

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590862

研究課題名(和文) 二光子レーザー顕微鏡を用いた心筋虚血再灌流傷害の制御機構解明と心筋保護治療の確立

研究課題名(英文) Two-photon laser scanning microscopy for the investigation of cardiomyocyte death during ischemia/reperfusion.

研究代表者 赤尾 昌治 (AKAO MASAHARU)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・展開医療部・主任研究員

研究者番号：00362509

研究成果の概要(和文)：

ミトコンドリア透過性遷移孔(MPTP)の開口と、それに続いて起こるミトコンドリア内膜電位( $\Delta\Psi_m$ )消失は、心筋虚血再灌流のさいの心筋細胞死の重要なステップであり、活性酸素(ROS)とカルシウムがこのステップの二大調節因子である。我々は、虚血再灌流を施された灌流心におけるROS、カルシウム、 $\Delta\Psi_m$ の三者の間の時空間的関連を細胞レベルで可視化する目的で、二光子レーザー顕微鏡を用いたリアルタイムイメージングを用いた。虚血再灌流時には、ROSは主に虚血早期に産生されて細胞に蓄積していくが、その蓄積速度は細胞によって大きく異なっており、そのROSレベルの多寡によって非可逆的 $\Delta\Psi_m$ 消失がall-or-none様式で起こった。細胞カルシウムレベルは、ROSの増加に平行して起こるが、ROSレベルがある閾値に達すると急激に上昇した。虚血プレコンディショニングは、これらROSとカルシウムの双方を増加を鈍らせることで $\Delta\Psi_m$ 消失を防いでいた。抗酸化剤はROSの増加を抑えたがカルシウム増加は抑制できず、 $\Delta\Psi_m$ 消失を防ぐ効果が見られなかった。このように、ROS上昇を抑えるだけでは心筋細胞保護効果は得られず、ROSとカルシウムを両方とも抑制することが心筋保護効果に必要であると考えられた。

上記のごとく、MPTP開口は心筋虚血再灌流のさいの心筋細胞死の重要なステップであり、これが心筋保護治療の標的として有望である。我々は、MPTPの構成分子のひとつであるサイクロフィリンD(CyPD)を、RNA干渉を用いた遺伝子サイレンシングで選択的に抑制することで心筋保護効果が得られるかを検討した。CyPDを非活性化するsiRNAを産生するように設計した組換えアデノウイルスを作成し、これをラット心臓に直接心筋内注入して感染させ、この心臓を数日後にとりだしてランゲンドルフ灌流し、二光子レーザー顕微鏡を用いたリアルタイムイメージングに供した。虚血再灌流下の $\Delta\Psi_m$ を経時的にモニタリングすると、CyPD-siRNAを発現する細胞においては、発現していない細胞に比べて明らかに $\Delta\Psi_m$ 消失は起こりにくく、CyPD-siRNAの心筋細胞保護効果が認められた。また、この保護効果には用量依存性がみられた。

この新たな二光子イメージングの実験系は、心筋虚血再灌流時の細胞死のメカニズムの解明において有用性が高く、また細胞死を防ぐ心筋保護治療を確立する上でも有用である。

研究成果の概要(英文)：

An opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), which leads to loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), is a crucial step in the cell death during myocardial ischemia/reperfusion; reactive oxygen species (ROS) and  $Ca^{2+}$  are considered as the two major regulators of this step. We aimed to visualize the spatio-temporal relationship between ROS,  $Ca^{2+}$  and  $\Delta\Psi_m$  loss at cellular level in the perfused heart subjected to ischemia/reperfusion using a real-time two-photon imaging system. During ischemia/reperfusion, ROS were mainly generated during early phase of ischemia with variable cell-to-cell specific rates and irreversible  $\Delta\Psi_m$  loss occurred in an all-or-none manner depending on cellular ROS level with a clear cut-off value. Cellular  $Ca^{2+}$  level concomitantly increased during ischemia, and once ROS level reached a threshold level,  $Ca^{2+}$  level increased robustly. Ischemic preconditioning

attenuated both the increase of ROS and  $Ca^{2+}$  and protected against  $\Delta\Psi_m$  loss. An anti-oxidant attenuated the ROS accumulation but not the  $Ca^{2+}$  increase; it did not protect against  $\Delta\Psi_m$  loss. Thus, reducing only ROS accumulation does not suffice to prevent cardiomyocyte death; suppression of both ROS and  $Ca^{2+}$  may be required.

