

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670425

研究課題名(和文)有機ルミネッセンスを用いた in vivo の体内臓器酸素化評価方法の開発

研究課題名(英文)Development of the methodology to evaluate oxygenation of organs in vivo utilizing organic luminescence

研究代表者

南学 正臣(Nangaku, Masaomi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90311620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの臓器の酸素分圧の評価方法は、臓器を流れる血液の酸素分圧を測定しており、細胞内の酸素分圧を測定する方法はなかった。我々は、脂溶性の高いりん光プローブを用い、このりん光プローブが全身投与で速やかに腎臓の尿細管の細胞内に取り込まれることを利用し、取り込まれたプローブの半減期の測定により正確に細胞内の酸素分圧を測定する方法を開発し、様々な疾患モデルにおける腎臓の尿細管内酸素分圧の変化を証明した。腎臓の低酸素状態は慢性腎臓病進行の最終共通経路であり、本方法は新規腎臓病治療薬の開発において有用なツールとなる。

研究成果の概要(英文)：Previous methods to evaluate oxygenation of organs measured oxygen tensions in the blood stream of organs, and no method could evaluate intracellular oxygenation. We employed the lipophilic phosphofluorescence probe, which is quickly taken up by tubular cells in the kidney. Utilizing this probe, we established the method to measure intracellular oxygen tensions accurately by calculating half-life of the probe. This method allowed us to prove changes of intracellular oxygen tensions of tubular cells in a variety of disease models. Hypoxia is the final common pathway of chronic kidney disease, and this method will serve as a powerful tool to develop novel drugs against kidney disease.

研究分野：酸素生物学

キーワード：低酸素 腎臓 りん光プローブ

1. 研究開始当初の背景

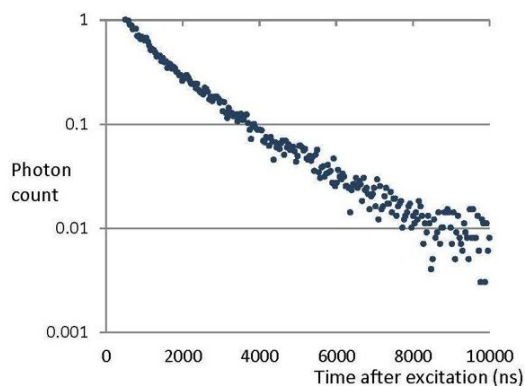
低酸素は、慢性腎臓病をはじめとする様々な病態で中心的な役割を果たしている。しかしながら、臓器の酸素化を測定する方法はすべて臓器の血流内の酸素分圧を測定しており、細胞内の酸素分圧を測定する方法は存在しなかった。細胞内の酸素分圧を生体内で測定する方法がないことは、低酸素の病因論的研究と低酸素をターゲットとした新規治療法の開発に大きな妨げとなっている。

2. 研究の目的

本研究は、これまで確立していない生体内での体内臓器の酸素化の評価方法を確立することを目指したものである。

3. 研究の方法

イリジウム錯体修飾物による有機ルミネセンスプローブ BTPDM1 を利用し、その発光を検出し、半減期を計算することで、酸素分圧を算出する方法を開発した。実験は、培養尿細管細胞 HK2 およびマウスを用いて行なった。測定には Quantaurus Tau (浜松ホトニクス) を用いた。

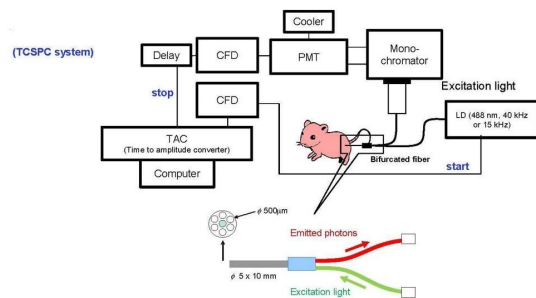


4. 研究成果

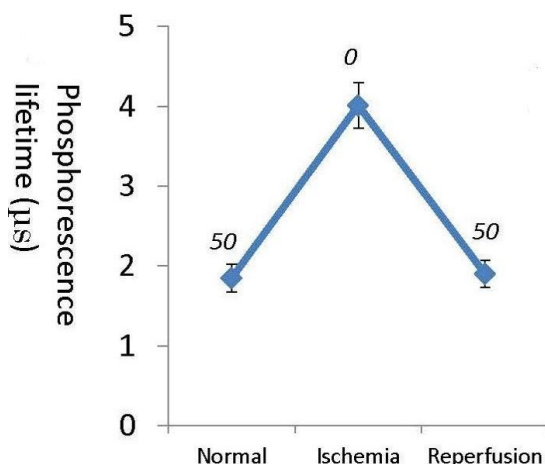
有機ルミネセンスプローブ BTPDM1 は、陽性荷電で脂溶性であり、細胞内に取

り込まれ、酸素濃度に依存してリン光の強度と寿命が変化することを確認した。培養尿細管細胞 HK-2 を用いて、培養機の酸素分圧を変化させ(1% ~ 20%)、細胞内酸素分圧とリン光寿命の関係を明らかにした。また、発光の半減期は、培地の pH などによる影響を受けず、純粋に酸素分圧依存性であることが確認された。実験では、培養の温度や加えるプローブの量も変化させ、正確な細胞内酸素分圧の評価を可能にした。

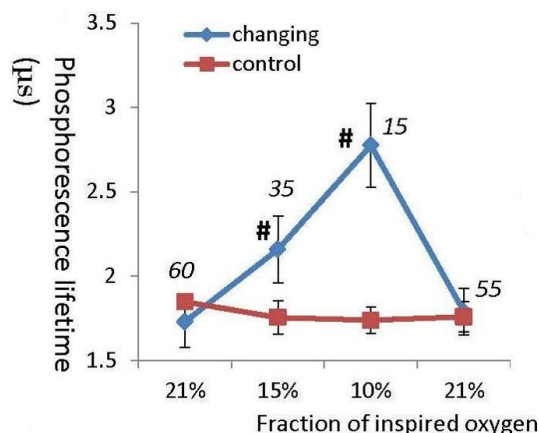
更に、有機ルミネセンスプローブ BTPDM1 による生体内臓器の酸素分圧測定方法の確立を行なった。有機ルミネセンスプローブ BTPDM1 を静脈内投与したマウスを全身麻酔して動きを抑制し、測定を行なった。測定に際しては、腎臓を測定臓器として選んだ。リン光は飛距離が限定的であるため、開腹して測定機器を腎臓表面に近づけることが必要であった。本方法で腎臓の発光を評価することで、腎臓の細胞内酸素分圧を推定することが可能であることを確認した。



組織レベルでは、有機ルミネセンスプローブは尿細管細胞に取り込まれており、生きているマウスの腎臓のリン光を評価することで、腎臓の尿細管細胞内酸素分圧の評価が可能であることが分かった。プローブについては、投与後 30 分は体内の挙動が安定であった。更に、虚血再還流急性腎不全モデルで腎動脈をクランプすると腎臓の酸素分圧がゼロになり、クランプをリリースすると酸素分圧が正常化すること、



動物の吸入する酸素分圧を変化させることにより吸入気の酸素分圧依存性に腎臓の酸素化が低下すること、



貧血により臓器への酸素供給を減少させると腎臓の酸素分圧も低下すること、2型糖尿病性腎症モデル動物の腎臓で酸素分圧が低下していること、強度の虚血再還流後に長期にフォローアップする腎臓の線維化モデルを用いた線維化した腎臓で尿細管毛細血管の脱落と同時に酸素分圧の低下がみられることを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hirakawa Y, Yoshihara T, Kamiya M, Mimura I, Fujikura D, Masuda T, Kikuchi R, Takahashi I, Urano Y, Tobita S, Nangaku M. Quantitating intracellular oxygen tension in vivo by phosphorescence lifetime measurement.

Sci Rep 5, 17838, 2015

〔学会発表〕(計4件)

Keystone Symposia: Diabetes: New insights into molecular mechanisms and therapeutic strategies 2015.10.26

Hirakawa Y, Mimura I, Yoshihara T, Kamiya M, Tanaka S, Tanaka T, Inagi R, Urano Y, Tobita S, Nangaku M. Estimation of intracellular oxygen concentration in diabetic kidney by phosphorescence lifetime measurement.

第49回アメリカ腎臓学会 2015.11.6

Masaomi Nangaku. Oxidative Stress and Kidney Injury.

第49回アメリカ腎臓学会 2015.11.7

Yosuke Hirakawa, Imari Mimura, Toshitada Yoshihara, Mako Kamiya, Yasuteru Urano, Seiji Tobita, Masaomi Nangaku. Quantitating Intracellular Oxygen Tension in Kidney by Phosphorescence Lifetime Measurement.

第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 2015.12.4

平川陽亮、吉原利忠、神谷真子、三村維真理、田中真司、田中哲洋、浦野泰照、飛田成史、南学正臣

りん光寿命測定を用いた腎臓尿細管細胞内分圧の測定

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

研究代表者

南学 正臣 (NANGAKU, Masaomi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号 : 90311620