

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08552

研究課題名(和文) 心筋ミトコンドリア/細胞質ATP可視化マウスによる心臓エナジェティクス解析

研究課題名(英文) Cardiac energetics analysis using myocardial mitochondrial/cytoplasmic ATP visualization mice

研究代表者

小坂橋 紀通 (Koitabashi, Norimichi)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10420093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：常に動き続ける心臓のエネルギー代謝をリアルタイムにモニターすることはこれまで不可能であった。我々はFRET蛋白質を利用してATP変動を生体で可視化できるマウスを開発した。またATPを産生するミトコンドリア特異的ATP可視化マウスも作製した。この両者のATP可視化マウスを用い、拍動状態の心臓において、ATPの産生と消費、蓄積と枯渇が、可視化でき、新たな創薬につながる可能性がある。心毒性のある薬剤で有意に心臓ATP低下を認めた。糖尿病モデルにおいて、有意に心臓ミトコンドリアATPの低下があり、糖尿病性心筋症のメカニズムとしてミトコンドリアにおけるATP 生産の低下が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎え、心不全患者が加速度的に増加している。循環器病およびその最終病態ともいえる心不全に対する病態解明と治療法の開発は、健康寿命を保つための喫緊の課題である。拍動しつづける心臓はエネルギーを持続的に必要とし、細胞の基本的なエネルギー基質であるアデノシン三リン酸(ATP)をもっとも多く必要とする臓器である。常に動き続ける心臓のエネルギー代謝をリアルタイムにモニターすることはこれまで不可能であった。我々が開発したATP可視化マウスモデルは、心臓生理学に新たな知見をもたらす、画期的な技術である。

研究成果の概要(英文)：It has been impossible to monitor the energy metabolism of the constantly moving heart in real time. We have developed mice that can visualize ATP changes in vivo using the FRET protein. We have also generated mitochondria-specific ATP visualizing mice that produce ATP. Using these two types of ATP visualization mice, the production and consumption, accumulation and depletion of ATP in the beating heart can be visualized, which may lead to new drug discovery. Significant reduction of cardiac ATP was observed with cardiotoxic drugs. In a diabetic model, there was a significant decrease in cardiac mitochondrial ATP, suggesting that decreased ATP production in mitochondria is a possible mechanism of diabetic cardiomyopathy.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：エナジェティクス 心臓生理学 ミトコンドリア

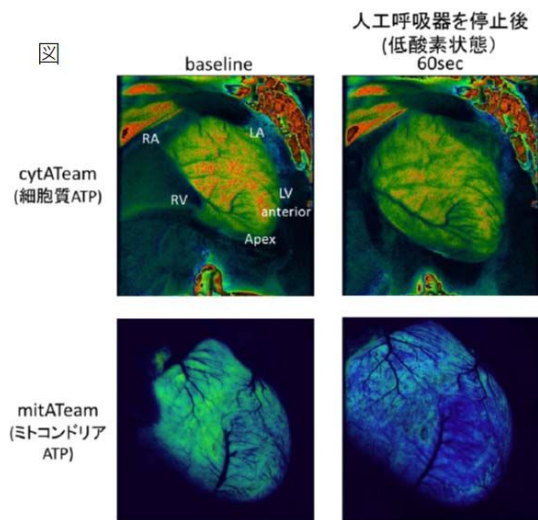
1. 研究開始当初の背景

共同研究者の山本(京都大学)は、*in vivo*でATP濃度と変動を可視化できるマウスを世界で初めて開発した(Imamura H, *PNAS* 2009, Yamamoto, M. et al. *GeneDev.* 2001, *Nature*(article). 2004)。細菌のATP合成酵素を構成するタンパク質の一つであるεサブユニットのATP存在下・非存在下での可逆的な構造変化を利用してATP測定蛍光タンパク質であるATeamは作成されているが、山本はこれまで構築されていたATeam1.03を改良し、pHに安定なGO-ATeamに応用してGO-ATeam3を構築した(unpublished data)。申請者は山本とこれまで共同研究を行い、ATP可視化マウスの心臓を、ランゲンドルフを用いず、全身麻酔、人工呼吸器管理下で、開胸による直視的観察により、生体内で拍動を続ける心臓のATPの動態の観察に成功した。吸入麻酔と麻酔薬の腹腔内投与および麻酔による鎮痛と少量の筋弛緩を用い、安定した血行動態の状態を開胸観察が可能であった。この状態で、β遮断薬による徐拍化、大動脈縮窄による血圧上昇などにより、心臓でのATP濃度の変化を観察した。その結果β遮断薬による徐拍化では心臓のATP濃度の短時間での上昇を認めた。大動脈縮窄による急激な左室内圧の上昇は左心室のATP濃度の短時間での低下を認めたが、右心室では変化がなかった。心房ペーシングでの心拍数の増加はATP濃度の低下を認めた。心筋酸素消費量は心室内圧(血圧)と心拍数で規定されていることから、心筋酸素消費量の変化をATP可視化マウスで見えるATP量の変化としてとらえられることが確認できた。

