

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－

研究成果報告書（追加助成）〈概要〉

所 属	京都大学 大学院医学研究科 腎臓内科学
氏 名	山本正道
研究テーマ	エネルギー代謝可視化による心疾患の解析

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

〈研究目的〉

心疾患は主要な死亡原因の一つである。その理由の一つは、心疾患の診断や解析が心臓全体を組織・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事である。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+})濃度や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。

2009 年に ATP 濃度を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の機能を用いて可視化する蛍光プローブ(ATeam)が開発された。これまでに、ATeam を応用して高解像度・高速反応かつ定量的に ATP を測定できる ATeamを開発し、これをマウスへ組み入れることにより、心臓が拍動した時に ATP 量が変わる事を観察してきた。本研究では、このマウスを利用して単離心筋細胞がとる収縮率と ATP 消費量率の相関性を明らかにする。

〈研究手法〉

成熟心筋細胞は ATP 濃度と変動を可視化できるマウス(ATP 可視化マウス)の成体心臓から単離してくる。成熟心筋細胞を単離してくるため、まず、この ATP 可視化マウスの成体 8 週齢マウスにヘパリンを腹腔注射した後に心臓を摘出する。心臓はランゲンドルフ灌流でコラゲナーゼを含む modified Tyrode 溶液を 20 分灌流。ハサミで小片とし、100 μm のメッシュで濾過した後にカルシウム濃度を 0.25mM から 1mM へ徐々に上昇させながら静置によりダメージのある細胞を取り除き、健全な単離心筋細胞を得る。心筋細胞の電気刺激はガラス底ディッシュに銀線電極と灌流用チューブを備え付けた特殊チャンバーを用いて行う。銀線電極は電気刺激装置(SD9 square pulse stimulator)を用いて、1 秒間に 1 回から 6 回の頻度で電気刺激を与える。灌流液は MEM に Hepes で調整した液に Insulin-Transferrin-Selenium supplement を加えて 95%酸素飽和した培養液を用いる。心筋細胞の収縮-弛緩と ATP 量の変動の観察は ATP 可視化マウスから単離してきた成熟心筋細胞を入れた特殊チャンバーを倒立顕微鏡に装着して 488nm で励起させた後に、Dual-View を通して 540nm で分光し、吸収フィルタ 515/30nm と 575/40nm で GFP と Kusabira Orange の画像を CCD カメラ ORCA-Flash4.0 で得る。画像取得速度は 30~100 フレーム/秒で行う。得られた画像は ImageJ を用いて面積の変化率と ATP 量の変化の両方を数値化する事で比較検討を行う。

〈研究成果〉

ATP 可視化マウスのマウス胎生期 14 日の胚からマウス繊維芽細胞を樹立後に ATP 濃度依存性を検討したところ 0.1~6mM の ATP 量に対して誤差範囲は約 4.5%以下の直線的に FRET Ratio 値が変化した。これより、蛍光の値から ATP 量を非侵襲的に定量できる事が示された。同様に、ATP 可視化マウスから成熟心筋細胞を単離してきた後に、顕微鏡下で電気刺激を行い、心筋細胞の収縮-弛緩と ATP 量の変動の観察を行った。その結果、収縮率が上昇するほど ATP 量変動が大きくなる事が示された。また、正常心筋細胞における筋収縮のエネルギー効率は約 59.4[%/mM] である事が導き出された。

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	京都大学 大学院医学研究科 腎臓内科学
氏 名	山本正道
研究テーマ	エネルギー代謝可視化による心疾患の解析

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

<研究目的>

心疾患は主要な死亡原因の一つである。その理由の一つは、心疾患の診断や解析が心臓全体を組織・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事である。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+})濃度や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。

2009 年に ATP 濃度を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の機能を用いて可視化する蛍光プローブ(ATeam)が開発された。これまでに、ATeam を改良する事で高解像度・高速反応かつ定量的に ATP を測定できる新規 ATP センサーである ATeam を開発に成功してきた。更に、これをマウスへ flox 型にてノックインする形で組み入れることにより、世界で初めて細胞質内の ATP 量を定量的・経時的・高解像度・高速で計測できるマウス開発に成功した。このマウスを用いると、心臓が拍動した時に ATP 量の変動する事が明らかとなった。そこで、本研究では、この成熟した ATP 可視化マウスを利用して単離成熟心筋細胞を in vitro で電気刺激により収縮運動を起こしたときの収縮率と ATP 消費量率の相関性を明らかにする。

<研究手法>

初代繊維芽細胞は ATP 濃度と変動を可視化できるマウス(ATP 可視化マウス)のマウス胎生期 14 日の胚を培養液下で切り刻んだ後に Collagenase 処理を行って細分化した後に培養する事で得る。この繊維芽細胞に黄色ブドウ球菌由来の α トキシンを permilization buffer 内で処理する事で培養液中の ATP が細胞質内へ侵入できるようにする。Calculation buffer 中の ATP 量を MgATP を変化させる事で 0 から 20mM までの ATP 量と、その時に細胞が発する蛍光を計測する。