An opening of the MPTP is the earliest event that commits cells to death, and this process is potentially a prime target for therapeutic intervention against myocardial ischemia/reperfusion. We aimed to investigate the protective effects of RNAi-mediated gene silencing of cyclophilin D (CypD), one of the putative components of the MPTP, against myocardial ischemia/reperfusion by using the two-photon laser scanning microscopy. We created an adenovirus carrying short interfering RNA (siRNA) which inactivates CypD. To investigate the effects *in vivo*, we monitored the spatio-temporal changes of  $\Delta\Psi_m$  in perfused rat hearts subjected to ischemia/reperfusion, using the two-photon imaging. Adult rats received direct intramyocardial injections of the adenovirus. Two to three days after injection, the rat hearts were perfused in Langendorff mode, and  $\Delta\Psi_m$  levels of individual cells were monitored. The progressive loss of  $\Delta\Psi_m$  during ischemia/reperfusion was significantly suppressed in CypD-siRNA-transduced cells, compared with non-transduced cells. Furthermore, the protective effect of CypD-siRNA was dose-dependent.

Thus, this novel two-photon imaging provides deeper insights into the mechanisms of cardiomyocyte death during ischemia/reperfusion, into cardioprotective therapy that targets mitochondria. .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学

#### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患は、日本を含む先進国における主要な死因のひとつであり、国民の健康施策上、克服すべき最も重要な課題のひとつである。心臓の虚血再灌流による細胞死のメカニズム解明や、それに基づく心筋保護効果を期待した治療戦略の確立は急務である。

申請者は単離心筋細胞を用いた主にイメージングの実験系で、ミトコンドリアの細胞死制御機構の解明と、それに基づいた治療戦略の確立を中心に一連の研究を行ってきた。

心筋保護機構の中心的役割を担うミトコンドリア内膜ATP感受性Kチャネル(mitoK<sub>ATP</sub>チャネル)に着目し、ラット心臓において心筋虚血により K<sub>ATP</sub>チャネル構成蛋白分子の発現が亢進することを発見した[Akao. *J. Clin. Invest.* 1997]。続いて、mitoK<sub>ATP</sub>チャネル開口が、培養心筋細胞において活性酸素によって起こるアポトーシスを抑制すること[Akao. *Circ. Res.* 2001]、その保護効果がミトコンドリアのカルシウム過負荷の軽減によること[Murata. *Circ. Res.* 2001]を発見してきた。また、活性酸素による細胞死経路

の最早期において、カルシウム依存性のミトコンドリア構築の進行性変化 (swelling, cristae の消失) が起こり [Akao. *Circ. Res.* 2003]、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルはこのミトコンドリア構築の変化の過程を抑制ないし遅延することで細胞保護効果を発揮することを発見した [Akao. *Circ. Res.* 2003]。また、ミトコンドリア内膜に存在する脱共役タンパク (UCP-2) の過剰発現、Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 阻害剤やスタチンなどの薬剤も、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルと同等の保護効果が得られることを発見してきた [Teshima. *Circ. Res.* 2003, Teshima. *Circulation.* 2003, Jones. *Circ. Res.* 2003]。

申請者は、単離心筋細胞のイメージングからさらに発展させて、灌流心における臓器レベルでのイメージングの実験系確立に取り組み、二光子共焦点レーザー顕微鏡 (Two-photon Laser Scanning Microscopy: TPLSM) を用いて世界で初めて生きた心臓 (灌流心) のミトコンドリアの可視化に成功した [Matsumoto-Ida. *Circulation.* 2006]。

TPLSM は、従来の共焦点顕微鏡をはるかに凌ぐ組織浸透度を有し、また組織に対する光毒性が少ないため、比較的厚みのある生きたサンプルを用いたイメージングには理想的な特長を持つ。この新しいシステムを用いて、虚血再灌流により心筋細胞のミトコンドリア機能が次々に失われていく様子をリアルタイムに撮影することに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究においては、TPLSM を用いたラット灌流心のリアルタイムイメージングによって、分子あるいは細胞レベルでの詳細な心筋虚血再灌流傷害のメカニズムや、心筋細胞傷害の時空間的伝播とその制御機構を解明し、これを新たな心筋保護治療戦略の確立に役

