

令和 4 年 8 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06878

研究課題名(和文) 心筋興奮収縮連関のin vivoナノ解析

研究課題名(英文) In vivo nano-analysis of cardiac excitation-contraction coupling.

研究代表者

小比類巻 生 (Kobirumaki-Shimozawa, Fuyu)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40548905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に開発した高空間・時間分解能を持つin vivo共焦点顕微鏡システムを使用して、心筋細胞内の収縮装置の分子情報を抽出することにより、心臓拍動の階層原理の一端を解明した。生きたマウスの心筋細胞内の構造をナノメートル精度で測定することにより、筋原繊維に含まれる個々のサルコメア長にはばらつきがあり、筋原繊維の収縮に同調しているサルコメアと同調していないサルコメアが混在している。同調しているサルコメアの割合が高いほど左心室圧も高くなることを示した。本研究では、ナノ計測を利用することにより、サルコメア同調性が心筋の収縮力を調節しているということを世界で初めて発見し、その成果の論文を出版した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウスin vivo心臓の各部位から心筋細胞内の分子情報(サルコメア長等)を、ナノメートル・ミリ秒スケールで解析してin vivoにおけるサルコメア同調性の変調をナノスケールで明らかにすることにより、正常および抑圧状態の心臓を生理学的分子論に基づいて定量化・明確化することに成功した。この成果を心疾患に応用し、各心疾患におけるin vivo興奮収縮連関の変化をナノスケールで定量化することができれば、心筋症発症の分子メカニズムの解明とそれに続く心臓のマクロ機能を正常化させる治療法の開発などに貢献し、将来的には心疾患の死亡率を劇的に低下させる「心臓ナノ医学」の創成につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Using our proprietary in vivo confocal microscopy system with high spatial and temporal resolution, we have succeeded in elucidating one aspect of the hierarchical principle of cardiac beating by extracting molecular information on the contractile apparatus in cardiomyocytes, specifically the sarcomere length in beating myocytes of living mice. By measuring sarcomere lengths at the nanometer scale, they found that individual sarcomere lengths in myofibrils varied, with a mixture of sarcomeres that were tuned to myofiber contraction and sarcomeres that were not. By using nano-measurements, they discovered for the first time in the world that sarcomere entrainment regulates myocardial contractility, and published a paper on their findings (Kobirumaki-Shimozawa et al., 2021).

