

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10315

研究課題名(和文) 内因性一酸化炭素による脳梗塞時の代謝血流維持機構の解明

研究課題名(英文) Protective effects of endogenous carbon monoxide on cerebral energy metabolism during acute focal brain ischemia

研究代表者

森川 隆之 (Takayuki, Morikawa)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80465012

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)：脳でヘムオキシゲナーゼ-2 (HO-2) により産生される一酸化炭素 (CO) の役割を明らかにすることを目的とした。まず網羅的代謝解析と生体イメージングにより、野生型マウスとHO-2欠損マウスの脳血流代謝を比較することで、COは定常状態の脳でエネルギー代謝と血流を抑制していることを示唆する知見を得た。また脳虚血モデルマウスを用い、脳梗塞時には健常側においてもHO-2が機能しないとエネルギー代謝が大きく損なわれることを予測させる証左を得た。これらの知見によりCOは定常時にエネルギー代謝および血流を抑制することで、脳虚血に対応するための予備能を備える役割を担っている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Brain generates a micromolar order of carbon monoxide (CO) via heme oxygenase (HO) reactions. In this study, we examined the hypothesis that the deletion of HO-2 exacerbates cerebral energy metabolism during acute focal brain ischemia. We conducted quantitative imaging mass spectrometry (Q-IMS) analysis for adenylates and lactate to decipher local cerebral responses of energy metabolism from wild-type (WT) and HO-2-null mice that underwent a 60-min occlusion of the left middle cerebral artery. Striking differences were found in the contralateral hemispheres, where the levels of ADP, AMP and lactate in HO-2-null mice were higher than those in WT mice. These results suggest that the HO-2/CO system plays roles in protecting against ischemia not only at the ischemic core where the severe reduction of blood flow occurs, but it also protects even more effectively in the trans-hemispheric regions where only a subtle reduction of blood flow takes place.

研究分野：生体イメージング

キーワード：一酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

日本国内の脳梗塞による死亡数は毎年 7 万人を超える高いレベルを維持している。さらに本疾患は予後が非常に悪く、介護が必要となる原因のトップともなっている。この虚血によりもたらされる病態の治療として、従来から脳循環代謝の改善を狙った薬剤の投与が行われてきたが、十分な治療効果が見られないケースも少なくない。したがって脳梗塞時の循環代謝の改善のための新たなターゲットの探索は、脳梗塞の根治を目指した治療法の確立のために急務であると言える。そこで脳虚血時の脳循環代謝改善の戦略として、脳内に広がる種々の内因性のガス分子による代謝ネットワークに着目した。

研究開始当初、脳血流の内因性のガス分子による制御機構は、*in vivo* イメージングの技術の発達により、徐々に明らかになってきていた。まず、くも膜下腔では heme oxygenase (HO) -2 から産生される一酸化炭素 (CO) が血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) の産生酵素、nitric oxide synthase (NOS) の活性を恒常的に抑制することで血管のトーンスを保っていることが、マウスの cranial window 法を用いた *in vivo* での知見により明らかとなっていた (Ishikawa et al., Circulation research, 2005)。また、当研究代表者らは脳実質においても神経細胞の HO-2 により産生されている CO は、血管拡張因子である硫化水素 (H₂S) を産生する酵素、cystathionine β-synthase (CBS) の活性を阻害することで血管のトーンスを保っている可能性を、多光子レーザー顕微鏡で脳実質の血流を捉えることにより示した。さらに、CO はヘムと酸素を基質として HO によって産生されることから、低酸素時には CO 産生が減少し、CO による H₂S 産生抑制が解除されることが、脳における低酸素性の血管拡張の一機序であることを明らかにした (Morikawa et al., PNAS, 2012)。

これら一連の研究の過程で、脳での CO の産生が減少していると考えられる HO-2 knock out (KO) マウスでは、大脳皮質でアデノシン 3 リン酸 (ATP) の濃度が高いことを見出した。これは脳実質での CO の標的分子が CBS だけではなく、ATP 産生に関わる解糖系や TCA サイクルといったグルコースの代謝経路や、ミトコンドリアの呼吸鎖にも存在している可能性を意味する。さらに CO がグルコース代謝を抑制するという事は、グルコースの代謝産物であり、かつ強力な血管拡張因子である CO₂ の産生が、CO の制御下に置かれていることも示唆されていたという状況が研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

