

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461211

研究課題名(和文)腎内微小循環系の3次元構築から腎硬化症の進展を考える

研究課題名(英文)evaluation of renal microcirculation of nephrosclerosis using 3D technique

研究代表者

上杉 憲子(uesugi, noriko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70279264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎癌非癌部組織を収集し、糖尿病、高血圧、高齢者について、腎臓の連続切片を作成し、血管と糸球体の関係を検討した。高齢者では太い動脈では硬化が強いが、その末梢の血管はよく保たれていることが3次元構築で判明した。腎障害が高度な高血圧例では、細い血管ほど動脈硬化が強く、糸球体硬化も強くみられた。3次元構築をすると、とくに末梢血管で内腔の狭い動脈硬化を有する症例では、高度な糸球体硬化を認めた。これらの結果を国内外の腎臓学会、病理学会で発表し、論文化をおこなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the human renal microcirculatory changes of aged, hypertensive and diabetic cases by a three-dimensional (3D) reconstruction technique using paraffin embedded non-tumor kidney specimen with immunohistochemical staining. The 3D images proved that arteriosclerotic changes in large proximal interlobular arteries did not directly induce distal arterial change or glomerulosclerosis. The nephrosclerotic patient showed severe hyalinosis with luminal narrowing of small arteries directly inducing glomerulosclerosis. We successfully visualized healthy aged kidneys on 3D images and confirmed the underlying pathology.

研究分野：腎臓

キーワード：糸球体硬化 動脈硬化 3次元構築 ヒト腎臓

1. 研究開始当初の背景

(1) **腎内微小循環系の障害による腎硬化**：腎臓内の微小循環は濾過や血圧調整などの腎機能に関係し、高血圧の標的臓器である。高血圧による微小循環障害は腎硬化症として知られ、腎硬化症による透析導入は日本でもあるいは世界的にも年々増加し、現在日本での透析導入の12.3%、原疾患別の3位を占めている(日本透析学会 2012年未の慢性透析患者に関する基礎集計)。腎硬化症は病理学的には小動脈の内膜肥厚や細小動脈の硝子化といった動脈硬化病変により引き起こされる腎実質障害と定義されるが、同様の小血管障害は、高血圧だけでなく、糖尿病、加齢、高脂血症、慢性腎臓病(chronic kidney disease,CKD)で高頻度にみられることが剖検(2005,JASN,Nimomiya)、移植腎(2010,Rule,Ann Intern Med)で報告され、高血圧以外の多くの因子が小動脈硬化の形態変化に関与することが明らかになった。降圧療法の進歩にも関わらず、世界的に腎硬化による末期腎不全が増加している事象は、その裏付けと考えられている。

(2) **小動脈障害における加齢とCKD**：小動脈障害により惹起される腎硬化は、加齢やCKDによる腎障害の進展に大きな影響があり、予後の規程因子である。一方、高齢者では腎疾患(膜性腎症、ANCA関連血管炎、糖尿病、感染関連腎炎)の罹患が増え、原疾患の重症度とともに、併存する腎硬化症つまり動脈硬化病変の病理学的評価の確定が腎予後評価や治療を決める際に重要となる。

(3) **腎硬化症診断における病理学診断の問題点**：しかし、腎内動脈病変の病理像判定には種々の問題がある。腎の動脈硬化性病変は健康高齢者を含む高齢者で多くみられる上に、その病理所見は必ずしも糸球体障害や腎機能の悪化に関係しないという報告が移植腎donor(2010,Rule,Ann Intern Med)や剖検例(2009,Ninomiya, JASN)でなされた。ど

のような動脈病変が直接的に糸球体や間質障害を引き起こすのか確定されていないため、血管病変の重症度の診断は難しい。糸球体や間質障害を来す血管障害の病理組織像を明らかにすることは、今後も増える高齢者やCKDでの降圧剤を含めた腎保護療法の選択や腎疾患の治療の選択を考える上で重要である。しかし、血管と糸球体の直接的な検討は、通常の組織学的な検索では、限界がある。