受精卵は ATP 可視化マウス同士を交配 2 日後に卵管から 2 細胞期の受精卵を M16 培養液にて flash out する事で得る。得られた受精卵はフェノールレッドフリーの M2 培養液内で培養しながら、培養液に解糖系と電子伝達系の阻害剤である 2-Deoxy-Glucose と Olygomycin を添加する事で ATP の産生を抑制し、細胞質内 ATP 量が低下する過程を蛍光顕微鏡で撮影する。また、その際に、3 分毎に受精卵を採取し、Luciferase 法にて細胞質内に存在する ATP 量を計測する。

成熟心筋細胞は ATP 可視化マウスの成体心臓から単離してくる。成熟心筋細胞を単離してくるため、まず、この ATP 可視化マウスの成体 8 週齢マウスにヘパリンを腹腔注射した後に心臓を摘出する。心臓はランゲンドルフ灌流でコラゲナーゼを含む modified Tyrode 溶液を 20 分灌流。ハサミで小片とし、100 μm のメッシュで濾過した後にカルシウム濃度を 0.25mM から 1mM へ徐々に上昇させながら静置によりダメージのある細胞を取り除き、健全な単離心筋細胞を得る。心筋細胞の電気刺激はガラス底ディッシュに銀線電極と灌流用チューブを備え付けた特殊チャンバーを用いて行う。銀線電極は電気刺激装置(SD9 square pulse stimulator)を用いて、1 秒間に 1 回から 6 回の頻度で電気刺激を与える。灌流液は MEM に HEPES で調整した液に Insulin-Transferrin-Selenium supplement を加えて 95%酸素飽和した培養液を用いる。心筋細胞の収縮-弛緩と ATP 量の変動の観察は ATP 可視化マウスから単離してきた成熟心筋細胞を入れた特殊チャンバーを倒立顕微鏡に装着して 488nm で励起させた後に、Dual-View を通して 540nm で分光し、吸収フィルタ 515/30nm と 575/40nm で GFP と Kusabira Orange の画像を CCD カメラ ORCA-Flash4.0 で得る。画像取得速

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

度は 30~100 フレーム/秒で行う。この画像を画像解析ソフト metamorph を用いて 2 画像に分離した後に、IMD イメージの Ratio 画像へ変換する。更に、画像解析ソフト ImageJ により、各画像を 2 値化することで ROI を設定し、収縮-弛緩時の面積と平均輝度値の変化を数値化する。これを利用して、面積の変化率と輝度値から ATP 量の変化率を求める。

<研究成果>

ATP 可視化マウスのマウス胎生期 14 日の胚からマウス繊維芽細胞を樹立後に ATP 濃度依存性を検討した。繊維芽細胞に黄色ブドウ球菌由来の α トキシンを処理する事で培養液中の ATP が細胞質内へ侵入できるようにして、培養液中の ATP 量を MgATP を加える事で変化させた。この時の細胞質内の蛍光変化を計測したところ 0.1~6mM の ATP 量に対して誤差範囲は約 4.5%以下の直線的に FRET Ratio 値が 0.4 から 2.0 へ変化した。

更に、異なる材料・方法でも同様に蛍光変化から ATP 量を導き出す事が可能かを検討した。ATP 可視化マウスから受精後 2 日目の受精卵を採取し、培養液に解糖系と電子伝達系の阻害剤である 2-Deoxy-Glucose と Olygomycin を添加する事で ATP の産生を抑制し、細胞質内 ATP 量が低下する過程を蛍光顕微鏡にて観察した。この蛍光の経時的变化を繊維芽細胞の実験で得られた蛍光と ATP 量の関係を調べた検量線を用いて ATP 量へ変換した。この ATP 量と経時的变化をグラフにした。同時に、阻害剤添加後 3 分毎に受精卵を採取し、Luciferase 法を用いて ATP 量を調べる事で細胞質内の ATP 量の経時的变化をグラフにした。以上の 2 つの実験で得られたグラフは類似していた。

以上の初代繊維芽細胞の実験結果および受精卵の実験結果から ATP 量を蛍光の値から非侵襲的・定量的・経時的・高解像・高速で計測できる事が示された。

次に ATP 可視化マウスから成熟心筋細胞を単離してきた後に、顕微鏡下で電気刺激を行い、心筋細胞の収縮-弛緩と ATP 量の変動の観察を行った。その結果、収縮率が上昇するほど ATP 量変動が大きくなる事が示された。また、正常心筋細胞における筋収縮のエネルギー効率 は約 59.4[%/mM]である事が導き出された。

