

令和元年6月17日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09491

研究課題名(和文) ATP可視化マウスによる心筋梗塞でのATP変動の時間的空間的解析と生理学的意義

研究課題名(英文) Temporal spatial analysis and physiological significance of ATP variability in myocardial infarction by ATP-visualized mice

研究代表者

小板橋 紀通 (Koitabashi, Norimichi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10420093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はATP濃度の変化をリアルタイムで可視化できるFRET蛋白質 GO-ATeamを発現する遺伝子改変マウスの作成に世界で初めて成功した。また、応募者はin vivoの心臓で開胸して、リアルタイムで拍動する心臓のATP濃度の変化を、時間的空間的に可視化し定量することに成功した。このマウスを用いて心臓のATP量を、急性の負荷をかけて経時的に調べたところ、心臓のATP濃度は酸素消費量の変化とともに変動することが分かった。急性虚血でATPは一過性に上がることが分かったが、心不全や糖尿病などでは心臓のATPレベルはほとんど変化しないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は全身の臓器のなかで、もっともエネルギーを消費する臓器にもかかわらず、拍動する心臓でエネルギーがどのように産生・消費されているかをリアルタイムに観察する方向はなかった。我々はそれに世界で初めて成功した。今後心臓病の病態解明や新たな心臓の治療薬の開発につながる研究である。

研究成果の概要(英文)：We succeeded for the first time in the world to create genetically modified mice expressing FRET protein GO-ATeam that can visualize changes in ATP concentrations in real time.

In addition, the applicant was able to visualize and quantify changes in the ATP concentration of the heart beating in real time in vivo. It was found that the ATP concentration of the heart fluctuates with the change of the oxygen consumption when the amount of ATP of the heart was examined over time by an acute load by using this mouse. Acute ischemia found that ATP is transiently increased in ischemic area. It was found that the ATP level of the heart was hardly changed even in heart failure and diabetes.

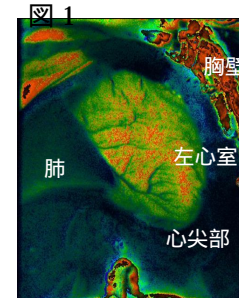
研究分野：循環器内科

キーワード：心臓 エネルギー代謝 可視化 虚血 遺伝子改変動物 生体イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

共同研究者の山本(京都大学)は、*in vivo*でATP濃度と変動を可視化できるマウスを世界で初めて開発した(Imamura H, *PNAS* 2009, Yamamoto, M. et al. *GeneDev.* 2001, *Nature*(article). 2004)。細菌のATP合成酵素を構成するタンパク質の一つであるεサブユニットのATP存在下・非存在下での可逆的な構造変化を利用してATP測定蛍光タンパク質であるATeamは作成されているが、山本はこれまで構築されていたATeam1.03を改良し、pHに安定なGO-ATeamに応用してGO-ATeam3を構築した(unpublished data)。申請者は山本とこれまで共同研究を行い、ATP可視化マウスの心臓を、ランゲンドルフを用いず、全身麻酔、人工呼吸器管理下で、開胸による直視的観察により、生体内で拍動を続ける心臓のATPの動態の観察に成功した。(図1)吸入麻酔と麻酔薬の腹腔内投与および麻酔による鎮痛と少量の筋弛緩を用い、安定した血行動態の状態を開胸観察が可能であった。この状態で、β遮断薬による徐拍化、大動脈縮窄による血圧上昇などにより、心臓でのATP濃度の変化を観察した。その結果β遮断薬による徐拍化では心臓のATP濃度の短時間での上昇を認めた。大動脈縮窄による急激な左室内圧の上昇は左心室のATP濃度の短時間での低下を認めたが、右心室では変化がなかった。心房ペースティングでの心拍数の増加はATP濃度の低下を認めた。心筋酸素消費量は心室内圧(血圧)と心拍数で規定されていることから、心筋酸素消費量の変化をATP可視化マウスで見えるATP量の変化としてとらえられることが確認できた。そこで、開胸した状態で冠動脈の枝である左前下行枝を結紮し、ヒトの急性心筋梗塞と同様のモデルを作製して観察した。意外なことに急性の冠動脈の虚血を起こした領域で、瞬時にATPの著明な増加が確認された。この上昇はATeam3で観察できる範囲以上にまで上昇していると考えられる極端な上昇であった。この一過性の上昇は虚血直後(1秒以内)から始まり、で低下してきて、30分後には虚血前より低い濃度まで低下した。



2. 研究の目的

上記の知見から虚血心筋では、虚血急性期に一過性にATPが上昇したのちに低下し、そのATPの上昇はp38MAPKを介して、心筋虚血による心筋傷害およびエネルギー代謝に影響を与えるとの仮説をたてた。

