

# 心筋分化に対する晩発性被ばく影響を光で定量評価する

渡邊 朋信

Watanabe M Tomonobu

## 1. はじめに

光学顕微鏡は、1590年の発明以降、近代医学を経て現在に至るまで、研究ツール/検査ツールとして用いられ続けている。光は、磁場やX線等のほかの医療画像モダリティと比較して、圧倒的な高時空間分解能を誇り、オンサイトでの観察を可能とするからだ。「顕微」は「拡大」の意味だけではない。光は、物質に照射されると、物質内の分子との相互作用により修飾され、屈折と反射を繰り返した後に散乱される。散乱光には、物質内部の情報が包埋されているのである。即ち、分光学的手法や数学的手法により散乱光を解析することにより、物質内部の状態を顕微することができる。最近、筆者らは、散乱光を解析するだけで、心筋細胞の筋活性を非接触・非侵襲で評価する技術を開発したので<sup>1)</sup>、晩発性の放射線被ばく影響に関する研究応用の例と併せて、簡潔に紹介したい。

## 2. 背景

心筋細胞の機能は、拍動である。拍動は、ビデオ分析に基づく心拍測定や活動電位計測等により定量できる。しかし、拍動の原動力は、筋線維による力発生である。それならば、力発生そのものを定量したい。筋線維はミオシンとアクチンの2つの線維タンパク質から構成されており、ミオシンがアデノシン三リン酸(ATP)を分解する際に生じるエネルギーを用いてアクチンを引っ張る(図1)。力は物性と変形の積によって定義される。そのため、ミオシン

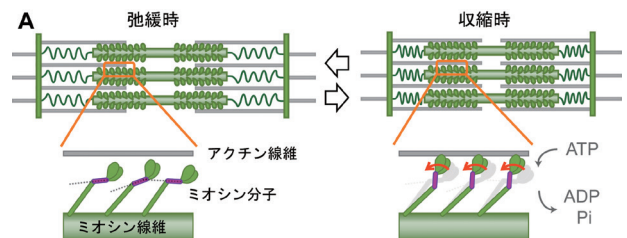


図1 筋肉の力発生

筋肉はアクチン線維とミオシン線維から構成される。ミオシン線維内のミオシン分子の構造変化が力となる

の力を測定するためには、ミオシン分子に物性(バネ定数等)が既知であるプローブを結合させて、プローブの変位もしくは変形から力を見積もる方法が一般的である。プローブの導入が困難である細胞内部において、この従来法の適用は極めて困難である。一方で、ミオシンは力を発生させる際に、「ボートの上で人がオールを漕ぐ」ように構造を変化させる。ミオシンの構造変化と力発生には平均的には一対一の対応があるので、ミオシンの構造変化を定量すれば、筋活性を直接評価できることになる。

生きた細胞の中でタンパク質の構造動態を計測することは、やはり極めて困難である。そこで、筆者らは散乱光に着目した。タンパク質から発せられる散乱光には、散乱元であるタンパク質内部の状態が反映されている。散乱光であれば、非染色かつリアルタイムに検出できる。光散乱現象の中でも、光第二高調波発生(Second Harmonic Generation, SHG)は非線形散乱現象であり、その光(SHG光)は散乱元の電気的な配向(分極)に起因する(図2)。ミオシン分子の力発生に伴う構造変化は筋線維の分極を変化させるので、筋線維から発生したSHG光、

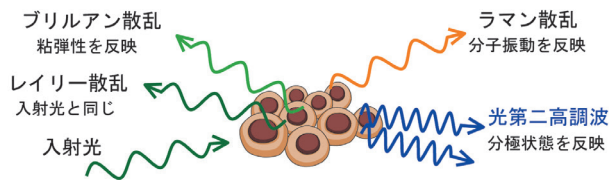


図2 様々な散乱光

光第二高調波発生 (SHG) は、波長は入射光のちょうど半分になる非線形散乱現象である

より具体的には、SHG 光の偏き (偏光) がミオシン分子の構造状態を反映する<sup>1,2)</sup>。言葉の上では、心筋細胞に光を当てて散乱光の偏光特性を調べるだけで、筋活性を定量できるのである。

