

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08586

研究課題名(和文) 23Na-MRIを用いたネフローゼ症候群の病態生理の解析

研究課題名(英文) Analyzing the Pathophysiological Mechanisms of Nephrotic Syndrome using 23Na-MRI

研究代表者

忒田 亮平 (Kaseda, Ryohei)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20737697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのごく小さな腎臓に対して、23Na MRI (磁気共鳴映像法)を用いて23Naをもとにした画像化に成功し、水の効率的な再吸収が可能となる対向流増幅系のNa+の濃度勾配・Na+の貯留の状態を可視化した。

検出コイルを新たに作成し、23Na-MRI画像を既存の1HプロトンのMRI画像と合致した画像を得た。

ネフローゼモデルマウスでは、髄質のNa+濃度に変化を認めなかったが、糖尿病モデルマウスによる検討では、ごく早期の6週齢での対向流増幅系の変化を見出した。尿中アルブミンの測定とともに、糖尿病性腎臓病での尿細管異常の早期診断の可能性が示唆された。この結果を、Kidney360誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

23Na MRIでは、腎傷害を反映した血中・尿中マーカーと異なり、ナトリウムの代謝機能の変化をみることで、尿中アルブミンの測定とともに、糖尿病性腎臓病での尿細管の異常を早期診断して、治療につなげられる可能性がある。

23Na MRIでは、今までわからなかった腎臓内のナトリウムの代謝変化を明らかにでき、糖尿病性腎臓病にとどまらず、他のナトリウム代謝に関わる脱水や一部の高血圧のより詳細な病態の把握できる可能性がある。また、マウスのごく小さな腎臓の詳細な可視化成功から、対象臓器拡大の可能性も考えられる。これらの知見の積み重ねにより、23Na MRIの臨床応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using 23Na-MRI (sodium magnetic resonance imaging), successful imaging based on 23Na was achieved for the tiny kidneys of mice, visualizing the concentration gradient of Na+ in the countercurrent amplification system, which enables efficient water reabsorption, and the state of Na+ retention.

A new detection coil was created, obtaining 23Na-MRI images that matched the existing 1H proton MRI images.

In the nephrotic mouse model, no changes were observed in the cortical Na+ concentration. However, in the study involving a diabetes mouse model, changes in the countercurrent multiplier system were detected at a very early stage, specifically at 6 weeks of age. Together with the measurement of urinary albumin, the possibility of early diagnosis of tubular abnormalities in diabetic kidney disease was suggested. These findings were published in Kidney360 journal.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：MRI 23Na MRI 糖尿病性腎臓病 ナトリウム 対向流増幅系 ネフローゼ症候群

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群では、Na⁺と水の貯留がみられ、この病態を明らかにすることが、本疾患の病態解明とその後の治療戦略の提案につながると考えられる。腎臓内でのNa⁺のハンドリングでは、水の効率的な再吸収が可能となる対向流増幅系といった機構が備わっており、皮質から髄質にかけてNa⁺による浸透圧勾配が形成されている。腎髄質のヘンレループが形成する対向流が、下行脚と上行脚の間に生じる微小な浸透圧勾配を長軸方向に増幅し、皮質から髄質深部に向かって大きな浸透圧勾配を形成している。この系では、ヘンレループの先端の濾液は、高いNa⁺濃度となっている。申請者らは、臨床応用されている既存の¹Hプロトンの画像に代わり、5週齢のごく小さなマウスの腎臓において²³Naの画像化に成功した。²³Na-MRIでは、対向流増幅系であるNa⁺の濃度勾配・Na⁺の貯留が可視化されている。

本研究では、「腎臓全体のNa⁺のハンドリング・Na⁺の貯留」と「Na⁺の再吸収に関わるチャンネル・トランスポーター」の関係を明らかにし、今まで不可能だったネフローゼ症候群の解明に挑みたいと考えている。

2. 研究の目的

²³Na-MRI 画像をもとに、今まで理解できなかったネフローゼ症候群における「腎臓全体のNa⁺のハンドリング・Na⁺の貯留」と「Na⁺の再吸収に関わるチャンネル・トランスポーター」の関係を明らかにすることで、病態生理の解明を試みる。腎臓全体でのネフローゼ症候群のNa⁺の再吸収に関わる機構の異常を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

