

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460283

研究課題名(和文) 2波長イメージングによる全心臓のカルシウム動態とエネルギー消費の同時計測法の開発

研究課題名(英文) Development of whole heart calcium imaging system with two different waves using modified G-CaMP-DsRed-coexpressed transgenic rat model in the blood-perfused excised heart preparation

研究代表者

小畑 孝二 (Obata, Koji)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40378229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自のラット血液交叉灌流摘出心臓の実験系を用いて、丸ごと心臓でのカルシウムイメージングを行い、心臓の収縮性の変化と、酸素消費、カルシウムトランジェントの関係を調べる。そこで、改良型G-CaMPとDsRed(赤色蛍光)の2つの遺伝子を同時発現するトランスジェニックラットを作製し、2波長による計測システムの構築を行った。しかし、多くの問題が明らかとなり、その問題解決に向けて研究を行っている。

研究成果の概要(英文)：I attempted to develop a whole heart calcium imaging system with two different waves using modified G-CaMP-DsRed-coexpressed transgenic rat model to investigate the relationship among cardiac contractility, oxygen consumption, and intracellular calcium handling in the blood-perfused excised heart preparation. I just have to overcome a couple of problems for measuring accurate calcium transient. Now, I try to find the effective breakthrough.

研究分野：生理心臓力学、循環動態、エネルギー代謝、分子生理学、循環器

キーワード：カルシウム カルシウムイメージング 心臓 エネルギー消費 酸素消費 収縮性 心筋細胞 興奮収縮連関

### 1. 研究開始当初の背景

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1拍毎の心筋酸素消費量 ( $VO_2$ ) と発生する総機械的エネルギー (PVA) の直線関係に注目し、その結果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世界に先駆けて確立した。この概念において、 $VO_2$  切片は、PVA 非依存性の酸素消費を示しており、基礎代謝を除いた部位は、興奮収縮連関に必要な酸素消費を示している。しかし、この興奮収縮連関に必要な酸素消費は、本当に PVA に依存しないか？ すなわち、前負荷の増大 (伸展刺激) は、心臓の機械的仕事の増大を起こす (いわゆるフランク・スターリングの法則) が、近年 Stretch-activated channel の関与等も報告されており、細胞内カルシウム濃度の増加が起こると考えられる。すなわち、上記の概念では PVA 非依存性の酸素消費の中の基礎代謝を除いた部分が増加するはずであるが、実際は不変であることを見出している。しかし、直接カルシウム動態を計測してはいない。一方、細胞レベルでは Fluo-3 等の蛍光カルシウム指示薬を用いた細胞内カルシウム動態の計測はよく行われている。摘出心臓でも報告はあるが、晶質液を用いており生体に近いとは言い難い。そこで中井ら (連携研究者、*Nature Biotech*, 2001) が開発した遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブ (GECIs) の一つである GCaMP による全心臓でのカルシウムイメージングと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。これまでに心臓特異的 GCaMP 過剰発現ラットの作製に成功し、GCaMP による心臓全体でカルシウムイメージングを行った。その結果、1心拍毎の蛍光強度の変化を捉えることに成功し、左心室中に挿入したバルーンの容積を増大させることにより、蛍光強度の増大部位も認めている。しかし実際は motion artifact が含まれ、正確なカルシウム動態とは言い難い結果であった。この問題を解決するため、GCaMP と DsRed (ただ赤色蛍光を示すのみ) を同時発現させることで、

赤色蛍光は motion artifact のみを捉え、GCaMP の緑色蛍光の変化から差し引くことで、より正確なカルシウム濃度の変化を測定できる 2 波長計測システムを考えた (図 1)。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、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である。いわゆるフランク・スターリングの法則は、前負荷の増大は心臓の収縮を増大させるというものであるが、簡単に言うと心筋は引っ張られるほど、よく収縮するというものである。一般に筋肉細胞は細胞内のカルシウム濃度が増大すれば収縮も大きくなる。しかし、これまでの報告では、前負荷を増大させても興奮収縮連関の酸素消費は変わらない (つまり細胞内カルシウム動態は変わっていない)。一方、培養細胞などを用いて細胞を伸展させたとき、細胞内カルシウム濃度の上昇が起こることは報告されている。これは、非常に短期的なものであり細胞レベルの実験での現象である。生体内において、心臓という臓器レベルで起こる前負荷の増大にもあてはまるのであろうか？ その心臓生理学上の疑問の解明に挑む。

