

論文の内容の要旨

論文題目 原子間力顕微鏡を用いた単離心筋細胞における短軸方向の力学的特性の解析
氏名 川上拓也

心不全は心血管領域の重要な問題である。先進国における心不全の有病率は1-2%である。心不全を始めとした心臓疾患における心臓の機能を考える際の基礎として、まず生理的条件下における心筋細胞単位での機能の解明が必要である。従来、心筋細胞の力学的特性に関する研究は主には長軸方向に関するものであった。例を挙げれば筋節の長さや心筋の収縮力の間には重要な関係が存在しており Starling の法則の基礎となっている。一方、心筋細胞の短軸方向の力学的特性の心機能における役割や重要性は不明である。心臓がポンプとして収縮と拡張を繰り返す間、心筋細胞には長軸方向と同時に短軸方向にも力が加わる。短軸方向への力学的特性についての報告は少ないが、心臓機能においては非常に重要な要素であると考えられる。本研究では、単離したマウスの心筋細胞を用いて細胞表面の形状および短軸方向の細胞の硬さについて検討するために分子レベルの大きさの力学的特性の測定が可能な原子間力顕微鏡 (AFM: atomic force microscopy) を用いて測定を行った。また過去の研究に単離した成体心筋細胞を用いて特に収縮・弛緩中にその硬さを測定した報告は存在しない。電気刺激によって収縮させた心筋細胞の短軸方向の硬さを AFM を用いて高サンプリングレートで測定した。

動物は 10 週齢の C57BL/6 Jk/J 小鼠、10 週齢の C57BL/10 小鼠、ジストロフィン欠損症モデルとして 6-8 週齢の C57BL/10 *mdx* Jic 小鼠を使用した。ランゲンドルフ灌流装置を用いて冠動脈に消化酵素溶液(collagenase Type II ± protease XIV) を灌流し心筋細胞を単離した。イソプロテノールを用いる実験では stock solution を 50 nM の濃度となるよう滴下した。ラミニン溶液で培養皿底面をコーティングし心筋細胞を培養皿底面に接着させ、コンタクトモード、インターミッテントモード、フォースマッピングモードの各種モードを用いて細胞表面形状と細胞の短軸方向の硬さを測定した。また細胞を接着させたゲイッシュ全体を電気刺激して心筋細胞を反復収縮させ、平均秒間 40 回のサンプリングレートで力分光法の計測を行った。収縮中の心筋細胞のサルコメア長については光学顕微鏡に接続する高速カメラである Myocam を用いて測定した。サルコメア長変化と心筋細胞の硬さ変化を同時に測定した。

コンタクトモードで心筋細胞の表面のイメージングは測定できなかったが、インターミッテントモードとフォースマッピングモードでは細胞表面の凹凸形状を測定することが可

能であった。インターミッテントモードにて電子顕微鏡でこれまで報告されたような筋原線維とミトコンドリアとの位置関係と一致する構造と Z 帯と M 帯のそれぞれに対応する周期性を有する縞構造を認めた。フォースマッピングモードでは押し込みが設定した力に達した点(set point)とカンチレバーがたわみ始めた点(contact point) の二つの高さ情報で異なるイメージが得られた。

フォースマッピングは力分光法を一定範囲内の方眼上に各点で連続測定し平面での細胞表面の高さと同一点での硬さの分布の情報を得る測定法である。フォースマッピングにおいて平面上の弾性率の分布が得られ、細胞の硬さについてはこれら各点の硬さの平均値とした。Z 帯および M 帯に相当する硬さのピークに差は認めなかった。アクチンファイバーの走行も目立たず、短軸方向の硬さについては実質的に筋原線維が中心的な役割をもっていると考えられた。

