

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26560225

研究課題名(和文) ナノ計測を用いた心疾患画像診断装置の基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of core technologies for heart diagnostic imaging apparatus based on nanoanalysis

研究代表者

福田 紀男 (Fukuda, Norio)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301534

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)：1)ラット培養幼若心筋細胞のZ線にCameleon-Nano140を発現させ、収縮の最小単位であるサルコメアの長さ変化を細胞内局所のCa濃度変化と同時にnm精度で解析することに成功した。2)マウスin vivo心臓から心筋細胞内のサルコメアの動きを高空間(20 nm)・時間(10 ms)分解能で捉えることのできるシステムを開発し、サルコメア動態と心電図および左心室内圧のリアルタイム同時観察に成功した。3) In vivo心臓の周期を17のフェーズに分割、各フェーズにおいて対物レンズを高速でZ軸方向に動かし、心周期のすべての時点において焦点の合っている動画を作成するシステムの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：1) We developed an experimental system for simultaneous nano-imaging of intracellular Ca dynamics and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes. We achieved this by expressing a fluorescence resonance energy transfer-based Ca sensor yellow Cameleon-Nano fused to α -actinin in order to localize to the Z disks. 2) We developed a high-speed (100 fps), high-resolution (20 nm) nano-imaging system for myocardial sarcomeres in living mice. During imaging, we measured macroscopic parameters such as electrocardiogram and left ventricular pressure. 3) We developed a digitally-controlled image reconstruction system for in vivo nano-imaging. Namely, the position of the objective lens was moved downward in the Z-direction during imaging. After experimentation, the LVP record was divided into 17 phases (i.e., 10.2 ms per phase); best-focused images were selected at each phase, and then, combined to obtain an image sequence.

研究分野：生理学

キーワード：ナノバイオ 先端機器デバイス 循環器・高血圧 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年の国内外の大型研究プロジェクトの成果により、分子研究は飛躍的に前進した。代表的な成果としては、ヒト、マウスなどの哺乳動物の全ゲノム解読と発現タンパク質の同定、タンパク質立体構造の解明、タンパク質1分子の振る舞いの仕組みの解明などを挙げることができる。また、ゲノム情報をもとに、多くのタンパク質の探索と局在が細胞生物学的研究によって明らかにされつつある。次のステップとして、生きた動物個体 (*in vivo*) の中で分子の振る舞いを可視化し、病態時、特に、超早期にどのような変化が生じるかを捉えることが待たれるが、国内、国外に関わらず、この方面の研究はほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

我が国における心疾患の死亡率は非常に高く、現在、癌に次いで第二位となっており、年々上昇を続けている。多くの心疾患は進行性をともなうため、心臓突然死のリスクを低下させ、患者の QOL (生活の質) を改善するためには、出来る限り早期に発見し、適切な治療を速やかに行うことが求められる。しかしながら、臨床で現在使用されている診断装置 (X 線-CT、MRI、超音波など) は精度が十分でないため、心疾患の超早期の段階で生じる心筋細胞内の微小な機能・構造異常を捉えることができない。本研究では、光学顕微鏡をベースとした最先端のナノ計測技術を小動物 *in vivo* 心臓に応用し、時間・空間分解能のいずれの面においても従来の診断装置をはるかに上回る、心疾患超早期画像診断装置の基盤技術の開発を行う。すなわち、心拍という周期的な“動き”の中から心筋細胞内ナノ情報を抽出し、興奮収縮連関のダイナミクスを可視化する基盤技術を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、光学顕微鏡を基盤とした最先端のナノイメージング技術を、小動物の心筋細胞や *in vivo* 心臓に応用し、蛍光像を解析することによって心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度やサルコメア長を測定した。以下に詳細をまとめる。

I) 心筋細胞を用いた実験：

我々は、ラットの培養幼若心筋細胞の Z 線 (α アクチニン) に AcGFP を発現させ、サル

コメアの運動を高精度で計測することのできる実験系を構築することに成功している (*J Gen Physiol* 2014)。本研究では、この実験系を改良し、 Ca^{2+} 濃度にもなって蛍光シグナルを変化させる FRET 型 Ca^{2+} センサー [Yellow cameleon-Nano140 (YC-Nano140)] をラットの幼若心筋細胞の Z 線に発現させた。そして、拍動中や電気刺激時、細胞内局所の Ca^{2+} 濃度と SL の同時計測を行った。

