

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16070

研究課題名(和文) 生体内りん光寿命イメージングによる、腎臓低酸素の様式解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of renal hypoxia by phosphorescence lifetime measurement

研究代表者

平川 陽亮 (HIRAKAWA, YOSUKE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10780736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでの研究を進展させ、りん光プローブであるBTPDM1を用いた腎臓における低酸素イメージングの手法を開発した。この手法により、世界で初めて、腎臓表面では隣接した尿細管間であっても酸素分圧が異なる、酸素勾配が存在することを示し、また近位尿細管のS1セグメント、S2セグメントという尿細管の上流・下流の酸素分圧を定量した。申請者はこれをさらに発展させ、酸素勾配の生物学的な意義についても検討を開始している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腎臓における酸素状態の評価法を確立した。慢性腎臓病の進行に、腎臓の低酸素が関与することは示されているが、低酸素の評価法が確立していなかったことが、実際に低酸素が関与する腎臓病を同定する上で問題となっていた。このため、本研究での低酸素検出方法の確立は、今後の腎臓病の低酸素をターゲットとした治療法の開発において、基礎的な研究のために有用である。

研究成果の概要(英文)：In this research, the researcher established a technique which visualizes oxygen status in renal surface by using a phosphorescence probe, BTPDM1. By the technique, the researcher demonstrated the existence of oxygen gradient in renal surface, even in neighboring tubules for the first time over the world. This research also revealed the absolute oxygen pressure of S1 and S2 segment of proximal tubules. This researcher further developed this research in assessing the biological meaning the oxygen gradient.

研究分野：腎臓病

キーワード：腎臓 低酸素 りん光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病における低酸素の意義

慢性腎臓病の原因疾患は糖尿病、糸球体腎炎、高血圧など複数存在するが、いずれの疾患も進行に腎臓低酸素が深く関与する (Nangaku M, J Am Soc Nephrol 2006, Mimura I, Nat Rev Nephrol 2010)。腎臓低酸素の検出、評価は CKD の進行メカニズムの解明のために重要であるにも関わらず、腎の低酸素応答に直接関係する細胞内低酸素の描出法は確立されていなかった。

(2) 低酸素検出法の状況

研究開始当初の低酸素検出法としては、針電極法と BOLD-MRI が開発されていたが、針電極法は空間的解像度を有さず、BOLD-MRI についても解像度は限定されており、単一ネフロンレベルの解像度を有する手法は存在しなかった。

2. 研究の目的

申請者は低酸素が腎不全に実際に及ぼしている影響を正確に評価し、これをターゲットとした新規治療を開発するために、細胞内酸素分圧の評価法であること、定量的であること、生体内での測定が可能であること、の3点を満たす理想的な低酸素評価法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 群馬大学理工学府との共同研究で、マウスにりん光プローブ BTPDM1 を投与し、りん光寿命イメージング顕微鏡を用いた観察を行った。
- (2) この結果を解釈するために、マウスに尿中排泄色素を投与し、りん光寿命の長短 (=酸素分圧の低高) と尿細管の上下流の関連を調べた。
- (3) りん光寿命を酸素分圧の絶対値に変換するために、培養細胞においてりん光寿命測定を行い検量線を作成した。

4. 研究成果

(1) マウス腎臓でのりん光寿命測定の成功

正常マウスにおいて BTPDM1 投与の後に、腎表面のりん光イメージング顕微鏡画像の撮影を撮影する手法を開発し、撮影に成功した。撮影の結果、腎表面においてはりん光寿命が異なる、すなわち酸素分圧の異なる二つの尿細管サブグループの存在が示された(図1)。

