

# 研究報告書

## 「代謝経路フラックスイメージング法による”局所”疾患代謝の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 杉浦 悠毅

### 1. 研究のねらい

ヒト疾患実態を反映した代謝物マーカーの開発/創薬ターゲットとなる代謝経路の同定には、疾患モデル動物臓器での機序解明が欠かせない。しかし現状、モデル動物の”摘出臓器”における代謝物測定の技術には、以下3つの重大な課題がある。

- ① 生細胞の中心代謝回転は高速であり(秒オーダー)、動物を麻酔し、臓器摘出する間も劇的に進行する『死後分解を抑制するサンプル調製法』が必須である。
- ② 多数の細胞種が混在する動物臓器において、疾患代謝をもたらしている責任細胞種を可視化し同定できる『代謝物イメージング技術』が必須である。
- ③ 生体内の臓器では血液を介した不足/過剰な代謝物の補充/排出が常に行われる。このため、疾患の原因となる代謝経路の亢進/減弱を浮き彫りにするには、安定同位体で標識した化合物を活用した『動物臓器での代謝経路トレース解析』が必須である。

本研究では、上記を全て解決するメソッドパッケージを確立/提供する。その結実として『動物臓器における代謝経路フラックスのイメージング法』を実現する。本法により、疾患臓器の局所において、『どの細胞種』が、『どのような代謝経路の異常』を惹起しているのかを明らかにする。

さらに本法の普及展開により、創薬ターゲットとなる細胞種/代謝経路の同定、または代謝物バイオマーカーの産生機序解明を *in vivo* で遂行できるツールを共有/提供する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

*in vitro* では一様な代謝を示す疾患モデル細胞であっても、*in vivo* においては正常細胞と代謝ネットワークを巡らせ、微小環境に応じた異なる代謝特性を示すサブポピュレーションを形成する。たとえば固形がんにおいては、増殖の盛んながん細胞は隣接する間質細胞や正常宿主細胞と代謝カップリングをすることで、増殖能に見合うエネルギーを得ると考えられる。従って、*in vivo* での疾患代謝の(不均一な)特性を解明しなければ、その正確な理解と制御を行うことは難しい。

本研究では、疾患モデル動物における代謝解析実施に必須の3つの技術を確立した。

### 代謝物の死後分解を伴わない Focused microwave(FMW)法の開発

質量分析は侵襲法であり、動物臓器から“活動時”の代謝情報を精確に得るには、『代謝物の死後分解』という非常に大きな問題があった。生細胞の中心代謝回転は非常に高速であり、実験動物の心停止後には**血流停止に伴う酵素的代謝改変が秒オーダーで進行する**。この点を、**FMW 法導入により、脳と心臓において、ほぼ完全な死後分解の停止を実現した**。FMW 法では標的臓器へフォーカスしたマイクロウェーブを1秒以下照射する。これにより細胞内酵素の瞬間的な熱失活が達成され、質量分析に供するまでの試料調製中において、一切の死後分解の影響を排除される事を示した。

### 高感度イメージング質量分析法の開発

従来のイメージング質量分析では、代謝経路上の化合物を網羅的に検出するには感度不足であった。本研究において、**標的化合物の誘導体化法を開発/拡張**し、生体内に非常に低濃度に存在する生理活性分子に至るまで、代謝経路上の網羅的な化合物イメージング法を開発した。

### *in vivo* 代謝経路トレーサー解析法の開発

動物臓器で特定経路の代謝亢進/減弱を浮き彫りにする為に、「**外因性の安定同位体で標識した代謝基質**」を**トレーサー**として用いた**代謝経路トレーサー解析**を開発した。具体的には、 $^{13}\text{C}$  で標識した化合物から代謝生成された化合物は、 $^{13}\text{C}$  を含むため、質量分析により内因性化合物と区別して定量/イメージングする事ができる。これを利用し、一例として心筋梗塞時に $^{13}\text{C}$  標識グルコースを投与し、 $^{13}\text{C}$  含有乳酸を定量/イメージングする事で『解糖系がどの程度亢進したか?』『組織のどの部位において亢進したのか?』といった問いに定量的な解を与えるに至った。

