

《様式B》

研究テーマ 「心不全の超早期発見を目指した心臓内部の生きた心筋細胞微細構造の  
定量化技術の開発」

研究責任者 所属機関名 名古屋工業大学

官職又は役職 准教授

氏 名 氏原 嘉洋

メールアドレス ujihara.yoshihiro@nitech.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏 名

(令和3年度募集) 第34回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

心不全患者は増加の一途を辿っており、その対策が切望されている。心臓の血液ポンプ機能は、心筋細胞の効率的な収縮・弛緩に支えられている。正常な心筋細胞には、形質膜が細胞の長軸方向に直角に陥入した膜構造（T管膜）が規則正しい間隔で存在する。重篤な心不全の発症に先行してT管膜が崩壊することから、T管膜の状態を把握することは心不全の超早期発見につながると期待されている。しかしながら、従来のT管膜を可視化する方法は、心臓から単離した心筋細胞やホルマリン固定した心臓を用いており、診断レベルとは大きく乖離していた。そこで本研究では、将来的な心不全の超早期診断法の基盤技術として、生体外に取り出した心臓内部の生きた心筋細胞のT管膜を可視化し、定量化する技術の開発を目指した。T管膜の状態を識別できる方法を確立するため、T管膜の状態が異なるモデルとして、生後8日（T管膜なし）、18日（T管膜部分的に形成）、10週（T管膜あり）のラットの心臓を用いた。体外に取り出した心臓の大動脈に注射針をカニューレションし、心筋保護液を注入して血液を洗い流した後に、脂質二重膜を可逆的に染色可能なFM4-64を溶かした心筋保護液でかん流した。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、染色した心臓を観察した。生後10週の成体ラットの心臓では、心筋細胞の長軸方向に直交する方向に規則正しい間隔で縞模様、すなわちT管膜が観察された。それに対し、生後8日の心臓では、縞模様は全く観察されず、T管膜は認められなかった。生後18日の心臓は、部分的に縞模様が存在し、T管膜が形成されつつあるのが確認できた。生後18日と生後10週のT管膜を定量化するために、画像処理をした取得画像に周波数解析を行い、ピークの振幅をT管膜の周期性の指標として算出した。その結果、生後10週の心臓のT管膜の周期性の方が生後18日より有意に高く、両者の違いを定量的に示すことに成功した。以上より、心筋細胞を単離あるいは固定することなく、心臓内部の心筋細胞のT管膜を可視化・定量化することに成功した。今後は、拍動によるノイズ対策、体内心臓のT管膜を可視化・定量化する技術の開発を目指し、心不全の早期発見技術の確立に貢献したい。

## 2. 実施内容および成果の説明

はじめに

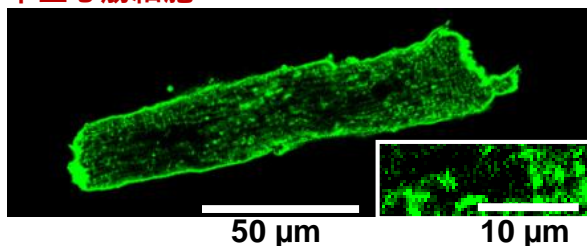
高齢化に伴い、心不全患者は増加の一途を辿っており、その対策は喫緊の課題である。心不全は、心臓の血液ポンプ機能が著しく低下した状態を指す。心臓ポンプ機能は、心筋細胞の効率的な収縮・弛緩に支えられている。正常な心筋細胞には、形質膜が細胞の長軸方向に直角に陥入した膜構造（T管膜）が規則正しい間隔で存在し、この構造は収縮効率と高い相関がある。重篤な心不全では、共通してT管膜が崩壊しているが（Guo et al., *Science*, 2018 等）、最近になってT管膜の崩壊が心不全の結果ではなく、心不全発症の引き金になるとの報告が相次いでいる（Ujihara et al., *Cardiovascular Research*, 2016 等）。心臓エコー検査による異常発見の前にT管膜が崩壊することから（Wei et al., *Circulation Research*, 2010）、T管膜の状態を把握することは心不全の超早期発見につながると期待されている。これまでのT管膜の解析では、心臓から単離した心筋細胞やホルマリン固定した（死んだ）心臓の細胞膜の染色画像が用いられてきた（図1）。しかし、これらの手法は侵襲的であるため、診断に使用出来ない。そこで本研究では、将来的な診断への応用を目指し、生きた心臓内の細胞膜を染色し、T管膜を観察・定量化する技術の開発を目指した。