### 3. 筋活性を SHG 偏光から評価する

筆者らの生物学的興味は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) に対する晩発的な放射線被ばく影響である。そこで、観察材料として iPS 細胞から分化作製した心筋細胞を用いた。SHG 光は分極を持つ分子が配向した構造から発せられるが、非常に微弱である。そのため、細胞内では高密度なタンパク質線維あるいはタンパク質結晶から発生した SHG 光が強く検出される。この効果により、SHG 光を可視化できる顕微鏡で心筋細胞を観察すると、アクチン線維とミオシン線維が周期的に相互作用する構造 (サルコメア構造) の 1 つ 1 つが、選択的に可視化される (図 3A)。偏光特性は、サルコメアに様々な入射角度で光を照射し、発せられる SHG 光の強度を計測することで取得できる (図 3B)。ミオシンが発する SHG 光の偏光特性はふた山を示す特徴を示し、このふた山を特徴付けるパラメータ ( $\gamma$  と記す) が力発生に依存する (図 3C)。筆者らが開発した SHG 偏光顕微鏡は、世界最高感度・最高時間分解能を誇り、SHG 光の入射偏光特性を 80 ms ごとに取得できる。これにより心筋拍動中の  $\gamma$  値の変動を検出でき、筋収縮時に  $\gamma$  値が増加することが確認された (図 3D)。

$\gamma$  値とサルコメア長の相関からミオシンの状態が分かる (図 3E)。図 3CD に示すように、収縮時に  $\gamma$  値が上昇するが、薬剤で力発生を阻害しても、ミオシンがアクチンに結合するだけで  $\gamma$  値が増加する<sup>1,2)</sup>。つまり、ミオシンが「オールを漕ぐような構造変化 (図 1)」を行う際のアクチンからの結合と解離が  $\gamma$  値に反映されている。サルコメア内にと

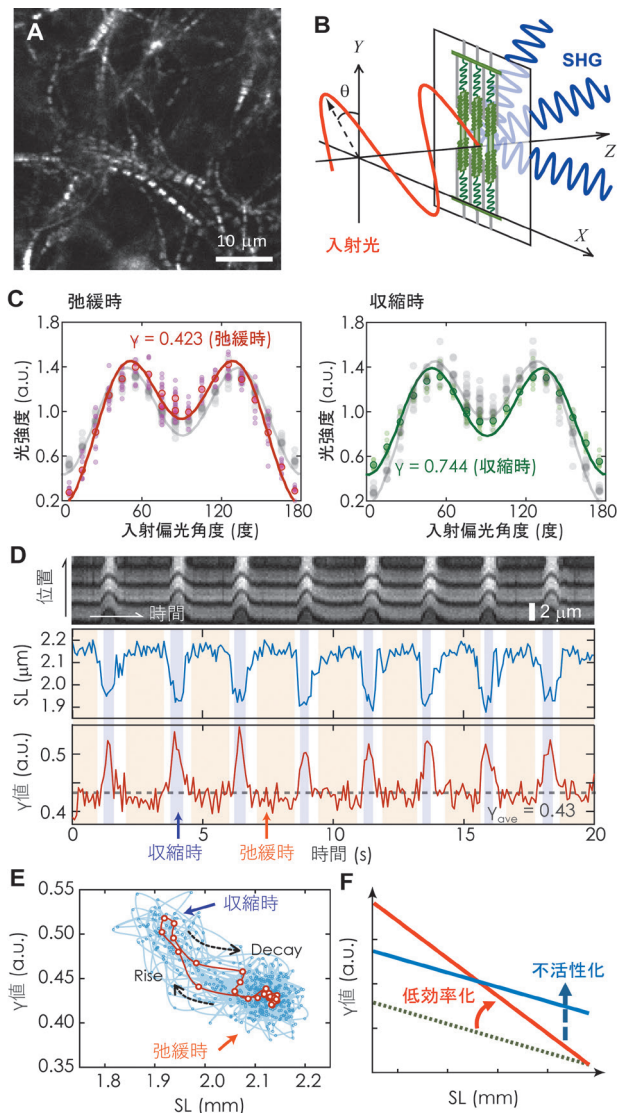


図3 心筋の SHG 偏光計測

(A) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を SHG 顕微鏡で観察した例。(B) SHG 偏光計測の模式図。(C) 弛緩時及び収縮時の SHG 偏光特性。実線はパラメータ  $\gamma$  を含む理論式  $I(\theta) = A[\{\gamma \cos^2(\theta - \theta_0) + \sin^2(\theta - \theta_0)\}^2 + \sin^2 2(\theta - \theta_0)]$  で近似した結果。(D) サルコメア長 (SL) と  $\gamma$  値のリアルタイム計測の例。上のパネルは SHG 画像上のサルコメアの断面を時系列に並べたグラフ (カイモグラフ)。(E) サルコメア長 (SL) と  $\gamma$  値の相関。(F) サルコメア長 (SL) と  $\gamma$  値の相関から分かるミオシンの状態

活性のミオシンが存在すると、アクチンから解離できないため、弛緩時の  $\gamma$  値 ( $\gamma_{rel}$ ) を増加させる (図 3F 青)。弛緩時に活性のあるミオシンがアクチンから解離すれば、そのミオシンの数の分だけ  $\gamma$  値は低下する。つまり、収縮時と弛緩時の  $\gamma$  値の差 ( $\delta\gamma$ ) は、力発生に寄与したミオシンの数に比例する。 $\delta\gamma$  とサルコメアの収縮長 ( $\delta SL$ ) の比 ( $\delta\gamma/\delta SL$ ) は、単位収縮距離当たり力発生に寄与したミオシン数に比例することになる (図 3F 赤)。

このように、SHG 偏光計測を用いることにより、

生きた心筋細胞の筋活性を非染色・非侵襲で、かつ定量的に評価する方法が確立した。

#### 4. 心筋分化に対する晩発性放射線被ばく影響

初期胚を構成する胚性幹細胞は、細胞分裂を頻繁に行うため、放射線被ばくに対する感受性が高い。ヒトの初期胚は、母親の子宮のおかげで、自然放射線等の低線量域の被ばくから保護されている。しかし、妊娠中から胎児に至るまでに、事故等により偶発的に強い放射線被ばくを受けると、器質形成前流産、器官形成中の奇形や機能不全、新生児の成長遅延や知的障害のリスクとなる可能性がある。ところが、ヒトの初期胚に放射線を照射することは倫理的に不可能であるため、ヒト初期胚あるいはヒト胚性幹細胞に対する放射線被ばくの影響に関する研究はなかなか進まない。ヒト iPS 細胞であれば、この倫理的問題点を解決できる。

胚性幹細胞に対する放射線被ばく影響についての研究報告の中で、筆者らは、放射線照射を受けた胚性幹細胞の多くは死滅するが、生存した細胞は多能性を維持していることに注目した<sup>3,4)</sup>。マウス胚性幹細胞では、放射線照射後であっても、拍動を有する心筋細胞に正常に分化する。一方、その拍動周期は遅く、機能不全を示す<sup>3)</sup>。幹細胞期に一過的に受けた被ばく影響が、その後は被ばくしなくとも、分化の後に晩発的に表面に現れるのである。ヒトの胚性幹細胞においても、放射線照射後の未分化能維持は確認されているが、分化後の晩発的な機能不全の確認はなされていない<sup>4)</sup>。筆者らは、ヒト iPS 細胞を用いて、放射線被ばくによる晩発性心機能不全を再現し、SHG 偏光計測を用いて、幹細胞期の放射線被ばくが分化後の心機能に与える影響について調べた。

ここでは、実験の簡素化のために、放射線刺激として X 線や  $\gamma$  線ではなく紫外線（波長 254 nm）を適用した。ヒト iPS 細胞（253G1 株）に対し、 $12.5 \text{ mJ/cm}^2/\text{min}$  の強度で 0, 2.5, 5, 10 分の紫外線照射（計 0.00, 31.25, 62.50, 125.00  $\text{mJ/cm}^2$ ）を行うと、照射時間に依存して細胞の生存率は低下した（それぞれ、92%, 10.5%, 4.5%, 0.5%）。生存したヒト iPS 細胞は、過去の報告同様に未分化能を維持しており、心筋分化を誘導すると、すべての条件にて拍動が目視で確認された。 $\alpha$  アクチニンの抗体を用いて免疫

