

心臓エナジエティクスからの心疾患の解明

山本正道

群馬大学 先端科学的研究指導者育成ユニット

【研究の背景】

心臓は全ての動物の生命活動の中核となっている臓器である。ヒトにおいて、特に先進国では心疾患は主要な死亡原因の一つである。心疾患の診断や解析は臨床では心電図・超音波検査・CT 検査・MRI 検査・心臓カテーテル検査など、基礎では生化学的方法・電気化学的方法などいずれも心臓全体を組織・部位として捉えた低解像度の空間を時間軸に沿って解析するに留まっている。そのため、左室駆出率の低下などにおける原因細胞の特定は不可能であった。これは心臓を構成する各細胞レベルの機能としてエネルギー増減・カルシウム(Ca^{2+})濃度・電位変化などを高解像度かつ高速反応で検出する方法が開発されてこなかったためである。

近年、遺伝子組換え型蛍光 Ca^{2+} プローブの開発により Ca^{2+} 濃度の側面から心臓全体を 1 細胞毎に高解像度で解析する方法が試されている。しかし、マウスの心臓は 1 秒間に約 7 回拍動するため、既存の Ca^{2+} プローブが高速に反応する事で Ca^{2+} 濃度変化を正確に捉えられるかは不明である。

2009 年に開発された ATP 濃度を可視化するプローブ(ATeam)は細菌の ATP 合成酵素を構成する蛋白質の一つである ε サブユニット(ATP 結合タンパク質)を介して GFP と KusabiraOrange を結合させて作成されている。これは ATP 濃度が上昇すると ε サブユニット部分が構造変化して GFP を励起する 488nm の光を当てても GFP から KusabiraOrange への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こり、GFP 由来の蛍光が減少して KusabiraOrange 由来の蛍光が主に発せられるようになる。これを用いる事で高解像度にエネルギー増減を計測できる。

更にこれまで私達が解析してきた心中隔欠損を含む先天的心奇形(Yamamoto, M. et al. *Development*, 2003)、虚血、心圧負荷(初期・後期)、心肥大、心筋梗塞、拡張型心筋症は形態的・生化学的方法により心臓の総合的な機能異常が解析されるだけで、個々の細胞の機能に時空間軸を取り入れた解析は不可能であった。

【目的】

ATP センサーである ATeam を利用して高解像度・高速反応かつ定量的に ATP を測定できる ATeam を開発した。そこで、これを用いてマウス生体内で細胞質内の ATP 変動を 1 細胞毎に測定できるシステムを構築している。このマウスで正常、生理学的負荷や病的負荷時における心臓の生理的機能をエネルギーの側面から高解像度・高速反応かつ定量的に解明する。

【方 法】

① まるごとの拍動心の *in vivo* での観察

このマウスを麻酔下に開胸し、拍動している *in vivo* の心臓を直接観察し、心臓の経時的 ATP 濃度変化を *in vivo* で観察する。心電図や、カテーテルによる心機能計測をしながら、心臓の ATP 動態を観察することが可能で、高度な時間、空間分解能で、かつ定量的に、心臓まるごとの心機能とエナジエティクスを評価する。

② 単離心筋細胞での観察

このマウスの心臓からランゲンドルフ灌流によるコラゲナーゼ処理を行い、心筋細胞を単離する。単離心筋細胞を電気的に刺激し、収縮弛緩と ATP の動態を観察する。

【結 果】

心電図及びカテーテルにより心機能が正常であることを確認した後に、心臓が拍動する時の ATP 動態を 50~100 フレーム/秒のスピードで画像取得した。このデータをメタモルフにて解析を行った結果、心臓の弛緩と収縮時に ATP 量の増減が観察された。またこの増減は心室よりも心房において大きく観察された。更に、心室内でも部位毎に ATP 量の増減幅とタイミングが異なっている事も明らかとなってきた。現在、この詳細を観察中である。

単離心筋細胞での ATP 動態を外部からの電気刺激を行う事で観察した。電気刺激は 1 pulse/sec~3 pulse/sec の強度で行った。こちらも 30~50 フレーム/秒で画像を取得した後にメタモルフ及び ImageJ を用いて ATP 量の増減と面積の変化を詳細に調べた。その結果、心臓と同様に弛緩と収縮時に ATP 量の増減が観察された。

【考 察】

マウス心臓における ATP 動態を臓器及び単離心筋細胞にて詳細に調べることのできるシステムが構築された。しかし、実際に心房や心室のどの領域でどのタイミングで ATP がどの程度増減しているのか。またその増減が筋収縮活動にどのような影響を及ぼしているのかの詳細は不明である。これまで *in vitro* においてミオシン-アクチンの滑り運動時における ATP 加水分解反応は非常によく調べられており、その反応過程にクレアチニン酸シャトルの関与も示されている。これらの知見と今回得られた知見の共通点を見出して調べることにより、*in vitro* の現象を臓器レベルまでつなげて説明することができる可能性があると推測される。また近年、スーパーコンピューター京を用いて心臓の拍動運動をシミュレーションするプロジェクトが進んでいるが、今回得られたデータを加える事により、更にシミュレーションの精度を上げられる可能性があると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで心臓の臓器としての拍動は電位の変化でしか捕らえられてこなかったが、それよりも収縮運動に最も近い所での変化を捉える事に成功したと考えられる。これを活かすことで、心臓の生理学や疾患薬理学の新たな進展が見込まれる。

【参考・引用文献】

1. Imamura, H., Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T. and Noji, H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009, 106 (37): 15651-15656.
2. Nakano, M., Imamura, H., Nagai, T. and Noji, H. Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level. ACS Chem. Biol. 2011, 6 (7): 709-715.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、先端医薬研究振興財団より研究助成を賜りました事を心より感謝申し上げます。