

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790216

研究課題名（和文）

全心臓カルシウム動態のエネルギーとイメージングの同時リアルタイム計測法の開発

研究課題名（英文）

Establishment of simultaneous real-time measurement system for myocardial mechanenergetics and calcium dynamics in rat whole hearts.

研究代表者

小畑 孝二（OBATA KOJI）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40378229

研究成果の概要（和文）：

心臓の力学的エネルギー学的性質において、興奮収縮連関の酸素消費は前負荷の増大に依存しないのかという永年の疑問がある。本研究ではその疑問に答えるため、ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いて、興奮収縮連関のカルシウムハンドリングに要するエネルギー計測と、遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブ（GCaMP）による全（丸ごと）心臓でのカルシウムイメージングの同時リアルタイム計測法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

A question of long-standing to cardiac physiologists is whether E-C coupling  $VO_2$  will be really independent of preload. To answer the question, we tried to develop the simultaneous real-time measurement system for myocardial mechanoenergetics and calcium dynamics in the blood-perfused excised heart preparations using G-CaMP-expressed transgenic rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：カルシウム、カルシウムイメージング、心臓、心臓力学、興奮収縮連関、筋小胞体、トランスジェニックラット、酸素消費

## 1. 研究開始当初の背景

心臓は全身に血液を送り出すポンプとしての機能を持ち、その収縮弛緩のメカニズムにおいて、心臓を構成する蛋白質の同定や興奮収縮連関の機序が明らかにされてきた。我々は、

ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いて、左心室圧-容積と冠循環の動静脈血液酸素濃度較差のリアルタイム測定により、心臓一拍毎の心筋酸素消費量と発生する総機械的エネルギーの直線関係から、心筋細胞の興奮収

縮連関におけるカルシウムハンドリングに要する酸素消費を算出する手法を駆使し、多く学術論文を報告してきた。しかしながら、本実験法では、機械的無負荷時の酸素消費の変化からカルシウムハンドリングの障害や改善を推測はできるが、実際に起こっている細胞内カルシウム濃度変化を同時に観察することはできない。一方、細胞内カルシウム濃度の測定には、一般的にFluo-3, 4等の蛍光カルシウム指示薬を用いるが、摘出心や生体位心のような全(まるごと)心臓でのカルシウム動態の観察は困難であることから、これまでの研究では心臓表面心筋のカルシウム濃度変化の検出に限られていた。最近、cameleonやG-CaMPなど遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブの開発が進んでいる。中井ら(*Nature Biotech*, 2001)は、Green Fluorescent Protein (GFP)、カルシウム結合蛋白質であるcalmodulinおよびその相互作用ペプチドであるM13を遺伝子操作により改変融合し、細胞内のカルシウムイオン濃度をリアルタイムに測定するための蛍光プローブ、G-CaMPを開発した。そこで本研究では、ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系により求めた心臓一拍毎の心筋酸素消費量と発生する総機械的エネルギーの直線関係から求められる心臓の興奮収縮連関におけるカルシウムハンドリングと、遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブであるG-CaMPによる全心臓でのカルシウムイメージングの同時リアルタイム計測法を開発するという発想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系による興奮収縮連関のカルシウムハンドリングに要するエネルギー計測と、遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブ、G-CaMPによる心臓全体でのカルシウムイメージングの同時リアルタイム計測法を開発し、全心臓の興奮収縮連関におけるエネルギー消費プロセスとカルシウム動態をリアルタイムで解析することである。本研究は、心臓の力学的エネルギー学的研究と最近注目されている遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブの一つであるG-CaMPを用いた全(丸ごと)心臓でのカルシウムイメージングを用いた画期的な研究であり、この研究によって、興奮収縮連関の酸素消費は本当に前負荷の増大に依存しないのか?という心臓生理学における永年の疑問に終止符を打つことが可能となる。

## 3. 研究の方法

ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験は、ラン

ゲンドルフ灌流と違い、2匹のラットのうち、一方から心臓を摘出し、他方のラットを代謝サポーターとし、その頸動脈・静脈と摘出心臓をつなぎ血液交叉灌流を行い、摘出心臓の冠循環を行う。ペーシングにより一定の心拍数で拍動させる。摘出心臓の左室内にバルーンを挿入し正確に注水して、左室圧と容積の測定を行う(図1)。

