

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300153

研究課題名 (和文) 心筋細胞非線形振動子群の協調と解離：ホロニック振動子の機能破綻と不整脈

研究課題名 (英文) Coordination and dissociation of nonlinear oscillations in cardiomyocytes:dysfunction of holonic oscillators leading to arrhythmias

研究代表者

河原 剛一 (KAWAHARA KOICHI)

北海道大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：20125397

研究成果の概要 (和文)：これまで我々は心筋細胞培養系において、心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動の細胞間同期に、細胞外情報伝達系である ATP-purinoceptor 系が関与している可能性を偶然発見した。本研究では、ラット・培養心筋細胞を実験対象とし、まず蛍光・発光同時計測により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動にともなって細胞外 ATP 濃度が振動しているか？もし振動している場合には、2つの振動間の相関ダイナミクスを明らかにする。次に、拍動に伴って細胞質内  $\text{Mg}^{2+}$  が振動しているかどうかを検証する。さらに、心筋細胞の拍動リズム、細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  リズム、および細胞質内  $\text{Mg}^{2+}$  リズム間での相関ダイナミクスを明らかにすること等から、複数振動子 (要素) 間相互作用、およびそれら振動子間の協調と破綻のメカニズムの解明を目指した。本研究の成果は、以下のようにまとめられる。

(1) 心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を fluo-4 の蛍光強度、および細胞外 ATP 濃度変化を luciferin-luciferase による発光強度により、蛍光・発光同時計測を行った。その結果、心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動と同期して、細胞外 ATP 濃度が振動している可能性を明らかに出来た。

(2) 拍動に伴った細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  濃度変化を、蛍光試薬である Mg-fluo4 または KMG-20 によって計測した。その結果、心筋細胞の拍動リズムと同期して、細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  濃度も振動していることを明らかに出来た。

(3) 心筋細胞内では  $\text{Mg}^{2+}$  が ATP と錯体を形成しており、細胞内 free  $\text{Mg}^{2+}$  濃度変化は、細胞内 ATP 濃度変化を反映している可能性がある。このことは、心筋細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  濃度および細胞内 ATP 濃度が、心筋細胞の拍動に伴って振動している可能性、および通常では、それら複数の非線形振動子が同期して活動していることなどが明らかとなった。これら非線形振動子の同期は、正常な心筋細胞拍動の基盤となっており、それら振動子間での同期の破綻が、不整脈など様々な心疾患の原因となっている可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：We have recently found that the extracellular ATP-purinoceptor signaling is crucially involved in the intercellular synchronization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations among cardiomyocytes. In this study, I aim at elucidating whether and how the concentrations of extracellular ATP and intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  oscillate in association with rhythmic contraction of cultured cardiomyocytes from neonatal rats. The simultaneous measurement of the fluo-4 fluorescence and the luciferin/luciferase chemical luminescence showed that the concentration of extracellular ATP oscillated synchronously with the concentration of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiomyocytes, supporting our previous inference that the extracellular ATP-purinoceptor signaling is responsible for the intercellular synchronization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. In addition, the concentration of intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  also oscillated in association with rhythmic contraction and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, suggesting that the concentration of intracellular ATP varied depending on the rhythmic contraction of cardiomyocytes. All these findings have led to an idea that

the coordination of multiple nonlinear oscillations in cardiomyocytes such as rhythmic variations in the concentrations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and ATP seems critical to the normal function of the heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：細胞情報工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋細胞，細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動，ATP-purinoceptor 系，細胞外 ATP 振動，細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  振動，非線形振動子