また、心不全などの病的な心臓では、細胞内カルシウム動態が変化していることも知られている。これまでにイソプレナリン持続投与による肥大心では、左室拡張障害が起こり、SERCA2a を含めたカルシウム調節蛋白質量の減少すること、さらに最近  $Na^+/H^+$  交換体阻害薬は SERCA2a 発現を回復させることを明らかにしている。また、SERCA2a を過剰発現するトランスジェニックラットを作製し、興奮収縮連関における酸素消費が正常心臓に比べ増大しているという大変興味深い結果を得ている。これらの心臓において、実際のカルシウム動態は定かではない。もし本研究で 2 波長カルシウムイメージングシステムが完成されると、正常心臓だけでなく、肥大心や不全心モデルといった病的な心臓や、SERCA2a 過剰発現ラットとのダブルトランスジェニックラットの心臓を用いて、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が可能となる。

最近、新規のミオシンアクチベーターである Omecamtiv mecarbil (OM) が報告された。この薬物は、ミオシンとアクチンの架橋構造を強固にすることで強心作用を発揮すると言われており、全く新しい作用機序の強心薬として現在臨床研究が進行している。従来の強心薬 (作動薬やジギタリスなど) は、結果的に細胞内カルシウム濃度を上昇させることで強心作用を発揮するが、これはすなわち興

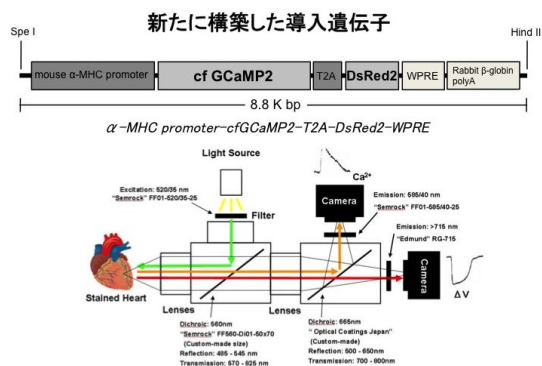


図1 摘出心臓でのカルシウムイオン2波長計測システム

奮収縮連関の酸素消費を増大させることであり、長期的にみると患者の予後の悪化に繋がることが懸念される。一方、OMはミオシンとアクチンの架橋構造にのみ作用するのであれば、理論的には細胞内カルシウム濃度は変化が無く、興奮収縮連関の酸素消費も変えないはずである。もし本研究によりカルシウムイメージングシステムと酸素消費、収縮性の同時計測実験系ができれば、薬物の評価も可能となる。このように本研究によって、学術的な興味だけでなく、病態の解明や新たな治療法の開発にも繋がる。

### 3. 研究の方法

ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験は、2匹のラット的一方から心臓を摘出し、もう一方のラットを代謝サポーターとし、その頸動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注水して、左室圧と容積の測定を行う(図2)。その注水量は前負荷

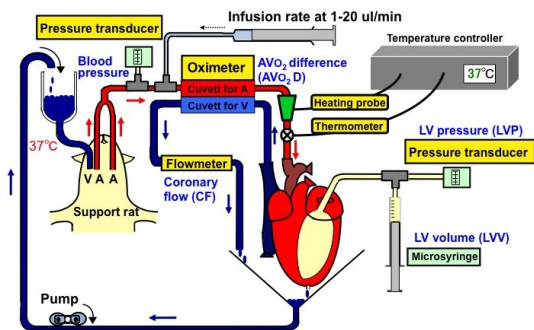


図2 ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系

を意味し、それを変化させることで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。ESPVRとEDPVRから収縮期末圧容積面積(PVA: 1心拍毎に発生する総機械的エネルギー)を算出する(図3)。交叉灌流系はほとんど冠循環であるので、1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、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3)。交叉灌流摘出心臓を用いたメカノエナジェティクス解析は、左心室圧-容積と冠循環流量と動静脈血

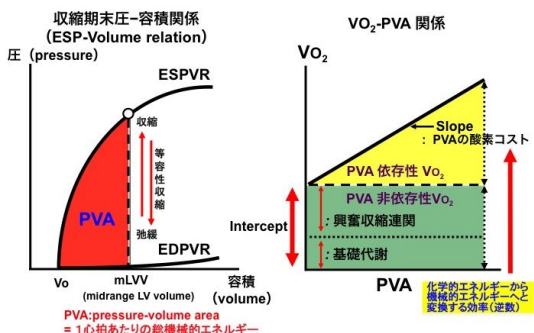


図3 ESPVR- $VO_2$ -PVAの概念について

液酸素濃度較差のリアルタイム測定により1心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関係を算出して行う。

一般的な細胞内カルシウム濃度の測定では、Fluo-3等の蛍光カルシウム指示薬がよく用いられている。しかし本実験系では血液を灌流しているため、血球細胞への蛍光カルシウム指示薬のトラップや浸透の不均一性など種々の問題が考えられた。そこで、中井らが開発したGCaMPによる全心臓でのカルシウムイメージングと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。つまり遺伝子組換え技術を用いて、ミオシン重鎖プロモーター制御下で心臓特異的に、GCaMPを過剰発現する遺伝子組換えラットを作製し、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、GCaMPによる心臓全体でカルシウムイメージングを行った。1心拍毎の蛍光強度

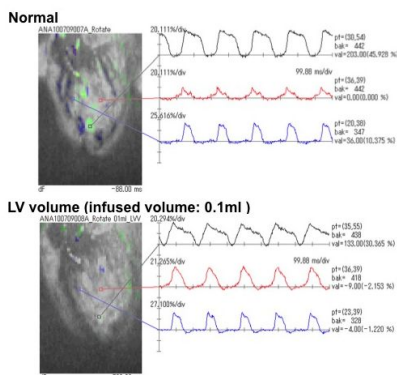


図4 GCaMPによる心臓全体で $Ca^{2+}$ イメージング

の変化を捉えることに成功し、左心室腔内に挿入したバルーンの容積を増大させることにより、蛍光強度の増大部位も認めている(図4)。しかし実際はmotion artifactが含まれ、正確なカルシウム動態とは言い難い結果であった。本研究では、心筋細胞内カルシウム計測のためのGCaMPによる緑色蛍光と、motion artifact除去のためのDsRedによる赤色蛍光の2波長蛍光観察から、全心臓でカルシウムイメージングシステムの新たな構築を行う。またOM投与といった種々の条件下での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し、収縮性との関係について明らかにする。

### 4. 研究成果

以前所屬していた奈良県立医科大学第二生理学講座の時代から科学研究費補助金を受け、岐阜大学医学部生理学教室に移動しても、GCaMP遺伝子組換えラットを用いて、摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いたカルシウムイメージングと心臓の力学的エネルギー学的性質を調べる同時計測の確立を目指して、一貫して研究を行ってきた。

本実験計画の初年度は、奈良県立医科大学から岐阜大学への改良型GCaMP-DsRed遺伝

子組換えラットの移動時に、微生物モニタリングの結果、実験に使用できないトラブルに見舞われた。そこで、摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いたエネルギー学的な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を算出する手法を確認するため、環境的な変化が心臓のメカノエナジェティクスに与える影響について検討した。初めに温度変化について、摘出心臓を低温(32℃)、正常(37℃)、高温(42℃)という環境にしてメカノエナジェティクスの変化をみた。つまり、低体温や熱中症のような高体温時に心臓自身がどのような収縮やエネルギー消費を行うかを検討した。その結果、同前負荷に対し、収縮期末圧は低温時で最も高く、温度の上昇に伴い減少した。つまり PVA が温度上昇に伴い、減少した。このときの  $VO_2$ -PVA 直線関係は、温度変化しても傾きや Y 軸切片は変化しなかった。しかし、同前負荷に対し、 $VO_2$ -PVA ポイントは温度上昇に伴いほぼ同一直線上を左斜め下方に、移動した(図5)。これは、通常 PVA 依存

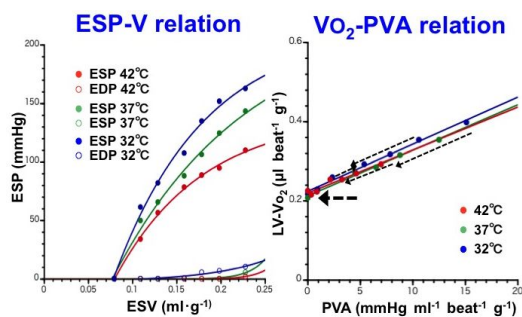


図5 温度変化によるESPVR- $VO_2$ -PVAへの影響性酸素消費が変化したことを意味しており、ミオシン ATPase への影響と考えられる。しかし、Y 軸切片の成分は温度上昇に伴い、基礎代謝成分が増大し、興奮収縮連関成分が減少していた。つまり、カルシウムハンドリングにも温度の影響がみられ、温度の上昇に伴い減少することが示唆された。しかし、圧-時間波形の下降脚は、温度上昇に伴い急峻となり、通常、筋小胞体のカルシウムポンプである SERCA の活性化を意味しているあり、SERCA は興奮収縮連関の中で最も多くエネルギー消費を行う(図6)。これらの結果は一見矛盾するようであるが、恐らく心臓は温度の上昇に伴

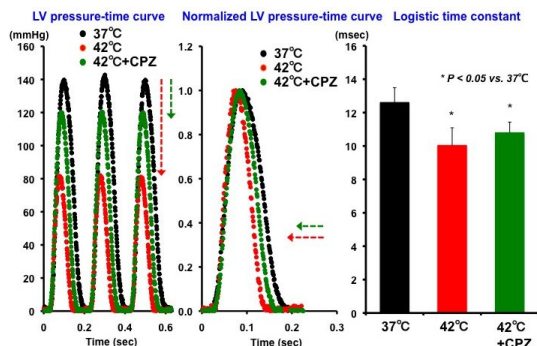


図6 温度変化による圧-時間曲線への影響

い、カルシウムハンドリングはむしろ抑制され、ミオシン-アクチンのクロスブリッジ構造の解離が促進されることによると推測した。本実験系から得られる結果は酸素消費というエネルギー学的に心臓の性質をみるという画期的な手法であるが、もしカルシウムイメージングと組み合わせられれば、実際のカルシウム動態を観察しながら、エネルギー消費を算出でき、より正確な評価が可能となることは間違いない。このように温度変化がもたらす心臓のメカノエナジェティクスへの影響について大変興味深い知見を得ており、論文作成中である。

2年目は、従来使用していた電磁流量計が故障し、製造中止のため超音波血流計を購入した。そのため、種々の条件が変更になり、条件設定などの調整に大きく時間を要した。図1で示したように、この実験系では心臓の酸素消費を求めるとき、動静脈血の酸素濃度較差と冠灌流速度の積を心拍数で除することによって求めている。そのため、電磁流量計はこの実験系では欠くことのできない計測機器である。購入し設置できるまでの間、温度変化の心臓のメカノエナジェティクスへの影響を分子レベルで解析する試みを行った(図7)。SERCA の働きは、ホスホランパンのリン酸化によって調節されていることが知られて

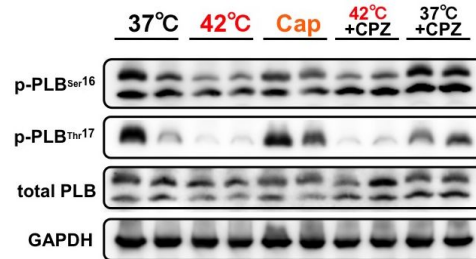


図7 温度変化による筋小胞体のカルシウム調節タンパク質への影響。そこで、高温条件下でそのリン酸化を検討した。さらに、温度受容体としてよく知られている TRPV1 のアゴニストであるカプサイシン(Cap)の影響についても検討した。その結果、リン酸化レベルは高温では低下しており、Cap では変化がなかった。超音波流量計の設定が終了後、Cap 投与による心臓のメカノエナジェティクスについて検討した。Cap によって、高温時と同様に ESPVR の低下がみられた。しかし、 $VO_2$ -PVA 直線関係の直線関係は、傾きは変わらないが Y 軸切片は濃度依存性に低下した。この結果は Cap によって、カルシウムハンドリングの低下による収縮性の減弱が起き、興奮収縮連関の酸素消費も低下したと考えられる。以上の結果は、収縮性の低下は Cap と高温条件と同様であるが、全く同様の作用ではないことから、高温による収縮性の低下には一部、TRPV1 を介した経路の関与が考えられた。しかし、本実験結果についても実際のカルシウム動態をみることで

