

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23810027
 研究課題名（和文） 先端分析技術による、脳微小領域における虚血に応答した生理活性分子の探索と可視化
 研究課題名（英文） Visualization of altered brain metabolism in the ischemic mouse brain by advanced-analytical technology.
 研究代表者
 杉浦 悠毅（SUGIURA YUKI）
 慶應義塾大学・医学部・特任講師
 研究者番号：30590202

研究成果の概要（和文）：

生体には強力な生理活性を持つ低分子代謝産物が存在し、これらの異常な増減は重篤な疾患を惹起するために、その局所産生と拡散の実態解明は重要である。しかし、これまでに汎用的な低分子・局在解析の技術基盤はなかった。本研究では、イメージング質量分析を中心にこの技術基盤を確立した。さらにマウス脳梗塞モデルに適用し、代謝産物群の局所動態を網羅的に画像化した。その結果、梗塞巣で特異的に亢進するグルコース代謝経路を同定し、この代謝異常が局所病巣から空間的に拡大する動態を可視化する事ができた。

研究成果の概要（英文）：

Because abnormal presence/absence of bioactive metabolites can induce many diseases, understanding their local production and diffusion within tissues is important. However, visualization technology for such small molecules was lacked. We established imaging mass spectrometry technology for the small molecules, and in the mouse brain infarction model, we successfully identified and visualized regional alterations of glucose-metabolism and their expansion from the ischemic core to adjacent brain regions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：質量分析, 神経科学, 糖代謝, 脳梗塞, 虚血, 死後分解

1. 研究開始当初の背景

生体には強力な生理活性を持つ低分子代謝産物が存在し、代謝異常に起因するこれらの増減は重篤な疾患を惹起する。例えば、エ

イコサノイドのような強力な生理活性を持つ分子は生体内で時空間的に高度に制御された産生/拡散/分解機構を有する。すなわち、正常時には臓器内で産生細胞が時期特異的

に限定され、また短時間に産生/分解されることで作用範囲を限局する“オートコイド”としての性質を示す。従って、疾病時にこれらの異常な増大、拡散は本来作用範囲でない組織部位を中心に重篤疾患を惹起し得る。以上から、このような生理活性低分子の時空間的な偏在情報 (when? where? How much?)は、病態進行機序の解明と、また進行度評価に重要なものとなる。しかし、多くの疾患研究でこれら低分子代謝産物の *in vivo* 局所における異常産生/拡散の実態は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究提案では、質量分析技術と微小組織採取装置を駆使展開し、これらの代謝産物の”局所”動態解明へ道を開く。従来の生化学的なアプローチは主に臓器レベルでの生理活性分子の”総量”を扱い、従って病態局所における集積/減少情報は見過されがちであった。本研究ではこの点を克服する。

まず組織微小領域採取システムを構築し、採取試料から質量分析による生理活性分子の定量系を確立する。さらにイメージング質量分析を導入し解析の空間解像度を向上させる。これらによりマウス脳虚血モデルに適用し、虚血による細胞障害領域が周囲の健全領域に傷害性因子を介して障害を及ぼす分子実態と位置関係を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、これらの代謝産物の組織レベル局在解析における問題点と技術的要求(解決策)を以下の二点と捉える。すなわち、

(課題 1) 生体内での早い代謝回転

>代謝物の死後分解を抑制した試料調整

(課題 2) 生体内での微量な産生量

>高感度な質量分析技術の適用

を課題とその対策方針として捉える。具体的

には、実験動物から瞬時酵素不活化処理を行なった臓器を摘出し、これらから質量分析を応用した微量分子解析を適用することで定量/定性的に解析する。確立した技術の適用例としては局所脳虚血に焦点を当てる。脳梗塞では血流が停滞し、低酸素状態から直接に傷害を受ける梗塞巣と、傷害された細胞から放出される生理活性分子により二次的に傷害される細胞群がある。しかし、傷害因子の分布と拡散について空間的に解像された情報は明らかでなく、細胞障害との因果関係を *in vivo* で評価する実験系が必要であった。

4. 研究成果

研究期間の前半においては、目標達成ために必要な要素技術 1-2 を確立した。

(技術 1) マイクロウェーブ照射法による酵素瞬時不活化 / (技術 2) 水溶性代謝産物群へのイメージング質量分析の適用

1)については、マイクロウェーブアプリケーションを導入し、脳梗塞モデルマウスに適用した。これにより、マウス脳内の死後の代謝産物分解をほぼ完全に抑えることに成功した。その結果従来は検出が困難であった高エネルギーリン酸ヌクレオチドやリン酸糖のような、生体内で瞬時に代謝される代謝産物を死後分解の影響を完全に排除して検出することに成功した。さらに本方法でしか検出されない未知の傷害因子候補の代謝産物を検出することにも成功した。

また (技術 2)のイメージング質量分析計を代謝物イメージング法として確立し、ルーチン実験系として導入した。この結果、(技術 1)で処理した脳虚血モデルマウスの解析に用いたところ、虚血領域に集中して蓄積する既知さらには未知の代謝物群を同定し、蓄積領域を可視化することができた。

期間後半は、これらを用いて虚血に応答し

た代謝因子群の産生拡散マップを作成した。これらの複数分子の分布情報を統合/再構成することで細胞が酸素を消費する好氣的代謝から、酸素を消費しない嫌氣的な代謝へシフトした領域を画像として取得する事ができた。すなわち、個体臓器内において、ある特定の細胞が好気 or 嫌気呼吸を行っているかを画像化し、その領域拡大を評価することができた。

脳血管が閉塞し、神経系を構成するニューロンまたはグリア細胞が低酸素状態に曝されると、これらの細胞は通常状態とは異なるエネルギー代謝を行う。この異常な代謝の結果産生される代謝産物は、細胞外へと放出されニューロン脱落の一因となる。本研究によって梗塞巣中心に位置する細胞が著しい嫌気代謝を行い、特にグリア細胞が嫌氣的呼吸に陥った結果、障害性の代謝因子を大量に放出していることが分かった。そのような因子の顕著な一例として乳酸が挙げられ、さらにこれ以外にも未知分子を含めた病態を悪化させる候補代謝因子が得られた。これらから確立した実験系が局所病態の原因代謝因子を抽出するのに有用である事が分かった。

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] (8 件)

1. Toue S, Sugiura Y, Kubo A, Ohmura M, Karakawa S, Mizukoshi T, Yoneda J, Miyano H, Noguchi Y, Kobayashi T, Kabe Y, and Suematsu M, "Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on-tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer xenografts", *Proteomics*, in press, (2013) [査読有]
2. Sugiura Y, Honda K, Kajimura M and Suematsu M, Visualization and quantification of cerebral metabolic fluxes of glucose in the awake mice, *Proteomics*, in press, (2013) [査読有]
3. Sugiura Y, Zaima N, Setou M, Ito S, Yao

I. "Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry." *Anal Bioanal Chem* 403, 1851-61 (2012) [査読有]
doi: 10.1007/s00216-012-5988-5

4. Hanada M, Sugiura Y, Shinjo R, Imagama S, Ishiguro N, Matsuyama Y, Setou M., "Spatiotemporal alteration of phospholipids and prostaglandins in a rat model of spinal cord injury." *Anal Bioanal Chem* 403, 1873-84 (2012) [査読有]
doi: 10.1007/s00216-012-5900-3

5. Yang HJ, Sugiura Y, Ikegami K, Konishi Y, Setou M., "Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine and its dependence on actin dynamics." *J Biol Chem* 287, 5290-300 (2012) [査読有]
doi: 10.1074/jbc.M111.316877
jbc.M111.316877.

6. 杉浦 悠毅

"質量分析法による代謝物質のイメージングと定量", 実験医学 30, 1949-1954, (2012) [査読無]

7. Beck G, Sugiura Y, Shinzawa K, Kato S, Setou M, Tsujimoto Y, Sakoda S, Sumi-Akamaru H., "Neuroaxonal dystrophy in calcium-independent phospholipase A2 β deficiency results from insufficient remodeling and degeneration of mitochondrial and presynaptic membranes." *J Neurosci* 31: 11411-20, (2011) [査読有]
doi:10.1523/JNEUROSCI.0345-11.2011

8. Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, Fujiwara M, Sugiyama K, Setou M. "Hydroxylated and non-hydroxylated sulfatide are distinctly distributed in the human cerebral cortex." *Neuroscience* 193: 44-53, (2011) [査読有]
doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.045

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 杉浦 悠毅, "グルコース代謝フラックスのイメージングマスマススペクトロメトリー", 第 7 回メタボロームシンポジウム, 2012 年 10 月 10 日, 山形県鶴岡市
- 2) 杉浦 悠毅, "イメージングマスマススペクトロメトリーによる脳の代謝の視覚化", 第 36 回日本医用マスマススペクトル学会年会 2011 年 9 月 16 日, ホテル阪急エキスポパーク
- 3) 杉浦 悠毅, "質量分析による生体の代謝

可視化”，
第6回メタボロームシンポジウム，2011年
10月14日，大阪大学

4) Sugiura Y, Setou M.,
“Visualization of cellular energy status
and oxidative stress by using multiple
metabolite ions in imaging mass
spectrometry.”
59th ASMS Conference On Mass Spectrometry,
2011年6月4日，Denver, USA

〔図書〕（計1件）

杉浦 悠毅，末松誠 編，“実験医学別冊：質
量分析実験ガイド”，羊土社，
全238 page，（2013）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 悠毅 (SUGIURA YUKI)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：30590202