(4) **血管病変の診断への取り組み**：研究代表者は、血管病変と糸球体、間質障害の直接的な関係を探る一つの方法として、腎微小循環系の3次元構築に着目し、研究協力者らとともに、平成23年度基盤研究(C)“新型バーチャルスライドを用いた腎血管構築の再現と慢性腎臓病進展機構の解明”で、腎癌非癌部を用い、ヒトではじめての腎微小循環系の3次元構築を完成させた。この方法は腎癌非癌部のパラフィン抱埋標本の連続切片を用い、免疫組織化学とバーチャルスライドシステムを駆使し、腎内小葉間動脈から、輸入細動脈、糸球体、さらに毛細血管にいたる3次元構築を作るもので、腎内微小循環系の壁の不整や走行状態など2次元では確定できない微小循環系の形態変化、血管と糸球体との直接のつながりが抽出しえた。この検討から健康高齢者では高度の病理変化を呈す小葉間動脈であってもそれに続く糸球体の形態像に影響を与えないことが確認され、血管障害と糸球体障害に関係がないとするこれまでの報告を裏打ちする結果が得られた。しかし詳細に検討すると、この輸入動脈は、障害のない小葉間動脈に続く輸入細動脈と比較すると、高頻度に蛇行し、軽度の内膜肥厚が観察された。蛇行は圧や容量負荷に対する血管のremodelingであるが、この所見では、むしろ上流の小葉間動脈の病変による血流変化を糸球体に伝えないための防御的機構とも考えられる。我々は糸球体門部以外の部位での

余剰な毛細血管の流入出など、糸球体レベルの remodeling 像も抽出した。腎臓では、remodeling の破綻が、腎症進展の key となると思われる。

2. 研究の目的

腎内微小循環障害は、高血圧、加齢、慢性腎臓病(chronic kidney disease,CKD)、糖尿病などの複合的な要因により発症し、腎硬化症として認識される。腎硬化症は高齢者やCKD腎障害進行に深く係わり、腎硬化症の原因となる小血管病変の形態的变化は評価は腎予後を占う意味で重要であるが、実際には腎障害を惹起する血管の形態所見は明らかになっていない。本研究では、腎障害を惹起する腎小血管障害の形態を解明するため、高解像度バーチャルスライドを用い動脈、糸球体、毛細血管に至る血管網を立体構築し、直接的ネフロン障害を引き起こす血管病変の形態像を解析する。さらに多重免疫標識を用いることにより、動脈の組織学的変化の評価が可能となり、動脈障害によるネフロン障害の機序の解明につながると考える。

3. 研究の方法

ヒト腎癌患者の非癌部のホルマリン固定パラフィン切片を用いた3次元構築を行う。(1)手術標本を通常の組織染色を行った後に、目的とする部位をマイクロアレイヤ - で3mm四方の円形にくりぬき、回転式マイクロトームを用い、200枚 - 300枚の連続薄切切片を作成する。これに血管内皮、平滑筋、近位尿細管のマーカーで、免疫染色を行い、それぞれの染色標本をバーチャルスライドに取り込み、画像解析ソフトを用い3次元構築を行い、小葉間動脈から輸入動脈、糸球体の描出を行う。3次元構築から、血管構築の異常(走行、内腔の不整)、糸球体内外に出入りする異常血管、糸球体内での毛細血管の異常連結を同定し、糸球体障害(硬化や虚脱)や尿細管障害

の関係を同定する。(2)同じ組織切片を用い、2次元形態計測(血管内膜中膜比、硝子化)、糸球体障害(硬化や虚脱糸球体数)、間質の線維化の形態計測を行う。これらの検討を腎皮質の部位(表層、髓質側)に分け検討する。(3)上記の所見を臨床データと比較検討する。

