慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ガス分子依存性多元的情報伝達系を標的とした脳エネルギー代謝・ 血流制御機構の解明
Sub Title	Gas-dependent mechanisms for neurovascular coupling
Author	梶村, 眞弓(Kajimura, Mayumi) 石川, 眞実(Ishikawa, Mami)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	ガスを含む低分子代謝物は, 金属と相互作用して微弱な振動分光学的信号を発する性質をもつ。また金属ナノ粒子の表面に吸着した分子のラマン散乱強度が, 数桁も増強する現象が発見され, シグナル増強に活用されるようになった。我々は, アルミの水熱処理によってベーマイトというナノ微細凹凸構造が容易に形成されることを利用し, その上に金原子を蒸着し, 高い表面増強ラマン散乱活性を有する"Gold Nanocoral"(金のナノサンゴ礁)という新規ナノ構造の量産開発に成功したラマンイメージング技術を駆使すると, 広い視野で生体ガス分子の分布や量が超高感度でアセスメントできる可能性がある。 Application of SERS for tissue-imaging has been limited because of technical constraints to fabricate a SERS substrate ensuring hot-spot formation uniformly over a large area with ease. To overcome this hurdle, we used the boehmite nanostructure easily achieved by immersing the aluminum film in boiling water. Sharp geometry of boehmite is an efficient template for the gold deposition ensuring strong enhancement of SERS signals. This simple method made it possible to produce a SERS substrate with a size of a square centimeter order, the dimension necessary to accommodate most tissue samples. GNC substrate enabled the large-area SERS imaging to visualize an ischemic core of mouse brain tissue without labeling for the first time. SERS has strength in visualizing metabolites as they exist in the tissue without any chemical pretreatment. We believe that this devise will give rise to new insights to characterize gas-dependent metabolic interactions between distinct regions of tissues.
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2012～2014 課題番号：24500448 研究分野：神経科学, 神経化学, 神経薬理学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24500448seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５００４４８

研究課題名（和文）ガス分子依存性多元的情報伝達系を標的とした脳エネルギー代謝・血流制御機構の解明

研究課題名（英文）Gas-dependent mechanisms for neurovascular coupling

研究代表者
梶村　眞弓（Kajimura, Mayumi）

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：１０３２７４９７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：ガスを含む低分子代謝物は、金属と相互作用して微弱な振動分光学的信号を発する性質をもつ。また金属ナノ粒子の表面に吸着した分子のラマン散乱強度が、数桁も増強する現象が発見され、シグナル増強に活用されるようになった。我々は、アルミの水熱処理によってベーマイトというナノ微細凹凸構造が容易に形成されることを利用し、その上に金原子を蒸着し、高い表面増強ラマン散乱活性を有する“Gold Nanocoral”(金のナノサンゴ礁)という新規ナノ構造の量産開発に成功したラマンイメージング技術を駆使すると、広い視野で生体ガス分子の分布や量が超高感度でアセスメントできる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Application of SERS for tissue-imaging has been limited because of technical constraints to fabricate a SERS substrate ensuring hot-spot formation uniformly over a large area with ease. To overcome this hurdle, we used the boehmite nanostructure easily achieved by immersing the aluminum film in boiling water. Sharp geometry of boehmite is an efficient template for the gold deposition ensuring strong enhancement of SERS signals. This simple method made it possible to produce a SERS substrate with a size of a square centimeter order, the dimension necessary to accommodate most tissue samples. GNC substrate enabled the large-area SERS imaging to visualize an ischemic core of mouse brain tissue without labeling for the first time. SERS has strength in visualizing metabolites as they exist in the tissue without any chemical pretreatment. We believe that this devise will give rise to new insights to characterize gas-dependent metabolic interactions between distinct regions of tissues.

研究分野：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　虚血　低酸素　ガスバイオロジー　質量分析イメージング　一酸化炭素

