

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560469

研究課題名(和文) グルコース代謝フラックスの脳内イメージング

研究課題名(英文) Visualization and quantification of fluxes of glucose metabolic pathways in brain

研究代表者

杉浦 悠毅 (Sugiura, Yuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30590202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系を構成する細胞は活動に応答してグルコース代謝量と代謝経路を変動させる。例えば動物個体への刺激に応答した神経興奮は、特定の脳部位のグルコース代謝量を増加させる。このような局所で生じる機能的グルコース代謝変動の解析には分子イメージング法が有用である。本研究では質量分析を用いた脳内グルコース代謝経路の網羅的トレースと、そのイメージング法を開発した。具体的には、質量分析の分子網羅性を活用した¹³C標識グルコース代謝産物群の一斉同定/定量法(安定同位体メタボロミクス)と、これらの一斉イメージング(安定同位体イメージング質量分析)を開発し、新規の神経/グリア間をシャトルされる代謝因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In response to a stimuli, neurons and astrocytes alter their metabolic pathways to fit their elevated energy demands. For example, it is known that a stimulation to an animal increase the amount of glucose consumption in the brain region specific manner. To understand molecular mechanism of this phenomenon, a molecular imaging approach is effective. In this research, we developed the novel flux analysis using stable isotopes in combination with MALDI-imaging mass spectrometry, as well as quantitative metabolomics. Those lead us to answer the questions including “during a neural stimulation, in what anatomical regions of the brain, is which metabolic derangement occurring?”. We finally identified a novel metabolic mediator shuttled between neurons and astrocytes up on the stimulation.

研究分野：分析化学

キーワード：脳代謝 イメージング質量分析 fMRI グルコース代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系を構成する細胞は活動にตอบสนองしてグルコース代謝量と代謝経路を変動させる。例えば動物個体への特定の刺激にตอบสนองした神経興奮は、特定の脳部位のグルコース代謝量を増加させる。さらに脳虚血/再還流モデルでは疾患部位のグルコース代謝量、さらに経路が劇的に変動する。このような機能的(または疾患による異常)なグルコース代謝変動は特定脳部位(疾患部位)に限局して生じ、従ってその解析には分子イメージング法が有用である。In vivo (動物個体)に対して、分子イメージングを非侵襲で行う方法としてはPET(positron emission tomography)が挙げられるが、トレーサーを介した単一の代謝指標情報しか得られない。MRS(magnetic resonance spectroscopy)も優れた非侵襲分子イメージング法であるが、やはり空間解像度や感度が十分でない。

(2) これらを背景に本研究では、質量分析を用いた脳内グルコース代謝経路の網羅的トレースと、そのイメージングを企図した。具体的には、質量分析の分子網羅性を活用した ^{13}C 標識グルコース代謝産物群(数十~数百分子種)の一斉同定/定量法(安定同位体メタボロミクス)と、これらの一斉イメージング(安定同位体イメージング質量分析)を開発することで、侵襲的ではあるものの、感度/解像度ともに優れた代謝解析を個体動物に適用した。

2. 研究の目的

(1) 脳機能イメージングは fMRI(functional magnetic resonance imaging)などを用いて行われるが、これらは中枢神経細胞の活動にตอบสนองする『間接的』指標を検出するのみで、脳局所の活動にどのようなエネルギー代謝分子が変動しているかは明らかにされない。

(2) 本研究では、代謝分子の局在を可視化する「質量分析イメージング」を発展させたグルコース代謝経路トレース・イメージング法により、特定の刺激に対して応答/活動する特定脳部位で、どのようなグルコース代謝経路が用いられているかをイメージングにより明らかにする。より詳細には投与した安定同位体 ^{13}C 標識グルコースが、外部刺激にตอบสนองする脳領域で「どのような」代謝分子に変換されたかを網羅的に定量し、さらに可視化する。同一のモデルを fMRI でも解析する事により、血中酸素濃度依存的シグナル(BOLD)信号応答領域での in vivo エネルギー代謝実態を解明する。

