

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19459

研究課題名（和文）ケージド化合物光分解による心臓の機能的合胞性破綻 - 不整脈の発生臨界領域の探索 -

研究課題名（英文）Functional impairment of the heart by flash photolysis of caged compounds - towards an integrated understanding of the critical regions for arrhythmogenesis -

研究代表者

田中 秀央（Tanaka, Hideo）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：60236619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、心筋組織に付加したカルシウムイオン(Ca²⁺)のケージド化合物を光で分解し、光照射部の心筋Ca濃度上昇が心筋組織の興奮伝導を変化させるか否かを検討した。新生仔ラット心から得た単層培養組織の局所を紫外(UV)光で照射する光学系を構築、Ca²⁺蛍光指示薬Fluo-8/AMとケージドCa²⁺DMNPE-4/AMを付加し、365 nmのUV光照射によりその興奮伝導を蛍光観察した。ケージドCa²⁺存在下、心筋の興奮に伴って生じるCa²⁺濃度の増減は光照射後に増幅し、照射領域を起点に伝導遅延が生じたほか、一部で巡回性の伝導や自発性の興奮も観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カルシウムイオン(Ca²⁺)のケージド化合物を付加した心筋組織に紫外光照射することにより、局所のCa濃度を自在に変化させて心筋の興奮伝導を制御できるか否かを検討した。心筋単層培養組織に紫外光を照射できる光学系を構築、ケージドCaのDMNPE-4/AMを付加した心筋組織に紫外光照射することにより心筋組織の興奮や伝導様式を変化させることに成功した。これにより、本手法が心臓の興奮伝導の異常である不整脈の制御や不整脈の発生病理の理解に有用となる可能性が示唆された。光による生物試料の機能制御法は心臓組織に留まらず様々な生命機能を解析する上で革新的な手段となるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：On the hypothesis that flash photolysis of caged calcium (Ca²⁺) loaded within cardiac tissue could alter spatiotemporal patterns of impulse generation or conduction, experiments were performed using rapid imaging of the fluo8/AM-based Ca²⁺ dynamics of the cultured cardiomyocytes monolayer obtained from neonatal rat hearts. It was found that the UV-flash light applied to the myocyte monolayer loaded with caged Ca²⁺ compounds DMNPE-4/AM resulted in slowing of the impulse conduction near the area of flash application. In addition, some samples showed localized reentrant excitation or abnormal automatic activity of the myocyte monolayer after UV-flash application. Thus, the flash photolysis technique for caged Ca²⁺ loaded in the myocardium would be a promising approach for modification of the cardiac impulse generation and propagation and for understanding of its basis. In addition, this unique experimental approach could also be worth applying in other biological research fields.

研究分野：実験病理学

キーワード：不整脈 ケージド化合物 光刺激 心筋細胞 カルシウム ギャップ結合 興奮伝導

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

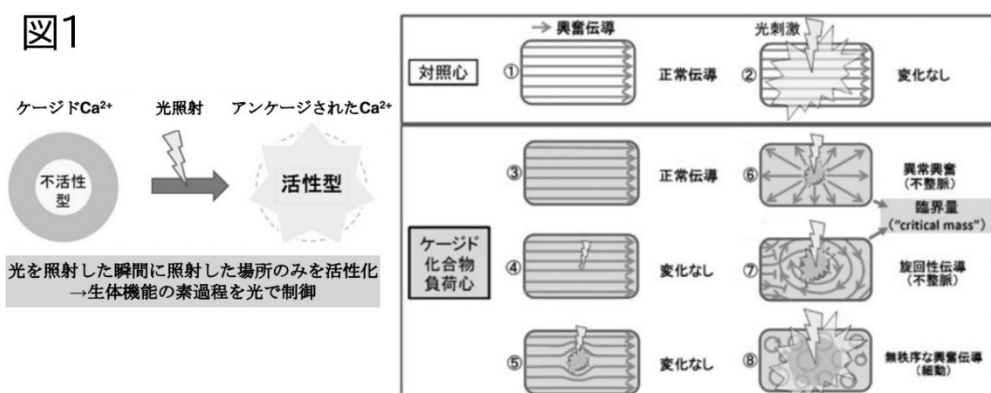
1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓の興奮伝導において重要な役割を演じるカルシウムイオン(以下、 Ca^{2+})は、心筋組織局所で異常な濃度上昇を示すと心臓全体に異常な興奮伝導、すなわち不整脈を引き起こす。しかしながら、心筋組織にどの程度の領域で Ca^{2+} 濃度上昇があれば興奮伝導に変化が生じるかは不明である。

