OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Intravital imaging with two-photon microscopy reveals cellular dynamics in the ischeamia-reperfused rat heart
Author(s)	松浦, 良平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/73461
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　松浦　良平

論文審査担当者	（職）	氏名
主　査	大阪大学教授	澤　芳樹
副　査	大阪大学教授（寄附講座）	妻木　克人
副　査	大阪大学教授	坂田　泰史

論文審査の結果の要旨

二光子顕微鏡の開発により、様々な組織・臓器を「生きた状態」で観察することが可能になった。しかし、心筋組織を生きた状態で観察することは、心臓が激しく動くためこれまで困難と考えられてきた。申請者は新たなスタビライザーを開発し、二光子顕微鏡を用いて長時間生きたままの心筋組織を観察する手法を確立した。また申請者は虚血再灌流時の経時的変化（細胞障害・細胞死・No-Reflow現象）を世界に先駆けて可視・定量化することができた。心臓の虚血再灌流障害は臨床上大きな課題であり、今後のさらなる病態解明にもつながると考えられる。また創薬スクリーニングの手法としても有望であり、本学位論文の学術的価値が認められ、Scientific Reportsに採択されている。また、申請者は本学位論文の内容を中心に幅広い質問に対して適切な回答を行ない、この課題について高度な専門性と深い学識を持っていると判断した。以上より本研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	松浦良平
論文題名 Title	Intravital imaging with two-photon microscopy reveals cellular dynamics in the ischeamia - reperfused rat heart　（二光子顕微鏡を用いたintravital imagingによるラット心筋の虚血再灌流障害における細胞の挙動の解明）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

近年低侵襲で深部組織の観察に適した“多光子励起顕微鏡”の登場により、“intravital imaging”とよばれる、実験動物を麻酔下で生かしたままで観察したい臓器を露出して観察できるようになった。二光子顕微鏡で生体組織の深部を観察するには十分固定しなければならないが、心臓は“動く臓器”であり、実際に生きたままの状態で心筋細胞や炎症細胞等がどのような挙動をとるか観察する手段は十分に確立していなかった。本研究は冠動脈バイパス術に用いられるスタビライザーに着想し心臓を固定する二光子顕微鏡用のスタビライザーを開発し、疾患モデル動物の心筋組織を“生きたまま”で観察し、虚血再灌流障害における細胞の挙動を明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

アクリル樹脂の中央にすり鉢状の孔を作成しカバーガラスを載せ、側孔から吸引することで心臓をカバーガラスに吸着させるスタビライザーを作成した。二光子顕微鏡にてGFP-transgenic Lewis ratを全身麻酔下にて挿管し、蛍光プローブ（DextranやIsolectin B4）を投与して蛍光染色し生きたままの状態で正常心筋を観察した。生きた状態でGFP signalから心筋細胞の筋原線維や細胞核を認め、TMRE投与にてミトコンドリアを認めた。またDextranやIsolectin B4投与にて微小血管や微小血管内を流れる血球成分、血管内皮を認めた。また独自にFree Formed Deformation (FFD)プログラムを作成し、動画全体のブレや歪みを補正した。そのプログラムによりHeat-mapを作成することで、細胞レベルでの心筋の動きを視覚化した。

ついで、GFP-transgenic Lewis ratのLADを結紮し血流を遮断し、心筋細胞や白血球の細胞動態の観察・検討を行った。LADを結紮し5分間虚血にしたところ、その10分後には心筋細胞のGFPシグナルはpatch状に低下した。TMRE染色で同様に観察したところ、GFPシグナルが低下した細胞はTMREが染まらない細胞と一致した。FFDを用いて動画を解析すると、細胞の弛緩収縮に逆相関が見られたため、GFPシグナルが低下した細胞は細胞死を来し弛緩能を失ったと考えられた。

またPCI balloonを用いて虚血・再灌流モデルを確立しreal timeで観察したところ、虚血直後から心筋の収縮能が低下した。15分後にはDextranが心筋細胞内に浸出し細胞透過性が亢進していた (Permeability index 0.4→0.6)。1時間虚血～1時間再灌流後に観察したところ細胞透過性はさらに亢進し(Permeability index 0.4→1.2)、虚血領域の微小血管に経時的に白血球が接着した。微小血管に血流を認めなかったため、no-reflow現象の原因と考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

心臓を固定する二光子顕微鏡用のスタビライザーを開発し、GFPラットのin vivo imagingを行った。虚血再灌流障害にて心筋細胞のGFPシグナルはheterogeneousに低下するとともに収縮能が低下し、その後細胞透過性が亢進した。さらに長時間の虚血再灌流障害により、障害部位への白血球が集積し、no-reflow現象の原因であることが示唆された。今後、本研究のin vivo imaging技術により、虚血性心疾患を始めとした心疾患モデルに対する新しい創薬スクリーニングシステム等への応用が期待される。