3. 研究の方法

(1) 研究の上半期では、以下の3点の実験プロトコルを確立した。

試料調整法の確立

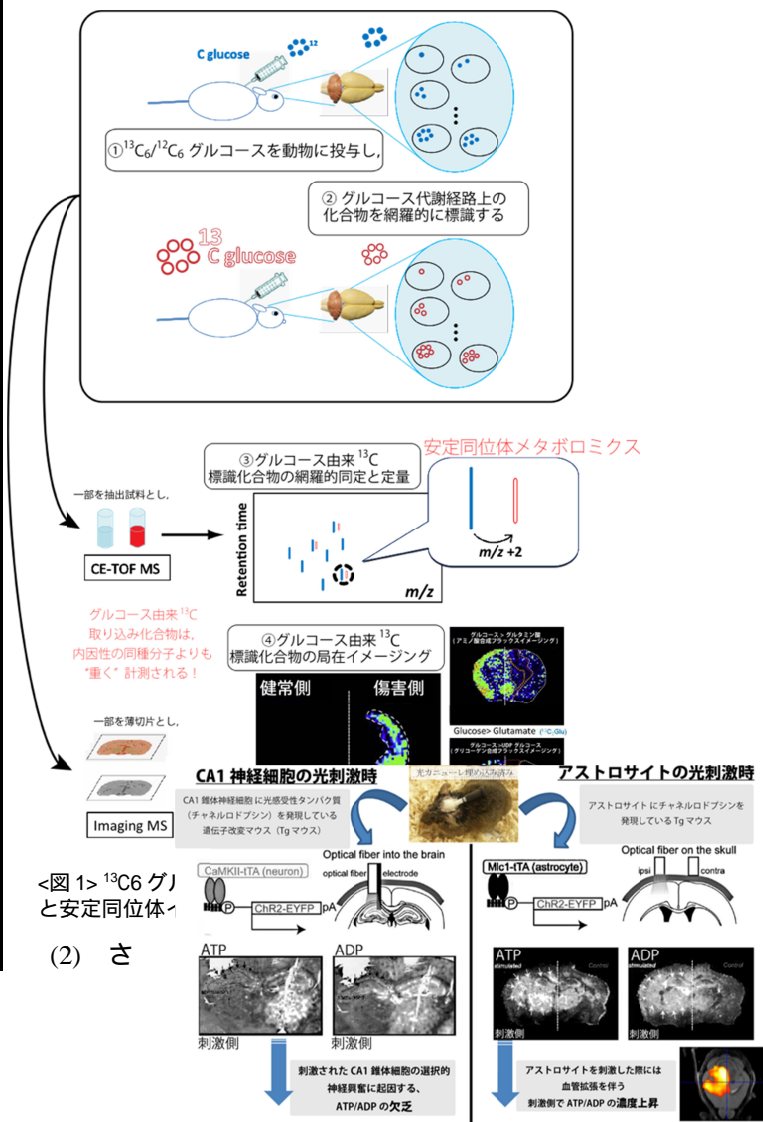
動物個体から破壊検査で代謝解析を行う鍵は、いかに迅速に動物個体の代謝を瞬時に停止させるかにある。すなわち、動物の死後、臓器摘出からの試料調製中に進行する死後酵素分解の抑制が必須である。特にグルコース代謝経路は非常に代謝回転が速い為、安定同位体標識によるトレースを行う際に問題であった。我々は、マイクロウェーブによる酵素瞬時不活化により、脳の代謝を完全に停止させることで解決した。さらに、後述するオプトジェネティクス/光刺激と同期して代謝固定をする事にも成功した。

安定同位体メタボロミクスの確立:

(技術課題 a) 質量分析の分子網羅性を活用して ^{13}C 標識グルコース代謝産物群の一斉同定と定量を行った。質量分析メタボロミクスの手法としては、分子網羅性が高いキャピラリー電気泳動質量分析法(CE-MS)を用いた。これを用いて投与グルコース由来の ^{13}C 含有化合物の網羅的同定/定量した(図1)。

(3) 安定同位体イメージング質量分析の確立:(技術課題 b)

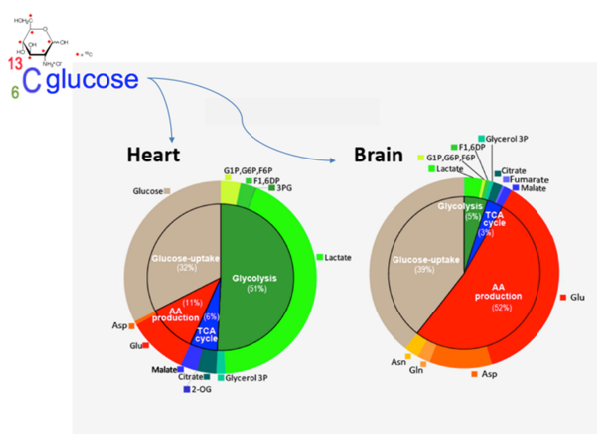
安定同位体メタボロミクスにより同定された ^{13}C 含有化合物を、イメージング質量分析により局在可視化を行う事にも成功した(図1)。



らに研究下半期では、特定脳部位における脳エネルギー代謝機構を解析するために「マウスに対する光遺伝学的 fMRI」と前述「安定同位体イメージング質量分析」とを組み合わせた計測を行った。

4. 研究成果

(1)始めに脳と心臓において、酵素瞬時不活化を企図した、マイクロウェーブ処理を用いた臓器代謝固定プロトコルを確立した。これらを用いて、マウス腹腔内に $^{13}\text{C}_6$ 標識グルコースを投与し 15 分後に代謝固定を行った。それぞれの臓器において安定同位体メタボロミクスを行う事で、脳と心臓において、投与された $^{13}\text{C}_6$ 標識グルコースがどのような下流代謝産物に変換されたかを、網羅的に定量する事が可能となった(図 2)。



(2)次に、これまでに確立した実験プロトコルを用いて「マウスに対する光遺伝学的 fMRI」と「質量分析イメージング」とを組み合わせた計測を行った。具体的には、光照射によって特定の神経細胞またはアストロサイト-選択的に活動を操作できる遺伝子改変マウス(トランスジェニックマウス(Tg マウス))を用い、刺激時/安静時の光刺激依存的な代謝物の空間的改変をイメージングにより解析した。このために、神経細胞/アストロサイト特異的に光感受性タンパク質(ChR: チャンネルロドプシン)を発現させた ChR-Tg マウス系統を用い、光照射によって *in vivo* における細胞選択的な活性化を達成し、この系をイメージング解析に用いた。

ChR-Tg マウス群に光照射をし、CA1-錐体神経細胞/アストロサイトを選択的に活性化し、この時の脳代謝変化をイメージング質量分析により可視化解析した結果、神経細胞またはアストロサイト特異的な活性化を行なったマウスにおいて、ATP の産生/消費動態は全く逆の傾向を示していた。すなわち、光刺激により興奮した神経細胞は ATP を消費する事で、刺激部位で減弱した ATP 分布イメージを示したのに対し、興奮アストロサイトは(おそらく血管拡張を介して)ATP 産生を助長し

たことに起因すると考えられる ATP 濃度上昇を示す分布イメージが得られた。

(3)最終年度では上述のプロトコル群を、神経細胞 or アストロサイトに光感受性タンパク質チャンネルロドプシンを発現させることで、光照射により特定細胞種を刺激できるマウス解析へ適用した。その結果、アストロサイト刺激時にも神経活動非依存的な BOLD シグナルが発生し、これにはグルコースからアセチルカルニチンへの酸化的代謝の関与が示された。さらにアセチルカルニチンはマイクロダイアリシスにより細胞外へ放出されている事も明らかになった。以上から刺激さ

<図 3> 神経細胞またはアストロサイトを光遺伝学的に活性化させた際の、特定脳部位における変動代謝物可視化の例。ATP と ADP はそれぞれの細胞種の活性化により、逆(それぞれ上昇と減少)の変動を示した。

れたアストロサイトは代謝基質としてアセチルカルニチンを産生し、神経細胞へシャトルする機構が考えられた。さらにアストロサイトにおけるアセチルカルニチン代謝が BOLD 信号ソースである事も示唆された。

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〕(計 6 件)(全て査読有り)

(1)Yuki Sugiura, Yoshinori Katsumata, Motoaki Sano, Kurara Honda, Mayumi Kajimura, Keiichi Fukuda, Makoto Suematsu, “Visualization of *in vivo* metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart” *Scientific Reports*, 6, 32361 (2017) doi: 10.1038/srep32361

(2) Yasuaki Kabe, Takehiro Yamamoto, Mayumi Kajimura, Yuki Sugiura, Ikko Koike, Mitsuyo Ohmura, Takashi Nakamura, Yasuhito Tokumoto, Hitoshi Tsugawa, Hiroshi Handa, Takuya Kobayashi, Makoto Suematsu, “Cystathionine β -synthase and PGRMC1 as CO sensors” *Free Radical Biology and Medicine*, 99, 333-344 (2016)doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.025

(3) Toshiki Takenouchi, Yuki Sugiura, Takayuki Morikawa, Tsuyoshi Nakanishi, Yoshiko Nagahata, Tadao Sugioka, Kurara Honda, Akiko Kubo, Takako Hishiki, Tomomi Matsuura, Takao Hoshino, Takao Takahashi, Makoto Suematsu, Mayumi Kajimura, “Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35, 794-805 (2015) doi.org/10.1038/jcbfm.2014.253

(4) Takahashi T, Ohnishi H, Sugiura Y, Honda K, Suematsu M, Kawasaki T, Deguchi T, Fujii T,

Orihashi K, Hippo Y, Watanabe T, Yamagaki T, Yuba S. "Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice." *FEBS J.* 281, 4672-90 (2015) DOI: 10.1111/febs.12974

(5) Sugiura Y, Honda K, Suematsu M. "Development of an Imaging Mass Spectrometry Technique for Visualizing Localized Cellular Signaling Mediators in Tissues (review)" *Mass Spectrom.* 4, A0040 (2015) DOI: 10.5702/massspectrometry.A0040

(6) Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Takei S, Yao I, Maesako M, Kinoshita A, Yamamoto T, Kon R, Sugiyama K, Setou M. "DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease." *Scientific Reports*, 4, 7130 (2014) DOI: 10.1038/srep07130

〔学会発表〕(計 27 件)

(1) 杉浦 悠毅, "質量分析による *in vivo* 代謝リズムのプロファイリング技術" 第 27 回クロマトグラフィー科学会 (招待講演), 2016 年 11 月 16 日~18 日, 慶應義塾大学 共立芝キャンパス (東京都港区)

(2) 杉浦 悠毅, "生体試料からの微量生理活性分子の高感度イメージング" 2016 年真空・表面科学合同講演会 (招待講演), 2016 年 11 月 29 日~12 月 01 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市熱田区)

(3) 杉浦 悠毅, "高感度質量分析による低分子ホルモン分子の可視化" 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 09 月 27 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市青葉区)

(4) 杉浦 悠毅, "on tissue 誘導体化/イメージング質量分析による低分子ホルモンの可視化" 第 41 回日本医用マススペクトル学会年会, 2016 年 09 月 15 日~09 月 16 日, ウィンク愛知 (愛知県名古屋市市中村区)

(5) 杉浦 悠毅, "ドパミン産生イメージング技術の開発" 第 89 回日本薬理学会年会 (招待講演), 2016 年 03 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市西区)

(6) 杉浦 悠毅, "生体代謝と質量分析~ライフサイエンスでどの様に質量分析を活かすか~", 第二回 mini メタボロミクスシンポジウム in 大分大学 (招待講演), 2016 年 02 月 05 日, 大分大学医学部 (大分県由布市挾間町)

(7) 杉浦 悠毅, "Development of an imaging mass spectrometry technique for visualizing localized cellular signaling molecules in tissues", 第 40 回日本比較内分泌学会大会/日本比較生理生化学会第 37 回大会 合同大会 (招待講演), 2015 年 12 月 11 日, JMS アステールプラザ(広島県広島市中区)

(8) 杉浦 悠毅, "質量分析による生体代謝プロファイリングの技術開発", 東京都医学総合研究所セミナー (招待講演), 2015 年 10 月 23 日, 東京都医学総合研究所 (東京都世田谷区)

(9) Yuki Sugiura, "Development of an imaging mass spectrometry technique for visualizing localized cellular signaling mediators in tissues." 10th World Congress for Microcirculation (招待講演), 2015 年 09 月 26 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市左京区)

(10) 杉浦 悠毅, "質量分析を用いた生体分子プロファイリング~微量炎症メディエーター・イメージングとリアルタイム分析へ~", 第 66 回日本薬理学会北部会 (招待講演) 2015 年 09 月 19 日, 富山国際会議場 (富山県富山市大手町)

(11) 杉浦 悠毅, "メタボロミクスによる *in vivo* 生体代謝プロファイリング", 臨床試料を用いた蛋白質解析から治療及び創薬標的探索, そして生体代謝プロファイリングの最前線 (招待講演), 2015 年 09 月 17 日, 日本医科大学 (東京都文京区千駄木)

(12) 杉浦 悠毅, "質量分析による *in vivo* 代謝プロファイリング~イメージングからリアルタイム代謝解析まで~", 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (招待講演), 2015 年 08 月 22 日, 長崎大学薬学部 (長崎県長崎市文教町)

(13) 杉浦 悠毅, "質量分析による生体代謝プロファイリングの展望 ~イメージングからリアルタイム代謝解析まで~", 医薬基盤研究所(NIBIO)セミナー, 2015 年 08 月 03 日, 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 (大阪府茨木市彩都あさぎ)

(14) 杉浦 悠毅, "痛みを仲介する脳内分子の探索のための技術", 第 2 回 緩和医療薬学研究会/第 3 回 Tokyo 疼痛緩和次世代研究会 合同研究会 (招待講演), 2015 年 08 月 05 日~08 月 06 日, 星薬科大学 (東京都品川区荏原)

(15) 杉浦 悠毅, "質量分析による生体代謝プロファイリングの展望", 第 63 回質量分析総合討論会, 2015 年 06 月 17 日~06 月 19 日, 工

ポカルつくば (茨城県つくば市竹園)

(16) Yuki Sugiura, "In vivo Visualization and Quantification of myocardial metabolic fluxes of glucose by mass spectrometry" the 25th Australian and New Zealand Society for Mass Spectrometry & 6th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference, 2015年07月19日~07月22日, Brisbane, Australia (Corner of Glenelg St and Merivale St, South Brisbane, Queensland, Australia)

(17) Yuki Sugiura, "Imaging of brain metabolic fluxes of glucose in the awake mice by mass spectrometry" OurCon II, imaging mass spectrometry conference, 2014年11月18日~11月21日, Antalya, Turkey (İleribaşı Mevkii - Belek Turizm Merkezi, 07500 Antalya,)

(18) 杉浦 悠毅, "IMS をより実用的な代謝生物学のツールとして用いるために", イメージングマススペクトロメトリー・ワークショップ(招待講演), 2014年11月10日~11月11日, 晴海グランドホテル (東京都中央区晴海)

(19) 杉浦 悠毅, "微量生体分子の イメージング質量分析による可視化", 第39回 日本医用マススペクトル学会年(招待講演)2014年10月16日~10月17日, 三井ガーデンホテル千葉 (千葉県千葉市中央区)

(20) Yuki Sugiura, "In vivo Visualization and Quantification of myocardial metabolic fluxes of glucose by mass spectrometry" The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014 (招待講演), 2014年09月10日~09月12日, 京都ホテルグランビア (京都府京都市下京区)

(21) 杉浦 悠毅, "イメージング質量分析による疾患代謝の可視化" 第67回日本酸化ストレス学会学術集会(招待講演), 2014年09月04日~09月05日, 同志社大学今出川キャンパス (京都府京都市上京区)

(22) Yuki Sugiura, "Visualization and quantification of brain metabolic fluxes of glucose in awake mice by mass spectrometry" 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014年08月24日~08月29日, CIGG (Rue de Varembe 17, 1211 Genève Switzerland)

(23) 杉浦 悠毅, "グルコース代謝フラックスの脳内イメージング" 第6回光操作研究会(招待講演), 2014年08月18日~08月25日, 東北大学星陵キャンパス(宮城県仙台市青葉区)

(24) 杉浦 悠毅, "in vivo で ^{13}C 代謝フラック

スを可視化するチャレンジ" 第147回 質量分析関西談話会(招待講演), 2014年08月09日, 島津製作所関西支社 (大阪府大阪市北区)

(25) 杉浦 悠毅, "生体臓器の代謝経路シフトをイメージングする" 第2回 低酸素研究会(招待講演), 2014年07月26日, 早稲田大学 先端生命医科学センター (東京都新宿区)

(26) Yuki Sugiura, "Visualization and quantification of brain metabolic fluxes of ^{13}C -glucose by mass spectrometry" 5th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference (招待講演), 2014年07月16日~07月19日, 北京大学 (5 Yiheyuan Rd, Haidian Qu, Beijing Shi, 中華人民共和国)

(27) 杉浦 悠毅, " ^{13}C 標識化合物を用いて, 代謝フラックスを可視化する" 第41回 BMS コンファレンス(招待講演)2014年07月07日~07月09日, 能登ロイヤルホテル (石川県羽咋郡志賀町)

〔図書〕(計5件)

(1) Yuki Sugiura, Kurara Honda, Makoto Suematsu, "Visualization of Localized Cellular Signalling Mediators in Tissues by Imaging Mass Spectrometry" Chronic Inflammation, Springer Japan, 147-160 (2016)

(2) 杉浦 悠毅, "質量分析による微量生理活性脂質のイメージング" 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患, ニュー・サイエンス社, 311-317(2015)

(3) 杉浦 悠毅, "メタボローム・イメージング-炎症研究でのイメージング質量分析の役割" 臨床免疫・アレルギー科, 科学評論社, 63, 131-138 (2015)

(4) 杉浦 悠毅, "イメージング質量分析による脳梗塞モデルマウスの代謝変動の可視化" 医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社, 249 (2014)

(5) 末松 誠, 杉浦 悠毅 (編), "驚愕の代謝システム (実験医学増刊)" 羊土社, 総ページ数 206 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 悠毅 (Yuki Sugiura)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30590202

(2)連携研究者

高田 則雄 (Norio Takata)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：50415212

田中 謙二 (Kenji Tanata)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30329700