立てることを目標とする。虚血再灌流時のミトコンドリア傷害において、細胞内の活性酸素やカルシウム過負荷が重要な役割を果たしていると考えられる。TPLSM を用いて、ミトコンドリア機能のみならず、活性酸素やカルシウムレベルの indicator を同時標識して、これらの経時的変化の関係を観察する。

近年の多くの研究により、ミトコンドリアは細胞の生死を直接的に制御していることが明らかとなってきた。ミトコンドリア PT ポア (MPTP) は細胞傷害性のストレスが加わったときに開口し、これによりミトコンドリア内膜電位が消失して細胞は死に至る。

MPTP の構成分子の一つであると考えられている Cyclophilin D (CypD) のノックアウトマウスでは虚血再灌流による心筋細胞傷害が著明に軽減されることが報告され (Baines et al. *Nature* 2005, Nakagawa et al. *Nature* 2005)、CypD が心筋保護治療の分子標的となりうることが強く示唆された。

本研究において、RNA 干渉 (RNAi) を利用して心臓における CypD を特異的に抑制し、心筋保護効果を期待した治療戦略を確立することを目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット灌流心を用いた心筋虚血・再灌流モデル

ラット心臓をランゲンドルフ灌流し、蛍光色素を含む灌流液にて所定時間の loading を行う。同一視野の細胞の挙動を経時的に追跡するためには心拍動を停止する必要がある、そのために butanedione monoxime を含む灌流液に切り替えて、拍動が停止したら、灌流心を顕微鏡のステージ上に静置して、撮像を開始する。虚血を再現するために、心臓への灌流液を停止して作成する全虚血モデルを用いることとする。

## (2) 二光子レーザー共焦点顕微鏡 (TPLSM)

790-900 nm の可変波長域をもつ

Ti:Sapphire laser を用いて、使用する蛍光色素に応じた波長を用いて色素を励起し、高感度の検出器を用いてシグナルを取得する。

## (3) ミトコンドリア内膜電位 ( $\Delta\psi_m$ ) の標識

ミトコンドリアは内膜の内外的プロトン濃度差に基づく電位差が産み出され、この電位 ( $\Delta\psi_m$ ) を駆動力として ATP を産生している。細胞が種々の刺激に曝されると、MPTP が開口して  $\Delta\psi_m$  が不可逆的に消失し、細胞は死に至る。MPTP 開口・ $\Delta\psi_m$  消失の制御機構を明らかにすることは、心筋保護戦略の確立に直結する。 $\Delta\psi_m$  の指標となる TMRE という蛍光色素を用いて、モニタリングを行う。

## (4) RNAi を用いた CypD の選択的抑制

CypD を選択的に抑制する short interfering RNA (CypD-siRNA) を心筋細胞により効率よく導入する目的で、CypD-siRNA 発現組換えアデノウィルスを作成し、これをラット心筋内に直接注入する。TPLSM による心臓ミトコンドリア機能のリアルタイムイメージングを用いて、虚血再灌流によるミトコンドリア傷害がどのように時間、空間的に伝播していくかを詳細に観察し、CypD-siRNA の効果を評価する。

## 4. 研究成果

我々は、心筋虚血再灌流によって、細胞ごとに heterogeneity (図 1 にて、生存細胞と死細胞がまだら状に混在している) が存在することに着目し、このメカニズムをさらに検討した。

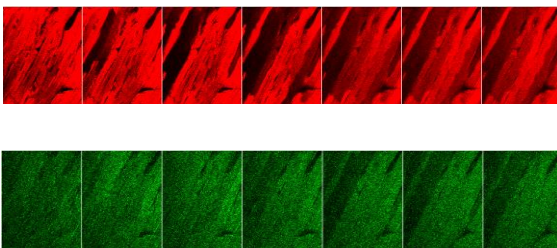


図 1. 10 分ごとに撮影した time-lapse 画像。(上段)TMRE 蛍光(下段)DCF 蛍光。60 分間全虚血。

図 1 に示すように、虚血開始とともに個々の細胞において活性酸素(ROS)レベル (DCF 蛍光で表現される) が徐々に蓄積し、ある閾値を超えた細胞が  $\Delta\psi_m$  消失 (TMRE 蛍光の消失で示される) に至る。また細胞によって ROS 蓄積速度が異なっており、ROS 蓄積速度が大きい細胞ほど、 $\Delta\psi_m$  消失に至る時間が短いことが示された。さらに興味深いことに、 $\Delta\psi_m$  消失の反応は all-or-none であり、ROS 蓄積速度レベルに明確なカットオフ値が存在していた (図 2)。