研究分野：細胞生理学

キーワード：サルコメア in vivoイメージング 心筋 ナノ計測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景：心臓は周期的に激しく動くため、*in vivo* ではリアルタイムでの細胞内分子情報の抽出が他の臓器に比べて困難であり、現在でもほとんどの分子研究が生体内の環境とは異なる条件の下で行われている。しかしながら、生体(個体)では、個々の心筋細胞が周囲と三次元的に接着しつつ立体的に配置し、さらに自律神経系やホルモン等の調節を受けているため、培養系・単離細胞系では再現できない臓器の中での分子動態の詳細な解析が求められていた。
2. 研究の目的：*In vivo* 心臓における心筋収縮は運動細胞に特異的なタンパク質群によって担われ、制御されている。心疾患の分子メカニズムを正確に解明するためには、分子から個体までの階層性を通じた心臓拍動のメカニズムを、系統的に、かつ生理学的な観点から見た分子機能の考え方に基いて解き明かす必要がある。本研究では、研究代表者らが独自に開発した世界最高精度の *in vivo* ナノイメージング顕微鏡を用い、マウス *in vivo* 心臓から心筋細胞内のサルコメアや Ca^{2+} 濃度の動的情報を高精度・リアルタイムに抽出し、細胞レベルでの興奮収縮連関と心臓のマクロ機能との関連をナノスケールで、かつ系統的に明らかにすることを目標とした。
3. 研究の方法
 - 1) 研究代表者らが独自に開発したマウス *in vivo* 心臓のナノ計測システムを用いて、生きたマウスの拍動中の左心室において、サルコメアを 20 nm・10 ms の精度で撮影し、サルコメア長動態の解析を行った。具体的には、 α -Actinin-AcGFP をコードするアデノウイルスベクターを用いて、左心室表面の心筋細胞の Z 線を AcGFP 標識し、スピンドイス型共焦点顕微鏡を用いて高速撮影(100 fps)を行った。動画データから Z 線の位置を 20 nm の精度で測定し、個々のサルコメアの動きがどのように LV 筋細胞の組織的収縮を生み出すかを *in vivo* マウスにおいて系統的に検討した。LVP のレベルが異なるマウスにおいて、直列に繋がった個々のサルコメア(最大 35 個)、マウス心筋の筋原線維のほぼ全長にわたって、生理的条件下での個々のサルコメア動態を解析した。
 - 2) 膜染色試薬(CellMask)を用い、マウス *in vivo* 心臓において心筋細胞の構造である T 管および介在板の動態をナノ解析した。
 - 3) *In vivo* ナノ計測システムに 2 光路系を導入し、T 管(CellMask)と Z 線(α -Actinin-AcGFP)の同時イメージングを行った。また、サルコメア長(α -Actinin2-TagRFP)と Ca^{2+} 動態(α -Actinin2-GCaMP)の同時撮影も試みた。
4. 研究成果
 - 1) アデノウイルスベクターを用いて α -Actinin-AcGFP を発現させた C57BL/6 マウスの左心室心筋細胞(図 1 A)において、サルコメアの動的挙動に着目し、個々のサルコメアの動きがどのように左心室筋細胞の組織的な収縮を生み出すかを、マウス *in vivo* 心臓において系統的に調査した。その結果、拍動中の心筋細胞では、一本の筋原線維における個々のサルコメア長(SL)にはバラツキが存在するが、平均すると左心室の圧波形とよく同調することが確認された(図 1 B)。次に、筋原線維のダイナミクスに対する個々のサルコメアの寄与の大きさを定量化するため、サルコメアと筋原線維の動きの相関を示す「寄与係数、contribution index (CI)」という新しいパラメーターを導

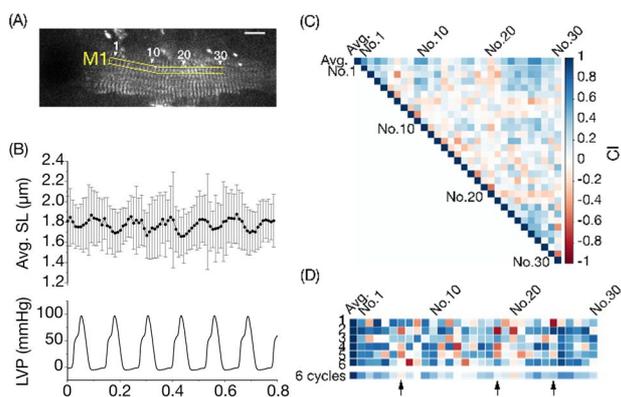


図 1 : A) *In vivo* 心筋ナノイメージングにて撮影した拍動中のマウス心筋細胞の蛍光顕微鏡像。黄色で囲った部分が ROI。B) 上段は ROI で示した 30 サルコメアの平均値の経時変化。下段は同時に測定された左心室圧の経時変化。C) 平均サルコメア長と個々のサルコメア長間の CI とサルコメア同士の CI を表すヒートマップ。D) 平均サルコメア長との CI、6 周期分のヒートマップ。Kobirumaki-Shimozawa et al., *JGP*, 2021 より引用。

入した [CI: -1 (完全非同期) ~ +1 (完全同期)] 筋原線維上に直列に並んだ 30 個のサルコメアについて、平均サルコメアに対する CI および隣接する他のサルコメアに対する CI をヒートマップで表すことによって、各単一サルコメア間の同期の大きさを可視化した。その結果、CI の値はサルコメア間でばらつきが大きく、正常収縮期の平均 CI は約 0.3 であった (図 1C)。このことは、筋原線維におけるサルコメアは一律に収縮に貢献しておらず、収縮期に収縮しない ($0.2 > CI > 0$) または伸展するサルコメア ($CI < 0$) が存在することを示している。また平均サルコメア長に対する個々のサルコメアの CI を心周期ごとに 6 周期分に分けてヒートマップに表したところ、収縮に貢献するサルコメアと貢献しないサルコメアは固定されているものではなく、心周期毎に入れ替わっていることが明らかとなった (図 1D)。

