

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300172

研究課題名(和文) 心筋組織の発達過程における筋線維構築と収縮特性の統合的解析

研究課題名(英文) Comprehensive Analysis of Structure and Contractile Performance of Myocardium during Development

研究代表者

清水 壽一郎(Shimizu, Juichiro)

広島国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80294403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：成体の心筋細胞は桿状で明瞭な横紋構造を持つ特徴があるが、ラット新生児単離心筋細胞の初代培養細胞あるいはES細胞からの誘導心筋細胞は星状細胞となり横紋構造も確認が困難である。そこで心筋組織の発達過程について、より詳細に解析するために、大型放射光施設Spring-8でのX線回折実験等を実施した。その結果、出生直後のラット心筋細胞は通常の収縮蛋白を持つがその配列が乱れており、成長とともに整ってくることを示した。

研究成果の概要(英文)：Isolated adult cardiomyocytes show rod shape with clear transverse striation pattern. However, isolated neonatal rat cardiomyocytes or induced cardiomyocytes of embryonic stem cells show star shape without clear transverse striation pattern. To analyze the development of structure of myofilament of cardiomyocytes, we performed x-ray diffraction analysis using Spring-8. We found that myofilament of neonatal rat heart had poor aligned myofilament lattice. The averaged inter filament lattice spacing was not so different during development over two weeks, deviation of interfilament lattice spacing was quite large at birth and decreased with development. We also considered how the poorly developed myofilament creates enough pressure to perfuse whole body. According to Laplace's law, small ventricle requires small tension to create the enough pressure. Then, the well aligned myofilament can provide enough pressure even in the well developed ventricle.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋線維 心臓 発達 X線回折

研究代表者である清水壽一郎は、心臓生理学、特に心筋の興奮収縮連関に関わる分野で研究を推進してきた。即ち臓器としての心臓の挙動を詳細に観察し、力学的エネルギー学的な解析あるいは理論的な解析を加え、心筋細胞内カルシウム動態の推測、心筋クロスブリッジ動態の推測を行ってきた。その結果、心筋細胞内カルシウム動態は心臓の容積に影響を受けず、心筋線維のカルシウム結合能も大きな変化を受けないこと、従って心臓の容積依存性の収縮力増加(Frank-Starlingの法則)はアクチン線維とミオシン線維との相互作用に大きく依存する可能性を示してきた。心筋のアクチン線維とミオシン線維との相互作用、即ちクロスブリッジ動態、を観察する手法はいくつか提案されているが、X線回折実験が最も生理的な条件下での観察方法であるものの、X線源の性能上の問題から乳頭筋標本を用いて相当数の収縮の加算平均によりようやく観察可能であった。しかし、世界最大の第三世代大型放射光施設であるSPring-8の供用に伴い十分な数の光子と波長・位相が良く揃ったX線源が確立され、ラットの心臓(厚さ10mm)を透過してのX線回折実験により単収縮のクロスブリッジ動態解析を行う条件が整った。そこで本プロジェクトの最終目標をラット心臓の発達過程における筋線維六角格子構造の構築について研究を進め、また左心室心筋クロスブリッジ動態の解析を主眼として行った研究成果について報告する。

1. 研究開始当初の背景

誘導多能性細胞や胚性幹細胞を用いた再生医療についての研究が盛んに実施されており、循環器領域でも心筋の再生を目指した研究が注目されている。特に、多能性幹細胞から誘導した心筋細胞やラット新生児単離心筋細胞を用いて、移植技術などを確立するための研究も行われている。一般に、成体の心筋細胞は桿状細胞で明瞭な横紋構造を持つことが最大の特徴として知られているが、誘導心筋細胞やラット新生児単離心筋細胞を初代培養すると基本的に星状細胞となり、収縮蛋白の規則的な構築に基づく横紋構造も位相差顕微鏡などでは確認は困難であり、蛍光染色等により筋線維を詳細に観察して始めて横紋構造が確認できることが多い。では、心筋細胞の筋線維の配列はどのように発達していくのかについて詳細に研究を行うこととした。