上記技術をメソッドパッケージとして確立/運用する事で『**動物臓器における代謝経路フラックスのイメージング法**』を実現するに至った。

## (2) 詳細

本さがけ研究では **(A)技術開発**と、その**(B)疾患モデルへの適用**を行った。

### 【研究テーマ A1— focused microwave irradiation (FMW)法による臓器試料の調製】

質量分析によるメタボロミクスの手法は、高感度かつ網羅的な代謝プロファイリングを実現する。その一方で侵襲法であるが故に、**個体動物を対象とする場合は臓器摘出に伴う死後分解 (postmortem degradation)による代謝改変が問題であった**。

FMW 法では、ごく短時間(1 秒以内)のマイクロウェーブ照射により、臓器温度を酵素失活が達成できる 80 度近辺にまで到達させる。これにより、“任意の瞬間”の臓器の代謝状態を保持したまま、質量分析による定量/イメージング解析を実施できる。

脳と心臓は、血流途絶後に急激かつ大規模な代謝変動が生じる。従って特にFMW法が有用であると考えられる為、実験プロトコルを確立した。その結果、図1で示すように、マウス心臓をFMW法(青)、麻酔下で迅速に開胸/心摘出(黄)、または血流途絶後10分後に摘出(赤)し、メタボローム解析を行ったところ、解糖系(図中A)においてはLactate産生とPyruvate減少が、TCAサイクル(同B)においてはSuccinate蓄積が、さらにNADH/NAD比(同C)の上昇抑制がFMW法により達成された。すなわち、サンプル調製中の心筋低酸素暴露による代謝改変(より具体的には、解糖系亢進と電子伝達系阻害のアーチファクト)を除外した代謝プロファイルを、FMW法により得ることが出来た。

### FMW法は心臓摘出に際する虚血/低酸素に起因した代謝改変を抑制した

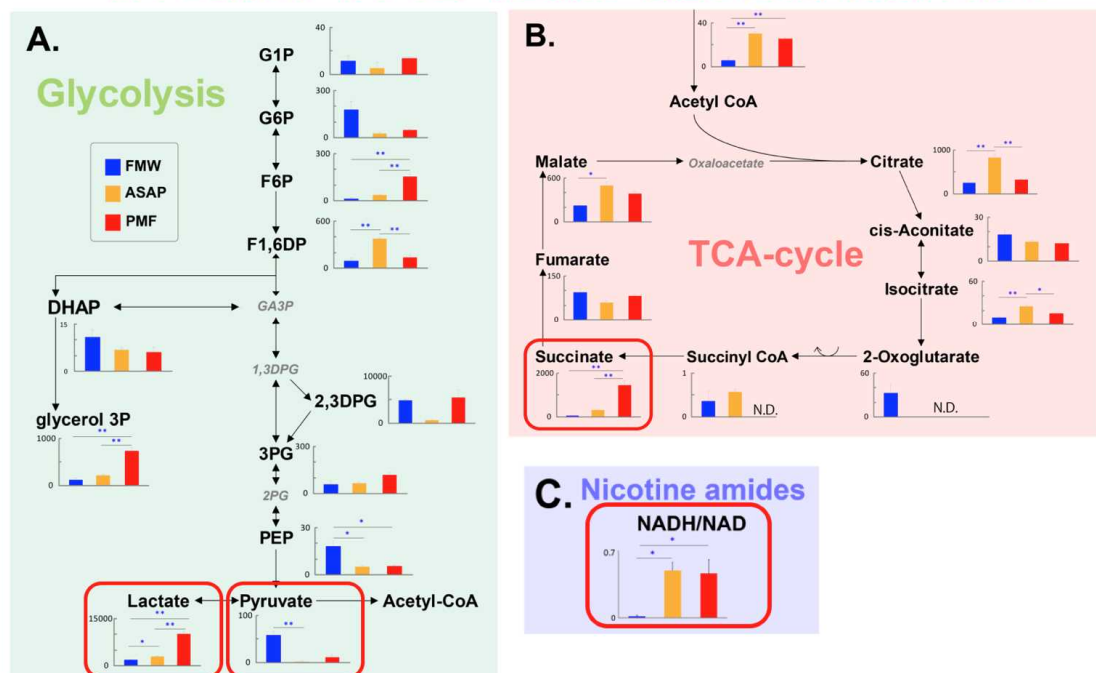


図1: マウス心臓をFMW法(青)、麻酔下で迅速に開胸/心摘出(黄)、または血流途絶後10分後に摘出(赤)し、メタボローム解析を行った結果を示す。(文献1より改変)