(2) 本研究では、心筋組織局所の Ca^{2+} 濃度を上昇させることにより「異常な興奮伝導組織」を作成することができれば、これに伴う興奮伝導様式の変化を捉えることができるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

ケージド Ca^{2+} を付加した培養心筋組織に光照射することにより照射領域の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、これに伴って生じる心筋組織の興奮伝導様式を解析することによりどのような興奮伝導の異常が生じるか否かを明らかにする (図1)。



3. 研究の方法

(1) 新生仔ラットの心臓から単離した心筋細胞を直径35 mmのプラスチック培養皿上に単層培養し心筋組織シートを作成、これに Ca^{2+} 蛍光指示薬Fluo-8/AM(4.7 μ M)とケージド Ca^{2+} DMNPE-4/AM(10~50 μ M)を付加し、490nmLED励起によりその興奮伝導様式を蛍光観察した(毎秒 100 コマの X-Y 動画)。

マクロズーム顕微鏡下でUV照射前後のFluo-8蛍光強度変化を記録



図2

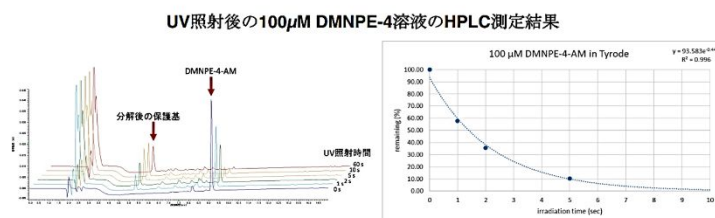
さらに紫外光照射により組織局所の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、これに伴って生じる心筋組織の興奮伝導様式の変化を可視化した。

(2) 実体蛍光顕微鏡システム(Olympus社製 MVX10)の光軸に対して斜め約45度から直径5 mmから18mmに亘る領域に紫外光(UV-LED, CCS, 8332C、315~395 nm、出力100 mJ、10 Hz、5秒

間)を様々な頻度(0.5 Hzから3 Hz)で試料面に任意のサイズ(直径 5 ~ 18 mm)の光(強度約70 mW/cm²)照射刺激システムを構築した(図2)。

(3) なお、作製したアンケージ用紫外光の照射によるDMNPE-4/AMのアンケージ効率を100 μM DMNPE-4溶液を用いてHPLCで測定したところ、1秒露光で約40%が、5秒露光で約90%がアンケージされることがわかった(図3)。

UV-LED光照射によるケージドCa²⁺のアンケージ効率



→ 1秒露光で約40%、5秒露光で約90%がアンケージ

図3

(4) Fluo8蛍光記録中、任意のタイミングで心筋層局所に紫外LED光を照射した。蛍光イメージングの記録には0.63xの対物レンズを用いた。CCDカメラ(BrainVision, High-Resolution)により取得された蛍光画像は高速イメージングシステム(BrainVision, MiCAM02)へと転送され、ペーシング信号との同期および蛍光強度差分処理が施された後にパソコンへと表示・保存した。

(5) 心筋細胞層試料はマクロズーム顕微鏡(Olympus, MVX10)下に供し、37°Cに加温したTyrode液の灌流および電極刺激(2Hz)によるペーシング下のもと、青色LED励起(465nm)によるFluo-8蛍光イメージングを行い、興奮伝導を記録した。

