

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15471

研究課題名(和文) 質量分析イメージングによる腎代謝小分子の可視化と虚血腎の病態解明

研究課題名(英文) Visualization of small metabolites in the kidney for elucidation of pathophysiology of ischemic nephropathy

研究代表者

伊藤 裕 (Itoh, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：40252457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓は生体の水分・電解質の恒常性維持に重要な役割を果たす。アデノシンは腎機能と腎血流の重要な規定因子として知られているが、アデノシンの腎臓における分布は知られていない。MALDI-IMSは、臓器内の小分子を可視化する新しい手法である。本研究では、MALDI-IMSを用いて、腎臓内の代謝小分子の可視化を試みた。腎臓における多くの代謝小分子は、MALDI-IMSにて半定量的に可視化が可能であった。アデノシンは腎皮髄境界の外側線条に特徴的な集積を呈していた。このことから、血圧変動に応じた髄質血流の調節において、アデノシンが重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The kidney plays an essential role in the maintenance of physiological homeostasis of fluid and electrolytes in the body. Adenosine is a well known regulator of renal function and blood flow; however, the normal distribution of adenosine in the kidney has not been well elucidated. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) - imaging mass spectrometry (IMS) is a novel technology for visualizing the distributions of molecules in situ. Small metabolites in the kidney has not been examined by the method thus far. In the present study, we identified a remarkable accumulation of adenosine in outer stripes of outer medulla (OSOM). The local accumulation of adenosine in OSOM may play a significant role for the physiological functions of adenosine such as the regulation of interstitial blood flow in the kidney.

研究分野：内分泌学、代謝学、腎臓内科学

キーワード：質量分析イメージング アデノシン ATP 腎臓

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(以下 CKD)は患者数 1300 万人をこえる国民病であり、その原因は高血圧性腎症、糖尿病性腎症、糸球体腎炎など多岐に渡るが、どの病態においても尿細管間質の慢性虚血による尿細管細胞のアポトーシスが CKD 進行の最終共通経路となる。腎臓は電解質や水分を再吸収する過程で ATP を大量に消費する、細胞代謝が活発な臓器であり、腎血流の不足は腎虚血に直結する。慢性虚血による代謝変容に対応する分子メカニズムとして、Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) 活性化を介した Pyruvate dehydrogenase (PDH) の発現抑制が知られている [Am J Physiol 1998]。

これまで腎臓における代謝小分子の解析は、メタボローム解析による全腎の定量解析、もしくはマイクロダイアリシス法による局所濃度の測定が主体であった。しかし代謝小分子は不安定な物質であることから、網羅性かつ定量性をもって代謝小分子の局在を正確に把握し、また、麻酔等の影響のない生理的な状態での解析を行うことは困難であった。近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(以下 MALDI)の進歩により、質量顕微鏡を用いた組織イメージング(MALDI-IMS)が可能となり、免疫染色法などでは正確に捉えられない小分子の代謝動態をリアルタイムで観察することが可能となった[Yamazoe et al. ACS Nano 2014]。しかしながら、代謝変化の激しい腎臓ではその技術応用がより困難であり、これまでは脂質や蛋白に用途が限られ、腎臓における代謝小分子の可視化は実現されていない。

2. 研究の目的

本研究では質量分析イメージングにより、いくつかのマウス虚血腎モデルにおける代謝小分子の変容を、質量分析イメージングを駆使して解析し、虚血腎の腎不全進展における代謝変容の意義を明らかにする。また腎実質細胞の代謝変容を治療標的とする新規 CKD 治療開発に向けた、基盤データの集積が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) C57BL6J マウス(8 週齢)を用いて、MALDI-IMS による質量分析イメージングを急速凍結法による正常腎において行い、生理的環境下の腎臓における代謝小分子の局在解析を行った。

(2) C57BL6J 雄マウス(8 週齢)を用いて、腎動脈クリップによる 1 分間、10 分間の虚血処置を行った短期急性虚血腎において、MALDI-IMS による質量分析イメージングを行い、短期虚血に伴う代謝小分子の分布変化を解析した。メタボローム解析にて ATP 分解産物の腎臓内分布について解析した。

4. 研究成果

(1) イオン化が可能である代謝小分子につき、網羅的な可視化が可能であった。解糖系中間代謝産物が皮質に多く存在し、皮質における盛んな糖代謝が示唆されるなど、腎臓における部位特異的なエネルギー産生機構が明らかとなった。また、虚血に伴い鋭敏に変化する ATP およびその分解産物の可視化にも成功し、ATP, ADP, AMP が皮質優位に集積して、アデノシンが腎皮髄境界に特異的に集積することを発見した。通常アデノシンは ATP 分解が促進する虚血部位で産生が亢進するが [ACS Nano 2014]、腎臓においては ATP 豊富な部位にアデノシンが集積しており、腎臓にアデノシンの特異的な集積メカニズムが存在する可能性が示唆された。

