

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860585

研究課題名(和文) 心臓におけるメタボロームイメージングの確立および移植心筋の代謝マップ作製

研究課題名(英文) Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart

研究代表者

勝俣 良紀 (KATSUMATA, YOSHINORI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80464832

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)：質量分析計の開発改良に伴い、臓器の代謝イメージングが実現可能となってきたが、心臓は死後の代謝変化が著しく、解糖系やクエン酸回路などの中心代謝産物の正確な代謝イメージングは難しかった。そこで、死後の代謝変化を最小限にするため、マイクロウェーブによる固定法を開発した。さらに、炭素13(¹³C)でラベルした基質を用いて、心筋梗塞モデルのグルコースおよび乳酸のトレースイメージングも成功した。虚血の中心部ではグルコースを乳酸に変換するとともに、乳酸を積極的にTCAサイクルで代謝していること、虚血の周辺部位ではグルコースを積極的にTCAサイクルで代謝していることがトレースイメージングにより明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Acute ischemia produces dynamic changes in labile metabolites. To capture snapshots of such acute metabolic changes, we utilized focused microwave treatment to fix metabolic flow in vivo in hearts of mice 10 min after ligation of the left anterior descending artery. Our techniques allowed us to determine the fate of exogenously administered ¹³C6-glucose and ¹³C3-lactate. The penumbra regions, which are adjacent to the ischemic core, exhibited the greatest adenine nucleotide energy charge and an adenosine overflow extending from the ischemic core, which can cause ischemic hyperemia. Imaging analysis of metabolic pathway flows revealed that the penumbra executes accelerated glucose oxidation, with remaining lactate utilization for tricarboxylic acid cycle for energy compensation, suggesting unexpected metabolic interplays of the penumbra with the ischemic core and normoxic regions.

研究分野：循環器内科

キーワード：メタボリックイメージング

1. 研究開始当初の背景

基礎研究の発展には、物質の定量技術や局在の可視化技術の開発が必須である。心臓疾患の病態生理学的な発見もこれらの技術の発展に大きく依存している。1970-1980 年に開発が進んだウェスタンブロット法や免疫染色法は、タンパク質の定量的や空間的な解析を可能とした。また、同時期に開発が進んだ、fluorescence in situ hybridization (FISH)、1987 年にキャリーマリスが開発した polymerase chain reaction (PCR)法は、mRNA, DNA の空間的、定量的な解析を可能とした。一方、解糖系やアミノ酸を含む低分子代謝産物の正確で網羅的な解析は長年困難であったが、2002 年の Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS)の開発により、組織内の網羅的な低分子代謝産物の解析が可能となった (Anal. Chem., 74, 2233 (2002)) (メタボローム)。さらに質量分析法の改良が進み、2007 年には imaging mass spectrometry (imaging MS)を応用し、低分子代謝産物を時空間的に解析する技術 (Mass Spectrom. Rev. 26, 606 (2007))が開発された(メタボリックイメージング)。この技術の開発により、タンパク質に対する免疫染色法や、mRNA に対する in situ hybridization に加え、低分子代謝産物を中心とする未知の物質の局在をメタボリックイメージングで評価することが可能となった

一方、組織内の低分子代謝産物を可視化(メタボリックイメージング)する際の問題点として、低分子代謝産物の分解が急速である点があげられる。従来の低分子代謝産物の保存に関しては急速凍結法が最良と考えられてきたが、凍結時や再融解時に一部の低分子代謝産物が損失することが認識されていた。一方、代謝産物の分解酵素を瞬時に死活化させ、低分子代謝産物を安定化させる処理方法として、マイクロ波を用いたサンプルの

処理が以前より提唱されていた。しかし、マイクロ波を特定の臓器に照射することが技術的に困難であったため、これまでは脳以外の臓器での応用は発達しなかった。心臓での低分子代謝産物の時空間的な分布(メタボリックイメージング)を把握するためには、マイクロ波を用いた心臓サンプルの処理と imaging MS 技術を組み合わせる必要がある。また、以下に記述する病的疾患の代謝マップを作成するにあたって、より高い空間解析度のメタボリックイメージング技術を開発、改良する必要がある。

2. 研究の目的

心臓におけるマイクロウェーブによるサンプル処理と imaging MS を組み合わせることで(メタボリックイメージング)、これまで不可能であった心臓の虚血再灌流傷害時の代謝の変化を、より詳細に時空間的に解析し、視覚的にとらえることを目的とする。また、質量分析のスクリーニング能力を生かし、新規の代謝産物を探索する。さらに ^{13}C glucose、 ^{13}C lactate、 ^{13}C palmitate などの放射性物質を併用することで、flux 解析を用いたメタボリックイメージングを行い、代謝産物を介した心筋組織内の細胞間コミュニケーション、および虚血心筋生存維持機構を明らかにすることを目的とする。その結果、未知のバイオマーカーの同定、虚血再灌流障害軽減のための創薬の開発へ発展できることが期待される。

3. 研究の方法

(1) マイクロ波を用いた心臓サンプルの処理の有用性の検証

10-15 週のマウス(C57BL6J)の心臓サンプルを、麻酔下でマイクロ波にて心臓を処理後に凍結保存、頸椎脱臼後、速やかに心臓を冷却した Phosphate buffered saline

(PBS)で洗浄し、液体窒素での急速凍結保存で、心臓サンプルを摘出する。それぞれの心臓サンプルを Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS)法、imaging MS にて解析し、低分子代謝産物の変化を検証する。これまでは(2)が、低分子代謝産物の分解抑制に有効であると考えられていたが(S hori, 1988 JMCC 21 203)、マイクロ波による心臓サンプルの処理が代謝産物の保存に対し最も有効な技術であるかどうか、またマイクロ波による心臓サンプル処理でメタボリックイメージングが可能であるかどうかを検証する。

(2) 心臓の心筋梗塞モデルの Imaging MS 法の妥当性の評価

10-15 週のマウス(C57BL6J)も用いて心筋梗塞モデルを作製し、マイクロウェーブ法にて心臓サンプルを処理し、低分子代謝産物の分解を完全に抑制する。Imaging MS、CE-MS 法により心筋梗塞部位の代謝の変化を確認する。梗塞部で上昇していることが過去に実証されている低分子代謝産物(乳酸 lactate など)を用いて、メタボリックイメージングでの時空間的な評価の妥当性を検証する。

(3) メタボリックイメージングを応用し、梗塞部、梗塞周囲部の代謝マップ、flux マップを作成

10-15 週のマウス(C57BL6J)も用いて心筋梗塞モデルおよび心臓虚血再灌流モデルを作製し、マイクロウェーブ法にて心臓サンプルを処理後、¹³C-glucose, ¹³C lactate, ¹³C palmitic acid を用いてメタボリックイメージングによる Flux 解析が可能かを検証する。また梗塞部、梗塞周辺部、非梗塞部での代謝の変化、並びに代謝産物を介した心筋組織内の細胞間コミュニケーションを解析する。虚血部位の代謝の変化を時空間的な分布を詳細に把握する。

4 . 研究成果

質量分析計の開発改良に伴い、臓器の代謝イメージングが実現可能となってきたが、心臓は死後の代謝変化が著しく、解糖系やクエン酸回路などの中心代謝産物の正確な代謝イメージングは難しかった。そこで、死後の代謝変化を最小限にするため、マイクロウェーブによる固定法を開発した。さらに、炭素 ¹³ (¹³C) でラベルした基質を用いて、心筋梗塞モデルのグルコースおよび乳酸のトレースイメージングも成功した。虚血の中心部ではグルコースを乳酸に変換するとともに、乳酸を積極的に TCA サイクルで代謝していること、虚血の周辺部位ではグルコースを積極的に TCA サイクルで代謝していることがトレースイメージングにより明らかとなった。

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 }(計 1 件)

Sugiura Y, Katsumata Y, Sano M, Honda K, Kajimura M, Fukuda K, Suematsu M. Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart. Sci Rep. 2016 Sep 1;6:32361. 査読有

{ 学会発表 }(計 1 件)

Yoshinoti Katsumata, Yuki Sugiura, Kurara Honda, Mayumi Kajimura, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano, Makoto Suematsu, Imaging Mass Spectrometry with Focus Microwave Treatment Reveals Heterogeneity in Directional Glucose Fluxes In and Around Ischemic Myocardium; American Heart Association

Scientific Session 2014, 2014/11/18 Chicago,
Illinois, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝俣 良紀 (Yoshinori Katsumata) 慶
應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 80464832

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()