心臓の収縮タンパクであるアクチンおよびミオシンは、六角格子構造をとることが知られており、X線回折実験により筋線維の配向や格子間隔の計測が可能である。SPring-8の供用開始に伴い高輝度なX線源が利用可

能となった。十分な光量と良く揃った波長と位相から、乳頭筋のように筋線維が一方向に配列した厚みのない組織を用意しなくても、ラット摘出心標本での解析も十分に為しえる。

左心室が乳頭筋と大きく異なる点は、心筋線維の三次元配列である。乳頭筋では心筋細胞は長軸方向に整列しているが、左心室では心室壁の厚み方向に心筋細胞が層状に並んではいるがその方向は心外膜側から心内膜側へ向け連続的に変化していることが知られており、心筋線維の三次元配向とX線回折像との関係、および前負荷変化に対する心筋クロスブリッジ動態と心筋線維格子間隔との関係について解析はこれまでの研究ですでに実施し確立している。そこで、ラット心筋の出生後の発達過程について、様々な角度から解析した。

2. 研究の目的

ラット新生児の心筋組織の発達過程について、超音波、電子顕微鏡、X線回折実験により解析し、心筋線維の構築について定量的に解析する手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) ラット新生児の心臓形態評価

超音波診断装置(NemioxGRiニア式電子スキャンプローブPLM-1204AT、東芝、日本)を用いた。ラット新生児の誕生から3週間にわたり、左室前壁厚、左室内径、左室後壁径を計測した。ラット新生児14匹について、出生後にマーキングを行った。計測日はマーキングの番号順に、ラットを左手で把持しニアプローブを右手に持ち画像を確認、乳頭筋レベルのMモード像を撮影し、左心室拡張期末の左室前壁厚、左室内径、左室後壁径を計測した。計測後はエコージェルを丁寧に拭き取り、保温用チャンバーに移した。全てのラット新生児について計測を終了後、母ラットのケージへ静かに戻した。計測日以外はラット飼育室で自由に行動させた。

(2) ラット新生児左室壁心筋の電子顕微鏡像

ラット新生児の誕生から0日齢、4日齢、7日齢、11日齢、14日齢について、左室壁心筋標本を作製し、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。標本作製および撮影は岡山大学大学院医歯薬総合研究科に依頼した。

(3) 大型放射光施設 SPring-8での実験

標本設置 大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL40XU のチャンバー内に作成した心臓標本(ラット新生児摘出ランゲンドルフ灌流心標本)を持ち込み、X線ビームが左心室を前壁側から後壁側に抜けるようにマウントした。標本の作成法は以下の通りである。まず、誕生から0日齢、4日齢、7日齢、11日齢、14日齢のラット新生児をペントバルビタールの腹腔内投与(100mg/kg)にて深麻酔し、痛み刺激に反応がないことを確認した。反応がある場合はしばらく待機して再度確認し、それでも反応が認められれば麻酔薬を追加し上記の作業を繰り返した。痛み刺激に反応のないラット新生児をバットに固定し、心窩部から両腋窩線に沿って剪刀を入れ、剣状突起部分を鑷子で把持しながら胸骨柄付近で胸郭を切離した。胸腺を除去後上行大動脈にテーピングを施し、大動脈に切開を入れ24ゲージ留置針の該当を挿入し固定した。直ちにヘパリン加ランゲンドルフ灌流液で灌流を開始した。3分間灌流し左室内腔の血液を除去した後、2,3-BDM加ランゲンドルフ灌流液に切り換え心拍動を停止させ、BL40XUでの計測に供した。

X線回折実験 本研究に用いたX線のエネルギーは15.0 keVで、 7×10^{14} 個の光子の一部をアルミニウムに吸収させた後の 2×10^{12} 個の光子からなるビームを用いた。X線ビームのサイズは水平方向が0.25 mm、垂直方向が0.10 mmというサイズである。撮像はベリリウムイメージンシファイア(V5445P, Hamamatsu Photonics)をもった高速CCDカメラ(C4880-80-24A, Hamamatsu Photonics)を用いて記録した。記録は拍動を停止した心臓標本の左心室自由壁付近をX線ビームが通過するように設定し、撮像毎にX線の通過部位を200 μ mずつ右室側へシフトさせ撮影し、二重同心円状の回折像が見られたフレームについて解析を行った。

