

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18993

研究課題名(和文)ラット摘出灌流心臓における心筋収縮動態の高速高精度解析

研究課題名(英文)High-precision analysis of myocardial contraction mechanism in rat isolated perfused heart.

研究代表者

照井 貴子(Terui, Takako)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10366247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年のイメージング技術を駆使し、蛍光色素などを用いて蛍光タンパク質を発現させることにより、心臓の心筋線維の最小ユニットである心筋サルコメアの収縮動態のイメージング(Z線イメージング)を高い時間・空間分解能でライブイメージングできる技術を開発し、生体内の心筋収縮・弛緩をナノレベルで可視化し、心筋の収縮・弛緩の分子メカニズムの解明をねらう。
in-vitroからin-vivoイメージングへ研究を進めていく上で、非常に重要なex-vivoイメージング装置を用いて、心筋サルコメアとCa²⁺動態を組み合わせ、擬似生体内での心筋サルコメアの収縮・弛緩動態の解析を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学・医学研究において生体内の様々な制御メカニズムを解明するためには、in vitroのみならずin vivoでの分子メカニズムの解明が待たれるが、心筋研究においては、心臓自体が常に拍動し続けている臓器であるため、その技術的な難しさからin vivo研究はほとんど行われていない。in-vitroからin-vivoイメージングへ研究を進めていく上で、非常に重要なex-vivoイメージング装置を開発し、本研究をより実質的かつ装置系に段階性を持たせて進められ、ex-vivoイメージング装置を実際に使用し、擬似生体内での心筋サルコメアの収縮・弛緩動態を解明できる装置系と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Numerous studies have been conducted in isolated tissues and cells to elucidate the molecular mechanisms of myocardial contraction. However, our knowledge is still limited on the dynamics of myocardial sarcomere contraction in the heart of living animals. In the present study, we developed a novel system enabling us to conduct the imaging of a single sarcomere in the rat isolated perfused heart. We expressed GFP at Z-disks (α -actinin-GFP) in the heart by using the adenovirus vector system, and conducted imaging of the movement of a single sarcomere. In order to estimate the magnitude of regional myocardial movement, we imaged voltage-sensitive dye on the beating isolated heart. We successfully observed striations along cardiomyocytes in the isolated perfused heart. Moreover, we generated the ex-vivo imaging system with two different images of an object through a single video camera.

研究分野：循環生理

キーワード：循環生理

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

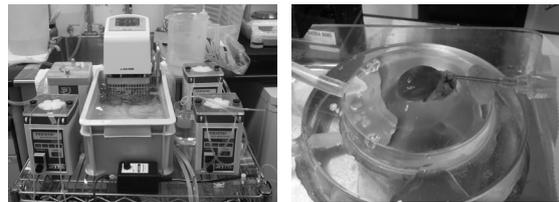
近代的なイメージング技術、特に GFP やルシフェラーゼを発現させた細胞を個体内で観察する方法はこの10年で急速に発展している。循環器研究分野では、2006年に米国の Tallini らがマウス個体内の心臓において Ca^{2+} 濃度を測定することに成功している①。しかしながら、これらの研究は細胞全体を観察するものであり、細胞内の分子の動きに着目した研究はなされていない。本研究では、1分子計測技術を活かして、ラットやマウス個体内の心筋細胞のサルコメア（すなわち、分子集合体）の動きを、高い時間・空間分解能で計測する。In vivo イメージングすなわち生きた個体では、コントロール困難なパラメータ・因子（血中 Ca^{2+} 濃度、ペーシングによる心拍数変調、呼吸、血液 etc...）があるほか、蛍光物質などは生体内に投与しては悪影響を来しうるため、これらの系を用いた研究は困難を極める。この点に関し、擬似生体内条件ではあるが、ex vivo イメージング装置を用いて研究することで、先述のあらゆる実験系を用いた新たな収縮・弛緩のメカニズム解析が可能になると考えられる。ex vivo および in vivo イメージング装置を用いて、生体内の心臓収縮期・拡張期における心筋サルコメア動態の解明、収縮・弛緩以外に加えた詳細なサルコメア動態の解明を目指す。

2. 研究の目的

心臓の心筋線維の最小ユニットであるサルコメアの収縮動態を in vivo および ex vivo でライブイメージングできる技術を開発することで、生体内の心筋収縮・弛緩をナノレベルで可視化し、心筋の収縮・弛緩の分子メカニズムの解明をねらう。

