

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10640

研究課題名(和文)非破壊イメージング手法による、移植関連腎障害評価手法の確立

研究課題名(英文)Development of non-invasive bioimaging techniques for evaluation of transplantation related kidney injury.

研究代表者

高原 史郎 (Shiro, Takahara)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：70179547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病による腎障害により発症する糖尿病性腎症は、日本における人工透析の最も頻度の高い原因である。慢性腎臓病の病気の進行は、腎臓の組織繊維化と密接な関係があることが知られていました。しかしながら、これまで、糖尿病性腎症では、組織繊維化は侵襲的な腎生検でしか評価ができなかった。今回、研究グループは、拡散MRIを多方向から撮影する拡散テンソル画像(DTI) MRIという撮影方法でラット糖尿病モデルの腎臓を撮影することにより、腎臓の繊維化を画像化することに成功した。本成果により、将来的に非侵襲的に糖尿病による腎障害の程度を正確に評価する手法が実用化されれば、人工透析患者の減少につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Diabetic kidney disease (DKD) is the most important and frequent cause for end stage renal disease in Japan. Progression of chronic kidney disease (CKD) is reported to be closely related with renal fibrosis, whose detailed evaluation is now only possible by conventional and invasive kidney biopsy. So non-invasive bioimaging techniques for evaluation of kidney fibrosis has been sought in the real medical sites. The research group developed diffusion tensor imaging MRI (DTI MRI) using spin echo sequence, which enables us to analyze diffusion of water molecule in the multiple directions. It was discovered that DTI MRI could evaluate and visualized kidney fibrosis in rat DKD models. In the future, it may be possible to evaluate kidney fibrosis non-invasively by applying this bioimaging technique.

研究分野：腎臓移植

キーワード：糖尿病性腎症 腎繊維化 DTI MRI

1. 研究開始当初の背景

わが国の慢性腎不全による透析患者数は 30 万人を超え、日本の医療財政を逼迫している。腎移植は末期腎不全患者における代替療法として、患者自身の生命予後、QOL、そして医療経済的にも理想的な治療法である。近年、免疫抑制療法の進歩により細胞性拒絶反応は激減し短期の移植成績は飛躍的に向上したが、移植 1 年以降の腎機能低下速度、graft loss 率に関してはシクロスポリン導入以前と比較しても大きな違いが認められず、その成績向上が移植腎長期生着を図るための大きな課題となっている。腎移植患者の約半数は術後 15 年以内に移植腎機能不全にて透析に移行しており、その原因の 8 割が慢性移植腎症である。慢性移植腎症には、虚血再還流障害、急性拒絶の影響、慢性抗体関連拒絶などが大きな原因となっており、保存期腎不全同様、腎臓繊維化と共に、腎機能が低下してゆく。現在、この腎臓繊維化を初めとした移植腎臓の組織障害の変化の評価は、侵襲的なバイオプシーによって行われている。

2. 研究の目的

MRI 技術は近年、脳科学の分野で長足の進歩を遂げ、解剖学的な変化を捉える以外に、血流、酸素消費量、間質繊維化、細胞性浮腫、組織内 Ph 等を非破壊的に画像化及び評価出来るようになってきている。本研究ではこのような、最近の技術進歩を、腎臓繊維化を非破壊的に MRI で評価する方法を開発する。

3. 研究の方法

申請者らは、挑戦的萌芽研究(高原 H24-26, 課題番号 24659714)において、Diffusion-DTI MRI 法で、組織内の浮腫の影響を抑えて組織中の繊維化を評価出来るという preliminary な結果を得た。本研究では、腎臓の繊維化を Diffusion-DTI MRI 撮影法で評価する。DTI MRI 撮影法は、Diffusion MRI を複数の方向から測定して、ある 1 方向の水分子の移動しやすさを数値化するものであ