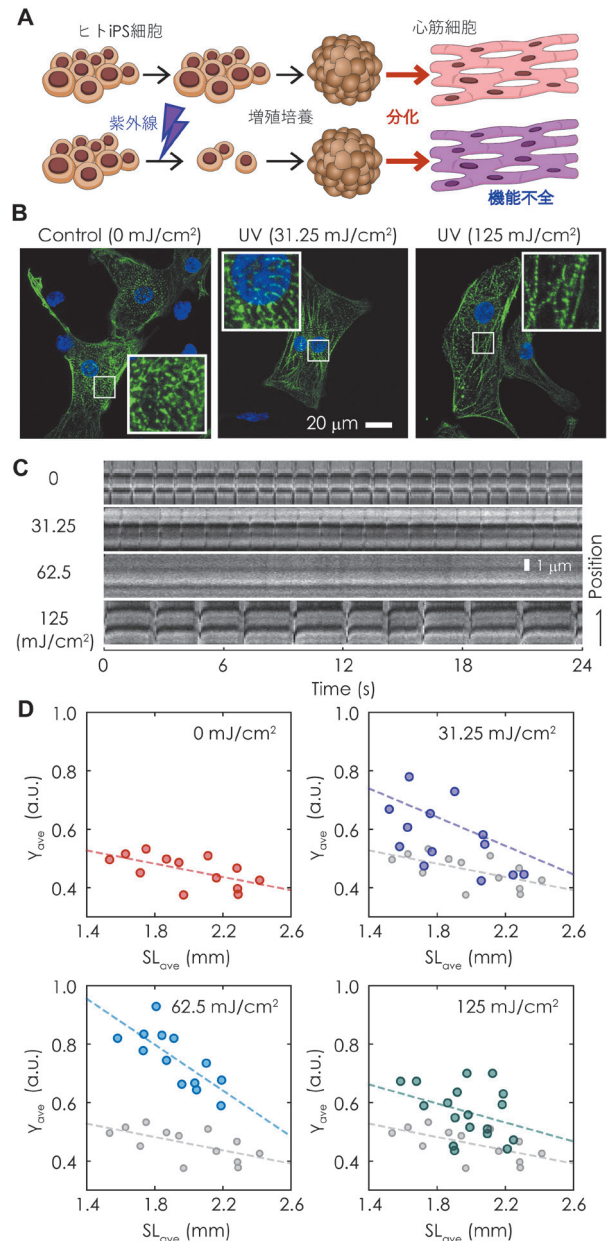


図4 晩発性放射線被ばく影響調査への応用

(A) 実験の模式図。(B) 紫外線照射後のヒト iPS 細胞から作成した心筋細胞の  $\alpha$  アクチニン蛍光染色画像。(C) サルコメアを SHG 観察した際のカイモグラフ。(D)  $\gamma$  値とサルコメア長 (SL) の相関グラフ

染色を施しサルコメアを可視化すると、紫外線照射後のヒト iPS 細胞から作られた心筋細胞ではサルコメア構造が粗である様子が確認された (図 4A)。どうやら、幹細胞期の紫外線被ばくは、後の心筋線維の熟成を阻害するようだ。サルコメアの運動により各細胞の拍動を見てみると、31.25  $\text{mJ/cm}^2$  照射で拍動は弱くなり、62.50  $\text{mJ/cm}^2$  照射でほぼ確認できないほど小さくなった。興味深いことに、125.00  $\text{mJ/cm}^2$  照射では拍動周期は低下するもの



