

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10302

研究課題名(和文) 虚血および再灌流時の脳組織代謝変化のオミクスによる包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of cerebral metabolic changes during ischemia-reperfusion by omics

研究代表者

細田 弘吉 (Hosoda, Kohkichi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90403261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、脳虚血再灌流時の脳虚血再灌流 heat shock protein 27 (HSP27)リン酸化亢進 G6PD活性亢進 NADPH/NADP+ ratio上昇を確認した。Ataxia telangiectasia mutated(ATM) kinase(HSP27リン酸化酵素)の阻害薬(KU-55933)により虚血再灌流時のHSP27リン酸化とG6PD活性亢進が阻害され、蛋白のカルボニル化も亢進し、脳梗塞も増大した。以上より、脳虚血再灌流時に、ATM kinaseによるHSP27リン酸化を介して活性酸素種に対処するという内因性抗酸化システムの存在が示された。

研究成果の概要(英文)：We performed comparative metabolic analysis of reperfusion effect on cerebral metabolism using rat middle cerebral artery occlusion (MCAO). Gas-chromatography/mass-spectrometry analysis showed metabolic changes that depended on reperfusion time. Enrichment analysis showed pentose phosphate pathway (PPP) was significantly upregulated during ischemia-reperfusion. Immunoblotting showed gradual increase in HSP27 and marked increase in HSP27 phosphorylation. G6PD activity was significantly elevated after 1-h MCAO (20%), reduced after 1-h reperfusion, and significantly elevated after 24-h reperfusion. The NADPH/NADP+ ratio displayed similar increasing pattern. ATM kinase inhibitor significantly reduced HSP27 phosphorylation and G6PD activity, significantly increased protein carbonyl, and resulted in increase in infarct size after reperfusion. Consequently, G6PD activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase may be part of endogenous antioxidant system during ischemia-reperfusion.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳虚血 メタボロミクス ペントースリン酸 NADPH

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、tPA による血流再開療法が確立されたとは言え、発症後 4.5 時間以内という適応制限により全脳梗塞患者の数%がその恩恵に預かるに過ぎず、さらなる治療法が必要である。時間制限の少ない治療開発の為に脳梗塞の病態解明は極めて重要である。

近年のメタボローム解析、トランスクリプトーム解析と言ったオミクス手法の発達により、低分子代謝物の変化や組織中の遺伝子発現の変化を網羅的に調べることが可能となった。しかし、脳虚血に関するオミクス解析研究は非常に少なく、脳梗塞患者血液のメタボローム解析が 2 件、ラット中大脳動脈閉塞モデルの血液と髄液のメタボローム解析が 1 件報告されているが、何れも、脳組織自体の解析を行ったものではない。

本研究は、ラットの虚血脳組織自体を対象としメタボローム解析とトランスクリプトーム解析を行い、その代謝変化を包括的に調べ、これを一次スクリーニングとして脳虚血や再灌流障害に特異的な代謝経路を同定しようとするものであり、このような研究の報告は他には殆ど見られない。

申請者は予備実験として、ラット中大脳動脈閉塞 2 時間後脳虚血組織のメタボローム解析を行い、90 種類の代謝物を用いた主成分分析や Heatmap により虚血群と対照群 (非虚血群) が分離されることを見出し、虚血群での代謝変化を既にある程度捉えている。これらの変化を pathway analysis により包括的代謝マップに描くと、解糖系の低下、TCA cycle やペントースリン酸経路の亢進が示唆された。さらに enrichment analysis により、虚血に関連する代謝経路を探索した。その結果の一部を挙げると、GABA の増加とグルタミン酸の低下から虚血時のグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の亢進が示唆された。また、別の結果としては、グルタチオン代謝の変化が見られ、脳虚血におけるグルタチオンの解毒作用の関与が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は、脳梗塞急性期の組織代謝の経時的変化をオミクスの手法を用いて解析することにより、虚血時脳組織の代謝経路・代謝物の特異な変化を明らかにし、脳梗塞の新たな治療法の開発へと展開する為の研究基盤を確立することを目的とする。

