

第5回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

大島賞受賞講演

生体イメージングを活用した腎病態生理機構の解明

Investigating an unknown renal pathophysiology by using multiphoton intravital imaging

中野 大介

Daisuke NAKANO

はじめに

生体イメージングは臨床応用されているMRIやPETなど、全身や標的臓器の描出を目的としたものから、レーザー顕微鏡に代表される細胞内構造にまで焦点を合わせたものまで幅広い応用がなされている。腎臓における生体イメージングは半世紀以上に端を発し、フィルムカメラのフィルム送りを高速にすることで可視光観察における腎イメージングが実現されていた¹⁾。

筆者の所属するグループは、腎臓における腎実質の三次元的関係や血流との関係をみる目的で、CCD付き蛍光顕微鏡による腎生体イメージングを2000年当初より導入した。アンジオテンシンIIやカルシウム拮抗薬など種々薬物の腎薬理効果を描出し、傍尿細管毛細血管における血流に対する作用を報告している²⁾。大島賞受賞に至った一連の研究は、2光子レーザー顕微鏡を用いて行われた。2光子レーザー顕微鏡は1990年に開発され、2000年頃から生きた小動物に対する応用が報告され始めた。腎臓における応用の先駆者はIndiana University School of MedicineのBruce Molitorisを中心としたグループであり、2002年にAmerican Journal of Physiology誌に発表している³⁾。その後、University of Southern CaliforniaのJanos Peti-Peterdiラボとの2大拠点により実験方法として成熟していった。筆者は2006～2008年の留学中(David Pollock ラボ, Medical College of Georgia)に、Peti-Peterdi先生と既知であったため、彼の研究室にて2光子レーザー顕微鏡を用いた生体腎イメージングの実験法を学んだ(2010年に6カ月間滞在)。

香川大学医学部薬理学

生体腎イメージングによる糸球体濾過バリアー解析

初めにPeti-Peterdiラボで取り組んだプロジェクトは、腎内レニン・アンジオテンシン系(RAS)マーカーとしてのアンジオテンシノーゲン(AGT)に関する取り組みであった。AGTは肝臓で産生され血中に常に存在するたんぱく質であるが、香川大学薬理学講座およびTulane大学の共同研究グループでは、腎臓で*de novo*合成されるAGTが腎内局所でのRAS活性を反映し、これは尿中AGT量にて測定できることを提唱してきた。

折りしも、2光子レーザー顕微鏡による腎糸球体濾過バリアー観察が熱を帯びている時代であり、「血中アルブミン(66kDa)とAGT(59kDa)には、糸球体濾過バリアー通過率に差はあるか」とのテーマで研究を行った。糸球体が腎表面に存在する特殊ラット(Munich Wistar Fromter ラット)を用いて、蛍光ラベル化した各たんぱく質の通過率を計測した結果、AGTはアルブミンに比べて糸球体を通過しにくいという結果が得られた⁴⁾。臨床検体において、尿中AGTは尿中アルブミンと同時期に出現し、尿細管たんぱく質取り込み障害が存在している状態でも、その尿/血濃度比はAGTのほうが有意に高いこと⁵⁾、腎臓あるいは肝臓におけるAGT-KOマウスでは、腎臓のKOにより尿中AGTが減少したことから、腎臓におけるAGT産生と尿中排泄の存在が確認された。

生体腎イメージングによる急性腎障害解析

帰国後、2光子レーザー顕微鏡にて捉えられるダイナミックな像が強みを発揮する研究領域について、しばらく

表 使用している2光子レーザー顕微鏡システムの性能

| | |
|-----------|---|
| メーカー | Olympus, FV-1000MPE |
| レーザー | Coherent, Chameleon Ultra-II MP laser |
| 使用する励起光波長 | 特徴 |
| 720 nm | NADH 自家蛍光による細胞形態観察 |
| 860 nm | 「赤」や「緑」蛍光色素の観察 レーザーパワーも強い(約 2.5W)深部観察 (腎臓で約 50 μm)が可能 |