①ネフローゼモデルマウス (NEP25 マウス) を用いて、ネフローゼ症候群といった病的状態では、腎臓内のNa⁺再吸収に関わる作用点(チャンネル・トランスポーター)がどのように変化するか明らかにする。MRI 内で麻酔深度を深めて安楽死した直後の撮像を比較し、Na⁺蓄積の分布も合わせて検討する(研究計画 I)。さらに、塩分摂取量を変えて、その効果も明らかにする。塩分摂取変化後の急性期と慢性期の状態を分けて、観察する(研究計画 II)。正確な腎臓内の位置の特定のため、²³Na-MRI 画像を既存の¹HプロトンのMRI 画像と合致するように機器を改変する。検出コイルを新たに作成することで可能である(研究計画 III)。

②Na⁺の再吸収に影響する薬剤について検討する(研究計画 IV)

③メガリンノックアウトマウスやNEP25 マウスを用いて、腎臓内 Agt、AngII 量や挙動と画像所見を元にしたNa⁺の再吸収機構の関連について検討する(研究計画 V)。

研究計画は、表1の通りとし、MRIの至適な条件設定の期間も含める。万が一、研究計画の遂行において、支障をきたした場合は、他のネフローゼモデル (ICGN マウスなど)、もしくは、慢性腎臓病全体に視野を広げ、片腎摘出モデル(ネフロン数の低下)、薬剤による腎障害モデル、糖尿病モデルなど幅広く検討する。本知見を踏まえて、臨床応用への方向性を模索する。

表1. 研究計画

研究項目	年度	2020年度	2021年度	2022年度
I) トランスポーター・チャンネルの変化：阻害による検討		→	→	
II) 塩分摂取量による変化		→	→	
III) ²³ Na-MRIの改変： ¹ HプロトンのMRI画像と合致		→		
IV) Na ⁺ 再吸収に関わる薬剤の反応			→	→
V) Agt、AngIIとの関わり、ENaC活性化との関わり			→	→

4. 研究成果

²³Na-MRI 機器改変：
¹HプロトンのMR画像と合致

²³Na-MRI 機器装置をより改変を進めた(図1)。正確な腎臓内の位置の特定のため、検出コイルを新たに作成し、²³Na-MRI 画像を既存の¹HプロトンのMRI 画像と合致した画像が撮像できた。また、同



図1



Proportional relationship between sodium concentration and ²³Na NMR signal intensity

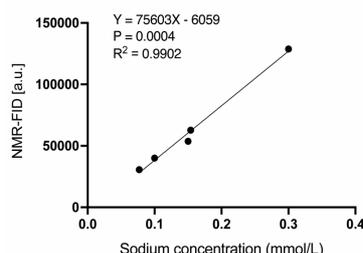


図2

一のMRI装置を用いて、マウスをMRI装置から出すことなく、連続して¹HプロトンのMR画像と合致する²³Na-MR画像を取得することが可能となった。濃度の異なる食塩水を用いて、信号値とNa⁺濃度が正比例の関係にあることを確認した(図2)。

(図1 ¹H +²³NaMRI装置 (A) 9.4Tの縦型標準ボア超伝導磁石、(B) ¹Hと²³Naのサーフェスコイル)

(図2 Na⁺と²³NaNMR信号の関係)

マウスの腎臓の撮像と評価

得られた¹HプロトンのMR画像と合致する腎臓の²³Na-MR画像が得られた(図3A)。腎臓の組織Na含有量(TSC)は、皮質から髄質にかけて、等間隔の区間でプロットされた平均Na信号強度は、線形増加を示した(図3B, C)。

(図3(A) ¹HプロトンのMR画像と合致する²³Na-MR画像 (C57BL/6Jc1マウス、6週齢、オス)。この画像は腹部を横切る断面を示しており、矢印が腎臓を示している。(B) 腎臓の領域と皮質から髄質にかけての軸を示す²³Na MR画像。(C) 皮質から髄質にかけての軸に沿った等間隔点におけるTSC (C57BL/6Jc1マウス、6週齢、オス、N=5))