II) *In vivo* 心筋サルコメアイメージング：

α -Actinin-AcGFP のアデノウイルスベクター (ADV) を作製し、*in vivo* 心筋細胞の Z 線に AcGFP を発現させた。アデノウイルスベクター注入 2 日後には AcGFP の発現が認められた。マウスはイソフルランにて麻酔した後、人口呼吸下、電気メスにて胸郭を取り去った。488 nm のレーザーを照射することによって蛍光観察を行い、サルコメア長のナノ計測を行った。レンズは、40 倍 (N/A, 0.8) と 60 倍 (N/A, 1.0) の二種類の水浸レンズを用いた。撮影は 100 fps の速度で行った。

III) *In vivo* 心筋 T 管イメージング：

マウスをイソフルランにて麻酔した後、人口呼吸下、電気メスにて胸郭を取り去った。その後、0.1 μ g/mL の CellMaskTM Orange (CellMask) を浸み込ませたガーゼを左心室上に 5 分間留置した。イメージングの方法は II) と同様であるが、この実験では、観察直前、高濃度のイソフルランによって心停止を惹起させた。

4. 研究成果

心筋細胞および *in vivo* 心臓において研究を行なった。以下、詳細をまとめる。

I) ラット幼若心筋細胞におけるサルコメア長と局所 Ca^{2+} 濃度の同時計測：

我々は Cameleon-Nano140 をラット幼若心筋細胞の Z 線に発現させることに成功した (図 1)。弛緩から収縮に至る際、すなわち、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加にもなって Yellow の蛍光強度が上がり、Cyan の蛍光強度が下がることが確認された。これらの蛍光強度の比 (F_{yellow}/F_{cyan}) を細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標とし、サルコメア長との関係を探ると、 F_{yellow}/F_{cyan} の上昇 (低下) にもなってサルコメア長が短縮 (伸長) することが確認された。また、心筋細胞内局所 Ca^{2+} と SL の関係を得て、これが β 受容体刺激薬の投与によって右方変位することを見出した。

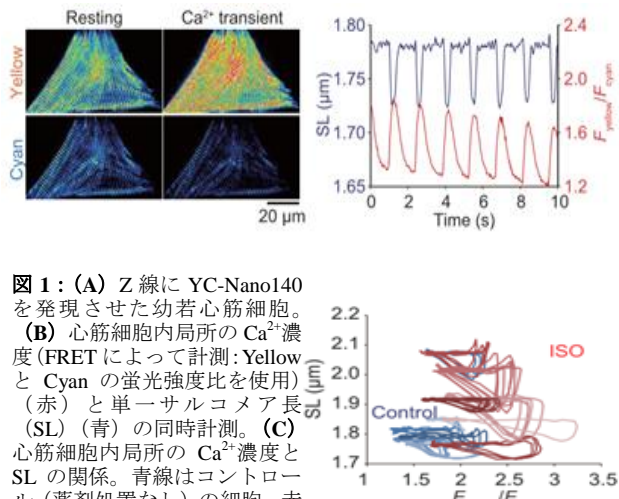


図 1: (A) Z 線に YC-Nano140 を発現させた幼若心筋細胞。(B) 心筋細胞内局所の Ca^{2+} 濃度 (FRET によって計測: Yellow と Cyan の蛍光強度比を使用) (赤) と単一サルコメア長 (SL) (青) の同時計測。(C) 心筋細胞内局所の Ca^{2+} 濃度と SL の関係。青線はコントロール (薬剤処置なし) の細胞、赤色は β 受容体刺激薬である isoproterenol (ISO) を負荷した細胞。

II) *In vivo* マウス心筋におけるサルコメア長計測と画像再構築法の開発:

我々は、ナノ計測技術をマウス個体 (*in vivo*) に応用し、心臓の中から心筋細胞内のサルコメアの動きを高空間 (20 nm)・時間 (10 ms) 分解能で捉えることのできるシステムを独自開発、サルコメア動態と *in vivo* マクロパラメータ (心電図および左心室内圧) のリアルタイム同時観察を世界で初めて可能にした (図 2)。約 30 周期分のサルコメア長変化を 13 匹のマウスについて解析し、収縮末期と拡張末期のサルコメア長を求めたところ、拍動時のサルコメア長は、拡張期および収縮期にそれぞれ 1.90 ± 0.06 、 $1.68 \pm 0.06 \mu\text{m}$ であり、静止時で得られた分布領域の比較的小さいレンジで変動していることが明らかとなった。心臓は収縮と拡張を繰り返す臓器である