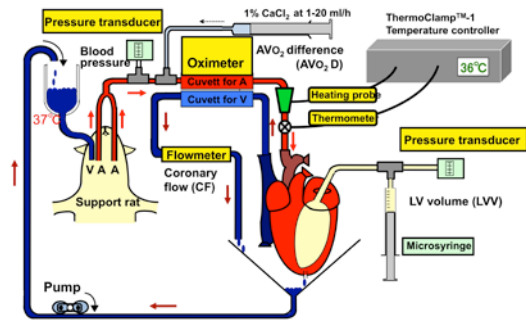


図1 ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系  
(A) LVP-LVV relation (B)  $VO_2$ -PVA relation

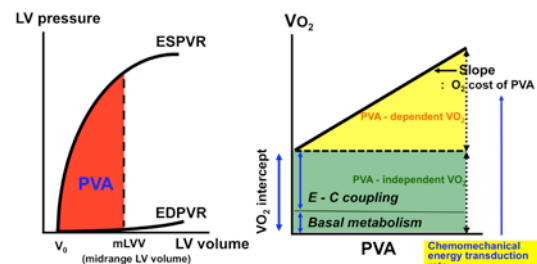
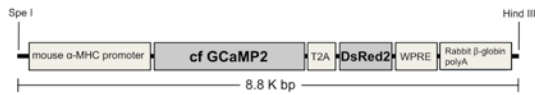


図2 心臓のメカノエナジェティクスの概念

その注水量(前負荷)を変えて心収縮期末圧容積関係(ESPVR)と弛緩期末圧容積関係(EDPVR)を求める(図2A)。ESPVRとEDPVRから収縮期末圧容積面積(PVA: 一回の心筋収縮・弛緩によって発生する総機械的エネルギー)を算出する。また、交叉灌流系はほとんどすべて冠循環であるので、一心拍当たりの心筋酸素消費量( $VO_2$ )は冠灌流量と動静脈酸素濃度較差の積を心拍数で除して求め、心臓の酸素消費量が連続的に正確に測定することが可能である。各心室容積におけるデータをプロットして $VO_2$ -PVA関係直線を得る(図2B)。この $VO_2$ -PVA関係直線の勾配と $VO_2$ 切片からそれぞれPVAの酸素コスト(化学エネルギーから機械エネルギーへの変換効率の逆数を表す)と興奮収縮連関のカルシウムハンドリングと基礎代謝に利用される酸素消費量を求める。この実験系に、ブレインビジョン社製の高速イメージングシステムを用いて、G-CaMPによる蛍光強度の変化から、専用ソフトを用いて心臓全体でカルシウム動態の計測を行う。

G-CaMP トランスジェニックラットの作製は、研究協力者である埼玉大学脳科学融合センター、中井淳一教授から改良型G-CaMP(図

3) プラスミドベクターの譲渡を受け、



**図3 導入遺伝子について**  
α-MHC promoterの下流にcfGCaMP2, T2A peptide, DsRed2, WPREを配している。T2A peptideの導入によりcfGCaMP2とDsRed2は細胞内で1:1で発現する。WPREの導入によりmRNAの核から細胞質への移行が促進される。

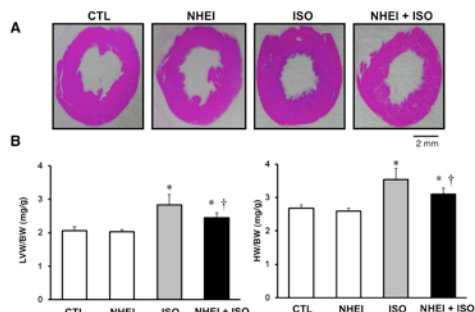
研究協力者として生理学研究所行動代謝分子解析センター、平林真澄准教授に依頼し、遺伝子組換えラットの作製を行った。

加えて、正常心臓から得られたデータをもとに、心筋の筋小胞体カルシウムポンプ (SERCA2a) 過剰発現心臓や、カルシウムハンドリングの異常が予測されるイソプロテレノール誘導性肥大心でのメカノエナジェティクスとカルシウム動態を計測する。そのため、SERCA2a トランスジェニックラットを作製し、その心臓をドナーとし、血液交叉灌流実験系を行い、そのメカノエナジェティクスを調べた。さらに、それらのトランスジェニックラットへのイソプロテレノール持続投与によって心肥大を誘導し、それらのラットを心臓ドナーとして、摘出した心臓の血液交叉灌流実験を行った。一方、病態モデルとしてイソプロテレノール持続投与ラットにおける心肥大のメカニズムおよびカルシウムハンドリング異常について、生理機能とカルシウム動態やカルシウムハンドリングタンパクの発現量を比較することでそのメカニズムを調べた。

