

令和元年5月16日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07066

研究課題名(和文) ガス分子依存性脳血流代謝カップリング機構の解明：代謝解剖学的アプローチを用いて

研究課題名(英文) Roles of gaseous mediators in the regulation of vascular and neural functions

研究代表者

梶村 眞弓 (KAJIMURA, MAYUMI)

慶應義塾大学・医学部(日吉)・教授

研究者番号：10327497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳で産生される一酸化炭素(CO)の役割の解明するため、野生型とCO量が半分に減弱したHO-2KOマウスを用い、虚血時に領域特異的に惹起される代謝リモデリングを解析した。HO-2KOマウスのペナンプラでは、乳酸が増加(嫌氣的解糖の亢進)したのに対し、野生型マウスでは乳酸の上昇が抑制され、虚血時でも酸化的リン酸化が担保されることが示唆された。さらに毛細血管径は、野生型とHO-2KOマウスの間で差が認められないのに対し、赤血球速度はHO-2KOで顕著に早いこと、つまりCOがないと基底状態で血流量が増加することが示された。COは、基底状態で統合的な抑制因子として働くことの証左となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究対象とした脳循環代謝病態においては、ATP産生を支える基質供給機構の同定など、エネルギー代償機転の分子機構の解明が大きな課題である。ガス分子の作用点を代謝物のin vivo-profilingにより空間的・定量的に解析することにより、これまでのin situの系では捉えにくかったセンサー蛋白とシグナル分子の相互作用を、直接的に構築できる可能性を有する点において本研究は独創的である。研究成果は、脳循環障害や神経疾患の病態を理解し、治療のターゲットを絞りこむための布石となりえ、救急蘇生学などの臨床医学研究への波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Brain generates carbon monoxide (CO) via heme oxygenase (HO) reactions. We examined the hypothesis that deletion of HO-2 exacerbates energy metabolism during acute brain ischemia. We conducted quantitative imaging mass spectrometry analysis to decipher local energy metabolism from wild-type (WT) and HO-2-null mice that underwent a 60-min occlusion of the left middle cerebral artery (MCAO). In ipsilateral hemispheres, MCAO caused elevation of AMP, ADP, and lactate, and depletion of ATP in both WT and HO-2 null mice. Ischemic core was larger in HO-2-null than WT mice. Striking differences were found in the contralateral hemispheres, where levels of ADP, AMP and lactate in HO-2-null mice were higher than those in WT mice. It suggests that the HO-2/CO system plays roles in protecting against ischemia not only at ischemic cores where severe reduction of blood flow occurs, but it also protects effectively in trans-hemispheric regions where only a subtle reduction of blood flow takes place.

研究分野：代謝生化学

キーワード：一酸化炭素 Heme oxygenase 質量分析イメージング Neurovascular coupling エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ガス分子は蛋白質に結合する補欠分子への結合やアミノ酸残基の翻訳後修飾を介して酵素反応速度を変化させ、生物活性を發揮する。しかし複数のガス分子とその受容タンパク質が時間的・空間的に複雑な相互作用を形成する生体内においては、そのメカニズムや生理作用との因果関係は立証されていない。

研究代表者らは、neuronにより産生される一酸化炭素(CO)とastrocyte由来の硫化水素(H<sub>2</sub>S)の2つのガスが、代謝経路の末端で産生される老廃物ではなく、実は分子状酸素のavailabilityとリンクして、巧妙に脳血流を制御する極小鍵分子であることを発見した(PNAS, 109, 1293-1298, 2012)。これらのガス分子に限らず、neurovascular coupling (NVC)に関する多くの低分子代謝物の動態を、時空的に解析することにより、NVCの分子実体を解明するため本研究の立案に至った。

### 2. 研究の目的

脳は数μMにも及ぶ高レベルの一酸化炭素(CO)生成系を有し、80%の活性は構成型 heme oxygenase2 (HO-2)により恒常的に産生される。しかしながら、中枢神経系(CNS)における内因性のCOの生理学的意義は未解明であった。近年、神経細胞が何のタスクも行っていない「基底状態」で大きなエネルギーを消費することが明らかになった。そこで以下の仮説を立てた。脳で産生されるCOは、(1)基底状態で統合的な抑制因子として働くこと、(2)持続的抑制によりストレス応答に必要な予備能を担保し、neuron発振型の fail-safe regulationの根幹を担うガスである。COの存在意義は、「基底状態」の脳の様々な領域でおこる交信活動や、神経伝播のfidelity制御などへと融合・発展する可能性があると考え、本研究を開始した。本研究の目的は、脳で産生されるガスの生成・受容機構を探究し、ガス分子によるエネルギー代謝と微小血流調節のカップリング機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### 定量的質量分析イメージング法

ガス分子が酵素の金属中心に配位結合する「結合力」は、金属のレドックス状態によって決定されるため、正常あるいは病態組織中で同一のガスがどのように作用するかを推し量ることは困難である。この問題を解決するため、我々が開発した「定量的質量分析イメージング法」を活用した。一枚の薄切組織標本を用い、組織中に存在する数十種類の物質を10-150ミクロンの空間分解能で画像化し、かつ量的情報も付与できる画期的な技術である。本法は、マトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング(Matrix assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry: MALDI-IMS)

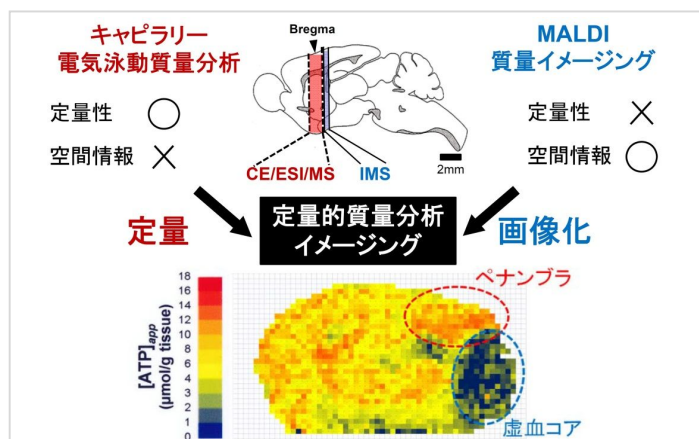


図1 MALDI-IMSとCE/ESI/MSを融合した定量的質量分析イメージング技術の概念図

約2mm厚の脳組織ブロックから代謝物を抽出、CE/ESI/MSによりメタボロームデータを収集する。一方隣接切片をMALDI(マトリックス支援レーザー脱離イオン化)により画像化。(Kajimura M et al., Respiratory Physiology & Neurobiology, 184:139-48. 2012より改変)

とキャピラリー電気泳動質量分析法 (capillary electrophoresis/ electrospray ionization : CE/ESI/MS) という異なる特性をもつ先端質量分析技術を融合することにより可能となった。MALDI-IMSは、生体組織を破碎することなく組織中の代謝物を、位置情報を残した状態で直接質量分析し、分子に固有な値である質量から分子種を同定し、質量分析情報を空間的に二次元で取得し画像化する技術である。MALDIは同一組織上の異なるポイントでの物質の相対比較は得意であるが、定量性に乏しいことから、異なる個体間での絶対比較は困難であった。一方、CE/ESI/MSは、定量性に優れているが、組織をすり潰し物質を抽出する工程を経るため、空間分解能が得られない。MALDI-IMSとCE/ESI/MSを融合することにより、組織上の代謝物を定量的かつまた代謝解剖学的に捉え、代謝動態を解析するための「代謝物コンテンツマップ」の作製が可能となる (図1)。

#### 4. 研究成果

##### マウス脳虚血病態における一酸化

##### 炭素の役割

COによる糖代謝制御の鍵分子を洗い出すため、左中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを作製し、虚血の度合いに呼応して領域特異的 (e.g. 虚血コアvsペナンプラ, 皮質vs海馬など) に惹起される代謝リモデリングを、

野生型 (WT) とHO-2KO (COが半分に減弱) の両群で比較した。定量的質量分析イメージング法を武器に、皮質、海馬、基底核などの解剖学的な

領域、あるいは、コア、ペナンプラといった血流低下に伴った虚血病態に特異的に形成される領域で惹起される代謝リモデリングを、*in situ* で解析した。複数の代謝物の組織内分布及び量的・質的な変化を解析し、COがどの酵素の活性を修飾するのかを探った。図2にATP及び乳酸の質量分析イメージングを示した。ATPは、「虚血コア」では完全に消失しているのに対し、「ペナンプラ」では、健常側の同一領域に比して増加している。一方野生型のペナンプラでは顕著なlactate増加はみられず、この領域では酸化的リン酸化により、ATP産生を行っているが推察された。

さらに二光子励起顕微鏡を用い、異なる微小血管レベル (e.g. 毛細血管, 前毛細血管, 細動脈) で惹起される虚血応答をreal-timeで精

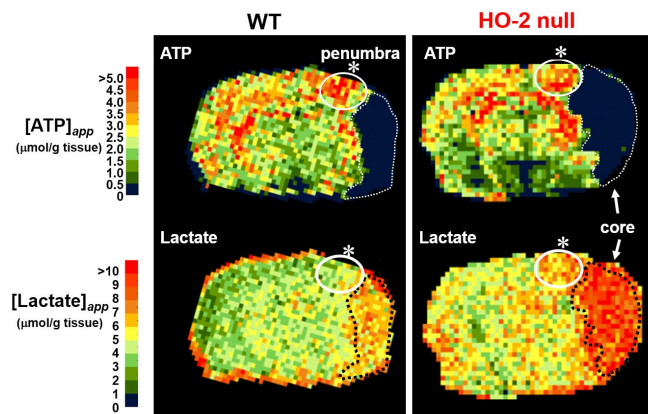
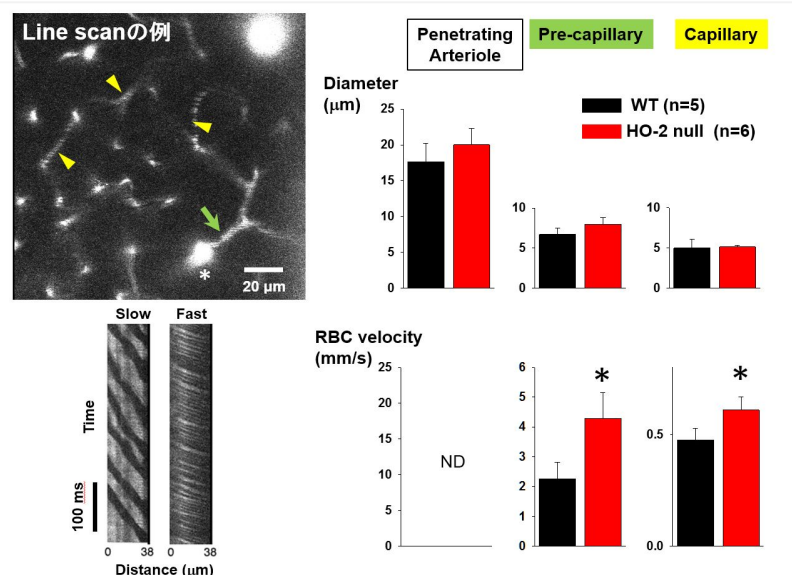


図2. COの産生酵素が欠損すると、低酸素に対する緊急対応能力が悪くなる。左中大脳動脈閉塞後60分後のATPと乳酸の定量的質量分析イメージング。(Goto S et al., Journal of Clinical Biochemistry and Nutritionより改変)



#### 図3 マウス大脳皮質の毛細血管内赤血球速度

基底状態HO-2KOの血流量は野生型に比べ亢進している。

(Goto S et al., Journal of Clinical Biochemistry & Nutritionより改変)

査した。低酸素性血管拡張は、基質( $O_2$ , グルコース)の要求が最も高い神経細胞の近傍の血管から拡張シグナルが伝播し、十分なCOが存在する野生型マウスでは顕著に増幅されると予測した。血管径測定に加えて、赤血球速度を計測し血流量を算定した。図3に示すように、毛細血管径は、野生型とH0-2K0マウスの間で差が認められないのに対し、赤血球速度はH0-2K0で顕著に早いこと、つまりCOがないと基底状態で血流量が増加することが示された。

CNSで恒常的に産生されるCOの役割は、基底状態で統合的な抑制因子として働くことのみならず、持続的抑制によりストレス応答に必要な予備能を担保し、neuron発振型のfail-safe regulationの根幹を担うガスであるという一つの証左を得るに至った。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件, 全て査読有)

