

博士論文

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

川上拓也

## 目次

略語集.....	1
要旨.....	2
序文.....	3
方法.....	12
結果.....	27
考察.....	54
結論.....	60
謝辞.....	62
参考文献.....	63

<略語集>

AFM: atomic force microscopy

BDM: butanedione monoxime

BSA: bovine serum albumin

DMD: duchenne muscular dystrophy

FBS: fetal bovine serum

HFpEF: heart failure with preserved ejection fraction

iPS: induced pluripotent stem

PBS: phosphate buffered saline

PKA: protein kinase A

PLB: phospholamban

SPM: scanning probe microscope

TnI: troponin I

## <要旨>

原子間力顕微鏡を用いて心筋細胞の短軸方向の新しい力学的特性の機能測定法を開発し、単離心筋細胞の表面形状および短軸方向の弾性率を評価した。静止状態では Z 帯と M 帯の周期性に一致する弾性率のピークを認め、筋原線維の硬さが心筋細胞の硬さの規定因子であると考えられた。一方、細胞骨格蛋白であるジストロフィンの関与は小さかった。生理学的な単収縮中の心筋細胞の短軸方向の弾性率を経時的に 40 回/秒の頻度で計測したところ収縮中に硬さの低下を認めた。イソプロテレノールは静止状態の弾性率は上昇させたが、収縮中には低下させた。収縮蛋白の構造変化の様式が心筋細胞の短軸方向の硬さに多様に影響している可能性が示唆された。

## <序文>

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%であり、そのうち左室収縮機能が正常な心不全は40%程度を占めている。このような心臓の収縮機能が比較的良好に保たれている心不全症例、Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF)の中には、左室拡張機能障害による心不全が存在する。拡張機能障害の心臓を有する患者は高齢者に多く、血圧上昇や頻拍を契機として拡張不全による急性心不全を発症する。心臓拡張機能異常および拡張不全の原因として心筋細胞外マトリックスの増生や心筋の線維化による chamber stiffness 上昇が挙げられているが<sup>1)</sup>、心筋細胞レベルでの拡張機能障害の発症機序・病態生理の詳細は依然として不明である。

### (心筋細胞の機械的な構造)

心筋細胞は骨格筋と同様の横紋筋である。心筋細胞は長軸方向に100-150  $\mu\text{m}$ 、短軸方向には幅20-35  $\mu\text{m}$ 、高さ10-15  $\mu\text{m}$ の楕円柱型の細胞である<sup>2,3)</sup>。心筋細胞内の筋原線維が収縮運動を担っている(図1)。細胞内の筋原線維は細胞膜蛋白とコスタメアを形成して細胞外マトリックスと結合している。

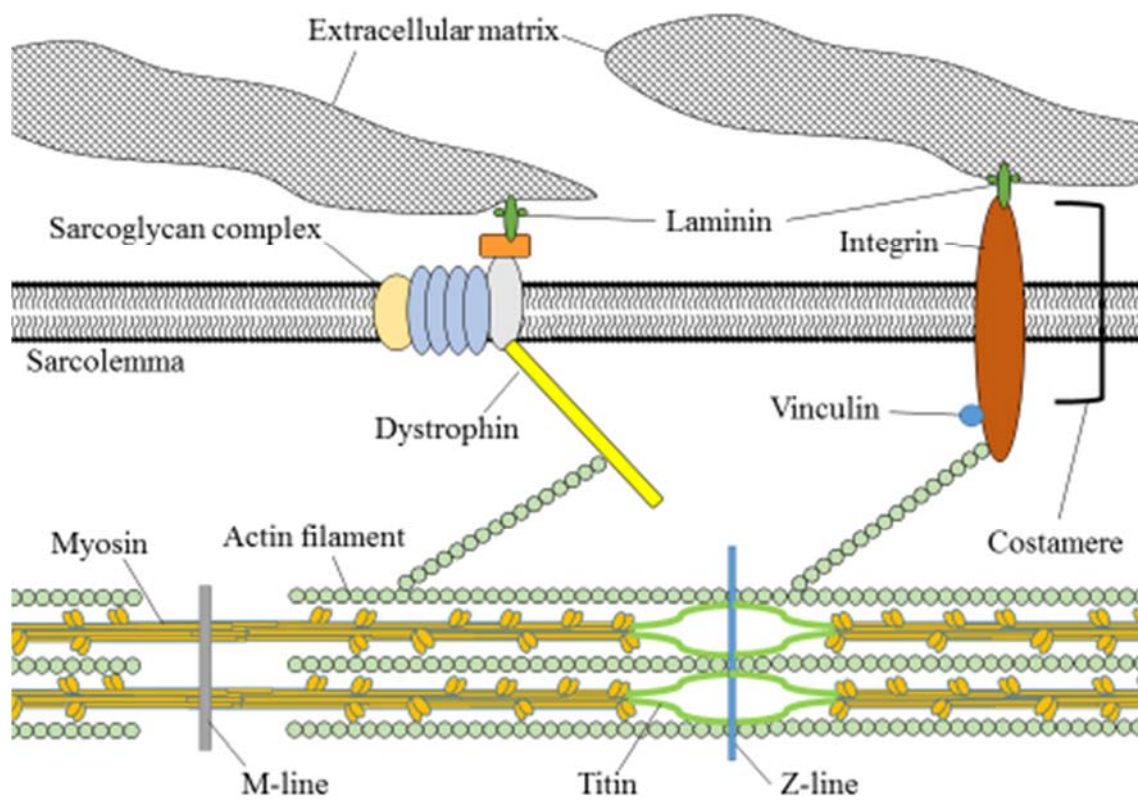


図 1. 筋原線維、コストメアと細胞外マトリックス。

(心筋細胞の弛緩)

生理的条件下における心筋細胞の拡張機能の調節機序について述べる。心筋細胞の単収縮における能動的な弛緩においては、①筋小胞体による細胞質内 Ca の取り込みが主に拡張期の早い相 (Ca トランジェントのピークに始まり減衰相を経て細胞内 Ca 濃度が弛緩状態のレベルまで減少するまで)、②アクチン-ミオシン間の運動が拡張期の遅い相 (細胞内 Ca 濃度が減少した後に、短縮していたサルコメア長が弛緩状態の長さにまで戻るまで) を調節している。①は蛋白リン酸化酵素 A (Protein kinase A: PKA) によるホスホランバン(Phospholamban: PLB) のリン酸化、②は PKA による収縮調節蛋白トロポニン I (Troponin I: TnI) のリン酸化により促進され、拡張機能が亢進する。さらに心臓の拡張期末期は、心腔内からの圧力により心筋細胞は受動的に伸展される。③細胞質内 Ca 濃度、④アクチン-ミオシン系の Ca 感受性、⑤細胞骨格蛋白タイチン (コネクチン) の伸展性という要素が、心筋細胞の伸展コンプライアンスとして拡張末期に影響を及ぼす。

実際の拡張障害型心不全の患者から採取された単離心筋細胞を用いると、拡張障害患者においては健常者と比較して長軸方向においてその受動的な伸展コンプライアンスが低下し、引き伸ばしにくい状態となっていることが報告されている<sup>4)</sup>。その機序として心筋 TnI や、cardiac myosin binding protein C、ならび

にタイチンの PKA によるリン酸化の異常や心筋線維の Ca 感受性の亢進が関与していることが示唆されている<sup>5)</sup>。

心筋細胞の内因性の異常による慢性的な拡張不全をきたすものの他に、急性の拡張不全の病態も存在する。Ischemic cascade と呼ばれる急激な冠動脈の血流不全から生じる心筋虚血後の反応である<sup>6)</sup>。冠動脈の血流低下による心筋虚血に伴い心筋細胞の代謝障害が生じると最初に拡張機能が低下し、収縮機能低下、心電図異常、自覚症状の出現の順に進行する。これは拡張機能が細胞内の代謝の影響を受けることを示している。

以上のように、臨床において遭遇する心不全においては虚血性や非虚血性、あるいは収縮不全と拡張不全といった様々な異なる要因や病態が複雑に絡み合っていると考えられ、その中で拡張障害型の心不全の病態の解明は十分になされていないのが現状である。

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。前述のように心筋は同じく横紋筋である骨格筋と同様にアクチンとミオシンフィラメント間のクロスブリッジ形成と解離により能動的な収縮と弛緩を繰り返す<sup>7,8)</sup>。受動的進展に対しては例えば巨大な弾性蛋白であるタイチンが関連している。

Fukuda らの報告では心筋細胞内の巨大弾性蛋白であるタイチンの異常や PKA



によるタイチンのリン酸化の影響により心筋細胞の長軸方向の弾性が変化する<sup>5)</sup>。このように力学的な機能を有する分子構造が相互に関係を及ぼしながら全体の心臓機能が成り立っている。

心筋細胞内の筋原線維においてはミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが交互に配列し A 帯と I 帯の規則正しい反復を持つ。アクチンフィラメントの末端は Z 帯に結合しており、Z 帯と Z 帯の間が筋節（サルコメア）である。弛緩している心筋細胞内の筋節の長さはおよそ 1.8  $\mu\text{m}$  であり、拡張期末期には受動的伸展により最大 2.2  $\mu\text{m}$  になる<sup>9)</sup>。

筋節の長さと心筋の収縮力の間には重要な関係が存在しており、これが Starling の法則の基礎となっている<sup>10)</sup>。また心筋細胞同士は長軸方向に介在板によって接着しており、ギャップ結合することで細胞間の興奮伝導の電気抵抗を下げる役割を有する他に、心筋細胞の長軸方向の力伝達や、細胞質の連絡はなもののシグナル伝達の役割を果たしている可能性がある。

一方、心筋細胞の短軸方向の力学的特性に関しては、心機能における役割や重要性は不明である。心臓内の心筋細胞はシートを形成して配列し、心臓内腔をらせん状に取り囲んでおり、心筋細胞が収縮するとこのシートとしての立体構造が変化する<sup>11)</sup>。心臓がポンプとして収縮すれば心筋細胞の内壁に対して接線方向に心筋細胞が短縮して、これによって法線方向の圧力が増大しながら内

腔の血液を拍出する。反対に拡張期においては、まず心臓内腔から心筋への圧力は法線方向にかかり、拡張末期には心筋細胞の長軸方向に分散する。短軸方向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（図2）。

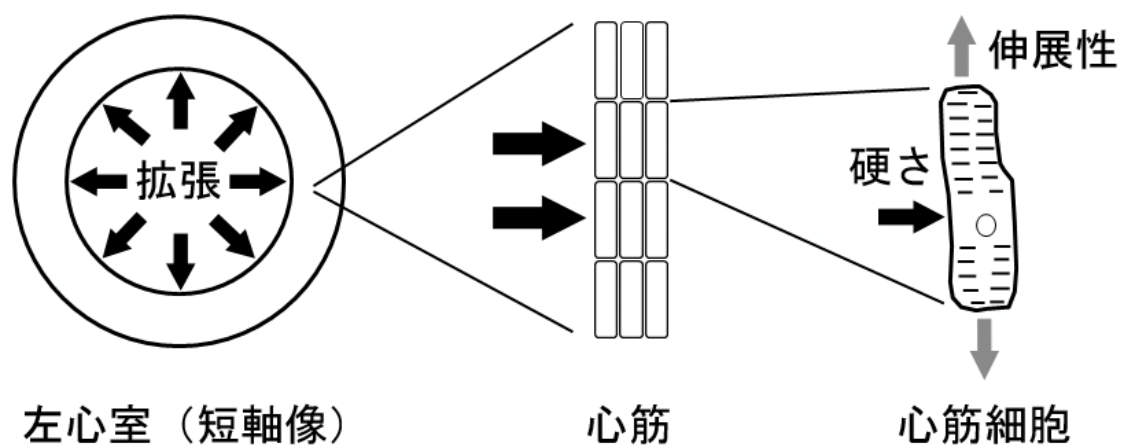


図2. 心臓の拡張と心筋細胞の短軸方向の硬さの関係

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。例えば、変異心筋 TnI を発現する肥大型心筋症や拘束型心筋症のモデルマウスの心筋細胞は、心筋線維の Ca 感受性が亢進し、長軸方向の伸展コンプライアンスが低下していることで拡張機能障害の原因が説明されている。またジストロフィン欠損症のモデルマウスである *mdx* マウスの単離心筋細胞は長軸方向の力学的負荷により細胞膜の破綻を来し、細胞外から細胞内への Ca 流入が起こり、アクチン-ミオシン間のクロスブリッジが形成され、心筋細胞の長軸方向の伸展コンプライアンスが低下し、拡張機能障害を呈する。

Chamber stiffness についての先行研究では、心筋梗塞のモデルを作成すると、梗塞領域の心筋組織は正常領域より虚血領域がより硬くなっていることが報告されている<sup>12)</sup>。さらに、犬を対象に拍動している心臓の弾性率を測定すると、急性の心筋梗塞領域においては拡張末期の chamber stiffness は上昇するが収縮末期では低下している<sup>13)</sup>。

犬の心臓切片を用いた研究では、筋肉組織の面内方向の chamber stiffness と短軸方向(短軸方向を z 方向とした場合の x および y 方向を面内方向と定義する)の chamber stiffness はほぼ線形関係にあった<sup>14)</sup>。また、心筋と同じ横紋筋であるカエルの骨格筋(半腱様筋)を用いた過去の研究では、筋肉の短軸方向の硬さとして超音波にて弾性率を測定し、等尺性(isometric)収縮において筋肉の短軸

方向の硬さを連続的に測定すると、筋肉の収縮中に硬さは低下することを報告している<sup>15)</sup>。その変化を説明する仮説としては、筋細胞の収縮によってアクチンフィラメントが回転し、Z 帯のアクチニンをはじめとした構造タンパクの形態が変化することが挙げられている<sup>16)</sup>。

心臓の短軸方向の弾性が収縮や虚血性の組織障害によって変化するという報告は多い。しかしこれらの報告はいずれも細胞外基質も含めた組織全体での弾性変化である。心筋細胞レベルで短軸方向の硬さの検討を行った過去の研究としては、原子間力顕微鏡(AFM: atomic force microscopy) を用いて細胞の高さの変化を測定<sup>17)</sup>した研究や、胎児マウスの心筋細胞では自発的な収縮時に細胞の硬さが増したとの報告がある<sup>18)</sup>。つまり、心筋と骨格筋の短軸方向の硬さに関して一致した見解は無く、さらに単離した成体心筋細胞を用いて生理学的な条件下での収縮・弛緩中にその硬さを測定した報告は存在しない。

本研究では、マウスより単離した心筋細胞の細胞表面の形状および細胞内の硬さの分布や細胞内の分子レベルでの弾性について検討するために分子レベルの大きさの試料の力学的特性の測定が可能<sup>19, 20)</sup>な AFM を用いた。AFM によって生きたままの心筋細胞の短軸方向の力学的特性を測定することが可能であり、また AFM の空間分解能から細胞膜や細胞質中の細胞骨格の評価が可能である。さらに時間分解能を改良して電気刺激によって単収縮させた心筋細胞の硬さを