3. 研究の方法

1) 実際にATP可視化マウスで明確にとらえられた虚血急性期のATP上昇を生化学的に証明する。ATPは心臓組織を採取する際、心停止させてハサミなどで採取する数秒のうちに、失活し、生体内での濃度を生化学的に測定するのが困難である。そのため、マイクロウェーブを用いた組織固定法で、心筋梗塞作成直後に心筋組織を瞬間的に固定して、虚血領域と非虚血領域でATP濃度をルシフェラーゼ法等で測定する。2) この一過性のATP上昇がミトコンドリア由来なのかを、ミトコンドリア特異的にATeam3を発現させたマウスを作製して、実験を行う。3) エネルギー代謝を阻害した状態で、このATP上昇が起こるかを検討する。具体的にはストレプトゾシン誘導性のインスリン依存型糖尿病をマウスに作製し、心臓への糖の取り込みを阻害するモデルを作製する。また脂肪酸トランスポーター(FAT: CD36)欠損マウスをATP可視化マウスと掛け合わせて、脂肪酸取り込みが低下したモデルをつくる。これらのモデルで虚血によるATP上昇に変化を認めるか検討する。4) 心筋細胞においてATPは様々なストレスでpannexin(Panx)を介して細胞外に出て、オートクライン、パラクライン的にシグナルを伝えることが近年明らかになっている(Dolmatova E, *Am J Physiol* 2012)。Panx1欠損マウスを入手し、ATP可視化マウスと掛け合わせ、急性虚血によるATP上昇を観察する。5) 培養心筋細胞(成体および新生児ラット・もしくはマウス)を用いて、ATPで細胞を刺激し、p38MAPKの活性化を確認する。*in vivo*の状態を再現するため、低酸素培養下でATPでの刺激も行う。Pannexin阻害剤の有無で比較する。6) 細胞外特異的ATP可視化マウスを作製し、虚血による反応を観察する。

4. 研究成果

虚血領域のATPの上昇を生化学的に証明しえた。またラットの心臓に透析チューブを通して、HPLCでATPをリアルタイムに測定し、ATPの虚血領域での一過性の増加を認めた。しかしそれらの上昇はATeamで認められた変化よりも少ないものであった。

ミトコンドリア特異的なAteamマウスの作製に成功した。

FAT欠損マウスや糖尿病マウスでもAteamで測定した心臓のATPレベルは変わらなかった。Panx1欠損マウスは、作成を試みているが、技術的な問題から、まだ作成段階である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

(研究代表者、研究分担者には下線)

1. Myocardial fatty acid uptake through CD36 is indispensable for sufficient bioenergetic metabolism to prevent progression of pressure overload-induced heart failure. Umbarawan Y, [Koitabashi N](#), [Kurabayashi M](#), Ogawa H. (他 12 名、3 番目、14 番目) *Sci Rep*. 査読有 13: 12035, 2018
2. Glucose is preferentially utilized for biomass synthesis in pressure overloaded hearts: evidence from fatty acid-binding protein-4 and -5 knockout mice. Umbarawan Y, [Koitabashi N](#), [Kurabayashi M](#). (他 13 名、3 番目、14 番目) *Cardiovasc Res* 査読有 114:1132-1144, 2018
3. Robust suppression of cardiac energy catabolism with marked accumulation of energy substrates during lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in mice. Umbarawan Y, [Koitabashi N](#), [Kurabayashi M](#) (他 15 名、9 番目、16 番目) *Metabolism* 査読有 77: 15-57, 2017
4. TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. Shimauchi T, [Koitabashi N](#). (他 11 名、9 番目) *JCI Insight*. 査読有 2:doi: 10.1172/jci.insight.93358, 2017
5. Nonmyocyte ERK1/2 signaling contributes to load-induced cardiomyopathy in Marfan mice. Roaf R, [Koitabashi N](#), (他 17 名、16 番目) *JCI Insight*. 査読有 2:doi: 10.1172/jci.insight.91588, 2017

[学会発表](計 6 件)

(研究代表者、研究分担者には下線)

1. [Koitabashi N](#), Yamamoto M, Musashi T, Samejima M, Iso T, Imamura H, [Kurabayashi M](#).
生体内 ATP 可視化モデルで心臓エナジェティクスを再評価する
第 19 回日本心不全学会学術集会
2015.10.22-24 (大阪)
2. Furukawa N, [Koitabashi N](#), Sunaga H, Obokata M, Yamaguchi A, Yokoyama T, [Kurabayashi M](#)
Vildagliptin Improves Ventricular Efficiency in Non-diabetic Pressure-overloaded Mouse Heart.
第 81 回日本循環器学会学術集会 2017.3.17-19 (金沢)
3. [Koitabashi N](#), Yamamoto M, Musashi T, Imamura H, [Kurabayashi M](#).
In Vivo Visualization of ATP Levels Reveals a New World of Cardiac Physiology
第 79 回日本循環器学会学術集会 2015.4.24-26 (大阪)
4. Furukawa N, [Koitabashi N](#), Sunaga H, Umbarawan Y, Matsui H, Yokoyama T, [Kurabayashi M](#)
Sacubitril/Valsartan Improves Passive Myocardial Stiffness Associated with Titin Phosphorylation in Diabetic Mice Heart.
American Heart Association Scientific Sessions 2018 (Chicago, USA)
5. [Koitabashi N](#), Sunaga H, Matsui H, Iso T, [Kurabayashi M](#)
Identification and molecular mechanisms of fibroblast growth factor 21 as a novel biomarker for metabolic stress in acute myocardial infarction
第 82 回日本循環器学会学術集会 2018.3.23-25 (大阪)
6. Furukawa N, [Koitabashi N](#), Sunaga H, Yokoyama T, [Kurabayashi M](#)
DPP-4 inhibitor, Vildagliptin, induce FGF21 expression through AMPK-Sirt1 signaling in non-diabetic mice heart.
第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.29-31 (横浜)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://gunma-u-med2.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：倉林 正彦

ローマ字氏名：KURABAYASHI, Masahiko

所属研究機関名：群馬大学大学院医学系研究科

部局名：循環器内科学

職名：教授

研究者番号（8桁）：00215047

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。