#### 1. 研究開始当初の背景

生体には様々なリズム現象が存在する。そしてそれらのリズム現象は、数理的には非線形振動子と考えられ、外力に対する引き込み現象など、様々な非線形振動子に特有の現象が認められている。これまで我々は心筋細胞培養系において、心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動の細胞間同期に、ギャップ結合を介した細胞内情報伝達系に加えて、細胞外情報伝達系である ATP-purinoceptor 系が関与している可能性を偶然発見した。ATP が情報伝達物質としても機能していることは、これまで主に中枢神経系や末梢神経系で明らかにされてきたが、最近心筋細胞においても、ATP が心筋細胞間での  $\text{Ca}^{2+}$  波の伝播に関与している可能性が明らかとなってきた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、ラット・培養心筋細胞を実験対象とし、(1) 蛍光・発光同時計測により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動にともなって細胞外 ATP 濃度が振動しているか？もし振動している場合には、2つの振動間の相関ダイナミクスを明らかにする。(2) 拍動に伴って細胞質内  $\text{Mg}^{2+}$  が振動しているか？(3) 心筋細胞の拍動リズム，細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  リズム，および細胞質内  $\text{Mg}^{2+}$  リズム間での相関ダイナミクスを明らかにする，等の点を解明することから，複数振動子（要素）間相互作用，およびそれら振動子間の協調と破綻のメカニズムの解

明を目指す。

#### 3. 研究の方法

実験は、新生ラット心室筋細胞の単離・培養系を用いて行った。心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は fluo4 の蛍光強度で、細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  濃度変化は Mg-fluo4 もしくは KMG-20 の蛍光強度変化で推定した。また、細胞外 ATP 濃度の拍動に伴う変化は、luciferin/luciferase による化学発光の強度変化から推定した。

#### 4. 研究成果

本研究の成果は、以下のようにまとめられる。

(1) 心筋細胞の拍動に伴う細胞外 ATP 濃度振動

これまでの研究で、互いに物理的な接触の無い心筋細胞間の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動の同期に、ATP-purinoceptor 細胞外情報伝達系の関与が推定された。もし、細胞外 ATP が心筋細胞間での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動の同期に重要な役割を果たしているならば、すなわち、細胞外 ATP が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動の同期に対する外力として作用しているならば、細胞外 ATP 濃度が心筋細胞の自発的拍動、もしくは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動とほぼ同じ周期で振動している可能性が考えられる。そこでこの可能性を検証した。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、細胞内に Fluo-4/AM

を負荷することで、その蛍光強度変化から推定し、細胞外 ATP 濃度は luciferin/luciferase の化学発光強度変化により推定し、蛍光および化学発光強度の同時測定を行った (図 1)。luciferin/luciferase 化学発光強度は微弱であるため、その時系列波形はノイズに埋もれており、周期性が明確ではない (図 1A1)。そこで自己相関解析 (図 1A2) および FFT 解析 (図 1A3) を行った。その結果、ATP 濃度は周期的に変化しており、その振動周期は細胞内  $Ca^{2+}$  振動の周期とほぼ一致していた (図 1B)。また、BDM 負荷によって自発的拍動を停止させても細胞内  $Ca^{2+}$  振動は持続するが、その状態においても細胞外 ATP 濃度振動が持続していた。さらに suramin の付加によって purinoceptor をブロックした場合には、細胞外 ATP 濃度の振動がほとんど消失した。以上のことから、細胞内から細胞外に細胞内  $Ca^{2+}$  振動に伴って周期的に ATP が放出され、細胞外 ATP 濃度が  $Ca^{2+}$  振動とほぼ同じ周期で振動し、心筋細胞間での細胞内  $Ca^{2+}$  振動の同期に関与している可能性を推定できた。

