

..., $y_4(k)]^T$ を検出ベクトルと呼ぶこととする。

データベクトル $x(k)$ を説明変数とし、検出ベクトル $y(k)$ を目的変数とする重回帰モデルを

$$y(k) = Ax(k) + e(k) \quad (2)$$

で表す。ここで、 A は $4 \times m$ 行列であり、 4×1 ベクトル $e(k)$ は残差である。

本研究では、指標の数を $m=14$ 、データ窓の個数を $K=400$ として、最小二乗法により (2) 式の重回帰モデルの係数行列 A を計算した。

運用時には、逐次的に計算した各指標から作られる $x(k)$ を、(2) 式で $e(k)=0$ としたモデルに入力し、SR, SVT, VT, および VF に対応する 4 つの目的変数 $y_i(k)$ の推定値として検出結果ベクトル $\hat{y}(k)$ を計算する。それらの中の最大値に対応する心調律の番号 i を、その時の心調律の種類として判定する。

全部で W 個のデータ窓から無作為に K 個のトレーニングデータを選択し、重回帰モデルの推定に用いた。なお、 $W-K$ 個のデータはテストデータとして、推定された重回帰モデルの妥当性を検証するために用いた。

2.3 心内心電図に基づく指標

本研究では、重回帰モデルの入力として、先行研究 [9] と同様、以下に示す 14 個の特徴量を用いたが、計算アルゴリズムを変更することで高速化を図った。

1) ヒストグラムに基づく指標 (Histogram)

心房と心室での心電図信号の独立性を指標として利用するために、2 種類の心電図に対して、5 個 \times 5 個のビンで表される 2 次元のヒストグラムである同時度数分布を求め、そこから Pearson の χ^2 統計量を計算した [8]。また、2 つの心電図信号の不規則性を標準偏差 σ で評価した。

本研究では、左心室内心電図 $IECG_{LV}$ と右心室内心電図 $IECG_{RV}$ 、および右心房内心電図 $IECG_{RA}$ と右心室内心電図 $IECG_{RV}$ の組み合わせに対して、それぞれ χ^2 統計量および σ を求めた。

2) 心周期に基づく指標 (Period)

心電図から得られる一般的な指標として心周期の算出を行った。従来法では、心電図にノイズが多く含まれた場合でも R 波が検出できるように、自己相関関数から算出する方法を用いてきたが、本研究では乗算の計算量を考慮して、心電図信号の一次微分の値を用いて R 波を検出し、心周期を求めた。

$IECG_{LV}$ 、 $IECG_{RV}$ および $IECG_{RA}$ からそれぞれの心周期 $Period_{LV}$ 、 $Period_{RV}$ および $Period_{RA}$ を算出した。さらに、 $Period_{RV}$ とそれ以外の心周期との比として $Period_{LV}/Period_{RV}$ と $Period_{RA}/Period_{RV}$ を算出した。

3) 相対的遅れ時間による指標 (Delay)

2 つの心電図における相対的な遅れ時間を指標として算出した。従来法では、2 つの心電図間の相互相関関数を用いて算出していたが、本研究では Period の算出時に得ら

れる R 波の時間情報を用いることで計算時間を節約した。

$IECG_{RV}$ を基準信号とし、 $IECG_{RA}$ から $IECG_{RV}$ までの遅れ時間および $IECG_{RV}$ から $IECG_{LV}$ までの遅れ時間を指標として用いた。

4) 心電図の同時分布に基づく複素数平面から得られる指標 (Complex)

2 つの心電図をそれぞれ実部と虚部とする複素数と見なし、その偏角と絶対値に関する指標を求める。いま複素数 Z を

$$Z = IECG_{RV} + i \cdot IECG_{LV} \quad (3)$$

と定義する。ここで i は虚数単位である。

Z の偏角のうち、第 1 四分位点と第 3 四分位点をそれぞれ指標として求めた。ただし、四分位点の算出には中央値ではなく平均値を用いることで、近似的に求めた。また、脱分極の長さを

$$|Z| > 0.05 \cdot \max_{\text{心周期内}} |Z| \quad (4)$$

となるサンプル点の個数で近似し、指標とした。なお、偏角の算出に必要な逆正接 (arctan) 演算については、計算時間の短縮のために、ライブラリ関数を用いずにルックアップテーブルを用いて行った。

2.4 時系列解析を用いた不整脈検出

先行研究 [9] における不整脈の分類方法では、窓ごとの分類であるため、臨床的に不自然な判定がされる場合がある。例えば、SR と判定された窓が連続する中、一つだけ VF と判定される窓があるということが起こりうる。そこで、本研究では、ある判定対象である k 番目の窓に対して、その窓から過去 n 個の窓の情報を用いることで、臨床的により妥当な判定を行う方法を提案する。

一つの方法として、判定対象の窓において、過去 n 個の判定結果との多数決関数を用いる方法が考えられる。この方法により、判定結果が急激に変化するような誤判定を減らすことが可能であると推察される。

他の方法として、検出結果ベクトルの値 $\hat{y}(k)$ の移動平均を算出し、判定を行う方法が考えられる。これにより、現在の判定結果に対して過去の判定結果の影響を及ぼすことで、誤判定を減らすことができると推察される。

2.5 検出性能の評価方法

高速化を図った提案アルゴリズムの有効性を評価するために、 $W=5221$ 個のデータ窓から、無作為に $K=400$ 個の窓で区切られたトレーニングデータを選択し、残りの 4821 個のデータはテストデータとして心調律の分類を行った。さらに、提案方法のロバスト性を評価するため、この操作を 100 回繰り返した。

トレーニングデータによって得られた重回帰モデルの分類性能の評価を行うため、テストデータの分類結果におけるそれぞれの心調律の感度と特異度を算出し、ROC (receiver operating characteristic) 曲線における曲線下

の面積 ROCA (area under the ROC) を算出した。ROCA はその値が 1 に近いほど、分類器としての有効性が高いといえる評価基準である。ROC 曲線のグラフは、2 値分類システムにおいて、縦軸が感度 (*Sensitivity*)、横軸が 1-特異度 (*Specificity*) で表される。*Specificity* と *Sensitivity* はそれぞれ

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN+FP} \quad (5)$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (6)$$

のように定義される。ここで、*TN* は true negative (真陰性) のデータの個数、*FP* は false positive (偽陽性) のデータの個数、*TP* は true positive (真陽性) のデータの個数、*FN* は false negative (偽陰性) のデータの個数を表す。

まず、高速化を図った提案アルゴリズムの有効性を検証するために、ROCA の値を用いて先行研究のアルゴリズムとの比較を行った。

次に、時系列解析を用いた不整脈検出性能の評価では、高速化を図った提案アルゴリズムにおける重回帰モデルを用いて検出結果ベクトルの値を算出した後、時系列解析を適用することで心調律を判定し、特異度および感度を算出した。

2.6 ICD への実装化

提案アルゴリズムの ICD への実装化について、計算時間の面から有用性の検証を行った。

ICD に実装するアルゴリズムについて、計算時間を考慮し、次のような構成とした。重回帰モデルの推定には多くの計算時間が必要であるため、パーソナルコンピュータ (PC) 上で MATLAB を使い、オフラインでモデル推定を行うものとした。実用上は、PC を用いて推定した重回帰モデルの係数をもとに、ICD 上で心調律の分類を行えばよい。そのため、ICD に実装する箇所は、心内心電図から 14 個の指標を計算する部分および重回帰モデルの係数を用いて心調律の分類を行う部分とした。

ICD への実装を検証するために、低消費電力で動作するマイコンとして MSP430 (テキサス・インスツルメンツ社) を用いた。また、開発環境として、Code Composer Essentials v3.1 (テキサス・インスツルメンツ社) を使用し、C 言語によるアルゴリズムの実装を行った。計算時間に関しては、Code Composer Essentials のデバッグ機能を用いることで検証を行った。

実装用に求められる仕様として、動作周波数 12 MHz のもとで、計算時間は、1 つの窓から次の窓までのシフト時間である 0.2 s をもとに、その半分の時間である 0.1 s 以下とした。

3. 結 果

先行研究[9]のアルゴリズムを用いて分類を行った場合と提案方法を用いて分類を行った場合の、ROCA の平均値および分散による評価の比較結果を図 2 に示す。図中では、先行研究のアルゴリズムを Previous algorithm、Previous algorithm から Period と Delay の算出方法と Complex の算出方法を変更したものを Proposed algorithm として示した。ただし、4 つの心調律への分類のうち、SR と SVT についてはいずれの場合でも ICD が作動しないため同じカテゴリーとして分類した。

次に、検出結果ベクトルの値に対し、多数決関数を用いたときの判定結果と移動平均を用いたときの判定結果における特異度の比較を図 3、感度の比較を図 4 に示す。ここで、Proposed algorithm において、心調律が正しく検出されるまでの時間が最大で 1.22 s であったため、多数決および移動平均を行う窓の個数を判定対象の窓を含めて 1.4 s 分、すなわち $n=2$ とした。

次に、提案アルゴリズムのうち、指標の算出部分と判定出力部分を MSP430 に搭載したところ、1 つの窓におけるそれぞれの指標の計算時間は表 2 のようになった。全指標の計算時間は約 56 ms であり、時系列解析を含む判定出力部分の計算時間は 1 ms 未満であったため、合計で約 56 ms であった。

4. 考 察

図 2 より、先行研究のアルゴリズムに比べて、ICD への実装化を考慮し高速化を図った提案アルゴリズムのほう

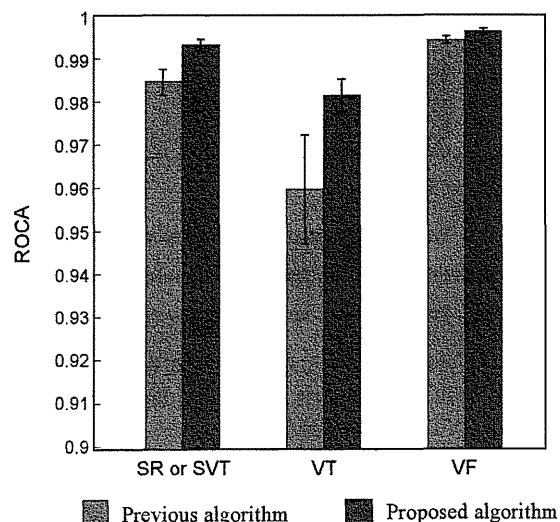


図 2 指標の計算アルゴリズムを変更して心調律の分類を行ったときの ROCA の比較。分類対象は左から、SR or SVT、VT および VF である。

Fig. 2 Classification of cardiac rhythms, which shows ROCA of SR or SVT, VT, and VF, in varying the algorithm of calculating indices.

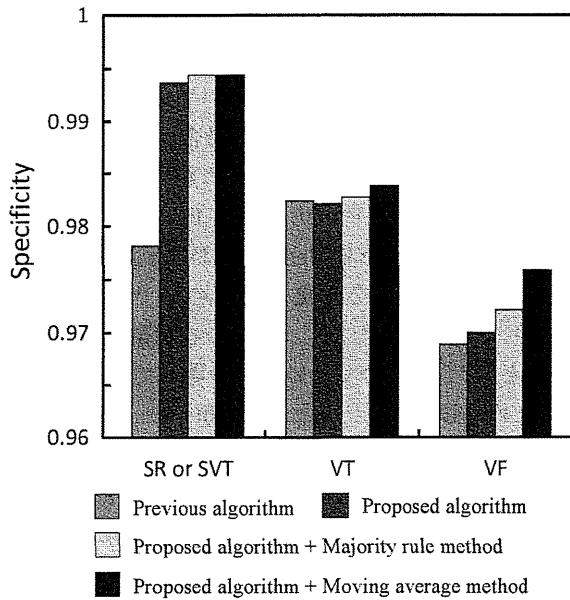


図 3 時系列解析を加えて心調律の分類を行ったときの従来法との特異度の比較。分類対象は左から、SR or SVT, VT および VF である。

Fig. 3 Classification of cardiac rhythms, which shows Specificity of SR or SVT, VT, and VF, in varying the algorithm of calculating indices and applying time series analysis.