きれば、高温と Cap のカルシウムハンドリングに対する違いも知ることが可能となるかもしれない。

これまでに遺伝子組換えラットの移動やクリーン化、さらには機器の故障など多くのトラブルに見舞われたため、思うように進んでいないのが現状である。また本実験系に必須である超音波血流計を購入したため、2波長計測のための装置を購入することが不可能となってしまった。そこで、最終年度である本年は、GCaMP 遺伝子組換えラットと Fluo-3 を用いたカルシウムイメージングについて、ガラス板による固定やミオシン-アクチンのクロスブリッジ運動の阻害薬である BDM を用いる等の様々な工夫により、蛍光感度の上昇や心臓自身の motion artifact を除去できるか試みた。その結果、ガラス板を心臓に押し当てて観察する方法では、動きを止めることはできたが、蛍光強度の変化がもともと小さく、また心筋自体を押しつぶしていることもあり、生体に近い状態であるとは言えないという問題があった。一方、BDM を用いた場合は、心臓を完全に止めるには用量の設定が難しく、また長時間行うと代謝サポートラットの心臓自身も停止してしまうため、良い方法とは言えなかった。最近、GCaMP に改良が加えられ、蛍光強度の変化の増大や赤色蛍光など、益々利用価値が発展していく可能性がある。今後も、心臓のメカノエネジェティクスを研究するうえで、直接的にカルシウム動態を観察し計測できることは非常に重要である。また本実験で考案した 2 波長計測系は、もし完成できれば世界に類のない実験系であり、その確立に向けて、今後も励みたいと考えている。

また、環境変化による心臓のメカノエネジェティクスについて、新規のミオシンアクチンベーターである OM について検討した。ただし、当初の予定では、カルシウムイメージングと組み合わせる予定だったが、計測系が完成していないため、メカノエネジェティクスのみを正常心臓と、イソプロテレノールの 4 週間投与することによって誘導した不全心を用いた摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いて調べた。その結果、ESPVR は僅かに上昇したが有意な違いは見られなかった。非常に興味深いことに  $VO_2$ -PVA 直線関係の傾きが OM 投与前後で、正常心と不全心ともに傾きの有意な低下がみられた。Y 軸切片は有意ではないが若干の増加がみられ、それは不全心群で多くみられた。以上の結果から、心臓における OM の効果は、発生する総機械的エネルギーはあまり増大させないが酸素消費量が減少したことから、収縮効率を上昇させた。OM は弛緩時間を明らかに延長させた。さらに Y 軸切片の増大から、これらの OM の作用は、興奮収縮連関に独立しているとは言えない可能性があり、

今後の検討課題である。つまり、カルシウムイメージングにより細胞内カルシウム動態を計測できれば、この疑問も解決できる可能性がある。

最後に、本研究は「興奮収縮連関に必要な酸素消費は、本当に PVA に依存しないのであるか？」つまり興奮収縮連関の酸素消費は前負荷の増大に依存して増えるのかどう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であった。そのため、左室圧-容積（収縮性）、酸素消費（エネルギー消費）、カルシウムイメージング（細胞内カルシウム動態）を同時に計測できる実験系の確立を目指した。結論的には種々の問題から達成することはできなかった。しかし、多面的なアプローチにより心臓のメカノエネジェティクスにおいて、新たな疑問が生じており、それらの解決にも同時計測実験系があれば、さらなる発展が望める。今後も心臓生理学を行うものとして、先人の残していった課題に新しい科学技術を用いて挑んでいきたい。

## 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 7 件)

1. Tateishi R, Akiyama N, Miyauchi M, Yoshinaga R, Sasanuma H, Kudo T, Shimbo M, Shinohara M, **Obata K**, Inoue J, Shirakawa M, Shiba D, Asahara H, Yoshida N, Takahashi S, Morita H, Akiyama T. Hypergravity Provokes a Temporary Reduction in CD4+CD8+ Thymocyte Number and a Persistent Decrease in Medullary Thymic Epithelial Cell Frequency in Mice. *PLoS One*. 2015 Oct 29;10(10):e0141650. doi: 10.1371/journal.pone.0141650. 査読有
2. Morita H, **Obata K**, Abe C, Shiba D, Shirakawa M, Kudo T, Takahashi S. Feasibility of a Short-Arm Centrifuge for Mouse Hypergravity Experiments *PLoS One*. 29;10(7):e0133981. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0133981. 査読有
3. Yamada A, Torimoto K, **Obata K**, Hirayama A, Fujimoto K, **Takaki M**. Persistent overexpression of SERCA2a affects bladder functions under physiological conditions, but not in bladder outlet obstruction-induced sub-acute pathological conditions *J Physiol Sci.*, 64(1):21-30. 2014. doi: 10.1007/s12576-013-0286-3. 査読有
4. Aoki K, **Obata K**, Kurihara M, Kuniyasu H, Kirita T, **Takaki M**. Possible peripheral mechanism for taste disorder in rats administered S-1 *Int J Clin Oncol.*,19(3):549-56. 2013. doi: 10.1007/s10147-013-0572-3. 査読有
5. Mitsuyama S\*, Takeshita D\*, **Obata K\***,