１．研究開始当初の背景

脳組織は恒常的にmicroM-orderの高レベルの一酸化炭素(CO)を、neuronに局在する構成型heme oxygenase2 (HO2)により産生している。これまで、末梢神経系(PNS)では、頚動脈小体のglomus cellで、HO2が低酸素を感知してCO生成を減少させることにより呼吸を調節することが示唆されていた（Williams *et al.*, Science 2004)。しかしながら、中枢神経系(CNS)でのCOの役割に関しては、1995年にTonegawaらがHO2 null mouseを作製し、HO2-CO系の生理学的存在意義を検証したが、明確な表現型が得られず、それ以来の謎であった。最近我々は、COがメチオニン代謝経路のtranssulfuration経路の律速酵素であり硫化水素(H_2S)産生酵素であるcystathionine β-synthase (CBS)の内因性阻害物質であることを見出した（Hepatology, 2008)。さらに脳皮質においては、neuronに局在するHO2は脳実質組織の酸素センサーとして機能し(O_2に対するKm = 35 μM)であり、前述のCO-CBS経路とリンクして、低酸素時に脳実質細動脈を秒オーダーで拡張させる即効型・可逆的な多元的ガス依存性シグナリングが形成されていることを明らかにした(PNAS, 2012)。この結果は、CNSにおけるCOの役割としては研究史上重要なものであり、大きなブレークスルーとなった。これらの研究成果を踏まえ、本研究では、脳において複数のガス分子が生物活性を発揮するメカニズム及び神経・血管系におけるエネルギー代謝とリンクしたガス分子依存性の情報伝達機構を生化学的に解明し、その生理学的意義を理解することを目的とした。

２．研究の目的

生体内で生成されるガス分子は、高分子の構造内に比較的容易に浸透し、金属原子や鉄-硫黄クラスターを有する補欠分子族への結合や、低分子の官能基に特異的に結合することにより生物活性を発揮する。ガス分子の作用は、可逆的・即効的である。また、多元的な標的をもつことを特徴とするが、それ故に、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、ガス分子の生成・受容及び情報伝達機構と生理作用との因果関係は十分に立証されていない。本研究は、脳組織で産生されるガスの生成・受容機構を探究し、ガス分子によるエネルギー代謝と血流調節のカップリング機構を解明することを目的とする。

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(MS^n)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、超音波破砕器で2分間破砕した。十分攪拌した後、水を 500 μL 加え再攪拌した。300 μL－aliqoutに200 μLのクロロホルムを添加し、これを遠心した(15,000 rpm, 4°C, 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、生体組織を破砕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量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トマップ作製を可能にした。

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ッ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。この解析法により、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。

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トマップを作製する。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。

（3）金微細粒子配列技術の応用による新規ガスイメージング技術の構築　-金ナノコーラルによる表面増強ラマン散乱の応用

ガスを含む低分子代謝物は、金属と相互作用して微弱な振動分光学的信号（ラマン散乱）を発する性質をもつ。また100 nmサイズの金属ナノ粒子の表面に吸着した分子のラマン散乱強度が、数桁も増強する現象が発見され、シグナル増強に活用されるようになった。この現象は、“表面増強ラマン散乱”(Surface enhanced Raman scattering: SERS)とよばれる。しかしながら、近年のナノテクノロージーの進歩をもってしても、組織イメージングを可能にするような大面積のSERSディバイスの作製は困難であった。アルミの水熱処理によってベーマイトというナノ微細凹凸構造が容易に形成されることを利用し、その上に金原子を蒸着し、高いSERS活性を有する“Gold Nanocoral”(金のナノサンゴ礁)という新規ナノ構造の量産開発に成功した。“Gold Nanocoral”という造形技術と、ラマンイメージング技術を駆使すると、広い視野でガスを含む低分子代謝物の分布や量が超高感度でアセスメントできる可能性がある（富士フィルム社との共同研究）。

４．研究成果

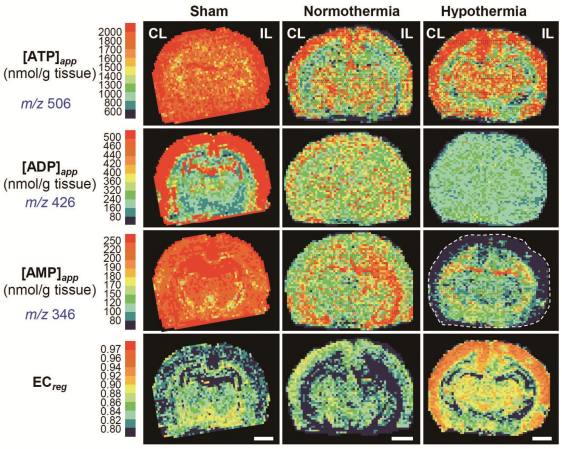
（1）定量的質量分析イメージングによる低体温療法の生体内作用点の代謝解剖学的解明

新生児低酸素性虚血性脳症は、周産期における最重要疾患のひとつである。神経学的後遺症を残すことが多いが、速やかに低体温療法を行うことにより予後を改善できることが示されている。しかし、低体温療法の有効性に関わるメカニズムが未解明であるため、治療温度、持続時間、復温方法、併用療法等、治療プロトコールの至適化は困難であった。本研究は、低体温によって惹起される脳代謝システムの変動を、経時的かつ部位特異的に観察することにより、本治療法の分子標的・代謝制御のポイントを詳らかにし、低体温療法の至適化に資することを目的とした。

生後7日のSprague-Dawley系雄性ラットの左総頸動脈を結紮した後、8%酸素に2.5時間曝露、新生仔低酸素性虚血性脳症モデルを作製した。その後、体温を38℃（常温群）と30℃（低体温群）の2群に分けてコントロールしつつ21%酸素下で3時間再酸素化した。低体温による代謝変動を系統的に解析するため、摘出した大脳から水溶性代謝物を抽出しメタボローム解析を行った。さらに、代謝制御のポイントと考えられる複数の代謝物に着目し、定量的質量分析イメージングを用いて、その脳内分布と領域特異的な動態を解

析した。

107 種類の代謝物を包括的かつ定量的にプロファイリングした。低酸素化直後の大脳では、ピルビン酸、乳酸等が上昇した。再酸素化における代謝プロファイルにおいて、低体温群では常温群に比して、（1）アセチル基供与体であるピルビン酸、アセチル CoA、アセチルコリンおよびグルタミン酸が減少、(2) 脱アセチル代謝物であるカルニチンやコリン等が増加していることが示された。さらに、定量的質量分析イメージングにより、低体温群では、アセチルコリンが海馬と扁桃体において減少すること、カルニチンが同部位で増加することが明らかとなった。また、低体温処理によるグルタミン酸の減少は、大脳の全領域で認められた。

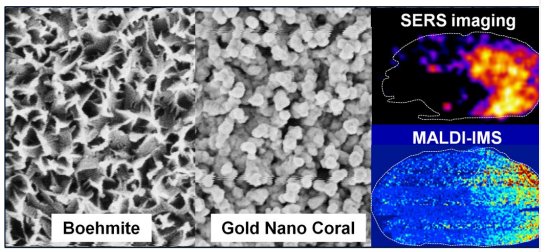


ラット 新生仔低酸素性虚血性脳症モデルのエネルギー代謝の定量的質量分析イメージング。Sham 対照群（左）常温群（中）低体温療法群（右）。低体温療法群では ATP が常温分群に比べて増加していることがわかる。エネルギー代謝物の変動を部位特異的に捉えることができる。

新生仔低酸素性虚血性脳症における低体温療法は、低酸素・虚血によるアセチルコリンやグルタミン酸の増加を抑制し、カルニチンを増加させることが明らかとなった。低体温療法の至適化には、脳内の神経伝達物資とエネルギー代謝動態に関わるアセチル基代謝の制御が重要であることが示された。(Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 14 January 2015; doi:10.1038/jcbfm.2014.253 に発表)。

（2）金微細粒子配列技術の応用による新規ガスイメージング技術の構築　-金ナノコーラルによる表面増強ラマン散乱の応用

我々は脳梗塞部位の ATP 分解産物（adenosine, inosine, hypoxanthine）の上昇を、特殊な標識なしに finger print で画像化することに成功した(ACS Nano, 8(6) 5622-5632, 2014)。ラマンイメージングの弱点はスペクトルのピークの帰属を確定することが困難なことであるが、我々は隣接組織切片の質量分析イメージングを使って、虚血部位で上昇する代謝物の正体を同定し、この問題を克服した。



Gold Nanocoral による新規虚血イメージング　ベーマイトのナノ微細凹凸構造上に金原子蒸着すると高い SERS 活性を有する“Gold Nanocoral”を作成できる。走査型電子顕微鏡写真で示されたベーマイト（左）、金のナノサンゴ礁(中)。波数 736 cm^{-1} でイメージングすると脳梗塞巣で高い SERS が認められた（右上）。右下は、隣接切片の inosine の質量分析イメージング

CO は金と相互作用して 2150 cm^{-1} 付近に強いラマンピークを有することが予測されることから、当該ピークを検出するため、ラマン顕微鏡に搭載している分光器の最適化を行った。さらに、従来の垂直方向から金原子蒸着から、斜め方向から蒸着すると、形成される金粒子のアスペクト比が変化して SERS enhancement factor が一桁上昇することを発見した（論文作成中）。これらの改良により、溶液中の CO（100 microM)を非標識で検出することに成功した。GNC ディバイスは、基板側からラマン信号を計測（励起/検出）することが可能であるため、培養細胞系に応用できるメリットがある。今後は野生型マウス繊維芽細胞と heme oxygenase 2 の mutant 株を用い、これらの細胞からの CO の放出をリアルタイムで検出することを目指し、世界初のガス分子バイオイメージング技術の確立を目標とする。さらに細胞外に放出される様々な代謝物を経時的に追跡する技術、あるいは簡単な基板への接触だけで多くの少量のサンプルの代謝物を解析する技術として発展させたい。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）***corresponding author**.

1. Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, Nakanishi T, Nagahata Y, Sugioka T, Honda K, Kubo A, Hishiki T, Matsuura T, Hoshino T, Takahashi T, Suematsu M, and **Kajimura M***. 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.*** Jan 14, **2015**. doi: 10.1038/jcbfm.2014.253 査読有

2. Yamazoe S, Naya M, Shiota M, Morikawa M, Kubo A, Tani T, Hishiki T, Horiuchi T, Suematsu M, and **Kajimura M ***. Large-area surface-enhanced Raman spectroscopy imaging of brain ischemia by gold nanoparticles grown on random nanoarrays of transparent boehmite, ***ACS Nano*** 8(6): 5622-5632, **2014**. doi: 10.1021/nn4065692 **査読有**

3. Sugiura Y, Morikawa T, Takenouchi T, Suematsu M, and **Kajimura M*,** Cilostazol strengthens the endothelial barrier of post-capillary venules from the rat mesentery in situ**,** ***Phlebology*** 29(9):594-599, **2014**. doi: 10.1177/0268355513497361 **査読有**

4. Sugiura Y, Honda K, **Kajimura M*** and Suematsu M, Visualization and quantification of cerebral metabolic fluxes of glucose in the awake mice**,** ***Proteomics*** 14(7-8):829-38, **2014**. doi: 10.1002/pmic.201300047 **査読有**

5. Kubo A, **Kajimura M.,** and Suematsu M. Matrix-assisted laser desorption/ ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (IMS): A challenge for reliable quantitative analysis, ***Mass Spectrometry***, 1. A0004, **2012**. doi: 10.5702/massspectrometry.A0004 **査読有**

〔学会発表〕（計 17 件）（発表年月日、学会等名、発表場所、発表者(代表)名、発表表題）

1. Sep 6, 2012, Society for Free Radical Research International, 16th Biennial, Imperial College, London, UK. **Mayumi Kajimura**, A CO-sensitive H_2S cascade mediates acute hypoxic regulation of the cerebral microcirculation and metabolism. (Invited).

2. Apr 28, 2014, Experimental Biology 2014, San Diego, USA. **Kajimura Mayumi**. Takenouchi T. and Suematsu M. Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection *via* a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia. (Poster)

3. **平成 24 年 6 月 30 日、第 12 回日本 NO 学会、神戸コンベンションセンター、兵庫県神戸市。（シンポジスト）梶村　眞弓、一酸化炭素・硫化水素カスケードによる脳微小循環代謝制御**

4. **平成 25 年 5 月 18 日、第 28 回日本ショック学会、北里大学薬学部コンベンションホール、東京都港区。（シンポジスト）梶村　眞弓、一酸化炭素・硫化水素カスケードによる脳微小循環代謝制御**

5. **平成 25 年 8 月 3 日、第 17 回酸素ダイナミクス研究会、弘前大学医学部コミュニケーションセンター、青森県弘前市。（シンポジスト）梶村　眞弓、中枢神経系における一酸化炭素の役割**

6. **平成 25 年 11 月 15 日、第 24 回** Forum in DOJIN、**熊本ホテルキャスル、熊本県熊本市。（招待講演）梶村　眞弓、一酸化炭素・硫化水素カスケードによる脳微小循環代謝制御**

7. **平成26年3月20日、第87回日本薬理学会年会、東北大学百周年記念会館川内萩ホール、宮城県仙台。（座長）国際シンポジウム臓器微小循環障害と回復の生体内制御機構と治療標的 Mayumi Kajimura**, Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway

8. **平成 26 年 9 月 13 日、第 24 回脳血管シンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市。（招待講演）梶村　眞弓　アストロサイトによる脳微小循環代謝制御－ガスメディエータによる調節**

〔図書〕（計 3 件）

1. **末松　誠、山本　雄広、梶村　眞弓。一酸化炭素とシグナル伝達　酸化ストレスの医学，診断と治療社　137-144，2014．9 月 1 日発行**
2. **梶村眞弓、森川隆之、菱木貴子、中西豪、中村智実、末松誠。驚愕の代謝システム-　実験医学 32，51-56，2014．9 月 10 日発行**
3. **末松誠、大村光代、森川隆之、笠原正貴、久保亜紀子、南嶋洋司、梶村眞弓。質量分析研究のストラテジー-　実験医学 30，84-90，2012．11 月 1 日発行**

〔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　眞弓　(KAJIMURA MAYUMI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
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