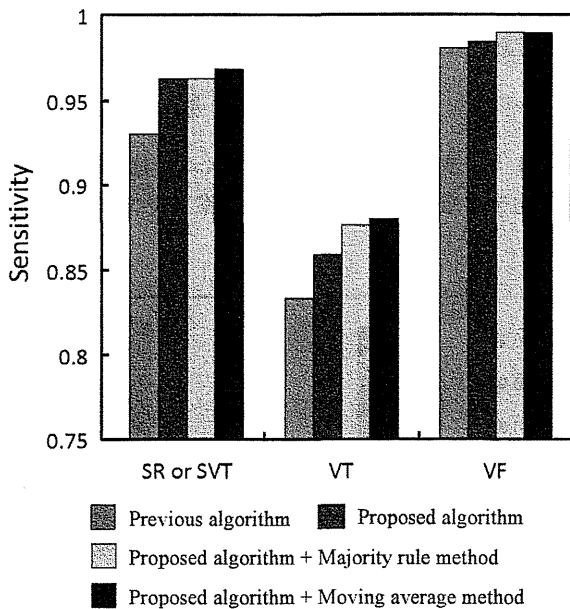


図 4 時系列解析を加えて心調律の分類を行ったときの従来法との感度の比較。分類対象は左から、SR or SVT, VT および VF である。

Fig. 4 Classification of cardiac rhythms, which shows Sensitivity of SR or SVT, VT, and VF, in varying the algorithm of calculating indices and applying time series analysis.

が、検出性能が高く、ROCA の値として 0.98 以上であった。特に、心周期 (Period) と遅れ (Delay) を算出するアルゴリズムについて、相関関数を用いた従来法では、

100 ms 以内という計算時間の仕様を満たすことが困難であることが確認されており、心電図の一次微分の値を用いて R 波を検出する方法のほうが有用であると考えられる。ただし、ICD への実装の際には、体動などのノイズによる R 波を誤検出する可能性があるため、アナログ回路によるフィルタの導入といった対策を今後検討する必要がある。

図 3, 図 4 より高速化を図ったアルゴリズムに加えて、時系列解析を用いることで、さらに検出結果における特異度と感度の上昇が確認された。特に、移動平均を用いた方法では、VT, VF の特異度と SR or SVT の感度の上昇が特徴的であった。この結果より、誤判定による ICD の誤作動を減少させる方法として有用であると考えられる。

一方、多数決関数を用いた方法においても、SR or SVT の特異度や VF の感度などの上昇が見られたが、移動平均を用いた方法ほど大きくはなかった。これは、移動平均を用いた方法では検出結果ベクトル $\hat{y}(k)$ の値を用いた解析方法であるのに対し、多数決関数を用いた方法では、分類結果そのものを用いた解析方法であるため、差異が生じると考えられる。これは、 $\hat{y}(k)$ の最大値の大きさによって分類の信頼性が変わってくるのが原因であると考えられる。提案法では (0, 1) の二値分類であるため、推定値 $\hat{y}(k)$ の最大値が 1 に近いときの分類結果の方が信頼性は高く、誤検出の可能性が低くなる。この特徴から、移動平均を用いた方法では、 $\hat{y}(k)$ の値の更新を行うため、信頼性の低い、すなわち最大値が小さな値も更新するので、信頼性の改善が望める。一方、多数決関数を用いた方法では、 $\hat{y}(k)$ の値そのものではなく、そこから得られる分類結果を用いているため、移動平均を用いた方法に比べて不利であると推察される。

マイコンを用いた計算時間の評価に関しては、表 2 の結果より、約 56 ms という計算時間は求められる仕様の約 60% であることがわかる。この結果から、提案アルゴリズムでは、不整脈の早期検出が可能となり、心調律の監視時における電力消費を抑えることができる。また、仕様に対して余裕があるため、今後のアルゴリズムの改良に伴う計算量の変化に対して柔軟に対応できると考えられる。

以上のように、高速化・高精度化を図った提案アルゴリズムの ICD への実装は有効性が高いと考えられる。一方で、次のような問題点を抱えている。本研究で分類の対象とした不整脈は、種類が限定的であり、データ数も十分とは言えない。そのため、今後は誤検出を誘発する可能性のある不整脈やより多くの不整脈データを取得し、アルゴリズムの有効性を検証する必要がある。

さらに、ヒトを対象とした実用面では次のような問題点を抱えている。本研究では 3ch の心内心電図データを用いているが、デバイスの仕様等で 2ch のデータしか得られない場合、重回帰モデル推定用の指標をすべて計算する

表2 指標を算出するために必要な計算時間
Table 2 Computational time of calculating indices.

| Index | Histogram | Period | Delay | Complex |
|------------------------|-----------|--------|-------|---------|
| Computational time[ms] | 18 | 5 | <1 | 32 |

ことはできない。そのため、先行研究[9]の結果が述べているように、指標の個数の減少により、約1~10%程度ROCAの値が低下する可能性がある。それゆえ、検出性能を保つためにさらなるアルゴリズムの変更が必要となると考えられる。

5. おわりに

本研究では、心内心電図から得られる複数の指標を用いた重回帰モデルを用いて4つの心調律(SR, SVT, VT, VF)に分類する方法において、従来法のアルゴリズムから高速化を図ったアルゴリズムへと変更を行っても、検出性能を低下させることなく実装可能であることが示された。さらに、ICDへの実装を想定したマイコン上で、提案アルゴリズムを約56msの計算時間によって実現できることが示された。

今後は、計測環境におけるアルゴリズムの変更の影響を検証する必要がある。さらには、不整脈の種類やデータ数を増やしての検証、ヒトを対象としたICDへの実装化に向けた心内心電図のチャンネル数を変更させたときの提案方法の有効性の検証、さらなる高精度化を目指したアルゴリズムの提案などを行うことが重要であると考えられる。

文 献

1. 笠貫宏: 植込み型除細動器(ICD)の歴史. 日本心臓ペースング・電気生理学学会, 植込み型除細動器調査委員会編, 植込み型除細動器の臨床. 医学書院, 東京, 1998, p. 1.
2. 杉本恒明: 突然死と不整脈. 杉本恒明編, 不整脈学. 南江堂, 東京, 1992, pp. 12-14.
3. Bayes de Luna A, Coumel P, Leclercq JF: Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases. *Am Heart J.* **117**(1): 151-159, 1989.
4. Mirowski M, Mower MM, Reid PR: The automatic implantable defibrillator. *Am Heart J.* **100** (6), pt. 2: 1089-1092, 1980.
5. 大西哲, 笠貫宏: ICDの原理と構造. 田中茂夫編, 心臓ペースメーカー・植込み型除細動器. メジカルビュー社, 東京, 2001, pp. 154-171.
6. Aliot E, Nitzsche R, Ripart A: Arrhythmia detection by dual-chamber implantable cardioverter defibrillators. A review of current algorithms. *Europace.* **6**: 273-286, 2004.
7. Nanthakumar K, Paquette M, Newman D, Deno DC, Malden L, Gunderson B, Gilkerson J, Greene M, Heng D, Dorian P: Inappropriate therapy from atrial fibrillation and sinus tachycardia in automated implantable cardioverter defibrillators. *Am Heart J.* **139**: 797-803, 2000.
8. Yoshizawa M, Kinoshita H, Sugai TK, Shimizu K, Inagaki M, Sugimachi M, Sunagawa K: Detection algorithm of

fatal Arrhythmias for implantable cardioverter defibrillators using joint probability. *Proc. of the Tohoku University Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research Network Center*, pp. 399-410, 2009.

9. 阿部誠, テルマ ケイコ スガイ, 吉澤誠, 山家智之, 清水一夫, 後藤萌, 稲垣正司, 杉町勝, 砂川賢二: 重回帰分析を用いた致死性不整脈検出アルゴリズムに関する検討. *生体医工学.* **48**(6): 577-583, 2010.

阿部 誠 (アベ マコト)

2009年東北大学大学院工学研究科博士後期課程修了。同年同大学サイバーサイエンスセンター厚生科研費研究員, 11年同大学大学院工学研究科助教, 現在に至る。映像の生体影響評価, 致死性不整脈検出アルゴリズムの開発に関する研究に従事。
IEEE, 電気学会の会員。



テルマ ケイコ スガイ (テルマ ケイコ スガイ)

2011年東北大学大学院医工学研究科博士後期課程修了。致死性不整脈検出アルゴリズムの開発, 補助人工心臓装着時における心機能推定に関する研究に従事。
IEEEの学生会員。



吉澤 誠 (ヨシザワ マコト)

1983年東北大学大学院工学研究科博士後期課程修了。同大学工学部通信工学科助手, 助教, 豊橋技術科学大学知識情報工学系助教, 東北大学大学院情報科学研究科助教, 同大学情報シナジーセンター教授を経て, 現在, 東北大学サイバーサイエンスセンター教授。モバイル健診装置の開発, 人工心臓の制御等の研究に従事。
IEEE, 日本生体医工学会, 日本・米国人工臓器学会等の会員。



本間 経康 (ホンマ ノリヤス)

1995年東北大学大学院工学研究科博士後期課程修了。00年Saskatchewan大学客員教授などを経て, 03年東北大学医学部助教, 08年同大学サイバーサイエンスセンター准教授, 現在に至る。最適制御, 複雑系, 脳科学, 医用画像等の研究に従事。
IEEE, 計測自動制御学会の会員。



杉田 典大 (スギタ ノリヒロ)

2004 年東北大学大学院工学研究科博士後期課程修了。05 年, 21 世紀 COE フェロー, 06 年, 同大学工学研究科助手, 助教を経て, 現在, 同大学大学院工学研究科准教授。モバイル健診装置の開発, 映像等の生体影響評価に関する研究等に従事。

日本遠隔医療学会, 計測自動制御学会の会員。



稲垣 正司 (イナガキ マサシ)

1987 年千葉大学医学部卒業。同年同大学医学部附属病院勤務, 91 年国立循環器病センター内科心臓部門, 96 年同研究所循環動態機能部研究員を経て, 現在, 国立循環器病研究センター研究所循環動態制御部室長。専門分野は循環器病学, 不整脈学。

日本循環器学会, 日本心電学会, 日本内科学会等の会員。



清水 一夫 (シミズ カズオ)

1983 年長岡技術科学大学大学院電気電子システム専攻科修了。88 年オリンパス株式会社 中途入社第 2 開発部所属, 98 年同社新事業推進本部 DM-pj グループリーダー (課長), 2005 年同社研究開発企画部課長を経て, 現在, オリンパス株式会社医療技術開発本部医療探索部部長。医療機器の研究開発に従事。

不整脈学会の会員。



杉町 勝 (スギマチ マサル)

1984 年九州大学医学部卒業, 92 年論文博士取得。同年, 国立循環器病センター研究所室長, 2004 年同研究所部長を経て, 現在, 国立循環器病研究センター研究所循環動態制御部部長。心臓力学, 循環動態, 循環制御の研究, 医療機器開発等に従事。

日本循環器学会, 日本生体医工会, 日本循環制御医学会, 日本心電学会, 計測自動制御学会, IEEE EMBS 等の会員。



後藤 萌 (ゴトウ モエ)

2009 年東京大学大学院工学研究科修士課程修了。同年, オリンパス株式会社入社。現在, オリンパス株式会社医療技術開発本部医療探索部研究員。専門分野は生体信号処理。



砂川 賢二 (スナガワ ケンジ)

1974 年九州大学医学部卒業。論文博士取得。同大学医学部循環器内科医員, ジョンスホプキンス大学医学部研究生, 講師, 助教授, 九州大学医学部助手, 講師, 国立循環器病センター研究所循環動態機能部長を経て, 現在, 九州大学大学院医学研究院循環器内科教授。専門分野はバイオニック心臓病学, 心血管の力学等。

日本内科学会, 日本循環器学会, 日本生体医工会, IEEE EMBS 等の会員。



心筋細胞のエネルギー代謝におけるミトコンドリアと筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルの相対位置の重要性

波田野 明日可^{*,**}・岡田 純一^{*}・鷺尾 巧^{*}・久田 俊明^{*}・杉浦 清了^{*}

Juxtaposition of Mitochondria to the Ca^{2+} Release Site is Crucial for the Cardiac Energy Balance—A 3-D Simulation Study of Cardiomyocyte—

Asuka HATANO,^{*,**} Jun-ichi OKADA,^{*} Takumi WASHIO,^{*} Toshiaki HISADA,^{*} Seiryu SUGIURA^{*}

Abstract Recent studies revealed that Ca^{2+} not only regulates the contraction of cardiomyocytes, but can also function as a signal to stimulate ATP production by the mitochondria. However, spatio-temporal resolutions of current experimental techniques limit our understanding on this issue. This study employs our 3D cardiomyocyte model based on the finite element method (Okada et al. AJP 2005) and has been extended to include the detailed subcellular structure including the sarcolemma with t-tubule system, sarcoplasmic reticulum, myofibrils and mitochondria. Elementary processes involved in the electrophysiology, contraction and ATP metabolism are spatially arranged, and the multiple reaction diffusion equations for Ca^{2+} and energy metabolites, and contraction were solved simultaneously. We specifically examined the effect of the gap distance between mitochondria and Ca^{2+} release site. Our model revealed that increasing the gap distance induced a severe energetic derangement due to phosphate accumulation, resulting in contractile failure under tachycardic electrical pacing at 3 Hz. Juxtaposition of the mitochondria to the Ca^{2+} release site is crucial for rapid signal transmission to maintain cardiac energy balance. Realistic 3-D model of cardiac excitation-contraction and metabolism provides a powerful tool for the study of cardiac function by expanding the temporal and spatial resolution beyond the limit in experimental approaches.

