

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2014
課題番号：23791442
研究課題名(和文)慢性腎臓病を対象とした機能的MRI法の開発

研究課題名(英文)Functional MRI for CKD

研究代表者

井上 勉 (Inoue, Tsutomu)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30406475

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)：心血管病や感染症のリスク因子として、慢性腎臓病(CKD)対策は急務である。CKDは腎実質の虚血と線維化が病態の本質であるが、腎生検以外は評価法が無かった。我々はこれまで脳神経分野で用いられてきたfunctional MRIを応用して腎臓の「機能的画像」を得ようとする試みを開始した。これまでにDiffusion-weighted MRI、blood oxygenation level-dependent MRI、およびarterial spin labeling法によって、腎線維化と虚血の重症度、組織灌流量の評価が可能となった。現在、他の腹部臓器にも応用可能な画像処理ソフトの開発を進めている。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is characterized by tubular atrophy and interstitial fibrosis. These pathological changes are caused by decreased renal oxygenation, which initiates and promotes a fibrotic response. Therefore, an evaluation of the degree of fibrosis/hypoxia and renal blood flow in CKD patients is beneficial for the determination of the prognosis of CKD. For the evaluation of CKD patients in this study, we employed (1) blood oxygen level-dependent magnetic resonance imaging (MRI) for the noninvasive assessment of tissue oxygen bioavailability, (2) diffusion-weighted MRI for the measurement of the apparent diffusion coefficients reflecting the degree of interstitial fibrosis, and (3) arterial spin labeling for the noninvasive measurement of tissue perfusion. We believe that this method will play a significant role in drug development as it can evaluate changes in the physical condition of the kidney prior to changes in serum creatinine and proteinuria.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 虚血 線維化 MRI BOLD DWI ASL

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病の病態

慢性腎臓病とは糖尿病、高血圧、慢性腎炎などで腎機能が低下した状態を指し、維持透析患者の予備軍である。約400万人いると推定され、新たな国民病と言われている。慢性腎臓病の病理像は尿細管萎縮と間質の線維化であり、腎臓は機能しているネフロンを失いながら膠原線維に置換されていく。多くの研究結果から、慢性腎臓病の進行過程は原疾患に因らず、「腎実質の虚血」が慢性炎症巣の形成を介して「尿細管間質の線維化」を生じ、それらが互いに他を助長しながら進行する経過が明らかとなっている。

現在、我々は、慢性炎症巣の形成に関わる各種サイトカインに焦点を当てた研究を進めているが、同時に、これまでの研究成果を臨床に還元する手段を模索していた。「虚血」と「線維化」は、慢性腎臓病進行の2大要因であるが、腎生検以外では正確に評価する手段が無い。しかも、腎生検は通常、腎機能が正常な病初期に、確定診断を得る目的で1度に限って施行されるので、経時的な評価手段にはなり得ない。

(2) 慢性腎臓病を画像評価する

2008年、脳の機能的MRIとして開発されたBOLD (blood oxygenation-level dependent) MRI (magnetic resonance imaging) を用いると、腎髄質尿細管における、利尿薬や輸液負荷後の酸素消費量の一時的な変化を、in vivo に捉えることが可能であるという発表があった。MRIに興味を持ってさらに検索すると、肝硬変の進行stage、つまり肝線維化の過程を、DWI (diffusion-weighted image) で評価可能であるとする複数の報告があった。腎のBOLD MRIで我々が注目したのは、被験者の状態で腎髄質のBOLD signalが大きく変化するのに対し、皮質では一時的な変化に乏しく、むしろ対象となっている腎臓の固有値を示している様にみえる事実である。また、これまでの基礎研究の経験から、腎と肝の線維化過程が共通していることを実感していた。

以上の経過から、MRIの複数の撮像法を組み合わせることで、慢性腎臓病の進行に関わる2大要因、「虚血」と「線維化」を、in vivo、非侵襲的に評価出来るのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 研究の全体構想

腎臓に限らず、腹部実質臓器を対象とした機能的MRI法の開発を最終目標とする。

腎臓に関しては、蛋白尿や血清クレアチンが変化する以前に腎の状態変化を捉える

ことで、日常診療における治療法の決定、および、新規治療法や薬剤の迅速なスクリーニングに寄与する事が目的である。

(2) 本研究課題の目標

本研究では、まず、慢性腎臓病・腎臓を対象とする。慢性腎臓病はあらゆる腎疾患が末期腎不全に至る過程であり、腎実質の虚血尿細管間質の線維化 腎萎縮と進行する。MRIの撮像原理から推察すると、虚血をBOLD MRIで、線維化をDWIで、腎萎縮をconventional MRIのT1強調画像で評価可能である可能性が高い。臨床・検査項目(クレアチニン、蛋白尿、慢性腎臓病の経過、原疾患等)の他、腎生検所見と比較することで、MRIで得られる各パラメータが、腎病理・腎生理学的にどのような要因で構成されるのかを検討する。

3. 研究の方法

当初は大きく3つの研究計画を立てていた。

(1) 慢性腎臓病患者を対象とした各MRI撮像法、評価法の検討

健常ボランティアと腎機能の安定している慢性腎臓病症例を対象に、機能的MRIと考えられる各種撮像法で実際に画像を得て、DICOM閲覧・計測ソフトであるOsiriXを用いて画像を計測する。最初は撮像条件の検討を行い、次に、撮像時点での臨床検査値(推定糸球体濾過量、ヘモグロビン、血清アルブミン、尿蛋白)との関連を検討する横断研究を実施する。更に、数年経過後、腎機能障害の進行速度とMRI計測値の関連を検討する縦断研究も実施する。

(2) 腎生検症例を対象とした、組織免疫染色と尿中バイオマーカーとMRI計測値の相関関係の検討

1) 腎生検を施行した症例に関しては、パラホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋組織を用いた免疫組織染色で、HIF1a(hypoxia-inducible factor-1a:虚血のマーカー)の発現範囲、細胞外基質の沈着範囲、炎症細胞浸潤の程度、線維芽細胞数、間質毛細血管密度、HMGA2 (high mobility group A2:活性化尿細管上皮のマーカー)陽性尿細管数を評価する。加えて、通常の色素染色としてMasson trichrome (MT) stainを行い、膠原線維の沈着範囲を計測する。同時に、未固定凍結組織を用いてカラム精製でtotal RNAを抽出し、半定量的PCR法で、細胞外基質産生量、HIF1a発現量、HMGA2発現量を測定する。

2) 腎生検が施行できない症例に関しては、尿中PIIINP (amino-terminal propeptide of type III procollagen)、および尿中TGF- β (transforming growth factor- β)を測定する。

3) 上記、各計測値を説明変数、MRIの各パラメータを目的変数として多変量解析を

行い、MRI の各パラメータを構成する要素を既知の因子の集合に置き換えることで、その特性を推定する。

(3) 動物実験による、各種腎疾患モデルの進行過程と MRI 計測値の検討

上記、ヒトを対象とした研究が予想通りに進まない場合、動物実験を並行して実施することで、各 MRI 計測値の理論付けを行う。我々は、慢性腎臓病に関するこれまでの研究成果の一環として、複数の腎疾患モデル動物を作成可能である。人間では生検が不可能な、中等度から高度腎機能障害個体の腎組織と、MRI の各パラメータを比較する事が出来れば、その検討結果をヒトに還元することが可能かもしれない。動物撮像用の MRI に関しては他施設との共同研究を予定する。

