

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15974

研究課題名(和文)超解像度顕微鏡を用いたneo renal histologyの創出

研究課題名(英文)Neo renal histology using super resolution microscopy

研究代表者

松本 あゆみ(Matsumoto, Ayumi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40794053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎組織の微細構造の変化は疾患の発症や進展に密接に関連している。本研究で我々は、ヒトおよび動物腎組織にエラスチカマッソン染色を施し超解像度顕微鏡を用いて観察したところ、ポドサイトの足突起や尿細管上皮細胞のミトコンドリアが描出できることを見出した。さらに、フーリエ変換を用いて各正常構造の破綻の程度の定量評価を行ったところ足突起の破綻の程度と尿蛋白量には良好な相関関係が得られた。同様の方法でミトコンドリア正常構造の障害の定量評価も可能であった。我々の方法は、腎組織の微細構造を簡便に定量評価することができるため個体毎のより詳細な病態把握に寄与する可能性があり、有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で我々は、一般診療に用いられているエラスチカマッソン染色などの通常染色プレパラートを、そのまま超解像度顕微鏡で観察することにより、これまで通常の光学顕微鏡で観察困難であった腎組織のポドサイト足突起やミトコンドリアが観察できることが明らかにした。また、これらの微細構造画像をフーリエ変換を用いて解析することにより、疾患による微細構造の破綻を定量的に評価することが可能であった。本方法を用いて腎生検病理を評価することでより詳細な病態を把握し、適切な治療選択に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Changes in renal microstructure tightly correlate with development and progression of kidney diseases. We found that Elastica Masson's trichrome stained kidney samples were useful to visualize podocyte foot process and tubular mitochondria using super resolution microscopy. Furthermore, we quantitatively analyze the degree of pathological breakdown in these microstructures with fourier transform. We revealed that the measurements significantly correlated with clinical amount of proteinuria. Fourier transform could also quantify the degree of mitochondrial injury due to tubulointerstitial nephritis. Our strategy required only already in-hand samples would be useful for precision medicine based on one's detailed pathological condition.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎生検 超解像度顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎生検は腎臓病の診断およびそれに基づく治療方針の決定に不可欠な検査である。また、病理組織標本を診断に用いる際に最も基本的で重要なポイントは、得られた材料から「出来るだけ多くの情報を正確に把握する」ことにある。このため、光学顕微鏡を用いた腎生検組織評価にあたっては、世界でほぼ共通して HE 染色、PAS 染色、PAM 染色、EM (エラスチカマッソン染色) 染色といった多様な染色が用いられており、これに免疫蛍光抗体法による評価を併せて腎病理診断が行われる。さらに、腎病理診断においては電子顕微鏡も重要な診断ツールであり、電顕所見は光顕・免疫蛍光抗体法所見を裏付けるのみならず、例えば膜性増殖性糸球体腎炎の病型鑑別診断等に重要な役割を担っている。しかしながら、昨今のさまざまな画像技術の進歩を踏まえ、「得られた材料から出来るだけ多くの情報を正確に把握する」という病理組織標本診断の原則に改めて立ち返り、既存の材料からより多くの情報を得、さらに定量評価する方法の確立を目指す。

2. 研究の目的

我々は本研究で、臨床診断に用いられたヒト腎生検サンプルをそのまま超解像度顕微鏡で観察し、これまで光学顕微鏡のみでは評価困難であった腎構成細胞の微細構造やオルガネラの変化がとらえられるかを検討する。また、これらの変化を定量的に評価する方法を確立し、腎予後や臨床症状との関連を検討する。

3. 研究の方法

PAS、HE、PAM、EM といったヒト腎生検の日常臨床で用いられる染色を施したヒト腎生検サンプルおよび実験動物の腎サンプルを超解像度顕微鏡の一つである構造化照明顕微鏡法 (Structured Illumination Microscopy: SIM) で観察する。描出された構造物は免疫蛍光染色を併用して構造物の同定を行う。SIM は透過型電子顕微鏡に比べ厚みのある切片の 3 次元データを画像化可能であり、描出された構造物の俯瞰的な画像を得ることができ、定量評価の際に必要な広範囲観察が可能である。このことから、捉えられた微細構造やオルガネラを客観的に定量評価するため、フーリエ変換を用いて画像解析を行う。

4. 研究成果

ヒト腎生検組織および動物腎組織に EM 染色、HE 染色、PAS 染色、PAM 染色を施し、超解像度顕微鏡を用いて観察した。各染色のうち、EM 染色を施した組織の糸球体領域を 561 nm レーザーで励起し観察したところ、ポドサイトの足突起が観察でき、640 nm レーザー励起では基底膜が観察できた。また、ポドサイト足突起の癒合を伴い臨床的に高度の尿蛋白を呈する微小変化型ネフローゼ症候群 (Minimal change nephrotic syndrome: MCNS) 症例では、足突起構造の消失が観察された。(図 1)