Keywords : cardiomyocyte, mitochondria, energetics, finite element method, sub-cellular.

1. はじめに

心筋細胞の収縮のシグナルである Ca^{2+} イオンはミトコンドリアのエネルギー生産の制御をも担うことが明らかにされている。ADP (アデノシン2リン酸) によるミトコンドリアの活性化がエネルギー消費量のフィードバックであるのに対し、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入はフィードフォワードな制御となり、エネルギー代謝のロバストな制御を支えているとされる。ここで未解決の争点の一つは、 Ca^{2+} 流入によるミトコンドリア内 Ca^{2+} が、①心拍毎の細胞質の濃度変化の影響を受け毎拍大きく変化するか (fast

Ca^{2+} uptake model), または②細胞内の濃度変化の累積として長期的に変化するか (slow Ca^{2+} uptake model) という点である [1]。刻々変動する心筋の負荷へ応答するには迅速な制御は重要であるが、ミトコンドリア内の Ca^{2+} 制御にもエネルギーを必要とするためエネルギー収支にマイナスの影響がある可能性がある。また近年の研究により、 Ca^{2+} 放出部位である JSR (junctional sarcoplasmic reticulum) とミトコンドリアが約 50 nm の間隙で隣接しており、この間隙の大きな Ca^{2+} 濃度変化を感知することが重要と示唆もある [2, 3]。しかしながら実験データの時間・空間解像度の限界からいづれも推測の域を出ない。

上記の議論を難しくするもう一つの要因は細胞、そしてその一部であるミトコンドリアが非常に複雑なシステムであり、最終的な応答が容易には予想できないことである。このような問題に対し、シミュレーションモデルは大きな力を発揮してきた [4]。しかしながら、多くのモデルは細胞内を1つないしは少数の反応プールとしてモデル化しており、細胞内の空間的な配置や構造を現実に即した形でモ

2011年8月4日受付, 2011年9月11日改訂, 2011年9月29日再改訂

Received August 4, 2011; revised September 11, 2011, September 29, 2011.

* 東京大学新領域創成科学研究科

Department of Frontier Science, The University of Tokyo

** 日本学術振興会特別研究員 DC

JSPS Research Fellow

デル化することはできない。細胞内の大きな Ca^{2+} 濃度勾配, エネルギー代謝に関する消費と生産の時空間的な局在, そして力学的な収縮は細胞全体の機能を構成する重要な要素である。細胞内の空間分布を検討する数値的試みとして, Ca^{2+} の空間分布を考慮し, 電気生理現象と力学収縮を統合した解析が岡田等[5]により行われた。本研究ではその枠組みを拡張しエネルギー代謝現象を取り扱う。心筋細胞内の微細構造を考慮し, 電気生理・エネルギー代謝・力学収縮が連成したマルチフィジックスな心筋細胞統合シミュレータを構築し, 微細構造内と空間分布が細胞機能に与える影響について考察する。

2. 方 法

心筋細胞統合シミュレータの概要について記述する。筋原線維・ミトコンドリア・JSR・NSR (Network sarcoplasmic reticulum)・T管・細胞膜を, 細胞内微細構造を考慮して有限要素メッシュを作成した。電気生理・エネルギー代謝反応については, Ca^{2+} とエネルギー代謝物質に関する反応拡散方程式を用いる。反応項は各細胞内小器官の機能, 拡散項は物質の伝達に相当し, 反応の局在と細胞内での相互作用を表現する。 Ca^{2+} やエネルギー代謝物質の筋原線維 A 帯における濃度からアクチンミオシンの収縮力発生量を決定し, 力学的な平衡問題を同一の有限要素メッシュで解くことにより電気生理・エネルギー代謝・力学問題を全て統合した解析を行った。

2.1 心筋細胞有限要素モデル

心筋細胞内の 1 筋節・膜を含んだ 3 筋原線維を取り出し, 細胞内の体積比[6]に従って有限要素メッシュを作成した (図 1(a))。全ての形状を表現することは計算コストの増大から困難であるため, 体積の大部分を占める筋原線維・ミトコンドリア・細胞質で領域を分割し, JSR・NSR・細胞膜・T管を現在の知見に基づき微小な体積を持つ二重節点として配置し細胞内の構造をモデル化した。 Ca^{2+} 制御に関する概念図を図 1(b)に示す。T管上に L 型 Ca^{2+} チャネル (LCC) が JSR に対面する部位に集中して分布している。脱分極により LCC から流入した Ca^{2+} が, JSR の Ca^{2+} 放出チャネルを開口することによって JSR からの Ca^{2+} 放出が起こる。放出部位から細胞質全体に拡散した Ca^{2+} は筋原線維領域ではトロポニンに結合し収縮を起こし, ミトコンドリア領域に一樣に分布した Ca^{2+} ユニポーター (UNI) によってミトコンドリア内に取り込まれた後 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系 (NCX) によって細胞質に排出される。細胞質の Ca^{2+} は最終的には NSR の Ca ポンプによって SR 内に取り込まれると同時に, 細胞膜と T管に一樣に分布した Ca^{2+} ポンプおよび $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系によって細胞外に排出される。ミトコンドリアと JSR の相対位置がエネルギー代謝に与える影響を調べるため, JSR - ミトコンドリアの間隔が 50 nm (Gap50) と 200

nm (Gap200) との 2 つのモデルを用意した (図 1(c))。

2.2 反応拡散方程式

エネルギー代謝の空間分布を表現するため, ATP (アデノシン 3 リン酸), ADP (アデノシン 2 リン酸), Pi (無機リン酸), CP (クレアチンリン酸), Cr (クレアチン) の 5 つの代謝物質と, シグナル物質である Ca^{2+} の濃度場を細胞全体に定義した。この計 6 物質について, 以下の反応拡散方程式を陽解法を用いて解いた。

$$\frac{d[S]_i}{dt} = \nabla \cdot (D_i \nabla [S]_i) + f_i^S$$

S は Ca^{2+} , ATP, ADP, Pi, CP, Cr のいずれか, i は位置のインデックス, [S] は S の濃度, D は拡散係数, f は反応項を示す。

反応項は心筋細胞の電気生理・エネルギー代謝に関する Cortassa 等のモデル[4]の各反応を, 対応する各細胞内器官に配した。拡散係数については実験データ[7-11]をもとに与えた。表 1 は筋原線維長軸方向の拡散係数である。短軸方向には 0.6265 倍[8], 細胞質には 0.1 倍の値を用いた[11]。

2.3 エネルギー代謝とミトコンドリアの Ca^{2+} 制御

ミトコンドリア内への物質の取り込み, 内膜反応の空間分布及びマトリクス内での Ca^{2+} の拡散を取り込んだ解析を行った。ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みは Ca^{2+} ユニポーターと呼ばれるチャネルを通して行われる。ユニポーターは半飽和濃度が約 10 μM と高いことが知られており[12], その特徴を取り入れるため Dash 等によるモデルを用いた[13]。

細胞質の Ca^{2+} 濃度がユニポーターによる取り込みを促進するため, 細胞質の Ca^{2+} 勾配に従ってミトコンドリア内にも Ca^{2+} 濃度勾配と拡散が起こる。 Ca^{2+} の濃度上昇は TCA 回路のイソクエン酸デヒドロゲナーゼ, ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを活性化することで, NADH・ATP 生産を促進する[14]。

生産されたマトリクス内の ATP は ANT (Adenine nucleotide translocator) により膜間腔へと放出される。ATP が消費部位へ輸送される経路は, 直接拡散のほかに「CP シャトル」が重要であると考えられている。CK (クレアチンキナーゼ) を触媒として, ATP/ADP のエネルギーと CP/Cr のエネルギーとは相互に変換されるため, より拡散の容易な CP にエネルギーを渡して伝播し, 必要な場所で逆反応により ATP を取り出す仕組みである。本モデルではこの CP シャトルの細胞内空間構造を考慮しモデル化を行った。ミトコンドリアの膜間腔には mit-CK (ミトコンドリア CK) を配置した。消費側である筋原線維では M 帯に CK が局在しているとされているため, 筋原線維の Z 帯・M 帯・A 帯・I 帯を区別し, M 帯には M-line bound CK を, A 帯には Acto-Myosin ATPase による ATP 消費を配置した。これにより, 筋原線維への ATP

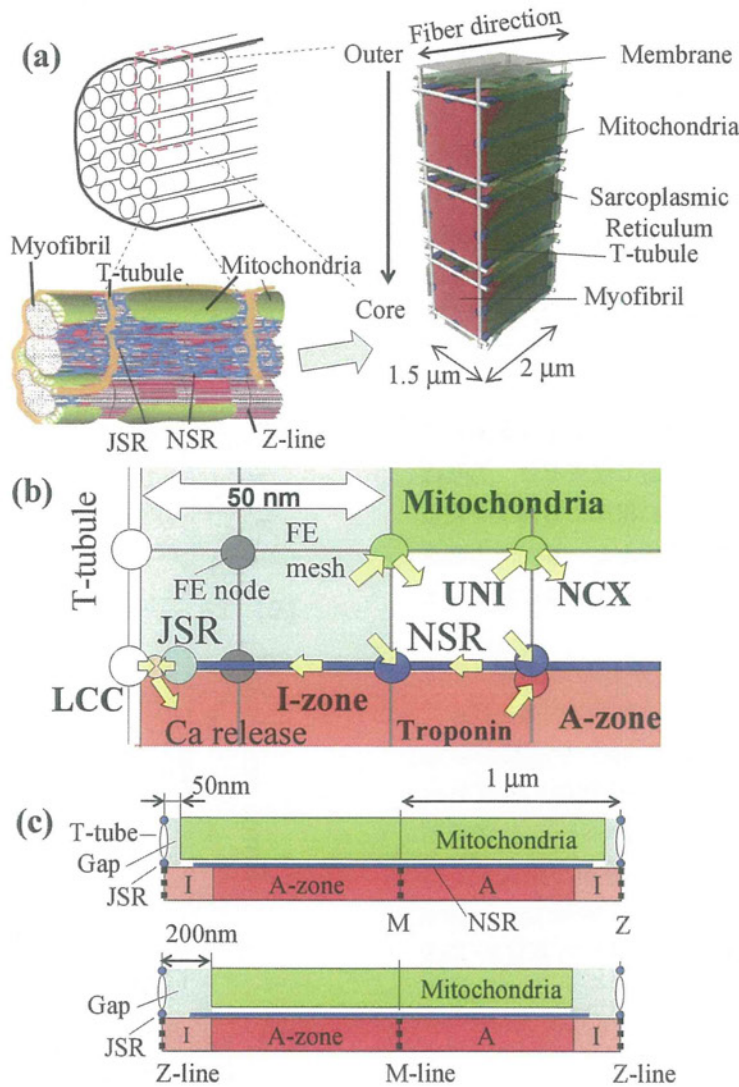


図1 3次元心筋細胞モデル
 (a) 取り出した部位と細胞内小器官の配置に関する模式図。(b) Ca^{2+} 放出チャネル周辺のメッシュ。 Ca^{2+} のやり取りを黄矢印で示した。(c) JSR-ミトコンドリアの間隔が50 nmと200 nmのモデル。

Fig. 1 3D model of cardiomyocyte.
 (a) Schematic image of the modeled segment and structure of subcellular components. (b) Finite element mesh around Ca^{2+} release site. Yellow arrows indicates Ca^{2+} fluxes. (c) Diagrammatic sketch of the models whose gap between Ca^{2+} release site and mitochondria are either 50 nm or 200 nm.