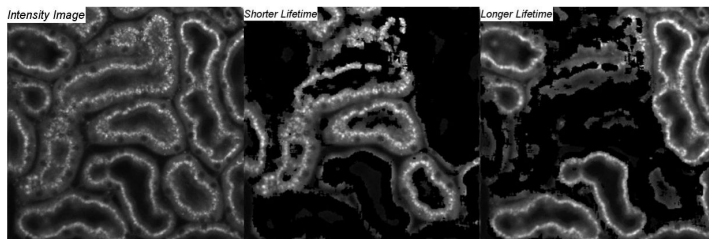


図 1

腎表面の PLIM とりん光寿命による分類

(2) 尿細管サブグループの同定

次に、りん光寿命の違いを示す尿細管群の解剖学的な同定のため、尿中排泄色素を投与し、色素動態の追跡を行った。その結果、尿中排泄色素はりん光寿命が短い尿細管に先に出現し、その後りん光寿命の長い尿細管に現れることから、糸球体に近い S1 セグメントの尿細管が比較的高酸素、糸球体から遠い S2 セグメントの尿細管が比較的低酸素であることが示された。

(3) 検量線の作成

今回使用したりん光寿命イメージング顕微鏡を用い、培養尿細管細胞を用いて検量線を作成したところ、図2に示すように精度の高い検量線が作成でき、生体で得られたりん光寿命に外挿することで生体内での S1 セグメント、S2 セグメントの酸素分圧を各々 51mmHg、41mmHg と定量することが可能であった。さらに、吸入酸素分圧を変えることにより、S1 セグメント、S2 セグメントの酸素分圧を別々に定量することが可能であった。

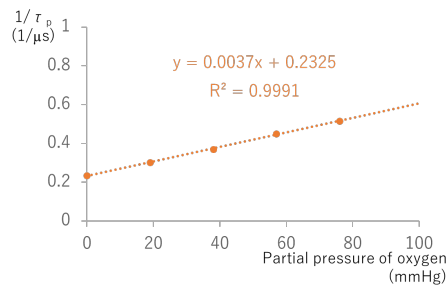


図 2
培養細胞における検量線
 p は培養酸素分圧を示す

(4) 病腎での検討

本研究では申請書の通り病腎での検討も行ったが、糖尿病性腎臓病モデルや尿管結紮モデルにおいて、BTPDM1 が期待通りの細胞内分布を示さなかったため、病腎においては十分な評価が行えなかった。ここまでの内容について論文報告を行った。

(5) gGlu-HMRG による近位尿細管染色実験

申請者はマウスに gGlu-HMRG を投与することで尿細管を標識可能であることを確認した。他方、現在の PLIM システムでは蛍光色素は一種類しか使用することはできず、今回染色できた尿細管が実際に近位尿細管であることの証明が行えなかった。PLIM システムの改良を待ち、引き続き検討を行う予定である。

(6) 他りん光プローブの検討

本研究では、りん光プローブとして BTPDM1 以外のプローブを用いることで、尿細管細胞の細胞内以外のコンパートメントの酸素分圧が測定ではないかと考えた。また、上記の通り病腎の酸素分圧測定は BTPDM1 では行えなかったことから、他のりん光プローブを用いた検討を行った。この中で、PEG 化した BTP が尿中によく分布し、尿中酸素分圧を用いて腎臓の酸素分圧が推定可能な可能性が生じたため、学会発表を行い、著書として報告した (Hydrophilic Ir(III) Complexes for In vitro and In vivo Oxygen Imaging)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Yosuke Hirakawa, Kiichi Mizukami, Toshitada Yoshihara, Ippei Takahashi, Purevsuren Khulan, Tomoko Honda, Imari Mimura, Tetsuhiro Tanaka, Seiji Tobita, Masaomi Nangaku. Intravital phosphorescence lifetime imaging of the renal cortex accurately measures renal hypoxia. *Kidney Int.* 2018;93:1483-1489.
2. Toshitada Yoshihara, Yosuke Hirakawa, Masahiro Hosaka, Masaomi Nangaku, Seiji Tobita. Oxygen imaging of living cells and tissues using luminescent molecular probes. *J Photochem. Photobiol. C.* 2017;30:71-95
3. Yosuke Hirakawa, Tetsuhiro Tanaka, Masaomi Nangaku. Renal Hypoxia in CKD; Pathophysiology and Detecting Methods. *Front Physiol.* 2017;8:99.
4. Yosuke Hirakawa, Tetsuhiro Tanaka, Masaomi Nangaku. Mechanisms of metabolic memory and renal hypoxia as a therapeutic target in diabetic kidney disease. *J Diabetes Investig.* 2017;8:261-271.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Yosuke Hirakawa, Kiichi Mizukami, Toshitada Yoshihara, Tomoko Honda, Imari Mimura, Tetsuhiro Tanaka, Seiji Tobita, Masaomi Nangaku. DETERMINATION OF OXYGEN TENSION IN TUBULAR EPITHELIAL CELLS USING PHOSPHORESCENCE LIFETIME IMAGING MICROSCOPY. 55th ERA-EDTA Congress. Copenhagen. May 24-27, 2018.
2. Yosuke Hirakawa, Kiichi Mizukami, Tomoko Honda, Toshitada Yoshihara, Imari Mimura, Tetsuhiro Tanaka, Seiji Tobita, Masaomi Nangaku. APPLICATION OF PHOSPHORESCENCE LIFETIME IMAGING MICROSCOPE TO ASSESS TUBULAR OXYGENATION. 16th Asian Pacific Congress of Nephrology. Beijing. March 28-31, 2018.