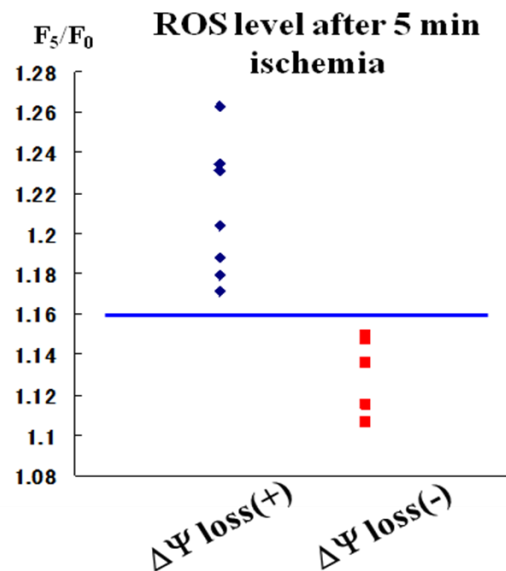


図 2.  $\Delta\psi$  消失に陥った細胞と陥らなかった細胞の、虚血開始 5 分後の ROS レベル。両者のあいだにカットオフが存在する。

内因性の心筋保護機転である ischemic preconditioning (IPC) においては、ROS 蓄積速度は有意に低下しており、これによって  $\Delta\psi_m$  消失の閾値に達する細胞数が減少して細胞保護効果を発揮していた。

しかしながら、2-mercaptopyrionylglycine のような抗酸化剤を前投与すると、ROS 蓄積速度は有意に低下するものの、 $\Delta\psi_m$  消失を防

ぐ効果は見られず、虚血時の ROS を低下させることだけでは細胞保護効果を得るには不十分であることが示唆された。

いっぽう、CypD-siRNA を感染させた培養心筋細胞においては、CypD の発現量が mRNA レベルでは 61%、タンパクレベルでは 63% 減少していた。ラット培養心筋細胞において、活性酸素刺激による細胞死やミトコンドリア機能傷害を CypD-siRNA が有意に抑制することを、cell viability assay や共焦点顕微鏡を用いたライブセルイメージングの実験系で明らかにした。

図 3 に、CypD-siRNA を発現したラット心臓の TPLSM 像を示す。発現に用いた組換えアデノウイルスは GFP 発現カセットを有するため、ウイルスを発現した心筋細胞が緑色蛍光を発しており、この視野で見ると、約半数の心筋細胞がウイルス導入されている。

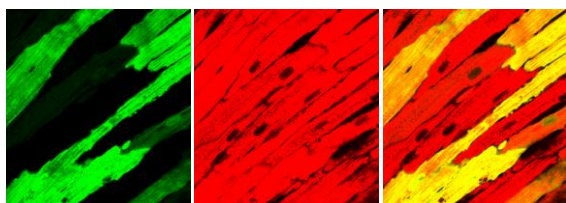


図 3. CypD-siRNA 発現アデノウイルスを発現させたラット心臓の TPLSM 像。(左)GFP 蛍光。(中)TMRE 蛍光。(右)重ね合わせ像。

この心臓を、ランゲンドルフ灌流下に全虚血を行い、その経時的変化を観察することに成功した (図 4)。GFP 陽性細胞と陰性細胞を比較することで、CypD-siRNA を発現する細胞と発現しない細胞の反応の違いを明確に比較することが可能であった。いずれの遺伝子発現も抑制しない control-siRNA を導入した心臓を、CypD-siRNA の対照として観察した。