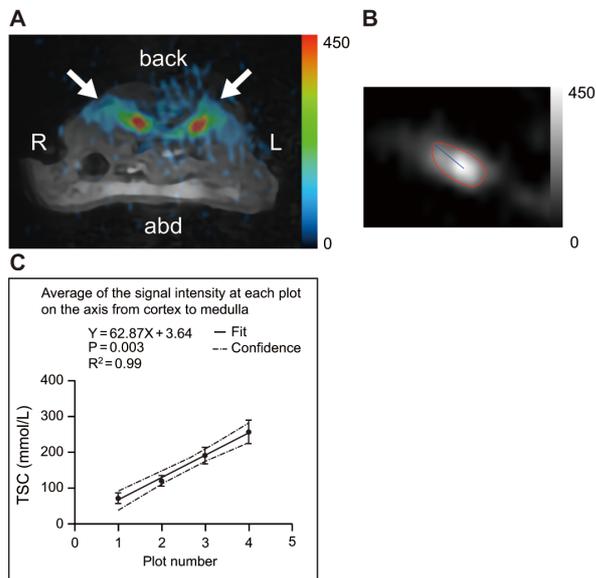


図3

深い麻酔深度による評価

深い麻酔下では、腎臓のNa信号強度が低下した(図4)。

3.5%のイソフルランを投与した後、深い麻酔が誘発され、呼吸の間隔が増加した。呼吸数は、1.5%のイソフルランで1分間に120回であり、3.5%のイソフルランでは12回に低下した。²³Na-MR画像における腎臓の信号強度は、呼吸数が著しく低下する程度の深い麻酔でNa信号強度が低下した。

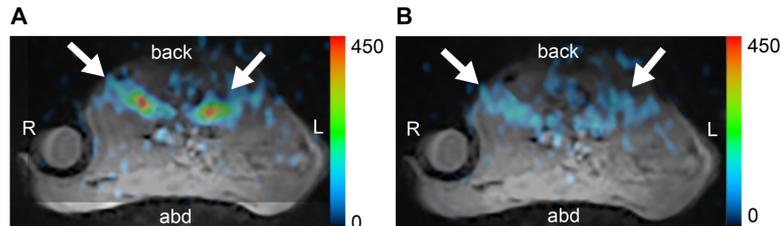


図4

(図4 マウスの腎臓における深い麻酔下での²³Na-MRI信号の変化。腹部を通る横断面のMR画像。矢印は腎臓。(A) 1.5%イソフルラン濃度での²³Na-MR画像。(B) 3.5%イソフルラン濃度での²³Na-MR画像。(C57BL/6Jc1マウス、6週齢、オス))。

トランスポーター・チャネルの変化：阻害による検討

対向流増幅系の形成に關与するNKCC2阻害剤であるフロセミドの投与により、髓質の ^{23}Na -MRI信号強度が低下した(図5)。フロセミド投与前と投与後20分後の皮髓信号勾配は、それぞれ 2.19 ± 0.3 と 1.53 ± 0.16 であった($P < 0.05$, $N = 7$)。初期のTSC値は、皮質では 129.3 ± 12.5 mmol/L、髓質では 281.2 ± 28.4 mmol/Lであり、フロセミド投与後20分後には、皮質では 93.3 ± 11.7 mmol/L、髓質では 141.1 ± 9.3 mmol/Lとなった。フロセミド投与後において、髓質のTSC値と髓質から皮質へのナトリウム濃度勾配は有意に低下した($P < 0.05$)。

(図5 フロセミド投与前後の腎臓の画像(C57BL/6Jc1マウス、6週齢、オス、 $N=7$)。

(A、B)腹部を通る横断面のMR画像。矢印は腎臓。フロセミド投与前(A)および投与後20分後(B)の

^{23}Na -MR画像と ^1H -MR画像の横断面画像(投与量:10 mg/kg体重)。(C)フロセミド投与前(0分)と投与後(20分)の皮質と髓質の信号強度勾配。(D)フロセミド投与前(0分)と投与後(20分)の皮質と髓質のTSC値(組織ナトリウム濃度)の円形ROI内での値。)