3. Yosuke Hirakawa, Toshitada Yoshihara, Tomoko Honda, Imari Mimura, Tetsuhiro Tanaka, Seiji Tobita, Masaomi Nangaku. Renal tubular oxygen imaging using phosphorescence lifetime imaging microscope. ISN Frontiers meeting. Tokyo. February 22-25, 2018
4. 本田智子, 水上輝市, 吉原利忠, 平川陽亮, 三村維真理, 田中哲洋, 南学正臣, 飛田成史. 親水性イリジウム錯体のりん光寿命測定による腎皮質(尿細管腔・傍尿細管毛細血管)酸素分圧の計測. 第13回日本分子イメージング学会. 東京. 2018年5月(口頭発表)
5. 平川陽亮, 吉原利忠, 本田智子, 三村維真理, 田中哲洋, 飛田成史, 南学正臣. りん光寿命イメージング顕微鏡を用いた生体腎皮質の酸素勾配の描出. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 兵庫. 2017年12月
6. 平川陽亮, 吉原利忠, 三村維真理, 南学正臣, 飛田成史. りん光寿命イメージング顕微鏡を用いた腎表面酸素分圧勾配の描出. 第12回日本分子イメージング学会学術集会. 神奈川. 2017年5月(口頭発表)
7. 平川陽亮, 吉原利忠, 三村維真理, 田中哲洋, 飛田成史, 南学正臣. りん光寿命を用いた尿中酸素分圧測定法の開発. 第60回日本腎臓学会学術総会. 宮城. 2017年5月

〔図書〕(計2件)

1. Hydrophilic Ir(III) Complexes for In vitro and In vivo Oxygen Imaging, Yoshihara T, Hirakawa Y, Nangaku M, Tobita S, RSC Detection Science: Quenched-phosphorescence Detection of Molecular Oxygen: Applications in Life Sciences, ed. D. B. Papkovsky and R. I. Dmitriev, Royal Society of Chemistry, 2018, Chap. 4, pp.71-90. DOI: 10.1039/9781788013451
2. Tipping the Balance from Angiogenesis to Fibrosis in Chronic Kidney Disease: An Organ-Based Guide to Disease Pathophysiology and Therapeutic Considerations. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Fibrosis in Disease. Monte S. Willis, Cecelia C. Yates, Jonathan C. Schisler. Humana Press, 2018 DOI: 10.1007/978-3-319-98143-7_16

〔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:
 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:
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：飛田 成史

ローマ字氏名：Tobita Seiji

研究協力者氏名：吉原 利忠

ローマ字氏名：Yoshihara Toshitada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。