表1 筋原線維における拡散係数 ($\mu m^2/msec$)

Table 1 Diffusion Coefficients in myofibril ($\mu m^2/msec$).

| Ca^{2+} | CP | Cr | Pi | ATP | ADP |
|-----------|------|------|------|-------|-------|
| 0.3 | 0.11 | 0.15 | 0.14 | 0.083 | 0.078 |

供給に関し、ミトコンドリアからの直接的な ATP 拡散と mit-CK により CP とされ拡散し、M-line bound CK で ATP となり筋原線維へと届けられる、2 経路の共存がモデル化された。

2.4 力学現象

筋原線維には、Negroni の 4 状態モデル [15]、エネルギー代謝物質の影響に関して松岡等のモデル [16] を用いた。A 帯の各点で Ca^{2+} とエネルギー代謝物質の濃度に応じて Negroni モデルから収縮力が求まり、これを力学的境界条件として力学平衡方程式を解いた。定式化の詳細は岡田等 [5] に準ずる。

$$\int_V \left(2 \frac{\partial W}{\partial C} + \lambda J C^{-1} \right) : \delta E dV + \int_{S_i} \bar{t}_b \cdot \delta u dS = 0$$

$$\int \delta \lambda \left(J - 1 \right) - \frac{2\lambda}{\kappa} dV = 0$$

ただし \mathbf{u} は変位, W は歪ポテンシャル, \mathbf{C} は右 Cauchy-Green 変形テンソル, \mathbf{E} は Green-Lagrange 歪テンソル, J は体積変化率, V は解析領域, λ は圧力の $-1/2$ に相当する Lagrange 未定乗数, κ は体積弾性率, $\bar{\mathbf{t}}_b$ は応力境界条件, S_b は応力境界条件が指定される領域, 記号 \cdot はテンソルのスカラー積 ($\mathbf{A}:\mathbf{B} = \sum_i \sum_j A_{ij} B_{ij}$) である [17]. 構造は超弾性体と仮定し, 筋原線維は異方性のある Humphrey, Lin-Yin の構成則 [18-20], ミトコンドリアや細胞質領域には等方性の Mooney-Rivlin 体を適用した.

2.5 計算

境界条件として, 拡散は細胞膜のイオンチャンネルを介するイオンの出入りを除き, 全ての面で流束ゼロ, 力学は筋の線維方向に垂直な面と細胞中央に相当する面上で変位をゼロ, それ以外の面は応力ゼロを与えた. また, 内部構造と境界条件の対称性から, 実際の解析領域はこの $1/4$ とした.

プログラムは全て Fortran90 で書かれた研究室コードである. シミュレータは電気的なペーシング刺激を模擬する強制的な膜電流 ($100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 0.5 ms) を周期的に加えることで, 興奮・収縮・代謝活動が自律的に計算される. 低負荷 (1 Hz) と高負荷 (3 Hz) のペーシングの結果を比較した. 高負荷の条件では強心作用を模擬するため, NSR の活性のみ 1.5 倍とした. 計算は Intel Xeon CPU (3.2 GHz) を用いて行われ, 1 秒間の計算に約 1000 秒を要した.

3. 結 果

3.1 相対位置の変化が平均値に及ぼす影響

JSR-ミトコンドリアの間隙の異なる 2 つのモデル (図 1 (c)) に対し, 等尺性の条件下で 1 Hz の定常状態と 3 Hz への負荷増大を与えた解析を行った. 図 2 は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ (細胞質 Ca^{2+} 濃度), $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ (ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度) の平均値と収縮力の時刻歴を Gap50 (黒), Gap200 (赤), 1 Hz (破線) と 3 Hz (実線) について比較したものである. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ 平均値は Gap200 モデルの方がピークの値が若干高くなっている. これは Gap200 モデルにおいて, 高い $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ を示すミトコンドリア-JSR 間隙の細胞質が相対的に多くなったことを反映したものであり, 1 Hz と 3 Hz とで共通している. 一方で $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ 平均値と収縮力については, 1 Hz では Gap による差は小さいが, 3 Hz では Gap200 でどちらもピークの値が低くなっており, 3 Hz では Gap による差の出方が大きくなっている. 図 3 に $[\text{NADH}]_{\text{mito}}$ と $[\text{Pi}]_{\text{cyto}}$ の 1 Hz から 3 Hz への過渡応答を示す. $[\text{NADH}]_{\text{mito}}$ と $[\text{Pi}]_{\text{cyto}}$ も同様に, 3 Hz において Gap による差が増大していることが分かる.

3.2 Ca^{2+} 空間分布がミトコンドリアに与える影響

負荷による差を詳細に検討するため, 図 4 (a) および

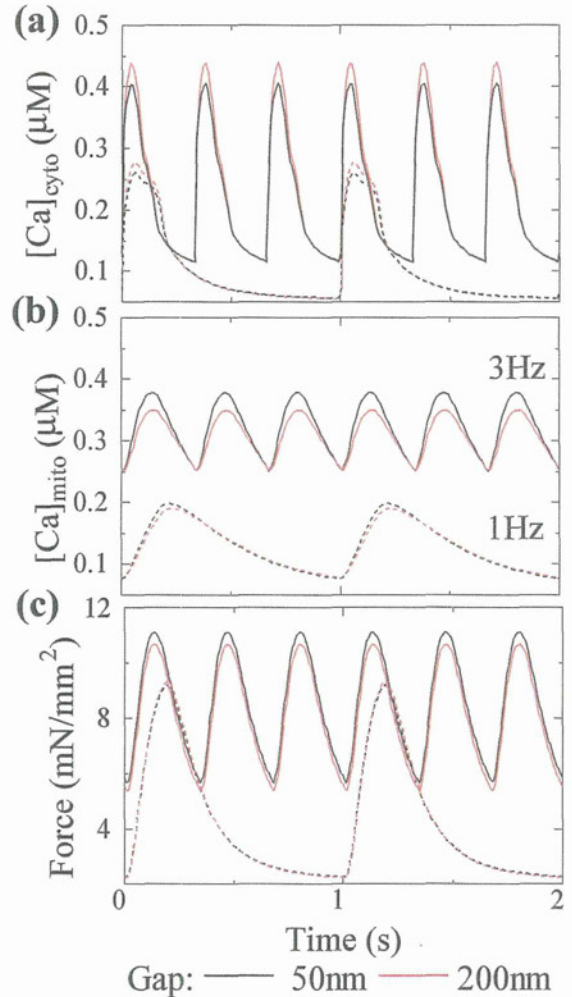


図 2 1 Hz (実線), 3 Hz (破線) の条件下における Gap50 (黒), Gap200 (赤) モデルの平均 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ (a), 平均 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ (b) と等尺性張力 (c) の時間変化

Fig. 2 Average $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ (a), $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ (b) and isometric force (c) at either 1 Hz (solid) or 3 Hz (dashed) under the Gap50 (black) or Gap200 (red) models.

(b) に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ と同図 (c-f) に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ の時間・空間分布を示した. 左列 (a, c, e) は 1 Hz, 右列 (b, d, f) は 3 Hz の結果である. ミトコンドリアに沿って線維方向に Z 帯から M 帯に向かう線上の位置を奥行き軸で示し, 時間を横軸, 濃度を高さで色で表示している. ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みは細胞質へ流入する Ca^{2+} の 2% 程度であり $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ に与える影響は小さい. 従って Gap の違いでは $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ の分布にほとんど差が出ないため, Gap50 の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ のみを示した (a, b). 黄色いラインは Z 帯からの位置が 200 nm のポイントの時間変化を示している. (c) と (d) は Gap50 モデル, (e) と (f) は Gap200 モデルの $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ を示したものである. まず 1 Hz の結果を観察すると, Z 帯の JSR からの Ca 放出により, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ に大きな濃度勾配が生じているのが観察される (a). この濃度勾配を反映して, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ にも濃度

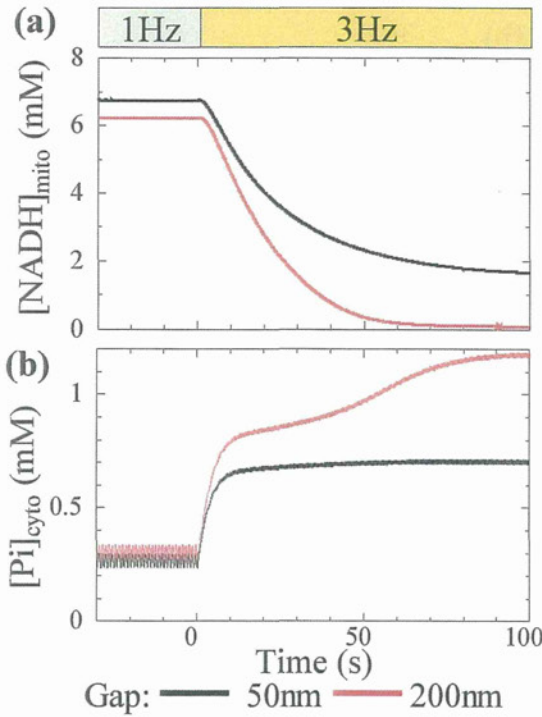


図3 1 Hz から 3 Hz への負荷増大に対する (a) $[NADH]_{mito}$ と (b) $[Pi]_{cyto}$ の過渡応答
Fig. 3 Transient response of (a) $[NADH]_{mito}$ and (b) $[Pi]_{cyto}$ upon switch from 1 Hz to 3 Hz conditions.

勾配が生じている。Gap50 においてはミトコンドリアのユニポーターはより高い $[Ca^{2+}]_{cyto}$ と接するため、Gap50 の $[Ca^{2+}]_{mito}$ (c) は Gap200 の $[Ca^{2+}]_{mito}$ (e) と比較して全体として高くなっている。3 Hz を見ると、この $[Ca^{2+}]_{mito}$ の Gap による差が大きくなっている (d, f)。 $[Ca^{2+}]_{cyto}$ (b) を見ると 1 Hz と比較して空間勾配が増大しており、Gap200 モデルと Gap50 モデルにおけるミトコンドリアの Ca^{2+} ユニポーターが接する $[Ca^{2+}]_{cyto}$ の差が増大し、 $[Ca^{2+}]_{mito}$ の差の増大につながったことが分かる。

4. 考 察

4.1 JSR—ミトコンドリア間隙の影響

低負荷 (1 Hz) においては、JSR とミトコンドリアの間隙の増加により $[Ca]_{mito}$ 、 $[NADH]_{mito}$ や細胞内のエネルギー状態のわずかな低下が見られたが (図 2(a), 図 3)、ミオシンによる収縮力発生に変化はみられなかった (図 2(c))。一方高負荷 (3 Hz) においては、間隙の増加はミトコンドリア内 Ca^{2+} の濃度振幅の低下 (図 2(b))、細胞質リン酸の大幅な上昇 (図 3)、そして収縮力の低下を引き起こした。

細胞質の平均 Ca^{2+} 濃度変化を見ると (図 2(a))、3 Hz で興奮時のピークが高く、且つ短くなっている。これは放出・汲み上げが共に活性化された結果であり、実験的観測と一致する傾向である [2, 3]。この放出と汲み上げの活性化

の結果、細胞内の Ca^{2+} 勾配が大きくなり (図 4(b))、ミトコンドリア内への Ca^{2+} 取り込み速度の位置による差異を大きくしている (図 4(c-f))。さらに 3 Hz では細胞質の濃度低下が早期に起こるため、ミトコンドリアからの Ca^{2+} 流出が流入より優位になるタイミングが早い。そのため流入の立ち上がりの速度の差が濃度の振幅に与える影響が増大したと考えられる。一方、高負荷では筋原線維における ATP 消費の増加により NADH 需要が増加するが、ミトコンドリアへの流入 Ca^{2+} の増加によりクエン酸回路が促進されることによって供給も増加する結果 NADH レベルが保たれる。しかし Gap200 モデルにおいては上述のような理由でミトコンドリア内の Ca 増加量が Gap50 と比較して減少するため、TCA 回路での NADH 産生亢進が消費に追いつかず、結果ミトコンドリアからの ATP 供給が減少し、 $[Pi]_{cyto}$ の上昇による収縮力の低下を引き起こした。このようにミトコンドリアと JSR の隣接部での早い Ca^{2+} の流入は、運動など高負荷 (3 Hz) 時のミトコンドリアのエネルギー動態に重要であり、間隙の増大による問題が高負荷時に顕在化することを示唆している。