る。

- 1) ラット一側尿管結紮モデル(UUO)を作製し、1週間後、sham 群、UUO 群を撮影する。
- 2) 腎臓を、皮質、髄質(inner stripe, outer stripe, inner medulla)の4領域に詳細に分割しそれぞれの MRI signal を測定し、移植腎臓のそれぞれの領域における線維化との相関を検討する。
- 3) 病理変化(線維化、酸化ストレスマーカー、TGF-beta、collagen の染色)との相関を検討する。
- 4) Cr、eGFR、Hb、Ht、尿中 L-FABP、NAG、beta2-MG、尿蛋白量等の血液及び尿検査値との相関を検討する。
- 5) 同様の検討を、糖尿病を併発する高血圧ラットモデルである、SHR/NDmcr-cp(cp/cp)に対して行い、組織浮腫がある状態でも、繊維化が測定出来るか検討する。

4. 研究成果

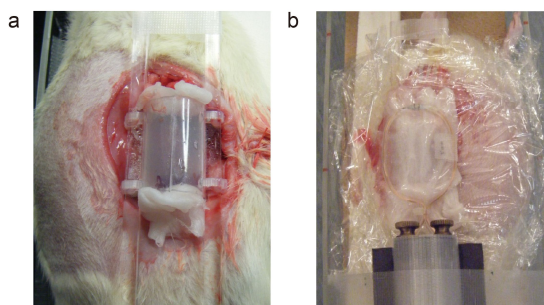
a. ラット UUO 専用腎臓固定装置の開発

特に、DTI MRI 撮影に長時間腎臓を固定するために、大阪大学村瀬教授の助言を元に開発した。この装置により長時間の腎臓固定が可能になった(下図)。

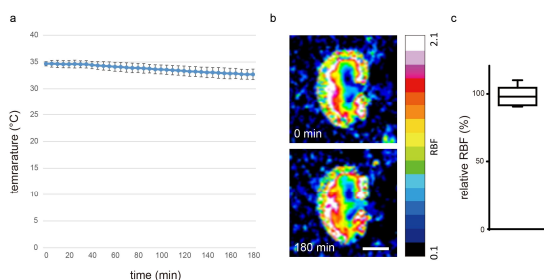


b. ラット UUO モデルを基本にして、MRI の撮影方法(PDWI, T1WI, T2WI, BOLD, ADC, DTI)において、腎臓繊維化と最も相関のある撮影方法を探索したところ、DTI MRI が最も相関があることを発見した。次に、UUO に繊維化抑制薬である Fasudil を投与して腎臓繊維化抑制効果を DTI MRI で評価出来るか検討を行ったところ、DTI MRI の結果である FA 値で Fasudil

の腎臓抗繊維化効果を評価出来る事が判明した。今回用いた DTI MRI では、spin echo sequence をシグナルの感度を上げるため採用しており、撮影までに3時間かかっていた。c. UUO で腎臓繊維化の可能性が示唆された、DTI MRI を用いて糖尿病性腎症モデルラットの腎臓繊維化が可能か検討を行う事とした。まず、糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-cp(cp/cp)が肥満であり、外部からの装置では、腎臓の長時間保持が不可能であることから、新しくラット表皮に切開を加え、内部から腎臓を支える装置を開発した。この装置により腎臓を圧迫及び乾燥させること無く MRI 撮影が可能となった(下図)。



d. 次に、このセッティングで腎臓の血流と温度が撮影中に変化無く推移していることを確認した。(下図：左のグラフは腎臓組織の温度変化、右の図は3時間の前後での血流を表している。)