具体的な研究項目は、(1) ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて脳梗塞急性期及び再灌流時の組織代謝および発現遺伝子の経時的変化をメタボローム解析・トランスクリプトーム解析により解明する。(2) 特定された代謝経路の変化を RT-PCR、免疫染色、酵素活性の測定などの手法により精査し、脳虚血時の代謝の経時的変化の詳細を明らかにする。(3) 特定した代謝経路に影響する薬剤や代謝物の投与により虚血障害・再灌流障害が改善するかどうかを調べ、新たな脳梗塞治療

法開発へ応用する。の 3 つである。

## 3. 研究の方法

### I. ラット中大脳動脈閉塞モデルの作成

(1) 麻酔下に Wistar rat の内頸動脈を露出し nylon 糸 (スレッド) を挿入、脳血流を Fiber optic probe を用いてモニターしつつ、中大脳動脈を閉塞して脳梗塞を作成。

(2) 中大脳動脈閉塞前、閉塞後 30 分、120 分、180 分など経時的に脳梗塞部位と対側正常脳組織 (対照群) を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。

(3) 再灌流実験として、閉塞 30 分後にナイロン糸を抜去し、閉塞前、閉塞 30 分後、再灌流 60、120 分後など経時的に脳組織を採取して、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。

### II. 虚血脳組織のメタボローム解析

虚血脳組織から水溶性代謝物・脂溶性代謝物を抽出し、水溶性代謝物はオキシム化・トリメチルシリル誘導体化後、また脂溶性代謝物は加水分解後、得られる脂肪酸をメチル誘導体化し、ガスクロマトグラフ質量分析装置にかけてメタボローム解析を行う。

### III. 虚血脳組織のトランスクリプトーム解析

DNA マイクロアレイは RNA に相補的なオリゴヌクレオチド配列をチップの上に固定化したもので、RNA サンプルを蛍光標識しておいて、基盤とハイブリダイズさせることにより、数千から数万種類の RNA の量を測定する方法である。脳組織から total RNA を抽出し、マイクロアレイにより、脳梗塞群と対照群の遺伝子発現状態の相違、虚血時間の影響や再灌流の影響を調べる。

### IV. バイオインフォマティクスによる解析

一次スクリーニングとして、メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析の結果を、主成分分析、ヒートマップ、クラスター解析、部分最小二乗法などの多変量解析の手法を用いて解析し、脳虚血や再灌流障害において特異的に変化する代謝経路を同定し、その経時的変化を明らかにする。また、pathway analysis, enrichment analysis などの手法を用いて、変化している代謝物とそれに関与する遺伝子の発現の関係 (代謝酵素の遺伝子発現亢進あるいは減退など) を明らかにする。前述のごとく、申請者は予備実験により既に幾つかの代謝経路が変動することを確認している。

### V. 脳虚血特異的な代謝経路の精査

同定した脳虚血に特異的な代謝経路を標的を絞ったメタボローム解析、RT-PCR、免疫染色、酵素活性の測定などで精査し、脳虚血時あるいは再灌流時に特異的な代謝変化の詳細を明らかにする。

### VI. 再灌流障害に特異的な代謝経路の精査

同定した再灌流障害に特異的な代謝経路を標的を絞ったメタボローム解析、RT-PCR、免疫染色、酵素活性の測定などで精査し、脳虚血時あるいは再灌流時に特異的な代謝変化の詳細を明らかにする。

## VII. 特異的代謝経路を変化させる薬剤など脳梗塞予後への影響の検討

脳虚血や再灌流障害に特異的な代謝経路を抑制あるいは促進する薬剤の投与、脳虚血時に不足する代謝産物の投与などにより脳梗塞の軽減が起こるかどうかを調べる。ラット中大脳動脈閉塞モデルにより脳梗塞を作成し、前記薬剤や物質の投与により、脳梗塞のサイズが変化するかどうかを検討する。また、運動機能評価として、motor deficit score (MDS)(自発回転、前肢把握、角材歩行、後肢反射を4段階で評価)と後肢の協調性評価として beam walking test (角材歩行中の後肢の使い方を7段階で評価)を経時的に実施する。