4.2 モデルの問題点と今後の展望

4.2.1 モデルの形状

後述するモデルのスケールの問題と同様、計算量の制約から今回のサルコメア、T 管のモデル形状は非常に単純かつ理想化されたものとせざるを得なかった。最近高性能の電子顕微鏡を用いた細胞内微細構造の 3 次元再構成が実用化され心筋細胞についても T 管、ミトコンドリアを含む構造が報告されている [21]。将来このような微細な構造までも再現したモデルが可能となれば疾患による細胞内の構造変化が細胞全体の機能に与える影響を評価することも可能となると考えられる。

4.2.2 移流の効果と電位分布の取り扱い

現モデルではイオンの運動が拡散のみに依ると仮定し、流体の移動と電位勾配がイオンに及ぼす力を取り扱っていないという問題点がある。また細胞膜・ミトコンドリア内膜共に膜電位の伝搬は十分に早いとの仮定から、1つのミトコンドリア内ではミトコンドリア膜電位は均一として扱った。これは知見に乏しい複雑な構造をしたミトコンドリアの内膜を伝搬する膜電位をどのように取り扱うのが妥当かという大きな問題を避けるためである。今後細胞内の現象をより精緻に再現するに当たっては、移流および電位勾配による物質移動や、ミトコンドリア内の僅かな電位差による ATP 生産への影響を検討し寄与が無視できないと考えられるものはモデルに取り入れていく必要がある。三相理論等の導入によってこの問題の解決を図ることは今後の一つの大きな課題である。

4.2.3 筋原繊維モデルの改良

本解析は等尺性の条件で行ったため、発生収縮力は活性状態にあるミオシン分子の数に比例し、活性状態の 1 ミオシン当たり 0.1 ms^{-1} の ATP 消費があるとモデル化した。3次元の力学統合解析

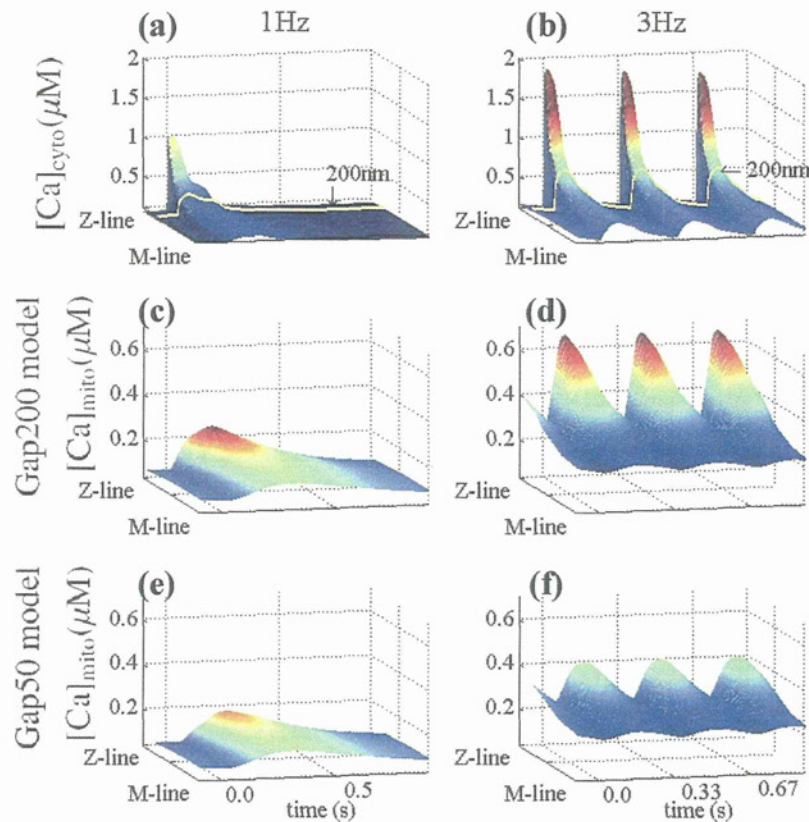


図 4 1 Hz (左列) と 3 Hz (右列) における $[Ca^{2+}]_{cyto}$ (上段) と $[Ca^{2+}]_{mito}$ (Gap50: 中段, Gap200: 下段) の時空間分布

Fig. 4 Regional $[Ca^{2+}]_{cyto}$ (top row) and $[Ca^{2+}]_{mito}$ of Gap50 (middle row) and Gap200 (bottom row) models in response to both 1 Hz (left column) and 3 Hz (right column).

として、長さ・滑り速度が現実に即した形でモデル化できる利点を生かし、今後張力や ATP 消費量とサルコメア長・滑り速度の関係について、より現実に即したモデルを提案していきたいと考えている。

4.2.4 境界条件 現在は計算量の制約から 1 筋節長のみをモデル化している。筋節の周期性から細胞長軸方向には周期境界条件をおいているが、これは 3 次元モデルの可能性を限定している。例えば、 Ca^{2+} wave による同期しない興奮は細胞内の不均一な収縮と、各筋節の様々な変形を引き起こすと考えられるが、1 筋節の周期境界モデルではそのような状況を再現できない。モデルの大規模化等によってこの点を解決することが今後の課題である。

5. おわりに

本研究では心筋細胞内小器官の 3D 構造を考慮し、電気生理・エネルギー代謝・力学現象を統合した解析を行った。ミトコンドリアと Ca^{2+} 放出口の間隙がミトコンドリアに及ぼす影響を評価し、隣接が細胞内のエネルギー代謝に重要であることを示唆する結果を得た。ミトコンドリアの Ca^{2+} が拍毎に変化するか累積的に変化するかという未解決の争点に関しては、モデルの問題点や実験的な知見の

不足から結論を導くに至らなかったが、細胞内の勾配と空間的構造の定量的な評価から、これまで細胞内の Ca 濃度を均一として扱ってきた実験やシミュレーションでの量的な評価の限界を示すことができたと思われる。細胞内微細構造を考慮した電気生理・エネルギー代謝・力学統合解析モデルは実験の時間・空間解像度の制約を乗り越えるに有用な手段であると考えられる。

謝辞 本研究は、日本学術振興会の最先端研究開発支援プログラムと科学研究費 (B) (20300152) により、助成を受けたものである。

文 献

1. O'Rourke B, Blatter LA: Mitochondrial Ca^{2+} uptake: Tortoise or hare? *J Mol Cell Cardiol.* **46**: 767-774, 2009.
2. Bers DM: Ca source and sinks, in Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer academic publishers: Dordrecht, 2001.
3. Andrienko TN, Picht E, Bers DM: Mitochondrial free calcium regulation during sarcoplasmic reticulum calcium release in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **46**(6): 1027-1036, 2009.
4. Cortassa S, et al. : A computational model Integrating

- electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophys J.* **91**: 1564-1589, 2006.
5. Okada J, et al. : Three-dimensional simulation of calcium waves and contraction in cardiomyocytes using the finite element method. *Am J Physiol.* **288**: 510-522, 2005.
 6. Aliev MK, et al. : Water content and its intracellular distribution in intact and saline perfused rat hearts revisited. *Cardiovasc Res.* **53** (1): 48-58, 2002.
 7. de Graaf RA, van Kranenburg A, Nicolay K: In Vivo ^{31}P -NMR Diffusion Spectroscopy of ATP and Phosphocreatine in Rat Skeletal Muscle. *Biophys J.* **78** (4): 1657-1664, 2000.
 8. Vendelin M, Birkedal R: Anisotropic diffusion of fluorescently labeled ATP in rat cardiomyocytes determined by raster image correlation spectroscopy. *Am J Physiol.* **295**: C1302-C1315, 2008.
 9. Lederer WJ, Niggli E, Hadley RW: Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science.* **248** (4953): 283, 1990.
 10. Selivanov V, et al. : Nucleotide-gated KATP channels integrated with creatine and adenylate kinases: Amplification, tuning and sensing of energetic signals in the compartmentalized cellular environment. *Mol Cell Biochem.* **256-257** (1): 243-256, 2004.
 11. Wegmann G, et al. : In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the actomyosin overlap zone as a molecular sieve. *J Muscle Res Cell Motil.* **13**: 420-435, 1992.
 12. Zhou L, et al. : Modeling cardiac action potential shortening driven by oxidative stress-induced mitochondrial oscillations in guinea pig cardiomyocytes. *Biophys J.* **97**: 1843-1852, 2009.
 13. Dash RK, Beard DA: Analysis of cardiac mitochondrial Na^+ - Ca^{2+} exchanger kinetics with a biophysical model of mitochondrial Ca^{2+} handling suggests a 3:1 stoichiometry. *J Physiol.* **586** (13): 3267-3285, 2008.
 14. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM: Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev.* **70** (2): 391-425, 1990.
 15. Negroni JA, Lascano EC: A Cardiac Muscle Model Relating Sarcomere Dynamics to Calcium Kinetics. *J Mol Cell Cardiol.* **28** (5): 915-929, 1996.
 16. Matsuoka S, et al. : Simulation of ATP metabolism in cardiac excitation-contraction coupling. *Prog Biophys Mol Biol.* **85**: 279-299, 2004.
 17. 久田俊明, 野口裕久, 非線形有限要素法の基礎と応用. 1995.
 18. Humphrey JD, Yin FCP: On constitutive relations and finite deformations of passive cardiac tissue: I. A pseudostrain-energy function. *J Biomech Eng.* **109** (4): 298-304, 1987.
 19. Lin DHS, Yin FCP: A multiaxial constitutive law for mammalian left ventricular myocardium in steady-state barium contracture or tetanus. *J Biomech Eng.* **120** (4): 504-517, 1998.
 20. Watanabe H, et al.: Multiphysics simulation of left ventricular filling dynamics using fluid-structure interaction finite element method. *Biophys J.* **87** (3): 2074-2085, 2004.
 21. Hayashi T, et al. : Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca^{2+}

signaling in the heart. *J Cell Sci.* **122** (7): 1005-1013, 2009.

波田野 明日可 (ハタノ アスカ)

2007年東京大学工学部機械工学科卒業, 2009年東京大学大学院新領域創成科学研究科修士課程修了. 現在, 同博士課程に在学中. 2010年より日本学術振興会特別研究員 (DC2). 専門分野: 有限要素法, 生体力学.

所属学会: 日本循環器学会, 日本生体医工学会, Biophysical Society.



岡田 純一 (オカダ ジュンイチ)

1999年名古屋工業大学機械工学科卒業, 2004年東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻博士課程修了, 現在, 東京大学大学院新領域創成科学研究科特任講師. 専門分野: 有限要素法, 生体力学, 心臓シミュレーション.

所属学会: 日本機械学会, 日本計算工学会, 日本循環器学会.



鷺尾 巧 (ワシオ タクミ)

1990年大阪大学理学部数学科修士課程修了. 1990年よりNECコンピュータ技術本部にてHW開発に従事, 1993年より同C&C研究所にてスーパーコンピュータ用計算アルゴリズムの開発に従事. 2004年より東京大学新領域創成科学研究科・(独)科学技術振興機構CREST研究員として心臓シミュレータの開発に従事, 2009年からは同研究科特任研究員として同シミュレータの開発を継続. 専門分野: 数値解析, 並列計算, 生体数値モデル.

所属学会: 日本応用数理学会会員.



久田 俊明 (ヒサダ トシアキ)

1973年早稲田大学工学部機械工学科卒業, 1979年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了 (工学博士). 1979年東京大学生産技術研究所助手, 1985年東京大学工学部助教授, 1988年東京大学先端科学技術研究センター助教授, 1993年東京大学工学部教授を経て, 現在, 東京大学大学院新領域創成科学研究科教授. 専門分野: 連続体力学, 非線形有限要素法, 流体構造連成解析.

所属学会: 日本機械学会, 日本循環器学会.



杉浦 清了 (スギウラ セイリョウ)

1982年東京大学医学部卒業. 1995年東京大学医学部附属病院助手を経て, 2002年より東京大学大学院新領域創成科学研究科教授. 専門分野: 心臓病学, 心臓生理学, 心臓シミュレーション.

所属学会: 日本循環器学会, 日本心臓病学会, 日本生体医工学会, 国際心臓研究学会 (ISHR), Fellow of American Heart Association.



Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, improves insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice

Eriko Inoue¹, Toshihiro Ichiki^{1,2}, Kotaro Takeda^{1,2}, Hirohide Matsuura¹, Toru Hashimoto¹, Jiro Ikeda¹, Aya Kamiharaguchi¹ and Kenji Sunagawa¹

Departments of ¹Cardiovascular Medicine and ²Advanced Therapeutics for Cardiovascular Diseases, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

(Correspondence should be addressed to T Ichiki at Department of Advanced Therapeutics for Cardiovascular Diseases, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences; Email: ichiki@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp)

Abstract

Obesity induces hypertrophy of adipocyte resulting in production of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1 (CCL2)). These cytokines play an important role in the development of insulin resistance. Beraprost sodium (BPS), a prostaglandin I₂ analogue, is reported to attenuate inflammation. In this study, we examined the effect of BPS on glucose metabolism in mice fed a high-fat diet (HFD). Four-week-old C57/B6 male mice were fed a HFD for 12 weeks (HFD group) and the treatment group received oral BPS (300 μ g/kg per day) for the same period. Then, glucose metabolism, histological changes, and gene expression of white adipose tissue (WAT) were examined. Body weight was increased, and glucose

intolerance and insulin resistance were developed in the HFD group. Treatment with BPS improved glucose tolerance and insulin action without body weight change. Histological analysis of WAT showed an increase in the size of adipocyte and macrophage infiltration in the HFD group, which was attenuated by BPS treatment. BPS reduced HFD-induced expression of MCP1 and TNF- α in WAT. BPS also attenuated hepatic steatosis induced by the HFD. These results suggest that BPS improved glucose intolerance possibly through suppression of inflammatory cytokines in WAT. BPS may be beneficial for the treatment of obesity-associated glucose intolerance.

Journal of Endocrinology (2012) **213**, 285–291

Introduction

Obesity plays a central role in the development of metabolic syndrome (Wajchenberg 2000), a constellation of risk factors such as insulin resistance, dyslipidemia, and high blood pressure. Accumulation of visceral fat rather than subcutaneous fat is believed to cause insulin resistance (Wajchenberg 2000, Masuzaki *et al.* 2001). In obesity, adipocytes are enlarged and increased in number, and an excess of lipid leads to ectopic deposition of triglyceride in the liver and muscle, which is one of the causes of insulin resistance (Savage *et al.* 2007). The hypertrophied adipocytes produce proinflammatory cytokines such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1 (CCL2)) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) as obesity progresses (Shoelson *et al.* 2006). These cytokines, so-called adipokines, cause inflammation and recruitment of macrophages to adipose tissue (Xu *et al.* 2003), which is another important mechanism for obesity-induced insulin resistance. The infiltrated macrophages enhance inflammation of adipose tissue, indicating that these processes form a vicious circle.

TNF- α induces c-Jun amino-terminal kinase (JNK) activation and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS1) at serine residues that negatively regulate normal signaling through the insulin receptor/IRS1 axis (Hotamisligil *et al.* 1996). Mice lacking chemokine receptor-2 (CCR2), a receptor for MCP1, are partly protected against developing high-fat diet (HFD)-induced insulin resistance and exhibit reductions in adipose tissue macrophage recruitment and inflammatory gene expression (Weisberg *et al.* 2006). These observations suggest that adipose tissue in obesity is characterized by chronic low-grade inflammation, and inflammatory cytokines play a causative role in the development of insulin resistance.

Beraprost sodium (BPS) is a stable prostaglandin I₂ analogue and has a potent vasodilating effect through activation of prostacyclin receptor (Olschewski *et al.* 2004). BPS is also reported to attenuate inflammation. BPS reduced serum TNF- α levels in diabetic patients (Fujiwara *et al.* 2004) and expression of *Mcp1* mRNA in the kidney of Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats, resulting in the amelioration of diabetic nephropathy (Watanabe *et al.* 2009). BPS inhibits

TNF- α -induced expression of vascular cell adhesion molecule and monocyte attachment to endothelial cells (Goya *et al.* 2003). We therefore hypothesized that the anti-inflammatory effects of BPS may be beneficial for the improvement of obesity-induced insulin resistance, in which inflammation plays an important role.

We showed in this study that BPS improved glucose metabolism in association with reduction of inflammation of white adipose tissue (WAT) in a mouse model of diet-induced obesity.

Materials and Methods

Animals

All procedures were approved by the institutional animal use and care committee and were conducted in conformity with institutional guidelines. Four-week-old C57/B6 mice were purchased from Kyudo Co. Ltd. (Tosu, Saga, Japan). Three groups were analyzed: mice fed a normal chow diet (control group), mice fed a HFD containing 60% kcal fat (High Fat Diet 32, Clea Japan (Tokyo); HFD group) for 12 weeks, and mice fed a HFD and administered BPS for 12 weeks (BPS group). BPS dissolved in water at 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was given *ad libitum* because of the short half-life of BPS (~ 1 h). As a preliminary study showed that the estimated volume of water intake was ~ 0.2 ml/g per day, the estimated dose of orally ingested BPS was 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per day. At the end of the experiment, systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were measured by a tail-cuff method (BP-98A, Softron Co., Tokyo, Japan). Mice were killed by CO_2 inhalation.

Histological analysis

Adipose tissues were fixed with 10% formaldehyde for 24 h. The specimens were embedded into paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). The cross-sectional area for each adipocyte was determined using Dynamic cell count BZ-HIC (Keyence, Osaka, Japan). To detect macrophage infiltration, the paraffin sections were stained with an antimouse MAC3 (LAMP2) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Sections were deparaffinized with xylene and refixed with ethanol for 40 min, immersed in PBS, and then autoclaved in citrate buffer for antigen retrieval. Then, the sections were incubated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 20 min. The sections were further incubated with an antibody against MAC3 (1:200) overnight at 4 °C. After rinsing with PBS, the sections were incubated with biotin-labeled goat anti-rabbit IgG antiserum (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:200 dilution) for 30 min and then incubated with avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; 1:100 dilution) for 15 min, and the sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine and 0.03% hydrogen peroxide in deionized water for about 80 s. The number of MAC3-positive cell clusters was counted in high power field (HPF). The data are mean of five randomly chosen HPFs. After the mice were killed, the livers were removed and subsequently fixed in 10% formaldehyde. The sections were embedded in

paraffin blocks and stained with H&E to examine the structures of the liver and evaluate lipid droplets. For the quantification of areas of lipid accumulation in the liver, H&E-stained images of liver were uploaded into a computer for analysis. The images were processed into two gradations (black and white). The white porosity areas were quantified as vacuolation (Sato *et al.* 2010), which mostly represents accumulation of lipid droplets. Contribution of arteries, veins, and bile ducts to porosity area was small and equally observed in the three groups and therefore ignored in the quantification. The data are expressed as a percentage of white area to total area.

Glucose tolerance test and insulin tolerance test

Mice were starved for 6 h. Then, the mice were i.p. injected with glucose (1 g/kg of body weight) for the glucose tolerance test (GTT). For the insulin tolerance test (ITT), the mice were i.p. injected with rapid insulin (0.5 IU/kg of body weight). Blood was taken from tail vein at various time points to measure blood glucose concentrations by Glutest Every (Sanwa Kagaku Kenkyusho, Nagoya, Japan).

Measurement of serum levels of triglyceride, cholesterol, and insulin

Serum triglyceride and total cholesterol levels were determined by commercially available kits, Triglyceride E-test Wako (Wako, Osaka, Japan) and Cholesterol E-test Wako (Wako) respectively. Serum insulin levels were determined by ELISA kit (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan).

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR analysis

RNA from adipose tissue was extracted using ISOGEN according to the manufacturer's instruction (Wako). One microgram of total RNA was reverse transcribed using ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo, Osaka, Japan). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) and SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primer sequences for real-time qPCR used in this study are as follows:

TNF- α : 5'-AAGCCTGTAGCCACGTCGTA-3';
5'-GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG-3'.
MCP1: 5'-TTAACGCCCCACTCACCTGCTG-3';
5'-GCTTCTTTGGACACCTGCTGC-3'.
PPAR γ (PPARG):
5'-TGTCGGTTTCAGAAAGTGCTTG-3';
5'-TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG-3'.
C/EBP α : 5'-TTGAAGCACAATCGATCCATCC-3';
5'-GCACACTGCCATTGCACAAG-3'.
Adiponectin: 5'-GTCAGTGGATCTGACGACACCAA-3';
5'-ATGCTGCCATCCAACCTG-3'.
18S rRNA: 5'-ACTCAACACGGGAAACCTCA-3';
5'-AACCAGACAAATCGCTCCAC-3'.

The expression of each gene was normalized with that of 18s rRNA.

ELISA

ELISA for adiponectin and TNF- α was performed using commercially available kits (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) in accordance with the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Fisher's test if appropriate. Data are shown as mean \pm S.E.M. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Hemodynamic and metabolic parameters

Body weight was significantly increased in the HFD group compared with the control group at the end of the experiment. However, there was no significant difference between the HFD and BPS groups (Table 1). SBP was significantly increased in the HFD group compared with the control group. BPS significantly reduced SBP, but SBP in the BPS group was still significantly higher than that in control group (Table 1). HR was significantly increased in the HFD group compared with the control group. BPS reduced HR, but the difference was not statistically significant (Table 1).

After 16 h of fasting, lipid profile and glucose and insulin levels were determined. Total cholesterol and triglyceride were significantly increased by the HFD (Table 2). BPS treatment modestly decreased total cholesterol and triglyceride levels. However, the differences were not statistically significant. Fasting insulin and glucose levels were elevated in the HFD group.

BPS improved GTT and ITT

At the end of experiment, GTTs and ITTs were performed. The HFD group developed glucose intolerance (Fig. 1A) and insulin resistance (Fig. 1C). Treatment of mice with BPS significantly improved glucose tolerance and insulin action (Fig. 1A and C). Interestingly, the basal glucose level was

Table 1 BW, SBP, and HR

| | BW (g) | SBP (mmHg) | HR (b.p.m.) |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Control (n=5) | 26.9 \pm 0.5 | 97 \pm 3 | 448 \pm 31 |
| HFD (n=10) | 43.4 \pm 1.1 [†] | 114 \pm 2 [†] | 532 \pm 15 [†] |
| HFD+BPS (n=10) | 43.9 \pm 0.9 [†] | 106 \pm 2* [‡] | 496 \pm 15 |

HFD, high-fat diet; BPS, beraprost sodium; BW, body weight; SBP, systolic blood pressure; HR, heart rate. * $P < 0.05$, [†] $P < 0.01$ vs control. [‡] $P < 0.05$ vs HFD group.

Table 2 Fasting serum chemistry of control, HFD-, and BPS-treated mice

| | TC (mg/ml) | TG (mg/ml) | Insulin (ng/ml) | Glucose (mg/ml) |
|----------------|---------------------------|-------------|------------------------------|------------------------------|
| Control (n=5) | 55 \pm 4 | 66 \pm 12 | 0.16 \pm 0.05 | 59.6 \pm 2.6 |
| HFD (n=10) | 209 \pm 9 [†] | 94 \pm 9* | 3.75 \pm 0.51 [†] | 142.4 \pm 7.3 [†] |
| HFD+BPS (n=10) | 182 \pm 14 [†] | 74 \pm 6 | 4.12 \pm 0.90 [†] | 132.8 \pm 6.2 [†] |

HFD, high-fat diet; BPS, beraprost sodium; TC, total cholesterol; TG, triglyceride. * $P < 0.05$ and [†] $P < 0.01$ vs control.

significantly lower in the BPS group compared with the HFD group after 6 h of fasting, which was not observed after 16 h of fasting (Table 2). Area under the curves (AUC) also showed improvement of glucose metabolism by BPS treatment (Fig. 1B and D).

BPS reduced adipocyte size

Histological analysis of epididymal WAT showed that the adipocyte size was increased in the HFD group compared with the control group (Fig. 2A and B). Treatment with BPS reduced adipocyte size (Fig. 2C). Statistical analysis confirmed that BPS significantly reduced adipocyte size (Fig. 2D). These data suggest that BPS enhanced adipocyte differentiation. We therefore examined expression of genes related to adipocyte differentiation. *Ppar γ* was significantly suppressed by the HFD, which was reversed by BPS (Fig. 3A). The upregulation of *Ppar γ* by BPS showed a borderline significance ($P = 0.06$) when three groups were considered. However, the difference between the HFD and BPS groups was statistically significant if only the HFD groups were compared ($P = 0.02$). We failed to see a significant effect of BPS treatment on the expression of *C/EBP α* (Fig. 3B) or adiponectin (Fig. 3C). Although adiponectin mRNA levels were not changed in the three groups, serum adiponectin levels were mildly decreased in the HFD group and BPS groups (Fig. 3D). However, the difference in serum adiponectin levels between the three groups was not statistically significant.