#### 4. 研究成果

はじめに、G-CaMP TG ラット作製し、飼育繁殖を行い、系統を樹立するのに時間を要したため、カルシウムハンドリングタンパクを変化させたモデル動物を用いて、実験を行った。

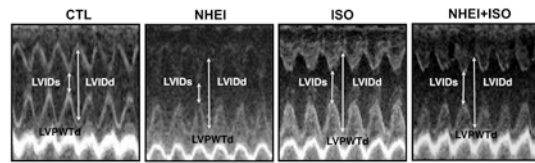
イソプロテレノール (ISO) 持続投与による心肥大とNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体 (NHE-1) 阻害薬によるカルシウムハンドリングタンパクの変化について調べた。ISOを浸透圧ポンプにて1週間持続投与すると心肥大を発症する (図4)。



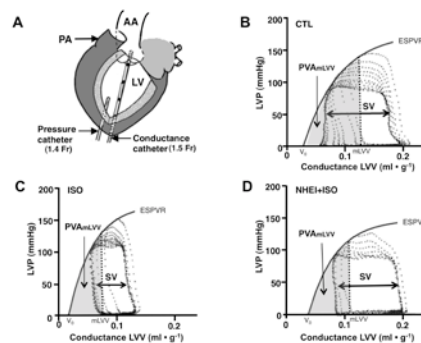
**図4 イソプロテレノール持続投与による心肥大について**

同時にNHE-1 阻害薬を投与すると心肥大が抑制された。心エコーで比較するとFSやEFには差はみられなかった。そこで、コンダクタン

スカテテルを用いて、圧-容積関係から求めたPVAを取縮性の指標として比較したところ、NHE-1 阻害薬による心機能の改善を見出した (図5, 6)。

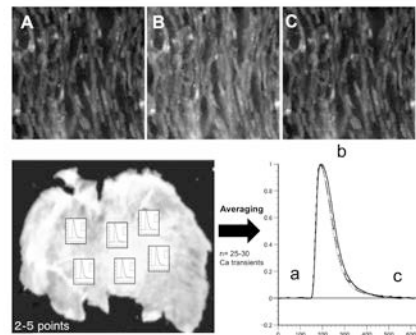


**図5 イソプロテレノール持続投与による心肥大について**



**図6 イソプロテレノール持続投与による心肥大について**

このとき、ISOによる筋小胞体のカルシウムポンプであるSERCA2aの減少がNHE-1 阻害薬により改善していることから、細胞内カルシウム動態を調べた。方法は心筋スライスを用いて、蛍光カルシウム指示薬であるFluo-3AMを用いた。その結果、ISO投与によりカルシウムトランジェントが短縮し、NHE-1 阻害薬投与による改善効果がみられた (図7)。

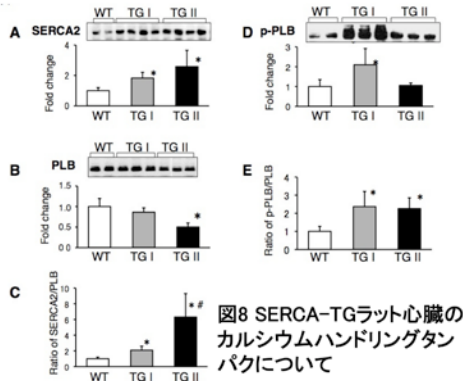


**図7 イソプロテレノール持続投与による心肥大について**

この結果から、SERCA2a活性よりNCX活性の増加の関与が示唆された。また、この実験ではFluo-3AMを用いたが、G-CaMP TGラットを用いることで、ISO持続投与による肥大心での丸ごと心臓を用いたカルシウム動態の計測が可能となる。

次に、SERCA2aを過剰発現させるTGラットを作製し、その力学的エネルギー学的性質を調べた。このTGラットでは、SERCA2a発現量の違うTG-Iと-IIを比較した。その結果、SERCA2aの制御タンパクであるホスホランバンおよび

リン酸化ホスホランパンにおいてもSERCA2a同様に違いが認められた(図8)。



そのメカノエナジェティック解析では、TG-IではESPVRの上方移動し、収縮性の増加がみられた。一方、TG-IIは通常ラット心臓と同等であった。しかし、両TGラットともVO<sub>2</sub>-PVA関係の傾きは有意に減少し、Y軸切片が上昇していた(図9, 10)。Y軸切片の増加は興奮収縮連関に使用される酸素消費の増大によることが示された。しかし、収縮性の酸素コストはすべての群で違いがみられなかった(図9, 10)。