### (a) 単離した心筋細胞の膜染色画像

正常心筋細胞 Di-8-ANEPPS (膜電位染色)



不全心筋細胞

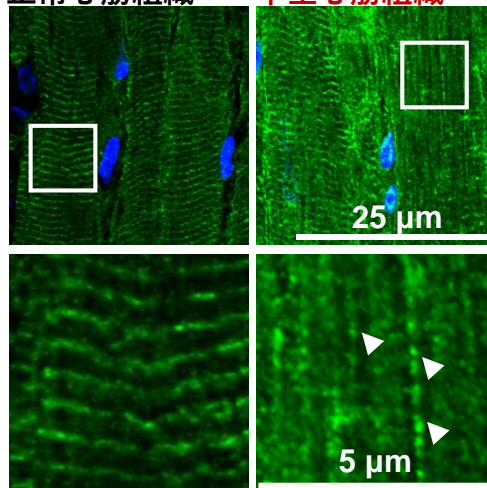


Ujihara et al., *Nature Communications*, 2019

### (b) ホルマリン固定した心筋組織の膜染色画像

正常心筋組織

不全心筋組織



G: NCX, B: DAPI

Ujihara et al., *Cardiovascular Research*, 2016

図1 従来の単離した心筋細胞やホルマリン固定した心筋組織を用いたT管膜を可視化する方法

## 実験方法

T 管膜の異常を観察・定量化する技術を開発するために、T 管膜の発達度が異なる 3 種類のモデルとして、生後 8 日 (T 管膜なし) , 18 日 (T 管膜部分的に形成) , 10 週 (T 管膜あり) のラットを使用した。実験は、名古屋工業大学の動物実験委員会の許可の下実施した。

まず、安楽死したラットから心臓を取り出し、大動脈に注射針をカニューレションし心筋保護液をかん流することで血液を洗い流すとともに、拍動を止めた。続いて、脂質二重膜を可逆的に染色可能な FM4-64 (T13320, Thermo Fisher Scientific) を溶かした心筋保護液をかん流し細胞膜を染色した。余分な FM4-64 を除去するために、再び心筋保護液をかん流した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて心筋細胞の膜を観察した。

正常な T 管膜は、周期的に約 2  $\mu\text{m}$  間隔で存在している。そこで、取得した画像の周波数解析を行い、周期性を定量化することで、T 管膜の構造を評価することを試みた。具体的には、画像処理をした取得画像に高速フーリエ変換を行い、得られたパワー空間周波数関係の 2  $\mu\text{m}$  付近 (0.5  $\mu\text{m}^{-1}$  付近) に相当する領域のピークの振幅を算出し、T 管膜の周期性の指標として用いた。

## 結果と考察

生後 10 週 (成体) , 18 日, 8 日のラットの心臓の染色画像を図 2 に示す。生後 10 週の成体ラットの心臓では、心筋細胞の長軸方向に直交する方向に規則正しい間隔で縞模様、すなわち T 管膜が観察された。それに対し、生後 8 日の心臓では、縞模様は全く観察されず、T 管膜は認められなかった。生後 18 日の心臓は、部分的に縞模様が存在し、T 管膜が形成されつつある様子を確認できた。これらの結果は、心臓をホルマリン固定して心筋細胞膜を観察した結果と一致しており、生きた状態で心臓内部の心筋細胞の T 管膜の可視化に成功したことを意味している。

次に、周波数解析により T 管膜構造の定量化を試みた。得られたパワー空間周波数関係の典型例を図 3 に示す。なお、空間周波数が 0 のときのパワーの値で正規化している。図 3(a)に示すように、生後 10 週の成体ラットに関しては、空間周波数が 0.5  $\mu\text{m}^{-1}$  付近に顕著なピークが現れた。生後 18 日のラットに関しても、空間周波数が 0.5  $\mu\text{m}^{-1}$  付近にピークが存在した (図 3(b))。このことは、成体ラットと生後 18 日のラットの心筋細胞には、周期的な膜構造があることを意味している。対照的に、生後 8 日のラットの心臓に関しては、顕著なピークが見られず、周期的な構造が存在しないことが示された (図 3(c))。