#### 【研究テーマ A2— 高感度イメージングによる網羅的な代謝物イメージング】

イメージング質量分析では組織切片を直接分析する。従って多量の夾雑物中から、ごく微量の目的化合物を検出する事が困難であった。しかし代謝経路を半網羅的にトレースする為には、微量化合物検出に十分な感度とシグナル選択性を得る必要がある。この問題を以下の2つの技術を用いることで解決した。

##### (1) on-tissue 誘導体化法による感度向上

イメージング質量分析における標的化合物の検出感度向上の為、組織切片上における化合物誘導体化法(on-tissue 誘導体化法)を開発した。これは標的化合物と選択的に反応する試薬を切片上に供給することで、位置情報を保持したまま誘導体化を達成し、質量分析にお

ける標的検出感度を大きく改善する手法である。我々が発表した試薬(TAHS, Toue et. al. 2014)と研究期間中に報告のあった試薬(DPP Shariatgorji et. al., 2014)を検討した結果、従来は検出が困難であったアミノ酸誘導体、カテコールアミン、さらにはステロイドホルモンのイメージングが可能になった。

## (2) 高質量分解能-質量分析計による選択性向上

さらに化合物シグナルの選択性を高める工夫も行った。低分子化合物は質量が非常に近い値を持つものが多い。従って、質量分析で検出される質量電荷比( $m/z$ )のピークも近接し、従来から汎用される飛行時間型の質量分析計では各々のシグナルを分離する事が難しい。この問題を解決する為に、高質量分解能の質量分析計(Fourier transform-MS, FT-MS)を活用した。その結果、高質量分解能測定により、化合物に特異的なシグナルを夾雑物から分離して計測する事が出来た。マウス胚(E9.5)のごく小さな試料切片から、解糖系および TCA サイクル代謝産物群を半網羅的にイメージングする事が出来た。

以上の技術開発を経て、これらを適用する事で以下の成果を得た。

(文献 2) 腸管免疫のビタミン B1 を介した生体防御メカニズム、

(文献 3) 新生児脳虚血モデルに対する低体温療法の代謝経路上の作用点解明、

(文献 4) マクロファージの低酸素適応機構の解明、

(文献 5) 発生胎児における、胎盤接続に伴うエネルギー代謝経路スイッチの解明

以降はマウス心筋梗塞モデル解析(文献 1)について詳細に報告する。

### 【研究テーマ B—梗塞心筋における補償的エネルギー代謝機構の解明】

心臓はその時々環境に適応し、鋭敏に自らのエネルギー代謝を改変する事でポンプ機能を維持する。従って心臓を外科的に摘出すると、即座に虚血/低酸素暴露に応答した、いわば全虚血心の代謝プロファイルを呈してしまう。この事から冠動脈結紮による心筋梗塞モデルが、マウス心臓においてどのような疾患代謝に帰結するかについて、(摘出によるアーチファクトを除外して)直接アプローチする手法に乏しかった。

本研究テーマ A-1 により心臓の FMW 法固定が可能になった。すなわち心筋梗塞時における、ごく一部の心壁が虚血に陥った状態を瞬間的に固定し、観察する事が可能となった。これにより、これまで不明であった平常時、心筋梗塞時の代謝イメージングを高い時間解像度、空間解像度で分析する事が可能となった。

### ○ 梗塞巣に隣接した penumbra 領域は ATP 減少に抵抗性である

FMW 法で固定した冠動脈結紮-心筋梗塞モデル心のイメージング質量分析によりまず明らかになった事は、梗塞巣に隣接する領域は ATP 減弱に抵抗性であるという所見であった。図 4 に示すように、梗塞巣が非常に明瞭にアデニンヌクレオチド・Energy Charge (ATP, ADP, AMP から算出されるインデックス)が減弱するのに対し、隣接する Penumbra 領域では常に Energy