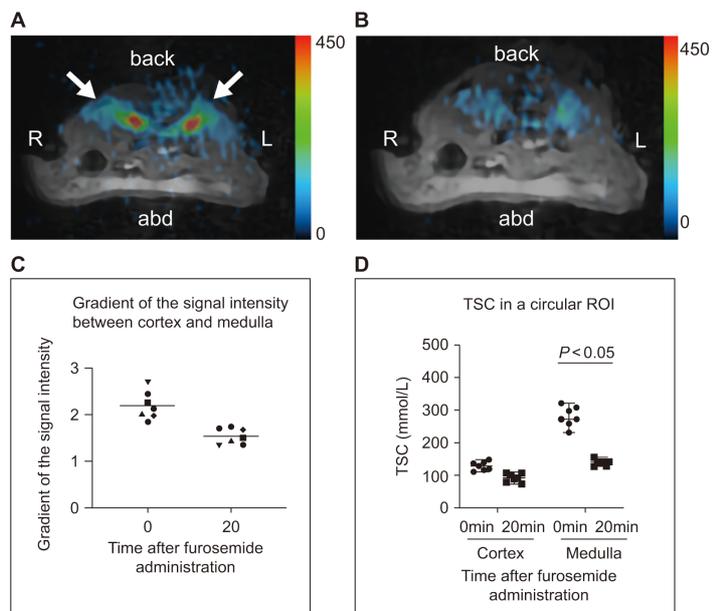


図5

ネフローゼモデルマウスの検討

nhps1の下流にヒトCD25を発現させたトランスジェニックマウスであるNEP25マウスを、東海大学松坂泰二教授より供与を受けて、飼育中だったが、MRI機器がある場所のP1Aの条件を満たせないこと、また、輸送によるマウスの馴化ができないといった問題があり、代替としてアドリアマイシン腎症モデルマウスでの撮像を行った。アドリアマイシン投与によるネフローゼモデルマウスでは、コントロールマウスと比較して髓質の Na^+ 濃度に変化を認めなかった(図6)。アドリアマイシン投与によるネフローゼモデルマウスでは、腎臓の ^{23}Na -MR画像はControl群、Adriamycin群ともに良好に描出された。信号値には両群で明らかな差は見られなかった。特に、対向流増幅系を反映する腎臓内の髓質の輝度に変化を認めなかった。

(図6 フロセミド投与前後の腎臓の画像

(BALB/cAJc1マウス、6週齢、Adriamycin群:10mg/KgBW単回尾静脈投与、Control:生理食塩水同量投与、オス、 $N=7$ 、投与後10日に撮像)。(A)腹部を通る横断面の ^{23}Na -MR画像。赤円内は腎臓。(B)Control群とAdriamycin群の皮質と髓質のTSC値(組織ナトリウム濃度)の円形ROI内での値。)

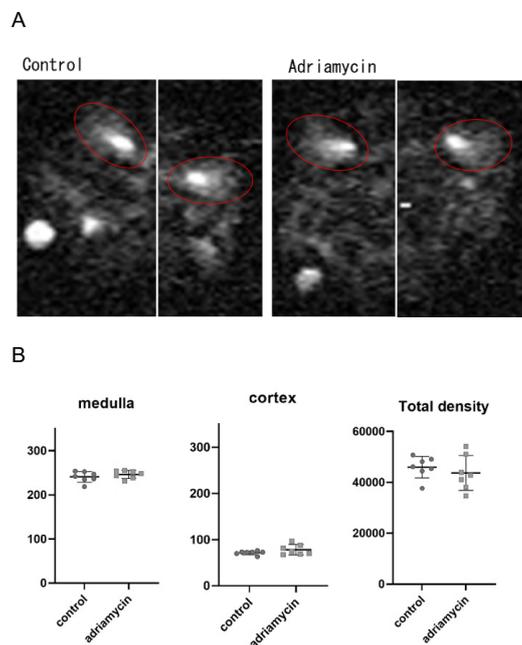


図6

また、NEP25マウスのNKCC2 mRNA、蛋白量ともに差を認めなかった(図7)。

(図7 NEP25 マウスに、抗ヒト CD25 抗体に緑膿菌毒素を組み合わせた LMB2 (0.625ng/gBW) を投与して、ネフローゼ症候群を発症させた後の腎臓の Western blotting。ネフローゼ症候群(+): NEP25 マウスに LMB2 投与群 n=4、ネフローゼ症候群(-): 同量の PBS 投与群 n=2)