<研究の考察>

今回、世界で初めてマウス生体内における細胞質内 ATP 量を全身・全臓器・全細胞にて非侵襲的・定量的・経時的・高速・高解像で計測できるマウス開発に成功した。このマウスを用いれば、心筋細胞の筋収縮時におけるエネルギー効率を計測する事ができる事から、心不全を初めとする心疾患をエネルギー効率の側面から検討する事ができる。更に、心保護薬や心機能改善薬などに関しても同様にエネルギー効率上昇などの検討ができる可能性がある。

ATP 動態が直接機能に結びつくと考えられる骨格筋でも心筋細胞の解析が有用と考えられる。これまでに、骨格筋細胞も単離し、心筋細胞と同様に電気刺激を起こすと収縮-弛緩と同時に ATP 量変動が観察された。また、坐骨神経を電気刺激する事で前頸骨筋の収縮運動を起こすと、前頸骨筋での ATP 動態が観察された。この実験システムを用いれば、心筋細胞と同様に骨格筋の疾患を ATP の側面から定量的に解析する事ができる可能性を示している。また、同様に骨格筋の治療薬や治療方法の開発・向上にも寄与できる可能性がある。更には、疲労や改善だけでなく筋機能向上などにも利用できる可能性がある。

更に、マウス全身での ATP 動態を調べる事ができる事から、代謝の側面から臓器連関などを non-targeted に探索できる可能性もある。

<今後の課題>

今回、単離心筋細胞での収縮-弛緩と ATP 動態の関係性を計測する事ができる事を示してきた

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

が、今後はこれを様々な疾患や治療薬など応用面でも有用である事を示して行く必要がある。更には、他臓器での ATP 動態を調べる事で、単なる ATP 量の計測に留まらず、機能を代謝変化により計測できるという事を示して行く必要があると考えられる。

更に、高解像で計測する事により、各細胞種で ATP 量がどのように変動するのかを計測する事は、機能と ATP 量の関係を細胞の機能に展開できる可能性がある。また、細胞質内の分布や細胞小器官レベルでの観察も顕微鏡のレンズ次第で可能である事から、ATP の産生と消費の関係を時空間情報を交えて詳細に調べて行く事も非常に重要である。

また、今回は細胞質内の ATP 量の変化を計測できるマウスを用いて心筋細胞における ATP 動態と機能を検討してきたが、ATP センサーをミトコンドリアや小胞体、核、クロマチン近傍または細胞外だけなどに存在するように設計する事で、新たな ATP の機能や役割を明らかにできる可能性がある。これらにも取り組んで行きたい。

<謝辞>

本研究は京都大学大学院生命科学研究科 今村博臣博士から第一世代 ATP センサーを供与して頂いた事から可能になった研究である。この場をお借りして深く御礼申し上げたい。また、公益財団法人 MSD 生命科学財団には長期にわたり研究費だけでなく、研究室訪問により研究者の声も拾い上げて頂きました。この場をお借りして深謝申し上げます。

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	京都大学 大学院医学研究科 腎臓内科学
氏 名	山本正道

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Miyazawa, H., <u>Yamamoto, M.</u> , Yamaguchi, Y. and Miura, M. Mammalian Embryos Show Metabolic Plasticity Towards the Surrounding Environment During Neural Tube Closure. <i>Genes to Cells</i> 9: 794-802 (2018)
2	Nakano, M., Imamura, H., Sasaoka, N., <u>Yamamoto, M.</u> , Uemura, N., Shudo, T., Fuchigami, T., Takahashi, R. and Kakizuka, A. ATP Maintenance via Two Types of ATP Regulators Mitigates Pathological Phenotypes in Mouse Models of Parkinson’s Disease. <i>EBioMedicine</i> 22: 225-241 (2017)
3	
4	
② <論文 PDF 添付なし>	
1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2018年11月29日	第41回日本分子生物学会, 山本正道, マウス生体内における ATP 動態
2	2018年9月9日	第73回日本体力医学学会, 山本正道, マウス生体内における ATP 動態
3	2018年8月10日	第4回日本筋学会, 山本正道, マウス生体内における ATP 動態
4	2018年3月10日	第6回骨格筋生物学研究会, 山本正道, マウス生体内における ATP 動態
5	2018年2月1日	新技術説明会, 山本正道, 画期的な生体内 ATP 濃度の計測技術
6	2017年12月4日	ERATO/AMED-CREST/さきがけ 合同国際シンポジウム, 山本正道, Visualizing Spatiotemporal and Quantitative Dynamics of ATP Levels in Mouse
7	2017年5月21日	Cell Symposia: Exercise Metabolism, 山本正道, Visualizing Spatiotemporal and Quantitative Dynamics of ATP Levels in Mouse
8	2016年9月9日	第88回日本遺伝学会, 山本正道, マウス生体内における ATP 動態の可視化
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿中	Cell Metabolism
2	投稿中	Cell Metabolism
3		
4		