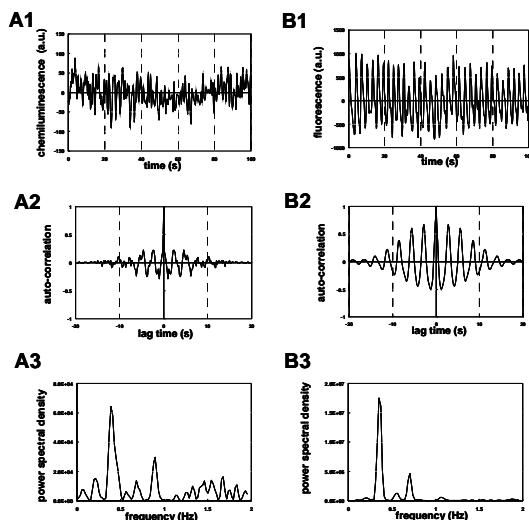


図1 心筋細胞の拍動に伴う細胞外ATP濃度の振動現象。A1-A3:化学発光強度変化の時系列(A1, A2)とその周波数スペクトル (A3)。B1-B3:fluo-4 蛍光強度変化の時系列 (B1, B2)とその周波数スペクトル (B3)。

## (2) 心筋細胞の拍動に伴う細胞内 $Mg^{2+}$ 振動

拍動に伴った細胞内  $Mg^{2+}$  濃度変化を、蛍光試薬である Mg-fluo4 または KMG-20 によって計測した。その結果、心筋細胞の拍動リズムと同期して、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度も振動していることを明らかに出来た (図 2)。

細胞内においては、free  $Mg^{2+}$  は ATP と親和性が高く錯体 (Mg-ATP) を形成していることから、周期的な心筋細胞の拍動に伴う細

胞内  $Mg^{2+}$  濃度の振動は、細胞内 ATP 濃度が周期的に変化している (細胞内 ATP 振動) ことを反映している可能性を示唆している。しかも細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の振動は、BDM の負荷によって自発的拍動を停止させても細胞内  $Ca^{2+}$  振動とほぼ同じ周期で持続していた。このことは、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の振動が周期的な心筋細胞の拍動に伴う ATP 消費の周期的変化に起因している、すなわち単なる passive oscillation ではなく、細胞外への周期的な ATP 放出、もしくは心筋細胞内ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化による ATP 生成が周期的に変化している可能性を示唆するものである。

本研究により、心筋細胞においては、複数の振動現象、すなわち拍動、細胞内  $Ca^{2+}$  振動、細胞内  $Mg^{2+}$  振動、細胞内 ATP 振動が存在していること、およびそれらの複数非線形振動子間が通常は協調した動作をしており、それが心臓における正常な機能の達成において重要な役割を果たしている可能性を明らかに出来た。

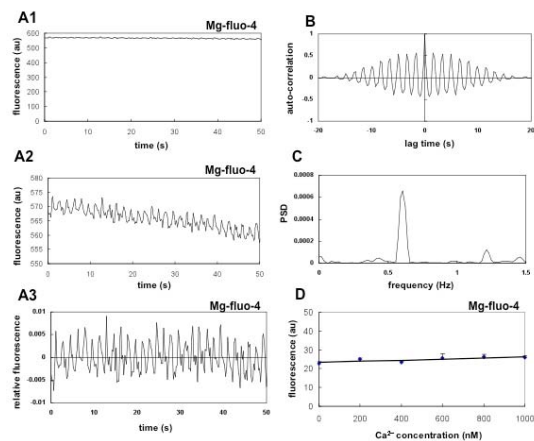


図2 心筋細胞の拍動に伴う細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の振動現象。A1-A3:Mg-fluo-4 蛍光強度変化の時系列。B:Mg-fluo-4 蛍光強度変化の自己相関関数。C:Mg-fluo-4 蛍光強度変化の周波数スペクトル。D: $Ca^{2+}$  濃度に対する Mg-fluo-4 蛍光強度変化。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Kawahara, K., Nakayama, Y. Fluctuations in the concentration of extracellular ATP synchronized with intracellular  $Ca^{2+}$  oscillatory rhythm in cultured cardiac myocytes. *Chronobiology International*, 査読有り, 24(6):1035-1048, 2007. **IF=3.495**

- ② Hachiro, T., Kawahara, K., Sato, R., Yamauchi, Y., Matsuyama, D. Changes in the fluctuation of the contraction rhythm of spontaneously beating cardiac myocytes in cultures with and without cardiac fibroblasts. *BioSystems*, 査読有り, 90:707-715, 2007. **IF=1.477**
- ③ Tanaka, M., Kawahara, K., Kosugi, T., Yamada, T., Mioka, T. Preconditioning-induced changes in the spontaneous calcium oscillations for the development of neuronal ischemic tolerance in neuron/astrocyte co-culture. *Neurochemical Research*, 査読有り, 32:988-1001, 2007. **IF=2.260**
- ④ Nakayama, Y., Kawahara, K., Hachiro, T., Yamauchi, Y., Yoneyama, M. Possible involvement of ATP-purinoceptor signaling in the intercellular synchronization of intracellular  $Ca^{2+}$  oscillation in cultured cardiac myocytes. *BioSystems*, 査読有り, 90:179-187, 2007 **IF=1.477**
- ⑤ Kawahara, K., Nakayama, Y. Extracellular ATP-purinoceptor signaling for the intercellular synchronization of intracellular calcium oscillation in cultured cardiac myocytes. *IFMBE Proceedings*, 査読有り, J.K. Zupanec (Ed.), Springer, Berlin, Volume 16: pp537-540, 2007.
- ⑥ Kawahara, K., Hachiro, T. and Matsuyama, D. Possible involvement of nitric oxide in the suppression of the release of cellular ATP during ischemia in cultured cardiac myocytes. In: *New Horizons in Coronary Artery Disease*, 査読有り, B.S. Lewis, D.A. Halon, and M.Y. Flugelman (Eds.), MEDIMOND S.r.l., Bologna, Italy, pp79-82, 2007.
- ⑦ 河原 剛一, 心筋細胞内 $Ca^{2+}$ 振動の細胞間同期と自動能: その新しいメカニズム, 臨床と研究, 査読無し(総説), 84(3): 441-444, 2007
- ⑧ Kawahara, K., Sato, R., Iwabuchi, S., Matsuyama, D. Rhythmic fluctuations in the concentration of intracellular  $Mg^{2+}$  in association with spontaneous rhythmic contraction in cultured cardiac myocytes. *Chronobiology International*, 査読有り, 25(6):868-881, 2008. **IF=3.495**
- ⑨ Mizutani, Y., Tsuchia, M., Hiratsuka, S., Kawahara, K., Tokumoto, H., Okajima, T. Elasticity of living cells on a microarray during the early stages of adhesion measured by atomic force microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有り, 47(7):6177-6180, 2008. **IF=1.309**
- ⑩ Matsuyama, D., Kawahara, K. Maintenance and characterization of spontaneous contraction rhythm in cultured cardiac myocytes fused with cardiac fibroblasts. *BioSystems*, 査読有り, 92:226-232, 2008. **IF=1.646**
- ⑪ Kosugi, T., Kawahara, K., Tanaka, M., Watanabe, Y., Inanami, O. Neuron is the primary target of  $Ca^{2+}$  paradox-type insult-induced cell injury in neuron/astrocyte co-cultures. *Neurochemistry International*, 査読有り, 52(4-5):887-896, 2008. **IF=3.228**
- ⑫ Matsuyama, D., Kawahara, K. Changes in the Proliferation activity and spontaneous contraction rhythm of terminally differentiated cardiac myocytes by co-treatment with FGF1 and an inhibitor of p38 MAP Kinase. The 22nd SICE Symposium on Biological and Physiological Engineering, Harbin, China, January 13-14, 2008. (Proceedings of the International Symposium on Biological and Physiological Engineering, 査読有り, pp.337-338, 2008)
- ⑬ Kawahara, K., Sato, R., Matsuyama, D., Iwabuchi, S. Rhythmic fluctuations in intracellular  $Mg^{2+}$  in spontaneously beating cultured cardiac myocytes. *Proceedings of the NBC 2008*, 査読有り, Katshev, A., Dekhtyar, Y. and Spigulis, J. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 264-267, 2008.
- ⑭ Matsuyama, D., Kawahara, K. Proliferation of neonatal cardiomyocytes by connexin43 knockdown via synergistic inactivation of p38 MAPK and increased expression of FGF1. *Basic Research in Cardiology*, 査読有り, 104(6):631-642, 2009. **IF=5.407**
- ⑮ Hiratsuka, S., Mizutani, Y., Toda, A., Fukushima, N., Kawahara, K., Tokumoto, H., Okajima, T. Power-Law stress and creep relaxations of single cells measured by colloidal probe atomic force microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有り, 48:08JB17, 2009. **IF=1.309**
- ⑯ Iwabuchi, S., Kawahara, K. Possible involvement of extracellular ATP-P2Y purinoceptor signaling in ischemia-induced tolerance of astrocytes in culture. *Neurochemical Research*, 査読有り, 34(9):1542-1554, 2009. **IF=2.260**
- ⑰ Hiratsuka, S., Mizutani, Y., Tsuchiya, M., Kawahara, K., Tokumoto, H., Okajima, T. The number distribution of complex shear modulus of single cells measured by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 査読有り, 109:937-941, 2009. **IF=2.629**
- ⑱ Iwabuchi, S., Kawahara, K. Oxygen-glucose deprivation-induced enhancement of extracellular ATP-P2Y purinoceptors signaling for the propagation of astrocytic calcium