次項では、実際に研究が遂行された時間経過に沿って研究成果を記載する。一部、研究計画の変更があった箇所に関しては、その理由と新たな研究方法を適宜明記する。

4. 研究成果

(1) 1.5T の MRI を用いた慢性腎臓病患者を対象にした MRI 撮像・評価法の検討【各時点で必要な IRB 申請は適宜実施している】

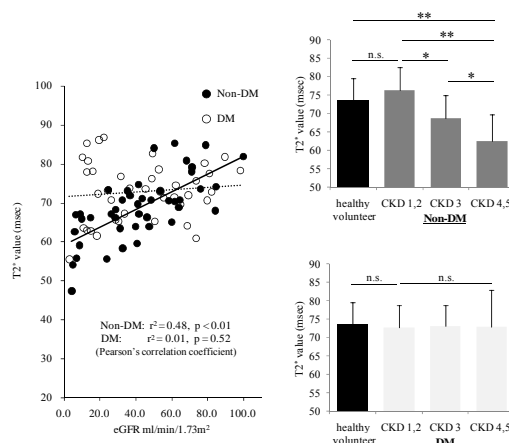
最初に健常ボランティアを対象とした BOLD MRI、DW MRI の撮像を行った。前者は T2* map を、後者は複数の b 値で撮像した画像から ADC map を作成し、OsiriX で ROI を設けて測定、各撮像対象の結果とした。同一被験者を複数回撮像すると、特に髄質の T2* 値は撮像毎にバラツキが大きく、既報にある様に体液量（脱水か非脱水か）を反映している可能性があった。一方、既報中では変化が少なくて注目されていなかった皮質は、撮像毎の変化が少なく、しかも対象者に因らずほぼ同一の値となる事が分かった。計測法に関しては、皮質全体を ROI とする場合、円形の小さな ROI を複数設けて平均する場合、計測者による差違、以上を検討した。結果、どのような方法でも計測値自体の差違は 3% 未満で、機器・撮像に由来する誤差よりも小さかった。慢性腎臓病患者を対象とする場合、皮質の菲薄化や嚢胞形成が予測されるため、計測領域として不適応な箇所を避ける意味で、複数 ROI を設けて平均する方法を採用した。DWI の b 値は脂肪抑制がかかるタイミングの方が計測値の変動が少なかった。また、呼吸同期は必ずしも必須では無い事も確認された。

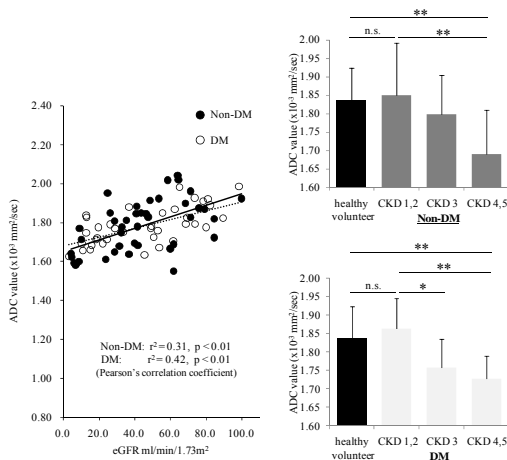
続いて腎機能低下症例の撮像を行った。40 症例弱の撮像が完了したところで MRI 計測値と臨床検査値との関連を検討したが、ADC 値が推定糸球体濾過量と有意な相関を認める一方で、T2* 値に関しては腎機能、蛋白尿、血清アルブミン値、ヘモグロビン値等々、検

討した範囲では臨床検査値との関連が無かった。しかし、推定糸球体濾過量が低下するに従って T2* 値のバラツキが大きくなることは明らかである為、推定糸球体濾過量以外に T2* 値を規定している因子があると考えた。虚血を反映している T2* 値に影響を及ぼす可能性がある病態として糖尿病の有無に注目し、腎機能別に T2* 値を目的変数とする重回帰分析を行うと、腎機能障害が進行した群では、糖尿病の有無が T2* 値に有意な影響を及ぼしていることが判明した。以上の事から、ADC 値に関しては腎生検所見（特に尿細管間質病変）との相関、MAG3 を用いた腎動態シンチによる推定腎血漿流量との相関の検討を計画し、T2* 値に関しては、糖尿病科との共同研究をお願いして、糖尿病腎症症例を幅広くエントリーする事とした。