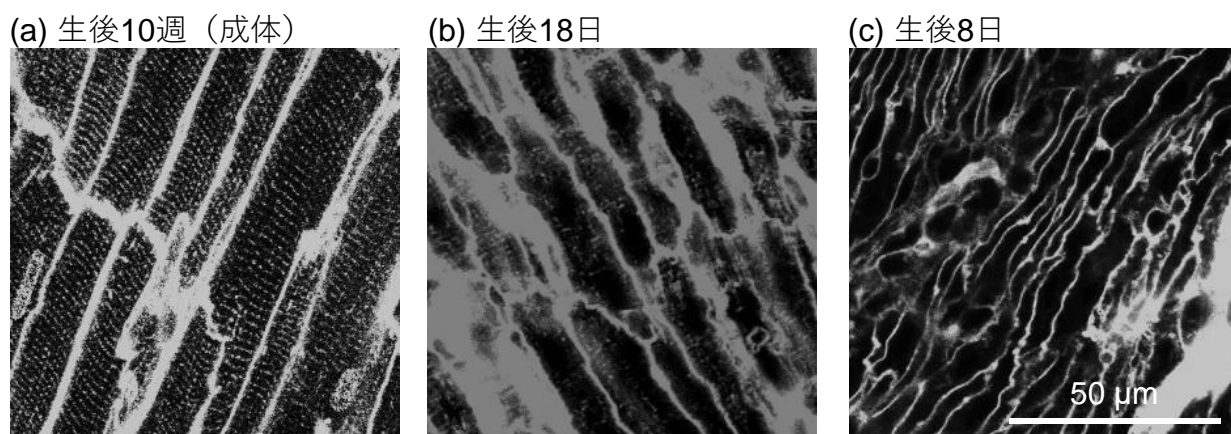


図 2 (a) 生後 10 週（成体），(b) 生後 18 日，(c) 生後 8 日のラットの心臓の膜染色画像。

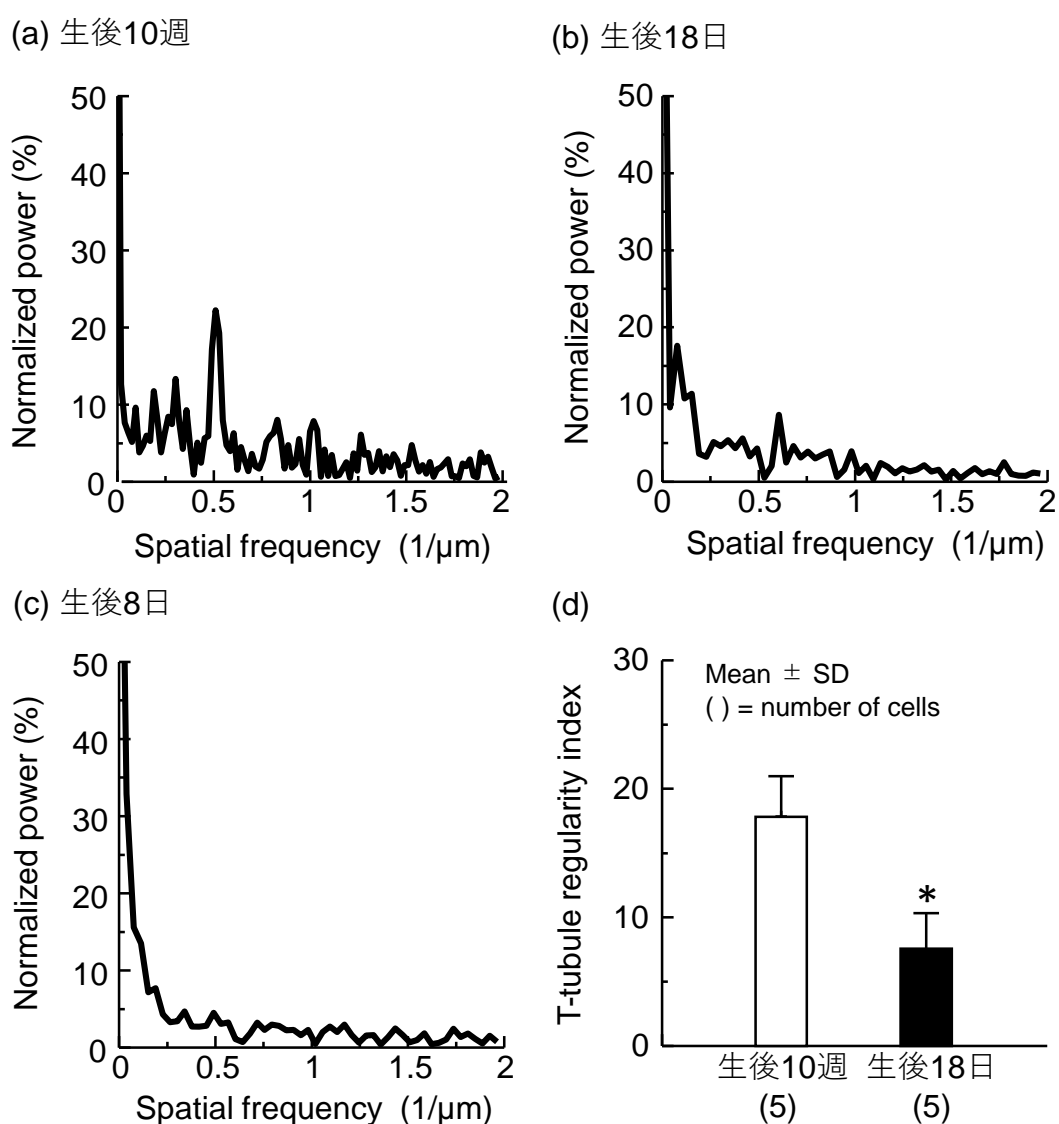


図 3 (a) 生後 10 週（成体），(b) 生後 18 日，(c) 生後 8 日のラットの心臓の膜染色画像の周波数解析結果。Spatial frequency が 0 のときの power の値で正規化してある。(d) 生後 10 週と 18 日の周波数解析結果から算出した T 管膜の周期性の指標。有意差検定には、 $t$  検定を用いた。

続いて、成体と生後 18 日の T 管膜構造の発達度の違いを定量化することを目指して、周波数解析で得られたピークの振幅を T 管膜の周期性の指標として算出した (図 3(d))。その結果、成体の心臓から得られた振幅は、生後 18 日よりも統計的有意に高かった。このことは、成体と生後 18 日の T 管膜構造の違いを定量的に判別可能であることを意味する。本研究では、重篤な心不全発症の前に起こる T 管膜の部分的な崩壊を検出する技術の開発を目的にしているため、本来であれば、T 管膜が部分的に崩壊したモデルを用いた検証が必要である。しかしながら、T 管膜の崩壊モデルを作製するのは、手術難易度・コスト・研究期間等を考慮すると現実的ではなかったため、T 管膜の形成前 (生後 8 日)、中 (生後 18 日)、後 (生後 10 週、成体) で代用した。生後 18 日のラットの T 管膜は完成直前の状態であるため、T 管膜崩壊開始直後と比較的近い状況であると考えられることから、心不全の引き金となるような T 管膜の崩壊の検出も可能であると期待している。

おわりに

将来的な心不全の超早期診断法の基盤技術として、生体外に取り出した心臓内部の生きた心筋細胞の T 管膜を可視化し、定量化する技術の開発を行った。その結果、細胞を単離することなく、心臓内の生きた心筋細胞の T 管膜の可視化と定量的な評価方法の開発に成功した。臨床の現場で用いるためには、拍動によるノイズの対策、そして体外に取り出すことなく T 管膜を可視化・定量化する方法に発展させることが今後必要であると考えられる。