2. 研究の目的

我々はATP濃度の変化をリアルタイムで可視化できるFRET蛋白質(ATeam)に着目した。共同研究者の山本(京都大学)は、このATeamに改良を加えたGOATeamを発現する遺伝子改変マウスの作成に世界で初めて成功した。また、*in vivo*の心臓で開胸して、リアルタイムで拍動する心臓のATP濃度の変化を、時間的空間的に可視化し定量することに成功した。予備実験の結果、心筋細胞の細胞質のATPは産生と消費がタイトにコントロールされ、余剰に産生されてはいないことが推察された。そのためATP産生のみを観察するため、共同研究者の山本(京都大学)は、ミトコンドリアでのATPを特異的にモニターできる遺伝子改変マウスの作成した。このモデルは心臓特異的にミトコンドリアでのATPのみを可視化できるモデルである。この二つの動物モデルを比較検討することで、心臓におけるATP利用を、拍動し続ける心臓において、観察することができる。図は麻酔し人工呼吸器管理をしたマウスに急性低酸素(筋弛緩薬投与+人工呼吸器停止)暴露を行った際の、心臓のATPレベルの変化である。急性の低酸素1分以内に心拍数は低下し、心収縮も低下してくるが、細胞質のATPは消費が低下するため保たれる一方、ミトコンドリアのATPは心拍数の低下と同時に急速に低下しており、ATPのミトコンドリアでの産生を観察していることが分かる。

ATPの産生、消費をリアルタイムに観察できることは、後負荷や前負荷、頻脈や徐脈といった心臓の血行力学的変化に対するATPの変化、カテコラミンの心臓に対する作用、急性の虚血および虚血再灌流におけるATPの変化なども容易に観察可能である。またこのモデルと同時にコンダクタンスカテーテルを用いて心臓の収縮弛緩特性のパラメーターをリアルタイムに計測し、ATPの産生と消費と心筋収縮弛緩効率との関係を解明し、90年代に確立された心臓エナジェティクス理論の裏付けが可能となる。



3. 研究の方法

慢性心不全モデルを作成し、心臓エナジェティクスがどのように変化しているか(それとも変化していないのか)を検討する。慢性心不全モデルとしては、下記の表のモデルを予定している。これらのモデルにおいて、cytATeamとmitATeamでATPの産生と消費の関係をみるとともに、コンダクタンスカテーテルで心機能を観察し、慢性心不全における心臓エナジェティクスを検討する。