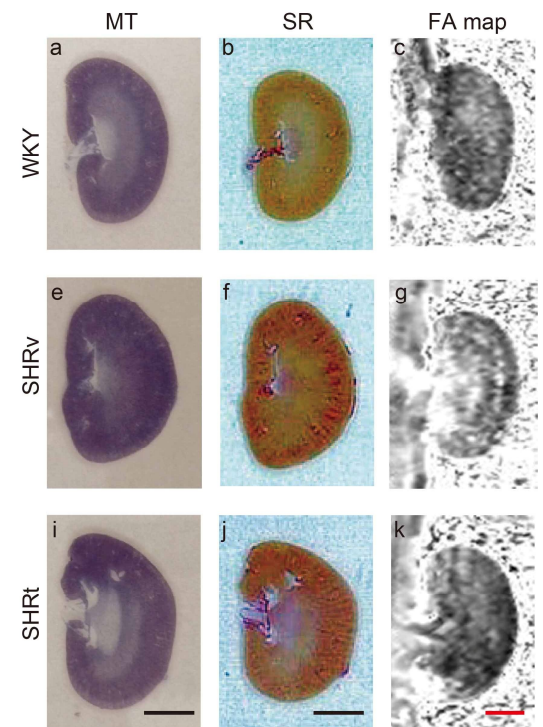


e. 8週齢でのラットの検討では、病理の組織で糖尿病性腎症モデルラットでは、腎臓繊維化は認められなかったが、FA 値は糖尿病ラット腎臓で有意に低下していた。この事の意味については不明であった。

f. 8週齢でのラットの検討では、病理の組織で糖尿病性腎症モデルラットでは、腎臓繊維化は認められた。また、この繊維化は特に

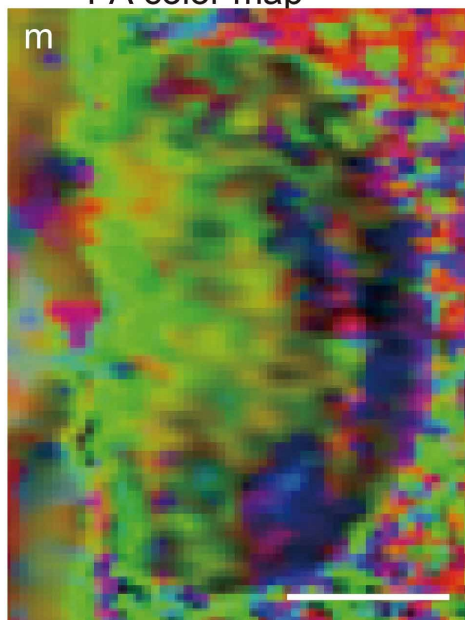
OS(outer stripe of outer medulla)に集中していた。また、様々な繊維化マーカーにより、38週での糖尿病性腎症モデルラット腎臓では繊維化が亢進していることが示唆された。

g. 38週での糖尿病性腎症モデルラット腎臓での繊維化を DTI MRI で撮影したところ、FA map で繊維化を画像化することが出来た。(下図：WKY;コントロールラット、SHRv;糖尿病腎症ラット+ピークル投与、SHRt;糖尿病腎症ラット+テルミサルタン投与。MT;マッソントリクローム染色、SR;シリウスレッド染色。テルミサルタン投与により腎臓繊維化が抑制されている。)

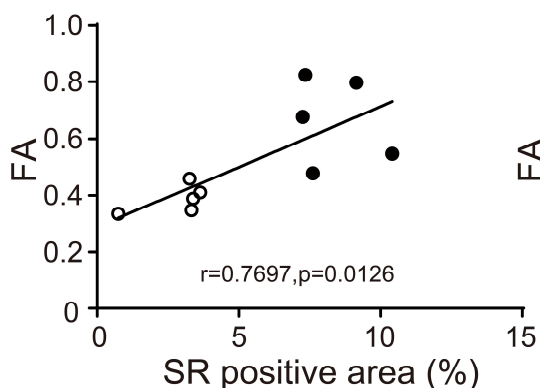


また、水の広がりやすさの方向を色で表したところ下図のように繊維化した部分では色がランダムになっており、興味深いことに脳の神経繊維とは異なり繊維の方向性が無いことが示唆された。

FA color map



h. OS (outer stripe of outer medulla)部分の FA 値とシリウスレッド陽性部分の面積は、有意に相関している事が示唆された。
($r=0.76$, $p=0.00126$)



