

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19K08509  
研究課題名（和文）ミトコンドリアー筋小胞体ネットワークの破綻を介した心筋拡張障害の発症メカニズム  
  
研究課題名（英文）Mechanisms for the development of cardiac diastolic dysfunction in diabetic hearts; From the view point of Mitochondria-SR network.  
  
研究代表者  
都島 健介（Tsushima, Kensuke）  
  
東京大学・医学部附属病院・助教  
  
研究者番号：50436482  
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）：以下の2つの研究課題に取り組んだ。  
（1）超高圧電子顕微鏡を用いて、通常より厚い試料の3次元微細構造のイメージング：超高圧電子顕微鏡を用いて従来の10倍の厚さの心筋組織でも3次元構築に耐えられる解像度でイメージングを行い、3次元構造を再現する方法を確立した。  
（2）電子顕微鏡用に作成された標識タンパクAPEXをアデノ随伴ウイルスを用いて心筋に導入し心筋組織で微細構造を標識すること：心筋の酵素活性の高さからバックグラウンドの高い画像となっており、これからも改良が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
細胞を構成するオルガネラやタンパク質の3次元微細構造を理解すること、基礎研究だけでなく創薬などの臨床医学の発展に重要である。本研究で開発した手法で今後心筋の微細構造やその動態が明らかに成ることで、心不全における心筋のオルガネラや膜小胞構造の異常が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we tried following 2 aims.  
Aim1: To develop 3D imaging of cardiac tissue using Ultra high voltage electron microscopy. : Using an ultra-high voltage electron microscope, we have established a method to reproduce the three-dimensional structure of myocardial tissue that is 10 times thicker than conventional imaging at a resolution that can withstand three-dimensional construction.  
Aim2: To develop a labeling-protein using APEX2 to mark myocardial-associated membrane.: The image obtained had a high background due to the high ALP activity of myocardium. We need some improvement to decrease background.

研究分野：循環器病学

キーワード：心不全 ミトコンドリア 筋小胞体 超高圧電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高血圧などインスリン抵抗性を基盤とする生活習慣病は世界的に罹患率が高く、心疾患の合併が生命予後を規定する。インスリン抵抗性は心臓拡張障害の原因として重要で、冠動脈疾患とは独立して、拡張不全型心不全 (HFpEF: Heart Failure with preserved Ejection Fraction) の発症と深く関わっている。HFpEF は高齢化に伴い増加しているが有効な治療法は確立しておらず、病態解明と治療薬開発は急務である。我々は、インスリン抵抗性の心筋では脂肪酸利用が過剰に亢進し、ミトコンドリアの形態異常と機能不全を伴う拡張不全の病態を呈することを明らかにした(2018 Circ Res. 122:58)。本研究では心筋拡張不全の病態をミトコンドリア-筋小胞体ネットワークに着目して解析し、新規治療標的の発見を目指す。我々は電子顕微鏡 (電顕) の固定処理に耐えて酵素活性を保持し超微細構造を良好に標識する APEX (Ascorbate peroxidase) 技術を導入して、心筋微細構造の電顕 3次元イメージング技術を新たに開発する。

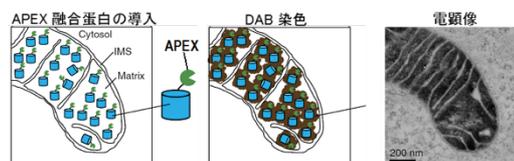
## 2. 研究の目的

心筋細胞は生まれてからすぐに分裂、増殖を停止し、外界からの刺激をうけてミトコンドリア、筋小胞体、T管を発達させ成長する。ミトコンドリアと小胞体(ER)は互いにERMES構造を介して物理的に近接し、細胞の生存に必須な  $Ca^{2+}$  やリン脂質の受け渡しが行われる(2017 NatRev Cardiol. 14:342)。また mTOR などのインスリンシグナル分子がERMESに局在し、ミトコンドリアの分裂やオートファジーもこの接点で始まることが知られ、細胞シグナルのハブとしての重要性が明らかになっている(2011 Science 334:358, 2013 Nature 495:389, 2013 PNAS 110:12526)。しかし、外界からの生理的ストレス、病的ストレスにこの構造体がどのように応答し細胞内シグナルに影響するか、その詳しい分子メカニズムについては理解されていない。本研究は、心筋の生体刺激による T管-筋小胞体-ミトコンドリアの微細 3次元構造変化を明らかにするイメージング技術を開発し、心筋におけるミトコンドリア-筋小胞体ネットワークによるシグナル伝達制御機構の解明することを目的として行われた。

## 3. 研究の方法

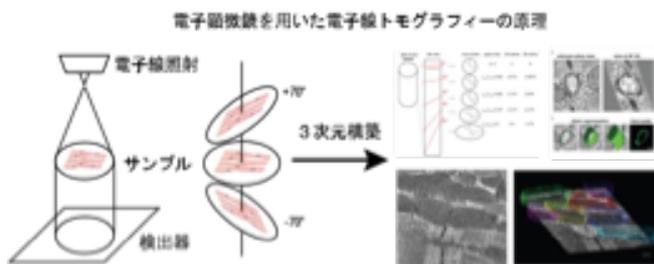
### (1) APEX2 を用いた電顕用標識プローブの開発、心筋組織への標識プローブの導入

APEX は 28kDa の単量体ペルオキシダーゼで電顕用固定処理を加えても酵素活性が失活せず、オルガネラや目的蛋白質の局在を同定するための電顕用標識タグとして活用されている(右図、Nat Biotechnol. 30:1143)。本研究では、ERMES に局在するタンパク質と APEX2 の融合タンパク質を作成し、電顕用ERMES標識プローブとして心臓組織で機能するか検討した。



### (2) 超高圧電子顕微鏡による厚い心筋切片の観察と 3次元構築

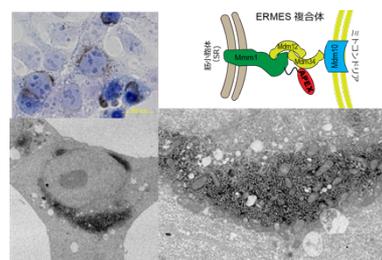
5-8 週齢の野生型マウスから心臓を採取し、大動脈から逆行性に 2% パラフォルムアルデヒドで還流し固定後に 2.5% グルタルアルデヒドで 1 日以上浸漬固定した。酢酸ウラニルでブロック染色を行い、800 nm 厚の心筋切片を超高圧電子顕微鏡を用いて観察し、電子線トモグラフィーによる 3次元構築も行った。また(1)で作成した APEX2 を用いて 3次元構造のイメージングも行う予定とした。



## 4. 研究成果

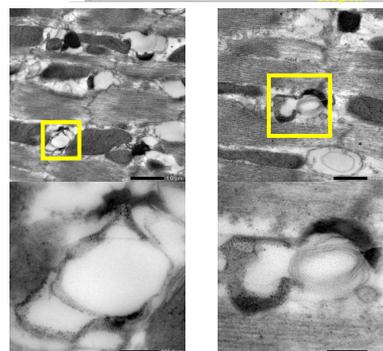
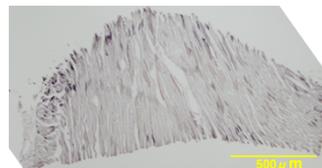
### (1) APEX2 (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ) を用いた電子顕微鏡標識プローブの開発と心筋組織への応用

①酵母ERMES複合体の構成タンパクMMM1のSMPドメインと哺乳類のタンパク質PDZD8のSMPドメインが機能的に相同であり、PDZD8がミトコンドリア-筋小胞体の繫留およびCa動態制御に重要であることが報告された (Science 358:623)。我々は、PDZD8-APEX2の融合タンパクの発現ベクターを作成し、HEK293T細胞を用いた予備実験でER膜の標識プローブとして活用できることを確認できたが、ERMESプローブとしての特異性については確認できなかった。



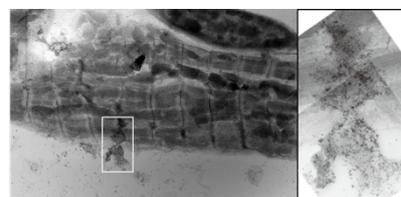
②次にこの PDZD8-APEX2 をアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いてマウス生体の心臓組織に導入した。AAV を感染後4週後にマウスから心臓を採取した。Western blot で融合タンパクの発現を確認した。0.8%グルタルアルデヒド・0.8%パラホルムアルデヒド・0.1M カコジル酸で固定した組織からビブラトームを用いて250 $\mu$ mのシート状切片を作成した。更に2mm程度の切片に細分しDAB/Ni染色後(右図上)、エポキシ樹脂包埋した。包埋した心筋シートから、DAB/Niが浸透している表面近傍のみ薄切し電子顕微鏡観察を行った。

右図下で示すようにミトコンドリア近傍で黒く染まる膜構造が認められた。しかし、(1)培養細胞と異なり、DABの組織への浸透が組織ブロックの表面に限定されている、(2)染色時間を長くすると培養細胞よりもバックグラウンドが遥かに高くなる、などの手法上の問題点に直面している。本手法の実用化のためには高いバックグラウンドをいかに抑え特異的なシグナルをわかりやすく描出するか、今後の課題として残されている。



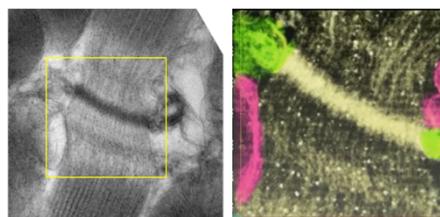
## (2) 超高压電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィー

通常の電子顕微鏡では電子線の加速電圧が120-200kV程度であり、観察する試料の厚さが50-100nm程度という制約があり、細胞内構造の3次元情報を捉えることは難しかった。今回我々は、電子線の加速電圧が1000kVを超える超高压電子顕微鏡を用いることで、通常の薄い切片では観察が難しかった細胞内の小胞構造の全体像を高い解像度で描出することが可能となった。



絶食48時間一摂食6時間の刺激後に心臓を回収し、通常の約10倍の厚さの800nmに心筋切片を調整し超高压電子顕微鏡で観察した。厚い切片の観察により、エキソソームが数珠状の管状構造をとり分泌蛋白が放出される全体像が観察された。

また、厚い心筋切片の観察により、今までは見えなかった構造体の発見にもつながっており、分泌タンパクを放出するために細胞内の膜構造が数珠状に連なって細胞外に分泌している構造体やZ-bandに沿って、線維性構造と蛋白質が集族している構造体が認識された。



800nmの厚さの心筋切片を観察することで、Zバンドの両側に今までは見過ごされていた新たな線維構造および蛋白質が集族したバンド状の構造体が存在することが認識された。また、電子線トモグラフィーによる3次元構造の観察も行った。

当初、超高压電子顕微鏡による電子線トモグラフィーをAPEX標識技術と組み合わせて、ERMES構造の3次元構造を明らかにすることを目的としていた。我々の検討では、APEX2の標識技術は培養細胞では特異性の高い良好なコントラストのイメージングが可能であったが、心筋ではバックグラウンドが高く特異性の点でも解決すべき課題が多く、現時点では実用化ができていない。心筋はミトコンドリアが豊富に存在しアルカリホスファターゼなど各種酵素活性が高いことが原因と考えている。この問題点を解決するために、酵素標識から蛍光標識に方法を変更し、光・電子相関顕微鏡法(CLEM)を心臓組織に応用することを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 都島健介
2. 発表標題 Molecular Mechanism of Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Lipotoxicity
3. 学会等名 国際心臓研究学会日本部会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------