Charge が保持される(図 3 矢印)。

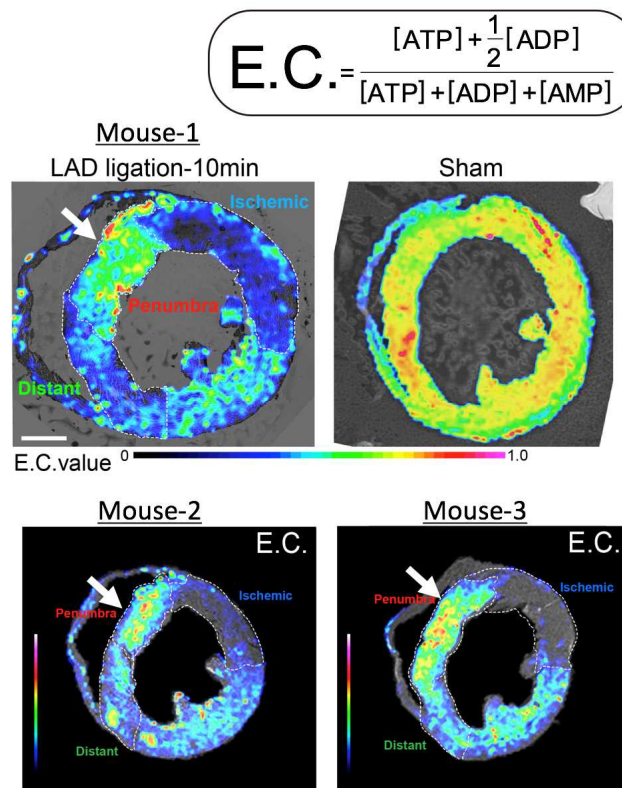


図 2:心筋梗塞 10 分後のマウス心臓における、Energy Charge(E.C.)-index のイメージング像: Penumbra 領域と名付けた梗塞巣隣接領域において、常に E.C.減弱に抵抗性が観察された。

### ○ Penumbra 領域ではグルコースの酸化的代謝が亢進している

次に、Penumbra 領域がどのような代謝機構で Energy Charge を維持しているかを調べるために、 $^{13}\text{C}_6$  グルコースまたは  $^{13}\text{C}_3$  乳酸を負荷し、その後これらの代謝運命をイメージングと定量解析によりトレースした。

一般に心筋梗塞では、血管狭窄点から心尖部に下降するに従い、梗塞部位は拡大していく。このような異なるサイズの虚血部位を含む複数の心断面において、Sham 群(=開胸/結紮なし)と比較して、すべての心断面で 10 倍以上の  $^{13}\text{C}$  標識グルコース代謝(総量)の増大が観察された。これは最も心虚血の程度が大きい心尖部位で最大であり、上昇率は実に平常時の 15 倍に上る。さらに、虚血が進行するに従い、糖代謝の質的な変化として解糖系の割合が上昇していくことが明らかになった。

さらにイメージング質量分析により、これらの増大する複数の経路の  $^{13}\text{C}_6$  グルコース代謝が、どの心領域で支配的におきているのかを解析した。予想通り、 $^{13}\text{C}_3$  標識乳酸(嫌氣的グルコース代謝の指標)により梗塞部位における乳酸産生(=嫌氣的グルコース代謝、赤で表記)の劇的亢進が示された(図 3 左)。興味深いことに、 $^{13}\text{C}_2$ -グルタミン酸(好氣的グルコース代謝の指標)の局在を可視化した結果、Penumbra 領域とほぼ一致する領域において亢進している様

子が観察された(図3中央)。すなわち Penumbra 領域の心筋は、隣接部位が虚血に陥った際にも、グルコースを好意的に代謝する事で、エネルギー産生を維持していることが示され、心機能補償の代謝-代償メカニズムが示唆された。