再度大きな収縮が多数確認できた (図 4C)。

SHG 偏光を用いた手法の最大の利点は、サルコメア長と  $\gamma$  値の相関グラフにより、サルコメア内のミオシンの活性を定量できることである (図 3E)。まず、 $\gamma_{rel}$  は、紫外線照射強度に依存して増加、 $62.50 \text{ mJ/cm}^2$  で飽和した (図 4D)。これは、紫外線照射により筋収縮に寄与しないミオシン (不活性化ミオシン)が増加したことを示す。傾き  $\delta\gamma/\delta SL$  は、 $62.50 \text{ mJ/cm}^2$  までは  $\gamma_{rel}$  と同様に増加した。これは、紫外線照射によりミオシン分子の力発生効率が低下 (同じ距離を収縮させるためにより多くのミオシンが必要) したことを示す。ところが、 $125.00 \text{ mJ/cm}^2$  照射後の iPS 細胞から作成された心筋細胞では、 $\gamma_{rel}$  は増加したものの、 $\delta\gamma/\delta SL$  は照射無し的心筋細胞と差異が無かった。つまり、筋収縮に寄与するミオシンの力発生効率は、正常細胞と変わらなかったのである。筆者らは、紫外線照射に対して抵抗力の強い細胞がわずかながら存在していたのだと考えている。照射強度が弱い際には、抵抗力の低い細胞が死滅せずに損傷を受けたうえで心筋細胞となり、照射強度が強い際には、抵抗力の低い細胞は死滅し、抵抗力の強い細胞のみが残存し心筋分化後に大きな収縮を起こしていたのであろう。

このように、ヒト iPS 細胞を用いてマウス胚性幹細胞と同様の晩発的心機能不全が再現できたと共に、SHG 顕微鏡観察により、紫外線照射の作用機序は強度  $62.50 \text{ mJ/cm}^2$  までと  $125.00 \text{ mJ/cm}^2$  とでは様相が異なることが示された。

## 5. おわりに

SHG 偏光計測を用いることで、生きた心筋細胞の収縮時におけるミオシン活性をサルコメア 1 つの精度で非侵襲かつ非染色で定量できる。本稿では、晩発性放射線被ばく影響調査への応用例を示したが、それだけではなく、心疾患による機能不全、あるいは、薬物の有効性や毒性を評価することもできる<sup>1)</sup>。iPS 細胞技術を用いることで、患者由来の細胞から様々な検査が可能となる。非染色及び非侵襲的であることで、後に移植を控えた人工心筋細胞の品質評価への展開も期待できる。「力」を扱うメカノバイオロジー分野においても、細胞内でミオシンの力発生を計測する有効な技術はほとんどない。本

手法は、実際の「力」を直接測定することはできないが、 $\gamma$  値は相対的な力の尺度になる。本手法は、今後の再生医療分野やメカノバイオロジーに不可欠な研究ツールとなるかもしれない。

SHG 光の生命科学応用は、約 40 年も前に始まっている。本手法の理屈も決して新しくなく、古くより本手法の可能性は議論されてきた。本手法の実現は、かつては技術的に難しいとされていたが、電子デバイスやコンピュータの技術発展により実現可能となった。筆者らは、それを実践したに過ぎない。すこし周りを見渡せば、同じような事象がよく見受けられる。深層学習による解析もしかり。イノベーションが近くに落ちているかもしれない。読者の方々にも、ぜひ、温故知新の技術開発をしていただきたいと願う。

## 謝辞

顕微鏡構築は、主に、金城純一氏 (元当研究室技師) によって行われた。iPS 細胞由来心筋細胞は、宮川繁教授 (大阪大学大学院医学系研究科) らの研究グループにより準備いただいた。紫外線照射実験は、藤田英明助教 (広島大学原爆放射線医科学研究所) 及び山本里佳子氏 (当時広島大学医学部 3 回生) により行われた。心より深謝する。

本研究は、主に理化学研究所運営費交付金で実施され、iPS 細胞に関する研究は、(国研)日本医療研究開発機構再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性心筋症疾患特異的 iPS 細胞を用いた集学的創薬スクリーニングシステムの開発と実践 (研究代表者: 宮川繁)」, (国研) 科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 CREST 「オールオプティカルメカノバイオロジーの創出に向けた技術開発と発生生物学への応用 (研究代表者: 倉永英里奈)」による支援を受けて行われた。

## 参考文献

- 1) Fujita, H., et al., *Life Sci Alliance*, **6**, e202302070 (2023)
- 2) Nuccitelli, V., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 7763 (2010)
- 3) Hellweg, CE, et al., *Cells*, **9**, 1650 (2020)
- 4) Wilson, KD, et al., *Cancer research*, **70**, 5539 (2010)

(広島大学放射線医科学研究所 / 理化学研究所生命機能科学研究所)