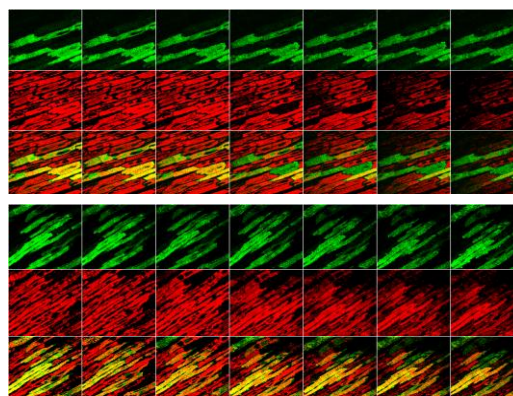


図 4. 全虚血開始後の 10 分ごとの time-lapse 像。上段: control-siRNA 発現アデノウイルスを導入したラット心臓。下段: CypD-siRNA 発現アデノウイルスを導入したラット心臓。いずれも GFP 蛍光(上)、TMRE 蛍光(中)、重ね合わせ像(下)から構成されている。

Control-siRNA 群では、GFP 陽性細胞と陰性細胞とで虚血時のミトコンドリア内膜電位消失の程度に差はみられなかったが、CypD-siRNA 群では、GFP 陽性細胞が明らかに虚血耐性がつよく、ミトコンドリア内膜電位を保持している細胞が多かった。さらに、GFP 蛍光強度とミトコンドリア内膜電位保持の程度には正の相関関係が見られ、すなわち CypD-siRNA の発現量が多いほど保護効果も強いことが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. The targeting of cyclophilin D by RNAi as a novel cardioprotective therapy : evidence from two-photon imaging. Kato M, Akao M, Matsumoto-Ida M, Makiyama T, Iguchi M, Takeda T, Shimizu S, Kita T. *Cardiovasc Res.* 2009 Jul 15;83(2):335-44. 査読有
2. p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M, Kato

M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K. Circ Res. 2009 Oct 9;105(8):746-54. 査読有

3. Direct monitoring of mitochondrial calcium levels in cultured cardiac myocytes using a novel fluorescent indicator protein, GCaMP2-mt. Iguchi M, Kato M, Nakai J, Takeda T, Matsumoto-Ida M, Kita T, Kimura T, Akao M. Int J Cardiol. 2011 Feb 3. [Epub ahead of print] 査読有

〔学会発表〕（計 9 件）

第 73 回日本循環器病学会学術集会総会，大阪 2009.3.20-22

1. Moritake Iguchi, et al: Visualization of Accumulating Reactive Oxygen Species during Myocardial Ischemia by Real-time Two-photon Imaging of Perfused Rat Hearts.

2. Yasuaki Nakagawa, et al: An Important Role of p300 on Mitochondrial Gene Expression and Function and Tolerance to Ischemia in the Heart.

**American Heart Association Scientific Sessions 2009, Orlando, USA. 2009.11.**

3. Moritake Iguchi, et al: Visualization Of Accumulating Reactive Oxygen Species During Myocardial Ischemia By Real-time Two-photon Imaging Of Perfused Rat Hearts.

4. Moritake Iguchi, et al: Direct monitoring of mitochondrial calcium levels in cultured cardiomyocytes using a novel fluorescent indicator protein, GCaMP2-mt.

第 74 回日本循環器病学会学術集会総会，京都 2010.3.5-7

5. Masaharu Akao, et al: Exploring

Mitochondria in the Intact Ischemic Heart with Real-time Two-photon Imaging: Insights into the Novel

Anti-ischemia/Reperfusion Therapy.

6. Masashi Kato, et al: Impact of Diabetes and Acute Hyperglycemia on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury and Ischemic Preconditioning: Evidence from Real-time Two-photon Imaging.

**American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago, USA. 2010.11.**

7. Moritake Iguchi, et al: Simultaneous monitoring of reactive oxygen species, calcium and mitochondrial potential during myocardial ischemia by real-time two-photon imaging of perfused rat hearts.

8. Masashi Kato, et al: Impact of diabetes and acute hyperglycemia on myocardial ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning: evidence from real-time two-photon imaging.

第 75 回日本循環器病学会学術集会総会，横浜 2011.8.3-4

9. Moritake Iguchi, et al: Simultaneous monitoring of reactive oxygen species, calcium and mitochondrial potential during myocardial ischemia by real-time two-photon imaging of perfused rat hearts.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤尾 昌治 (AKAO MASAHARU)

独立行政法人国立病院機構（京都医療センター一臨床研究センター）・展開医療部・主任研究員

研究者番号：00362509