高サンプリングレートで測定する実験系を確立することを本研究の目的の一つとした。また疾患モデルのマウスを試料に用いてその心筋細胞の力学的特性を測定することで、硬さの観点から疾患の理解が深まる可能性がある。また、成体のマウスから単離した心筋細胞を用い、細胞の硬さの測定条件をより至適に設定し、さらにこれまで報告のなかった収縮と拡張を繰り返す生理的条件下での短軸方向の硬さ測定を行うことで、将来における心筋細胞レベルでの疾患の病態生理の解明や新しい治療の標的の発見に繋がる可能性がある。

既知の肥大型心筋症や拡張型心筋症においてはミオシンやタイチンのような構造タンパクの遺伝子異常が報告されている<sup>21,22)</sup>。その機能の解析においてもタイチンの遺伝子異常が拡張不全を生じるという報告もなされている<sup>23)</sup>。

力学的な作用が複雑に関係しあう心筋組織内の構造にも拘わらず、心筋細胞の力学的特性に関する研究は長軸方向に関するものが多かった。そこで本検討では単離した心筋細胞の短軸方向の力学的特性としての硬さの評価を行った。

細胞内の分子レベルでの弾性について再評価するために分子レベルの大きさの試料をナニュートン単位で力学的特性の測定が可能なAFMを用いて測定を行った<sup>19,20)</sup>。また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高サンプリングレートで測定した。

## <方法>

### (心筋細胞単離)

本実験に用いた実験動物の取り扱いについては東京大学動物実験実施規則に則って実施した。入手が容易で汎用されている C57BL/6 のマウスを用いた。正常対照として C57BL/6 6JKw1 の 10 週齢のメス、C57BL/10 の 10 週齢のメス、心臓拡張機能障害を来すジストロフィン欠損症モデルとして C57BL/10 *mdx* Jic の 6-8 週齢のマウスを高杉実験動物社、日本クレア社から購入し当日か翌日に心筋細胞を採取した。*mdx* マウスは C57BL/10 マウスの系統から出現した突然変異であるため正常対照として C57BL/10 マウスを実験に使用した。

マウスにヘパリン 0.1 ml (100 単位) を腹腔内投与して 20 分間後にウレタン (Ethyl Carbamate, 050-05821, 和光純薬) を 0.1 g/ml に溶解したものを 0.5 ml 腹腔内投与し麻酔した。マウスを素早く開胸し心臓を摘出し、氷冷の Tyrode 液 (Tyrode solution: NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.33 mM, HEPES 5 mM, Glucose 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM) に移して冷却し心拍を停止させた。摘出した心臓周囲の不要な組織を除去した後に、上行大動脈に注射針をカニューレションし糸で縛って固定した。この注射針をランゲンドルフ灌流装置に接続して冠動脈に Tyrode 液を灌流させた。細胞単離で得られる細胞の収率を上げるためにタウリン (Taurine T0625-100G, SIGMA) を 30 mM と

2,3-Butanedione monoxime: BDM (B0753-25G, SIGMA) を 0.1 mM となるように付加した  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode 溶液(Tyrode + Taurine 30 mM + BDM 0.1 mM) で 4 分間灌流した。その後に冠動脈に消化酵素溶液 (Tyrode 25 ml + Taurine 30 mM + BDM 0.1 mM + Collagenase Type II (Worthington 社) 30 mg + Protease XIV (Sigma) 1 mg) を 37 °C で 2 分間灌流した。さらに  $\text{CaCl}_2$  1 M を追加して  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM とした消化酵素溶液でさらに 8 分間灌流した。心臓をランゲンドルフ灌流装置から取り外したのちに心室をハサミで切り離し 5 ml の消化酵素溶液で満たしたガラス皿内に移した。心臓をハサミで切り刻み、さらに先端をあらかじめ熱で丸めた滅菌スポイトで懸濁することで単離した心筋細胞の細胞懸濁液を作成した(図 3a)。細胞懸濁液をすべて 15 ml のチューブに移し 10 ml の反応停止液 (Tyrode + bovine serum albumin: BSA(Sigma A9418-50G) 2 % + fetal bovine serum: FBS 5 % + BDM 0.1 mM) を加えて 3 分間静置することで大きな細胞塊を沈殿させた。上澄み液を 22°C で遠心分離(400 rpm, 2 分) にかけて細胞を集め、沈殿した細胞を反応停止液に懸濁した。急速な Ca 濃度の上昇による細胞障害を防ぐため 10 分毎に 0.1 mM ずつ緩徐に Ca 濃度を上昇させ最終で  $\text{CaCl}_2$  の濃度を 1 mM とした。BDM を除去するため遠心分離(400 rpm, 2 分) にかけて(Tyrode +  $\text{CaCl}_2$  1 mM + BSA 2 %) で懸濁する洗浄を 2 回行った。

イソプロテレノールを用いる実験では Tyrode 液に溶解し 1 mM の stock solution

を作成し、これを試料の入った培養皿へ 50 nM の濃度となるよう滴下した。

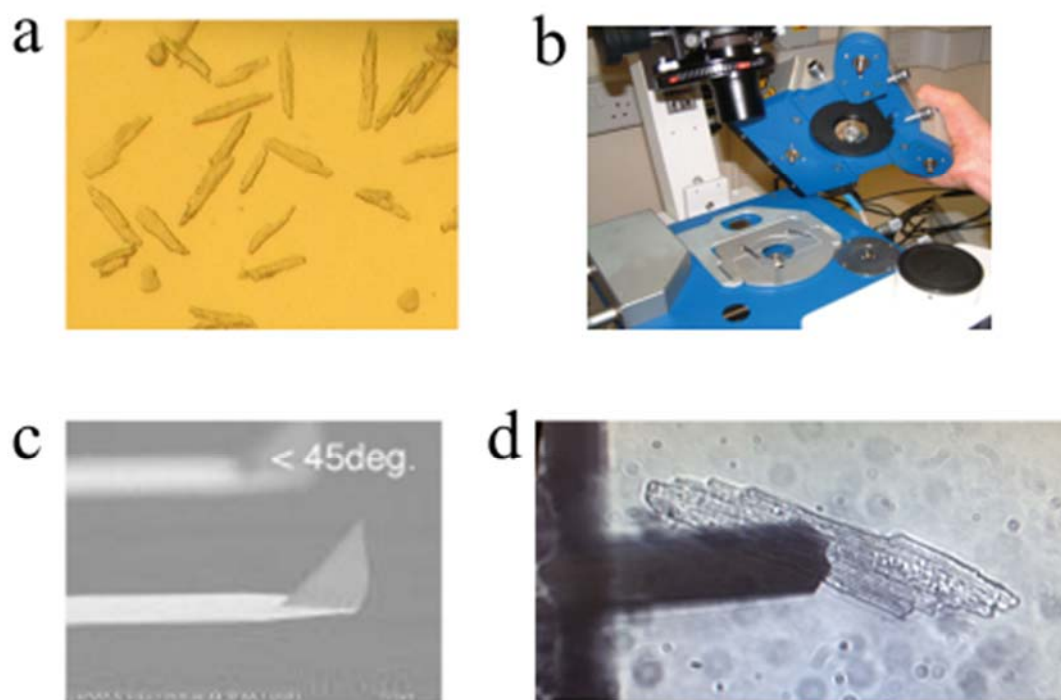
(培養皿への固定)

60mm の培養皿(Cornig 430166) の中央に 40  $\mu$ M のラミニン溶液(Phosphate buffered saline: PBS + ラミニン(L2020, SIGMA)) を 20  $\mu$ l ずつ滴下し 37°C で 1 時間かけて培養皿底面をコーティングした。その上に単離した心筋細胞を含む溶液を 2 ml ずつ移し、37°C で 1 時間かけて心筋細胞を培養皿底面に接着させた。

(原子間力顕微鏡)

AFM を用いて細胞表面の硬さを測定した。AFM とはカンチレバーと測定試料の間に働く原子間力やその他の相互作用を測定することで試料表面の形状や物性を観察する走査型の顕微鏡である。AFM の原理について簡単に説明する。システムからは常に赤外レーザーをホルダーに固定したカンチレバーの上面に照射し、その反射光を AFM システム内の 4 分割フォトディテクターで感知させる。試料とカンチレバーの間の物理的な相互作用はカンチレバーの機械的なたわみとして反映され、たわみの量はカンチレバーの反りによって変動する反射光がフォトダイオードの各要素からの差分からレーザースポットの位置が測定されることで計測される(図 4)。実際に試料に接触するのは数十から数百  $\mu$ m 程度までの長さのカンチレバーの先端に形成された探針であるが、通常は様々な形状の先端半径が nm レベルの探針を持つものを用いる(図 3)。





**図 3. 心筋細胞と AFM カンチレバー**

酵素処理で単離された心筋細胞(a)。AFM をステージの試料の上から被せるようにセットし(b)、カンチレバー先端の探針(c)を細胞方向に向けて細胞表面に接触させて測定する(d)。

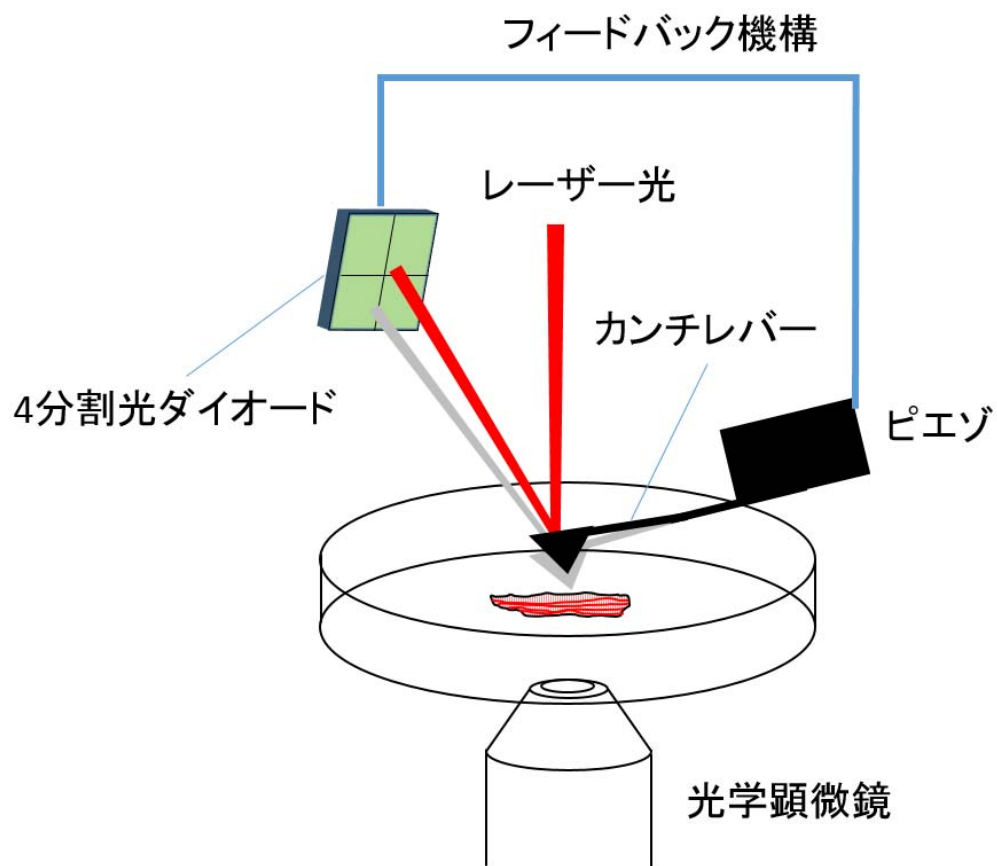


図 4. AFM の位置関係

レーザー光はカンチレバー上面に反射し、4 分割光ダイオードで測定される。試料とカンチレバーとの相互作用で生じるたわみを赤外レーザーの反射光スポットの変動として測定する。

次に AFM による試料表面のイメージング及び、力分光法の各種測定の原理について説明する

(イメージング)

イメージングではカンチレバーを  $x, y$  方向に動かし試料表面を走査する際に複数の測定モードを持つ。カンチレバーのたわみ、つまり試料表面に与える力を設定値となるようにカンチレバーを固定するホルダーをピエゾでフィードバックして  $z$  方向に上下動させると同時に  $z$  方向の高さを測定することで細胞表面の凹凸を測定する。さらにカンチレバーの動かし方によって、大別して常にカンチレバーが試料表面を接触しながら走査するコンタクトモードと断続的に接触するインターミitttentモード（タッピングモード）の 2 種類がある。

コンタクトモード : **Contact mode imaging** では試料表面とカンチレバーを常に接触させ、プローブ間に働く力を設定した値で一定に保つようにカンチレバーの  $z$  方向の位置を制御しながら指定した試料表面の領域を走査する。カンチレバーの探針のプローブ先端が試料表面を沿うようにして走査することで試料の形状を得ることが可能となる。

インターミitttentモード : **Intermittent contact mode imaging** ではカンチレバーを設定した周波数で振動させた状態で細胞表面を走査させる。カンチレバーは常に振幅しているため試料表面に接触している時間は短く試料に与える力は

弱いため柔らかい試料の観察に向いている。カンチレバーが持つ共振周波数をサーマルノイズ法で得られた共振ピークの値を参考にしながら駆動振動数を選択する。この駆動周波数とプローブが試料に接触することで減衰して測定されたカンチレバー振動数の位相差情報を測定し、振幅を一定にするようフィードバックして  $z$  位置を制御する。

またフォースマッピングモードは後述する力分光法を指定した領域内で連続測定する。力分光法では細胞表面の高さとカンチレバーのたわみを指定した  $Z$  方向の範囲内で情報として得られる。それぞれの  $x, y$  地点でカンチレバーのたわみが開始する点あるいは指定したたわみの量に達した  $z$  位置情報から細胞凹凸を測定する。欠点としては各測定点でカンチレバーを上下動させることから測定に時間がかかり、 $x, y$  方向の時間当たりの解像度はコンタクトモードとインターミッテントモードに劣るが、表面形状と同時に各点で硬さを測定することができる。また試料との接触時に  $z$  方向のみに力がかかるため設定次第で心筋細胞への刺激を小さくすることができる利点がある。これら 3 種類の方式で細胞表面の形状を測定した。