同一マウスの筋原線維内で連続する 30 個のサルコメアの 6 心周期分の間で得られた平均値を用いて、CI、SL (拡張期 SL と収縮期 SL の差)、拡張期 SL と収縮期 SL との関係性を解析したところ、CI と SL の間 ($R=0.66, P<0.001$) (図 2A) および CI と拡張期 SL の間 ($R=0.41, P<0.05$) (図 2B) に正の線形関係が認められたが、CI と収縮期 SL との間には認められなかった ($R=0.12, P>0.05$)。このことから、収縮性の高いサルコメア、そして拡張期のサルコメア長が長いほど、同調性も高い傾向にあることが分かった。

直列に繋がって隣接するサルコメア間の動きは非同期的 ($CI < 0$) であるが、一つ離れて隣のサルコメアおよび遠く離れたサルコメアは筋原線維に沿って同期的 ($CI > 0$) に動くことが分かった (図 2C 左下)。隣接サルコメア間 (No.0 と 1 の間) の CI は平均サルコメアに対する CI に対して有意な線形関係を示し、筋原線維全体ではサルコメアの同期が保たれていることが示された (図 2C 右下: $R=0.50, P<0.001$)。さらに LVP の変化と CI の関係について調べたところ、LVP が高くなれば $CI > 0.2$ の筋原線維全体の収縮に貢献するサルコメアの割合が増加し、LVP が低下すると低下した (図 2D: $R=0.90, P<0.001$)。LVP を 10 mmHg 以下に下げると、拡張期のサルコメアは伸長した。このとき、隣接するサルコメア間の運動は著しく同期が悪く ($CI, -0.3 \sim -0.4$)。その結果、平均 CI は LVP の低下に伴い線形性に減少した (図 2E: $R=0.93, P<0.01$)。これらの結果から導出される知見は、その構造的必然性ゆえ、*in vivo* 心臓においてはサルコメアの長さにはバラツキが生じている、ということである。拡張期に短いサルコメア (図 3A: 4 番のサルコメア) は収縮期に伸展され、それによってタイチン依存性静止張力が上昇し、次の拡張期に短縮する。この位相のズレを利用する形で、1 番 ~ 3 番と 5 番のサルコメアの動きは同調する (図 3A)。一方、低収縮状態では、最大サルコメア長はより長い範囲へとシフトした。これは、血液のうっ滞による心室の拡大に伴うものと考えられる。マウスの心室には分子量が比較的小さな N2B タイチンが発現しているが、N2B タイチンに基づく静止張力はサルコメア長が $2.2 \mu\text{m}$ を超えると急激に上昇する。したがって、十分に伸長したサルコメアにわずかな伸長を加えるだけで、内向