生命科学・医学研究において生体内の様々な制御メカニズムを解明するためには、in vitro のみならず in vivo での分子メカニズムの解明が待たれるが、心筋研究においては、心臓自体が常に拍動し続けている臓器であるため、その技術的な難しさから in vivo 研究はほとんど行われていない。しかし、近年イメージング技術が急速に発展しており、当研究室でもナノレベルでの分子メカニズム解明が可能となりつつある。明るい蛍光（ローダミンの約1,000倍）を長時間（最大約1時間）発する量子ドット（Qdot）を用いて、心筋サルコメアのZ線の成分である α アクチニンの抗体とQdotの複合体をトランスフェクション試薬と混合し、これを単離したラットの心室筋細胞に導入した。その結果、サルコメアのイメージング（Z線イメージング）を高時間（ ~ 2 ms）・空間（ ~ 5 nm）分解能で行うことに成功している。

In vitro から in vivo イメージングへ研究を進めていく上で、より実質的かつ装置系段階性を持たせて様々な検討を行うため、非常に重要な ex vivo イメージング装置を行っている。ラット摘出心を用いてランゲンドルフ灌流下に顕微鏡観察ができる ex vivo イメージング装置を構築した（図1）。心臓へ灌流しながら、顕微鏡観察できるため、灌流条件を変化させた際の心臓細部の変化を、可視化および評価することができ、様々な検討を行うことが可能となった。



<図1 Ex vivoイメージング装置概要>
左：灌流装置のポンプ部分。ラット心臓に灌流しながら、蛍光顕微鏡で観察できる。右：顕微鏡上で実際に、灌流しながら観察しているラット心臓。拍動を維持している。

これらの装置系を駆使し、心筋収縮・弛緩のメカニズムを細胞内のナノレベルの動きから、心拍に合わせた拍動に至るレベルまで、詳細にわたり解析を行う。

本研究では、疑似生体内でのナノレベルのイメージング情報に現行の生体内の循環パラメータを組み合わせて、より詳細な心臓の収縮・弛緩動態の分子メカニズムや病態メカニズムを探る。以下の事象を明らかにする。

I 心臓収縮期・拡張期におけるリアルタイムサルコメア動態の解明

1 心拍の間、心臓がナノレベルでどのように収縮・弛緩しているのか、心臓の収縮期・拡張期に心筋細胞はナノレベルでどのような挙動をとっているか、現行の装置系においては空間分解能が低く、未だ詳細不明である。本研究では、ex vivo イメージング装置を用いて、心筋細胞はどのように収縮・弛緩しているのかサルコメアイメージングと心電図情報などを融合して行うことにより、ナノレベルの収縮・弛緩動態を可視化する。

II 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と心筋細胞動態の関連性の可視化

これまでの数々の研究により、心筋細胞内での Ca^{2+} 濃度変化（ Ca^{2+} スパーク、 Ca^{2+} ウェーブ、 Ca^{2+} トランジェントなど）が指摘され、不整脈発生との関連について指摘されているが、明確な発生動態などは未だ可視化および解明されていない。Ex vivo イメージング装置を用いて、心臓・心筋細胞自体を蛍光指示薬など様々な条件に設定することができ、さらに血行動態すなわち灌流条件についても多様に変化させ、これらの解明を行う。

3. 研究の方法

Ex vivo 心筋ナノイメージング技術の改良：これまでに得られたナノイメージング技術を小動物（ラット）摘出心臓に応用する。心筋の収縮弛緩の分子メカニズムを明らかにするためには、特定の分子の動きを動物個体内で観察する必要がある。この考えに基づき、以下に挙げる解析を行う。

研究協力者である福田の研究室では、心筋サルコメア、主に心筋線維のZ線のイメージングを

行うため蛍光タンパク質の生体内発現を検討しており、現在心筋の Z 線成分である α アクチニンと蛍光タンパク質 (EGFP) を融合させた遺伝子組換えウィルスベクターを作製している他、拍動下の局所心筋のナノレベルの動態を高空間分解能でとらえるため、高速位置フィードバック (ピエゾモーター) を用いてリアルタイムイメージング可能となる実験設備を整えている。心筋サルコメアに蛍光タンパク質を発現させることにより、より鮮明に心筋サルコメアは蛍光顕微鏡で描出できると考えている。これまでにラット心臓に α アクチニン-EGFP の発現が可能であることが確認できており、今後 *ex vivo* イメージングへ応用していく。また、膜電位感受性色素は、細胞膜の電位変化に応じて吸光および蛍光の変化を来す色素であり、近年様々な領域の研究で用いられている。心筋細胞では、細胞膜すなわち T 管に集積し、その T 管は心筋サルコメアの Z 線に非常に近く存在しているため、サルコメア構造の解析にも広く用いられている②。申請者は、*ex vivo* イメージング装置を用いて、膜電位感受性色素により、サルコメア構造のイメージングを行い、心筋細胞の収縮様式の詳細、また、 Ca^{2+} 濃度変化のない状態での心筋細胞の動態についての検討を行っている。ラット摘出心イメージングシステムを確立させたのち、拍動下に膜電位感受性色素である di-4-ANEPPS を使用し、心筋サルコメア (T 管) イメージングは可能であり、*ex vivo* イメージング装置を用いて、さらに心筋収縮・弛緩動態について検討していく。