#### (力分光法: Force spectroscopy)

力分光法はカンチレバーで細胞を押し込むことで試料の物性を測定する方法である。以下にその原理を概説する。ピエゾでカンチレバーを  $z$  方向に試料へ

下ろし、試料表面に接触後もそのままカンチレバーを一定量まで押し込んだ後に試料から十分に離す。この上下動中のカンチレバーのたわみの変化をフォトダイオードで測定する。カンチレバーのもつバネ定数を  $k$ 、たわみの変化分を  $s$  とすれば、試料とカンチレバーの間にかかる力  $F$  (単位: N) を  $F = k \cdot s$  と求められる。得られたカンチレバーの押し込み量と力  $F$  のデータをグラフ化したフォースカーブを得る(図 5)<sup>24)</sup>。そして最終的に試料の硬さを Hertz モデルを用いて計算する。ヤング率を  $E$ 、ポアソン比を  $\nu$ 、押し込み量を  $\delta$ 、探針の角度を  $\alpha$  とする。体積変化はないとして  $\nu = 0.5$  とする。カンチレバーの探針の形状によって変形する形状が異なるため、それぞれ違う次式が成立する。

円錐で押し込んだ場合には

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta^2$$

の式を用いる。

また四角錐で押し込んだ場合は

$$F = 0.7453 \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^2 \tan \alpha$$

の式を用いる。試料の硬さは Hertz モデルを用いた縦弾性率であるヤング率として求める。計測で得られた force curve に対してソフトウェア上で fitting を行い最も Herz モデルに近似する  $E$  の値を計算の結果として得る。

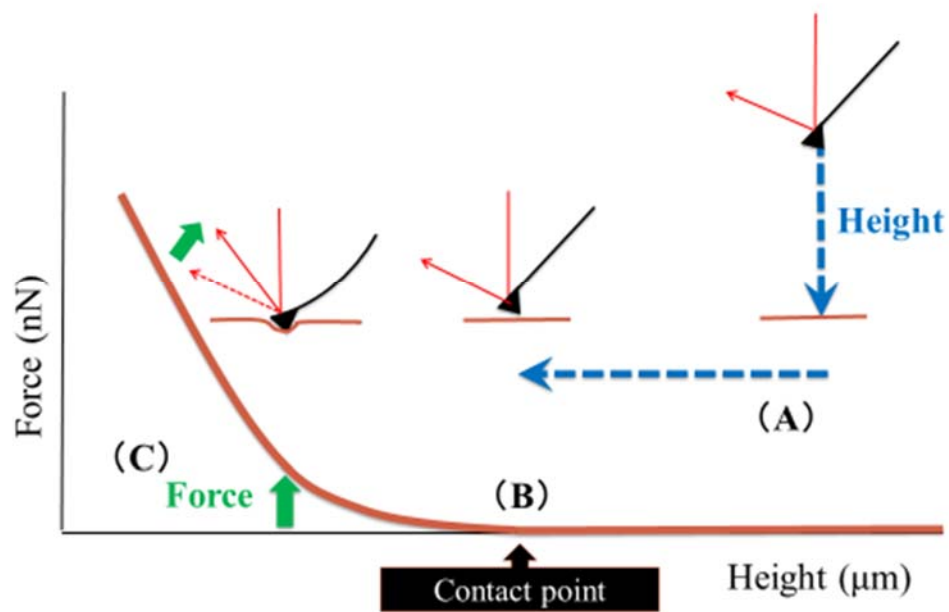


図 5. フォースカーブとカンチレバーの位置の関係  
 カンチレバーを試料に向けて下ろし(A)、細胞表面の接触点(B)  
 から試料の硬さに応じてカンチレバーの反りが発生する(C)。

(電気刺激と高時間分解能光力法)

AFM システム下の空間が狭く限られているため、ラミニンで心筋細胞を底面に固定したディッシュ中に直接設置できる刺激用の電極装置を 3D プリンターで作成した。直径 60 mm の細胞培養用ディッシュ形状に合わせるため円盤の中心にカンチレバーを接近させるための 1 cm × 3 cm の穴をあけ、その底面側に純白金棒（径 1 mm、ニラコ社）を電極として 2 本平行に 10 mm 間隔に固定した。装置の素材はアクリル樹脂を選択した。電極の末端はペーシング装置に接続した(図 6)。出力については 20-30 V、Duration は 10-20 msec の矩形波刺激とした。ペーシング装置の出力の開始は手動で設定するか AFM 側のシステムから出力した trigger に同期させることで行った。心筋はペースメーカー細胞である洞結節からの電気興奮刺激を受けて収縮・弛緩を繰り返すことを模して電気刺激し細胞単位での反復収縮をさせてその測定を行った。心筋細胞の形状は単離後に培養皿に接着させた状態では概ね 100 × 40 × 10 μm 程度の扁平な直方体の構造で、収縮中は長軸方向に短縮する。同一の測定点において、カンチレバーを連続上下させた。過去のラット新生児心筋細胞を用いた研究よりも高頻度となる平均秒間 40 回のサンプリングレートで計測を行った。

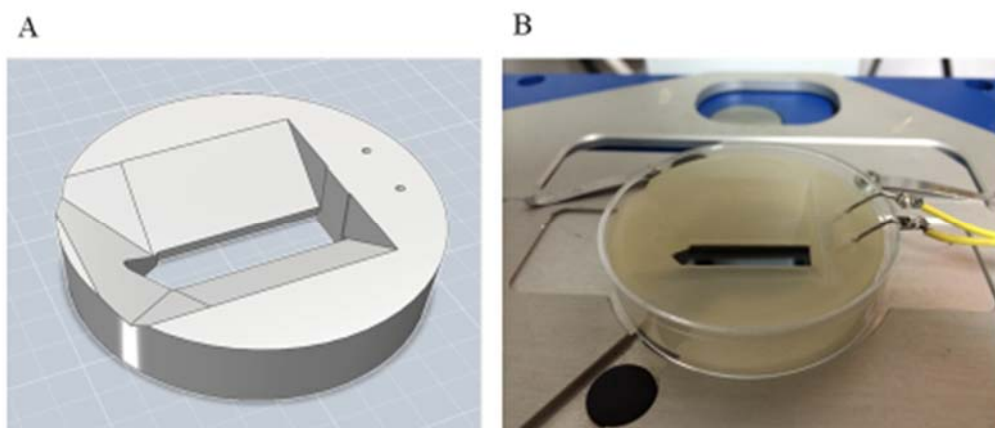


図 6. 心筋細胞のペースング装置

ペースング装置の 3DCG モデル(A)、実際のディッシュとペースング装置を組み合わせた電気刺激チャンバー(B)。



実験で用いた AFM のシステムは JPK 社の Nanowizard®である<sup>25)</sup>。この装置ではピエゾはカンチレバーのホルダーを動かすため、ディッシュは顕微鏡ステージ上に固定する。主要な AFM のシステム自体はその上部に覆いかぶさるように設置し、直上から試料に対してカンチレバーを下降させてアプローチする(図 3, 4)。

#### (AFM の測定条件)

AFM の測定に用いるカンチレバーは一定のバネ定数を有するが、測定前にはそれぞれカンチレバー毎のキャリブレーションが必要である。カンチレバーのバネ定数については熱ノイズ法によってキャリブレーションが必要であり、サーマルノイズ法でバネ定数を求めるが、これについてはディッシュ温度を一定にする代わりに、実験中は常に室温を 22°C で一定とし、ディッシュの液温も 22°C として設定した。短冊形のカンチレバーを液中でばね定数を測定した場合には実測値に  $\text{Correcting factor} = 0.817$  を乗じて補正した<sup>26)</sup>。

試料である心筋細胞は単離後に刺激への感受性が非常に強いことから、刺激が最小になるように小さく柔らかいカンチレバーを選択した。

三角形の OMCL-TR-400PB(Olympus 社) と短冊型の BL-RC-150VB(Olympus 社)を使用した。Hertz モデルによる Young 率の決定においては探針の形状が重要であり、カンチレバー全体は横方向に比較的安定な三角形型で、先端は Hertz モデ

ルで近似可能な四角錐の探針を持つカンチレバーの OMCL-TR-400PB を選択した<sup>27)</sup>。また、さらに細胞への刺激を少なくするために、ばね定数のより小さなカンチレバーである TR-150VB を使用した。

TR-150VB の探針は特殊な形状であるため、角度  $45^\circ$  の円錐に近似してヤング率を求めた。2 種類のカンチレバーが同一のチップに形成されており、主に長さ  $60\mu\text{m}$  でバネ定数が  $0.03\text{ N/m}$  の A レバーを使用した。B レバーでも同様に硬さの測定は可能ではあったが  $0.006\text{ N/m}$  と非常に柔らかいものの共振周波数が低く、実際の測定ではノイズが大きいという難点がある。使い分けとしてはヤング率を定量的に求める場合には探針が四角錐の形状を持つ TR-400PB を選択したが、それ以外では TR-150VB を使用した。

AFM の設定は以下に述べる。フォースマッピングの上下動の幅は  $2.5\mu\text{m}$  とした。Mathur らはカンチレバーで  $100\text{ nm}$  の押し込み量で  $100.3 \pm 10.7\text{ kPa}$  であり、押し込み量をそれ以上としても変化しなかったとしている<sup>28)</sup>。Hofman らは chicken の心筋細胞を最大  $6\text{ nN}$  の力で  $0.5\text{-}1\mu\text{m}$  を押し込む設定で測定し硬さをヤング率で  $5\text{-}30\text{ kPa}$  と報告している<sup>29)</sup>。Shroff らは Rat の心房の心筋細胞は  $3\text{-}7\text{ nN}$  の力で  $200\text{-}500\text{ nm}$  を押し込む設定でヤング率を  $0.5\text{-}0.67\text{ MPa}$  と報告している<sup>30)</sup>。その中で十分な押し込み距離では測定される数値は収束してくるとのことから、細胞が刺激死しない範囲内の十分な押し込み距離が得られる set point を

1-2 nN とした。実波形を観察しながら 0.5  $\mu\text{m}$  以上 1  $\mu\text{m}$  程度の押し込みを目標に設定した。測定範囲はサルコメアが十分観察が可能な 7  $\mu\text{m}$   $\times$  7  $\mu\text{m}$  の範囲を縦横で 64  $\times$  64 分割した各点で弾性率を測定した。

細胞膜タンパクと細胞外基質の処理条件を変えるため、コラゲナーゼ単独使用およびコラゲナーゼとプロテアーゼの併用を行った。また *mdx* マウスは心筋細胞の表面と細胞内小骨格であるアクチンフィラメントを接続することで細胞膜を強度的に安定させているジストロフィンが欠損しているために細胞膜が脆弱である<sup>31-34)</sup>。*mdx* マウスの心筋細胞表面の形状と細胞弾性をフォースマッピングで測定し、正常対照としての C57BL/10 マウス心筋細胞と比較した。

(サルコメア長の測定)

収縮中の心筋細胞のサルコメア長については Myocam システム(IonOptix 社, Milton, MA)を用いた。Myocam は光学顕微鏡に接続する高速カメラであり、フーリエ解析のシステムを組み合わせるサルコメア長の収縮中の変動を計測するものである。これによって単収縮におけるサルコメア長変化と心筋細胞の硬さ変化の同時測定を試みた。

(解析)

AFM で得られたデータの解析用のソフトウェアは Data Processing (JPK®社)を使用した。統計解析には JMP® pro 11(SAS 社) と Sigmaplot version 12.5 (Systat

Software 社)を用いた。平均値間の有意差検定をおこなったものは5回以上の平均を用いており、値は平均(mean)± 標準誤差(SEM) で表した。薬剤投与の効果判定について2群比較には Shapiro-Wilk 検定を用いた。P<0.05 を統計的に有意差ありと判断した。

## <結果>

### (イメージング)

単離した C57BL/6 の心筋細胞を探針を試料に持続的に接触させながら走査するコンタクトモードで細胞表面の測定を試みた。カンチレバーの XY 方向への動きと同じ方向に細胞全体が動いてしまった。カンチレバーを細胞に押し付ける力である **set point** の値を設定限界まで下げてカンチレバーと細胞間の相互作用を小さくしても結果は同様であった。これは単离心筋細胞の表面の凹凸が大きく AFM がフィードバックでピエゾを上下する範囲を超えてしまうため探針が細胞表面の凹凸に引っかかり、細胞全体が動いてしまったと考えられた。

インターミッテント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(図 7)。周期的に見える短軸方向の縞状パターンと球状の構造が観察された。Control の C57BL/6 マウスでの AFM で測定したサルコメア長 は平均で  $1.87\ \mu\text{m}$  ( $1.866 \pm 0.0138\ \mu\text{m}$ ) であり、同一細胞群の光学顕微鏡で測定した値の平均値は  $1.83\ \mu\text{m}$  ( $1.833 \pm 0.00719\ \mu\text{m}$ ) と有意差を認めなかった ( $P = 0.0622$ ) ( $n = 6$ )。

細胞の収縮能を保った状態の心筋細胞表面においても設定を十分に調整し非常に小さな力であれば AFM によるイメージングが可能であった。そして細胞表面から筋原線維の走行に一致した形態を観察することができることがわかった。Z-line, M-line, ミトコンドリアの画像についてはこれまでの固定した細胞や骨格

筋細胞に対して行われた以前の報告通りである<sup>35, 36)</sup>。また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していた(図 7, 8)<sup>35, 37)</sup>。

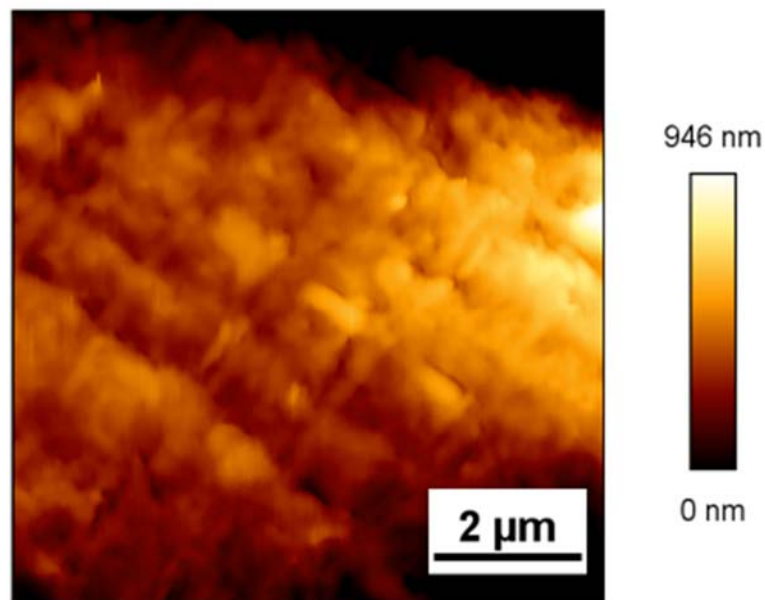


図 7. インターミットモードでの細胞の凹凸

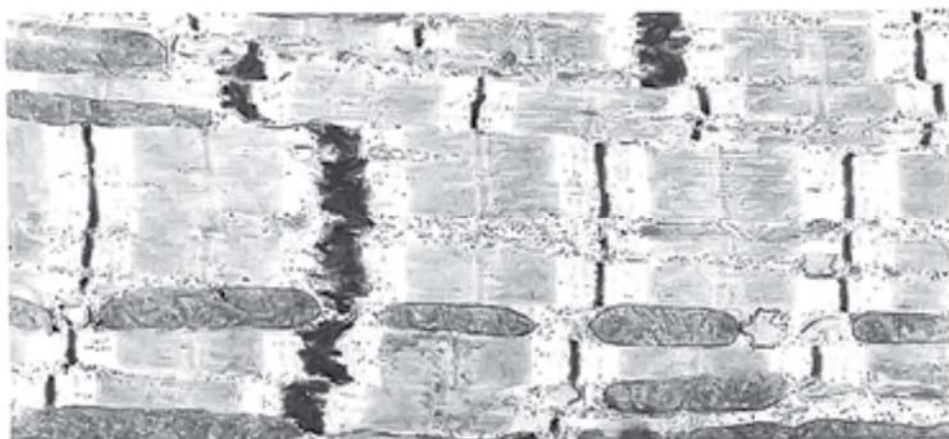


図 8. 心筋細胞の電子顕微鏡画像

(出典 Sarantitis, I, et al. The cytoskeleton of the cardiac muscle cell. *Hellenic J Cardiol.* 53:368p, 2012.<sup>3))</sup>

(細胞の硬さ)

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。サルコメア長を複数含む  $7\text{ }\mu\text{m}\times 7\text{ }\mu\text{m}$  の測定範囲で行った。測定時間を規定するものが解像度であり通常  $64\times 64$  点で行った。最大  $128\times 128$  の解像度でより精密な測定も行った。押し込みの目標は押し込み量を  $1\text{ }\mu\text{m}$  程度になるよう  $1\text{-}2\text{ nN}$  の範囲で調節した。細胞表面外のコラーゲンの弾性に対する影響を除外するために、測定できた領域のなかで縞構造が確認できる部分を選択しその細胞の硬さを求めた。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た (図 9)。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。

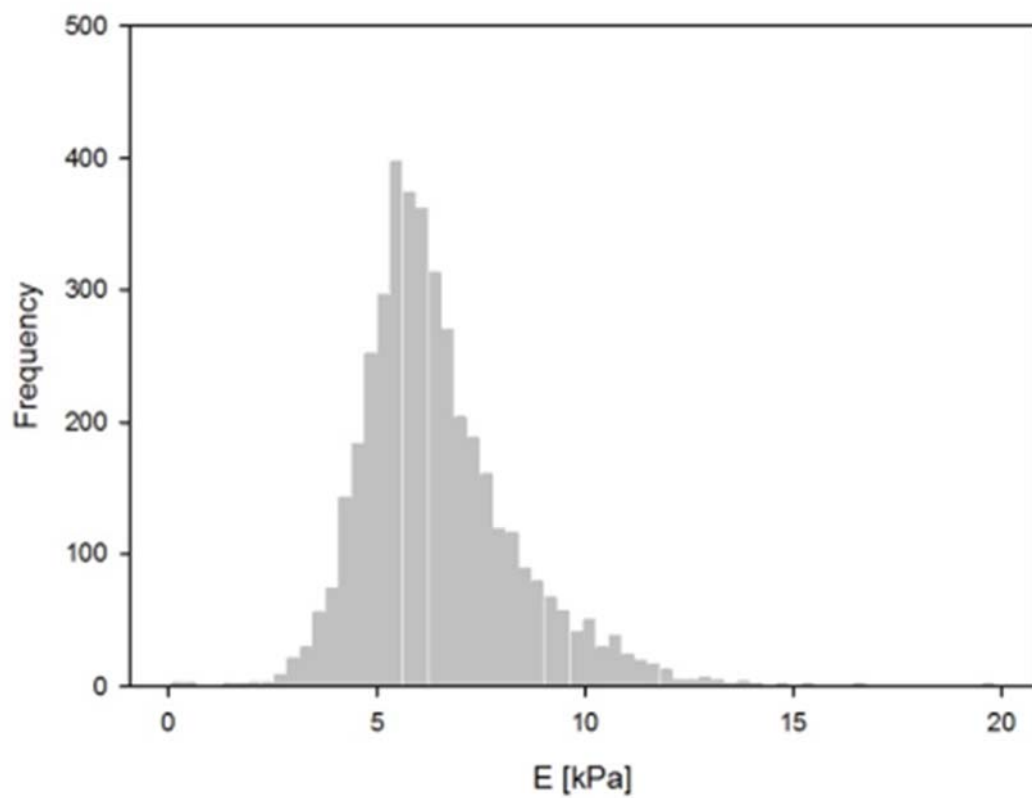


図 9. 代表的な心筋細胞(C57BL/6)の硬さのヒストグラム



フォースマッピングで得られた硬さの x,y 方向の分布が図 10 のように得られた。イメージングでも確認できた Z 帯と M 帯と同様にサルコメア長の半分の間隔で硬さのピークを認めた。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。Akiyama らの<sup>38)</sup>、心筋細胞から単離した single myofibril について AFM によって弾性率を測定した結果、周期的にサルコメア長と関連した弾性率のピークを Z 帯に認めた報告と一致し、この周期性を有する縞状構造は心筋細胞内の筋原線維のサルコメアであると考えられる。

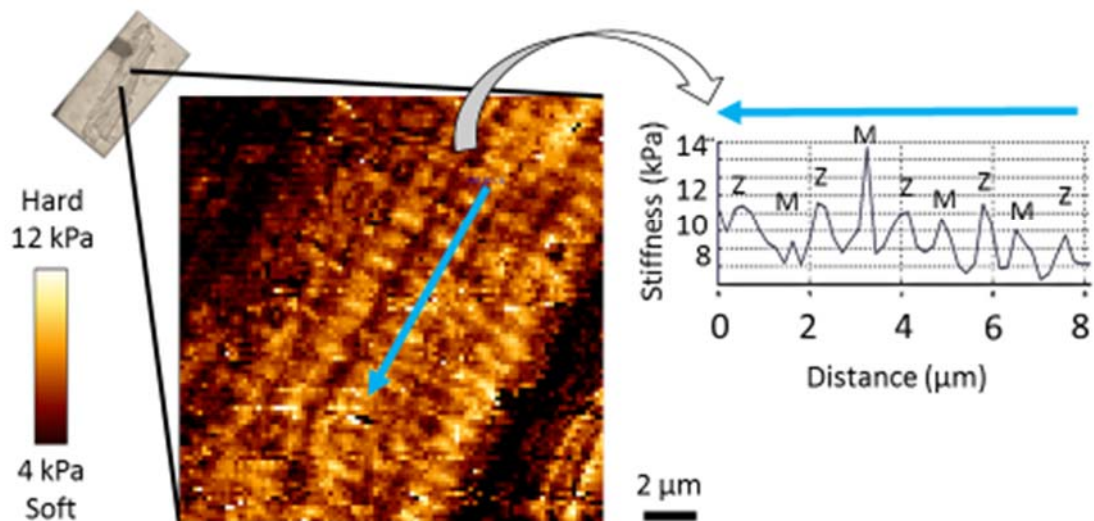


図 10. フォースマッピング

弾性率のフォースマッピングは周期的なピークを持ち、Z 帯と M 帯はほぼ同等の硬さを有する。

フォースマッピングでは細胞表面の測定が可能であってもインターミッテントモードのような解像度での測定は困難であったが、細胞への刺激を最小に抑えることができた。このときフォースカーブから得られる  $z$  位置の情報として、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) の二つの高さ情報が得られた。前者では細胞表面高は  $Z$  帯と  $M$  帯のそれぞれに対応する周期性がみられて、これはインターミッテントモードでの細胞表面高の情報と同様の周期性であった。一方後者のフォースマッピングの contact point でのイメージングではサルコメア長に一致した  $Z$ - $Z$  間隔のみの周期がみられた。力分光法ではカンチレバーのたわみが生じる最小の力を検出することができるために細胞膜表面が変形する直前の凹凸と考えられる。 $Z$  帯で細胞高が下がるのは、細胞膜と筋原線維がコストメアにて接近し両者間の距離が短くなっているからと考えられる (図 11 A, B) 。インターミッテントモードとフォースマッピングでの set point の凹凸形状は一定の力によって筋原線維まで押し当てられた状態での細胞膜表面の凹凸と考えられる。同一の範囲をこの二つの測定法で連続して測定した(図 12 A, B) 。細胞表面を含む凹凸ではインターミッテントモードではより詳細に観察できるため、筋原線維のイメージとは別に細胞膜表面の構造と思われる構造が認められるが(図 12 A) 、同一の領域で硬

さの分布をみるとその構造は短軸方向の硬さに影響を与えていないことがわかる (図 12 B)。

解像度の異なるフォースマッピングモードとインターミッテントモードのイメージングを組み合わせることで、細胞表面の高さ形状と硬さの分布の関係性を AFM 単独で同時に測定することが可能であった。

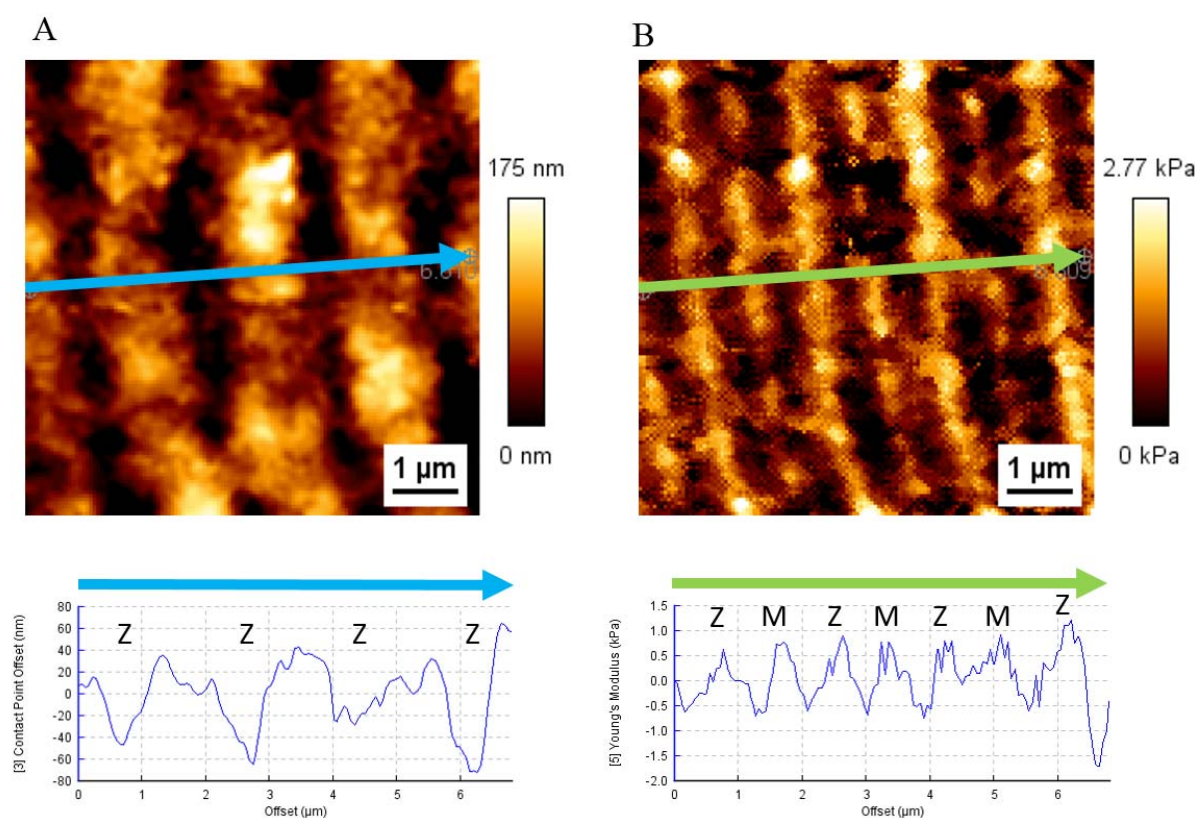


図 11. フォースマッピングで同時に測定された高さや硬さの比較  
細胞表面高さ(A) は Z 帯で谷となるパターンがみられるが、細胞の硬さ(B)は Z 帯と M 帯にピークを認める。

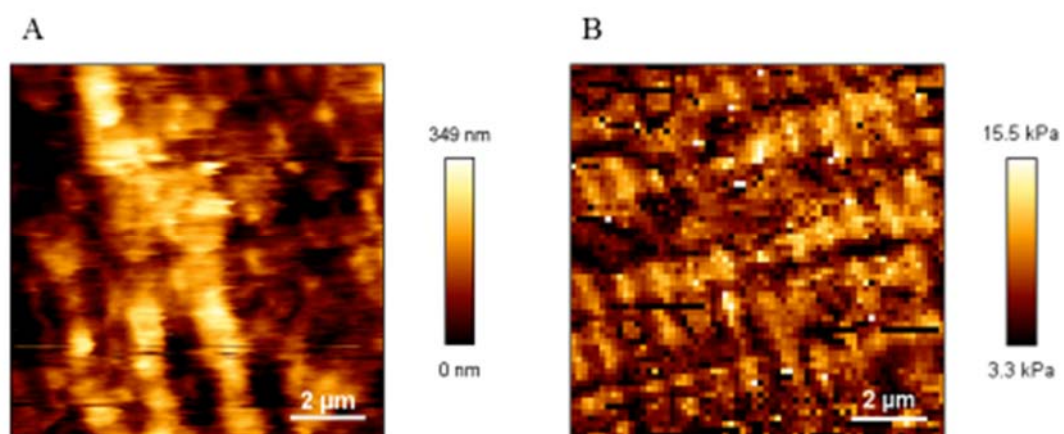


図 12. インターミットモードの凹凸とフォースマッピングでの硬さの比較  
同一範囲でのインターミットモードによる細胞表面高(A)  
とフォースマッピングによる硬さの分布(B)を比較した。

(*mdx* マウス心筋細胞の硬さ測定)

疾患モデルマウスの心筋細胞の力学的特性を測定することで、硬さの観点から疾患の理解が深まる可能性がある。Yasuda らの報告では、ジストロフィン欠損の疾患モデルマウスである *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<sup>39)</sup>。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。また後述の通りジストロフィンおよび関連蛋白であるサルコグリカン-ジストログリカン<sup>39)</sup>は心筋細胞の短軸方向を含めた側方からの力伝達に関与している可能性があるが、その検証の基礎としてジストロフィン欠損が心筋細胞の短軸方向の力学的特性に影響を与えるか否かを明らかにする必要がある。

ジストロフィン<sup>39)</sup>は分子量 427 kDa の巨大分子であり、細胞骨格としての役割を持つ。骨格筋細胞および心筋細胞においては収縮蛋白と細胞膜を連結し、細胞膜上のサルコグリカン・ジストログリカンと共にジストロフィン関連蛋白複合体を形成し、さらにジストログリカンと細胞外マトリックス間の結合を経て、心筋細胞内から細胞外マトリックスへの物理的な結合を形成している。ジスト