4 . 研究成果

型糖尿病モデルマウス (ob/ob マウス) を ATeam マウスと掛け合わせて、非糖尿病コントロールマウスと比較すると心臓の ATP 量が低下していることが分かった。また、ある種の糖尿病治療薬により、心臓の ATP 量が回復することが分かった (未発表)。mitoATeam でも確認しており、ミトコンドリアでの ATP 産生が糖尿病では低下しており、心筋傷害を引き起こしていることが分かった。また心機能異常を引き起こす抗がん剤や抗不整脈薬を投与すると、急性期に心臓 ATP の有意な低下を認めた。慢性期の心毒性を心臓 ATP のモニタリングで予測できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Koitabashi Norimichi, Ogasawara Riki, Yasui Ryuto, Sugiura Yuki, Matsuda Hinako, Nonaka Shigenori, Izumi Takashi, Kurabayashi Masahiko, Suematsu Makoto, Yanagita Motoko, Imamura Hiromi, Yamamoto Masamichi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Visualizing ATP Dynamics in Live Mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.06.10.143560 | 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 - |
| 1. 著者名 Kawakami R, Sunaga H, Iso T, Kaneko R, Koitabashi N, Obokata M, Harada T, Matsui H, Yokoyama T, Kurabayashi M. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Ketone body and FGF21 coordinately regulate fasting-induced oxidative stress response in the heart. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10993-4. | 査読の有無 有 |
| 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 - |
| 1. 著者名 Umbarawan Y, Kawakami R, Syamsunarno MRAA, Obinata H, Yamaguchi A, Hanaoka H, Hishiki T, Hayakawa N, Koitabashi N, Sunaga H, Matsui H, Kurabayashi M, Iso T. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Reduced fatty acid use from CD36 deficiency deteriorates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in mice. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Metabolites. | 6. 最初と最後の頁 881 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo11120881. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kawakami R, Matsui M, Konno A, Kaneko R, Shrestha S, Shrestha S, Sunaga H, Hanaoka H, Goto S, Hosojima M, Kabasawa H, Obokata M, Koitabashi N, Matsui H, Sasaki T, Saito A, Yanagita M, Hirai H, Kurabayashi M, Iso T. | 4. 巻 255 |
| 2. 論文標題 Urinary FABP1 is a biomarker for impaired proximal tubular protein reabsorption and is synergistically enhanced by concurrent liver injury. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Pathol | 6. 最初と最後の頁 362-373 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5775. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 7.Umbarawan Y, Kawakami R, Syamsunarno MRAA, Koitabashi N, Obinata H, Yamaguchi A, Hanaoka H, Hishiki T, Hayakawa N, Sunaga H, Matsui H, Kurabayashi M, Iso T | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Reduced fatty acid uptake aggravated cardiac contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77895-1. | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Furukawa N, Koitabashi N, Matsui H, Sunaga H, Umbarawan Y, Syamsunarno RAA, Yamaguchi A, Obokata M, Hanaoka H, Yokoyama T, Kurabayashi M. | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 DPP-4 inhibitor induces FGF21 expression via sirtuin 1 signaling and improves myocardial energy metabolism. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Heart Vessels | 6. 最初と最後の頁 136-146 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-020-01711-z. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Sunaga H, Koitabashi N, Iso T, Matsui H, Obokata M, Kawakami R, Murakami M, Yokoyama T, Kurabayashi M. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Activation of cardiac AMPK-FGF21 feed-forward loop in acute myocardial infarction: Role of adrenergic overdrive and lipolysis byproducts. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48356-1. | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 He J, Yamamoto M, Sumiyama K, Konagaya Y, Terai K, Matsuda M, Sato S. | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Two-photon AMPK and ATP imaging reveals the bias between rods and cones in glycolysis utility. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 FASEB J | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101121R. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto S, Yamamoto M, Nakamura J, Mii A, Yamamoto S, Takahashi M, Kaneko K, Uchino E, Sato Y, Fukuma S, Imamura H, Matsuda M, Ynagita M | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Spatiotemporal ATP dynamics during AKI predict renal prognosis. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol | 6. 最初と最後の頁 2855-2869 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2020050580. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ide Y, Horie T, Saito N, Watanabe S, Otani C, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nishino T, Nakao T, Nihiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Rodriguez RR, Xu S, Yamasaki T, Watanabe T, Yamamot M, Yanagita M, Kimura T, Kakizuka A, Ono K | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Cardioprotective effects of VCP modulator KUS121 in murine and porcine models of myocardial infarction. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci | 6. 最初と最後の頁 701-714 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2019.06.001. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Watanuki S, Kobayashi H, Sorimachi Y, Yamamoto M, Okamoto S, Takubo K | 4. 巻 514 |
| 2. 論文標題 ATP turnover and glucose dependency in hematopoietic stem/progenitor cells are increased by proliferation and differentiation. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun | 6. 最初と最後の頁 287-294 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.123. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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 | 倉林 正彦 (Kurabayashi Masahiko) (00215047) | 群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 山本 正道 (Yamamoto Masamichi) (70423150) | 国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任 部長 (84404) | |

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 |
|---------|---------|
| | |