

第5回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞講演

# りん光寿命顕微法による腎皮質低酸素の正確な描出

Intravital phosphorescence lifetime imaging of the renal cortex accurately measures renal hypoxia

平川 陽亮

Yosuke HIRAKAWA

## 慢性腎臓病研究における低酸素検出法開発の意義

慢性腎臓病は、その進行により腎臓低酸素を誘発し、また腎臓低酸素は慢性腎臓病の進行を促進する<sup>1,2)</sup>。特に近年、慢性腎臓病においては、低酸素の存在に比して相対的に低酸素に対する細胞応答が不十分であるという報告があり、このため低酸素と、低酸素に対する細胞応答を区別して計測する必要があることが認識され始めた<sup>3,4)</sup>。低酸素の計測については、その検出方法は複数存在しているものの、腎臓領域のみならず悪性腫瘍などの他領域も含めて、新たな手法の必要性が叫ばれてきた。既存の低酸素検出法には、生体内の酸素検出法としては、微小電極などの酸化還元反応を利用したもの、blood oxygen level dependent MRI (BOLD-MRI) など酸素とヘモグロビンの結合を利用したもの、低酸素応答因子の水酸化など酸素分子を酵素反応の基質として用いる反応の観測などがあげられるが、これらの手法は測定対象や空間解像度に問題があり、慢性腎臓病における低酸素の出現・進展メカニズムを精緻に描出するには新たな手法の開発が必要である。

## りん光の原理とりん光寿命測定を用いた酸素分圧測定

本研究では、りん光に着目し酸素状態の定量化を行った。りん光は、近年では工業的には有機 EL (electro-lumi-

nescence)などに用いられている<sup>5)</sup>。りん光は、三重項励起状態から発する発光現象と定義され、類似した発光現象に蛍光がある。その詳細を図1に示す。

蛍光物質およびりん光物質は、励起光などによる刺激で一重項励起状態に移行する。一重項励起状態から発せられる光を蛍光と呼称する。一部の分子は一重項励起状態から三重項励起状態に移行することができ、三重項励起状態から発せられる光がりん光と定義される。三重項励起状態の分子は、りん光を発する以外に、酸素分子の衝突によりそ

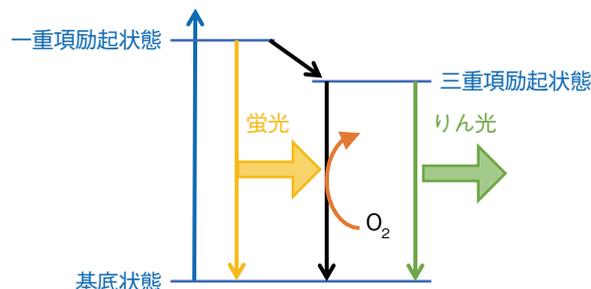


図1 蛍光とりん光

基底状態の分子は、励起エネルギーにより一重項励起状態に移行し、一重項励起状態から蛍光を発し基底状態に戻ることができる。一部の物質は、一重項励起状態から三重項励起状態に移行することができ、この三重項励起状態の分子はりん光を発するほか、酸素分子の衝突によりその基底状態に戻ることができる。このため、りん光の強度・寿命は酸素分子の濃度に依存し変化する。