### 4. 研究成果

#### 1. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた虚血時(再灌流無し)の脳組織における代謝変化

ラット中大脳動脈閉塞後(再灌流はなし)の脳虚血組織をガスクロマト質量分析装置(GC-MS)を用いて、網羅的に分析しメタボローム解析を行った。この結果を多変量解析により分析すると、主成分分析の scoreplot や Heatmap で虚血群と対照群(非虚血群)が綺麗に分離された。脳虚血特異的に変化する代謝経路を探索したところ、ペントースリン酸経路の亢進、ケトン体(hydroxybutyrate)の増加、GABAの増加などが示唆された。また、マイクロアレイ解析を行ったところ、脳虚血2時間後に Toll 様受容体シグナル経路と mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路が有意に亢進していることが判明した。MAPK シグナル経路の中でも、heat shock protein 27 (HSP27)の発現増加が注目された。何故なら、HSP27 はペントースリン酸経路の律速酵素である glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) の活性を亢進するからである。G6PD は NADPH を産生して還元型グルタチオンの再生産を促進、抗酸化状態を維持するのに貢献する。RT-PCR や Immunoblot により虚血時に G6PD の mRNA 量やタンパク量は変化しないが、リン酸化 HSP27 (pHSP27)は脳虚血後1時間で増加すること、G6PD の酵素活性は虚血2時間後に上昇すること、NADPH/NADP 比も虚血2時間後に上昇することを確認した。さらに、虚血時の HSP27 のリン酸化とそれに伴う G6PD の活性化は ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase の阻害薬 (KU-55933) の脳室内注入により阻害されることを見出した。以上より、再灌流を伴わない虚血早期において ATM kinase が関与する HSP27 リン酸化を介しての G6PD 活性化が NADPH を増加させ、虚血早期の内因性抗酸化機構として働いている可能性が示唆された。これらの結果をまとめ、論文として報告した (Neuroscience 349 (Mar 2017), 1-16)。

## II. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた虚血再灌流時の脳組織における代謝変化

ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、脳虚血再灌流時の脳組織をガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)を用いて、網羅的に分析しメタボローム解析を行った。この結果を多変量解析により分析すると、scoreplot で対照群と虚血群と虚血再灌流群が時間依存的に綺麗に分離された。この結果を用いて脳虚血再灌流時に特異的に変化する代謝経路をエンリッチメント解析で探索したところ、再灌流なしの虚血の際と同様に、ペントースリン酸経路の亢進が示唆された。さらに、免疫プロットにより再灌流時間に依存した heat shock protein 27 (HSP27)のリン酸化亢進も確認された。ペントースリン酸経路の律速酵素である Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)の酵素活性の測定、NADPH の測定などにより、脳虚血再灌流 HSP27 リン酸化亢進 G6PD 活性亢進 NADPH/NADP+ ratio 上昇という流れを確認した。さらに、Ataxia telangiectasia mutated(ATM) kinase(HSP27 リン酸化酵素)の阻害薬(KU-55933)により、中大脳動脈閉塞による脳虚血再灌流時に、HSP27 リン酸化と G6PD 活性亢進が阻害されること、蛋白のカルボニル化(酸化ストレスの指標)が増大すること、脳梗塞の体積が有意に増大することが確認された。以上より、脳虚血再灌流時に、ATM kinase による HSP27 リン酸化によって G6PD の活性が亢進し、さらに NADPH を増加させ還元型グルタチオンの再生産を促進して活性酸素種に対処するという内因性抗酸化システムの存在が示された。以上の結果をまとめ論文として報告した (Brain Res 1687:82-94, 2018)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Yamamoto Y, Hosoda K, Imahori T, Tanaka J, Matsuo K, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E: Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion. Brain Res. 査読有 2018 May 15;1687:82-94. 細田弘吉: くも膜下出血の診断に必要な検査と治療 臨床検査 査読なし 62:138-143, 2018

Yamamoto D, Hosoda K, Uchihashi Y, Fujita A, Sasayama T, Fujii M, Sugimura K, Kohta M, Kohmura E: Perioperative Changes in Cerebral Perfusion Territories Assessed by

Arterial Spin Labeling Magnetic Resonance Imaging Are Associated with Postoperative Increases in Cerebral Blood Flow in Patients with Carotid Stenosis. World Neurosurg. 査読有 2017 Jun;102:477-486.

Imahori T, Hosoda K, Nakai T, Yamamoto Y, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E: Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia. Neuroscience. 査読有 2017 May 4;349:1-16.

Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Sato N, Takeuchi Y, Kyotani K, Mukasa A, Mizukawa K, Sakata J, Yamamoto Y, Hosoda K, Itoh T, Sasaki R, Kohmura E: Diagnostic value of glutamate with 2-hydroxyglutarate in magnetic resonance spectroscopy for IDH1 mutant glioma. Neuro Oncol. 査読有 2016 Nov;18(11):1559-1568.

Imahori T, Hosoda K, Fujita A, Yamamoto Y, Mizowaki T, Miyake S, Kimura H, Kohta M, Kohmura E: Long-Term Outcomes of Carotid Endarterectomy and Carotid Artery Stenting for Carotid Artery Stenosis: Real-World Status in Japan. J Stroke Cerebrovasc Dis. 査読有 2016 May;25(5):1284-7.

Hosoda K: The Significance of Cerebral Hemodynamics Imaging in Carotid Endarterectomy: A Brief Review. Neurol Med Chir (Tokyo). 査読有 2015;55(10):782-8.

〔学会発表〕(計 18 件)

(国際学会 6件)

Matsuo K, Hosoda K, Tanaka J, Yamamoto Y, Imahori T, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Kohmura E: Upregulation of Pentose Phosphate Pathway after Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Cerebral Cortex: The Impact of Heat Shock Protein 27 Phosphorylation. International Stroke Conference 2018, Los Angeles (USA), 2018 Jan 24

Yamamoto Y, Hosoda K, Tanaka J, Imahori T, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Kohmura E: Combined Metabolic And Transcriptional Profiling Identifies Pentose Phosphate Pathway Activation by Heat Shock Protein 27 Phosphorylation During Cerebral Ischemia.

International Stroke Conference 2017, Houston (USA), 2017 Feb.23

Yamamoto Y, Hosoda K, Irino Y, Tanaka J, Imahori T, Nakai T, Kohmura E: Metabolomic Analysis of Ischemic Brain Tissue in Rats. International Stroke Conference 2016, Los Angeles (USA), 2016 Feb 17

Imahori T, Hosoda K, Irino Y, Nakai T, Yamamoto Y, Tanaka J, Kohmura E: Metabolic And Transcriptional Profiling Of Acute Cerebral Ischemia In Rats: Part 1. Changes Of Brain Tissue. Brain 2015, Vancouver (Canada), 2015 June 28

Yamamoto Y, Hosoda K, Imahori T, Irino Y, Tanaka J, Nakai T, Kohmura E: Metabolomics Profiling Of Acute Ischemia In Rats: Part 2. Metabolic Changes Of Blood Plasma. Brain 2015, Vancouver (Canada), 2015 June 28

Nakai T, Hosoda K, Imahori T, Shinohara M, Irino Y, Yoshida M, Kohmura E: Metabolic Profiling To Identify Distinct Changes Associated With Ischemic Cerebrovascular Events In Carotid Stenosis. Brain 2015, Vancouver (Canada), 2015 June 28

(国内学会 12件)

松尾和哉, 細田弘吉, 山本祐輔, 田中潤, 佐藤直子, 今堀太一郎, 中井友昭, 入野康宏, 篠原正和, 甲村英二. 虚血再灌流による脳皮質でのペントースリン酸経路賦活化の意義 Heat shock protein 27 リン酸化の役割. 第43回日本脳卒中学会学術集会 福岡国際会議場(福岡) 2018 3月15日

松尾和哉, 細田弘吉, 田中潤, 山本祐輔, 今堀太一郎, 中井友昭, 入野康宏, 篠原正和, 甲村英二. 虚血再灌流による脳皮質でのペントースリン酸経路賦活化の意義 - Heat shock protein 27 リン酸化の役割 - 第60回日本脳循環代謝学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(大阪) 2017 11月3日