尿細管領域の観察では、561 nm レーザー励起でミトコンドリアが描出された。尿細管間質障害を認めない症例では、長く櫛状に整列したミトコンドリアが観察されたが、尿細管間質障害を認める症例では、ミトコンドリアの膨化や断片化が確認できた。(図 2)

動物モデルでも同様の検討を行った。

4 週齢雄性 SD ラットの正常腎糸球体ではポドサイト足突起が観察され、Puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症では正常足突起構造が破綻している様子が観察され、電子顕微鏡でも同様の所見が得られた。(図 3) また、6 週齢雄性 C57BL6/J マウスを用いてミトコンドリア障害モデルを作成し、ミトコンドリアの変化を観察した。ミトコンドリア障害モデルとして、エンドトキシン投与マウス (Lipopolysaccharide 10 mg/kg 腹腔内投与)、虚血再灌流障害モデル (ischemia-reperfusion injury: IRI) (虚血 30 分、再灌流 15 分) を作成した。エンドトキシン投与モデルではミトコンドリアの断片化が観察され、IRI モデルではミトコンドリアの膨化および断片化が観察された。これらの変化は、電顕で認められたミトコンドリア所見に矛盾しない所見であった。(図 4)

図 1 糸球体上皮細胞

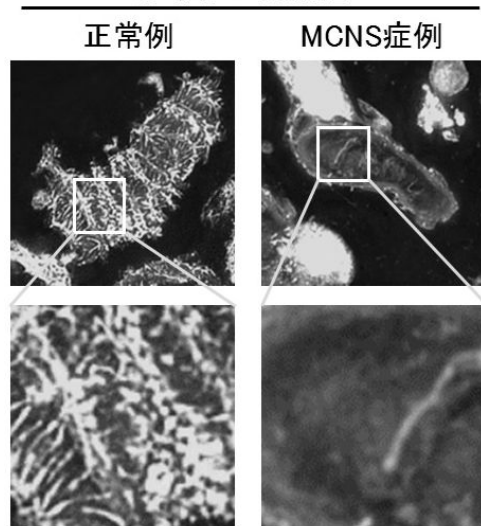


図 2 近位尿細管細胞

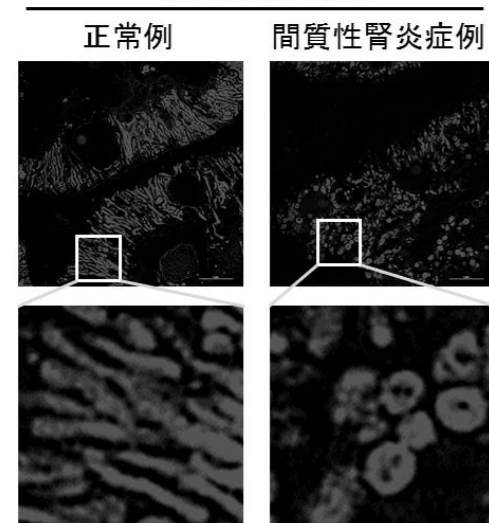


図 3

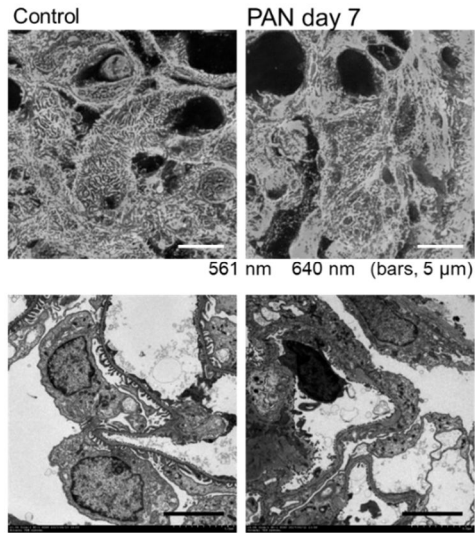
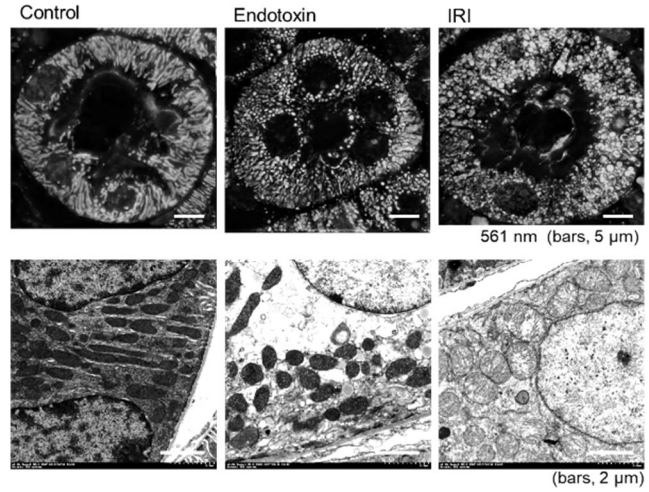
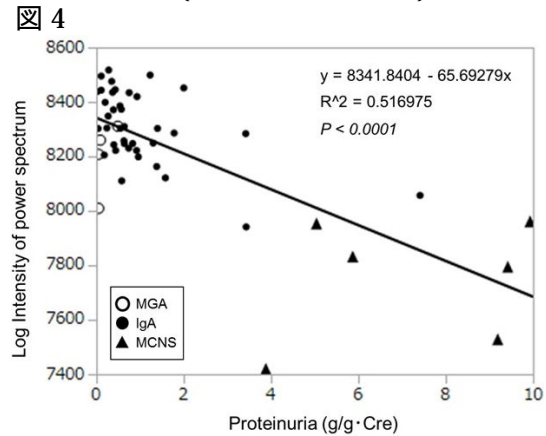


図 4



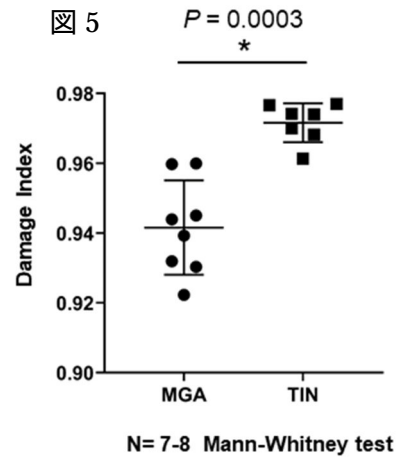
さらに、我々はこれらの構造の定量評価方法の確立を行った。ポドサイト足突起やミトコンドリアは、正常な状態では周期性を持った構造を持つ。このため、我々は、様々な関数を代表的な周期関数であるサインとコサインの和に変換する手法であるフーリエ変換を用いてこれらの構造の定量評価を行った。このフーリエ変換は二次元画像にも応用可能であり、全ての2次元画像はさまざまな周波数の正弦波の重ね合わせで表現できる。2次元画像を、その画像を構成する様々な周波数と振幅を持つ空間周波数成分に分解しプロットする(パワースペクトル)のがフーリエ変換であり、パワースペクトルを元の画像に戻すのが逆フーリエ変換である。