ロフィン欠損はデュシャンヌ型筋ジストロフィー、サルコグリカン欠損は肢帯型筋ジストロフィーを発症する<sup>40)</sup>。筋ジストロフィーは心不全を合併するが、ジストロフィン、サルコグリカン、ジストログリカンの其々の欠損が如何にして心機能に直接影響するかは未知の部分が多く、最近になり心筋細胞レベルで発症機序や病態生理が明らかになりつつある。ジストロフィン欠損マウスである *mdx* マウスの単離心筋細胞は、機械的負荷に対して細胞膜の脆弱性を示し、細胞内カルシウムの制御・恒常性に破綻を来す (図 13)<sup>39) 41)</sup>。

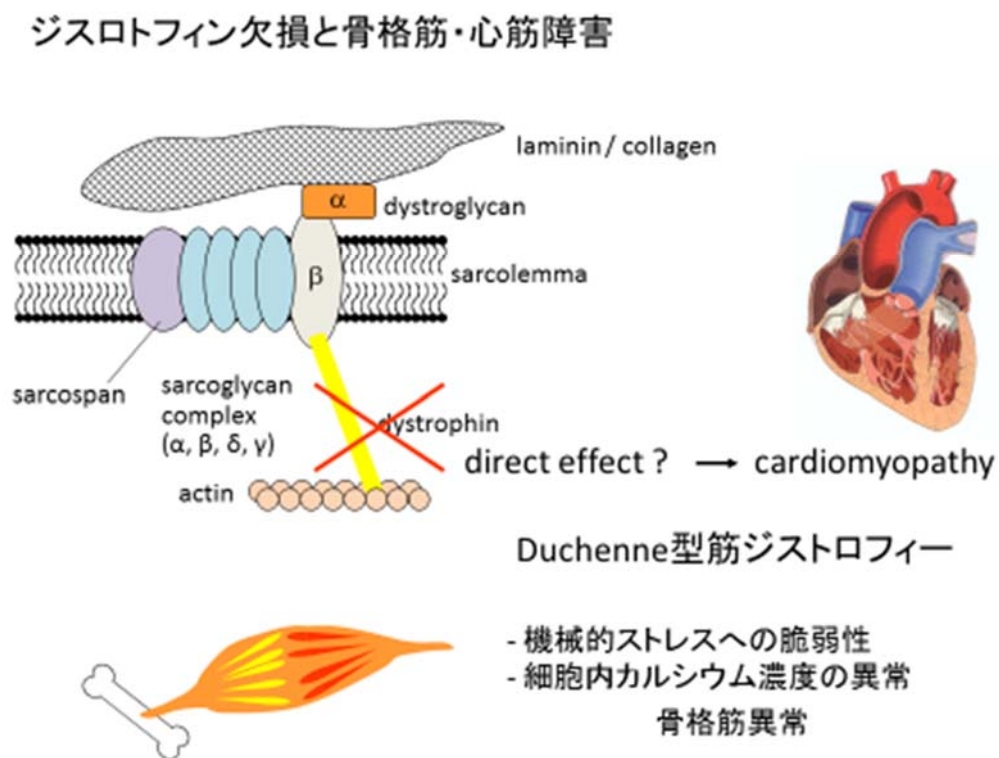


図 13. ジストロフィン欠損

サルコグリカン欠損マウスは、その心筋細胞は*mdx*マウス心筋細胞と異なり、機械的負荷に対しての細胞膜の破綻を示さず<sup>42)</sup>、冠動脈造影にて冠動脈攣縮が認められたことから、心筋虚血が心筋障害の原因であると考えられている（図14）<sup>43, 44)</sup>。

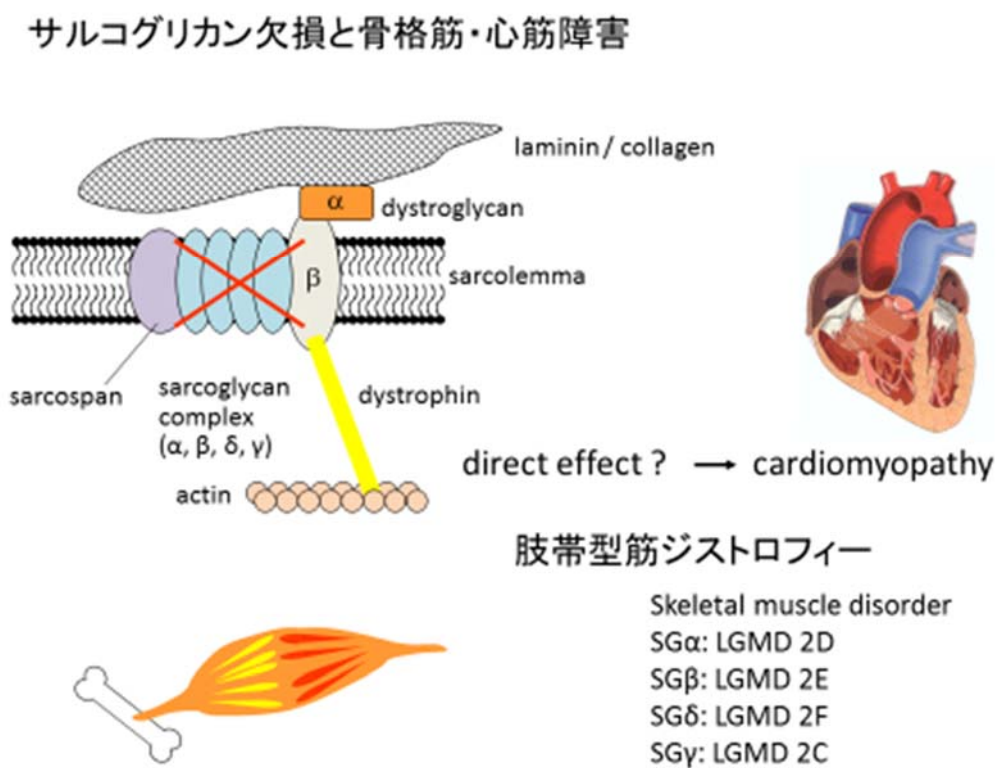


図 14. サルコグリカン欠損



ジストログリカン欠損による心不全発症の機序を解明するためにジストログリカンのノックアウトマウスは有用と考えられるが、この遺伝子組み換えマウスは胎生致死であり<sup>45)</sup>、心筋細胞におけるジストロフィン関連蛋白群の中ではジストログリカンの機能は不明な点が多い（図 15）。

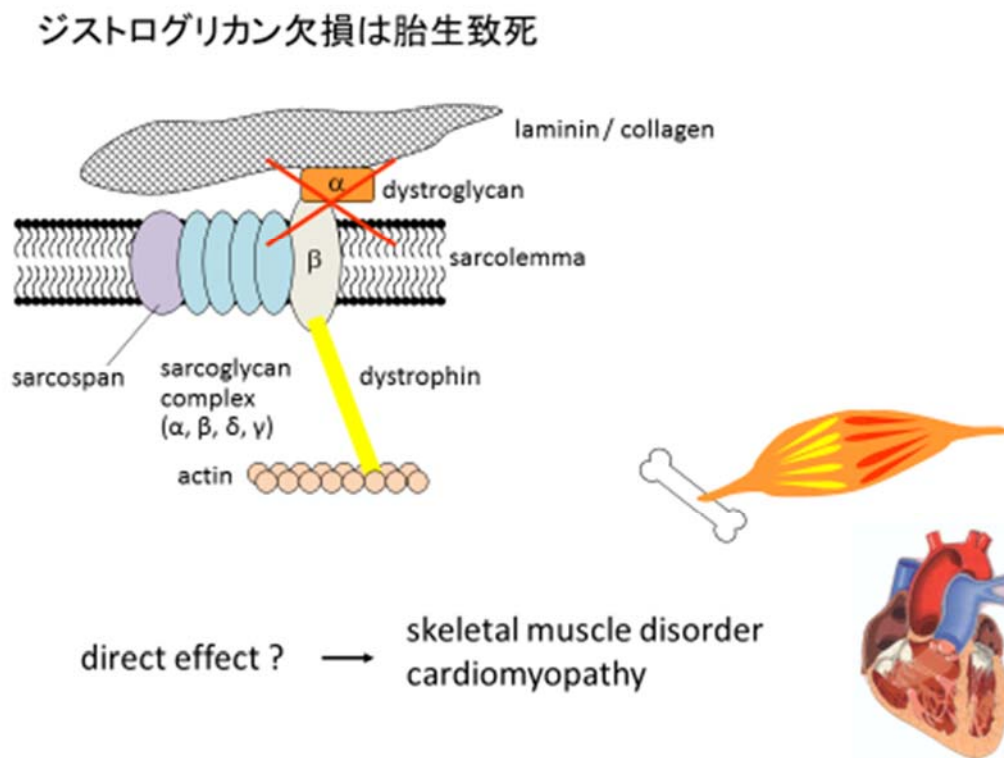


図 15. ジストログリカン欠損



ジストロフィン・サルコグリカン・ジストログリカンの結合を考慮すると、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。そこでまず、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。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ためコラゲナーゼ処理のみ行った場合と、細胞外マトリックスおよび細胞表面の蛋白を分解するためコラゲナーゼ+プロテアーゼによる処理を行った場合を比較した。コラゲナーゼ処理のみの BL/10 マウス心筋細胞表面は、細胞外マトリックスと考えられる構造物により覆われ、心筋細胞表面の観察が困難であり、プロテアーゼ処理を加えることにより、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単離の際にプロテアーゼを用いずにコラゲナーゼ処理のみにて細胞表面が観察可能であった (図 16)。

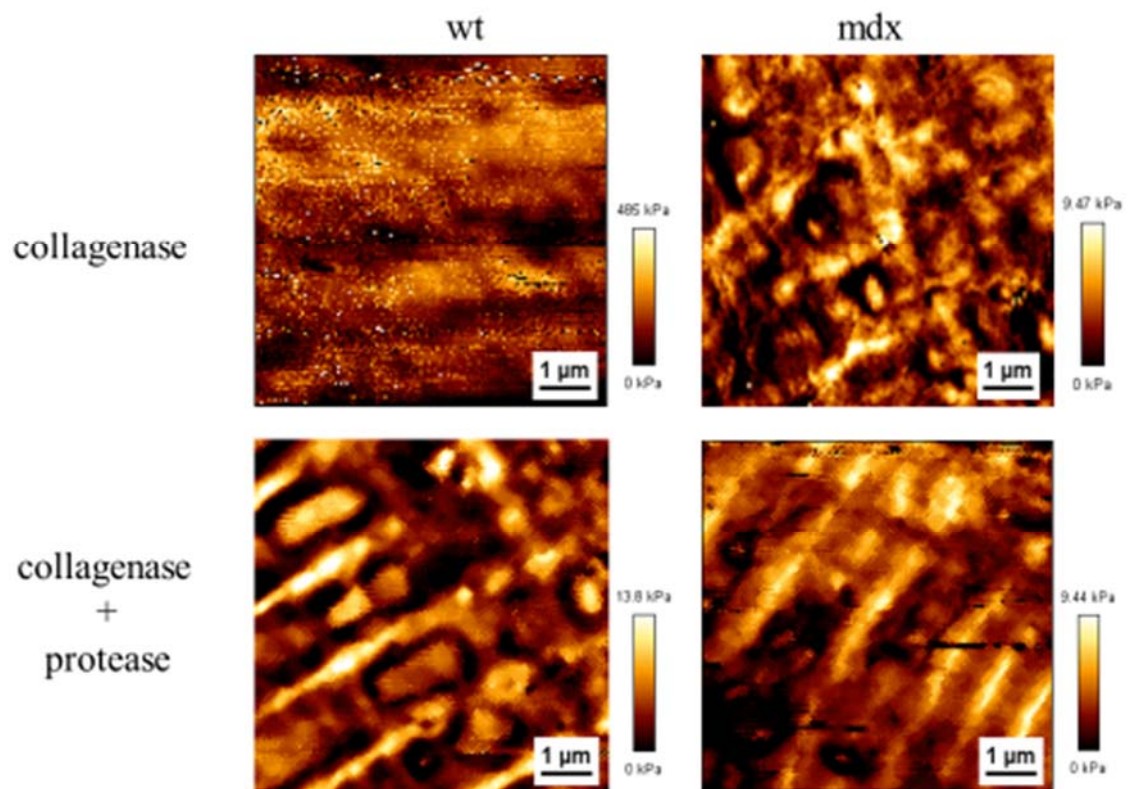


図 16. コントロールと *mdx* マウスの細胞表面の硬さの分布  
Protease の有無にかかわらず *mdx* マウスでは細胞弾性率の測定が容易であった。

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。

心筋組織における心筋細胞への力学的負荷には2方向、すなわち長軸方向の力伝達 (longitudinal force transmission) と短軸方向の力伝達 (lateral force transmission) が存在し（図 17）、そのうち細胞外マトリックスから細胞膜を経て細胞内に至る心筋細胞短軸方向の機械的・化学的伝達経路 (mechanosignal transduction) の消失が筋ジストロフィーにおける心不全の原因である可能性がある。従って、lateral force transmission に関する基礎的実験として正常および筋ジストロフィーにおける心筋細胞の短軸方向の力学的特性を比較した。

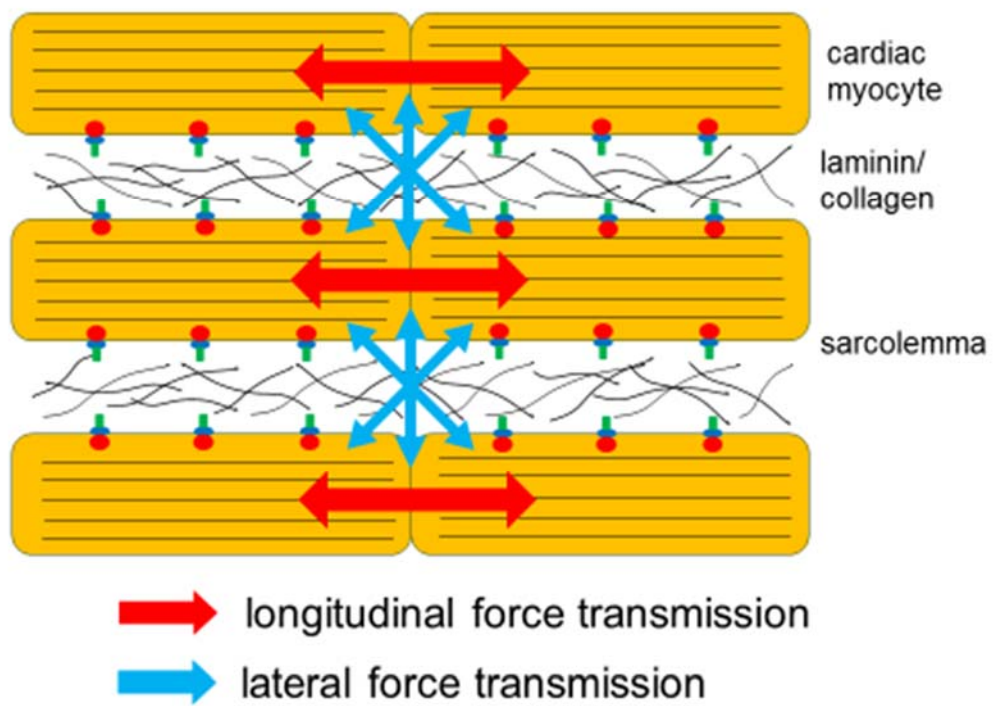


図 17. 心筋細胞間の力の伝達

ジストロフィン欠損モデルである *mdx* マウスとコントロールの C57BL/10 マウスの心筋細胞を比較した。C57BL/10 で  $8.851 \pm 0.575$  kPa であり *mdx* マウスで  $9.068 \pm 0.875$  kPa と短軸方向の硬さに有意な差を認めなかった(図 18)。ジストロフィンの有無や細胞膜の状態が細胞骨格の短軸方向の硬さ測定に影響を与えないことが示唆された。