脳において神経細胞から恒常的に産生されている CO は、脳血流 ATP 産生を抑制していることがマウスを用いた実験から示唆されていたが、そのメカニズムや意義は未解明で

あった。そこで CO 産生酵素である HO-2 が酸素濃度依存性に CO を産生することに着目し、虚血などの低酸素時には CO 産生が減少し、ATP の産生抑制作用が弱まることで、エネルギー代謝が保たれていると考えた。これら仮説の検証により、脳で HO-2 により産生される CO の、グルコース代謝と CO₂ 産生抑制作用による、脳血流代謝調節機構の存在の検証と、その生理的、または脳虚血時における役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳の代謝物濃度の測定

CO による脳でのグルコース代謝の制御ポイントを探るため、定常状態での脳のメタボローム解析を行い、グルコース代謝産物の濃度を野生型マウスと HO-2 KO マウスとで比較した。まず、マウス脳サンプルの採取に当たっては、分解速度の速いエネルギー代謝物の迅速な固定に、麻酔下での *in situ* freezing (ISF) 法を用いた。代謝物の測定にはキャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE-MS, Agilent) を使用し、野生型マウスと HO-2 KO マウスの脳の代謝物の濃度を比較することで、CO によるグルコース代謝に及ぼす作用を探った。

(2) 脳の CO₂ 産生能の測定

CO による CO₂ 産生制御の可能性を検証するため、脳の CO₂ の産生能を野生型マウスと HO-2 KO マウスとで比較した。そのために ¹³C-グルコース投与 10 分後のマウスの脳を ISF 法により採取し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) で ¹³CO₂ の濃度を測定した。これにより単位時間内にグルコースが代謝されて産生される CO₂ の量を野生型マウスと HO-2 KO マウスとで比較した。

(3) 脳血流の測定

CO により脳血流が抑制されているかどうかを検証するため、脳実質の血管径と血流速度を測定し、野生型マウスと HO-2 KO マウスとで比較した。麻酔したマウスの頭蓋骨を厚さ 30 ~ 40 μm の厚さに削り、そこから多光子レーザー顕微鏡 (FV-1000MPE, Olympus) で、脳表から約 100 μm の深さの脳の実質の血管径と、赤血球速度を記録した。血管径はマウスの大動脈から蛍光試薬 Qdot-655 を注入することで血管を可視化した上で計測した。このとき、血管内の赤血球が黒く抜けて見えるので、その速度を測定し、血流速度とした。さらに血管径と赤血球速度から、血流量を算出した。

(4) 脳梗塞モデルマウスの作成

脳梗塞のモデルとして、マウス中大脳動脈梗塞 (MCAO) モデルを用いた。麻酔したマウスの外頸動脈から、先端を 220 μm の太さに加工したナイロン糸を血管内に挿入し、内頸動脈を経由して中大脳動脈を閉塞した。閉塞から 60 分後に ISF 法により代謝物を固定し、脳を採取し、その後の解析に用いた。

(5) 梗塞時の脳の代謝物、CO₂ 産生能、血流の

測定

梗塞時の脳のグルコース代謝産物の濃度と脳血流を野生型マウスと HO-2 KO マウスとで比較した。これにより、仮説として挙げた、CO によるグルコース代謝の抑制作用が、梗塞時に低下しているかどうかを検証した。

(6) 梗塞時のエネルギー代謝の解析

梗塞部位特異的な代謝の変動を精査するために、定量的イメージング質量分析 (IMS) を行った。ISF 法により代謝物を固定した脳梗塞モデルマウスの脳の 10 μm 厚の切片を作成し、MALDI イメージング質量分析装置によって代謝物をイメージングした。この結果に CE-MS による代謝物の定量データを組み合わせることで、定量性を持った代謝物イメージングを行う。これにより、梗塞部位と非梗塞部位のエネルギー代謝物の濃度分布を野生型と HO-2 KO で比較し、仮説として提示した CO による脳梗塞時のエネルギー代謝の低下を防ぐ作用が見られるかどうか検証した。

4. 研究成果

先行研究の成果から、HO-2KO マウスの脳の ATP 濃度は、野生型マウスと比較して皮質や海馬において高いことが示唆されている。そこでまず ATP の主要な産生系であるグルコース代謝を含めた、物質代謝における CO の役割を検証するため、HO-2 KO マウスの脳の網羅的代謝解析を行った (野生型マウス: n=9, HO-2 KO マウス: n=9)。クラスター解析の結果、定常状態においてグルコース 6-リン酸やフルクトース 6-リン酸を初めとした解糖系、またイソクエン酸や 2-オキソグルタル酸といったクエン酸サイクルの代謝産物の代謝産物が、野生型マウスと比較して HO-2 KO マウスで高値を示すクラスターに含まれることが分かった。このことから CO は定常状態において解糖系やクエン酸サイクルの流速を抑制していることが予想された。一方で HO-2 KO マウスの脳の ATP が高値を示す要因のひとつとして、CO 産生の減少による脳血流量の増加が原因であることも考えられた。この仮説を検証するため、多光子レーザー顕微鏡を用い、マウスの大脳皮質の毛細血管、前毛細血管及び細動脈の血流速度を測定した (野生型マウス: n=9, HO-2 KO マウス: n=9)。その結果、野生型マウスと比較して、HO-2 KO マウスでは血流速度が速いことを示すデータが得られ、CO が脳局所において血流を抑制する働きをしていることが示唆された。HO-2 から産生される CO は低酸素時における予備能を付与する役目を担っていることが先行研究の結果から予見されているが、ここまでで得られた知見はこのメカニズムの全貌を明らかにするための重要な布石となるという意義を持つと考えられた。

これらの結果を踏まえ、次に脳局所でのグルコースや酸素低下時における予備能を CO が担っている可能性について検証した。まず

メタボローム解析によって MCAO モデルでの脳局所虚血 60 分における代謝物の動態を、野生型マウス (n=10) と HO-2 KO マウス (n=8) とで比較した。クラスター解析の結果、野生型マウスよりも HO-2 KO マウスで、虚血時に大きく減少している代謝物のクラスターには、ATP などの高エネルギーリン酸化化合物が含まれていた。このことから虚血時に HO-2 がエネルギー代謝に関与する代謝物を維持する役割を担っていることが示唆された。さらに、野生型マウスと HO-2 KO マウスとで、MCAO によりエネルギー代謝が障害を受けている部位の大きさを比較するため、エネルギー代謝物の定量的質量イメージングを施行した。その結果、MCAO によって ATP が低下し、ADP、AMP が上昇している部位は、野生型マウスと比較して HO-2 KO マウスでは広範に及ぶことがわかった。これらの結果から、脳で HO-2 から産生される CO は脳虚血時に ATP 濃度の減少を抑制することで、梗塞による障害を軽減する役割を担っている可能性が示唆された。

さらにマウスの脳における CO による CO₂ の産生制御、及び脳虚血時の血流維持の可能性について検証した。まず定常状態の野生型マウスと HO-2 KO マウスの脳の CO₂ 濃度をガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定した。¹³C 標識グルコース投与 10 分後、野生型マウスと比較して HO-2 KO マウスの脳では ¹³CO₂ の濃度が高い傾向が見られ、定常状態で CO は解糖系の flux を抑制することで CO₂ 産生を低値に保っている可能性が示唆された。次に MCAO による局所脳虚血モデルにより、脳梗塞時における HO-2 の CO₂ 産生に及ぼす影響について検討を加えた。¹³C グルコースを投与した HO-2 KO マウスの ¹³CO₂ 濃度は、特に非虚血側において野生型マウスと比較して約 75% に減少していた。このことから脳梗塞時には HO-2 は非虚血部位においても CO₂ 産生を一定のレベルに保つ役割を担っていることが示唆された。また多光子レーザー顕微鏡による局所脳血流の測定を行い、脳虚血時に HO-2 によって保たれていることが予想される CO₂ が脳血流を維持する可能性について検証した。マウスの総頸動脈に遠隔操作可能な血管結紮用のデバイスを設置し、多光子レーザー顕微鏡で全脳虚血前後の脳局所血流を測定した。結果、脳全体が虚血に陥った場合では HO-2 による CO₂ の産生制御は脳血流の維持には寄与しない可能性が示された。これらの知見は研究期間前半で得られた CO によるグルコース代謝制御と、その脳虚血時の役割をより詳細に示した意義を持つ。また脳のエネルギー代謝制御における HO-2 による低酸素応答の *in vivo* での検討結果は、脳血流制御において局所血流での CO の果たす役割が高いことを示唆した点においても重要な知見であると考えられる。

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 9 件)

Shiota M, Naya M, Yamamoto T, Hishiki T, Tani T, Takahashi H, Kubo A, Koike D, Itoh M, Ohmura M, Kabe Y, Sugiura Y, Hiraoka N, Morikawa T, Takubo K, Suina K, Nagashima H, Sampetean O, Nagano O, Saya H, Yamazoe S, Watanabe H, Suematsu M.

Gold-nanofève surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival

Nat Commun. 査読あり, 2018 Apr 19;9(1):1561.

doi: 10.1038/s41467-018-03899-1

Goto S, Morikawa T, Kubo A, Takubo K, Fukuda K, Kajimura M, Suematsu M

Quantitative imaging mass spectroscopy reveals roles of heme oxygenase-2 for protecting against transhemispheric diaschisis in the brain ischemia

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読あり, 2018

doi : 10.3164/jcfn.17-136

Takubo K, Morikawa T, Kobayashi H.

Abnormal hematopoiesis and hematopoietic stem cell niche

Rinsho Ketsueki. 査読あり, 2017;58(10):1844-1850.

doi: 10.11406/rinketsu.58.1844

Morikawa T, Takubo K.

Use of imaging techniques to illuminate dynamics of hematopoietic stem cells and their Niches

Front Cell Dev Biol. 査読あり, 2017 Jun 13;5:62.

doi: 10.3389/fcell.2017.00062

Ishikawa M, Kajimura M, Morikawa T, Tsukada K, Tsuji T, Kusaka G, Tanaka Y, Suematsu M.

Cortical microcirculatory disturbance in the super acute phase of subarachnoid hemorrhage - In vivo analysis using two-photon laser scanning microscopy

J Neurol Sci. 査読あり, 2016 Sep 15;368:326-33.

doi: 10.1016/j.jns.2016.06.067

Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK, Soga T, Otsu K, Suematsu M, Okamoto S, Suda T, Takubo K.

p38 α Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress

Cell Stem Cell. 査読あり, 2016 Aug 4;19(2):192-204.

doi: 10.1016/j.stem.2016.05.013.

Tsuchihashi K, Okazaki S, Ohmura M,

Ishikawa M, Sampetean O, Onishi N, Wakimoto H, Yoshikawa M, Seishima R, Iwasaki Y, Morikawa T, Abe S, Takao A, Shimizu M, Masuko T, Nagane M, Furnari FB, Akiyama T, Suematsu M, Baba E, Akashi K, Saya H, Nagano O

The EGF Receptor Promotes the Malignant Potential of Glioma by Regulating Amino Acid Transport System xc(-)

Cancer Res. 査読あり, 2016 May 15;76(10):2954-63.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2121.

Ishikawa M, Kajimura M, Morikawa T, Tsukada K, Tsuji T, Kusaka G, Tanaka Y, Suematsu M.

Leukocyte plugging and cortical capillary flow after subarachnoid hemorrhage

Acta Neurochir (Wien), 査読あり, 2016 Jun;158(6):1057-67.

doi: 10.1007/s00701-016-2792-6

Morikawa T, Takubo K

Hypoxia regulates the hematopoietic stem cell niche

Pflugers Arch. 査読あり, 2015 Oct 21.

doi : 10.1007/s00424-015-1743-z

〔学会発表〕(計 1 件)

Morikawa T, Hoshino T, Yoshioka T, Kubo A, Goto S, Sugiura Y, Hishiki T, Suematsu M and Kajimura M

Deletion of heme oxygenase-2 exacerbates cerebral energy metabolism during acute focal brain ischemia

The 10th world congress for microcirculation
2015 年 9 月 25 日-27 日

6 . 研究組織

研究代表者

森川 隆之 (Takayuki Morikawa)

国立国際医療研究センター研究所・生体恒常性プロジェクト・研究員

研究者番号 : 80465012