### $^{13}\text{C}_6$ -Glucose metabolism

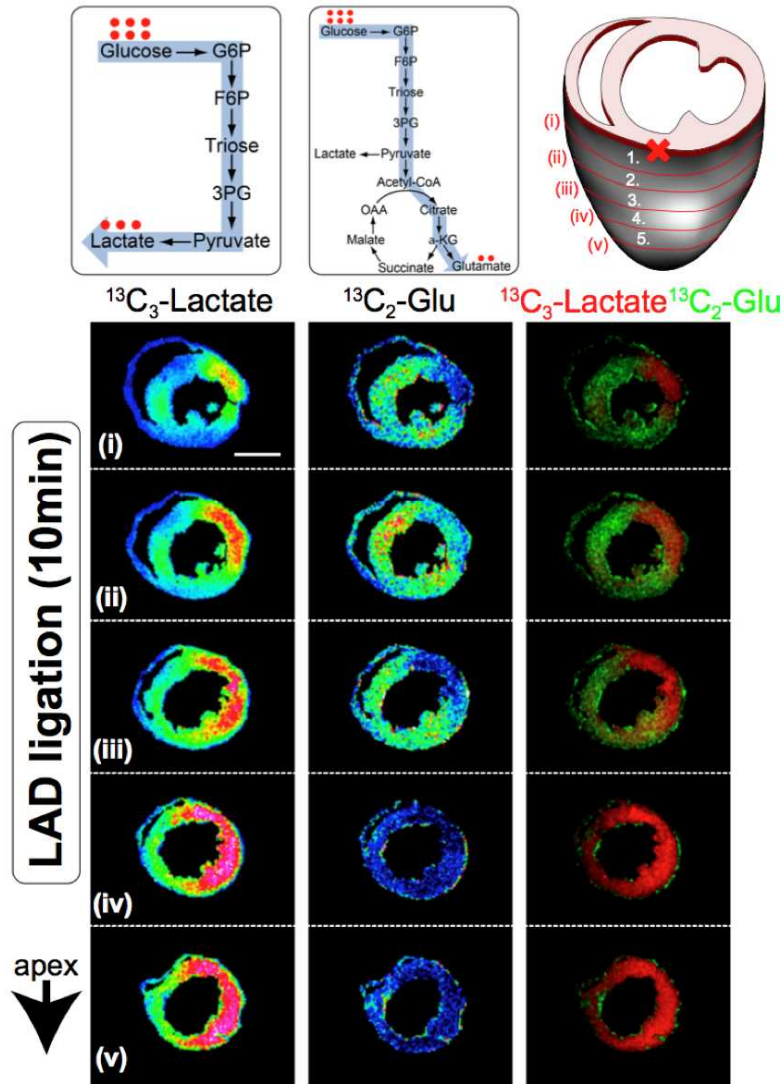


図3: 心筋梗塞時の  $^{13}\text{C}_6$  グルコース代謝経路トレーサイメージング

$^{13}\text{C}_6$  グルコースから異なる代謝経路を経て生成した化合物をイメージングする事で、異なる心領域において、異なる代謝経路が用いられていることが可視化された。

本メソッドパッケージは、非侵襲分子イメージング法であるFDG(Fludeoxyglucose)-PET(positron emission tomography)と対比すると、長短所が分かり易い。すなわち本法では、単純な糖取り込みの多寡をイメージングするのみでなく、どのような下流-代謝経路で取り込んだエネルギー基質が代謝されているかを、高空間解像度でイメージング

する事が出来る。また安定同位体-標識基質のバラエティも豊富であり、高い拡張性を備える。しかしながら、侵襲法である為に同一個体から経時的な情報が得られず、ヒト診断法としての応用は不可能である事が短所である。

一方で FDG-PET では糖の取り込みのみをモニターする手法であり、感度、空間解像度ともに本法には劣る。しかしながら、非侵襲法であるが故に経時的な代謝動態をモニターする事が出来、さらに診断法として確立されたものである。本研究で開発されたツールを、相補的な特徴を持つ非侵襲分子イメージング法と組み合わせる事で、基礎/臨床の疾患代謝解析に資する知見を今後生み出すものと期待される。