BPS reduced inflammatory changes in WAT in HFD-fed mice

Chronic inflammation in WAT is a common feature of obesity. Therefore, we examined the infiltration of macrophages into adipose tissue. The number of MAC3-positive macrophage aggregation surrounding adipocytes, often referred to as a crown-like structure (CLS) in WAT (Weisberg *et al.* 2003, Xu *et al.* 2003), was significantly increased in the HFD group compared with the control group (Fig. 2E and F; arrowheads). In the control group (Fig. 2E), almost no CLS was observed in WAT. Treatment with BPS significantly decreased the number of CLSs in WAT (Fig. 2G and H).

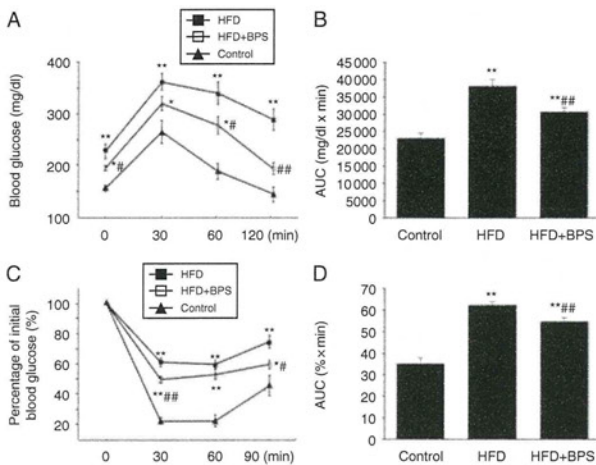


Figure 1 BPS ameliorated HFD-induced insulin resistance. (A) The control group (black triangle) was fed a normal chow and the HFD (black box) and BPS groups (white box) were fed a HFD for 12 weeks. Mice were i.p. injected with 1 g/kg glucose and blood glucose levels were measured. (C) Mice were i.p. injected with 0.5 U/kg insulin and blood glucose levels were measured. (B and D) AUC were calculated. Control group $n=5$, HFD group and BPS group $n=10$. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ vs control. # $P<0.05$ vs HFD group, ## $P<0.01$ vs HFD group.

Real-time PCR analysis showed that HFD-induced expression of $TNF-\alpha$ and MCP1 was significantly suppressed by BPS treatment (Fig. 3E and F). We could not detect serum $TNF-\alpha$ even in mice fed a HFD (data not shown).

BPS attenuated HFD-induced hepatic steatosis

Finally, we examined whether BPS affects hepatic steatosis induced by the HFD. HFD feeding for 12 weeks caused fatty liver compared with control feeding (Fig. 4A and B). Fat accumulation in the liver was attenuated in the BPS group compared with the HFD group (Fig. 4C and D).

Discussion

We demonstrated in this study that BPS improved HFD-induced insulin resistance and glucose intolerance. Treatment with BPS reduced expression of inflammatory cytokines, adipocyte size, and macrophage infiltration in WAT of diet-induced obesity mice. BPS also induced modest PPAR γ upregulation. Although BPS treatment did not affect serum glucose and insulin levels after 16 h of fasting (Table 2), GTT performed after 6 h of fasting showed a significant reduction in basal glucose levels in the BPS group. The difference may be ascribed to the length of the fasting period, and prolonged fasting time may attenuate the difference between the HFD group and the BPS group.

Low-grade adipose tissue inflammation is a key state underlying insulin resistance in obesity. An increase in $TNF-\alpha$ mRNA expression was observed in adipose tissue from animal models of obesity and diabetes (Hotamisligil *et al.* 1993). It has

been suggested that $TNF-\alpha$ is an important mediator of insulin resistance in obesity because neutralization of $TNF-\alpha$ increased peripheral glucose uptake in response to insulin in obese rats. And $TNF-\alpha$ -deficient obese mice were protected against obesity-induced attenuation of insulin signaling in muscle and fat tissues (Uysal *et al.* 1997). Several studies suggest that $TNF-\alpha$ blocks insulin signaling. It is reported that $TNF-\alpha$ inhibits insulin-induced tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the insulin receptor in the obese rat (Hotamisligil *et al.* 1994a,b). $TNF-\alpha$ activates JNK signaling, and JNK activation promotes the

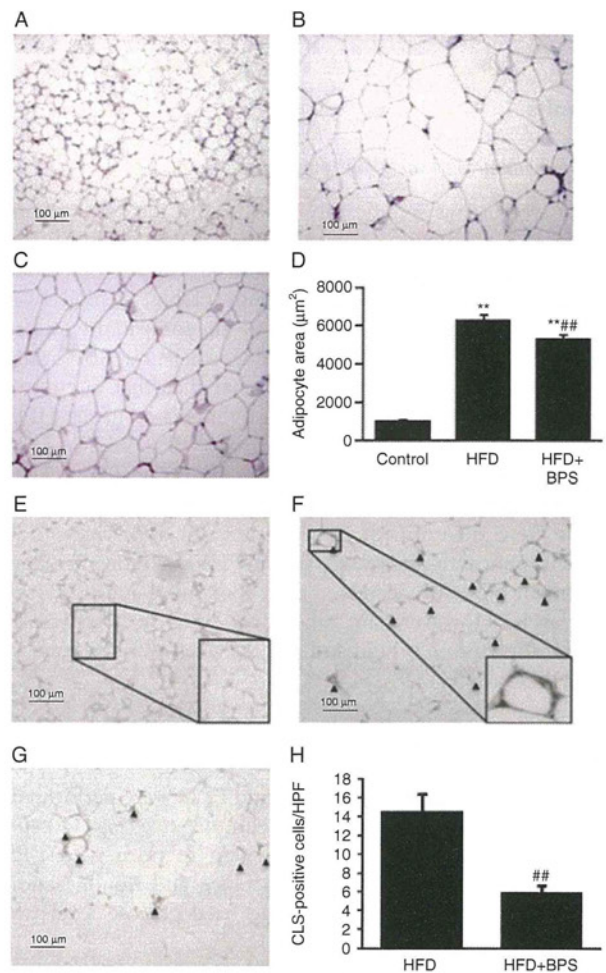


Figure 2 BPS treatment decreased adipocyte size and infiltration of macrophages in WAT. (A, B, and C) Representative microphotographs of H&E-stained sections of epididymal WAT from the control group (A), HFD group (B), and BPS group (C) are shown. Scale bar, 100 µm. (D) Bar graph indicates average adipocyte size of epididymal WAT, $n=5$ (control group; $n=3$). ** $P<0.01$ vs control. # $P<0.01$ vs HFD group. (E, F, and G) Representative microphotographs of WAT immunohistochemically stained with an anti-MAC3 antibody to stain macrophage in the control group (E), HFD group (F), and BPS group (G) are shown. Scale bar, 100 µm. (H) Bar graph indicates the number of CLSs in high power field (HPF), $n=7-8$. ## $P<0.01$ vs HFD group. Almost no CLS was observed in the control group.

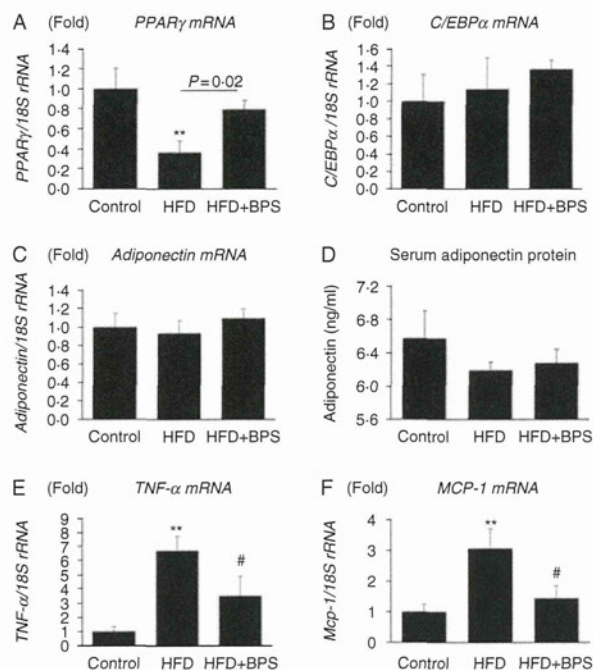


Figure 3 Effect of BPS on the adipocyte differentiation markers in WAT. (A, B and C) The results of real-time qPCR analysis for PPAR γ (A), C/EBP α (B), and adiponectin (C) are shown, $n=5$. ** $P<0.01$ vs control. (D) Serum adiponectin levels were determined by ELISA. (E and F) The results of real-time qPCR analysis for TNF- α (E) and MCP1 (F) expression in WAT are shown, $n=5$. ** $P<0.01$ vs control. # $P<0.05$ vs HFD group.

phosphorylation of IRS1 at serine residues that negatively regulate normal signaling through IRS1 (Aguirre *et al.* 2000, Shoelson *et al.* 2006). An absence of JNK1 (MAPK8) improved insulin sensitivity and enhanced insulin receptor signaling in diet-induced obesity mice and *ob/ob* genetic obesity mice (Hotamisligil *et al.* 1993, Hirosumi *et al.* 2002). In this study, BPS reduced mRNA expression of TNF- α in WAT from diet-induced obesity mice. Hence, we assume that reduction of TNF- α may contribute to the improvement of insulin action by BPS, at least in part. It is also expected that the signaling pathways activated by TNF- α are attenuated in the adipose tissue of BPS-treated mice. However, the effect of BPS seems to be multi-fold, such as reduction of MCP1. Therefore, it is difficult to determine specifically whether TNF- α -signaling is attenuated in this model. It is important to note that we must be cautious in extrapolating the data in this study to humans because TNF- α neutralizing antibodies have been shown to be ineffective on impacting insulin sensitivity in humans (Ofei *et al.* 1996).

Several studies showed anti-inflammatory effects of BPS. Ohta *et al.* (2005) showed that BPS suppressed concanavalin-A-induced TNF- α and INF- γ production and liver injury. It is also reported that BPS prevented the development of cigarette smoke extract-induced emphysema (Chen *et al.* 2009). Production of TNF- α and interleukin 1 β (IL β) in the lung

tissue was suppressed by BPS in this model. Although activation of prostacyclin receptor is suggested to be involved in the anti-inflammatory effect, the detailed mechanism of BPS suppression of inflammatory cytokine production is not clear and further study is needed.

Hypertrophied adipose tissue secretes MCP1 (Hotamisligil *et al.* 1995, Bruun *et al.* 2005). MCP1 attracts macrophages to adipose tissue (Kamei *et al.* 2006). It is suggested that infiltrated macrophages secrete MCP1 and proinflammatory cytokines such as TNF- α or IL6, indicating that macrophage infiltration and inflammation of WAT form a vicious circle (Suganami *et al.* 2005). It is also reported that transgenic overexpression of MCP1 in adipose tissue causes insulin resistance by direct attenuation of insulin signaling in skeletal muscle and liver and inflammation of adipose tissue (Kamei *et al.* 2006, Kanda *et al.* 2006). Therefore, MCP1 is thought to contribute to insulin resistance through paracrine and endocrine effects (Kamei *et al.* 2006). BPS reduced both MCP1 expression and macrophage infiltration, which may contribute to the improvement of glucose tolerance and insulin action.

PPAR γ has been known as a master regulator of adipocyte differentiation *in vivo* and *in vitro* (Rosen *et al.* 1999, Camp *et al.* 2002). PPAR γ ligands, such as thiazolidinediones, improve insulin sensitivity by increasing the number of small adipocytes secreting adiponectin and decrease the number of large adipocytes secreting TNF- α in WAT (Okuno *et al.* 1998, Yamauchi *et al.* 2001). We observed that treatment with BPS decreased the average size of adipocytes in epididymal WAT from diet-induced obese mice. Although statistical significance was marginal, it is plausible to assume that the increased PPAR γ by BPS may contribute to adipocyte

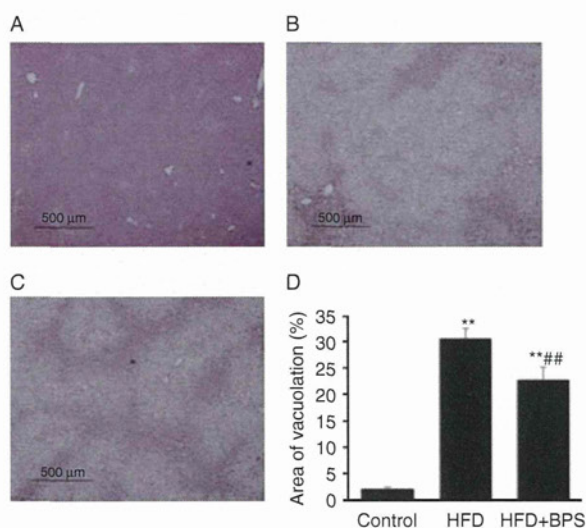


Figure 4 BPS attenuated HFD-induced hepatic steatosis. (A, B, and C) Representative microphotographs of H&E-stained sections of liver from the control group (A), HFD group (B), and BPS group (C) are shown. Scale bar, 500 μ m. (D) Bar graph indicates area of vacuolation, $n=5-8$. ** $P<0.01$ vs control. ** $P<0.01$ vs HFD group.

differentiation and improvement of insulin action. Because PPAR γ is known to inhibit NF- κ B, a transcription factor-mediated expression of inflammatory cytokines, BPS may suppress TNF- α and MCP1 expression through PPAR γ activation. Although the detailed mechanism of BPS upregulation of PPAR γ is not clear, a previous report showed that another prostacyclin analogue, treprostinil, activates PPAR γ through prostacyclin receptor-dependent and cAMP-independent mechanisms (Falcetti *et al.* 2007).