1. Kyoko Mahima, Shinichi Takahashi, Kazushi Minami, Yoshikane Izawa Takato Abe, Naoki Tsukada, Takako Hishiki, Makoto Suematsu, **Mayumi Kajimura**, Norihiro Suzuki, Neuroprotective Role of Astroglia in Parkinson Disease by Reducing Oxidative Stress Through Dopamine-Induced Activation of Pentose-Phosphate Pathway, *ASN Neuro*, **2018** Jan-Dec;10:1759091418775562. doi: 10.1177/1759091418775562
2. Shinichi Goto, Takayuki Morikawa, Akiko Kubo, Keiyo Takubo, Keiichi Fukuda, **Mayumi Kajimura**, Makoto Suematsu. 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** 63:70-79. doi.org/10.3164/jcbrn.17-136
3. Yohji Matsusaka, Kazuhiro Takahashi, Yu Iwabuchi, Yuji Ogata, Chiyoko Nishime, **Mayumi Kajimura**, Masahiro Jinzaki. Preclinical evaluation of heat-denatured [ $^{18}F$ ]FDG-labeled red blood cells for detecting splenic tissues with PET in rats. *Nuclear Medicine and Biology* **2018** Jan;56: 26-30. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2017.09.002.
4. Matsusaka Y, Nakahara T, Takahashi K, Iwabuchi Y, Nishime C, **Kajimura M**, Jinzaki M.  $^{18}F$ -FDG-labelled red blood cell PET for blood-pool imaging: Preclinical evaluation in rats. *EJNMMI Research* (European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging). **2017** Dec;7(1):19. doi: 10.1186/s13550-017-0266-3. Epub 2017 Feb 27.
5. Yokouchi M, Atsugi T, Logtestijn MV, Tanaka RJ, **Kajimura M**, Suematsu M, Furuse M, Amagai M, Kubo A Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. *Elife*. **2016** Nov 29;5. pii: e19593. doi: 10.7554/eLife.19593
6. Kabe Y, Yamamoto T, **Kajimura M**, Sugiura Y, Koike I, Ohmura M, Nakamura T, Tokumoto Y, Tsugawa H, Hand H, Kobayashi T, Suematsu M. Cystathionine  $\gamma$ -synthase and PGRMC1 as CO sensors, *Free Radic Biol Med*. **2016** Oct;99: 333-344. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.025.
7. 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 of Neurological Sciences* **2016** Sep 15; 368: 326-333. doi: 10.1016/j.jns.2016.06.067.

8. Sugiura Y, Katsumata Y, Sano M, Honda K, **Kajimura M**, Fukuda K, and Suematsu M  
Visualization of *in vivo* metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart, *Scientific Report* **2016** Sep 1;6: 32361. doi: 10.1038/srep32361
9. Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, Hishiki T, Suematsu M, **Kajimura M**, Suzuki N. A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system, *Journal of Neuroinflammation*: **2016** May 4;13 (1) 99. doi: 10.1186/s12974-016-0564-0
10. 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 Neurochirurgica (Wien)*. **2016** Jun;158 (6):1057-1067. doi: 10.1007/s00701-016-2792-6.
11. Suematsu M, Nakamura T, Tokumoto Y, Yamamoto T, **Kajimura M**, Kabe Y. CO-CBS-H<sub>2</sub>S axis: From vascular mediator to cancer regulator. *Microcirculation*. **2016** Apr;23 (3):183-190. doi: 10.1111/micc.12253.

〔学会発表〕(計2件)

1. 2019年, 44回日本微小循環学会総会, 後藤 信一, 久保 亜希子, 森川 隆之, **梶村 眞弓**, 末松 誠, Protective roles played by heme oxygenase-2 against transhemispheric diaschisis
2. 2017年, **World Congress of Neurology**, **Kajimura M**, Takenouchi T, Sugiura Y, Hishiki T, and Suematsu M. Neuroprotective effects by hypothermia are mediated through a coordinated suppression of acetyl CoA contents leading to a decrease in acetylcholine contents in neonatal hypoxia-ischemia

〔図書〕(計1件)

1. 末松 誠, 塩田 芽実, 山添 昇吾, 久保 亜紀子, 菱木 貴子, **梶村 眞弓**, 加部 泰明. 金属と原子の相互作用を解き明かすラマンイメージング。～原子間振動から読み取るメタボロミクスと疾患 実験医学 36, 37-45, 羊土社 2018年発行

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

- <http://www.sci.keio.ac.jp/member/detail.php?eid=00181&katagaki=3&status=1>
- [http://www.sci.keio.ac.jp/en/people/detail.php?eid=00181&katagaki=3&bunya2\\_color=6&status=1](http://www.sci.keio.ac.jp/en/people/detail.php?eid=00181&katagaki=3&bunya2_color=6&status=1)

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：後藤 信一  
ローマ字氏名：GOTO, Shinichi

研究協力者氏名：森川 隆之  
ローマ字氏名：MORIKAWA, Takayuki

研究協力者氏名：菱木 貴子  
ローマ字氏名：HISHIKI, Takako

研究協力者氏名：久保 亜紀子  
ローマ字氏名：KUBO, Akiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。