4. 研究成果

(1) 1Hzの電気駆動下に心筋はCa²⁺濃度の一過性上昇(Ca²⁺トランジェント)を発生し、刺激部から興奮が90 ~ 100 mm/秒の定速度でほぼ均一に放射状伝播した。ケージド化合物を負荷しない状態で心筋組織を紫外光照射したところ、Fluo8 蛍光強度は閃光照射の前後で有意な変化は示さず(図4)、興奮伝導速度も殆ど変化を認めなかった(図5)。これらより本光照射自体は心筋の興奮伝導に影響しないことが確認された。

試料: 培養心筋細胞層 (ケージドCa²⁺非導入)
刺激頻度: 2Hz

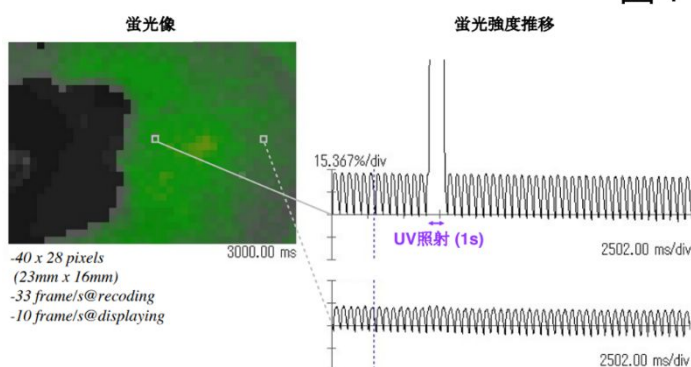
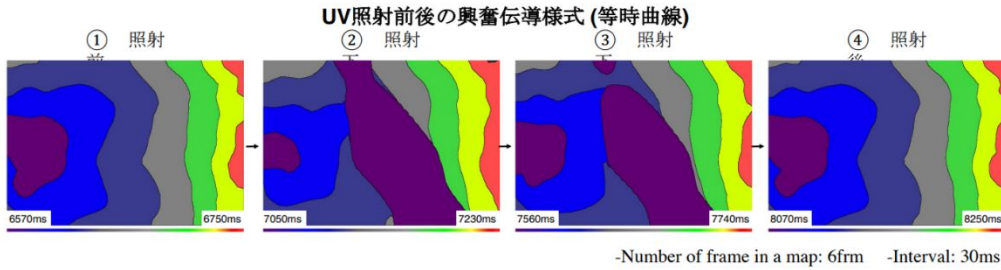


図4

UV照射のみでは興奮伝導様式に変化は見られない

図5

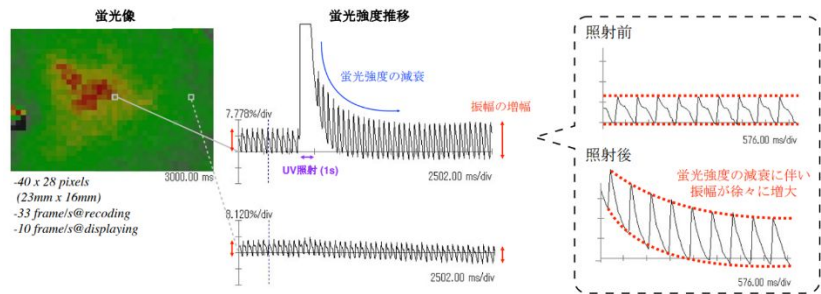


(2) ケージドCa²⁺ (10 μM) を付加した細胞層ではUV照射前には刺激毎に一定振幅の蛍光強度上昇が見られたが、UV照射後は照射領域における蛍光強度底値の大幅な増加と減衰が見られた(図6)。これはUV照射によりケージドCa²⁺のCa²⁺がアンケージされた結果と言える。また底値の増加のみならず、刺激毎の蛍光強度振幅の増幅も得られた。UV照射前後における興奮伝導様式の等時曲線を調べたところ、UV照射中から照射直後にかけて照射領域を起点とする興奮伝導遅延が生じていたことがわかった。