これらの事から、DTI MRI によって糖尿病性腎症における腎臓繊維化を評価出来る可能性があることが示唆された。糖尿病の腎臓では浮腫の影響が多分にあり、水分子の挙動を画像化する MRI は繊維化などの病理組織変化を測定する事が困難と考えられてきた。しかしながら、DTI MRI を用いることで、撮影に長時間かかるが、糖尿病腎症でも MRI で病理組織変化を評価出来る可能性があることが示唆された。今後は、より臨床応用が可能となるように、より短時間で撮影が可能となる、シークエンスの開発が求められる。

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 2 件)

Kaimori JY, Isaka Y, Hatanaka M, Yamamoto S, Ichimaru N, Fujikawa A, Shibata H, Fujimori A, Miyoshi S, Yokawa T, Kuroda K, Moriyama T, Rakugi H, Takahara S. Diffusion Tensor Imaging MRI with Spin-Echo Sequence and Long-Duration Measurement for Evaluation of Renal Fibrosis in a Rat Fibrosis Model. Transplant Proc. 2017 Jan - Feb;49(1):145-152.

Kaimori JY, Isaka Y, Hatanaka M, Yamamoto S, Ichimaru N, Fujikawa A, Shibata H, Fujimori A, Miyoshi S, Yokawa T, Kuroda K, Moriyama T, Rakugi H, Takahara S. Visualization of kidney fibrosis in diabetic nephropathy by long diffusion tensor imaging MRI with spin-echo sequence. Sci Rep. 2017 Jul 18;7(1):5731.

〔学会発表〕(計 5 件)

Kaimori JY, Isaka Y, Hatanaka M, Yamamoto S, Shibata H, Fujimori A, Fujikawa A, Miyoshi S, Ichimaru N, Moriyama T, Rakugi H, Takahara S. Visualization of kidney fibrosis in diabetic nephropathy by DTI MRI. American Society of Nephrology Kidney Weak 2015 Annual Meeting;2015; Atlanta, USA.

Kaimori JY, Isaka Y, Hatanaka M, Yamamoto S, Shibata H, Fujimori A, Fujikawa A, Miyoshi S, Ichimaru N, Moriyama T, Rakugi H, Takahara S. DTI MRI with spin echo sequence and long duration measurement was identified for evaluation of renal fibrosis in rat UUO model. TTS Asian meeting;2016;Tokyo, USA.

貝森淳哉, 猪阪善隆, 畑中雅喜, 山本聡子, 市丸直嗣, 藤川昭彦, 柴田洋, 藤森明, 三好荘介, 余川隆, 黒田輝, 守山敏樹, 楽木宏実, 高原史郎. 高解像度DTI MR imaging法による腎線維化可視化の研究. 第6回腎不全研究会;2015;東京.

貝森淳哉, 猪阪善隆, 畑中雅喜, 山本聡子, 市丸直嗣, 藤川昭彦, 柴田洋, 藤森明, 三好荘介, 余川隆, 黒田輝, 守山敏樹, 楽木宏実, 高原史郎. 高解像度DTI MR imaging法に

よる腎線維化可視化の研究. 第43回日本臓器保存生物医学会学術総会;2015;盛岡.

貝森淳哉、高原史郎.水分子を造影剤としたMRIを用いた研究展開-Visualization of kidney fibrosis in diabetic nephropathy by DTI MRI-. 第51回日本移植学会学術集会;2015;熊本.

〔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

高原 史郎 (TAKAHARA, Shiro)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号：70179547

(2)研究分担者

猪阪 善隆 (Isaka, Yoshitaka)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00379166

黒田 輝 (Kuroda, Kagayaki)
東海大学・情報理工学部・教授
研究者番号：70205243

市丸 直嗣 (Ichimaru, Naotsugu)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：70346211

貝森 淳哉 (Kaimori, Junya)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：70527697