ポドサイト足突起構造を捉えた画像およびミトコンドリア画像を 128×128 pxls の正方形に切り出し、これをフーリエ変換して得られたパワースペクトラムを用いて足突起およびミトコンドリアの構造の正常構造の保存の程度を定量評価した。臨床的に様々な尿蛋白量を呈する Minor glomerular abnormalities (MGA) 症例、IgA 腎症、MCNS の腎生検症例において、足突起の保存の程度と尿蛋白量には良好な相関関係が得られた。(図 4)



同様にフーリエ変換を用いてミトコンドリア正常構造の定量評価を行った。ポドサイトと同様、ミトコンドリアが描出された画像を 128×128 pxls の正方形画像に切り出し、フーリエ変換を行って得られたパワースペクトラムを用いて、ミトコンドリアの障害度を表す Damage Index を定義した。尿細管間質所見を認めない MGA 症例と尿細管間質炎 (tubulointerstitial nephritis: TIN) 症例で Damage Index を評価したところ、TIN 症例において有意に上昇しており、その障害度を定量的に評価可能であった。(図 5)

我々の方法は、腎組織の微細構造を簡便に定量評価することができるため個体毎のより詳細な病態把握が可能となり、個々の病態に応じた治療選択に寄与することができるため、有用である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本 あゆみ
2. 発表標題 エラスティカマッソン染色検体の超解像度顕微鏡観察によりポドサイト足突起等の評価が可能である
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayumi Matsumoto
2. 発表標題 Elastica Masson's Trichrome stain is useful for the quantitative analysis of podocyte foot process and tubular mitochondria in the kidney
3. 学会等名 International Society of Nephrology Frontiers Meetings 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 あゆみ
2. 発表標題 腎臓のあたらしいイメージング戦略
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----