waves. BioSystems, 査読有り, 96:35-43, 2009. IF=1.477

- ⑱ 河原 剛一, 互いに孤立した心筋細胞の同期現象:細胞間情報伝達の新しいメカニズム, 心電図, 査読無し(総説), 29 Suppl. 5:S-5-3-S-5-10, 2009.

[学会発表] (計 55 件)

- ① Mizutani, Y., Tsuchiya, M., Hiratsuka, S., Kawahara, K., Tokumoto, H., Okajima, T. Force measurements of microarray living cells. Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM15), (Atagawa, Japan) December 6-8, 2007.
- ② 松山大輔, 河原剛一, 異種細胞融合による終末分化心筋細胞・細胞周期リエントリーの可能性, 生体医工学, 45, Suppl. 1:111, 2007 (第46回生体医工学会大会, 仙台, 2007.4)
- ③ Mizutani, Y., Tsuchiya, M., Hiratsuka, S., Kawahara, K., Tokumoto, H., Okajima, T. Elasticity of Cardiac Cells on a Microarray under Oxidative Stress Measured by Atomic Force Microscopy. Y. Mizutani, M. Tsuchiya, S. Hiratsuka, K. Kawahara, H. Tokumoto, and T. Okajima., International Scanning Probe Microscopy Conference Seattle '08, Seattle, WA, U.S.A. (June, 2008) (International Scanning Probe Microscopy Conference Seattle Meeting program, P. 36, 2008)
- ④ 岩淵 禎弘, 河原 剛一, 虚血・再灌流によるグリア細胞間カルシウム情報伝達機構の変化, 第47回生体医工学会大会, 2008年5月. (生体医工学, 46: suppl. 1: pp20)
- ⑤ 河原 剛一, 互いに孤立した心筋細胞の同期現象:細胞間情報伝達の新しいメカニズム, 第23回犬山不整脈カンファレンス, 2008. 8. 30 (福岡) (招待講演)
- ⑥ Iwabuchi, S., Kawahara, K. Sublethal ischaemia enhances the expression of glucose transporter 3 in cultured astrocytes, 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Neurological Society, Milano, June 20-24, 2009.
- ⑦ 岩淵 禎弘, 松山 大輔, 河原 剛一, 低出力超音波パルス刺激が線維芽細胞遊走能に与える影響について, 第48回日本生体医工学会大会, 2009年4月23-25日.

他 48 件

[その他]

ホームページ等

<http://cell-c.ist.hokudai.ac.jp/>

(1)研究代表者

河原 剛一 (KAWAHARA KOICHI)

研究者番号 : 20125397

(2)研究分担者

越久 仁敬 (OKU YOSHITAKA)

研究者番号 : 20252512