(3) また、本伝導遅延は照射後の照射領域における定在Ca²⁺濃度が減少するに従い解消されており、可逆的な応答であるとわかった。さらに一部の試料では、Ca²⁺アンケージによる巡回性の興奮(図7)や、自発性の興奮(図8)も見られた(図8)。

試料: 培養心筋細胞層 (10μM DMNPE-4)
刺激頻度: 2Hz

図6

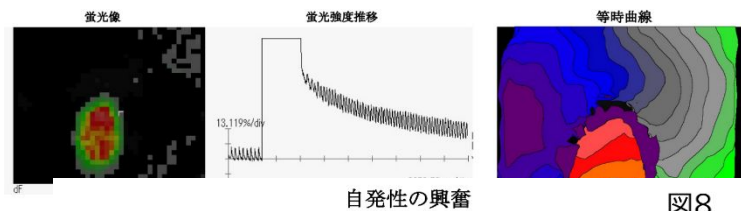


巡回性の興奮伝導

図7

-刺激頻度: 2Hz

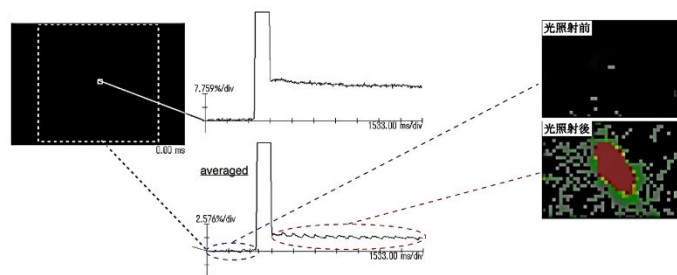
以上、ケージドCa²⁺の利用により局所的Ca²⁺過負荷を誘発でき、その結果、一定頻度刺激下ではCa²⁺興奮伝導の遅延、巡回性の興奮、自発性の興奮が見られた。なおこれらの異常は、ケージドCa²⁺非存在下では見られなかった。今後、Ca²⁺濃度やCa²⁺濃度上昇領域に依存した興奮伝導様式につきさらに詳細に検討を加え、光による不整脈の誘発・制御の可能性につき追求する。光による生物



自発性の興奮

図8

-非刺激環境下でCa²⁺アンケージ



試料の機能制御というアプローチは、心臓組織にとどまらず様々な生命機能を解析する上で革新的な研究手法として期待できる。

本研究結果の一部（HPLCによるアンケージ率の解析）はABiS 東邦大学理学部・古田寿昭教授に協力をいただいた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Tanaka H | 4. 巻 154 |
| 2. 論文標題 Fluorescence imaging of the living heart for understanding the basis of arrhythmias | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Folia Pharmacol Jpn | 6. 最初と最後の頁 171, 177 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.154.171 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tanaka H, Matsuyama T |
| 2. 発表標題 Non-uniform calcium dynamics of the atrial cells and Purkinje fibers with references to T tubules |
| 3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 田中秀央 |
| 2. 発表標題 光学顕微鏡の使い方 |
| 3. 学会等名 第43回組織化学講習会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 万井広基、田中秀央 |
| 2. 発表標題 カルシウムパラドックスによる心筋拘縮 ラット灌流心における心筋カルシウム動態と細胞構造の解析 |
| 3. 学会等名 生理学研究所研究会2018 「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 田中秀央 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 220 |
| 3. 書名 実験医学増刊「心不全のサイエンス」 | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 原田義規、田中秀央 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 学際企画 | 5. 総ページ数 232 |
| 3. 書名 組織細胞化学2018 | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 中村明宏、田中秀央 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 学際企画 | 5. 総ページ数 242 |
| 3. 書名 組織細胞化学2019 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|---|--|-----------------------------|
| 研究 分担 者 | 熊本 康昭 (Kumamoto Yasuaki) (30611727) | 大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教 (14401) | 2019年9月1日に京都府立医科大学より大阪大学へ異動 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|