100 症例以上の検討を経て得た結論は以下の通りである。

- ・皮質の MRI 計測値は、髄質とは事なり、対象者の状況に因らず比較的安定した値をとる。慢性腎臓病の評価に適していると考ええる。
- ・手動的な計測誤差まで含めた MRI 計測値の誤差は 5-10% 程度と推算される。
- ・ADC 値は、推定糸球体濾過量、腎生検で評価した間質線維化面積、MAG3 シンチで測定した推定腎血漿流量、T1 強調画像の腎長径、以上に有意に相関した。撮像原理も加味すると、腎間質線維化の指標として有用である可能性がある。
- ・T2* 値は、非糖尿病腎症では ADC 値と同様の变化をする。つまり、腎機能や腎線維化、腎萎縮程度に有意に相関する。一方で、糖尿病腎症では、有意に相関する臨床パラメータが無い。測定原理を考えると、腎虚血状態を反映している可能性が高いが、糖尿病腎症では未知の因子が腎虚血状態を規定している可能性がある。
- ・ADC 値と T2* 値が乖離する状況としては、上記の糖尿病腎症の他に、原発性ネフローゼ症候群、急性腎障害、腎血管性疾患で明らかであった。





(2) 1.5T MRI の各計測値と臨床経過の検討

研究初年度、腎生検標本における MT stain の青色領域、Periodic acid-Schiff stain における尿細管萎縮程度と間質線維化程度の 5 段階評価、各 MRI 測定値との相関関係、および、MRI 計測値の誤差（同一症例を当日 2 回撮像、同一症例を 1 週間開けて 2 回撮像）を検討したところ、MRI 測定値の誤差が約 5%、上記の中で連続変数となる MT 染色を除く他の検査値との相関は、統計学的に有意であるものの相関係数は小さかった(0.2-0.4 程度)。

本研究費交付以前からエントリーしている症例を含めると、本研究期間内に 3 年以上の臨床経過を追える症例数も増加した。そこで、MRI 計測値と腎機能障害の進行速度、蛋白尿の推移の相関に関して検討した。約 40 症例、3 年間の経過では意味のある相関は認められなかった。毎年データを追加したところ観察期間が 5 年経過した時点で、腎機能悪化速度と観察開始時点の腎機能、蛋白尿量、（該当症例に関しては、腎生検の）尿細管間質病変の程度、MRI の ADC 値、以上の間に統計学的有意な相関が認められた。結局は従来の腎機能予測因子と比較して MRI の優位性は無いという結論になった。

当初、腎生検および尿検体を用いて予定していた各評価因子は、概ね腎線維化の間接的な指標であるので、当初の計画通りでは有益な検討は出来ない（MRI を用いる臨床的意義を十分には証明できない）と判断し、2 つの代替計画を開始した。一つは計画書に織り込み済みの動物実験、もう一つは、当初の計画に無かった静磁場 3.0 テスラの高磁場 MRI を用いた臨床研究とした。研究計画提出時には未定であった同機器の稼働時期が決定し、本研究期間内にヒトを対象とした撮像を開始できる目処が立った事が理由である。

(3) 動物実験による各種腎疾患モデルの進行過程と MRI 計測値の検討

MRI 計測値を構成する病態背景を検討するために、複数のマウスモデルを用いて、各進

行性腎障害の経過と MRI 測定値の変化を検討する計画を立てた。用いたマウスモデルは片側尿管結紮モデル（ヒトの閉塞性腎症に相当）、抗糸球体基底膜抗体腎症モデル（ヒトの急速進行性糸球体腎炎に相当）、腎垂全摘モデル（ヒトの慢性糸球体腎炎あるいは腎硬化症に相当）、アドリアマイシン腎症モデル（ヒトの中毒性腎症あるいは慢性尿細管間質性腎炎に相当）、虚血再灌流モデル（ヒトの急性腎障害後の遷延性腎障害に相当）以上である。