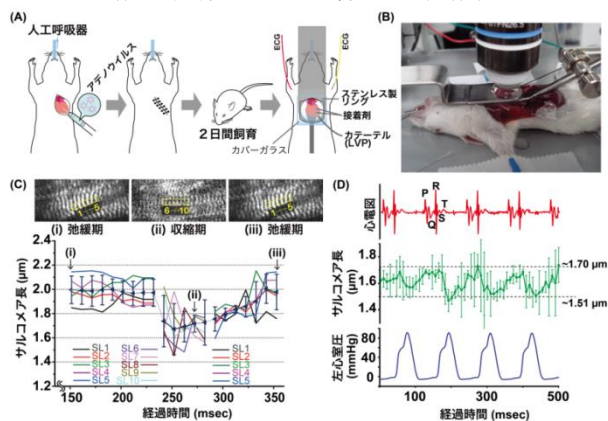


図 2: (A) マウスへのアデノウイルスベクター (ADV) 投与方法。濃縮した ADV を麻酔下に開胸したマウスの左心室表面に投与。2 日後に GFP の発現が安定して見られた。(B) *In vivo* 顕微システムによる、サルコメア長とマクロパラメータ (心電図、心臓内圧) の同時計測の様子。(C) 一回の心拍サイクルにおける同一心筋細胞内のサルコメア長変化。同一細胞内でもサルコメア長には $\sim 300 \text{ nm}$ のバラツキがある。上は、計測した心筋細胞の領域を示す (黄色枠内)。心筋に特有な横紋構造が明瞭に見られる。(D) ナノ情報とマクロ情報の融合。動画取得開始から 0.5 秒までの平均サルコメア長 (中段) および、心電図 (上段) と左心室内圧 (下段)。

ため、左心室内圧が比較的高い場合、心サイクルの異なる時点において焦点がずれるという問題が生じる。我々は、1 心周期を 17 のフェーズに分割し、各フェーズにおいて対物レンズを Z 軸方向に高速で動かすことによって焦点の合う画像を得た。そして、それらの画像を組み合わせることによって、心周期のすべての時点において焦点の合っている動画を作成することに成功した (図 3)。

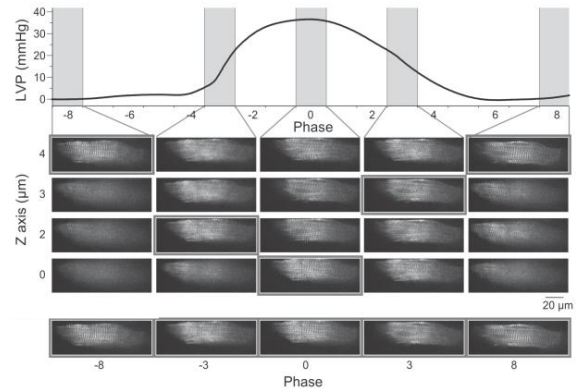


図 3: 画像処理システム。(上) 左心室内圧 (黒線) を 17 のフェーズに分割し、各フェーズにて対物レンズを Z 軸方向 (数 μm) に高速スキャン。1 フェーズ、10.2 ms。(下) 焦点が合った画像 (灰色枠付き画像) を再構築、心サイクルのすべての時点において焦点の合った動画 (最下段) を得た。

III) *In vivo* マウス心筋における T 管間隔の計測:

II) の実験で用いたイメージング手法を応用した。露光時間が 10 ms と短い場合、横紋構造はあまり明瞭ではなかったが、25 枚の画像を重ね合わせることによって隣接した二つの心筋細胞における T 管間隔を計測することに成功した (図 4)。T 管間隔はサルコメア長に近い値であり、細胞と細胞の間のギャップジャンクションも明瞭に確認された。イギリスの Bub らは、di-4-ANNEPS によ

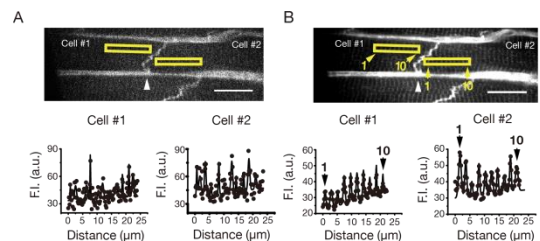


図 4: マウス *in vivo* 心筋細胞における T 管観察。(A) CellMask を用いて心臓表面から滴下染色したマウス T 管 (露光時間 10 ms で撮影)。(B) (A) で撮影した画像を 25 枚合成したもの。Cell #1、#2 における T 管間隔は、それぞれ 2.24 ± 0.05 、 $2.11 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ($P=0.15$) であった。