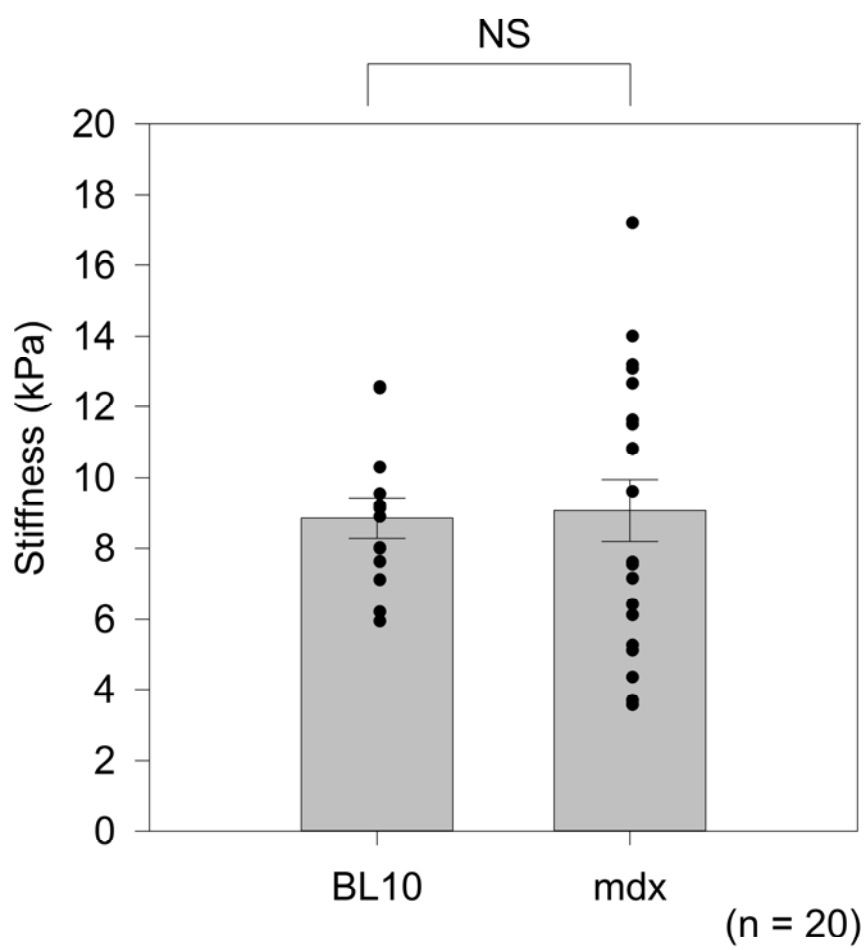


図 18. フォースマッピングでの BL/10 と *mdx* の心筋細胞の硬さの比較

(イソプロテレノール)

心不全状態では自律神経の緊張によりカテコラミン活性が高まっている。また心不全を始めとして $\beta$ 受容体刺激薬は広く臨床の場で使用される薬剤である。収縮機能および能動的拡張機能を亢進させる交感神経 $\beta$ 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。

(C57BL/6 マウスの心筋細胞の静止状態の硬さ)

フォースマッピングによって評価してから直ちにAFM装置下のチャンバー内5 mlのTyrode液に対して1 mMのイソプロテレノールを0.25  $\mu$ l滴下し50 nMの濃度とした。直ちにAFMをセットし、同じ細胞に同じ設定で再測定を行った ( $n = 11$ )ところ、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。投与前は  $7.004 \pm 0.842$  kPa、投与後は  $8.516 \pm 0.907$  kPa で変化の平均の差は 1.513 kPa であった。Shapiro-Wilk 検定では両側で  $p = 0.0167$ 、片側検定では  $p = 0.00833$  で有意な差を認めた(図 19)。Sumita らによるとイソプロテレノールの投与で左室肥大を起こした心筋細胞の硬さが上昇したとの報告があるが<sup>46)</sup>、左室肥大の有無に関わらず、交感神経 $\beta$ 受容体刺激薬としてのイソプロテレノールの投与でも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。

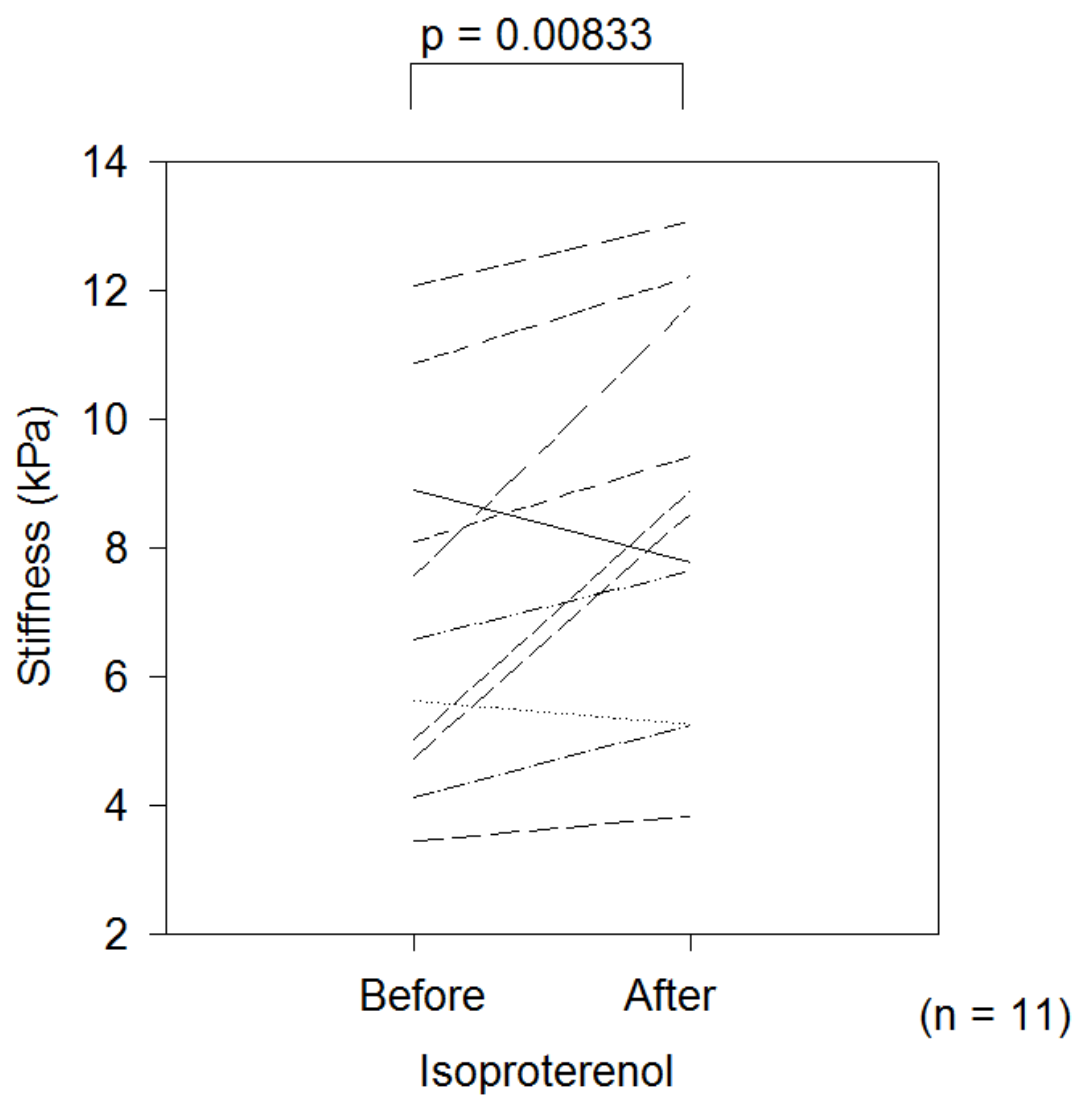


図 19. 静止時のイソプロテレノール投与による硬さの変化



(高時間分解能の力分光法)

C57BL/6 の単離した細胞を試料とした。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。力分光法の設定については測定の高さの範囲を設定し、データの記録もカンチレバー押し込み方向のみとし retract 方向は移動速度を大きく設定した。上下動の Z-range は  $2.5\ \mu\text{m}$  に設定し、収縮によって細胞表面高が上昇してきても力分光法による測定が可能ないように調整した。押し込み距離および押し込み速度を設定し、一回の測定の押し込み時間を  $10\ \text{ms}$  に設定した。この設定で細胞表面に接してから  $1\ \text{nN}$  の力まで到達する時間は  $3\ \text{ms}$  前後となった(図 20)。カンチレバーの測定位置は心筋細胞の中間付近の細胞収縮による動きの小さい箇所を設定し測定を行った。心筋細胞の単収縮時の硬さの経時的変化を 1 秒間に約 40 回の力分光法の測定が可能であった。収縮に伴い細胞表面高は上昇した(図 21)。また収縮時のフォースカーブの押し込み後の傾きは減少し、硬さとしてのヤング率が低下した(図 22)。細胞表面の硬さの測定と同時に光学顕微鏡に接続した Myocam でサルコメア長の変化を測定すると、収縮中のそれぞれの変化は同時におこり、いずれも心筋細胞の収縮に伴う変化であった(図 23)。

