

機関番号：35303

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300163

研究課題名 (和文) マルチフォトン共焦点レーザー顕微鏡による蛍光分子糸球体機能解析

研究課題名 (英文) Molecular Biological Analysis on Glomerular Function by Multi-Photon Confocal Laser Microscopy

研究代表者

仲本 博 (NAKAMOTO HIROSHI)

川崎医科大学 医学部・助教

研究者番号：10299183

研究成果の概要 (和文)：糸球体濾過を可視化して定量化することが出来た。糖尿病の初期からアルブミン程度の分子量の物質がラットにおいて漏出していることが判明した。その程度は糖尿病の罹病期間に応じて経時的に進行する。糖尿病誘発後2ヶ月ほどでスリット膜を構成する蛋白分子の配列に乱れが生じている。スリット膜を構成するポドシンと CD2AP は、均等に配列不正が生じるのではなく、それぞれが局所的に構造変化を来していることが判明した。

研究成果の概要 (英文)：We were able to visualize glomerular filtration in a rat. There was leakage of larger particles with the molecular weight of 70k Dal, which was found progressive even at the early stage of diabetes. The reason of this leakage was attributed to the structural changes of the slit membrane where filtration takes place. It is because alignment of podocin and CD2AP, component proteins of the slit membrane was heterogeneously damaged due to diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：腎症、可視化、糖尿病、共焦点顕微鏡、濾過

## 1. 研究開始当初の背景

我国は、20世紀末から高齢化社会に突入しており、近年ますます高齢者が抱える生活習慣病への関心が高まっている。これに対処せよという社会的急務の中、メタボリック症候群を形成する糖尿病や高血圧、高脂血症の血行動態変化も注目されるようになった。今や成人の7人に一人が糖尿病予備軍と言われている。その糖尿病の初期から微小アルブミン尿が排泄されていることが、直接腎症に繋がっているだろうと推測されている。糖尿

病では、この濾過が初期には亢進しており、末期には腎不全を引き起こす。新規透析導入の原因の40%が実に糖尿病による腎不全である。糖尿病における腎微小循環の解明は、臨床的にもおおいに意義があると言えよう。さて、腎糸球体の in-vivo 観察は制約が大きく、これまでは水腎症など病的モデルや糸球体が表在化する特殊な状態のラットモデルによる解析に限られ、生理的条件下の観察は不可能であった。

本研究申請者らのグループは、医学に工学的手法を導入し成果を上げてきた。腎血流については 80ch の 20MHz 超音波血流計を使用し動脈硬化の局在性をイヌにおいて明らかにし、ヒトへの応用も成し遂げ (Arteriosclero Thrombo '92, '96)、動脈硬化が血流のズリ応力の小さい流れの剥離があるところに生じ易いことを実証した。1993 年には、日本光電 (株) と共同で CCD 生体顕微鏡を開発し、心筋内微小血管の可視化に世界で初めて成功 (Circ Res 93, 94, 95, Am J Physiol 94, J Physiol 98) するとともに、腎に応用してイヌ (米国腎臓病学会 American Society of Nephrology, 1993)、ヒト (American Heart Association, 1994) における腎内微小血管の観察に成功し、アンジオテンシン II やカルシウム拮抗剤の作用を明らかにした。その後、腎糸球体血流の停止 (stop-flow 現象) の薬剤濃度依存性を示し (ASN 1998)、糸球体における血流速度の測定を可能にした。 (Methods of Information in Medicine 2000)。高浸透圧液による尿細管糸球体フィードバックの可視化にも成功している (Kidney Int. 2001)。最近では、急性腎不全の一病態である血管内凝固症候群 (DIC) の可視化にも成功し、研究を続けている (FASEB 2003, World Congress on MPBE 2006)。

しかし、分子生物学の進展に伴い単なる生理的な現象論を越えて高次元の研究が希求されるようになった。そこで我々の微小循環可視化の手法に、蛍光色素法を導入し、糸球体の機能の一つである濾過を可視化することで、機能に迫ることを着想した。分子サイズの異なるデキストランを用いることで、病態による濾過の違いを分子レベルで調べることが出来る。1990年代初頭から共焦点レーザー顕微鏡が腎臓の分野にも応用されて来たが、最近まで正常機能である濾過・再吸収・分泌といった現象を可視化するという

段階に留まっており、定量化を試みた報告は 10 に満たない。しかし、分子レベルでの機能を観察するには、細胞の染色や分子の大きさ (5 nm 前後) や電荷を変えることが出来なければならないが、マルチフォトン顕微鏡はこれを可能とする。実際に、マルチフォトン共焦点レーザー顕微鏡を用いた研究も循環器学会で英語で発表を行なっている (Circulation Journal, 2007)。

