

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10571

研究課題名(和文) イメージング質量分析によるATPの可視化により肝再生・肝不全のプロセスに迫る。

研究課題名(英文) Imaging Mass Spectrometry of Liver Regeneration

研究代表者

井口 公太 (Iguchi, Kohta)

京都大学・医学研究科・その他

研究者番号：40771118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の代謝物情報をそのまま生体外に取り出すことは、物質の不安定性のために困難である。今回、Heat stabilizerを利用し、臓器に熱処理を加えることにより、物質を安定化させ、肝臓内の代謝物の定量・可視化を行った。まずHS処理を行う臓器の至適条件を明らかとした。次に本実験ストラテジーの妥当性を検証するため、ラット転移性肝癌モデルを利用して、グルコース安定同位体を利用した癌部と非癌部の代謝物情報の定量比較、さらにイメージング質量分析による腫瘍内不均一性につき明らかとした。本手法を利用し、ラット肝切除モデルにおける肝再生時のエネルギー代謝に着目し、現在進行形にて実験を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回Heat stabilizerを利用した肝臓内代謝物の研究基盤を作成した。ATPを含めた不安定な代謝物情報を、定量質量分析やイメージング質量分析によって定量化、空間把握し、安定同位体を使用して、代謝過程を認識することが可能となった。例えば肝癌増大や肝切除後肝再生時に必要なエネルギーはどのように得ているのかを部位特異的に理解可能となることによって、癌や肝不全に対する治療戦略の導出に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：To extract in vivo information about metabolites is challenging because of their instability under anaerobic conditions. Heat stabilizer (HS) enables us to quantify and visualize the metabolites in the liver because of its ability to stop degradation by the heat and pressure under vacuum on the liver samples. First, we demonstrated the optimal conditions of the samples for HS treatments. Second, to testify the feasibility of the current strategy, we adopted metabolic flux analyses on a metastatic liver cancer model of rats. Using  $^{13}C_6$  glucose, we compared the metabolic process between cancer and non-cancer tissues. We also visualize the heterogeneous localization of the various metabolites including ATP. Finally, we are in an ongoing experiment using a rat partial hepatectomy model, focusing on an energetic status during liver regeneration.

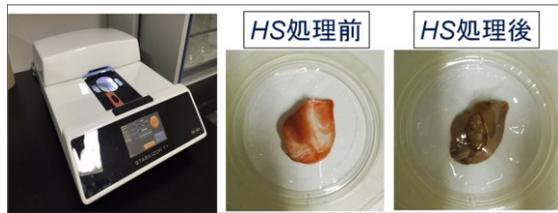
研究分野：消化器外科学 肝臓学

キーワード：メタボロミクス Heat stabilizer 癌と代謝 肝再生と代謝

1) 7V/cK3 PK 028 d6K KH  
 b/S/M,  fSc)7V  gI&EM(bSuM  
 UM/Mcgtb4b6  shear stress, A5 8   
 b/7762sGf8  M)7V  e46   
 0v16bK6MVCeY   
 8CCH K b6  ATP  U4b6%T% K  S  2   
 2A5  IMS8m2GK 7V b)M b)P   
 2A50  M  m2xK% 2A5vb   
 M)Vb12A5%/G  ATP (   
 6(KbM6K8  IMS bm20   
 M

0, %2b%   
 1) ATP b IMS 50150   
 Ep2A  ATP  ex vivo B(OIS)  u01cb  
 S15006242E6  IMS EEp2A0iM bSu  
 b4S   
 2) S(  vs./b2A52bf   
 ATP c b  sample b5B6C  IMS b   
 2) sO (b)  ATP b52fUM   
 3) 7V5S)7V50   
 30%, 70%, 90%)7V K M    
 E  IMS8b2A5 7V 6   
 bSEEp b556M

1) %2b2  
 1) Heat Stabilizer T1 (HS; Denator, Sweden)  
 K S  HS 4)   
 0M Su W b   
 E K S  ICR   
 M D 7E ( ) K S v b   
 control E ( )  positive  
 S v b  HS Frozen  s M  HS K   
 HS K S v b  HS on ice L f 8  30 (K E ) K S v b   
 negative control  4  b  n=4 for each  A 5 2 A 5 ( )  Capillary  
 electrophoresis-electrospray ionization (CE-ESI)-MS  Y 650 K S



d6b0i3 (b) K b  ATP 680K   
 S  IMS bS9(0b560  eG 076G   
 8K S E  ATP uS  energy status b) T I 8   
 M K S Ep 00M G B h K S  E  /   
 K S Y 2  /4kEp5/  /  G b m Ep b b   
 Ep)2b4  /E b) e M I C K e 0 5 7 K 8 % 2 E   
<sup>13</sup>C6 glucose 5M Ep (b S  ) b b  4 ( 8   
 4K S  0K S  d

2) HS b w 0M Su ) K 60M   
 3   48   4)  HS (G K S   48    
 4b b 7 W S 9 e ) 6  <sup>13</sup>C6 glucose K S   
 1p  M W S  f S Ep ' b 5 6 ( x ) M S u  UltraFlextreme  
 MALDI-time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany)  IMS K  S  5   
 0  IMS 0b20 (8 E  b36

34) M  O K S b M 5  IMS  
 K S

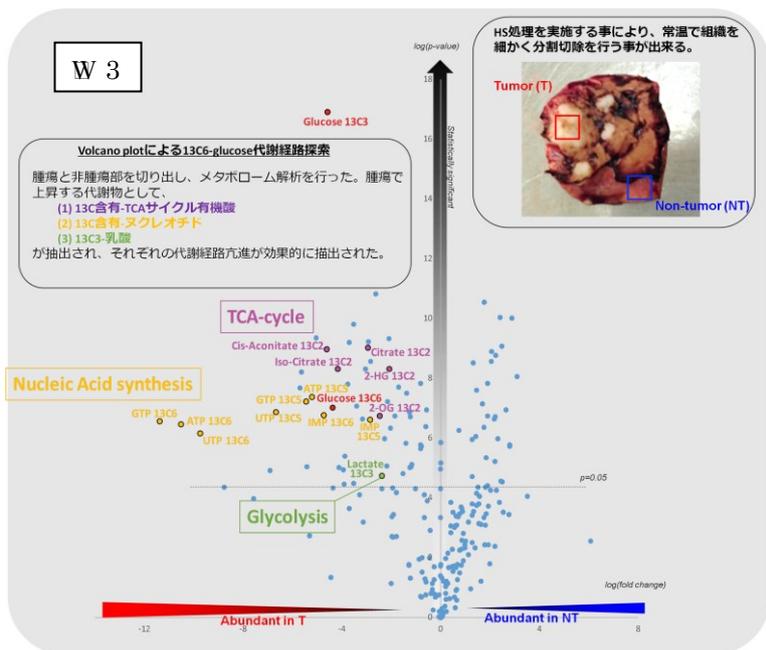
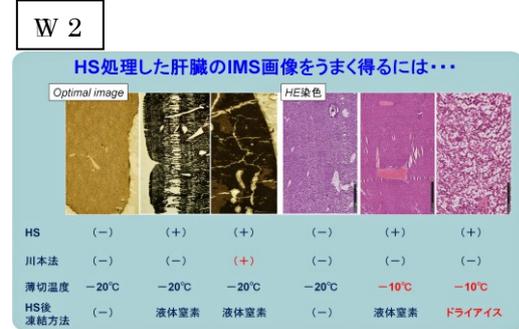
22□  
 □ W7b□ Negative control □ BK□  
 HS on ice □ HS frozen □  
 DI8lp6M□ ATP uS  
 9lp8E HS frozen □  
 c(ODN□ in vivo blp□  
 M□ HS on ice □  
 6□ G(WSES□ HS □  
 .bSu□ 1mm, 5mm, whole liver  
 (E Sv6□ 95□ 60(ES  
 vb8□ ATP A luciferase assay □  
 5B(WSDw)□  
 c1uN□ 60ENY□  
 (6G(W/S□ data not shown□

□ 2□ HS (WSE6E)□  
 7618Su□  
 2)8B□ SECTION-LAB k□  
 K□ Cryofilm(%T)□  
 Kbr-1M1010□ 4868136□  
 □ IMS KSW □ 2□ 72E□  
 HS fmaC)8BKS□  
 2A5(Og1w)□  
 u□ cryofilm (Mb2Ab)□  
 WNIW8S□  
 cW 2bOKC□ cryostat  
 b□ -20□ -10ME G□  
 (38)6G□ S□  
 rS HS (8BbSu)M□  
 7eN□ eOE(□  
 8)MG506S□  
 9)□  
 bgBIMS□ Y4□ 6 WS □

□ HS (GKS6E)EG□  
 KS G)VMSEK□  
 b feasibility (KS)46□  
 U□ 4 46□ <sup>13</sup>C6 glucose )aw□ 1 6TOS□ HS □  
 2B□ 1b3□ on ice KS□ HS □ 5%□ 1 mm b□  
 K□ □ 48□ □ 4(E□ )KS□

□ 3□ )W 3 □ Volcano  
 plot KlgMcMb  
 lp□ /K eM(xM  
 vb0w)□  
 W□ 8 4 (NT)PK□  
 □ 4(T)SMlp□  
 6Gbp□ □  
 4MMlpK□  
 q <sup>13</sup>C w -TCA w  
 4□ e <sup>13</sup>C w -□  
 □ s <sup>13</sup>C3 lactate □  
 Rblp)2□  
 4 eM □  
 S□

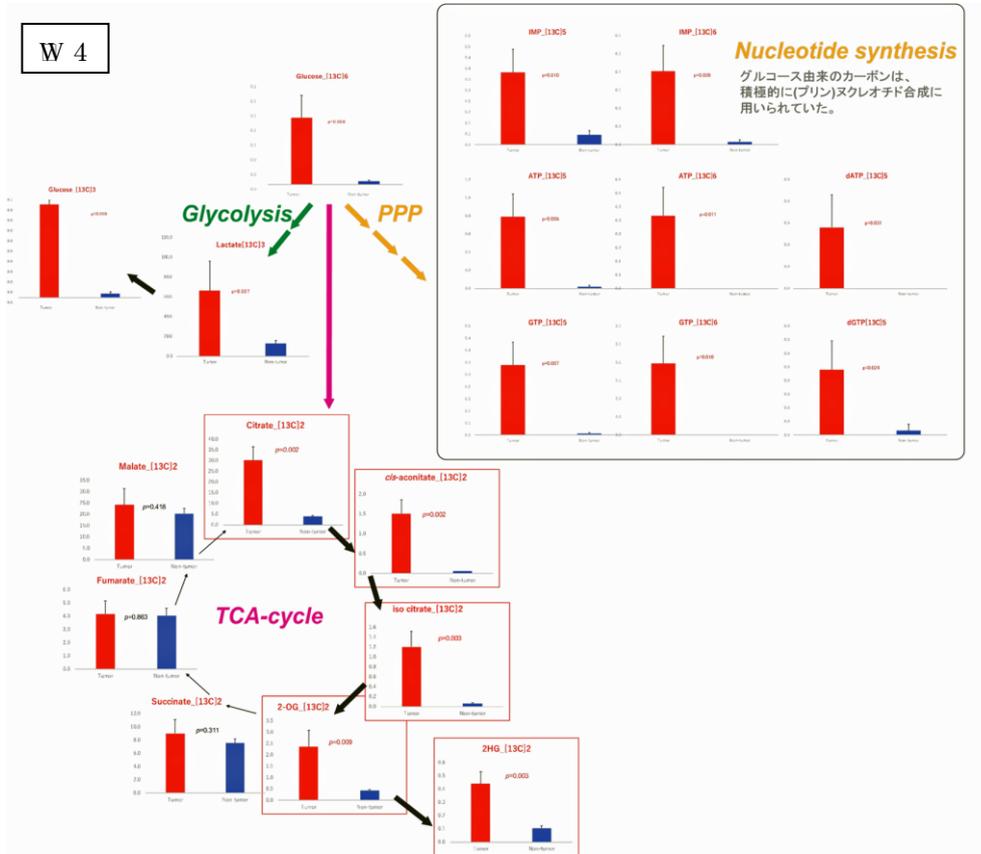
□ 4Gb)2□  
 KS □  
 MS  
 IOS (W 4)2e□ □ 4□  
 7 8 □ □ 4 K □ <sup>13</sup>C6  
 glucose □(□



TCA cycle (PPP)  $^{13}C_6$  glucose (Citrate, iso-citrate, 2-oxo-glutarate(OG)) (Succinate, Fumarate, Malate) ATP

Glucose  $^{13}C_6$  Lactate  $^{13}C_3$  Citrate  $^{13}C_2$  ATP  $^{13}C_5$  GTP  $^{13}C_5$  dGTP  $^{13}C_5$

Glucose  $^{13}C_6$  Citrate  $^{13}C_2$  ATP  $^{13}C_5$  GTP  $^{13}C_5$  dGTP  $^{13}C_5$

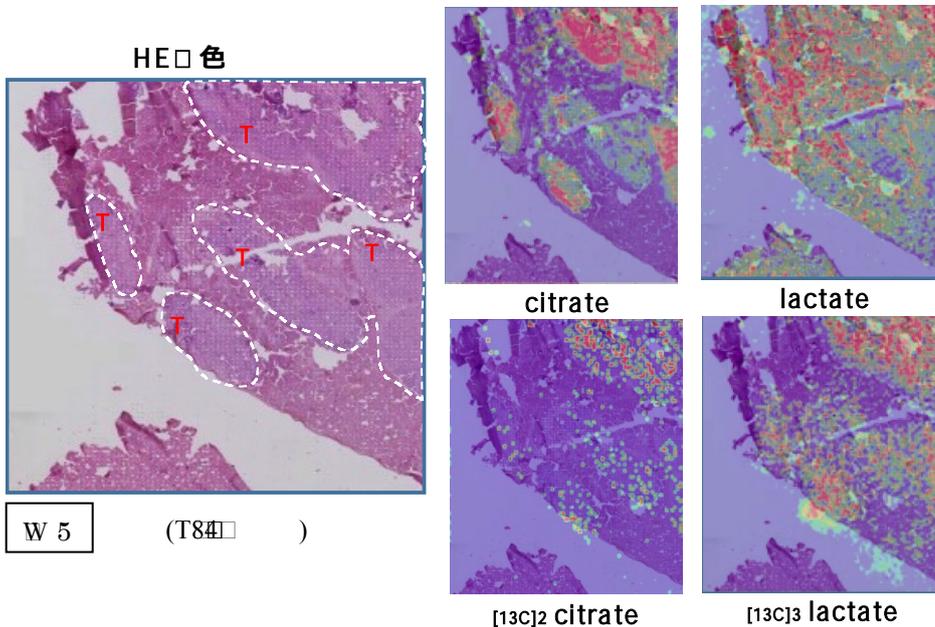


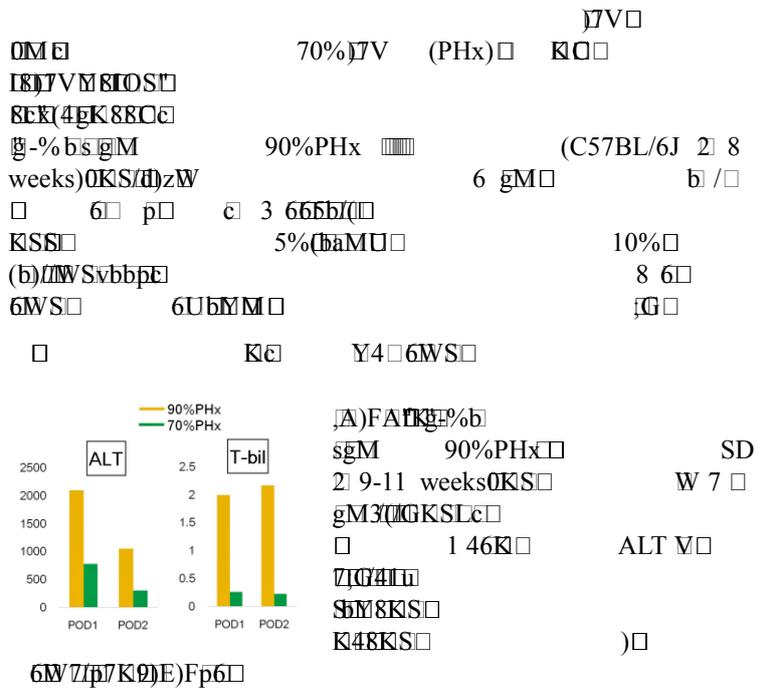
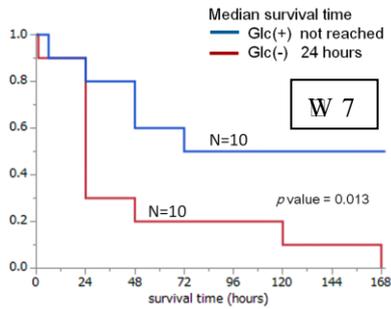
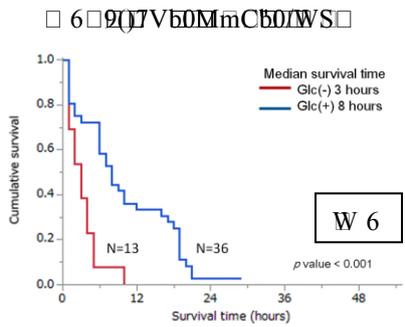
IMS (MOS)  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate  $^{13}C_6$  glucose  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate

citrate  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate  $^{13}C_6$  glucose  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate

citrate  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate  $^{13}C_6$  glucose  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate

citrate  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate  $^{13}C_6$  glucose  $^{13}C_2$  citrate  $^{13}C_3$  lactate





(a)

Yuki Sugiura, Yoshinori Katsumata et al., Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart. Scientific Reports, 2016.

3)  $\bar{z} = e$

7)  $\bar{z} = 0$

0)

54)  $^{13}\text{C}$  Glucose/Glutamine  $^{25}\text{A}$  Heat stabilization  
 2018  
 37)  $\text{pKd}$   $\text{p4f}$   $^{25}\text{A}$  heat stabilization  $^{6}\text{M}$   
 65)  $\text{G2A5}$   $^{25}\text{A}$  2017

4) %2)

(1)%2

%2(8) 7

8) IKEGAWA Masaya

d%268) k

48) 4

8) M5

%2) 8 F8) 60381943

%2(8) 85) K

8) HATANO Etsuro

d%2684)

48%2)

8(9)%2

%2) 8 F8) 80359801

2□

§

8□

UEMOTO Shinji

d%2684□

48%2□

8M5□

%2□

8 F8□ 40252449