てラットの T 管染色を試みているが (*Am J Physiol Heart Circ. Physiol.* 2010; *Circ Res* 2013)、di-4-ANNEPS は心臓の電氣的興奮性に影響を与えることが知られている。したがって、今回我々が開発した CellMask を用いる

方法は、*in vivo*における心筋ナノイメージングを行う上で有用なツールになるものと期待される。

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 9 件)

1) F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Shimozawa, K. Oyama, Y. Kushida, T. Terui, S. Ishiwata, N. Fukuda. Optimization of fluorescent labeling for *in vivo* nano-imaging of sarcomeres in the mouse heart. *BioMed Research International* 2018 (in press).

2) T. Kagemoto, K. Oyama, M. Yamane, S. Tsukamoto, F. Kobirumaki-Shimozawa, A. Li, C. dos Remedios, N. Fukuda, S. Ishiwata. Sarcomeric auto-oscillations in single myofibrils from the heart of patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure* 2018 (in press).

3) S. Ishiwata, M. Miyazaki, K. Sato, K. Nakagome, S.A. Shintani, F. Kobirumaki-Shimozawa, N. Fukuda, K. Suzuki, J. Takagi, Y. Shimamoto, T. Itabashi. Dynamic properties of bio-motile systems with a liquid-crystalline structure. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2017;647:127-150.

4) T. Shimozawa, E. Hirokawa, F. Kobirumaki-Shimozawa, K. Oyama, S.A. Shintani, T. Terui, Y. Kushida, S. Tsukamoto, T. Fujii, S. Ishiwata, N. Fukuda. In vivo cardiac nano-imaging: A new technology for high-precision analyses of sarcomere dynamics in the heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2017;127:31-40.

5) S. Tsukamoto, T. Fujii, K. Oyama, S.A. Shintani, T. Shimozawa, F. Kobirumaki-Shimozawa, S. Ishiwata, N. Fukuda. Simultaneous imaging of local calcium and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes using yellow Cameleon-Nano140. *Journal of General Physiology* 2016;148:341-355.

6) F. Kobirumaki-Shimozawa, K. Oyama, T. Shimozawa, A. Mizuno, T. Ohki, T. Terui, S. Minamisawa, S. Ishiwata, N. Fukuda. Nano-imaging of the beating mouse heart *in vivo*: Importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length *per se*, in the regulation of cardiac function. *Journal of General Physiology* 2016;147:53-62.

7) S.A. Shintani, K. Oyama, N. Fukuda, S. Ishiwata. High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015;457:165-170.

8) J. Udaka, N. Fukuda, H. Yamauchi, K. Marumo. Clinical definition and diagnostic criteria for sarcopenia. *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 2014;3:347-352.

9) F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Inoue, S.A. Shintani, K. Oyama, T. Terui, S. Minamisawa, S. Ishiwata, N. Fukuda. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *Journal of Physiological Sciences* 2014;64:221-232.

[学会発表] (計 18 件)

1) 小比類巻 生、大山廣太郎、下澤東吾、石渡信一、福田紀男. マウス心筋における単一サルコメア動態の *in vivo* ナノ解析. 日本生理学会、サンポートホール高松、2018 年 3 月.

2) 大山廣太郎、Zeeb Vadim、新井智実、伊藤秀城、新谷正嶺、鈴木 団、福田紀男、石渡信一. 光熱変換顕微鏡を用いた温度センシングの一細胞解析. 日本生理学会、サンポートホール高松、2018 年 3 月.

3) 大山廣太郎、山澤徳志子、村山尚、原田慶恵、飯野正光、福田紀男、石渡信一、鈴木 団. 悪性高熱症の原因となる骨格筋リアノジン受容体 1 変異体の熱刺激応答. 生体運動研究合同班会議、法政大学、2018 年 1 月.

4) 大山廣太郎、新谷正嶺、塚本精一、小比類巻 生、下澤東吾、鈴木 団、石渡信一、福田紀男. サルコメア収縮の蛍光イメージングと光操作技術の開発. 精神・神経疾患研究開発費「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」平成 29 年度研究班会議、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター教育研修棟 ユニバーサルホール場所、2017 年 12 月.

5) 塚本精一、藤井輝之、大山廣太郎、下澤東吾、小比類巻 生、石渡信一、福田紀男. Yellow Cameleon-Nano140 融合 α -actinin を用いた幼若心筋細胞におけるサルコメア動態と局所 Ca^{2+} 濃度の同時観測. 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」、生理学研究所、2017 年 9 月.

6) 下澤東吾、広川恵里沙、小比類巻 生、大山廣太郎、照井貴子、石渡信一、福田紀男. *In*

vivo 心筋ナノイメージング. 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」、生理学研究所、2017年9月.

7) 塚本精一、大山廣太郎、藤井輝之、小比類巻生、石渡信一、福田紀男. ラット幼若心筋細胞のZ線におけるYellow Cameleon-Nano140 融合 α -actinin 発現を用いたサルコメア動態と局所的カルシウムの同時観測. 日本生理学会、アクトシティ浜松、2017年3月.

8) 小比類巻生、福田紀男. *In vivo* cardiac nano-imaging: high-resolution analysis of excitation-contraction coupling in the heart. 日本生理学会、アクトシティ浜松、2017年3月.

9) 小比類巻生、大山廣太郎、下澤東吾、新谷正嶺、広川恵里沙、照井貴子、石渡信一、福田紀男. ナノイメージングによるマウス心臓の *in vivo* サルコメア動態解析. 日本生物物理学会. 金沢大学、2015年9月.

10) F. Kobirumaki-Shimozawa, K. Oyama, T. Shimozawa, T. Terui, S. Ishiwata, N. Fukuda. High-speed, high-performance real-time imaging of physiological sarcomere dynamics in the beating heart *in vivo*. 米国生物物理学会、Los Angeles、2016年2月.

11) S. Tsukamoto, K. Oyama, T. Fujii, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Shimozawa, S.A. Shintani, S. Ishiwata, N. Fukuda. 米国生物物理学会、Los Angeles、2016年2月.

12) 大山廣太郎、小比類巻生、下澤東吾、福田紀男. *In vivo* ナノイメージングによる心筋収縮の可視化と熱による制御. 第93回日本生理学会年会、北海道大学、2016年3月.

13) 塚本精一、大山廣太郎、藤井輝之、小比類巻生、石渡信一、福田紀男. Yellow Cameleon-Nano140 を用いたラット幼若心筋細胞のサルコメア長と細胞内カルシウムの同時観測系の開発. 第93回日本生理学会年会. 北海道大学、2016年3月.

14) 榎田康晴、塚本精一、藤井輝之、大山廣太郎、小比類巻生、福田紀男. マウス心臓上における移植ラット幼若心筋のサルコメア動態の定量的解析. 第93回日本生理学会年会. 北海道大学、2016年3月.

15) 小比類巻生、大山廣太郎、下澤東吾、照井貴子、南沢享、石渡信一、福田紀男. ナノスケール高速ライブイメージングによる *in vivo* サルコメア計測. 第12回ナノ学会大会. 京都大学宇治キャンパス. 2014年5月.

16) 新谷正嶺、大山廣太郎、石渡信一、福田紀男. サルコメア長ナノ計測による心筋細胞内収縮ダイナミクスの系統的解明. 京都大学宇治キャンパス. 2014年5月.

17) S.A. Shintani, K. Oyama, N. Fukuda, S. Ishiwata. High-frequency sarcomeric auto-oscillations in living cardiomyocytes under hyperthermal conditions. 第52回日本生物物理学会. 札幌コンベンションセンター. 2014年、9月.

18) 福田紀男. 高精度分子イメージングを用いた心臓拍動メカニズムの解析. 革新的分子イメージングで拓く医学新領域. 東京工業大学. 2014年4月.

〔図書〕(計 1件)

1) 石渡信一、島本勇太、福田紀男. メカノバイオロジー (第12章: 横紋筋のメカノバイオフィジックス: マクロからマイクロへ). 化学同人. 2015年.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)
○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田紀男 (FUKUDA NORIO)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30301534

(2) 研究分担者

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

小比類巻生 (FUYU
KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40548905

大山 廣太郎 (OYAMA KOTARO)
高崎量子応用研究所・先端機能材料研究部・主任研究員
研究者番号: 70632131

(3) 連携研究者

石渡信一 (SHIN'ICHI ISHIWATA)
早稲田大学・理工学術院・名誉教授
研究者番号: 10130866