山本祐輔, 細田弘吉, 松尾和哉, 田中潤, 今堀太一郎, 中井友昭, 入野康宏, 篠原正和, 甲村英二. 虚血後再灌流の際に大脳皮質では Heat shock protein27 のリン酸化を介して ペントースリン酸経路の活性化が起こり内因性抗酸化機構として働く. 日本脳神経外科学会第76回学術総会 名古屋国際会議場(名古屋) 2017 10月12日

細田弘吉, 今堀太一郎, 山本祐輔, 田中潤, 中井友昭, 入野康宏, 篠原正和, 松尾和哉, 甲村英二. オミクス解析を用いた虚血中脳組織代謝変化の探索と内因性抗酸化機構としての HSP27 リン酸化を介するペントースリン酸経路活性化

の同定．第 18 回日本分子脳神経外科学会 日本分子脳神経外科学会 ホテルクラウンヒルズ甲府（山梨）2017 8月 25 日

山本祐輔、細田弘吉、入野康宏、篠原正和、今堀太一郎、中井友昭、入野康宏、篠原正和、甲村英二 .虚血後再灌流による脳皮質でのペントースリン酸経路の賦活化 オミクス解析による分析と Heat shock protein 27 の関与 第 18 回日本分子脳神経外科学会 ホテルクラウンヒルズ甲府（山梨） 2017 8月 26 日

山本祐輔、細田弘吉、入野康宏、篠原正和、今堀太一郎、田中潤、中井友昭、甲村英二 .虚血脳組織のオミクス解析による脳虚血中 HSP27 リン酸化を介するペントースリン酸経路活性化の同定．第 42 回日本脳卒中学会学術集会 大阪国際会議場（大阪）2017 3月 16 日

山本祐輔、細田弘吉、入野康宏、篠原正和、今堀太一郎、田中潤、中井友昭、甲村英二 .虚血脳組織のオミクス解析による脳虚血中 HSP27 リン酸化を介するペントースリン酸経路活性化の同定 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会 徳島市あわぎんホール（徳島）2016 11 月 11 日

山本祐輔、細田弘吉、入野康宏、篠原正和、今堀太一郎、田中潤、中井友昭、甲村英二 .虚血脳組織のオミクス解析による脳虚血中 HSP27 リン酸化を介するペントースリン酸経路活性化の同定 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会 福岡国際会議場（福岡）2016 9月 30 日

山本祐輔、細田弘吉、入野康宏、篠原正和、今堀太一郎、田中潤、中井友昭、甲村英二 .虚血脳組織のオミクス解析による脳虚血中 HSP27 リン酸化を介するペントースリン酸経路活性化の同定 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会 福岡国際会議場（福岡）2016 9月

今堀太一郎、細田弘吉、中井友昭、入野康宏、篠原正和、山本祐輔、田中潤、甲村英二 .急性期脳虚血における脳組織代謝変化のオミクス解析に基づく新たな治療ターゲットの探索 第 41 回日本脳卒中学会学術集会 ロイトン札幌（札幌）2016 4月 14 日

山本祐輔、細田弘吉、入野康宏、田中潤、中井友昭、今堀太一郎、甲村英二 .ラットにおける虚血時脳組織代謝変化のメタボローム解析．第 27 回日本脳循環代謝学会総会 富山国際会議場（富山）2015 年 10 月 31 日

今堀太一郎、細田弘吉、入野康弘、山本祐輔、田中潤、中井友昭、甲村英二 .急性期脳虚血代謝物変動の包括的メタボローム解析によるバイオマーカー探索．日本脳神経外科学会第 74 回学術総

会 ロイトン札幌（札幌） 2015 10月 16 日

〔図書〕(計 1 件)

細田弘吉：「頸動脈内膜剥離術（CEA）における脳循環動態画像の意義」脳卒中における脳循環代謝画像のすべて 編集：小笠原邦明 にゅーろん社，2015

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

細田 弘吉 (HOSODA KOHKICHI)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：90403261

### (2)研究分担者

篠山 隆司 (SASAYAMA TAKASHI)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10379399

甲村 英二 (KOHMURA EIJI)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30225388

篠原 正和 (SHINOHARA MASAKAZU)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80437483

### (3)連携研究者