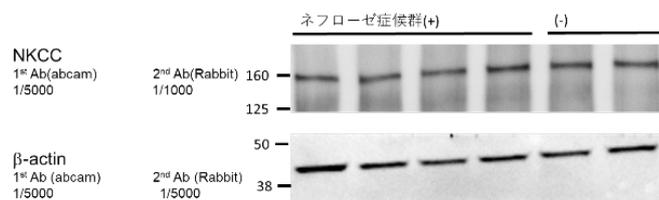


図 7

ネフローゼ症候群において、対向流増幅系に関わる NKCC2 の変化は認めないことが示唆される。既報では糸球体で濾過されたプロテアーゼが集合管の Na 再吸収チャネルである ENaC の構造変化を起こし、Na⁺と水の再吸収を亢進させるとされている (Evan C Ray et al. Adv Chronic Kidney Dis. 2015)。この経路は腎皮質部分での尿濃縮を伴わない等張性の再吸収であり、腎臓の Na⁺濃度には差が見られなかった可能性が考えられる。

さらに、NEP25 マウスを用いた whole kidney RNA-sequence を解析した。トランスポーター活性を持つ遺伝子のうち、up-regulation, down-regulation されているものは、いずれも TPM 1~10 と非常に発現量が少なく、尿細管での Na 再吸収に大きく関わっていることは否定的だった。Na⁺再吸収として報告のある主要遺伝子はいずれも変動を認めず、²³Na-MRI で変化を捉えようとした NKCC2 についても差を認めなかった。mRNA レベルでは腎臓内で Na⁺に関わる主要なトランスポーターに明らかな変化を認めなかった。転写後因子の調整が主体で mRNA 発現量とトランスポーター活性が相関していない可能性が示唆された。

糖尿病モデルマウスでの検討

慢性腎臓病全体として、視野を広げ、糖尿病モデルマウス (db/db マウス) での検討を行ったところ、ごく早期の 6 週齢での対向流増幅系の変化を見出した (図 8)。

db/db マウスでは、コントロールである m+/m+ マウスに比べて腎臓の髄質領域の信号強度が低下した。髄質から皮質への Na 濃度勾配は、m+/m+ マウスと db/db マウスでそれぞれ 2.28 ± 0.21 と 1.64 ± 0.36 だった ($P < 0.01$)。m+/m+ マウスの皮質の TSC 値は 146.0 ± 50.3 mmol/L であり、髄質の TSC 値は 333.5 ± 54.4 mmol/L だったが、db/db マウスではそれぞれ 135.8 ± 16.4 mmol/L と 209.6 ± 42.4 mmol/L だった。

db/db マウスの髄質の TSC 値は、m+/m+ マウスと比較して有意に低かった ($P < 0.01$)。 (図8 m+/m+ (BKS. Cg-m+/m+/Jc1) および db/db マウス (BKS. Cg-Leprdb+/+ Leprdb/Jc1) の腎臓 MR 画像 (それぞれ 6 週齢、N=7) (A, B) m+/m+ マウス (A) および db/db マウス (B) の右腎臓の ²³Na MR 画像と ¹H MR 画像の横断画像 (C) m+/m+ マウスおよび db/db マウスにおける皮質から髄質への信号強度勾配 (D) m+/m+ マウスおよび db/db マウスの円形 ROI 内の皮質と髄質の TSC 値 (組織 Na 濃度) m+/m+, BKS. Cg-m+/m+/Jc1 マウス ; db/db, BKS. Cg-Leprdb+/+ Leprdb/Jc1 マウス)