Adipocytes become hypertrophied as obesity progresses. It is suggested that these hypertrophied adipocytes secrete free fatty acid that contributes to fat accumulation in ectopic sites including liver and muscle, leading to the development of insulin resistance (Jacob *et al.* 1999, Bays *et al.* 2004, Hwang *et al.* 2007). Although the mechanism is not clear, BPS mildly decreased serum TC and TG levels (Table 2). A decrease in the serum TC and TG levels by BPS may contribute to the improvement of insulin action.

It is of note that BPS ameliorated hepatic steatosis induced by HFD. Although the precise mechanism is not clear, anti-inflammatory effects of BPS may play a role in the attenuation of hepatic steatosis because recent studies suggest that inflammation is one of the critical factors in the development of hepatic steatosis. It was reported that anti-TNF α antibody treatment improved hepatic steatosis in *ob/ob* mice (Li *et al.* 2003). Treatment with an inhibitor of MCP1 receptor reportedly attenuated insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice (Tamura *et al.* 2010). Therefore, reduction of fat accumulation in the liver by BPS treatment may be due to suppression of inflammatory cytokine expression, at least in part, as observed in WAT of the BPS group. However, it is not clear at this point whether cytokine levels in the liver are decreased in the BPS group, and further study is needed.

A recent study showed that BPS improves glucose metabolism in a genetic obesity-induced insulin resistance model (Sato *et al.* 2010). Although our data mostly agree with those by Sato *et al.* (2010), our study is also important because we showed beneficial effects of BPS on glucose metabolism in a diet-induced obesity model, which is more clinically relevant than a genetic model. In addition, our data suggest a possible involvement of anti-inflammatory effects of BPS in the improvement of impaired glucose metabolism, which was not obvious in the previous study by Sato *et al.* (2010).

Taken together, we showed in this study that BPS improved glucose tolerance in mice fed a HFD possibly through suppression of inflammatory cytokines in WAT and induction of adipocyte differentiation. BPS may be beneficial not only for the treatment of patients with peripheral artery disease or pulmonary hypertension but also for treatment of patients with insulin resistance.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported in part by a grant-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (19590867 to T I).

Author contribution statement

E I researched the data, contributed to discussion, wrote and reviewed/edited the manuscript. T I contributed to discussion and wrote and reviewed/edited the manuscript. K T and K S reviewed/edited the manuscript. H M, T H, J I, and A K researched the data.

Acknowledgement

The authors would like to thank the technical expertise of the Support Center for Education and Research, Kyushu University.

References

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R & White MF 2000 The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *Journal of Biological Chemistry* **275** 9047–9054. (doi:10.1074/jbc.275.12.9047)
- Bays H, Mandarino L & DeFronzo R 2004 Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89** 463–478. (doi:10.1210/jc.2003-030723)
- Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB & Richelsen B 2005 Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 2282–2289. (doi:10.1210/jc.2004-1696)
- Camp HS, Ren D & Leff T 2002 Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine* **8** 442–447. (doi:10.1016/S1471-4914(02)02396-1)
- Chen Y, Hanaoka M, Chen P, Droma Y, Voelkel NF & Kubo K 2009 Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **296** L648–L656. (doi:10.1152/ajplung.90270.2008)
- Falcetti E, Flavell DM, Staels B, Tinker A, Haworth SG & Clapp LH 2007 IP receptor-dependent activation of PPAR γ by stable prostacyclin analogues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **360** 821–827. (doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.135)
- Fujiwara K, Nagasaka A, Nagata M, Yamamoto K, Imamura S, Oda N, Sawai Y, Hayakawa N, Suzuki A & Itoh M 2004 A stable prostacyclin analogue reduces high serum TNF- α levels in diabetic patients. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **112** 390–394. (doi:10.1055/s-2004-821024)
- Goya K, Otsuki M, Xu X & Kasayama S 2003 Effects of the prostaglandin I₂ analogue, beraprost sodium, on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells and circulating vascular cell adhesion molecule-1 level in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **52** 192–198. (doi:10.1053/meta.2003.50025)
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M & Hotamisligil GS 2002 A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420** 333–336. (doi:10.1038/nature01137)
- Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259** 87–91. (doi:10.1126/science.7678183)

- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN & Spiegelman BM 1994a Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *PNAS* **91** 4854–4858. (doi:10.1073/pnas.91.11.4854)
- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D & Spiegelman BM 1994b Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Clinical Investigation* **94** 1543–1549. (doi:10.1172/JCI117495)
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson R & Spiegelman BM 1995 Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **95** 2409–2415. (doi:10.1172/JCI117936)
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF & Spiegelman BM 1996 IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271** 665–668. (doi:10.1126/science.271.5249.665)
- Hwang JH, Stein DT, Barzilai N, Cui MH, Tonelli J, Kishore P & Hawkins M 2007 Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: *in vivo* MR imaging and spectroscopy studies. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **293** E1663–E1669. (doi:10.1152/ajpendo.00590.2006)
- Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD *et al.* 1999 Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **48** 1113–1119. (doi:10.2337/diabetes.48.5.1113)
- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kovatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M *et al.* 2006 Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* **281** 26602–26614. (doi:10.1074/jbc.M601284200)
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K *et al.* 2006 MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* **116** 1494–1505. (doi:10.1172/JCI26498)
- Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY & Diehl AM 2003 Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **37** 343–350. (doi:10.1053/jhep.2003.50048)
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR & Flier JS 2001 A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* **294** 2166–2170. (doi:10.1126/science.1066285)
- Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M & Taylor R 1996 Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* **45** 881–885. (doi:10.2337/diabetes.45.7.881)
- Ohta S, Nakamura M, Fukushima M, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M & Nawata H 2005 Beraprost sodium, a prostacyclin (PGI) analogue, ameliorates concanavalin A-induced liver injury in mice. *Liver International* **25** 1061–1068. (doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01143.x)
- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H *et al.* 1998 Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *Journal of Clinical Investigation* **101** 1354–1361. (doi:10.1172/JCI1235)
- Olschewski H, Rose F, Schermuly R, Ghofrani HA, Enke B, Olschewski A & Seeger W 2004 Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics* **102** 139–153. (doi:10.1016/j.pharmthera.2004.01.003)
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM & Mortensen RM 1999 PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Cell* **4** 611–617. (doi:10.1016/S1097-2765(00)80211-7)
- Sato N, Kaneko M, Tamura M & Kurumatani H 2010 The prostacyclin analog beraprost sodium ameliorates characteristics of metabolic syndrome in obese Zucker (fatty) rats. *Diabetes* **59** 1092–1100. (doi:10.2337/db09-1432)
- Savage DB, Petersen KF & Shulman GI 2007 Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological Reviews* **87** 507–520. (doi:10.1152/physrev.00024.2006)
- Shoelson SE, Lee J & Goldfine AB 2006 Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **116** 1793–1801. (doi:10.1172/JCI29069)
- Suganami T, Nishida J & Ogawa Y 2005 A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25** 2062–2068. (doi:10.1161/01.ATV.0000183883.72263.13)
- Tamura Y, Sugimoto M, Murayama T, Minami M, Nishikaze Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kita T, Yokode M & Arai H 2010 C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **17** 219–228. (doi:10.5551/jat.3368)
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW & Hotamisligil GS 1997 Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* **389** 610–614. (doi:10.1038/39335)
- Wajchenberg BL 2000 Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* **21** 697–738. (doi:10.1210/er.21.6.697)
- Watanabe M, Nakashima H, Mochizuki S, Abe Y, Ishimura A, Ito K, Fukushima T, Miyake K, Ogahara S & Saito T 2009 Amelioration of diabetic nephropathy in OLETF rats by prostaglandin I(2) analog, beraprost sodium. *American Journal of Nephrology* **30** 1–11. (doi:10.1159/000195722)
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL & Ferrante AW Jr 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1796–1808. (doi:10.1172/JCI19246)
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL & Ferrante AW Jr 2006 CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation* **116** 115–124. (doi:10.1172/JCI24335)
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA *et al.* 2003 Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1821–1830. (doi:10.1172/JCI19451)
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N *et al.* 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* **7** 941–946. (doi:10.1038/90984)

Received in final form 25 March 2012

Accepted 29 March 2012

Made available online as an Accepted Preprint
29 March 2012



Acetylcholinesterase inhibitors attenuate angiogenesis

Ryohei MIYAZAKI*, Toshihiro ICHIKI*†, Toru HASHIMOTO*, Jiro IKEDA*, Aya KAMIHARAGUCHI*, Eriko NARABAYASHI*, Hirohide MATSUURA*, Kotaro TAKEDA*† and Kenji SUNAGAWA*

*Departments of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan, and

†Advanced Therapeutics for Cardiovascular Diseases, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

A B S T R A C T

Donepezil {(RS)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-one} is a reversible acetylcholinesterase inhibitor and used for treatment of patients with AD (Alzheimer's disease). Recent studies showed that treatment with donepezil reduced production of inflammatory cytokines in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells). It was also reported that muscle-derived inflammatory cytokines play a critical role in neovascularization in a hindlimb ischaemia model. We sought to determine whether donepezil affects angiogenesis. A hindlimb ischaemia model was created by unilateral femoral artery ligation. Blood flow recovery examined by laser Doppler perfusion imaging and capillary density by immunohistochemical staining of CD31-positive cells in the ischaemic hindlimb were significantly decreased in donepezil- and physostigmine-treated mice compared with control mice after 2 weeks. Donepezil reduced expression of IL (interleukin)-1 β and VEGF (vascular endothelial growth factor) in the ischaemic hindlimb. Intramuscular injections of IL-1 β to the ischaemic hindlimb reversed the donepezil-induced VEGF down-regulation and the anti-angiogenic effect. Hypoxia induced IL-1 β expression in C2C12 myoblast cells, which was inhibited by pre-incubation with ACh (acetylcholine) or LY294002, a PI3K (phosphoinositide 3-kinase) inhibitor. Donepezil inhibited phosphorylation of Akt [also known as PKB (protein kinase B)], a downstream kinase of PI3K, in the ischaemic hindlimb. These findings suggest that cholinergic stimulation by acetylcholinesterase inhibitors suppresses angiogenesis through inhibition of PI3K-mediated IL-1 β induction, which is followed by reduction of VEGF expression. Acetylcholinesterase inhibitor may be a novel anti-angiogenic therapy.

INTRODUCTION

Donepezil {(RS)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-one} is a specific and

reversible acetylcholinesterase inhibitor that increases bioavailability of ACh (acetylcholine), a neurotransmitter both in the CNS (central nervous system) and PNS (peripheral nervous system). Donepezil is used for

Key words: acetylcholinesterase inhibitor, angiogenesis, hindlimb ischaemia, interleukin-1 β .

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AD, Alzheimer's disease; bFGF, basic fibroblast growth factor; BP, blood pressure; CNS, central nervous system; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; donepezil, (RS)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-one; ERK, extracellular-signal-regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; HPF, high-power field; HR, heart rate; IL, interleukin; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LPS, lipopolysaccharide; mAChR, muscarinic ACh receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; nAChR, nicotinic ACh receptor; NF- κ B, nuclear factor κ B; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; qRT-PCR, quantitative reverse transcription-PCR; TNF α , tumour necrosis factor α ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Correspondence: Professor Toshihiro Ichiki (email ichiki@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp).