

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500353

研究課題名（和文） 代謝解剖学的アプローチによるガス分子受容・生成系を標的とした
脳血流制御機構の解明

研究課題名（英文） Gaseous molecules controlling metabolic systems

研究代表者

梶村 真弓 (KAJIMURA MAYUMI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10327497

研究成果の概要（和文）：外因性の多量の一酸化炭素(CO)は細胞の機能を障害するが、脳内で恒常的に産生されている CO は、酸素が十分にある時は、マウスの脳皮質細動脈をやや収縮させており、急な酸素不足の時に拡張させる予備能を付与する「緊急対応」の鍵分子として働くことを発見した。基礎 CO 量が野生型の約半分の HO-2 欠損マウスを用い、代謝物の分布と局所濃度を網羅的にイメージングできる質量顕微鏡の技術により、エネルギー代謝物の動態を検証した。HO-2 欠損マウスの脳は正常酸素下では、野生型より ATP レベルが高いが、低酸素になると ATP は約半分に低下するのに対し、野生型のマウスでは ATP が維持されることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Enhancement of cerebral blood flow by hypoxia is critical for brain function, but signaling systems underlying its regulation have been unclear. We report a novel pathway mediating hypoxia-induced cerebral vasodilation in studies monitoring vascular disposition in cerebellar slices as well as in intact mouse brains employing two photon intravital laser scanning microscopy. In this cascade, hypoxia elicits cerebral vasodilation *via* the coordinate actions of hydrogen sulfide (H₂S) formed by cystathionine β-synthase (CBS) and carbon monoxide (CO) generated by heme oxygenase (HO)-2. Hypoxia diminishes CO generation by HO-2, an oxygen (O₂) sensor. The constitutive CO physiologically inhibits CBS, so that hypoxia leads to increased levels of H₂S that mediate the vasodilation of pre-capillary arterioles. Mice with targeted deletion of HO-2 or CBS display impaired vascular responses to hypoxia. Thus, in intact adult brain cerebral cortex of HO-2-null mice, imaging mass spectrometry reveals an impaired ability to maintain ATP levels on hypoxia.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：脳血流代謝カップリング、一酸化炭素、硫化水素、ガスバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

本研究は、中枢神経系(CNS)で産生される低分子ガス状メディエータの生成・受容機構を探究し、ガス分子による脳局所血流調節

のメカニズムを解明することを目的とする。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蛋白質が時間的・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十分に立証されていない。

脳は、全組織重量の僅か2%を占めるに過ぎないながらも心拍出量の14%を受容しており、特に灰白質では他組織平均の約10倍もの血流量を維持している。この驚異的に高い血流量を compliance の非常に低い頭蓋骨という狭い空間に納め、同時に正常な頭蓋内圧を保つためには厳格な血流制御が必須である。興味深いことに、CNSの血管へのノルアドレナリン作動性神経支配は、通常、血流制御の中心的な役割を担う細動脈（抵抗血管）ではなく、大半(65%)が毛細血管レベルに達していることが判明した (Peppiatt *et al*, Nature, 2006)。つまり脳では、代謝の活発な細胞の近傍の血管から拡張シグナルが伝播し、血流制御は毛細血管に始まると考えられる。この見地より、COがグルタミン酸やノルアドレナリンなどの neurotransmitter の放出により惹起される cytosolic Ca^{2+} の動員と連動した血管作動性物質の増減を、局所で調節する vascular regulator として作用している可能性を探究する。具体的には、CO、NO、 H_2S 産生酵素欠損マウスの動物実験モデルと *in vitro* でのガス分子と精製レセプター蛋白質の相互作用を検証すること、さらに先端技術である顕微質量分析技術を駆使することにより、CNSにおけるCOのセンサー蛋白質の同定を目指す。

2. 研究の目的

(1) CO-cystathionine β -synthase (CBS)/ H_2S 系による脳微小循環機能制御機構の解明

COの標的分子として H_2S の生成酵素であり脳での高発現が認められたCBSに着目する。 H_2S は血管平滑筋に存在するATP依存型のカリウム(K_{ATP})チャンネルの開口確率を上昇させ細胞膜の過分極を起こすことによって血管平滑筋を弛緩させることが報告された (Zhao *et al.*, EMBO J., 2001)。

我々は、メタボローム解析の結果からCOがtranssulfuration pathwayを抑制することに着目し、この代謝系の律速酵素であるCBSの活性がCOにより阻害され、NOでは阻害されないCO特異的な受容体であることを見出し

た (Hepatology, 49, 2009)。さらに、full lengthのラットCBS遺伝子を大腸菌に発現・精製し、可視分光スペクトルによるヘム軸配位子の解析を行ったところ、ヘムの2つの軸配位子のうちcysteine残基がCOと置換することが酵素反応を阻害するメカニズムであることを突き止めた。興味深いことに、CBSのN末端のヘム鉄のredox stateを H_2S が還元型にシフトさせることにより、COによる当該酵素の阻害効果を増強するしくみがあることの証左を得た。そこでCBSがグリア細胞に、またCO産生酵素であるheme oxygenase(HO)-2がニューロンに、いずれも高発現していることから、 H_2S がヘム鉄の生体内還元剤として機能する可能性の高い脳組織をモデルとし、『COは H_2S 生成を抑制することにより血管の拡張反応を制御するvascular regulatorであり、センサー蛋白質である H_2S 生成酵素(CBS)の活性調節を介して、脳組織内の血流調節と神経伝達の調節に携わっている。』という仮説の立証または否定を試みることを第一目標とした。

(2) 顕微質量分析によるガス分子の生体内作用点の代謝解剖学的解明

我々はこれまでに、CNS組織におけるガスシグナリングを受容体の活性化をoutputとしてイメージングするmechanistic probingや、蛍光プローブによるNOの視覚・定量化に取り組んできた。その結果、COが産生部位の極めて近傍でのみ、センサー蛋白質と作用して生理作用を発揮することや、これらのガスセンサー蛋白質には複数の代謝系の律速酵素が含まれることが判明しつつある。このようにガス状メディエータが複数の標的を有することを鑑みると、その制御機構を理解するためには、一つの指標のみを捉えることしかできない従来の方法論や、目的物質の細胞内分布や組織での局在という位置情報が勘案されないメタボローム解析では不十分である。そこで酵素蛋白質の基質や、生成物、またレセプター蛋白質のリガンド、蛋白質の制御因子等の個々の生理作用に関与する蛋白質以外の低分子の組織・細胞内での分布及び量的・質的な変動を、高空間分解能で多変量的に捉え『生体の物質応答』をプロファイリングすることによってガス分子の制御ポイントを洗い出す解析系、つまり『代謝解剖学』の開拓が必須であるとの考えに至

った。近年、質量分析情報を空間的に二次元で取得し画像化する『質量分析(MS)イメージング』技術が開発され、形態情報を保ったまま細胞内メディエータや代謝分子等の微量成分を測定し、さらにタンデム質量分析(MSⁿ)を行うことによりフェムトモルの感度で未知の代謝産物の構造を決定することが可能になりつつある。この画期的な技術と、in vivoバイオイメージング技術を駆使し、ガス分子が「いつ、どこで、どのように」働くかを的確に捉え、CNS機能の恒常性維持の基盤となる『神経細胞-グリア細胞-微小循環』の三つのコンポーネント間での代謝と血流制御のリンクを徹底的に解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) メタボローム解析

代謝システムは極めて早い流速で動いているために、どのようにサンプル採取するかによって結果が大きく左右される。我々は、麻酔したマウスの心臓を拍動させた状態で頭蓋局所を液体窒素で冷凍することにより、生体内代謝物の分解を最小限に止める in situ freezing 法を用いた。内部標準として L-Methionine sulfone (Wako 502-76641) と 2-Morpholinoethane sulfonic acid (MES, Dojindo 349-01623) 各 300 μM を含んだ methanol 溶液 2 mL に約 300 mg の組織を入れ、超音波破碎器で 2 分間破碎した。十分攪拌した後、水を 500 μL 加え再攪拌した。300 μL - aliquot に 200 μL のククロホルムを添加し、これを遠心した(15,000 rpm, 4 , 15 min)。上層の水-methanol 層から 200 μL を限外濾過フィルター(分画分子量 5,000, Amicon Ultrafree MC 5,000, Millipore)に移し、90 分間遠心した(10,000 rpm, 4°C)。ろ液を遠心濃縮し capillary electrophoresis (CE) Mass spectrometry (MS) (Agilent) 解析試料とした。

(2) 定量的質量分析イメージング

「定量的質量分析イメージング法」とは、一枚の薄切組織標本を用い、数十種類の物質 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イメージング法である。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) 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。

まず、MALDI-IMS は、生体組織を破碎することなく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。我々は、MALDI-IMS と CE/ESI/MS の融合により、組織上の数十種類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ピングを作製することが可能にした。

組織切片を乾燥し、組織内の分子をソフトイオン化するために必要なマトリクス分子を塗布する。質量分析機中で UV パルスレーザーを照射し、切片上の低分子代謝物をイオン化して、それらの質量と電荷の比 (mass-to-charge ration (m/z)) の違いを利用して分離し、分子量、分子種を分析する。各スポットから m/z 250~1000 に含まれる多くのイオンピークが検出できる。代謝物の同定は MS/MS 解析を行い、構造依存的なフラグメントパターンを標準品と比較することにより決定できる。この解析法の最大のメリットは、一回のスキャンで、異なる m/z 値で同定される多くの物質の分布を 2 次元画像として再構成できることである。図 1A に、ATP、ADP、AMP を例に示したが、原理的には MS スペクトラムの全てのピークに対しての画像化が可能である。

MALDI/IMS で得られる画像のスポットごとのシグナルの相対強度を、CE/ESI/MS によって得られる定量結果で標準化し、組織重量当たりの代謝物絶対量として再計算し、画像として再構築する。それらを見かけ上の組織内の代謝物量をして疑似カラー上に記載した代謝物コンテンツマップ(図 1B)を作製する。この方法により、異なる個体間においても代謝物の定量比較検討が可能となる。

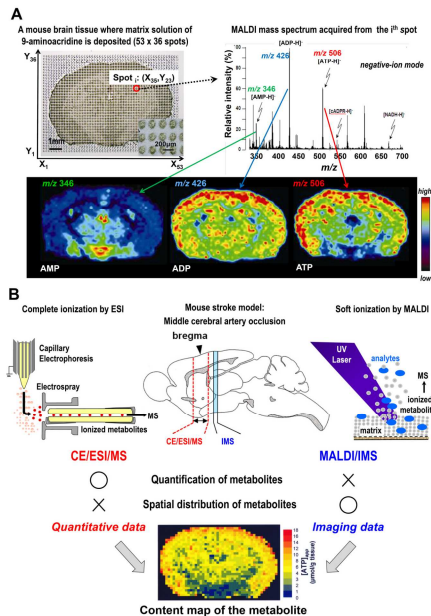


図 1. MALDI-IMS と CE/ESI/MS を融合した定量的質量分析イメージング技術の概念図。A, マウス脳組織を in situ freezing 法で凍結固定した後、組織切片を乾燥し、組織内の分子をイオン化するために必要なマトリックス分子をドットプリントする。ドットポジションに合わせてパルスレーザー照射を行い、イオン化した分子を吸引、MALDI-TOF (飛行時間型) 計測を行うことで質量分析情報を網羅的に収集する。レーザー照射の Raster scan によって各点で MS スペクトルを取得する。各点のピーク強度から二次元イオンマップを作成する。AMP と ATP の脳組織内分布を例として示した。B, 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-IMS により代謝物の局在を画像化する。画像データの特定の代謝物シグナルをピクセルごとに総計したシグナル強度がメタボロームデータと対応すると仮定することによって、当該組織切片上の特定の代謝物を定量データとして表現することが可能になる。ESI; エレクトロスプレー方式イオン化。

(3) 2光子励起レーザー顕微鏡を用いた低酸素負荷時のマウス脳循環代謝の解析

2光子励起レーザー走査型顕微鏡 (2PLSM) により、皮質の深部の血管反応性を検証できるようになった。我々はマウス脳における低酸素 (O_2) 負荷時の、微小循環動態とエネルギー代謝の変化を見るために、2PLSM を用いて、NAD(P)H の自家蛍光と、脳表細動脈の血管径、および脳表細動脈と毛細血管の血流速度を測定した。C57BL/6 雄マウス (20-25g, 8-9 週齢) を Urethane + α -chloralose で麻酔 (腹腔内投与) thinning skull window を作成した。気管内挿管の後、人工呼吸器に装着した。2PLSM システムは FV100MPE (オリンパス社)、レーザー発振器は Chameleon 210 (Coherent 社) を用いた。マウス人工呼吸器を用いて、21% O_2 、10% O_2 曝露時を比較した。

4. 研究成果

(1) CO-cystathionine β synthase (CBS)/ H_2S 系による臓器機能制御機構の解明

脳で恒常的に生成されている一酸化炭素 (CO) が低酸素時の脳血管拡張反応と脳のエネルギー代謝の維持に重要な働きをしていることを発見した。脳や肝臓の heme oxygenase は、分子状酸素を用いて heme を分解することによって大量の CO を生成する。Heme を解毒する臓器である肝臓ではこの反応でできる CO が類洞血管を拡張させ血流を維持するために不可欠なガスであることを我々は 1994 年に発見した。一方、脳で生成

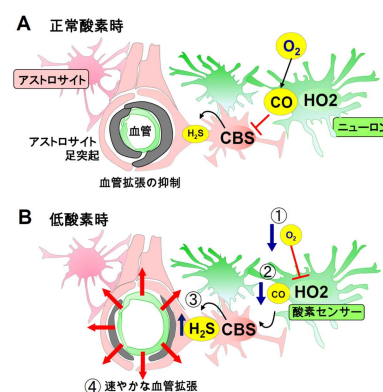


図 2. 低酸素時の neurovascular unit における O_2 -CO- H_2S ガスシグナリングを介した血管拡張反応機構

される CO は、記憶に関与することは知られていたが、heme の解毒が中枢神経系でなぜ活発に行われるのか、大量かつ広範囲に生成される CO の生理学的な意義は謎だった。

本研究では CO を受容する蛋白質として cystathionine β synthase (CBS) に着目し、この酵素が astrocyte に高発現しており、もう一つのガスメディエータであり血管拡張作用のある硫化水素 (H_2S) を生成していること、脳では正常酸素時には CO が CBS を恒常的に抑制することによって H_2S の量が抑制されているため血管が収縮した状態にあることを明らかにした。低酸素時には CO が低下することによって CBS への抑制が解除され、 H_2S が増加することによって血管が拡張することがわかった (図 2)。Heme oxygenase あるいは CBS を発現していないマウスでは、低酸素時に血管拡張が惹起されない。CO の生成できないマウスでは、正常酸素下で野生型マウスよりも ATP が余計に作られており、いざという低酸素時に、ミトコンドリアでの ATP

のバックアップが働きにくくなることも、代謝物の分布と局所濃度を網羅的にイメージングできる質量顕微鏡の技術により解明した(図3)。

酸素が低下するとCOの低下が齎され、H₂Sの増加が起こり、血管拡張が起こるといった情報伝達経路の発見は、ガス分子が代謝システムを精妙に制御することの証左ともなった。

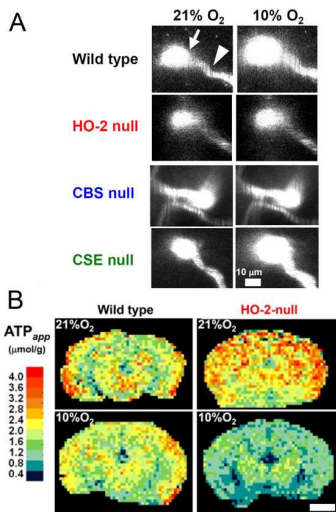


図3. A, マウス脳実質細動脈の低酸素で惹起される拡張反応。2光子レーザー顕微鏡により視覚化。B, 野生型とHO-2-nullのマウスの正常酸素時(上段)・低酸素時(下段)のATP量の比較。

(2) 顕微質量分析イメージングを用いたガス分子依存性代謝動態の解剖学的解析

脳組織で産生されるガス分子による脳局所血流調節機構を生化学的に、かつ、神経細胞・アストロサイト・微小血管から構成されるneurovascular unitというマイクロ形態解剖学的なレベルで解明することに取り組んだ。脳組織のエネルギー代謝は、非常に不均質であり部位特異的であることが特徴である。虚血に対する代謝応答や障害感受性も領域によって大きく異なるため、代謝解剖学的アプローチの開拓が必須であった。虚血性脳障害の急性期には、不可逆的な障害が起こる「虚血コア」と、血流量が低下しながらも細胞死を免れている「ペナンブラ」という二つの特徴的な領域が存在することが知られている。平成22年度は、これら「虚血コア」と「ペナンブラ」における代謝動態の変化を、マクロ解剖学的・時空間的に捉え、異なる個体間で惹起される変動を定量的に検討可能にする実験系の確立を目指した。

その手段として、質量分析イメージング

と網羅的代謝解析法という二つの先端代謝計測技術の融合を試みた。Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) Mass Spectrometry (MS)による質量分析イメージングは、形態情報を保ったまま組織上の複数の代謝分子を測定しその分布を可視化することができる半面、定量性に乏しい。一方capillary - eletrophoresis electrospray ionization (CE-ESI) MSは、優れた定量性を持ち、少量の組織の数百種類の水溶性代謝物を包括的に定量することができる半面、組織を潰すため解剖学的な位置情報が得られない。この両者の長を融合しデータを合わせて計算することにより、組織切片内の代謝産物の位置情報と定量情報が両方とも得られ、異なる組織切片での比較評価も出来るようになった。具体的には、中大脳動脈閉塞によるマウス脳虚血モデルを作製し、in-situ freezing法により代謝物のautolysisを最小限に止め摘出した脳から10 μm厚の末固定凍結乾燥組織切片を作製した。MALDI/IMSによって得られる相対シグナル値とCE/ESI/MSで得られる平均定量値を組み合わせる事で、各ピクセル毎の見かけ上の代謝物量をμmol/g tissueの単位で表し、代謝物の定量情報を疑似カラーで再構築したコンテンツマップを作製することに世界で初めて成功した

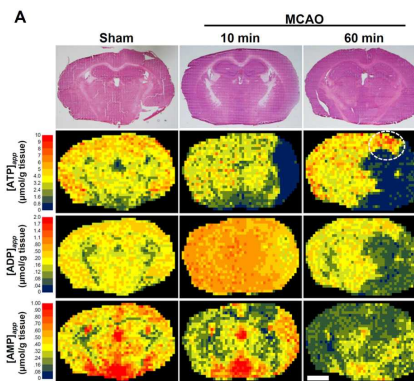


図4. マウス脳虚血のエネルギー代謝の定量的質量分析イメージング。ペナンブラ(白丸で示した領域)ではATPが健常側の同じ部位に比べて増加していることがわかる。ペナンブラとコアを代謝物の変動(metabolic boundary)をベースにして捉えることができる。

(Hattori *et al.*, Antioxidants & Redox Signaling, 2010)。これにより、これまで困難であった特定代謝物量の組織内分布を異なる個体間で比較可能にする「定量的質量分析イメージング」という新手法の構築に至った。その結果、興味深いことに、ペナンブラ領域では血流が低下するにも関わらずATPが

増加することが判明した。これまでに ATP、ADP、AMP 以外にも同一切片上で NADH や cyclic ADP-ribose の定量的イメージングが可能となった。この 2 つの物質は特に虚血コアで著明に増加しており、NADH の増加した領域は ATP の低下した領域と重なりなく相補的に分布することが疑似カラーマップの重ね合わせにより確認され、両領域間の明瞭な metabolic boundary が質量分析イメージングにより初めて示された (図 4)。

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 12 件)

1. Kajimura M.*, Nakanishi T., Takenouchi T., Morikawa T., Hishiki T., Yukutake Y., and Suematsu M. Gas biology: Tiny molecules controlling metabolic systems **Respiratory Physiology & Neurobiology**, (in press) *corresponding author. DOI: 10.1016/j.resp.2012.03.016. 査読有
2. Morikawa T., Kajimura M.*†, Nakamura T., Hishiki T., Nakanishi T., Yukutake Y., Nagahata Y., Ishikawa M.., Snyder S. H., and Suematsu M. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 109, 1293-1298, 2012. †double first authorship, *corresponding author. 査読有
3. Nakamura T., Kajimura M.*, Morikawa T., Hattori K., Ishikawa M., Uchiyama S., and Suematsu M. Acute CO₂-independent vasodilatation of penetrating and precapillary arterioles in mouse cerebral parenchyma upon hypoxia revealed by a thinned-skull window method, **Acta Physiologica**, 203, 187-196, 2011. *corresponding author. 査読有
4. Hattori K., Kajimura M.*, Hishiki T., Nakanishi T., Setou M., Suematsu M. Paradoxical ATP elevation in ischemic penumbra revealed by quantitative imaging mass spectrometry, **Antioxidants & Redox Signaling** (News and Views), 13, 1157-1167, 2010. *corresponding author. 査読有
5. Kajimura M.*, Fukuda R., Bateman R. M., Yamamoto T., and Suematsu M. Interactions of multiple gas-transducing systems: Hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology, **Antioxidants &**

Redox Signaling (Comprehensive Invited Review), 13, 157-192, 2010. *corresponding author. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. Oct 15, 2011 Joint meeting of the European Society for Microcirculation and the German Society of Microcirculation and Vascular Biology, Ludwig-Maximilians-University, Munich Germany. (invited by Professor Agnes Gorchach as a symposium speaker). Kajimura M., Morikawa T., Nakamura T., Hattori K., Hishiki T., Nagahata Y., and Suematsu M. CO-H₂S cascade controls brain microvascular tone during hypoxia.
2. Sep 21, 2011 The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kyoto, Japan. Kajimura M., Morikawa K., Nakamura T., and Suematsu M. Carbon monoxide: the housekeeping regulator of brain microvascular tone (invited speaker)
3. Jul 30, 2009 The 36th International Union of Physiological Society, Kyoto, Japan. Kajimura M., Hattori K., Morikawa K., Ishikawa M., and Suematsu M., Regulation of cerebral vascular tone by gaseous mediators; Interactions of multiple gas-transducing systems (invited speaker)

[図書] (計 6 件)

1. 末松誠、山本雄広、菱木貴子、加部 泰明、梶村真弓。ガス分子による代謝システム制御機構の系統的探索と医学応用 **実験医学** 30 236-243, 2012. 羊土社

[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: 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶村 真弓 (KAJIMURA MAYUMI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 10327497

(2) 研究分担者

石川 眞実 (ISHIKAWA MAMI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60212859

(3) 連携研究者 なし