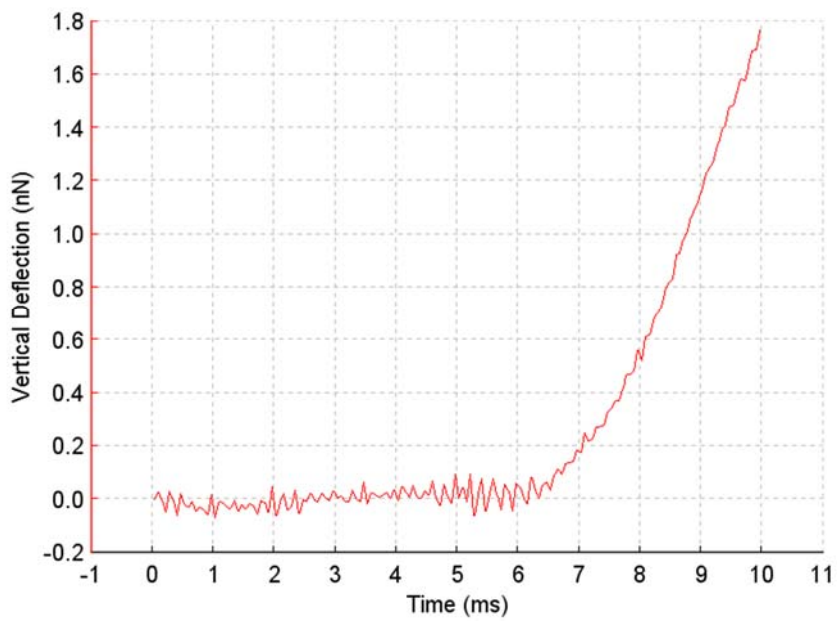


図 20. 押し込み時間とカンチレバーのたわみの関係

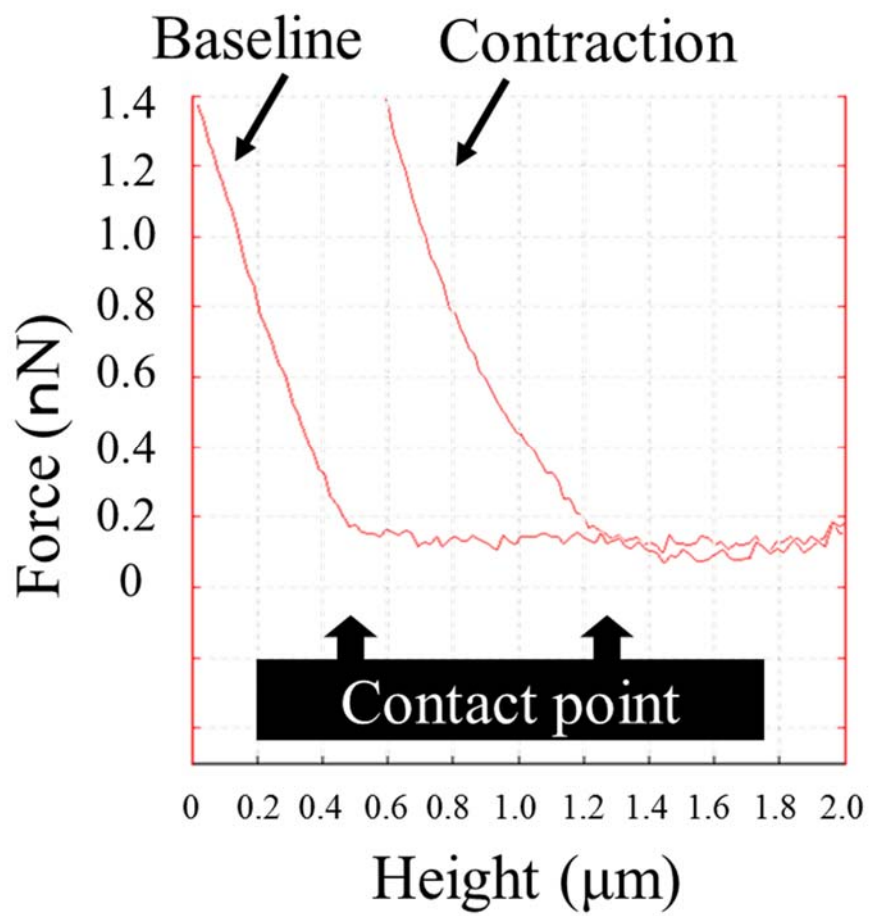


図 21. 収縮時と弛緩時の心筋細胞表面高

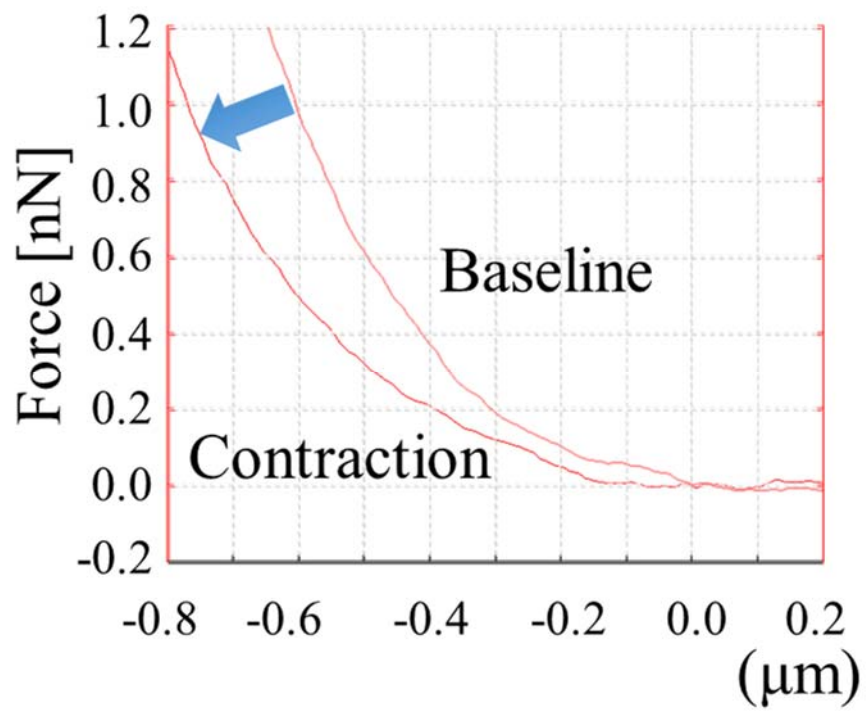


図 22. 収縮時のフォースカーブの傾きの変化

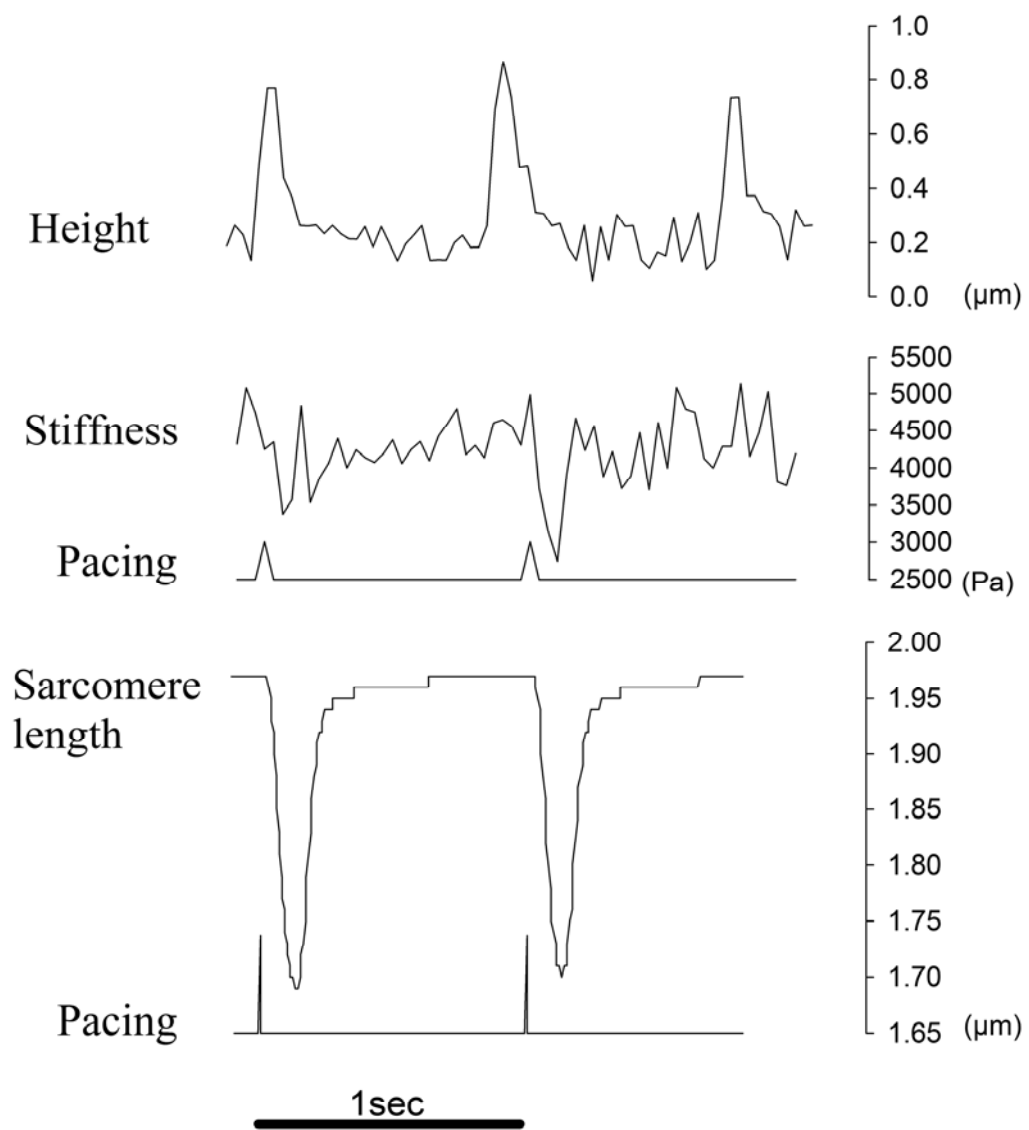


図 23. 心筋細胞の細胞表面高・硬さ・サルコメア長の変化の同時測定

収縮中の硬さの変化を加算平均すると細胞の高さの変形とほぼ同時に硬さの変化が生じることが観察された（図 24）。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。得られた結果については収縮の弾性率のピーク値を平均し、イソプロテレノールの投与前後で Shapiro-Wilk 検定において投与前が  $10.925 \pm 2.804$  kPa、イソプロテレノール投与後が  $7.804 \pm 1.777$  kPa であり、有意に収縮ピーク時の硬さは低下した（ $P = 0.0386$ ）（図 25）。

このことは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を示唆する。

心筋細胞が単収縮する時の短軸方向への短縮率は 5-15% である<sup>47)</sup>。心筋細胞が単純な楕円柱で細胞の体積は一定のままと仮定すると、図 23 のように長軸径が均等に 13% 短縮した場合には短軸方向の断面積は 15% 増加し短軸径は 7% の増加となる。細胞の短軸方向の厚さを  $10\text{ }\mu\text{m}$  としたときには収縮時には厚さが  $0.7\text{ }\mu\text{m}$  増すこととなり、測定はカンチレバーを用いた片側からの押し込みであるため  $0.35\text{ }\mu\text{m}$  の厚さの増加が影響を与える変化と考えられる。細胞膜表面から 100-150nm の押し込みでも筋原線維の硬さ分布が反映されることから<sup>36)</sup>、仮に横軸方向の厚さの変化がすべて細胞膜直下の細胞質器質の増加とした場合でも、細胞膜表面から最大で  $1\text{ }\mu\text{m}$  押し込めば、厚さの増加分をこえてカンチレバーの測定は筋原線維に到達しているものと考えられる。

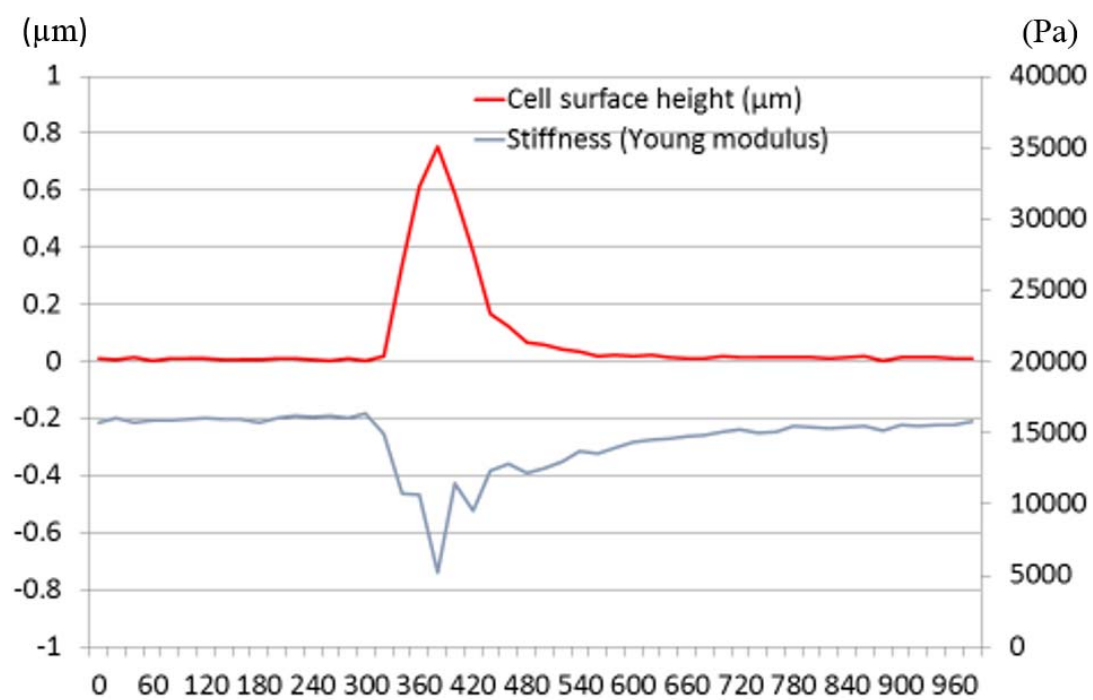


図 24. 高時間分解能での力分光法の結果の加算平均

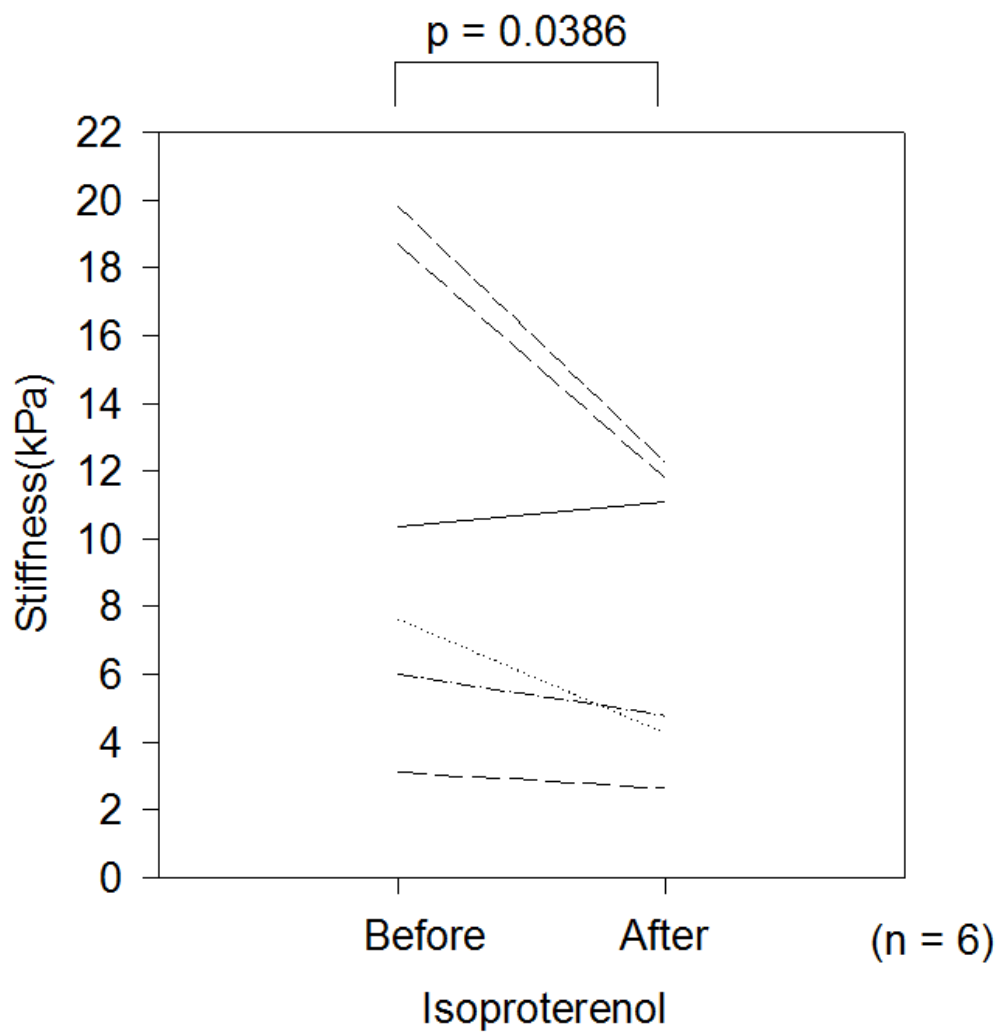


図 25. イソプロテレノール投与前後の収縮時の硬さ低下のピーク値の比較

## <考察>

### (イメージング)

AFM によるイメージングで心筋細胞の細胞表面のみならず細胞膜直下を含めた構造の形状と細胞の硬さの分布を重ねた像を測定することができた。インターミッテントモードのイメージングは測定条件の微調整が必要であり技術的に難しかった。これは細胞表面への刺激で容易に興奮し細胞死してしまい、また細胞表面の凹凸が AFM の測定にとって大きいためであった。AFM にとって測定対象の細胞の固定と表面形状のある程度の平坦さが重要であるため、これが先行研究では培養された細胞を使用するか、薬剤で細胞固定されることが多い理由であろうと考えられた。しかしカンチレバーの選択やディッシュへの細胞の接着の強化や測定系の細胞への相互作用を測定可能限界まで小さくするといった改良によって成功率の改善を見た。実際に得られる画像の解像度は理論上では SEM の電子顕微鏡に匹敵するが、特に細胞が生きた状態のまま測定できるのは AFM の利点である。

インターミッテントモードに加えて、フォースマッピングによる測定は XY 方向に最大で  $128 \times 128$  という低解像度ながら、単位面積当たりの解像度が理論上カンチレバーの探針の先端サイズまで上げることができることから数  $\mu\text{m}$  程度の範囲であれば心筋細胞の観察には十分であると考えられた。三次元的な凹



