

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2008 ~ 2009  
 課題番号： 20790237  
 研究課題名(和文) ヒト赤血球代謝応答の大規模数理モデルによる予測と網羅的代謝解析による実証  
 研究課題名(英文) Prediction of metabolic dynamics in human erythrocytes based on a large-scale mathematical model and its verification by metabolome analysis  
 研究代表者  
 谷内江 綾子 (YACHIE AYAKO)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号： 10453549

研究成果の概要(和文): 大規模なヒト赤血球代謝シミュレーションモデルを用いて生理的条件下でのアデノシンに対する赤血球代謝応答の再現を行った。その結果、アデノシンを大量に取り込むことで却って総 ATP 量が低下する事、低酸素時にはヘモグロビンの T-state 遷移に応答した解糖系活性化が補償的に働くことで、細胞外アデノシン増加による ATP 量の減少が抑えられる事が予測され、メタボローム解析によって実証された。更に、シミュレーションモデルを用いた高速かつ低コストなスクリーニングによる保存条件の最適化を目指し、MAP 低温保存赤血球の長期間での代謝動態を定量的に再現し得るモデルを作成した。

研究成果の概要(英文): Large-scale mathematical model of metabolism in human red blood cells predicted that high extracellular adenosine resulted in decrease in intracellular ATP levels, and that the reduction of cellular energy would be compensated by glycolytic activation through hypoxia-induced hemoglobin-transition. A simulation model that can reproduce the metabolic behavior in long and cold stored red blood cells in MAP solution was also developed. The MAP-stored model would contribute to high-throughput and low-cost screening of optimized stored condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・医化学一般

キーワード： システム生物学、シミュレーション、血液保存、メタボローム、代謝解析

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト赤血球は、解糖系によりATPを合成して電解質輸送能と細胞変形能を維持する一方、水素イオンや2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG、解糖系のブランチ経路により生成される)を用いてヘモグロビンからの酸素乖離を促進し、末梢組織への酸素供給を維持する役割を果たす。またヘモグロビンの酸素結合能はNAD(P)Hを利用したメトヘモグロビン還元能により担保されている。しかしながら、ATP、2,3-BPG、NAD(P)Hといった機能代謝物質を、必要に応じてどのように動的に生成・維持するのか、その代謝制御機構に関する定量的な議論、特に *in vivo* の状態を反映し得る実験に基づいた議論は非常に困難であった。そこで、分子レベルでの個々の反応を統合してコンピュータ上に再現し、大規模な代謝シミュレーションモデルを構築することで、生理的条件下での赤血球代謝制御機構を理解することを提案してきた(図1)。

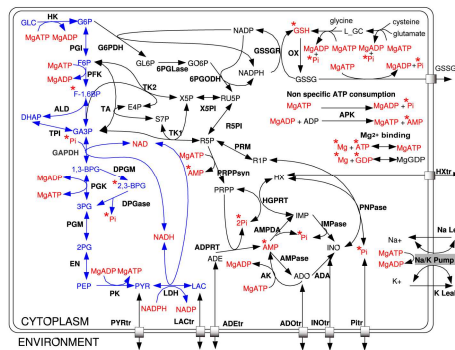


図1 赤血球代謝モデルにおける反応経路

(1) 末梢酸素運搬における赤血球内代謝の重要性を示唆する仮説として、低酸素性に赤血球がATPを放出し、血管内皮細胞のプリン作動性受容体(Pxy)を活性化して血管拡張を起こす可能性が多数報告されている(Ellsworth M *et al.* *Am J Physiol.*, 1995)。このことから、赤血球内代謝、特にATPエネルギー代謝の制御機構は、微小循環においても重要な役割を果たすと考えられる。一方、虚血時には、末梢組織の微小循環系においてアデノシン濃度が上昇し、赤血球に取り込まれること、また赤血球にはアデノシンからATPを産生するプリンサルベージ経路があることが知られているが、細胞外アデノシン上昇による赤血球細胞内代謝への影響、生理的条件下での意義は未知であった。