### 3. 今後の展開

本研究では、「本技術でしか達成できない疾患代謝の理解」をもたらす事を主眼に据えた。一例としては上述した『梗塞心筋における微小領域の補償的エネルギー代謝機構』の解明である。これまで難しかった個体動物内の疾患代謝を、高い時間/空間解像度で捉える事で、多くのモデル動物の代謝研究が新たな展開を迎えて進行中である。

この様に、研究実施者が企図する展望は本技術によりもたらされた知見がブレークスルーとなり展開する、多くの疾患代謝の基礎研究である。すなわち、分析化学者の視点から技術的な問題提起を成し、その解決法の提供をしたい。疾患モデル動物臓器を用いたメタボローム解析は、主として試料を持ち込む研究者と、質量分析を行う研究者の完全分業として行われることが多い。そのような状況から、本研究で掲げた死後分解のような問題が見過ごされてきたと考える。

長期的展望にはヒト疾患の治療・予防・診断という臨床への貢献を視野に入れたい。単なる技術開発にとどまることなく、疾患モデルを徹底的に理解するというスタンスを貫徹する事で、ヒト代謝疾患の理解と制御という最終着地点への到達を今後のマイルストーンとして課したい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

疾患モデル動物での詳細なメカニズム解明は、ヒト疾患研究の基礎をなす。このモデル動物の“摘出臓器”における代謝物測定において、3つの問題提起を行い、これらを解決する事で疾患臓器の局所において、『どの細胞種』が、『どのような代謝経路の異常』を惹起するのかを明らかにするツール創出が、私のさきがけ研究のテーマである。

これらは、①『死後分解を抑制するサンプル調製法』、②『高感度代謝物イメージング技術』、③安定同位体で標識した化合物を活用した『動物臓器での代謝経路トレース解析法』として確立された。

さらに応用研究として(文献 1)マウス心筋梗塞モデル解析、(文献 2)腸管免疫のビタミン B1 を介した生体防御メカニズム、(文献 3)新生児脳虚血モデルに対する低体温療法の代謝経路上の作用点解明、(文献 4)マクロファージの低酸素適応機構の解明、(文献 5)発生胎児における、胎盤接続に伴うエネルギー代謝経路スイッチの解明、として報告する事が出来、技術の浸透は着実に進んでいる。

以上の技術開発の成果と、その浸透の早さは、私が研究開始当初考えていた予想を超えるものであり、一定の自己評価を与えて良いと考えている。

一方で、モデル動物で得られる基礎的な知見から、疾患制御に直接貢献する創薬ターゲットとなる細胞種/代謝経路の同定、または代謝物バイオマーカー同定や産生機序解明は、今後さらに進展させていく必要がある。

最後に、3年間の研究実施期間において、申請時に掲げた医学—分析化学—工学と一体になった取り組みを全力で行なう事が出来たと考えるが、それらの成果は、本さきがけ領域のアドバイザーの先生方、さきがけ研究者仲間との数多くの共同研究、議論によるところが大きく、このような研究機会を与えていただいた小田総括をはじめとするアドバイザーの先生方に深く感謝いたします。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ヒトの疾患診断マーカーの開発、創薬標的タンパク質の同定およびそのタンパク質の代謝経路やシグナル伝達経路での役割の解明には、培養細胞や疾患モデル動物での研究が必要となる。このモデル動物の利用においては、多くの場合で臓器摘出などの操作が不可欠である。しかしながら、従来は「(1) 摘出操作中の細胞成分(代謝産物やタンパク質など)の変化」については、十分に検討や対策がなされてきたとは言い難かった。また、疾患の病巣は細胞集団であるが、この集団は往々にして正常細胞と異常細胞から構成されている。しかしながら、「(2) 疾患の原因となっている異常な細胞の検出・同定」は容易でない場合が多く、代謝物の高感度なイメージング技術の進歩が望まれていた。さらに、疾患における代謝の基礎的な知見を得るために、疾患の原因となる「(3) 代謝経路の変化を病巣内部の局所において調べる技術」の開発も課題であった。

本研究は、近年のイメージング質量分析や化合物分離・精製法の進歩を活用し、これら3つの課題を解決するメソッドパッケージを確立・提供し、創薬ターゲットとなる細胞や代謝経路の同定や、代謝物バイオマーカーの産生機序解明を *in vivo* で遂行することを目指した野心的な研究である。その目的は十分に達成されたと思われる。具体的には、(1) 標的臓器(脳と心臓)へフォーカスしたマイクロウェーブを1秒以下照射することで、細胞内酵素の瞬間的な熱失活により代謝物の死後分解を防止することができたことは、今後の試料調製法として広く普及していくと思われる。また(2) 標的化合物の組織切片上における誘導体化法を開発し、Fourier transform-MS も利用し、高感度で網羅的な化合物イメージング法を開発したことで、モデル動物の疾患代謝や病態の解析で飛躍的な情報量の増加が期待される。さらに、(3) 安定同位体標識の化合物を活用して、モデル疾患動物の臓器の代謝異常を定量的にイメージングする技術の開発は、ヒト心筋梗塞のみならず、様々な疾患の予防・治療のための研究に新たなアプローチを提供すると思われる。

これらの成果の多くは積極的な共同研究によるものである。即ち、アイデアと初期の研究成果が認められ、本さきがけ研究領域内での共同研究や領域外の研究グループとの多数の共同研究にも発展した。また、成果発表(論文、学会など)も積極的に行い、国内外の招待講演も増え、本分野(代謝のイメージングなど)の世界レベルの研究者の一人として注目されるよう



になった。よって、さきがけ研究が研究者としての大きな飛躍につながったと言える。さきがけ研究期間内で、様々な疾患モデル動物の病態を、疾患代謝の視点から細胞レベルでイメージングするツール(メソッドパッケージ)の重要性が明らかとなり、より広範な疾患モデル動物の解析へとつながることが期待される。また、疾患モデル動物で得られた知見を創薬に活かすべく、アカデミアや産業界との共同研究もさらに推進し、この優れたメソッドパッケージの普及を促進してほしい。現時点で非公開の興味深い研究成果も多数あることから、これらについても今後の発表と知財確保を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. **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.** 6:32361, 2016
2. Kunisawa J, **Sugiura Y\*(equally contribution)**, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H. *“Mode of Bioenergetic Metabolism during B Cell Differentiation in the Intestine Determines the Distinct Requirement for Vitamin B1”*. **Cell Reports.** 13(1):122-31., 2015
3. Takenouchi T, **Sugiura Y\*(equally contribution)**, Morikawa T, Nakanishi T, Nagahata Y, Sugioka T, Honda K, Kubo A, Hishiki T, Matsuura T, Hoshino T, Takahashi T, Suematsu M, Kajimura M: *“Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia.”* **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 35:794-805, 2015
4. Semba H, Takeda N, Isagawa T, **Sugiura Y**, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R, Komuro I. *“HIF-1 $\alpha$ -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity.”* **Nat Commun.** 18:7:11635. 2016
5. Miyazawa H, Yamaguchi Y, **Sugiura Y**, Honda K, Kondo K, Matsuda F, Yamamoto T, Suematsu M, Miura M. *“Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching.”* **Development.** 144(1):63-73. 2017.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(受賞歴)

2014年 日本質量分析学会 奨励賞受賞

2014年 日本医用マスペクトル学会 奨励賞受賞

(主要な学会発表)

2014/07/14 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Visualization and quantification of brain metabolic fluxes of glucose in the awake mice by mass spectrometry*” “5th AOMSC and 33rd CMSS (中国 北京)”

2015/09/15 国際 口頭

Yuki Sugiura “*In vivo visualization and quantification of myocardial metabolic fluxes of glucose by mass spectrometry*” ANZSMS25 & AOMSC6 (Brisbane, Australia)

2014/9/10-12 国際 口頭

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, (Kyoto)

2015/9/26 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Development of an imaging mass spectrometry technique for visualizing localized cellular signaling mediators in tissues.*” 10<sup>th</sup> World congress for Microcirculation (Kyoto)

2016/5/20-22 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Highly sensitive Imaging Mass Spectrometry*” the 9th international conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (Sendai)

2016/5/20-22 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Time resolved analysis of brain energy metabolism by micro-dialysis linked ion chromatography-mass spectrometry*” the 16th Annual Conference for American Society for Mass Spectrometry (San Antonio, USA)