Ex vivo イメージングシステムを用いた心拍制御下での心筋収縮弛緩動態の解析： Ca^{2+} 濃度変化に依存しない心筋細胞動態で、すなわち、拍動が存在しない条件 (心静止) あるいは心拍をコントロールした状態で、サルコメア長変化が生じるか否か、そして、どのように心拍は再開するのか、心筋収縮動態を検討するため *ex vivo* イメージング装置により、薬剤投与を行い心拍制御下に検討する。心拍を制御する薬剤の例として、まず、臨床的に一時的に心拍を抑え、心静止とし、不整脈診断にも用いられる ATP (アデノシン三リン酸) を使用する。ATP は脱リン酸化されたアデノシンとして作用し、心臓の房室伝導を抑制し、心拍を停止することが可能である。また半減期が非常に短く (約 10 秒)、速やかに失活されるため、可逆的な心静止の状態を得ることができる。ラット摘出心による *ex vivo* イメージングシステムを構築し、既に拍動下に ATP を灌流させた予備試験を行っている。心静止より拍動再開するまでの間に、心拍よりも早くサルコメアの動きが観察されており、刺激伝導系とは別のメカニズムによる心筋細胞の動きと考えられる。この現象が Ca^{2+} ウェーブなどの細胞内 Ca^{2+} 動態によるものなのか、細胞レベルで確認されている現象である心筋サルコメアの自励振動 (SPOC) であるかどうか、カルシウム感受性色素 (Fluo 4AM) などを用いてさらに検討を行い、詳細な心筋の収縮・弛緩のメカニズムの解明に迫る。また、 β アドレナリン受容体遮断薬を用いて心拍を制御することにより、同様の検証を行う。

4. 研究成果

ex vivo 心筋ナノイメージング装置の改良：

心筋の収縮弛緩の分子メカニズムを明らかにするためには、特定の分子の動きを動物個体内で観察する必要がある。これまでに得られたナノイメージング技術を小動物 (ラット、マウス) *in vivo* に応用し、生体内での心筋収縮・弛緩のメカニズムの解析を行う前段階として、ラット摘出心を用いてランゲンドルフ還流下に顕微鏡観察ができる *ex-vivo* イメージング装置を構築した。先述の膜電位感受性色素で心筋サルコメアの描出条件の見直しをはかるとともに、心筋サルコメア、心筋の Z 線/Z 線付近に存在するタンパク質 (α アクチニン) と蛍光タンパク質 (EGFP) を融合させた遺伝子組換えウィルスベクターを用いて心筋サルコメアに蛍光タンパク質を発現させることにより、より鮮明に心筋サルコメアを蛍光顕微鏡で描出できると考えている。

2 光路系イメージングシステムの拡充：

これまでのイメージング装置の蛍光顕微鏡部分に、2 つの蛍光波長を切り替えて蛍光観察ができるイメージング装置 (2 光路系) を慈恵医大細胞生理学講座福田研究室との研究協力の上、構築を行った。この 2 光路系イメージング装置を使用することで、これまでの蛍光観察に加え、より踏み込んだ観察が可能と考えられ、*ex-vivo* 還流システムと併用することで、心臓の収縮・弛緩に関する動態に関する解析が加速すると考えられる。膜電位感受性色素によるサルコメアの動き (T 管イメージング) と Ca^{2+} 感受性色素による Ca^{2+} イメージングを行うことを念頭に、従来保有のイメージングシステムだと、2 光路系観察において、2 つの光路での位置精度が不十分と考えられ、最終年度は 2 光路系の観察を高精度で行うため、解析ソフトの精度拡充を行った。

<引用文献>

- ① Tallini YN, et al. Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: Cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006 ;103(12):4753-8.
- ② Bub G, et al. Measurement and analysis of sarcomere length in rat cardiomyocytes *in situ* and *in vitro*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010;298(5):H1616-25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kobirumaki-Shimozawa Fuyu, Shimozawa Togo, Oyama Kotaro, Kushida Yasuharu, Terui Takako, Ishiwata Shin'ichi, Fukuda Norio	4. 巻 2018
2. 論文標題 Optimization of Fluorescent Labeling for In Vivo Nanoimaging of Sarcomeres in the Mouse Heart	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/4349170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimozawa T, Hirokawa E, Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Shintani SA, Terui T, Kushida Y, Tsukamoto S, Fujii T, Ishiwata S, Fukuda N.	4. 巻 124
2. 論文標題 In vivo cardiac nano-imaging: A new technology for high-precision analyses of sarcomere dynamics in the heart.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Prog Biophys Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbiomolbio.2016.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----