## 参考文献

- Guo, A., Wang, Y., Chen, B., Wang, Y., Yuan, J., Zhang, L., Hall, D., Wu, J., Shi, Y., Zhu, Q., Chen, C., Thiel, W. H., Zhan, X., Weiss, R. M., Zhan, F., Musselman, C. A., Pufall, M., Zhu, W., Au, K. F., Hong, J., Anderson, M. E., Grueter, C. E., & Song, L. S. (2018). E-C coupling structural protein junctophilin-2 encodes a stress-adaptive transcription regulator. *Science*, 362(6421), eaan3303.
- Ujihara, Y., Iwasaki, K., Takatsu, S., Hashimoto, K., Naruse, K., Mohri, S., & Katanosaka, Y. (2016). Induced NCX1 overexpression attenuates pressure overload-induced pathological cardiac remodelling. *Cardiovascular Research*, 111(4), 348–361.
- Wei, S., Guo, A., Chen, B., Kutschke, W., Xie, Y. P., Zimmerman, K., Weiss, R. M., Anderson, M. E., Cheng, H., & Song, L. S. (2010). T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circulation Research*, 107(4), 520–531.
- Ujihara, Y., Kanagawa, M., Mohri, S., Takatsu, S., Kobayashi, K., Toda, T., Naruse, K., & Katanosaka, Y. (2019). Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure. *Nature communications*, 10(1), 5754.