## 2. 研究の目的

腎微小循環の可視化は困難であった。初期には摘出ネフロンが用いられた。その後、水腎症モデルやネフロンの類粘膜への移植モデルなどが用いられた。更に、糸球体が腎皮質の表層にも存在する特殊な動物モデルも用いられるようになった。しかし、これらのサンプルや動物モデルを用いて得られた結果は、妥当性が常に疑問視されて来た。我々は、普通の Wistar ラットを用いての in-vivo における腎微小循環の可視化に挑戦して来た。このたび、我々はこの濾過を分子レベルで評価するために、蛍光色素を用いて多光子共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP2 MP) を用いて、生理的条件化で可視化することを試みた (図 1)。

## 3. 研究の方法

Wistar ラットに尾静脈から STZ (50mg/kg) を投与することで糖尿病を誘発し、4 週から 8 週の早期糖尿病モデルを作成した (n=6)。対照群には、生理的食塩水を同様に投与した (n=8)。自発呼吸によるセボフレン吸入麻醉下のラットに、Texas Red で標識した 3, 10, 40, 70 kDa のデキストランを尾静脈から投与して、共焦点レーザー顕微鏡にて可視化撮像した。約 4 秒で濾過はピークに達し、10 秒以内に終了した。FITC で標識した 500 kDa のデキストランを投与し血管内を緑色で、Hoechst33342 を投与し細胞の核を青色で描出した。

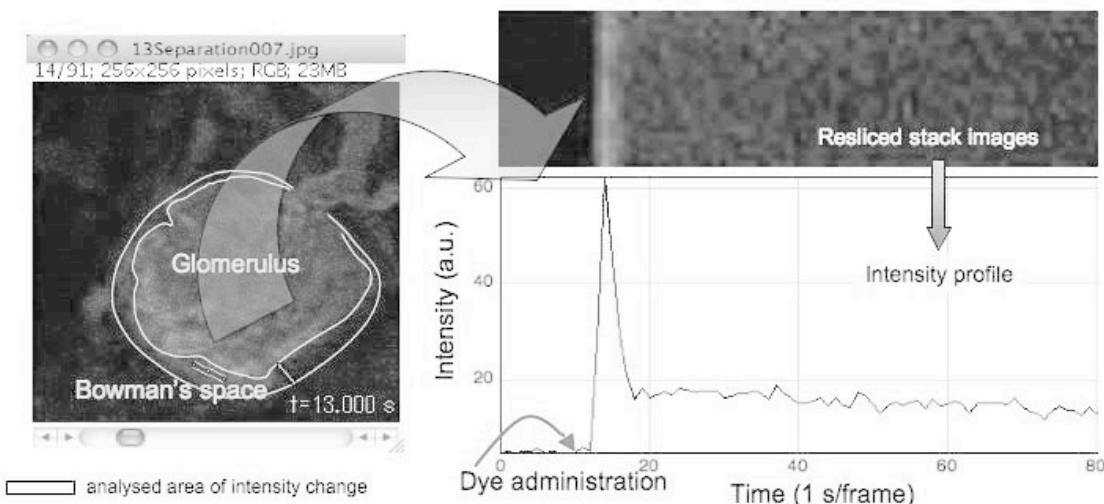


図 1 hyperfiltration の可視化

さらに、蛍光抗体染色によってスリット膜を構成するポドシンと CD2AP を染色してその分子生物学的構造を調べた。

#### 4. 研究成果

早期糖尿病は、hyperfiltration を呈し、コントロールラットに比して、低分子量の 3k、10k のデキストランでは差はないが、より大きい分子量の 40k、70k のデキストランは多く濾過されていた。つまり、糸球体におけるアルブミンと同サイズの分子の濾過が認められるので、糸球体濾過機能の障害が糖尿病早期から生じていることを意味する。

糖尿病誘発後 2 ヶ月ほどでスリット膜を構成する蛋白分子の配列に乱れが生じていることが分かった。さらに 6 ヶ月の糖尿病ラットモデルを用いると、スリット膜を構成するポドシンと CD2AP は、均等に配列不正が生じるのではなく、それぞれが局所的に構造変化を来していることが判明した。

糖尿病早期の hyperfiltration を可視化定量化することが出来た。糖尿病の早期からすでに蛋白濾過の障害が生じており、それは構造変化に由来することが分かった。

#### 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 2 件)

① Hiroshi Nakamoto, Yasuo Ogasawara, Fumihiko Kajiya, Visualisation of nephroprotective function of C-peptide in an early stage diabetic rat, 査読無、生体医工学 48 Suppl.1 2009, pp.291-292

② 仲本 博、小笠原康夫、梶谷文彦、In-vivo における糸球体濾過の可視化と定量化の試み、査読無、日本バイオイメージング 19(2), 2009, pp.82-83

[学会発表] (計 18 件)

① Hiroshi Nakamoto, Yasuo Ogasawara, Fumihiko Kajiya C-peptide Effects on Glomerular Filtration at the Early Stage of Diabetes, The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2011/03/20 パシフィコ横浜(神奈川)

② Hiroshi Nakamoto, Kazuhiko Nakayama, Noriaki Emoto, Fumihiko Kajiya Early diabetes and slit membrane, 第 36 回微小循環学会総会 2011/02/12 名古屋市立大学医学部付属病院 (名古屋)

③ 仲本 博、矢田豊隆、小笠原康夫 生体でのアデノシンによる糸球体輸出入細動脈の調節、第 40 回日本心脈管作動物質学会総会 2011/2/5 かがわ国際会議場 (香川)

④ Hiroshi Nakamoto, Yasuo Ogasawara, Fumihiko Kajiya In-vivo Quantification of Glomerular Filtration in a Rat, 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society 2010, 2010/09/26 九州大学医学部付属病院 (福岡)

⑤ 仲本博、小笠原康夫、梶谷文彦 In-vivo における糸球体濾過の可視化と定量化の試み、日本バイオイメージング学会総会、2010/09/11 慶応大学日吉学舎 (神奈川)

⑥ Hiroshi Nakamoto, Yasuo Ogasawara, Fumihiko Kajiya In-vivo Visualisation Study of Renal Microcirculation in a Rat, 6th World Congress on Biomechanics 2010, サンテック・シンガポール国際会議場 (Singapore)

⑦ Hiroshi Nakamoto, Yasuo Ogasawara, Fumihiko Kajiya Visualisation of nephroprotective function of C-peptide in an early stage diabetic rat, 第 49 回日本生体医工学会大会、2010/06/27, 大阪国際交流センター (大阪)

⑧ Hiroshi Nakamoto, Yasuo Ogasawara, Fumihiko Kajiya In-vivo Visualisation Study Revealed Hyperfiltration in an Early Diabetic Rat Can be Corrected with C-peptide, The Japanese Circulation Society, 2010.3.7, Kyoto

⑨ Hiroshi Nakamoto, Yasuo Ogasawara, Fumihiko Kajiya In-vivo measurement of sieving coefficients of a rat glomerular membrane, 日本微小循環学会、2010.2.27、大宮

⑩ 仲本博、小笠原康夫、梶谷文彦 生理的条件下での腎糸球体濾過機能定量 (第 22 回バイオエンジニアリング講演会 (於岡山理科大学、1月9-10日) 2010 岡山

⑪ Nakamoto Hiroshi, Ogasawara Yasuo, Kajiya Fumihiko PROGRESSION OF HYPERFILTRATION IN AN EARLY DIABETIC RAT WAS VISUALISED BY MULTIPHOTON MICROSCOPY ( The 36th Congress of the International Union

of Physiological Sciences (Kyoto, Jul.27-Aug.1) 2009

⑫仲本博、小笠原康夫、梶谷文彦 糖尿病における糸球体濾過には早期から障害が生じている (第 32 回日本バイオレオロジー学会年会 (群馬、6 月 4-5 日) 2009

⑬ Nakamoto Hiroshi, Ogasawara Yasuo, Kajiya Fumihiko Progressive hyperfiltration at the early stage of diabetes in a rat The 73st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2009/03/20 Osaka

⑭仲本博、小笠原康夫、梶谷文彦 早期糖尿病ラットにおける過濾過の可視化 (第 48 回日本生体医工学会大会 (東京、4 月 23-25 日) 2009)

⑮ Nakamoto Hiroshi, Ogasawara Yasuo, Kajiya Fumihiko Existence of Hyperfiltration in an Early Diabetic Rat was Visualised by Multiphoton Microscopy (AHA Scientific Sessions (Circulation. 2008;118:S\_337.) NOV. 10, 2008 (New Orleans)

⑯仲本博、小笠原康夫 早期糖尿病の腎糸球体における hyperfiltration の可視化による検討、2008 年 6 月 5 日 第 31 回日本バイオレオロジー学会年会、東京

⑰ Nakamoto Hiroshi, Ogasawara Yasuo, Kajiya Fumihiko In-vivo visualisation of disturbance of glomerular hyperfiltration in an early diabetic rat, 第 51 回日本腎臓学会学術総会、2008 年 6 月 1 日、Fukuoka

⑱仲本博、小笠原康夫 糸球体濾過の分子レベルの蛍光可視化、第 47 回日本生体医工学会大会、2008 年 5 月 8 日、神戸

[その他]

ホームページ

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=303>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲本 博 (NAKAMOTO HIROSHI)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10299183

### (2) 研究分担者

小笠原 康夫 (OGASAWARA YASUO)  
川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10152365

矢田 豊隆 (YADA TOYOTAKA)  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00210279