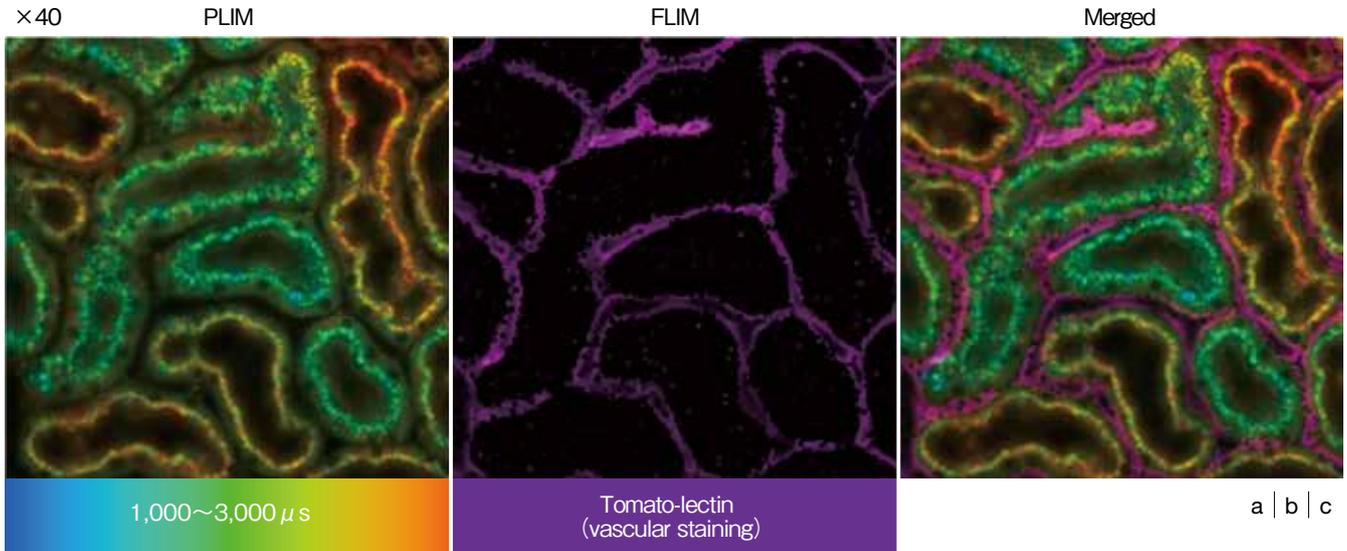


図2 腎表面におけるりん光イメージング顕微法画像

BTPDM1 を用いたりん光イメージング画像(a), *Lycopersicon esculentum* (Tomato) lectin を用いた血管標識画像(b), および結合画像(c)。腎表面から 10 μm 程度の深さの部位を撮影している。りん光寿命の長い(= 低酸素の)尿細管と、りん光寿命の短い(= 高酸素の)尿細管が存在することがわかる。

PLIM : phosphorescence lifetime imaging microscopy, FLIM : fluorescence lifetime imaging microscopy

の励起エネルギーを酸素分子に譲与して基底状態に戻ることができる。りん光の寿命はすなわち三重項励起状態の分子の寿命と考えるとよいが、酸素が多いほど三重項励起状態の分子に酸素分子が衝突し、その励起エネルギーを失わせるため、りん光寿命は酸素が多いほど短縮する<sup>6)</sup>。また、一般に光の強度はその寿命に比例するため、寿命のみでなくりん光強度も酸素濃度と逆相関する。このため、りん光強度を用いて酸素状態を推定することも可能である。本研究においてはマウス腎臓を対象にするため、りん光寿命測定は特殊な機器を必要とする一方、色素の濃度に依存しない結果を示すため、生体内での色素濃度が一定でないことを考慮し、りん光寿命を測定することで腎臓の酸素状態を評価することとした。

本研究では、りん光色素として BTPDM1 を使用した。このりん光色素は群馬大学大学院理工学府にて開発された色素であり、これまでに悪性腫瘍の低酸素イメージングに活用され、また腎臓への分布が多いことが証明されていたものである<sup>7,8)</sup>。BTPDM1 はマウスに対して全身投与すると、腎臓においては尿細管によく分布していた。このため、腎表面から観測されるりん光は尿細管の酸素分圧を反映していると考えられ、この手法を用いることで腎の低酸素の定量的評価が必要となった。しかしこの手法は、定量性には優れているものの解像度を有しておらず、腎臓の低酸素に

ついて新たな知見を得るには不十分であった<sup>9)</sup>。

### 腎臓におけるりん光寿命イメージング顕微法

前述の問題点を解決すべく、BTPDM1 投与後の腎臓において、りん光寿命イメージング顕微法 (phosphorescence lifetime imaging microscopy : PLIM) を行う手法を開発した。りん光は蛍光と類似する発光現象であるため、基本的には蛍光寿命イメージング顕微法 (fluorescence lifetime imaging microscopy : FLIM) と同様ではあるが、一般的にりん光は蛍光と比して寿命が著しく長く、本研究においても腎臓の自家蛍光を含めた蛍光はナノ秒オーダーであったのに対して、BTPDM1 のりん光寿命はマイクロ秒オーダーである。したがって、1枚の PLIM 画像を取得するには1分程度の時間が必要であり、その間マウスの呼吸、心拍、体動の影響を受けない撮影法を開発することが必要であった。倒立顕微鏡とスライドグラスチャンバーを用いた撮影を行うことでこの問題を解決し、BTPDM1 を用いたりん光寿命イメージング画像を取得した結果が図2である<sup>10)</sup>。

驚くべきことに、尿細管(腎表面から 10 μm という深度を考慮するとすべて近位尿細管と考えられる)においては、りん光寿命の短い1群と、長い1群が存在する、すなわち酸素分圧により近位尿細管が2群に分けられることが明らか

かになった。次に、この酸素分圧の異なる2群の特性を確認するため、糸球体から濾過され排泄される色素を追跡したところ、まず、りん光寿命の短い尿細管を通過し、その後りん光寿命の長い尿細管を通過することが明らかになった。尿中色素の通過の順にS1セグメント、S2セグメントであると解釈でき、また、培養細胞を用いてりん光寿命と酸素分圧の検量線を作成し、生体での結果に外挿することで、S1セグメントの酸素分圧は51 mmHg、S2セグメントの酸素分圧は41 mmHgと換算された。これらの結果は、針電極法を用いた過去の腎皮質の酸素分圧測定結果と乖離はみられず、妥当と解釈できる<sup>11,12)</sup>。

### 課題と今後の展望

本研究は腎臓における特殊な酸素勾配を示すことができた一方、さまざまな今後の課題を有している。慢性腎臓病の研究としては、疾患により酸素勾配がどのように変化するかを描出する必要があるが、BTPDM1がアルブミン結合性を有するため、アルブミン尿を呈するモデルでは尿細管細胞を精密に描出することができず、本法では酸素分圧を推定することができない。また、S1セグメントとS2セグメントの酸素分圧の差異のメカニズムについても今後解明が必要であり、その詳細解明のためにわれわれは、血管内分布性りん光色素の開発を行っている。さらに、生体内の腎臓で酸素勾配が存在することが、今回初めて確認された。肝臓などでは組織内に酸素勾配が存在することが知られているが、この酸素勾配が低酸素応答にどのように関与するかも今後証明すべき課題であると考えられる。

### 謝辞

本研究においては、東京大学大学院医学系研究科 腎臓内科学の南学正臣教授のご指導がその遂行に不可欠で、ここに謝辞を述べる。また、共同研究者である東京大学大学院医学系研究科 浦野泰照氏、神谷真子氏ならびに群馬大学大学院理工学府 飛田成史氏、吉原利忠氏、水上輝市氏に改めて謝意を示す。

また、本研究はJSPS 科研費 17K16070 および 19K17697 の助成を受けている。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

### 文献

1. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 17 : 17–25. doi: 10.1681/asn.2005070757
2. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Renal hypoxia in CKD ; pathophysiology and detecting methods. *Front Physiol* 2017 ; 8 : 99. doi: 10.3389/fphys.2017.00099
3. Song YR, et al. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2010 ; 25 : 77–85. doi: 10.1093/ndt/gfp454
4. Futatsugi K, et al. Obesity-induced kidney injury is attenuated by amelioration of aberrant PHD2 activation in proximal tubules. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 36533. doi: 10.1038/srep36533
5. Kimura K, et al. Selective triplet exciton formation in a single molecule. *Nature* 2019 ; 570 : 210–213. doi: 10.1038/s41586-019-1284-2
6. Rumsey WL, Vanderkooi JM, Wilson DF. Imaging of phosphorescence: a novel method for measuring oxygen distribution in perfused tissue. *Science* 1988 ; 241 : 1649–1651.
7. Zhang S, et al. Phosphorescent light-emitting iridium complexes serve as a hypoxia-sensing probe for tumor imaging in living animals. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 4490–4498. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-3948
8. Yoshihara T, et al. Intracellular and *in vivo* oxygen sensing using phosphorescent Ir(III) complexes with a modified acetylacetonato ligand. *Anal Chem* 2015 ; 87 : 2710–2717. doi: 10.1021/ac5040067
9. Hirakawa Y, et al. Quantitating intracellular oxygen tension *in vivo* by phosphorescence lifetime measurement. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 17838. doi: 10.1038/srep17838
10. Hirakawa Y, et al. Intravital phosphorescence lifetime imaging of the renal cortex accurately measures renal hypoxia. *Kidney Int* 2018 ; 93 : 1483–1489. doi: 10.1016/j.kint.2018.01.015
11. Ow CP, Abdelkader A, Hilliard LM, Phillips JK, Evans RG. Determinants of renal tissue hypoxia in a rat model of polycystic kidney disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014 ; 307 : R1207–1215. doi: 10.1152/ajpregu.00202.2014
12. Nordquist L, et al. Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 26 : 328–338. doi: 10.1681/asn.2013090990