X線回折像の解析 X線回折像を解析する際には、X線ビーム位置を中心とし、回折像を30度ずつ12個のセクタに分割し、垂直軸は12時方向・6時方向のセクタを含むように設定した。心筋からのX線回折像は基本的にX線ビームを中心として点対称の関係を持つため、12時方向・6時方向のセクタのように対向する二つのセクタは結晶学的には等価である。また、骨格筋ではアクチン線維、ミオシン線維による六角格子構造からの赤道

反射のほか、アクチンやミオシンの線維の長軸方向の繰り返し構造からの子午反射、アクチンのらせん構造からの層線が観察されるが、心筋では赤道反射のうち(1,0)、(1,1)反射のみが観察される。各セクタ内の(1,0)、(1,1)反射を円周方向に積分して輝度分布曲線を得た後、背景放射を表す四次関数と(1,0)、(1,1)反射の分布を表す二つのガウス関数からなる曲線でカーブフィッティングし、それぞれのガウス関数の係数から(1,0)、(1,1)反射強度を求めた。この反射強度からそれらの比 $I(1,0)/I(1,1)$ からクロスブリッジ形成量を推定することができる。

また、(1,0)、(1,1)反射のピークの位置が筋線維六角格子の格子間隔を反映することが知られており、カメラ長、回折角、X線波長から筋線維格子間隔の平均値を求めた。また、ガウス関数の各係数から筋線維格子間隔のばらつきを指す指標として標準偏差を求めた。

4. 研究成果

新生児ラット左心室の前壁厚、内径、後壁厚の発達過程を図1に示す。

左室前壁厚、後壁厚は徐々にではあるが日齢の経過につれて有意に増加傾向を示している。また、左室内径についても同様に、日齢の経過につれて有意に増加傾向を示している。

電子顕微鏡像での心筋線維の状態を評価したが、定量的な比較が困難であるため0日齢および14日齢のラット新生児心筋標本の透過型電子顕微鏡像について比較した。0日齢ラット新生児心筋ではミオシン線維に

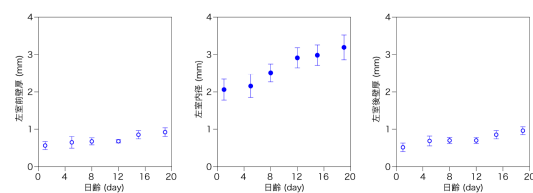


図1 新生児ラット左心室の前壁厚、内径、後壁厚の発達過程

左パネル：ラット新生児左室前壁厚、中パネル：左室内径、右パネル：左室後壁厚の経時的変化を示す。前壁厚、後壁厚については15日齢以降で、左室内径については8日齢以降で、1日齢の時と比較して有意差を認めている。



ラット新生児0日齢 心筋線維 ラット新生児14日齢 心筋線維

図2 新生児ラットの心筋線維透過型電子顕微鏡像
左パネル：ラット新生児 0 日齢における心筋線維の電子顕微鏡像。ミオシン線維に相当する黒い点は確認できるがその配列は不均一であり、また心筋線維の走行方向も不揃いである印象がある。右パネル：ラット新生児 14 日齢における心筋線維の電子顕微鏡像。ミオシン線維に相当する黒い点は六角格子状に配列している。

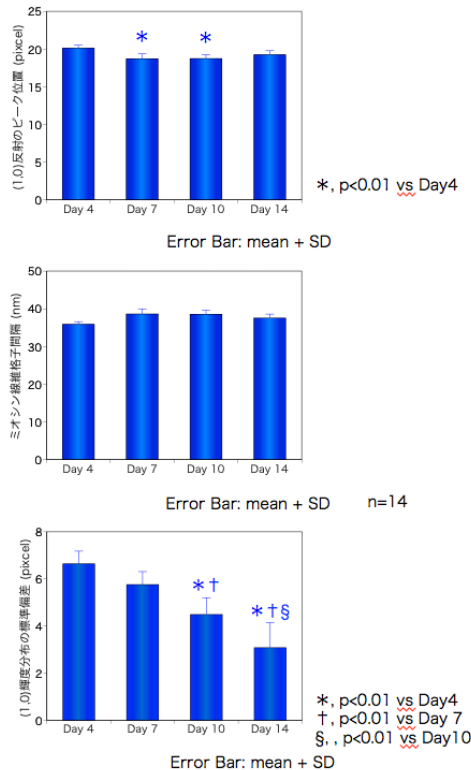


図3 X線回折による筋線維の状態

上パネル：ラット新生児摘出心における(1,0)赤道反射の位置、中パネル:(1,0)赤道反射から求めたミオシン線維格子間隔の平均値、下パネル(1,0)赤道反射をガウス関数によりフィッティングし得られた標準偏差。日齢によるミオシン線維の格子間隔の変化はほとんどないが、標準偏差としてみると大きく異なる。

相当する像が観察できるが、その密度は部位

により大きく変動している。また、配列は明らかに不揃いであり、一部では心筋線維の走行方向自体も不揃いである印象が強い。それに対し、14日齢ラット新生児心筋ではミオシン線維に相当する像は密度も均一であり、配列も大変良く整っている。また、心筋線維の走行方向自体も大きく変化している像は観察できず、ほぼ成体に近い状態であると考えられる。

図3にX線回折実験の結果を示す。上のパネルには各日齢のラット新生児心標本のX線回折像の(1,0)赤道反射の位置をカメラの撮像素素単位で解析した結果を示している。4日齢の(1,0)赤道反射の位置に対して、7日齢、10日齢では有意差が認められたが、14日齢では有意差が消失している。

中のパネルはX線回折像の(1,0)赤道反射の位置から回折角を導き、それを元にミオシン線維格子間隔を求めたもので単位はnmである。赤道反射の位置では有意差を認めていたが、ミオシン線維格子間隔としてあらためて分散分析を行うと有意差は消失しており、日齢にかかわらず基本的に同じ格子間隔を持つことを示している。

下のパネルは(1,0)赤道反射をガウス関数(正規分布関数)で近似し、得られた標準偏差を比較したものである。X線回折像での輝度分布は正規分布を示すが、その逆フーリエ変換により求められるミオシン線維の配列から求められる格子間隔のばらつきは非線形な関係であるため、あくまでもX線回折像上の値として画素数として統計解析を行っている。パネルを見て分かる通り、日齢を経る毎に標準偏差は著明に小さくなる。即ち、筋線維格子間隔のばらつきが小さくなっていく傾向が分かる。

ラットの心筋細胞は、出生後も二回ほど細胞分裂することが知られている。以前の実験でこの細胞に不死化遺伝子を導入したところ、細胞は何度でも分裂することが可能となった。一方、同じ遺伝子を成体から単離した初代培養細胞に導入したところ、筋線維自体の存在により分裂が阻害され、増殖に至ることはなかった。即ち、心筋細胞は増殖過程を終えてから、心筋線維の緻密な格子構造を発達させるものと考えられる。

では新生児期0~4日齢程度の未発達な心筋線維で、全身に血液を駆出するための十分な張力が発生できるのだろうか。ラプラスの法則に基づいて、張力を持った球体とその内圧の関係は、 $P = T/r$ の関係があることが知られている。ここで、Pは球体の内圧、T

は球体表面の張力、 r は球体の半径である。組織に血液を送るために必要な血圧は動物の大きさには依存せず、ほぼ 100mmHg 程度の血圧があれば十分であることは、過去の様々な動物実験から明らかである。従って、新生児期の必要な収縮期左心室圧も同程度であるとすれば、図 1 に示したように左室内径自体も出生後に単調に増大していくことから、必要な壁張力は半径の増大に伴って大きくなるのが分かる。つまり、出生直後の小さな心臓では未発達な心筋線維が発生する小さな張力でも十分に左心室圧を発生させることができ、日齢を重ねて心筋線維張力が増大しても左室内径も同様に増大するため左心室圧が極端に増大することもなく、安定した心機能を発揮させているものと考えられる。

左室内径の増大に比べ左心室壁厚はより緩やかな増加傾向を示しているが、出生後の初期の発達段階では、心筋細胞の肥大（筋線維量の増大）よりむしろ、筋線維の配列を整えることで発生張力を増大させている可能性が示唆されるが、その点については将来的に解決を図る予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Increased passive stiffness of cardiomyocytes in the transverse direction and residual actin and myosin cross-bridge formation in hypertrophied rat hearts induced by chronic α -adrenergic stimulation.

Sumita Yoshikawa W, Nakamura K, Miura D, Shimizu J, Hashimoto K, Kataoka N, Toyota H, Okuyama H, Miyoshi T, Morita H, Fukushima Kusano K, Matsuo T, Takaki M, Kajiya F, Yagi N, Ohe T, Ito H.

Circ J. 2013;77(3):741-8. Epub 2012 Dec 6. 査読あり

Effects of propofol on left ventricular mechanoenergetics in the excised cross-circulated canine heart.

Fujinaka W, Shimizu J, Iribe G, Imaoka T, Oshima Y, Kiyooka T, Morita K, Mohri S. Acta Med Okayama. 2012;66(6):435-42. 査読あり

Cardiac dysfunction and prolonged hemodynamic deterioration after implantable cardioverter-defibrillator

shock in patients with systolic heart failure.

Toh N, Nishii N, Nakamura K, Tada T, Oe H, Nagase S, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ito H.

Circ Arrhythm Electrophysiol. 2012 Oct;5(5):898-905. doi:

10.1161/CIRCEP.111.970285. Epub 2012 Jul 26. 査読あり。

Energy for myocardial Ca^{2+} handling per beat increases with heart rate in excised cross-circulated canine heart.

Kiyooka T, Oshima Y, Fujinaka W, Iribe G, Mohri S, Shimizu J.

Tokai J Exp Clin Med. 2014 Mar 20;39(1):51-8. 査読あり。

[学会発表](計 5 件)

ラット新生児の心筋六角格子発達過程についての基礎解析

竹内祐貴、中村一文、三浦大志、清水壽一郎 2011/10/22 第 34 回日本生体医工学会中国四国支部大会、徳島、日本

Increased Heart Rate Reduced Crossbridge Formation in Beating Rat Whole Heart

Yamato Tamura, Takehiro Miyasaka, Juichiro Shimizu 2012/1/5-7 IEEE-EMBS International Conference on Biomedical and Health Informatics (BHI2012), Shenzhen, China

Cellular basis analyses of afterload dependent increasing in crossbridge formation in ejecting

rat

Yamato Tamura¹), Takehiro Miyasaka²), Juichiro Shimizu 2012/10/26-27 The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, Fukuoka, Japan

Afterload dependent increasing in crossbridge formation in ejecting rat

Yamato Tamura, Kengo Horiuchi, Takehiro Miyasaka³), Juichiro Shimizu 2013/6/30-7/4 International Society for Heart Research, Sandiego, USA

Cellular basis analyses of afterload dependent increasing in crossbridge formation in ejecting rat heart

Yamato Tamura, Kengo Horiuchi, Takehiro Miyasaka, Juichiro Shimizu 2013/7/21-26 International Union of Physiological Science 2013, Birmingham, UK

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水壽一郎 (SHIMIZU JUICHIRO)
広島国際大学・保健医療学部・教授
研究者番号：80294403

(2) 研究分担者

中村一文 (NAKAMURA KAZUFUMI)
岡山大学・岡山大学病院・准教授
研究者番号：10335630

片岡則之 (KATAOKA NORIYUKI)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授
研究者番号：20250681

(3) 連携研究者

()

研究者番号：