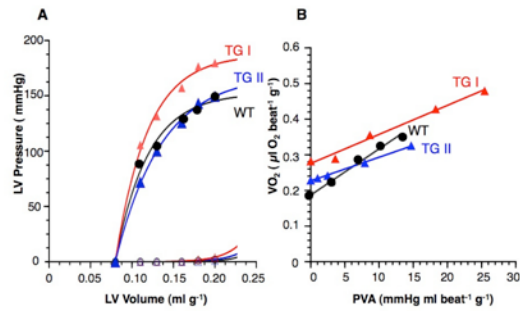


図9 SERCA-TGラット心臓のメカノエナジェティクスについて

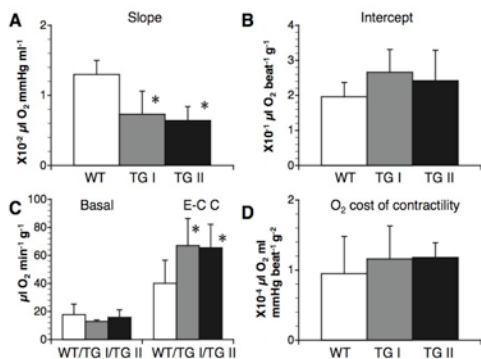


図10 SERCA-TGラット心臓のメカノエナジェティクスについて

これらの結果から、SERCA2a過剰発現により、カルシウムハンドリングに用いられる酸素消費の増加が明らかとされた。今後、G-CaMP TGラットとのダブルトランスジェニックの作製により、実際のカルシウム動態とメカノエナジェティックの同時計測への期待が高まった。さらに現在、このSERCA2a-TGラットに先述のようにISO持続投与することで心肥大を発症

させた時、肥大はどうか、メカノエナジェティクスはどう変化するかを調べている。

G-CaMP TGラットの作製は、はじめにヒトサイトメガロウイルスプロモーター制御で全身性の過剰発現ラットを作製した。イメージングシステムは、ブレインビジョン社のMiCAMO2-CMOSカメラを用いたカルシウムイメージングシステムを使用した。その結果、培養細胞での一過性の強制発現、G-CaMP TGラットからの摘出心臓での心筋スライス、あるいは丸ごと心臓にて、拍動毎のカルシウムトランジェントをイメージングすることに成功した(図11)。

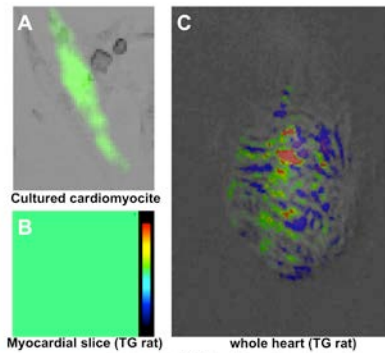


図11 G-CaMPの発現した培養心筋細胞(A)、心筋スライス(B)、丸ごと心臓のカルシウムイメージング

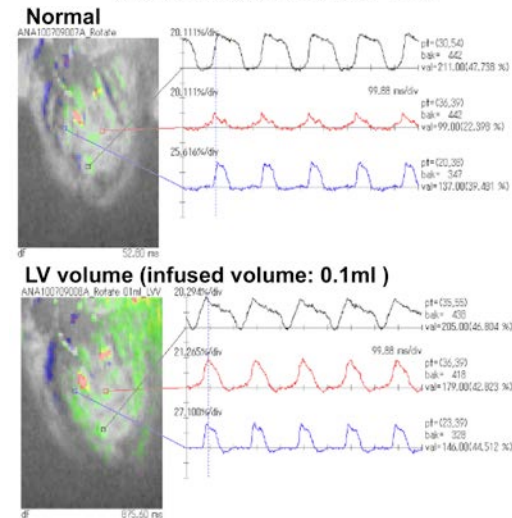


図12 G-CaMPによる全心臓のカルシウムイメージング

そこで、血液交叉灌流実験系を用いた提出心臓でのカルシウムイメージングを行った。まず、永年の疑問であった前負荷の増大でカルシウム動態に違いはあるかどうかを調べた。その結果、赤線で示す部位のようにカルシウムトランジェントのアンプリチュードの増加が起きているところもあったが、全く変化のない部位もあった(図12)。その後も幾度と実験を行ううちに、この結果にはmotion artifactが含まれており、本当に正確な細胞内カルシウム濃度の変化をとらえていないことが分かった。そこで現在、正常心臓のよう