各モデルを作成後に 1 週間毎に腎臓を取り出して病理学的検討を行い、ヒト同様に慢性の尿細管萎縮、間質線維化が十分に生じるまでの期間を決定した。その後、MT 染色、F4/80 免疫染色、fibronectin 免疫染色、Sirius red 染色を行って、腎病変の進行程度を定量的に評価した。線維化・慢性炎症に関わる因子に関しては定量的 RT-PCR（SYBR green を用いた real time PCR）を行い mRNA 発現量も検討している。主な因子は collagen type 1、fibronectin、TGF- β 、PAI(plasminogen activator inhibitor)-1、HMG2 等であり、ヒトでの検討を予定していた項目と同様である。本研究を通して得られた成果は、当研究室で同時に進行している基礎系研究課題の遂行にも大きく寄与した。各種抗原賦活化法の比較検討や、恒温槽を用いた抗原・抗体反応の促進法など、当研究室の実験手法の改善は明らかであった。

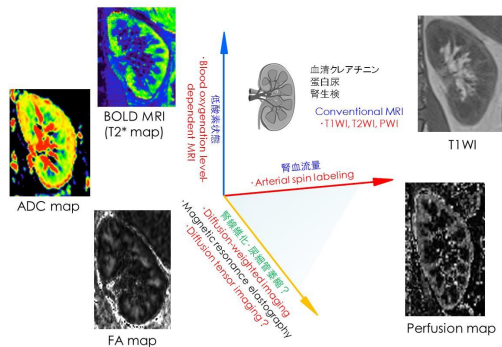
上記の検討を経て、複数のマウス進行性腎障害モデルにおける病変の経時的変化を詳細に分析可能となった。マウスの機能的 MRI の撮像には 7.0 テスラ MRI を用いる必要があり学内には設置が無い為、現在も共同研究先を交渉中となっている。

(4) 3.0T の MRI を用いた慢性腎臓病患者を対象にした MRI 撮像・評価法の検討【各時点で必要な IRB 申請は適宜実施している】

静磁場 3.0T の MRI 装置を用いて、従来から形態評価に用いられている T1 強調画像、T2 強調画像に加えて、機能的 MRI と考えられる BOLD MRI、DW MRI のシーケンスを 1.5T から移行した。加えて、DTI(diffusion tensor image) の FA (fractional anisotropy) 値、ASL (arterial spin labeling) による組織灌流量の測定も組み込み、腎の内部構造、酸素分圧・虚血程度、線維化の進行具合に加えて、尿細管・細血管微細構造の変性程度、組織重量当たりの灌流量の評価を同時に行う事を目標とした。

1.5T MRI 装置による評価では、ADC 値が腎生検標本の間質線維化・尿細管萎縮程度、糸球体濾過量に有意に相関していたが、3.0T に移行後は相関が弱くなった。原因として b 値の設定に変更が必要な事が判明した。【ASL を

施行する事にしたため、より純粋に拡散を反映する b 値に変更した事が一因である可能性がある。しかし 1.5T MRI での検討では、早期 b 値も後期（概ね 1000ms まで）も、同等に糸球体濾過量を反映していた。3.0T で結果が異なる理由は不明である。】拡散強調画像系では、ADC 値の他に、DTI での FA 値の測定を目標としているため、現在も約 30 症例毎に放射線科との協議を行い、適切な撮像条件の検討を常に行っている。

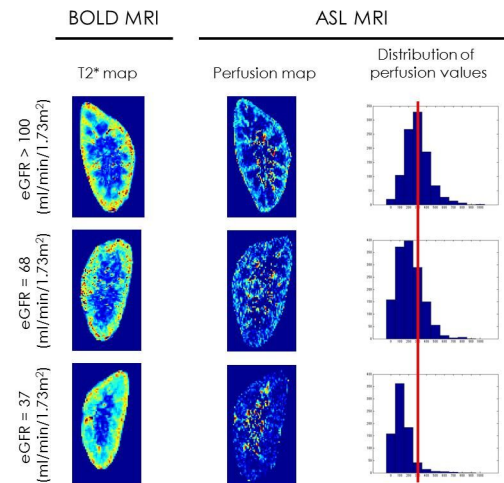


脳神経学分野では、MRI コンソール上で作成されたデータから機能解析を行うためのソフトウェアが複数存在するが、腎の機能的 MRI に関しては同様のソフトウェアが無い。2014 年度から当大学の保健医療学部の研究者に共同研究をお願いして、MATLAB（数値演算コンピュータ言語）を基礎とした画像解析ソフトの開発に着手している。現在、GUI（graphical user interface）を備えた beta 版を使用しているが、データ処理には未だに多くの問題点がある。他施設で腎の機能的 MRI を導入する際のハードルを下げる為にも、汎用性があり容易に操作できるソフトウェアの開発を続けている。現在はコマンド入力によって画像演算を実施しているが、演算結果として得られる perfusion map は、皮質灌流量が多い事を反映して、造影 CT や造影 MRI に類似する画像が得られる。しかも、腎機能の低下に伴い皮質灌流量は急速に低下し、同時に T2* で推測される組織酸素分圧も低下する様子が、画像として描写可能となっている。本法を用いれば、造影剤を使用せず、位置情報を備えた組織灌流量の変化を可視化する事ができる。

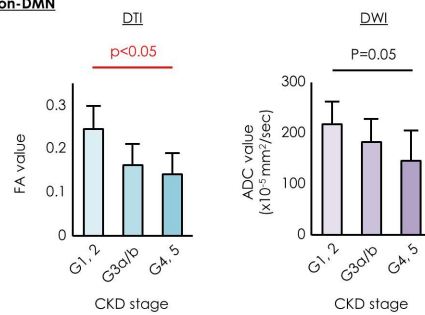
現在までのところ、得られた結論は以下の通りである。

- ・ASL で腎灌流量の評価が可能。腎機能の低下に伴い減少する。同時に T2* も低下し、組織酸素分圧の低下が生じている可能性がある。
- ・DWI の ADC 値は腎機能の低下に伴い低下する傾向があった。間質線維化の進行を反映している可能性がある。

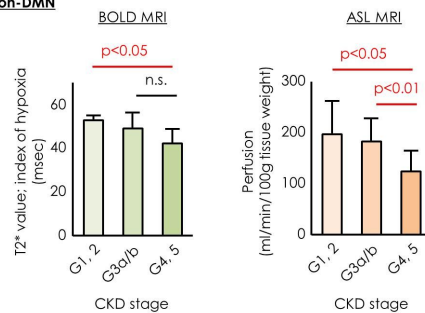
・DTI の FA 値は腎機能の低下に伴い有意に低下した。腎の尿管・細血管微細構造の変性程度を反映している可能性がある。



Non-DMN



Non-DMN



腎の機能的 MRI と考えられる複数の撮像法で、非侵襲的、非造影に慢性腎臓病の病態変化を捉えることが可能であり、本研究計画書提出時点の研究目標は、概ね達成することができたと自己評価している。今後は、各 MRI 計測値の理論的背景の検討、臨床検査としての意義の検討、即ち、腎機能予後の関連や治療介入による変化の検討、多施設での施行、それに必要なハード、ソフト両面の標準化、等を具体的な研究目標と位置づけ、慢性腎臓病の臨床と治療の発展・開発に寄与し

たいと考えている。

研究機器やソフトウェアの年次更新にも研究費が必要であり、今後も継続的な御支援をお願いしたい。

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10件)

Inoue T. 他3名 Morphological and functional evaluation of chronic kidney disease using magnetic resonance imaging World J Clin Urol 2014 Nov 24; 3(3): 325-329 doi: 10.5410/wjcu.v3.i3.325. 査読有

井上勉、他3名 【慢性低酸素状態の腎臓】MRIによる低酸素の画像診断 医学のあゆみ 244 巻4号 Page309-314(2013.01) 査読無

小澤栄人、井上勉、他1名 3テスラ磁気共鳴装置を用いたテンソル画像による糖尿病性腎症の早期診断の研究 埼玉医科大学雑誌 40 巻1号 Page16-18(2013.08) 査読無

井上勉、他2名 【最近の腎尿路画像検査】ファンクショナルMRI 腎臓 36 巻1号 Page22-28(2013.06) 査読無

井上勉、他3名 【腎臓病の up to date-病態に基づいた治療の最前線-】腎臓病の病態 画像診断 カレントセラピー31 巻6号 Page587-592(2013.06) 査読無

Inoue T. 他3名 Is there no future for renal BOLD-MRI? Kidney Int. 2012 Oct; 82(8): 934; doi: 10.1038/ki.2012.282. 査読有

井上勉、他2名 Basic nephrology 検査・診断 腎機能の可視化 Annual Review 腎臓 2012 巻 Page93-99(2012.01) 査読無

井上勉、他3名 【慢性腎臓病 CKD の新たなパラダイムを求めて】CKD の診断と評価 CKD の画像診断 新たな試み 内科 107 巻2号 Page214-217(2011.02) 査読無

井上勉、他4名 BOLD MRI を用いた腎機能評価法の確立 埼玉医科大学雑誌 38 巻1号 Page39-44(2011.08) 査読無

Inoue T. 他10名 Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. J Am Soc Nephrol. 2011 Aug; 22(8): 1429-34. doi: 10.1681/ASN.2010111143. 査読有

[学会発表](計8件)

井上勉、他8名 3テスラMRIによるASL(arterial spin labeling)を用いた腎灌流量の評価 第112回日本内科学会講演会 2015年4月10-12日 みやこメッセ(京都)

岡田浩一、井上勉、他1名 機能的イメージングの腎疾患病態解明、臨床への応用 Functional-MRI を用いた腎線維化と虚血の非侵襲的評価 第57回日本腎臓学会学術総会 2014年7月4-6日 パシフィコ横浜(横浜)

Kozawa E, Inoue T. 他3名 Oxygen Level-Dependent (BOLD) MRI of Diabetic Nephropathy, 20th ISMRM 2012年5月5-11日メルボルン(オーストラリア)

井上勉、他3名 画像診断による予後予測 Radiologic-pathologic correlation から Radiologic-prognostic correlation へ MRIによる非侵襲的CKD評価の試み 第71回日本医学放射線学会総会 2012年4月13-15日パシフィコ横浜(横浜)

井上勉、他4名 ここまで見える 腎疾患イメージングの最前線 MRI を用いた非侵襲的CKD評価の試み 第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月15-17日 パシフィコ横浜(横浜)

小澤栄人、井上勉、他4名 腎臓における Apparent diffusion coefficient (ADC) および T2* 値の反復性および再現性の検討 第39回日本磁気共鳴医学会大会 2011年9月29日-10月1日 リーガロイヤルホテル小倉(北九州)

Inoue T. 他4名 Non-Invasive Evaluation of Kidney Hypoxia and Fibrosis Using MRI, American Society of Nephrology Renal Week 2011年11月8-13日 フィラデルフィア(アメリカ)

Kozawa E, Inoue T. 他5名 Functional MR Imaging of Kidneys, 97th RSNA 2011年11月27日-12月3日 シカゴ(アメリカ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 勉 (INOUE, Tsutomu)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30406475