凸のみならず硬さという物理的特性を同時に測定することが可能であり、情報量としては大きく向上する。心筋細胞の表面のイメージングでは明らかな構造体としてサルコメアやミトコンドリアの構造を確認することができた。ただ、それぞれの構造は測定方法によってその違いがみられた。インターミッテントモードでは細胞内のミトコンドリアや筋原線維の凹凸形状が明瞭に観察された。これは細胞表面全体を一定の力で押し付けた状態で測定した形状ともいえるため、細胞表面に付属する細胞外基質だけでなくミトコンドリアのような細胞内小器官までよく観察されるものと考えられた。その一方でフォースマッピングでのイメージングにカンチレバーの最小のたわみが発生する  $z$  方向の位置情報を用いることで、インターミッテントモードと異なる細胞膜の隆起が観察された。これは実際に細胞膜タンパクと筋原線維が  $Z$  帯に一致して機械的に連結していることの直接的な観察と考えられた。しかし、フォースマッピングでの硬さ分布では、筋原線維以外はいずれの硬さも数値が同程度か小さいため無視できるか、ミトコンドリアのように大きな構造体はより柔らかい値の分布として観察された。すでに報告されているような心筋細胞以外の培養細胞でのイメージ程度にはアクチンファイバーの走行は目立たなかった。これらの結果から、すでに長軸方向はいうまでもなく筋原線維が心筋細胞全体の弾性の主決定要因であるが、短軸方向についても心筋細胞の形態および機械的特性を与えている

のは巨大な筋原線維であることが示唆された。さらに心筋細胞においては全領域で筋原線維の走行が観察されることから、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。

(ジストロフィン関連)

*mdx* マウスの筋細胞においては、ジストロフィンが欠損していることによって正常と比較して細胞膜と Z 帯に付着する細胞膜のコスタメアとの機械的な連結が少ないために細胞膜の脆弱性がゆえに細胞死しやすく筋ジストロフィーのモデルマウスである<sup>40)</sup>。心筋細胞においては静止時の短軸方向の硬さの分布について Control 群と平均の硬さには有意差を認めなかった。この理由は *mdx* の異常が筋原線維によるものではないことと、前述したように筋原線維が細胞全体の硬さを規定し得ることを合わせて説明し得ると考えられる。またジストロフィンに関連した細胞膜蛋白の局在が変化しても細胞自体の短軸方向の硬さは変化しなかった。一方で *mdx* マウスを用いたフォースマッピングはプロテアーゼを用いずコラゲナーゼによる処理のみでも細胞の各種測定が明瞭に行えたことから、細胞膜内外の連結タンパクの有無が細胞外マトリックスの結合にも影響していることが示唆された。本研究の結果からはジストロフィンの有無が心筋細胞の短軸方向の力学的特性に与える直接の意義はまだ明らかでないが、細胞膜の安定性だけではなく、また細胞表面に付着する細胞外マトリックスとの連結

の安定性にも関与しているものと考えられた。

(イソプロテレノール)

薬剤による硬さの変化については複数の報告がある。Angiotensin II の投与した直後に腎細胞の培養細胞で硬さが一時的に上昇する<sup>48)</sup>。血管内皮細胞でも同様にサイトカイン(TNF- $\alpha$ ) に反応した細胞骨格の構造変化により弾性が変化することが報告されている<sup>49)</sup>。細胞骨格の構造変化が細胞全体の硬さに影響を与えるのであれば、心筋細胞について考えた場合には、本研究にて得られた結果から少なくとも短軸方向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。

また静止状態にイソプロテレノールによって心筋細胞内の  $\beta$  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の数が増加した可能性がある。

交感神経刺激の経路はその他にも存在しており、また細胞内カルシウム濃度による変化の他にも細胞内シグナルの変化による細胞内構造の性質変化が報告されていることから、非収縮時の細胞の硬さを変化させた要因は他にも考えられる。最大の弾性蛋白であるタイチンがカルシウム濃度の影響や  $\beta$  刺激から PKA シグナルを受けて弾性を変化させると指摘されている。筋原線維の硬さの

平均値はほぼ Z 帯-M 帯間に分布しており、AFM の測定においては細胞の弾性は対象を均質な弾性体として仮定して探針が押し込んだ場所の弾性率を算出する。光学顕微鏡で観察される I 帯および A 帯を無視した分布であるが、タイチンはこの領域に存在している筋原線維内の構造であり、この領域の硬さへのタイチンの関与は否定できない。タイチンの変異が心筋症の原因となりうることが報告されている<sup>50)</sup>。自然発生のタイチン異常のラットが存在しており、心筋の弾性が変化していることが予想される。Z 帯-M 帯間を結ぶ様々な構造は拡張機能に関係する可能性があり、疾患としての拡張不全を考えた場合には同領域の短軸方向の硬さの解析から新たな知見が期待される。

これまで心筋細胞の硬さを測定する試みがなされてきたが、単離された成体心筋細胞レベルで生理的条件下での収縮に伴う連続的に経時的な硬さの変化を測定した報告はない。本研究において、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した。Chamber stiffness を規定する要素として、従来は心筋細胞の長軸方向の発生張力と細胞外マトリックスが挙げられ、各々の寄与の程度は未だ確定していない。また、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。

本実験の限界としては、無負荷の心筋細胞の能動的な弛緩のみの測定であることである。心臓が心室腔の内圧を受けながら拡張していることから、心筋細胞の短軸方向の硬さは拡張期の早期すなわち収縮末期の直後から、拡張末期にかけてのいずれの時相においても拡張機能に影響していると考えられる。しかし生理的な条件下での心筋細胞においては拡張末期には心房から心室への流入血流を受けて受動的な伸長が生じる。従って、漸増する力学的負荷を受けた条件下での短軸方向の硬さ測定が将来の課題となるが、こうした心臓の壁内環境の再現にはまだ実験装置に改良の必要がある。現状の AFM のシステムは試料周囲のスペースに制約があるため他の実験装置を持ち込むことが困難であるが、当研究室における既存の手法であるカーボンファイバー等を用いた心筋細胞の長軸方向の張力測定装置や細胞内 Ca 測定装置と組み合わせた、さらに詳細な心筋細胞の短軸方向の力学的特性の解析方法の開発が今後の目標である。

## < 結論 >

AFM を用いてマウス心筋細胞の表面形状の詳細な可視化と、短軸方向の力学的物性の評価を行った。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。細胞短軸方向の硬さについては、縦弾性係数に関して筋原線維が主要な要素と考えられた。定量化にはさらに改善が必要であるが、単収縮中の心筋細胞の硬さの変化を測定することに成功し、単収縮中には予想に反して短軸方向の硬さが低下することを発見した。イソプロテレノールの投与によって弛緩状態の硬さは上昇し、収縮中の硬さは低下した。イソプロテレノールによる心臓の収縮機能の向上という臨床上認められる作用に関連する新しい所見と考えられた。

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。心不全の心臓から単離した心筋細胞を用いて、弾性率の変化が収縮機能あるいは拡張機能に与える影響を確認できれば、今後拡大すると考えられる iPS 細胞を用いた心筋細胞レベルでの研究<sup>51)</sup>において心

機能を予測する手法の開発や創薬に役立つ可能性を有している。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。

## <謝辞>

本研究は多くの方々からご指導を頂きました。ここに感謝の言葉を述べさせていただきます。AFMの各種設定についてご相談させて頂きました JPK 小幡谷育夫様、ご指導を頂きました関東中央病院循環器内科部長の山下尋史先生、自治医科大学附属さいたま医療センター循環器内科教授の藤田英雄先生、そして最大のご支援ご指導を頂きました東京大学医学部附属病院循環器内科特任講師の保田壮一郎先生にこの場を借りて御礼申し上げます。



<参考文献>

- 1) Zile, M.R. New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part II: Causal Mechanisms and Treatment. *Circulation*. 105:1503-1508, 2002.
- 2) Severs, N.J. The cardiac muscle cell. *Bioessays*. 22:188-99, 2000.
- 3) Sarantitis, I., Papanastasopoulos, P., Manousi, M., Baikoussis, N.G. & Apostolakis, E. The cytoskeleton of the cardiac muscle cell. *Hellenic J Cardiol*. 53:367-79, 2012.
- 4) Borbely, A. et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 111:774-81, 2005.
- 5) Fukuda, N., Wu, Y., Nair, P. & Granzier, H.L. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*. 125:257-71, 2005.
- 6) Nesto, R.W. & Kowalchuk, G.J. The ischemic cascade: temporal sequence of hemodynamic, electrocardiographic and symptomatic expressions of ischemia. *Am J Cardiol*. 59:23c-30c, 1987.
- 7) Hanson, J. & Huxley, H.E. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature*. 172:530-2, 1953.

- 8) Huxley, A.F. & Niedergerke, R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*. 173:971-3, 1954.
- 9) Iribe, G., Helmes, M. & Kohl, P. Force-length relations in isolated intact cardiomyocytes subjected to dynamic changes in mechanical load. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292:H1487-97, 2007.
- 10) Maruyama, K. Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J*. 11:341-5, 1997.
- 11) Costa, K.D., Takayama, Y., McCulloch, A.D. & Covell, J.W. Laminar fiber architecture and three-dimensional systolic mechanics in canine ventricular myocardium. *Am J Physiol*. 276:H595-607, 1999.
- 12) Jacot, J.G., Martin, J.C. & Hunt, D.L. Mechanobiology of cardiomyocyte development. *J Biomech*. 43:93-8, 2010.
- 13) Miyaji, K. et al. Myocardial tactile stiffness: a variable of regional myocardial function. *J Am Coll Cardiol*. 31:1165-73, 1998.
- 14) Halperin, H.R. et al. Transverse stiffness: a method for estimation of myocardial wall stress. *Circ Res*. 61:695-703, 1987.
- 15) Tamura, Y., Hatta, I., Matsuda, T., Sugi, H. & Tsuchiya, T. Changes in

- muscle stiffness during contraction recorded using ultrasonic waves. *Nature*. 299:631-3, 1982.
- 16) Jarosch, R. Large-scale models reveal the two-component mechanics of striated muscle. *Int J Mol Sci*. 9:2658-723, 2008.
  - 17) Domke, J., Parak, W.J., George, M., Gaub, H.E. & Radmacher, M. Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscope. *Eur Biophys J*. 28:179-86, 1999.
  - 18) Azeloglu, E.U. & Costa, K.D. Cross-bridge cycling gives rise to spatiotemporal heterogeneity of dynamic subcellular mechanics in cardiac myocytes probed with atomic force microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 298:H853-60, 2010.
  - 19) Moy, V.T., Florin, E.L. & Gaub, H.E. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*. 266:257-9, 1994.
  - 20) Rief, M. Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science*. 276:1109-1112, 1997.
  - 21) Herman, D.S. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 366:619-28, 2012.
  - 22) Guo, W. et al. RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates

- titin splicing. *Nat Med.* 18:766-73, 2012.
- 23) Chung, C.S. et al. Shortening of the elastic tandem immunoglobulin segment of titin leads to diastolic dysfunction. *Circulation.* 128:19-28, 2013.
  - 24) Shahin, V. et al. The genome of HSV-1 translocates through the nuclear pore as a condensed rod-like structure. *J Cell Sci.* 119:23-30, 2006.
  - 25) Instruments, J. JPK Data Processing Software Manual ver 4.2 (2012).
  - 26) Butt, H.J. & Jaschke, M. Calculation of Thermal Noise in Atomic-Force Microscopy. *Nanotechnology.* 6:1-7, 1995.
  - 27) Dimitriadis, E.K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B. & Chadwick, R.S. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J.* 82:2798-810, 2002.
  - 28) Mathur, A.B., Collinsworth, A.M., Reichert, W.M., Kraus, W.E. & Truskey, G.A. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech.* 34:1545-53, 2001.
  - 29) Hofmann, U.G., Rotsch, C., Parak, W.J. & Radmacher, M.

- Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *J Struct Biol.* 119:84-91, 1997.
- 30) Shroff, S.G., Saner, D.R. & Lal, R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *Am J Physiol.* 269:C286-92, 1995.
  - 31) Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A. & Moore, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:1189-92, 1984.
  - 32) Consolino, C.M. & Brooks, S.V. Susceptibility to sarcomere injury induced by single stretches of maximally activated muscles of mdx mice. *J Appl Physiol (1985).* 96:633-8, 2004.
  - 33) Dangain, J. & Vrbova, G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve.* 7:700-4, 1984.
  - 34) Sicinski, P. et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 244:1578-80, 1989.
  - 35) Davis, J.J., Hill, H.A. & Powell, T. High resolution scanning force microscopy of cardiac myocytes. *Cell Biol Int.* 25:1271-7, 2001.
  - 36) Ogneva, I.V., Lebedev, D.V. & Shenkman, B.S. Transversal stiffness

- and Young's modulus of single fibers from rat soleus muscle probed by atomic force microscopy. *Biophys J.* 98:418-24, 2010.
- 37) Fawcett, D.W. & McNutt, N.S. The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J Cell Biol.* 42:1-45, 1969.
  - 38) Akiyama, N., Ohnuki, Y., Kunioka, Y., Saeki, Y. & Yamada, T. Transverse stiffness of myofibrils of skeletal and cardiac muscles studied by atomic force microscopy. *J Physiol Sci.* 56:145-51, 2006.
  - 39) Yasuda, S. et al. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature.* 436:1025-9, 2005.
  - 40) Rahimov, F. & Kunkel, L.M. The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 201:499-510, 2013.
  - 41) Fanchaouy, M. et al. Pathways of abnormal stress-induced Ca<sup>2+</sup> influx into dystrophic mdx cardiomyocytes. *Cell Calcium.* 46:114-21, 2009.
  - 42) Townsend, D., Yasuda, S., McNally, E. & Metzger, J.M. Distinct pathophysiological mechanisms of cardiomyopathy in hearts lacking dystrophin or the sarcoglycan complex. *Faseb j.* 25:3106-14, 2011.

- 43) Wheeler, M.T. et al. Secondary coronary artery vasospasm promotes cardiomyopathy progression. *Am J Pathol.* 164:1063-71, 2004.
- 44) Coral-Vazquez, R. et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell.* 98:465-74, 1999.
- 45) Williamson, R.A. et al. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet.* 6:831-41, 1997.
- 46) Sumita Yoshikawa, W. et al. Increased passive stiffness of cardiomyocytes in the transverse direction and residual actin and myosin cross-bridge formation in hypertrophied rat hearts induced by chronic beta-adrenergic stimulation. *Circ J.* 77:741-8, 2013.
- 47) Colligan, P.B., Brown-Borg, H.M., Duan, J., Ren, B.H. & Ren, J. Cardiac contractile function is enhanced in isolated ventricular myocytes from growth hormone transgenic mice. *J Endocrinol.* 173:257-64, 2002.
- 48) Cuerrier, C.M., Benoit, M., Guillemette, G., Gobeil, F., Jr. & Grandbois, M. Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile

- response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* 457:1361-72, 2009.
- 49) Szczygiel, A.M., Brzezinka, G., Targosz-Korecka, M., Chlopicki, S. & Szymonski, M. Elasticity changes anti-correlate with NO production for human endothelial cells stimulated with TNF-alpha. *Pflugers Arch.* 463:487-96, 2012.
- 50) Granzier, H., Wu, Y., Siegfried, L. & LeWinter, M. Titin: physiological function and role in cardiomyopathy and failure. *Heart Fail Rev.* 10:211-23, 2005.
- 51) Tohyama, S. et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* 12:127-37, 2013.