に拍動を続ける血液交叉灌流実験系で、motion artifact を除去できる方法として、G-CaMP と DsRed を共発現させ、ただ赤色蛍光のみを示す DsRed の蛍光変化と緑色蛍光である G-CaMP を同時測定できる 2 波長計測実験系 (図 13) を構築し、それらを差し引くことで、motion artifact を除去できると考えた。そこで、新たなコンストラクトを作製し、TG ラットを作製した。現在、飼育繁殖中であり、結果は今後に期待される。

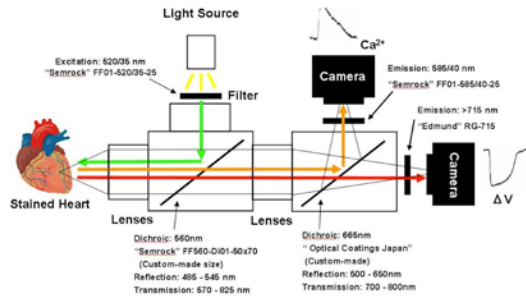


図13 摘出心臓でのカルシウムイオンの2波長計測システム

最後に、本実験システムの完成により正確なカルシウム動態を計測できるようになれば、現在の生理学の教科書に記載されている VO<sub>2</sub>-PVA 関係において興奮収縮連関における酸素消費は前負荷に依存しないという定説が真実かどうかを立証することが可能となる。

#### 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 9 件)

1. Evaluation of left ventricular mechanical work and energetics of normal hearts in SERCA2a transgenic rats.  
Zhang GX, Obata K, Takeshita D, Mitsuyama S, Nakashima T, Kikuta A, Hirabayashi M, Tomita K, Vetter R, Dillmann WH, Takaki M. *J Physiol Sci.* 62(3):221-31.2012 (査読有)  
DOI: 10.1007/s12576-012-0200-4
2. NHE-1 blockade reversed changes in calcium transient in myocardial slices from isoproterenol-induced hypertrophied rat left ventricle.  
Hattori H, Takeshita D, Takeuchi A, Kim B, Shibata M, Matsuoka S, Obata K, Mitsuyama S, Zhang GX, Takaki M. *Biochem Biophys Res Commun.* 419(2):431-435. 2012. (査読有)  
doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.041
3. Comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT4 receptor agonist on in vivo neurogenesis at the rectal anastomosis in rats.  
Kawahara I, Kuniyasu H, Matsuyoshi H, Goto K, Obata K, Misawa H, Fujii H, Takaki M. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302(6):G588-597. 2012. (査読有)  
doi: 10.1152/ajpgi.00284.2011
4. Age-related changes in afferent responses in sensory neurons to mechanical stimulation of osteoblasts in co-culture system.  
Asada K, Obata K, Horiguchi K, Takaki M. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(5):C757-765. 2012. (査読有)  
doi: 10.1152/ajpgi.00284.2011
5. NHE-1 participates in isoproterenol-induced downregulation of SERCA2a and development of cardiac remodeling in rat hearts.  
Shibata M, Takeshita D, Obata K, Mitsuyama S, Ito H, Zhang GX, Takaki M. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301(5):H2154-2160. 2011. (査読有)  
doi: 10.1152/ajpheart.00483.2011
6. In vitro enhanced differentiation of neural networks in ES gut-like organ from mouse ES cells by a 5-HT4-receptor activation.  
Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Kawahara I, Goto K, Zhang GX, Obata K, Kuniyasu H. *Biochem Biophys Res Commun.* 406(4):529-33. 2011. (査読有)  
doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.072
7. Changes in contractile and electrical activity in the ileum of DSS-induced colitis model W/W<sup>u</sup> mutant mice.  
Matsuyoshi H, Nakagawa T, Zhang GX, Obata K, Misawa H, Kawahara I, Takaki M. *J Smooth Muscle Res.* 46(3):143-56. 2010. (査読有)  
doi:10.1540/jsmr.46.143
8. Effects of angiotensin type I receptor blockade on the cardiac Raf/MEK/ERK cascade activated via adrenergic receptors.  
Zhang GX, Kimura S, Murao K, Yu X, Obata K, Matsuyoshi H, Takaki M. *J Pharmacol Sci.* 113(3):224-33. 2010. (査読有)  
doi:10.1254/jphs.09336FP
9. A cardioprotective agent of a novel calpain inhibitor, SNJ-1945, exerts beta1 actions on left ventricular mechanical work and energetics.  
Yoshikawa Y, Zhang GX, Obata K, Matsuyoshi H, Asada K, Taniguchi S, Takaki M. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299(2):H396-401. 2010(査読有)  
doi: 10.1152/ajpheart.00153.2010