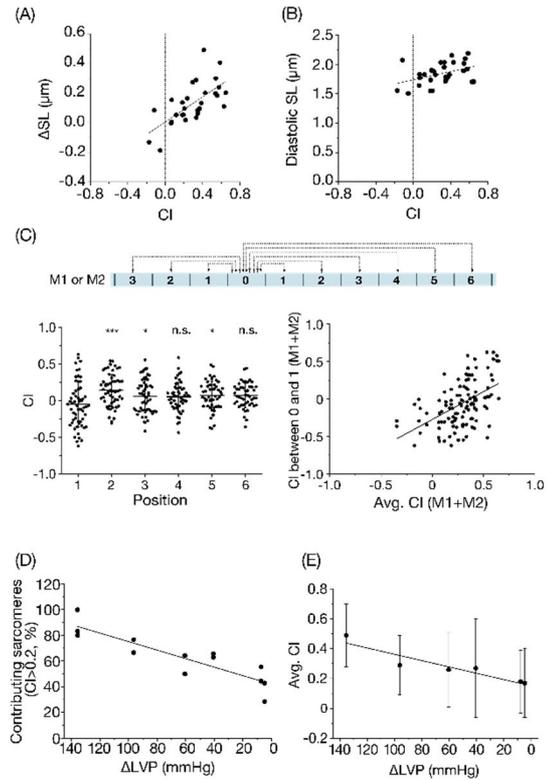


図 2: A) 個々のサルコメアの平均 CI と SL の間の関係 ($R=0.66, P<0.001$)。B) 個々のサルコメアの平均 CI と拡張期 SL の間の関係 ($R=0.41, P<0.05$)。C) 上)筋原線維上に直列に並んだサルコメア間の模式図。左下)位置 0 のサルコメアと隣接サルコメア (位置 1 ~ 6) 間の CI の分布。右下)隣接サルコメア間の CI と平均サルコメアに対する CI との線形関係。D) $CI > 0.2$ のサルコメア (貢献サルコメアの割合) と LVP の関係。E) 平均 CI と左心室圧の線形関係。Kobirumaki-Shimozawa et al., *JGP*. 2021 より引用。

きのタイチン依存性静止張力が上昇し、アクトミオシンによる活性張力を超える可能性が高い。これを踏まえると、低収縮状態に置かれた筋原線維では、2番、4番のような長いサルコメアは、1、3、5番の“より短いサルコメア”よりも大きな活性張力を生み出し、すなわち筋長効果を介して大きく短縮する。すると、短かった1、3、5番は収縮時に伸長し、タイチンが伸展されて大きな静止張力が発生する。次の拡張期に入ると、1、3、5番がその大きな静止張力によって急激に短縮し、隣のサルコメア2番、4番が伸展され、サルコメア間の非同期運動が発生するものと推察される(図3B)。これらの結果から、マウス生体内における拍動中の左心室に関し、申請者は以下の結論を得た：同一筋原線維に存在するにもかかわらず、隣接するサルコメア間では、活性張力とタイチン依存性静止張力の不均衡によって各サルコメアの運動にランダム性が生じる。低収縮状態ではサルコメアが伸展されてタイチン依存性静止張力が著しく上昇するため、サルコメア間の力の不均衡がより顕著となる。遠位のサルコメア間相互作用を通じてサルコメア運動に同調性が生まれ、それが筋原線維の収縮性と協調することで左心室のポンプ機能を制御している。以上、本研究では、ナノ計測を利用することによって、サルコメアの同調性が *in vivo* 心臓のポンプ機能を調節しているという全く新しい知見を得た。これらの研究成果を論文にまとめて発表した(Kobirumaki-Shimozawa et al., *J Gen. Physiol.*, 2021)。

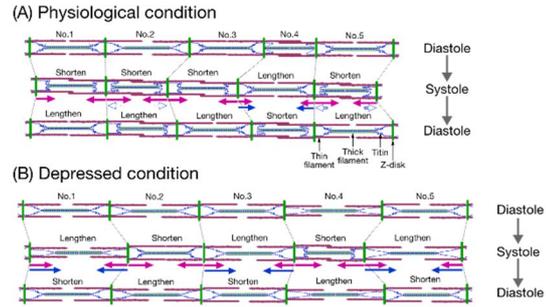


図3：A) 生理的条件下でのサルコメア同調性。B) 低収縮状態でのサルコメア同調性。Kobirumaki-Shimozawa et al., *JGP*, 2021 より引用。

この論文は *Journal of General Physiology* 誌のコメンタリーに取り上げられた(Helmes and Palmer, *J Gen Physiol.*, 2022)。また、第99回日本生理学会大会のシンポジウムにおいても成果発表を行った。