(2) 短時間の虚血で ATP とその分解産物は、鋭敏に変化した。全腎のメタボローム解析にて、ATP は 1 分間の虚血により約 40% 減少し、10 分間の虚血により約 80% 減少した。質量分析イメージングにて、ATP は皮質において 1 分間の虚血により約 40% 減少し、10 分間の虚血により約 85% 減少した。アデノシンは、全腎のメタボローム解析にて、1 分間の虚血により 1.7 倍増加し、10 分間の虚血により 2.2 倍増加した。生理的環境下で皮髄境界に特異的な集積したアデノシンは、1 分間の虚血により集積が消失し、皮髄境界以外の部位においてアデノシンが増加した。

このように腎臓では 10 分以内の短期急性虚血においても、代謝小分子の著明な分布変化を呈した。今後 ATP 分解産物の虚血に伴う変化をより詳細に解析し、これら代謝小分子の腎臓における生理的意義を解析するとともに、虚血性急性腎障害における ATP やアデノシンを治療標的とした新規治療戦略を提言することを目指していく。我々は腎動脈コイルリングによる慢性虚血腎モデルマウスをすでに作成している。本モデルにおける腎臓の質量分析イメージングを慢性虚血腎においても応用し、慢性虚血腎における代謝変容の可視化解析を行い、慢性虚血性腎障害による腎代謝変容の病的意義を明らかにしていく。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

藤井健太郎, 宮下和季, 久保亜紀子, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 竜崎正毅, 遠藤翔, 宇都飛鳥, 藤井千華子, 三石正憲, 田蒔昌憲, 伊藤裕

マスイメージングを用いた虚血腎における代謝変容の経時的解析
第 8 回メタボリックシンドロームカンファレンス 2016 年 12 月 17 日 北の丸スクエア (東

京都千代田区) (招待講演)

宮下和季, 藤井健太郎, 久保亜紀子, 佐藤正明, 末松誠, 伊藤裕

Analysis of renal adenine nucleotides with an imaging mass spectrometry and their alteration by acute ischemia.

第 20 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2016 年 12 月 16 日 東京コンベンションホール (東京都中央区) (招待講演)

藤井健太郎, 宮下和季, 久保亜紀子, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 藤井千華子, 遠藤翔, 宇都飛鳥, 田蒔昌憲, 伊藤裕

Paradoxical Adenosine Accumulation in the outer Stripes of Outer Medulla Revealed by Imaging Mass Spectrometry.

第 39 回日本高血圧学会総会 2016 年 10 月 1 日 仙台国際センター (宮城県仙台市) (若手研究奨励賞受賞)

K. Fujii, K. Miyashita, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
ACCUMULATION OF ADENOSINE IN THE OUTER STRIPES OF OUTER MEDULLA IN MURINE KIDNEY IDENTIFIED BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION IMAGING MASS SPECTROMETRY.

26th Scientific Meeting of International Society of Hypertension, 25 Sep. 2016, Seoul (South Korea) (Moderated poster session, Travel grant award)

久保亜紀子, 藤井健太郎, 宮下和季, 菱木貴子, 伊藤裕, 末松誠

MALDI 質量分析イメージング法によるマウス急性腎虚血におけるアデニル酸代謝解析

第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)

A. Kubo, K. Fujii, K. Miyashita, T. Hishiki, H. Itoh, M. Suematsu

Dense accumulation of adenosine in the outer stripes of outer medulla in murine kidney identified by microscopic MALDI-imaging mass spectrometry.

21st International Mass Spectrometry Conference 20 Aug. 2016, Toronto (Canada)

藤井健太郎, 宮下和季, 久保亜紀子, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 末松誠, 伊藤裕

質量分析イメージングによる腎皮髄境界におけるアデノシン集積の発見とアデノシン集積機構の解析

第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 6 月 17 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

藤井健太郎, 宮下和季, 久保亜紀子, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 末松誠, 伊藤裕

質量分析イメージングによる腎皮髄境界におけるアデノシン集積の可視化

第 16 回日本抗加齢医学会総会 2016 年 6 月 10 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

K. Fujii, K. Miyashita, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh

Accumulation of adenosine in the outer stripes of outer medulla in murine kidney identified by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry

53rd congress ERA-EDTA, 22 May. 2016, Wien (Austria)

久保亜紀子, 藤井健太郎, 中西豪, 宮下和季, 伊藤裕, 末松誠

質量分析イメージングが解く腎アデニル酸代謝のパラドクス

第 64 回質量分析総合討論会 2016 年 5 月 18 日 ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)

K. Fujii, K. Miyashita, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
Accumulation of adenosine in the outer stripes of outer medulla in murine kidney identified by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry Hypertension summit, 12 May. 2016, Kyoto (Japan).

〔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

<http://www.keio-emn.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 裕 (ITOH Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 40252457

(2) 研究分担者

久保 亜紀子 (KUBO Akiko)

慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：50455573

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
宮下和季 (MIYASHITA Kazutoshi)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：50378759