[学会発表] (計 10 件)

1. Obata K, Takeshita D, Mitsuyama S, Zhang G-X, Takaki M: Suppressed  $\text{Ca}^{2+}$  handling and cross-bridge cycling underlie negative inotropism in hyperthermic rat hearts. *J Physiol Sci* 62 (Suppl. 1): S165 (2PJ-113), 2012. 第 89 回日本生理学会大会 長野県松本文化会館 長野, 2012/3/29-31.
2. Takeshita D, Hattori H, Matsuoka S, Shibata M, Kimb B, Takeuchi A, Zhang GX, Obata K, Takaki M:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger-1 blocker treatment reversed changes in calcium transient in myocardial slices from isoproterenol-induced hypertrophied rat left ventricles. *J Physiol Sci* 62 (Suppl. 1): S168 (2PJ-123), 2012. 第 89 回日本生理学会大会 長野県松本文化会館 長野, 2012/3/29-31.
3. Mitsuyama S, Obata K, Takeshita D, Ito H, Takaki M: Left ventricular mechanoenergetics in isoproterenol-induced hypertrophied SERCA2a transgenic rats. *J Physiol Sci* 62 (Suppl. 1): S166 (2PJ-116), 2012. 第 89 回日本生理学会大会 長野県松本文化会館 長野, 2012/3/29-31.
4. 小畑孝二, 竹下大輔, 光山晋一, 伊藤治男, 高木 都: 血液交叉灌流摘出ラット心臓の高温条件下におけるメカノエナジェティクスの研究 第 21 回日本病態生理学会 日本大学医学部 東京, 2011/8/20-21.
5. Zhang G-X, Obata K, Takaki M: Symposium45 New approach of analysis for cardiac function using cross-circulation system with blood Cardiac mechanoenergetics in SERCA2a transgenic rats. *J Physiol Sci* 61(Suppl. 1): S89 (S45-3), 2011. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 シンポジウム パシフィコ横浜会議センター 横浜, 2011/3/28-30.
6. Takeshita D, Zhang GX, Obata K, Misawa H, Matsuyoshi H, Takaki M: A novel NHE-1 inhibitor ameliorates cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  handling impairment and prevents the development of cardiac remodeling in isoproterenol-infused rats. *J Physiol Sci* 61(Suppl. 1): S203 (P2-123), 2011. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 パシフィコ横浜会議センター 横浜, 2011/3/28-30.
7. 田中みどり, 張 国興, 小畑孝二, 松吉ひろ子, 吉川義朗, 竹下大輔, 三澤裕美, 谷口繁樹, 高木 都: ラット急性虚血モデルにおけるカルパイン阻害薬の作用-1 心拍

あたりの総機械エネルギー(PVA)解析から- 第 103 回近畿生理学談話会大阪大学銀杏会館, 2010/10/2.

8. 竹下大輔, 柴田宗孝, 服部宇孜, 張 国興, 小畑孝二, 松吉ひろ子, 三澤裕美, 高木 都:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換体阻害薬経口投与によるイソプロテレノール誘導性肥大心の肥大抑制作用と  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントへの影響 第 103 回近畿生理学談話会 大阪大学銀杏会館, 2010/10/2.
9. 吉川義朗, 張 国興, 小畑孝二, 大賀好美, 松吉ひろ子, 谷口繁樹, 高木 都: 新しいカルパイン阻害剤SNJ-1945 添加心筋保護液の虚血再灌流障害防止効果: ラット血液交叉灌流摘出心臓標本を用いて 第 31 回 日本循環制御医学会総会 千里ライフサイエンスセンター, 2010/5/28-29.
10. 柴田宗孝, 張 国興, 小畑孝二, 竹下大輔, 三澤裕美, 松吉ひろ子, 高木 都: イソプロテレノール誘導性肥大心における  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントと経口  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換体(NHE-1) 阻害薬の肥大抑制作用 第 31 回 日本循環制御医学会総会 千里ライフサイエンスセンター, 2010/5/28-29.

[その他]

ホームページ等

奈良県立医科大学生理学第 2 講座 HP

<http://www.naramed-u.ac.jp/~2phy/>

6. 研究組織

研究代表者

小畑 孝二 (OBATA KOJI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40378229