ジストロフィンが欠損した場合に細胞膜上のサルコグリカン・ジストログリカンは細胞質への足場を失うことになり、細胞膜上の局在部位が正常と異なる可能性がある。AFM を用いて正常対照の C57BL/10 マウスと *mdx* マウスの単離心筋細胞の表面形状を観察したところ、心筋細胞の単離の際に、細胞外マトリックスのみ分解するコラゲナーゼ処理のみでは BL/10 マウス心筋細胞表面は、心筋細胞表面の観察が困難であった。コラゲナーゼ+プロテアーゼによる処理を行った場合には細胞表面の観察が可能となった。一方、*mdx* マウスの心筋細胞はどちらの条件でも細胞表面が観察可能であった。以上の結果より、正常心筋細胞膜表面と細胞外マトリックスを結合する蛋白すなわちジストロフィン関連蛋白群、特にジストログリカンが、*mdx* マウスでは細胞表面に存在していない（正常な局在が失われている状態）と考えられた。

mdx マウスから単離された心筋細胞は受動的な伸展に対して細胞膜が脆弱で破綻し易く細胞外からの Ca 流入を来し、細胞の長軸方向の伸展コンプライアンスが低下しており、またコンダクタンスカテーテルを用いた左室内圧-容量測定にても拡張機能が低下していることが示されている。一方、正常心筋細胞と比較してジストロフィン欠損心筋細胞は短軸方向の硬さが変化し、さらに心臓拡張機能に影響を及ぼしているかは未だ明らかでない。*mdx* マウスの心筋細胞表面をフォースマッピングで測定し、正常対照と比較したが、短軸方向の硬さに有意な差を認めなかった。ジストロフィンの有無や細胞膜の状態が心筋細胞の短軸方向の硬さに影響を与えないことが示唆された。

収縮機能および能動的拡張機能を亢進させる交感神経 β 受容体刺激薬であるイソプロテレノールを投与しその反応を評価した。イソプロテレノールの投与後は細胞の硬さは有意

に増加した。交感神経 β 受容体刺激薬としてのイソプロテレノールを投与すると急性効果として心筋細胞の硬さが増加することが明らかとなった。

電気刺激用チャンバーを用いて電気刺激を加えて単収縮させた。力分光法を用いて連続的に収縮中の細胞の硬さを測定した。単収縮時の硬さの経時的変化を1秒間に約40回の力分光法で測定した。収縮に伴い細胞表面高が上昇すると同時に、硬さとしてのヤング率が低下した。Myocamで測定されたサルコメア長の短縮とそれぞれの変化は同時におこっており、心筋細胞の収縮に伴う変化であった。測定後にイソプロテレノールを投与し再度同一の心筋細胞において測定を行ったところ、有意に収縮ピーク時の硬さは低下した。この結果により心筋細胞の収縮時において、収縮に伴うサルコメアの構造がより過大に変化するとともに心筋細胞の硬さもより大きく低下したことが示唆された。

これらの実験結果から明らかとなったことをまとめると以下の通りである。心筋細胞の短軸方向の弾性率を支配的に定義しているのは筋原線維であり、おそらくその他の細胞骨格が細胞全体の硬さに与える影響は相対的に十分小さいことが示唆される。筋原線維は心筋細胞の短軸方向においても弾性の主要な役割を担っているものと考えられた。*mdx* マウスの心筋細胞は正常心筋細胞と比較して細胞の硬さに有意差はなかったが、ジストロフィン欠損によって細胞膜表面蛋白と細胞外基質との結合も障害されていることが示された。また静止状態ではイソプロテレノールによって心筋細胞の硬さは上昇した。細胞内の β 受容体を刺激することで細胞内カルシウム濃度が上昇し、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントのクロスブリッジが増加したことによる可能性がある。

従来の研究よりも時間分解能を高めた力分光法を用いて単離した心筋細胞の単収縮中の短軸方向の硬さの変化を測定することに成功した。収縮中に心筋細胞は硬くなるものと予想されていたが、実際には硬さは低下することを発見した。しかし心筋細胞の短軸方向の硬さの生理学的意義はまだ不明であり、特に今回得られた結果の生理学的意義に関しては、今後の研究による解明が待たれる。

クロスブリッジの早い運動による単収縮と、静止状態のクロスブリッジ運動の遅い緊張(*pre-systole*) とでは心筋細胞の短軸方向の硬さの変化が真逆であったことから、筋原線維の構造の変化の様式が短軸方向の力学的特性に大きく関与している可能性が示唆された。今後は心不全病態モデルの実験動物を用いることで心臓機能における心筋細胞の硬さの意義を決定し、新たな治療法の標的となりうる病態の解明を目指す。