4. 研究成果

80件の腎癌非癌部を収集し、作成した連続切片から血管を観察し、糸球体と血管の関係を検討した。糖尿病性腎症では、輸出動脈の重要性を検討したが、これに関しては、論文発表がまだであり、この場では、言及しない。

大型の血管、弓状動脈や近位の小葉間動脈の組織変化は、これまでは、動脈硬化のメルクマールとされてきた。しかし、3次元構築を行うと、これらの動脈の高度な血管障害があっても、末梢の動脈硬化を必ずしも招かないことが、確認された。とくにヒト高齢者ではその所見が顕著であった。一方では高齢者では、糸球体硬化自体はすすんでおり、動脈構造の変化以外の要因、血圧や血流量などの影響が大きいことが明らかになった。

また高血圧患者では、腎障害の軽いものと高度な症例を、3次元構築を用い、比較すると、太い血管には明らかな差はなかったが、末梢の血管、とくに小葉間動脈遠位では、内膜肥厚は顕著ではないが、高度の内腔の狭窄を認め、輸入動脈では高度の硝子化がみられ、これが栄養する糸球体には硬化を認めた。

以上より、腎硬化症ではより細い血管の障害が重要であり、細い血管障害は、必ずしも大型の血管障害とは相関がないことが明らかになった。この結果を学会などで発表し、論文文化を行った。

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1件)

1. Age-Related Renal Microvascular Changes: Evaluation by Three-Dimensional Digital Imaging of the Human Renal Microcirculation Using Virtual Microscopy / Uesugi. N., Shimazu. Y., Kikuchi. K., Nagata. M. Int. J. Mol. Sci. (2016, 2 ;17)

[学会発表](計8件)

1. 輸出細動脈障害は糖尿病の最初のターゲットである。 / 上杉憲子 古市賢吾 上田善彦 和田隆志 第60回腎臓学会学術総会 平成29年5月26日 東京
2. 輸出細動脈障害は糖尿病のターゲットである。 / 上杉憲子 第106回病理学会日本病理学会 平成29年4月27日 東京
3. Polar Vasculosis is Early Morphological Change in Diabetes / Uesugi. N., Furuichi K., Wasa. T. American Society of Nephrology Annual Meeting, 2016, Nov. 18, Chicago, USA
4. 軽症肥満症(過体重)の糸球体門部血管異常 / 上杉憲子 長田道夫 第59回日本腎臓学会学術総会 平成28年6月17日 仙台
5. 糸球体門部血管は軽症肥満症での target である / 上杉憲子 島津徳人 長田道夫 第105回病理学会日本病理学会 平成28年5月14日 仙台
6. 糸球体門部血管は軽症肥満症での target である / 上杉憲子 島津徳人 長田道夫 第105回病理学会日本病理学会 平成28年5

月14日 仙台

7. ヒト糖尿病 polar vasculosis の起源について : 3次元構築を用いた検討 / 上杉憲子 島津徳人 長田道夫 第58回日本腎臓学会学術総会 平成27年6月6日 名古屋

8. ヒト糖尿病性腎症における polar vasculosis(PV)の発生源について : 3次元構築を用いた検討 / 上杉憲子 島津徳人 長田道夫 第104回病理学会日本病理学会 平成27年5月14日 仙台

[図書](計2件)

1. クリオグロブリン血症 / 上杉憲子、-腎と透析、腎沈着症(2018, 544-552)(東京医学社)
2. 血管の観察 : 肉芽腫性血管炎、壊死性血管炎 / 上杉憲子 -腎と透析、別冊(2017, 295-305)(東京医学社)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上杉 憲子 (UESUGI, Noriko)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号 : 70279264

(2)研究分担者

島津 徳人 (SHIMAZU, Yoshihito)
麻布大学・生命・環境科学部・准教授
研究者番号 (10297947)

長田 道夫 (NAGATA, Michio)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号 (10192238)

(4)研究協力者

菊池 和盛 (KIKUCHI Kazumori)
筑波メディカルセンター 病理部長