(2) 保存赤血球の質の向上、保存期間の長期化のため、ATP、2,3-BPG濃度の低下を抑える手法開発は重要な課題であるが、従来研究

では専ら経験則に基づいて開発されており、赤血球代謝不全のメカニズムに根ざした研究はなされていないのが現状である(Hess, JR. *Vox sanguinis.*, 2006)。精緻な代謝シミュレーションモデルのパラメータを検討し、低温状態での代謝を再現する代謝シミュレーションモデルを構築することで、情報科学のアプローチを用いた網羅的かつ系統的な条件探索が可能である。

## 2. 研究の目的

(1) 赤血球は細胞外のアデノシンを取り込んでATPを産生する代謝経路を持ち、一方で、虚血組織において血管拡張物質としての機能を持つアデノシンが高濃度となることが知られている。本研究では、細胞外のアデノシン濃度の変化が赤血球内のエネルギー代謝にどのように作用し、周辺組織への酸素運搬にどのような影響を与えるかをシミュレーションによって予測する。また、キャピラリー電気泳動質量分析機(CE-MS)を用いた *in vitro* 実験系でのメタボローム実測結果と併せて、*in vivo* での赤血球代謝の重要性を考察することを目的としている。

(2) 救急医療において、輸血に用いる赤血球の低温での長期保存、鮮度保持は重要な課題である。しかし、これまで保存血液の研究は経験則に頼ったものが多く、代謝物質の経時変化のメカニズムに基づいた手法は用いられてこなかった。また、実測実験では試行可能な摂動の数と方法にコスト・技術的限界が存在することから、系統的且つ効率的、網羅的な実験の施行はしばしば困難である。一方、シミュレーションを用いた仮想実験では、実際には不可能な実験条件を施行し、現象に対する作用点を予測し、定量的に生物学的意義を議論することが可能である。そこで、すでに構築している精緻な赤血球代謝シミュレーションモデルを基礎としてMAP保存液で低温保存された赤血球の長期間での代謝動態を予測するモデルを構築する。

## 3. 研究の方法

(1) 大規模なヒト赤血球代謝シミュレーションモデルを用いて生理的条件下でのアデノシンに対する赤血球代謝応答の再現を行う。シミュレーションモデルでは、循環血液中で赤血球が受ける酸素濃度の周期変動をステップ関数として実装した。また、実証実験系として、精製したヒト赤血球にアデノシ

ンを添加して CE-MS でメタボローム測定を行う。その際、アデノシンのアデニンが持つアミノ基の窒素原子を同位体置換して標識した N15-アデノシンを用い、通常酸素状態と窒素置換による低酸素状態で N15-AMP、N15-ADP、N15-ATP を測定する。また、赤血球を一酸化炭素で処理することで、ヘモグロビンを R-state(酸素結合時の状態)で固定化する方法でヘモグロビンの状態遷移を起さないようにした赤血球と、正常赤血球の代謝変動の比較を行う。

(2) MAP 濃厚赤血球による低温保存赤血球内での代謝を再現するモデルを作成するため、赤血球代謝シミュレーションモデルのパラメータを先行研究による ATP、2,3-BPG 量の実測データ (Shiba, M et al. Japanese Journal of Transfusion Medicine, 1991) にフィッティングさせる。ATP、2,3-BPG 量は、経時的劣化の指標となるが、赤血球内のあらゆる代謝反応によって複雑に制御されているため、数理モデルを用いた網羅的探索が必須である。

まず、初期値として MAP 保存液の組成を勘案し、低温によるヘモグロビンの R-state 遷移、保存液中のクエン酸による pH 値の低下を時系列の実測データから実装する。次に、低温による酵素活性の低下、特に Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ポンプの顕著な活性低下、pH の低下による特定の酵素の活性上昇に着目して、遺伝的アルゴリズム (実数 GA) によるパラメータ探索を行う。

次に、パラメータセットの妥当性検証のために、実測実験による検証と、シミュレーションによる検証を行う。実測実験では、MAP 保存液と同じ組成の保存液を作成し、精製した赤血球を低温にて 7 週間保存して、1 週間毎に CE-MS による代謝物測定を行う。シミュレーションによる検証では、無作為にパラメータを設定したモデルでは CE-MS 測定結果が再現できないことを、情報科学的に実証する。

また、作成した MAP 低温保存赤血球のモデルを用いて感受性解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 大規模なヒト赤血球代謝シミュレーションモデルを用いて生理的条件下でのアデノシンに対する赤血球代謝応答の再現を行ったところ、1 分子のアデノシンを ATP に代謝する際にサルベージ経路では 2 分子の ATP を消費する事から (図 2)、アデノシンを大量に取り込むことで総 ATP 量、エネルギーチャージが低下し、ここで消費される ATP は、

解糖系によって産生される ATP の約 1/3 を占めると予測された。

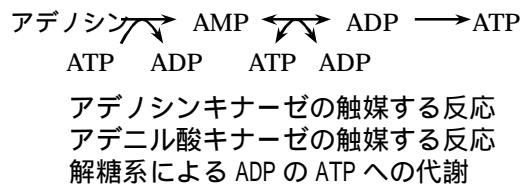


図 2 プリンサルベージ経路におけるアデノシンからの ATP 生成

また、この ATP 量の減少は、ヘモグロビンの T-state 遷移に応答した Band3 からの酵素の乖離による解糖系活性化が補償的に働くことで、低酸素時には抑えられる事が予測された。従来、アデノシンは ATP 産生のソースとして考えられてきたため、細胞内へのアデノシン取り込みの増加が ATP 総量を低下させる結果はアデノシンの新たな一面を浮かび上がらせるものである。

CE-MS によるメタボローム解析を行ったところ、実際に通常酸素でのアデノシン添加により細胞内の ATP 量、エネルギーチャージが低下し、これらは低酸素で抑えられる事を確認した。また、N15 同位体標識した AMP、ADP、ATP の総量は低酸素によって顕著に増加していた。一酸化炭素で処理した赤血球においても総量の増加が起きていることから、酸素濃度が低下するとアデノシンの取り込みが増加する可能性が示唆された。

これらのことから、虚血組織における微小循環で高濃度となるアデノシンを赤血球が積極的に取り込み、取り込んだアデノシンを ATP に代謝する際に必要とされる ATP を、赤血球自身の低酸素応答としての解糖系活性化で補償する、新しい赤血球の生理作用の構造が示唆された。

(2) 先行研究によって報告されている MAP 低温保存赤血球における ATP、2,3-ビスホスホグリセリン酸の濃度データを基に、前項で示したパラメータセットを実数 GA で最適化させた結果、得られたパラメータセットでのシミュレーションは、CE-TOFMS によるメタボローム測定で得られた解糖系中間代謝物質の長期保存による代謝変動を定量的に再現しており、「MAP 長期保存赤血球代謝のシミュレーションによる予測」を可能にした (研究のワークフローを図 3 に示す)。

更にモデルの感受性解析の結果から、低温保存赤血球の代謝を長期的に安定に保つ条件を予測した。その結果、温度感受性に变化するヘモグロビンの状態遷移 (R 型遷移) と pH

値が、保存赤血球内の ATP、2,3-BPG 量の低下に非常に強く影響することが予測された。低温赤血球代謝におけるヘモグロビンの関与を示唆した研究はこれまでになく、新たな保存方法の提案に結びつくものであると考えられる。

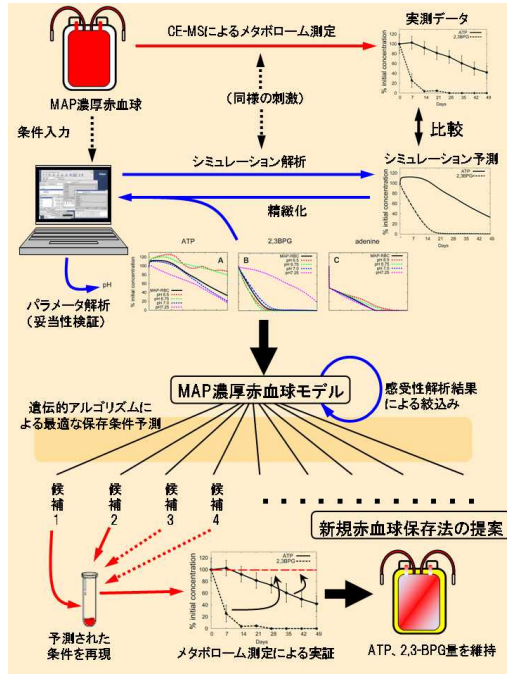


図3 低温保存赤血球の最適化に向けた研究スキーム

また、ランダムなパラメータセットを用いた網羅的なシミュレーション解析により、設定した探索パラメータセットが、報告されている ATP、2,3-BPG 変動、CE-MS による時系列データを再現するのに必須であることを示し、作成した MAP 低温保存モデルの妥当性を裏付けた。

本研究は、分子レベルでの大規模な細胞シミュレーションモデルを実用レベルに精緻化し、臨床応用への可能性を示した独創的な研究である。

## 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6件)

Yachie Kinoshita, A., Nishino, T., Shimo, H., Suematsu, M., Tomita, M.: A Metabolic Model of Human Erythrocytes: Practical Application of the E-Cell Simulation Environment *J Biomed Biotechnol.* (in press, 2010)

(査読あり)

Hattori, K., Kajimura, M., Hishiki, T., Nakanishi, T., Kubo, A., Nagahata, Y., Ohmura, M., Yachie Kinoshita, A., Matsuura, T., Morikawa, T., Nakamura, T., Setou, M., Suematsu, M.: Paradoxical ATP elevation in ischemic penumbra revealed by quantitative imaging mass spectrometry *Antioxid Redox Signal.* (in press, 2010) (査読あり)

Sakuragawa, T., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Soga, T., Yachie Kinoshita, A., Kajimura, M., Suematsu, M.: Hypotaurine is an energy-saving hepatoprotective compound against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 46(2): 126-134 (2010) (査読あり)

Akatsu, T., Tsukada, K., Hishiki, T., Suganuma, K., Tanabe, M., Shimazu, M., Kitagawa, Y., Yachie Kinoshita, A. and Suematsu, M.: T-state stabilization of hemoglobin by nitric oxide to form a nitrosyl heme causes constitutive release of ATP from human erythrocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 662: 109-114 (2010) (査読あり)

Nishino, T., Yachie Kinoshita, A.\* (\*corresponding author), Hirayama, A., Soga, T., Suematsu, M., Tomita, M.: In silico modeling and metabolome analysis of long-stored erythrocytes to improve blood storage methods. *J Biotechnol* 144(3): 212-223 (2009). (査読あり)

西野泰子 谷内江綾子 富田勝 「E-Cell system によるヒト赤血球代謝シミュレーションの展開」人工血液 17(1)37-43 (2009) (査読なし)

[学会発表](計6件)

Yachie Kinoshita, A., Kawahara H., Suematsu M. "Development of hepatic lobular model of metabolism based on large-scale biosimulation at individual cellular level" 2<sup>nd</sup> Bio-SuperComputing Symposium 2009 (東京 2010/3/18,19)

谷内江綾子 川原仁志 西野泰子 須

永泰弘 野田茂穂 大日向大地 横田秀夫 末松誠 「赤血球代謝モデルの応用と4D細胞シミュレーションへの拡張」Bio-SuperComputing Symposium 2008 (東京 2008/12/25,26)

谷内江綾子 藤木夏子 福田亮 末松誠 「網羅的代謝解析により強化された肝細胞代謝モデルの開発と応用」Bio-SuperComputing Symposium 2008 (東京 2008/12/25,26)

谷内江綾子 川原仁志 野田茂穂 須永泰弘 大日向大地 横田秀夫 末松誠 「細胞における代謝の時空間シミュレーション」BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (神戸 2008/12/11)

谷内江綾子「細胞シミュレーションとメタボローム解析による実証」第291回CBI学会研究講演会(東京 2008/11/19)

Yachie Kinoshita, A., Noda, S., Yoshizawa, S., Yokota, H. and Suematsu, M. "Simulation on Temporospacial Dynamics of Cellular Metabolism" 1st Joint Workshop on Computational Science (Tokyo 2008/7/7-8)

〔図書〕(計1件)

Kinoshita A. "Simulation of metabolism in human erythrocytes." A chapter in *E-Cell System: Basic Concepts and Applications* Kluwer Academic Publishers Landes Bioscience (in press, 2010)

〔その他〕

受賞

Poster Award (Tokyo 2010.3)  
2<sup>nd</sup> Bio-Supercomputing Symposium 2009

Poster Award (Tokyo 2008.12)  
Bio-Supercomputing Symposium 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷内江綾子 (YACHIE AYAKO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：10453549

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし