

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17579

研究課題名(和文) 心臓におけるin vivo 四次元代謝イメージング技術の開発と応用

研究課題名(英文) Development of in vivo four-dimensional [4D] metabolism imaging

研究代表者

勝俣 良紀 (KATSUMATA, Yoshinori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80464832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心筋障害部位での超急性期の代謝の継時的な変化をとらえるために、マイクロダイアリス法を用いた技術の開発を行った。Wistarラットの左室心筋局所にダイアリシスプローブを植え込んで、インジェクションポンプを用いて灌流し、終端より環流液を回収し、質量分析法で代謝産物を網羅的に解析した。虚血時および再還流時に、細胞外のグルタチオン関連物質の有意な変動が明らかになった。心筋培養細胞でも、虚血再酸素化時に、グルタチオンの細胞外への放出が増大し、細胞内の活性酸素、過酸化脂質が経時的に増大した。またグルタチオンの投与は、細胞内のグルタチオン濃度を保持し、虚血再酸素化時の細胞障害を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血再灌流における詳細なRedox代謝変化を検証するため、空間的および時間的な網羅的代謝解析技術を確立した。マイクロ波による心臓処理を行うことで代謝産物の死後のdegradationを完全に抑制し、虚血再灌流時のRedox代謝産物の局在の可視化(マッピング)に成功した。さらに、虚血および再灌流に伴い、ダイナミックに変化する代謝産物の推移を時間軸で把握するために、メタボローム解析とマイクロダイアリス法を組み合わせ、同一個体で心筋細胞外の代謝変化を連続的に測定する手法を確立した。これらの手法を組み合わせた代謝4次元マッピングは代謝物の時間的変化を明らかにした点に特色を有する。

研究成果の概要(英文)：A microdialysis method was developed to capture the metabolic sequential changes during the hyperacute phase at the site of myocardial injury. A dialysate rope was implanted in the left ventricular myocardium of Wistar rats, perfused with an infusion pump, and the annulus fluid was collected from the tip for comprehensive analysis of metabolic products using mass spectrometry. The products were analyzed exhaustively by mass spectrometry. Significant variations in extracellular glutathione-related substances were revealed during ischemia and during reflux. In cultured cardiomyocytes, extracellular glutathione release increased during ischemia and reoxygenation, and intracellular reactive oxygen species and lipid peroxide increased over time. Intracellular glutathione levels were also maintained by glutathione administration, and cellular damage during ischemia and reoxygenation was suppressed.

研究分野：循環器内科

キーワード：メタボローム 虚血再灌流 代謝 マイクロダイアリス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

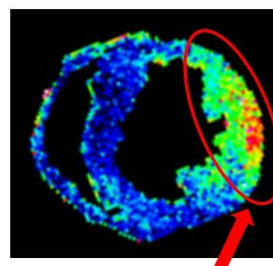
1. 研究開始当初の背景

基礎研究の発展には、物質の定量技術や局在の可視化技術の開発が必須である。心臓疾患の病態生理学的な発見もこれらの技術の発展に大きく依存している。1970-1980年に開発が進んだウェスタンブロット法や免疫染色法は、タンパク質の定量的や空間的な解析を可能とした。また、同時期に開発が進んだ、fluorescence in situ hybridization、1987年にキャリーマリスが開発した polymerase chain reaction 法は、mRNA、DNA の空間的、定量的な解析を可能とした。一方、解糖系やアミノ酸を含む低分子代謝産物の正確で網羅的な解析は長年困難であったが、2002年の Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) の開発により、組織内の網羅的な低分子代謝産物の解析が可能となった。さらに質量分析法の改良が進み、2007年には imaging mass spectrometry (imaging MS) を応用し、低分子代謝産物を時空間的に解析する技術が開発された。この技術の開発により、タンパク質に対する免疫染色法や、mRNA に対する in situ hybridization に加え、低分子代謝産物を中心とする未知の物質の局在をメタボリックイメージングで評価することが可能となった。

一方、心臓における低分子代謝産物のイメージングを行う際に、低分子代謝産物の分解が急速である点が大きな障壁となる。従来は、急速凍結により、代謝産物の degradation を最小限に抑制していたが、この方法でも、凍結時や再融解時に一部の低分子代謝産物の degradation が進み、正確な解析が困難であることが認識されていた。特に、心臓における代謝産物のイメージングでは、死後の degradation をほぼ完全に抑制する技術の併用が望まれたため、我々はマイクロ波を用いたサンプルの処理に注目した。組織をマイクロ波で処理すると、代謝産物の分解酵素を瞬時に死活化させることができるため、低分子代謝産物の degradation は死後も進行しない。この方法を心臓に応用し、imaging MS と組み合わせることで、これまで不可能であった心臓の虚血再灌流傷害時の代謝の変化を、正確に空間的に解析し、視覚的にとらえることが可能となった。冠動脈結紮 10 分後の乳酸のマッピングを行うと、虚血部位に一致して、乳酸が蓄積することが高解像度で可視化できた (図 1)。

しかし、超急性期の心筋障害部位での代謝の継時的な変化については、代謝がドラスティックかつ急速に変化するため、不明な部分が多い。特に、in vivo での局所の代謝変化の連続的な解析はこれまで困難であった。慢性期の心筋リモデリングは、超急性期から急性期の代謝の変化がトリガーとなって進行する。超急性期の障害を受けた心筋の代謝の変化を把握し、治療介入することが慢性期のリモデリングの改善に大きく関与すると考えられる。そのため、代謝の時間的・空間的イメージング (in vivo 四次元代謝イメージング) 技術の開発は、喫緊の課題である。

Lactate の代謝マッピング
(冠動脈結紮後 10 分)



虚血部位に一致して、
Lactate が蓄積

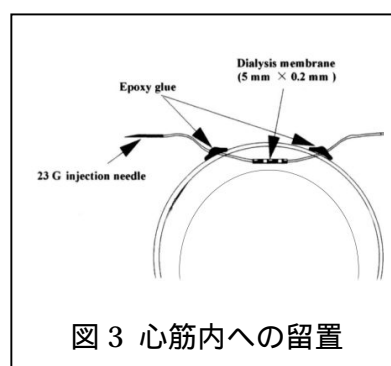
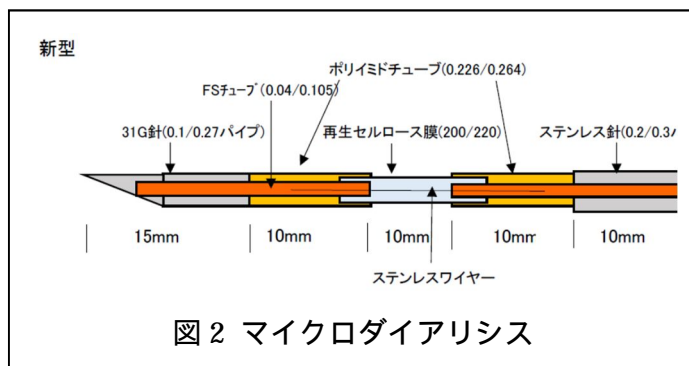
図 1 Lactate の代謝地図

2. 研究の目的

心臓の虚血再灌流障害における、代謝の時間的・空間的イメージング (in vivo 四次元代謝イメージング) 技術の開発を通して、新たな治療ターゲットを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

心筋障害部位での超急性期の代謝の継時的な変化をとらえるために、マイクロダイアリス法を用いた技術の開発を行った (図 2, 3)。心臓マイクロダイアリス法は、半透膜の特性を利用して、心筋間質に存在する低分子生体内物質を、中空糸状透析膜を介して灌流液中に分離採取する方法である。Wistar ラットの左室心筋局所に ダイアリスプローブを植え込んで、インジェクションポンプを用いて灌流し、終端より環流液を回収し、質量分析法で代謝産物を網羅的に解析した。10 分毎に違うマイクロチューブに集積することで、局所の心筋代謝の変化を連続的に評価することが可能となる。



4. 研究成果

虚血時および再灌流時に、多くの代謝産物がダイナミックに変化していることが可視化できた。特に、乳酸やアデノシンは、既存の報告と同様に、虚血時に上昇し、再灌流後に徐々に減少する挙動を示しており、本研究がうまくワークしていることが確認できた。得られた結果を用いて、Volcano plot などの統計分析を行い、細胞外のグルタチオン関連物質 (GSH、GSSG 等) の有意な変動が明らかになった(図 4)。

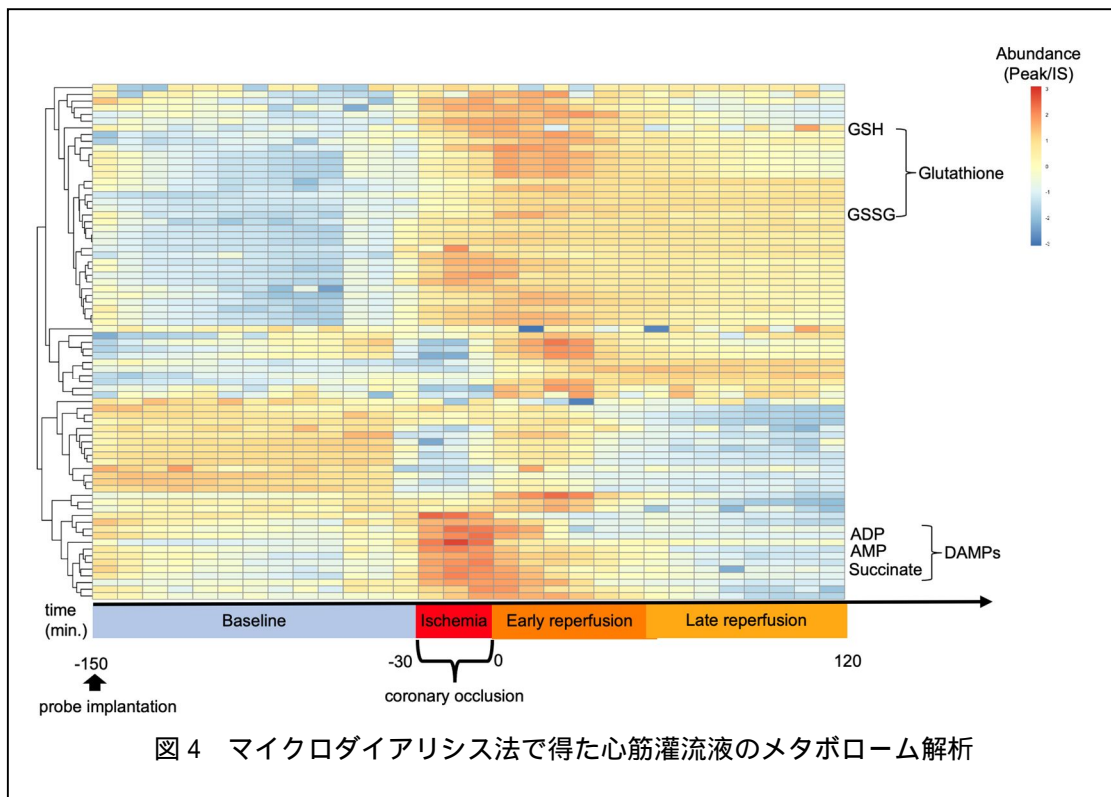


図 4 マイクロダイアリス法で得た心筋灌流液のメタボローム解析

この成果をもとに、グルタチオンの細胞間移動をラットの初代心筋培養を用いて検証した。心筋培養細胞でも、虚血再酸素化時に、グルタチオンが細胞外への放出が経時的に増大した。その結果、細胞内グルタチオン

濃度が低下し、活性酸素、酸化脂質が経時的に増大した(図 5)。またグルタチオンの投与は、細胞内のグルタチオン濃度を保持し、虚血再酸素化時の細胞障害を抑制した。この現象は、マウス虚血再灌流モデルでも検証し、グルタチオンの投与が、area at riskを減少し、虚血再灌流障害を抑制することが証明された(図 6)。

これまでの成果をもとに、虚血時、再灌流時に、心臓における酸化ストレスの防御機構に重要な役割を果たしているグルタチオンの細胞外放出が持続的に起こっているメカニズムの解明をすすめる。特に、グルタチオン輸送に関わる各種トランスポーターの関与、酸化脂質産生やフェロトシス誘導との関連を明らかにする。近年では細胞内外でのグルタチオン関連代謝物の移動が、細胞内および細胞外の代謝環境を変化させ、生理学的機能の維持または病態形成に重要な役割をもつことが神経系や血管内皮、癌組織等でわかってきた。神経系では、終末分化した神経

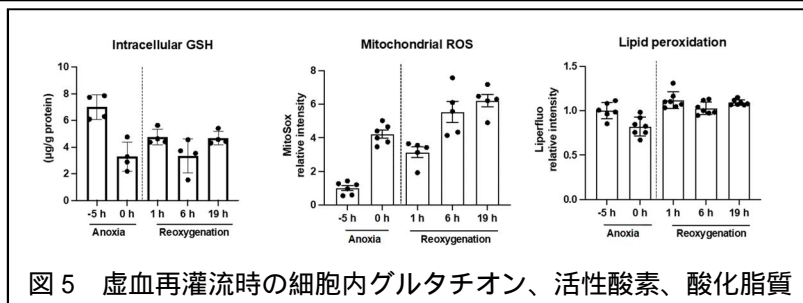


図 5 虚血再灌流時の細胞内グルタチオン、活性酸素、酸化脂質

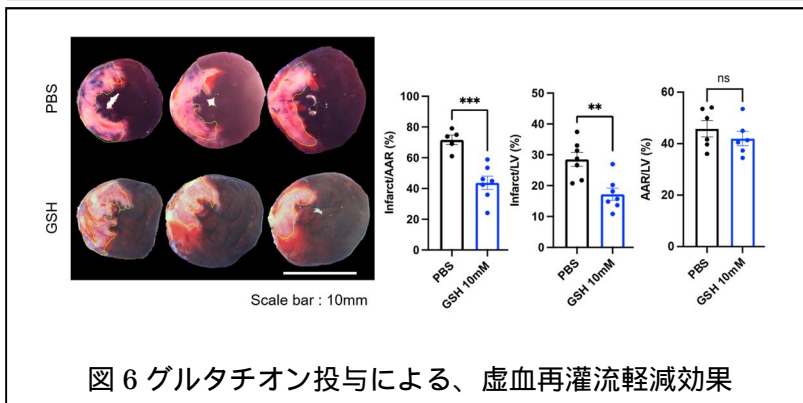


図 6 グルタチオン投与による、虚血再灌流軽減効果

細胞は自身でシステインを合成する能力を喪失しており、その供給を周辺のアストロサイトからのグルタチオン放出に依存している。脳の血管内皮細胞のバリア機能維持にもアストロサイトから受け取るグルタチオンが重要であり、このグルタチオン移動の阻害はバリア機能の破綻を引き起こす。T細胞の活性化には細胞外の還元状態が重要であるが、癌組織は反対の酸性環境を作り出すことでT細胞を不活性化している。これらの知見を踏まえて、虚血再灌流障害時に放出されたグルタチオンの非心筋細胞に及ぼす病態生理学的影響の解明を行い、新たな治療ターゲットの同定を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Goto S, Ichihara G, Katsumata Y, Ko S, Anzai A, Shirakawa K, Endo J, Kataoka M, Moriyama H, Hiraide T, Kitakata H, Kobayashi T, Fukuda K, Sano M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Time-Series Transcriptome Analysis Reveals the miR-27a-5p-Ppm1l Axis as a New Pathway Regulating Macrophage Alternative Polarization After Myocardial Infarction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-20-0783.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seki Y, Nakashima D, Shiraishi Y, Ryuzaki T, Ikura H, Miura K, Suzuki M, Watanabe T, Nagura T, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Fukuda K, Katsumata Y	4. 巻 2
2. 論文標題 A novel device for detecting anaerobic threshold using sweat lactate during exercise.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84381-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinya Y, Hiraide T, Momoi M, Goto S, Suzuki H, Katsumata Y, Kurebayashi Y, Endo J, Sano M, Fukuda K, Kosaki K, Kataoka M.	4. 巻 10
2. 論文標題 TNFRSF13B c.226G>A (p.Gly76Ser) as a Novel Causative Mutation for Pulmonary Arterial Hypertension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.019245.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 10: Sugai K, Tamura T, Sano M, Uemura S, Fujisawa M, Katsumata Y, Endo J, Yoshizawa J, Homma K, Suzuki M, Kobayashi E, Sasaki J, Hakamata Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Daily inhalation of hydrogen gas has a blood pressure-lowering effect in a rat model of hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77349-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirakawa K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Anzai A, Moriyama H, Kitakata H, Hiraide T, Ko S, Goto S, Ichihara G, Fukuda K, Minamino T, Sano M.	4. 巻 9
2. 論文標題 MerTK Expression and ERK Activation Are Essential for the Functional Maturation of Osteopontin-Producing Reparative Macrophages After Myocardial Infarction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.120.017071.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoshinori Katsumata, Genki Ichihara, Yuki Sugiura, Shinichi Goto, Seien Ko, Takahiro Hiraide, Hiroki Kitakata, Hidenori Moriyama, Kohsuke Shirakawa, Atsushi Anzai, Jin Endo, Masaharu Kataoka, Motoaki Sano, Keiichi Fukuda,
2. 発表標題 Continuous analysis of local in vivo metabolic changes using a microdialysis technique,
3. 学会等名 The 4st JCS Council Forum on Basic Cardiovascular (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Genki Ichihara, Yoshinori Katsumata, Yuki Sugiura, Shinichi Goto, Seien Ko, Takahiro Hiraide, Hiroki Kitakata, Hidenori Moriyama, Kohsuke Shirakawa, Atsushi Anzai, Jin Endo, Masaharu Kataoka, Motoaki Sano, Keiichi Fukuda,
2. 発表標題 Continuous analysis of local in vivo metabolic changes using a microdialysis technique,
3. 学会等名 Japanese circulation Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------