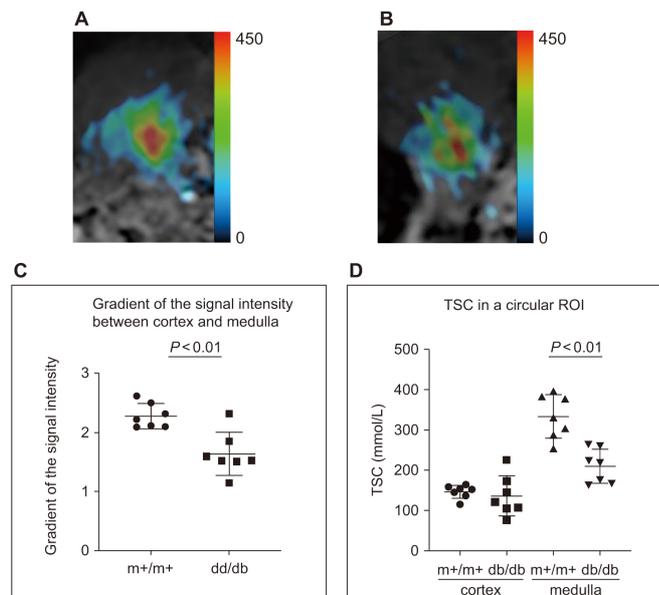


図 8

以上の結果より、²³Na MRI では、腎傷害を反映した血中・尿中マーカーをみる検査とは異なり、ナトリウムの代謝機能の変化をみることで、糖尿病性腎臓病を早期診断できる可能性がある。また、臨床でもよく用いられている尿中アルブミンの測定とともに、糖尿病性腎臓病での尿細管の異常を早い段階で診断して、治療につなげられる可能性があるが示唆された。この得られた結果を Kidney360 誌にて報告した。

今後の展望として、²³Na MRI では、今までわからなかった腎臓内のナトリウムの代謝変化を明らかにでき、糖尿病性腎臓病にとどまらず、他のナトリウム代謝に関わる脱水や一部の高血圧のより詳細な病態の把握できる可能性があると考えられる。今後、これらの他の病気の診断に役立つか明らかにしていく方針である。また、マウスのごく小さな腎臓の詳細な可視化成功から、対象臓器拡大の可能性も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakagawa Yusuke, Kaseda Ryohei, Suzuki Yuya, Watanabe Hirofumi, Otsuka Tadashi, Yamamoto Suguru, Kaneko Yoshikatsu, Goto Shin, Terada Yasuhiko, Haishi Tomoyuki, Sasaki Susumu, Narita Ichiei	4. 巻 4
2. 論文標題 Sodium Magnetic Resonance Imaging Shows Impairment of the Counter-current Multiplication System in Diabetic Mice Kidney	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 582 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0000000000000072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 悴田亮平、拝師智之、佐々木進、成田一衛
2. 発表標題 23Na-MRIを用いた腎臓の病態生理の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 悴田亮平、中川裕介、拝師智之、佐々木進、成田一衛
2. 発表標題 23Na-MRIを用いた腎臓内の対向流増幅系の検討
3. 学会等名 第48回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Nakagawa, Ryohei Kaseda, Yuya Suzuki, Yasuhiko Terada, Tomoyuki Haishi, Susumu Sasaki, Ichiei Narita
2. 発表標題 Sodium Magnetic Resonance Imaging Shows Impairment of the Counter-Current Multiplication System in the Diabetic Model Mice Kidney
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川裕介、俣田亮平、拝師智之、佐々木進、成田一衛
2. 発表標題 23Na-MRIを用いた2型糖尿病マウスにおける腎臓内Na+濃度勾配の検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 画像処理装置、画像処理方法、及びプログラム	発明者 俣田亮平、成田一衛、佐々木進、拝師智之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-127377	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	成田 一衛 (Narita Ichiei) (20272817)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	細島 康宏 (Hosojima Michihiro) (50464003)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (13101)	
研究分担者	斎藤 亮彦 (Saito Akihiko) (80293207)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授 (13101)	
研究分担者	寺田 康彦 (Terada Yasuhiko) (20400640)	筑波大学・数理物質系・准教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------