

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19425

研究課題名(和文)水素吸入療法の分子メカニズムの解明：代謝解剖学的アプローチを用いて

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of hydrogen inhalation

研究代表者

後藤 信一 (Goto, Shinichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50770864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当教室で開発された定量的質量分析イメージング(Q-IMS)を用いて脳内の解剖学的分布を含めて代謝物のプロファイリングを行った。また、複数の個体におけるQ-IMSのデータを効率的に比較する技術の応用に関して論文発表を行った。

水素の脳梗塞巣到達経路解明のためにコンピュータシミュレーションと水素電極による水素濃度の測定を行った。単純拡散で水素が梗塞部位に到達している可能性が示唆された。この仮説を検証するために気相からの距離を変化させ、各部位での水素濃度を測定したが、マウスの脳では小さ過ぎたため、有用な結果が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular target of hydrogen, we compared multiple metabolites between stroke model mice treated with hydrogen inhalation or control. We have published a research paper on the utilization of this technology. To elucidate how the hydrogen molecule reach the stroke area, we have performed computer simulation in combination with actual measurements of hydrogen in the brain. These results suggested simple diffusion of hydrogen gas. To confirm this finding, we measured the hydrogen concentration in locations with different distances from the air way in the brain. This did not give meaning full results mainly because the size of brain was too small in mice.

研究分野：循環器内科

キーワード：水素 吸入 脳梗塞 代謝

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は日本人の死因第3位の疾患であるのみならず、神経学的後遺症を残し寝たきりになるリスクもあるなど健康寿命を著しく障害する疾患である(Shinohara et.al *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011). 脳梗塞の治療である血栓溶解療法は適応が狭く、出血の副作用があるという問題点があり新たな治療法が必要である。脳梗塞治療において現在最も重要と考えられていることは早期に治療を開始することである。しかし、脳梗塞と症状が類似する脳出血では、逆に血栓溶解療法は禁忌であるため、治療開始前に画像検査により出血と梗塞を鑑別する必要がある、このことが治療開始を遅らせる原因の一つであった。研究開始当初より、水素吸入療法はマウス脳梗塞モデルの梗塞巣を著明に縮小することが報告されていた(Ohsawa et.al *Nat Med* 2007)。さらに、水素投与は脳梗塞のみならず、脳出血(Manaenko et.al *Acta Neurochir Supple* 2011)やくも膜下出血(Zhan et.al *Crit Care Med* 2013)などの頭蓋内出血の動物モデルにおいても予後改善効果が得られる可能性が示唆されている。脳梗塞に対しての水素吸入療法が臨床応用できれば、脳梗塞と出血を鑑別するための画像検査が不要になり救急車内で治療が開始できるようになる可能性がある。これが実現できれば治療開始が早まり脳梗塞の予後を改善できることが推察された。申請者は、代謝物のイメージングによる作用機序の解明および水素の梗塞巣到達経路の解明を通して、水素の臨床応用加速を目指した。

2. 研究の目的

脳梗塞の予後を改善するため水素吸入療法を早期にヒトへ応用することが望まれる。しかし、作用の分子メカニズムや梗塞巣への到達経路は不明であり、臨床研究実施の障害になっている。早期の臨床応用を目指し、臨床研究への橋渡しを行うため、本研究では(1)脳梗塞における水素吸入療法の標的分子の解明および(2)水素吸入による梗塞巣内への水素の到達経路の解明の2点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 1つ目の目的である水素の作用機序を解明するため、脳梗塞モデルマウスを用いて水素吸入群とコントロール群の間で代謝物を比較し、プロファイリングを行った。代謝物は、当研究室で開発された定量的質量分析イメージングにより測定した。定量的質量分析は代謝物の生体内での分布を測定可能な一方、定量性がないため群間比較ができない技術である imaging mass spectrometry (IMS) と、組織をすり潰す必要があることから分布が不明になってしまうものの、代謝物の絶対定量ができるため群間比較可能な capillary

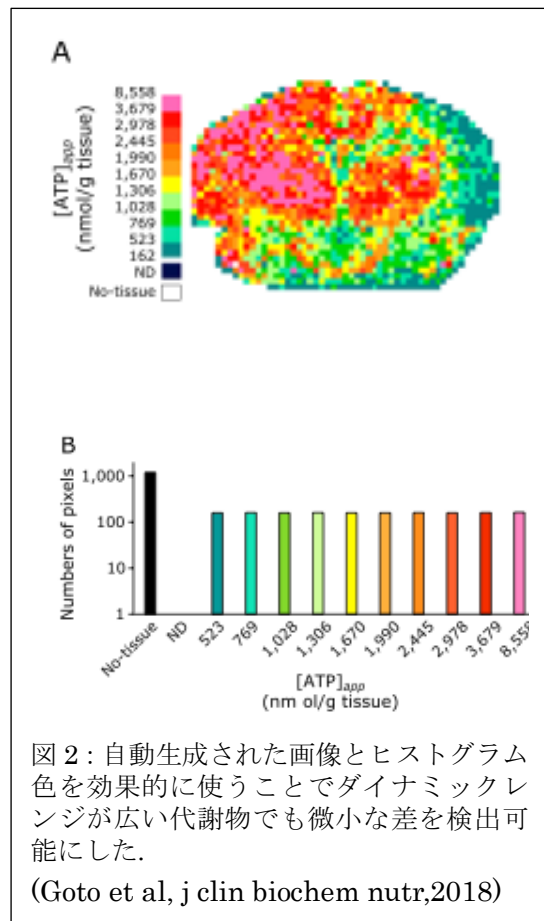
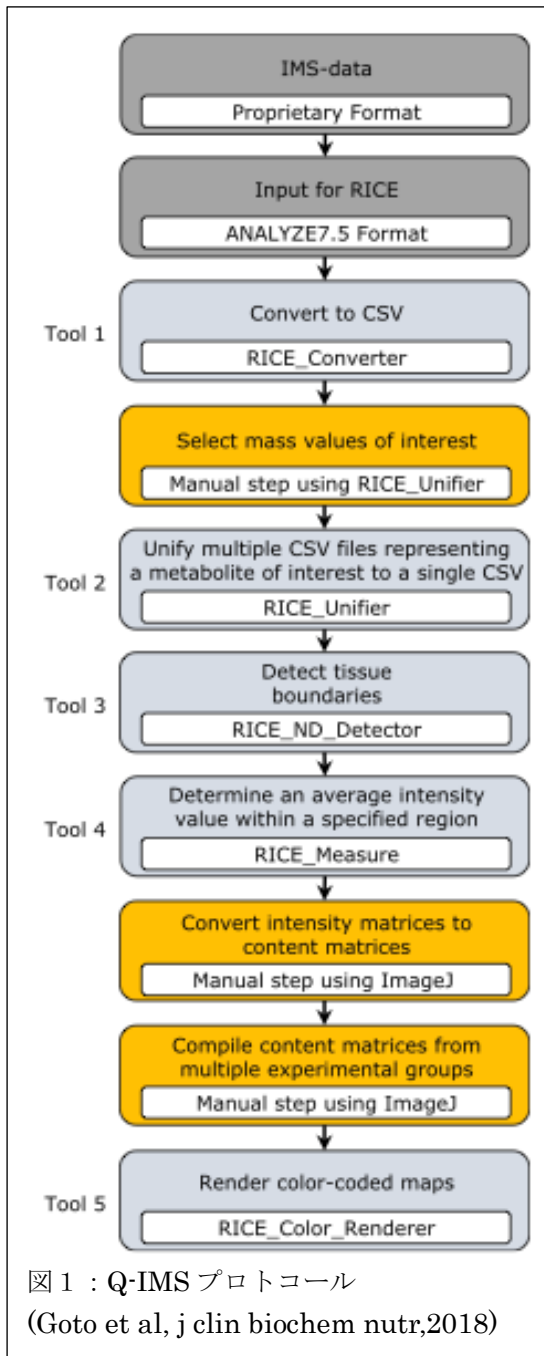
electrophoresis mass spectrometry (CE-MS) とを組み合わせることで、代謝物の分布を保ったまま群間比較を可能にする技術である。この方法を用いることで、代謝物のプロファイリングを解剖学的・機能的部位ごとに詳細に行うことを可能にした。

(2) 2つ目の目的である水素の梗塞巣への到達経路を解明するために、気相から脳への水素の拡散をコンピュータシミュレーションにより計算した。このシミュレーションでは、気相では空気中における水素拡散定数を用いて、脳内では水の水素拡散定数を用いて計算を行った。水素は骨を透過しないと仮定した。この計算では血流の影響は考慮しなかった。次に、脳梗塞部位における水素の濃度を水素電極で測定した。水素電極は特定濃度の水素でバブリングした水素水の水素濃度でキャリブレーションを行った。さらに、水素が単純拡散で脳内に分布することを検証するために、気相からの距離の異なる複数の点で、同様に水素濃度の測定を行った。

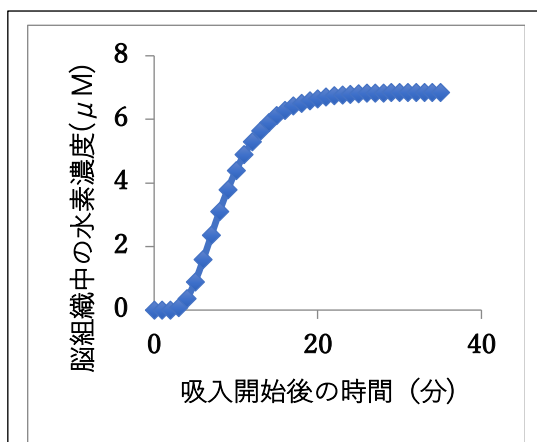
4. 研究成果

(1) 水素の作用メカニズムの解明では、定量的代謝物イメージングを行うことで、水素吸入群とコントロール群において代謝物の分布および絶対量が大きく変化するものが見出された。水素が生体高分子に作用しその分子の機能を変化させるのであれば、その痕跡は結果として代謝物に現れるはずである。このことから、これらの代謝物のプロファイリングを行い、関与する生体高分子を推定した。結果として2つの生体高分子が標的となる可能性が示唆された。この研究を行うためには定量的代謝物イメージングにより、複数の代謝物について複数の動物における比較を行う必要があった。定量的質量分析イメージングは各部位における代謝物濃度を人の手で一つ一つ計算する手法であったため、そのままではこのような解析に使用するには不适当であった。本研究では、効率的に定量的質量分析イメージングを行うことができるプロトコルを作成(図1)し、オリジナルのソフトウェアを作成することでこの問題をクリアした。この手法を用いることで、比較に適した画像を自動的に生成することができた(図2)。このソフトウェアに関しては、学会発表および論文発表を行った。次に推定された分子が実際に水素の標的であることを検証するための研究を開始した。このためには、単離した標的分子に水素をバブリングにより暴露し、活性の変化を測定する必要がある。ガスをバブリングして酵素活性を測定するなどの手技は、当研究室では確立されたものであったが、水素は爆発する可能性のある分子であり、安全に単離した生体高分子に暴露させるためには、新たな手法が必要であった。様々な手法を試した結果、排気に含まれる水素をゆっくりと

酸素と反応させることで、安全に水素の暴露を行うプロトコルを確立した。しかし、このプロトコルの作成に多大な時間を要したため、実際の測定を研究期間内に行うことができなかった。今後確立されたプロトコルを行いこの研究を完遂させる。



(2) 水素の脳梗塞巣への到達経路解明では、まず、コンピュータシミュレーションにより単純拡散のみで脳梗塞周囲の水素濃度が $7\mu\text{M}$ 程度まで上昇することが計算された(図3)。また、水素吸入させたマウスを用いて実際に測定した結果からも、同様の部位における水素濃度は $7\mu\text{M}$ 程度であり、単純拡散のみで達成できる濃度と差がなかった。実際に生体内でも単純拡散により代謝物が到達していることを検証するため、気相からの距離の違う複数の点において水素濃度の測定を試みた。



この実験では、マウス脳が小さいため十分に距離を変化させることができず、結論は得られなかった。今後さらに大きな動物を用いて同様の実験を行うことが必要と考える。

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 1件)

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, 2018, adypub doi:10.3164/jcfn.17-136 著者数:7 研究代表者:1人目 査読あり

[学会発表] (計 1件)

Goto S et al. RICE:Rapid Image Contrast Enhancement. A method enabling quantitative intergroup comparison of local metabolite distributions acquired by MALDI imaging mass spectrometry. 第41回日本微小循環学会 2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 信一 (Goto, Shinichi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号 : 50770864