2) 細胞膜染色試薬 CellMask を用いて *in vivo* 心筋細胞の細胞膜を染色する手法を確立し、心筋収縮に不可欠な構造であるT管と介在板の *in vivo* 心臓における動態を解析した。CellMask で染色した介在板のリアルタイム共焦点イメージングを *in vivo* マウス心臓で行った結果、マウス心筋細胞の介在板の構造は、従来考えられていたよりも柔軟であることがわかった。実際、細胞から細胞へ収縮が伝搬する際に介在板が著しく屈曲することが観察された(図4A)。介在板の長さの変化は30~42 μm で(変化の大きさは約30%)あった。CellMask で染色した介在板(黄色)と細胞幅を表す線(緑)の中心のズレを「ずれの距離」としたとき、負の値は細胞1側、正の値は細胞2側になり、負のピーク値は-1.9 μm 、正のピーク値は5.4 μm であった(図4B)。介在板の長さの時間変化を、細胞幅方向の長さと比較して解析すると、図4Aの収縮が伝搬する間に、介在板の長さは約12 μm も変化することが分かった。その後で2つの細胞の接合部で測定された細胞幅が変化するが、この場合介在板の長さが約30%も変化していることから、収縮が隣接する筋細胞へ伝搬する柔軟性を示している(図4C)。一方で、-Actinin-AcGFPの追跡では、介在板付近のtransitional junctionの横方向の変化は比較的小さかった(変化の大きさは約20%)。この結果は、正常なZ線は比較的強固な構造

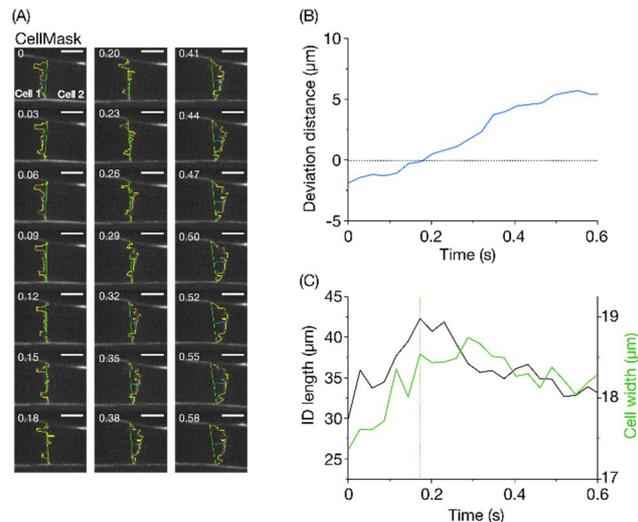


図4：A) 様々な時刻における CellMask 染色した介在板の共焦点顕微鏡像。介在板を黄色、心筋細胞の幅を緑、緑の縦線からの中心から見た中心部の介在板のズレを青の水平線で示す。心筋の収縮は左の細胞から右の細胞に伝搬している。B) 介在板の偏差距離の変化の時間経過。値は0.18秒で0になった。C) 細胞の幅と介在板の長さの経時変化。Kobirumaki-Shimozawa et al., *Nanomaterials*, 2020 より引用。

を持っているという考えと一致する。以上のことから本研究では、介在板内の細胞膜領域の構造が変化し、心臓内でゆらぎのある運動を見せることを発見した。介在板付近のZ線は以前から介在板の構造が折りたたまれていることが電子顕微鏡を用いた研究から判明しており、今回の発見は、介在板における細胞膜の折りたたみ/折りたたみ解除が、コネクシン43 (Cx43) に基づく電気伝導と協調して、ナトリウムイオンチャネル ($\text{Na}_v 1.5$) の活性化によるシナプスを介さない異所性のインパルスの乗り移りを加速する可能性を示唆するものであった。 研究成果は論文として発表した (Kobirumaki-Shimozawa et al. *Nanomaterials*, 2020)。

- 3) *In vivo* ナノイメージングシステムに2光路系 (W-view, Hamamatsu Photonics K.K.) を導入し、T管 (CellMask) とZ線 (β -Actinin-AcGFP) の同時イメージングを行った。FluoVoltを用いた実験では、染色された細胞膜の輝度が低く、現在の *in vivo* イメージングシステムでは必要な観察精度に届かないことが分かった。この結果は今後の光学システムの改良や試薬の運用を考える上で貴重な知見となった。マウスの *in vivo* 心筋細胞に

おいて、T管とZ線が並行していることが確認できた。*In vivo* マウス心臓において、細胞膜とZ線を同時観察可能な輝度で標識する方法を確立することができたことは今後の研究に大いに役立つ成果である。また Ca^{2+} 感受性タンパク質 GCaMP (β -Actinin-GCaMP) でのZ線の標識と CellMask による細胞膜の同時標識により、サルコメア長と局所 Ca^{2+} 濃度の同時イメージングも可能になったことで、今後、マウス *in vivo* 心臓における心筋細胞内局所 Ca^{2+} 濃度とサルコメア動態の関係を解析することが可能になるものと期待される。

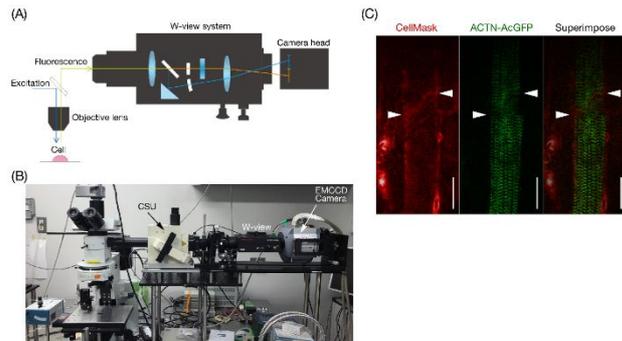


図4 : A) W-view システムの模式図。2つの異なる蛍光波長のイメージングを可能にする。B) *In vivo* イメージングシステムの全体像。共焦点スキャナユニット CSU と EMCCD カメラとの間に W-view が導入されている。C) (B) で撮影した共焦点顕微鏡像。左 : CellMask で染色された筋細胞膜。中 : AcGFP で標識された ACTN2。右 : CellMask と AcGFP を重ねた像。Bar : 20 μm 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fuyu Kobirumaki-Shimozawa, Togo Shimozawa, Kotaro Oyama, Shunsuke Baba, Jia Li, Tomohiro Nakanishi, Takako Terui, William E. Louch, Shini'chi Ishiwata, Norio Fukuda	4. 巻 153
2. 論文標題 Synchrony of sarcomeric movement regulates left ventricular pump function in the in vivo beating mouse heart.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 e202012860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.202012860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kobirumaki-Shimozawa Fuyu, Nakanishi Tomohiro, Shimozawa Togo, Terui Takako, Oyama Kotaro, Li Jia, Louch William E., Ishiwata Shin'ichi, Fukuda Norio	4. 巻 10
2. 論文標題 Real-Time In Vivo Imaging of Mouse Left Ventricle Reveals Fluctuating Movements of the Intercalated Discs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 532 ~ 532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano10030532	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 該当する
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 下澤東吾、小比類巻生、大山廣太郎、照井貴子、福田紀男	4. 巻 59
2. 論文標題 In vivo心臓ナノイメージング法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 009-013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小比類巻 生, 下澤 東吾, 大山 廣太郎, Li Jia, 中西 智博, 照井 貴子, Louch William E., 石渡 信一, 福田 紀男
2. 発表標題 サルコメア運動の同調性によるマウス左心室ポンプ機能の制御
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小比類巻生、下澤東吾、Li Jia、Louch William E.、石渡信一、福田紀男
2. 発表標題 In vivoナノイメージングによる心筋サルコメアの動態解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fuyu Kobirumaki-Shimozawa, Kotaro Oyama, Togo Shimozawa, Shin'ichi Ishiwata, Norio Fukuda
2. 発表標題 In vivo nano-analysis of the dynamics of individual sarcomeres in the beating mouse heart.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Psychological Societies congress in conjunction with The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小比類巻生, 下澤東吾, 大山廣太郎, 石渡信一, 福田紀男
2. 発表標題 In vivoマウス心筋における単一サルコメア動態のイメージング
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担者	照井 貴子 (Tarui Takako) (10366247)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

	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
研究 協力者	福田 紀男 (Fukuda Norio) (30301534)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	
研究 協力者	大山 廣太郎 (Oyama Kotaro) (70632131)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・その他部局 等・研究員 (32651)	
研究 協力者	下澤 東吾 (Shimozawa Togo) (00386608)	東京大学・理学部技術部・技官 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ノルウェー	Oslo University Hospital	University of Oslo		