Zhang GX, **Takaki M.** \*Equal contribution

Left ventricular mechanical and energetic changes in long-term isoproterenol-induced hypertrophied hearts of SERCA2a transgenic rats

J Mol Cell Cardiol., 59C:95-106. 2013.

doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.012. 査読有

6. Goto K, Kato G, Kawahara I, Luo Y, **Obata K.**, Misawa H, Ishikawa T, Kuniyasu H, Nabekura J, **Takaki M.**

In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine

PLoS One. 8(1):e54814. 2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0054814. 査読有

7. Takeshita D, Tanaka M, Mitsuyama S, Yoshikawa Y, Zhang GX, **Obata K.**, Ito H, Taniguchi S, **Takaki M.**

A new calpain inhibitor protects left ventricular dysfunction induced by mild ischemia-reperfusion in in situ rat hearts

J Physiol Sci., 63(2):113-23.2013.

doi: 10.1007/s12576-012-0243-6. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 小畑孝二、その他  
左心室力学的エネルギー学的性質への新規ミオシンアクチベーター, omecamtivmecarbil の効果  
第 93 回日本生理学会  
2016 年 3 月 22-24 日 札幌コンベンションセンター 北海道札幌市
2. 小畑孝二、その他  
ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いたメカノエナジェティクスとカルシウムイメージング解析法の開発  
第 62 回中部日本生理学会  
2015 年 11 月 13 日-14 日 富山大学 富山県富山市
3. 小畑孝二、その他  
左心室力学的エネルギー学的性質へのミオシンアクチベーターと SERCA アクチベーターの効果の検討  
第 25 回日本病態生理学会  
2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日 愛媛大学 愛媛県松山市
4. 小畑孝二、その他  
ラット摘出心臓における高温条件下での陰性変力作用について - TRPV1 の関与 -  
第 92 回日本生理学会  
2015 年 3 月 21-23 日 神戸国際会議場 兵庫県神戸市
5. 小畑孝二、その他  
ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いた高温条件による陰性変力作用のメカニズムについて  
第 24 回日本病態生理学会  
2014 年 8 月 9-10 日 北九州国際会議場 福岡県北九州市

6. 小畑孝二、その他

病的心臓のメカノエナジェティクスにおける SERCA2a 過剰発現の影響

第 35 回日本循環制御医学会

2014 年 7 月 4-5 日 九州大学医学部 福岡県福岡市

7. 小畑孝二、その他

血液交叉灌流実験系を用いたラット摘出心臓のカプサイシン投与によるメカノエナジェティクス解析-高温との比較-

第 91 回日本生理学会

2014 年 3 月 16 日-18 日 鹿児島大学郡元キャンパス 鹿児島県鹿児島市

8. 小畑孝二、その他

血液交叉灌流実験系を用いたラット摘出心臓の高温条件下におけるメカノエナジェティクス解析

第 60 回中部日本生理学会

2013 年 10 月 25-26 日 岐阜大学医学部 岐阜県岐阜市

9. 小畑孝二、その他

SERCA2a 過剰発現ラットにおけるイソプロテレノール誘導肥大心の左心室メカノエナジェティクスに関する研究

第 23 回日本病態生理学会

2013 年 8 月 2-4 日 東京慈恵医科大学 東京都港区

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~physiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小畑 孝二 (Obata Koji)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  
研究者番号: 40378229

(2) 研究分担者

高木 都 (Takaki Miyako)

奈良県立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号: 33358

(3) 連携研究者

中井 淳一 (Nakai Junichi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号: 80237198

(4) 連携研究者

大倉 正道 (Ohkura Masamichi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号: 70369172