探索する日々が続いた(表に顕微鏡機種などを記す)。さまざまな病態を観察した結果選択した病態が急性腎障害(AKI)であった。ラットにおける虚血再灌流などの手技は大阪薬科大学での学生時代に習得しており、マウスも香川大学腎臓内科との共同研究にてモデルとして確立していたため⁶⁾、顕微鏡実験への応用も障害は少なかった。当初は、虚血再灌流障害などにおいてみられる細胞死を観察し、tubular cell sloughing や tubular cell migration, cast formationなどを捉えることに成功した⁷⁾。しかし、これらは既存の仮説の範疇をはずし、2光子レーザー顕微鏡を使用して、何か新規のものは捉えられないかとさらに観察の継続を決意した。

そのような折り、Indiana University School of Medicineにて同じ顕微鏡を用いていた波戸岳博士らが、リポポリサッカライド(LPS)を蛍光ラベル化させてマウスに投与すると近位尿細管に蓄積するという報告をされた⁸⁾。これに強い興味を持ち、早速LPSを蛍光標識してマウスに投与したところ、見事な再現性が得られた。ここで不思議に感じたことは、LPS投与初期(~6時間)のLPS蓄積尿細管において、管腔構造がはっきりと保たれていた点である。糸球体血流低下に伴うGFRの低下は管腔容積を減少させるはずである(事実、LPSモデルも24時間から72時間までは管腔が劇的に狭窄していた)。この時点ですでに乏尿が生じていることは確認していた。「管腔構造が保たれており(GFRはある)、かつ乏尿が生じている」事実に対して、尿の流れを追うことを決断した。糸球体を自由に通過する蛍光色素(Inulin-FITCやLucifer yellow)をbolus投与すると、近位尿細管において尿が滞留するような像が得られた⁹⁾。2光子レーザー顕微鏡による高時間解像度の動画では、近位尿細管に流れてくる速度と、そこから流出する速度を推算することが可能である(図)。綿密に調べると、LPS投与6時間の時点ではGFRに有意な変化はなく、正常レベルで保

たれていた。しかし、近位尿細管内において劇的に尿流速が減少していることがわかった。近位尿細管に流れてきた原尿が下流ネフロンに流れなかった場合の原尿の行き先はどこか。尿細管構造を透過して間質・毛細血管へと回収される可能性しか考えられない。PubMedでLPSの水・電解質再吸収に与える影響について丁寧に検索をかけたが、出てくる論文はいずれも「LPSは近位尿細管再吸収に対して無効あるいは抑制」であり、生体イメージングにおいて確認された現象を説明してくれるものではなかった。細胞内を介した再吸収の可能性が薄いとなると、残るは細胞の外、すなわち細胞と細胞の間を通過する経路が残される。現在、この経路を介した乏尿メカニズムについて解析を続けている。

また、AKI時の治療効果についても生体イメージングを活用した。心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)は、経験的にAKIに対して使われているが、その薬理作用も含めて不明な点が多く残されていた。前述の新たに発見された乏尿メカニズムに対するANPの作用を検討したところ、LPSを投与した内毒素症ラットにおいて、ANPは血圧に影響を与えない用量で十分に尿量を回復できることが示された¹⁰⁾。輸液蘇生(6 mL/時間)単独とANP併用との比較により、ANPは腎臓内の輸液抵抗性尿細管の数を減らすことがわかった。また、内因性のANPは血管内皮細胞に働きGFRを維持する方向に、外因性の(薬物としての)ANPは尿細管における尿流速減少を抑制する方向に働くことが明らかとなった。

一方で、ANPが治療効果を示すのは、LPS投与初期の血圧がある程度保持されている間のみであり、ショックのような全身血圧が劇的に低下した状態においては、全く治療効果がみられないこともわかった。同様のことが臨床でも起きているのであれば、ANPに対するエビデンスが一致しきれない原因の一つとも考えられる。

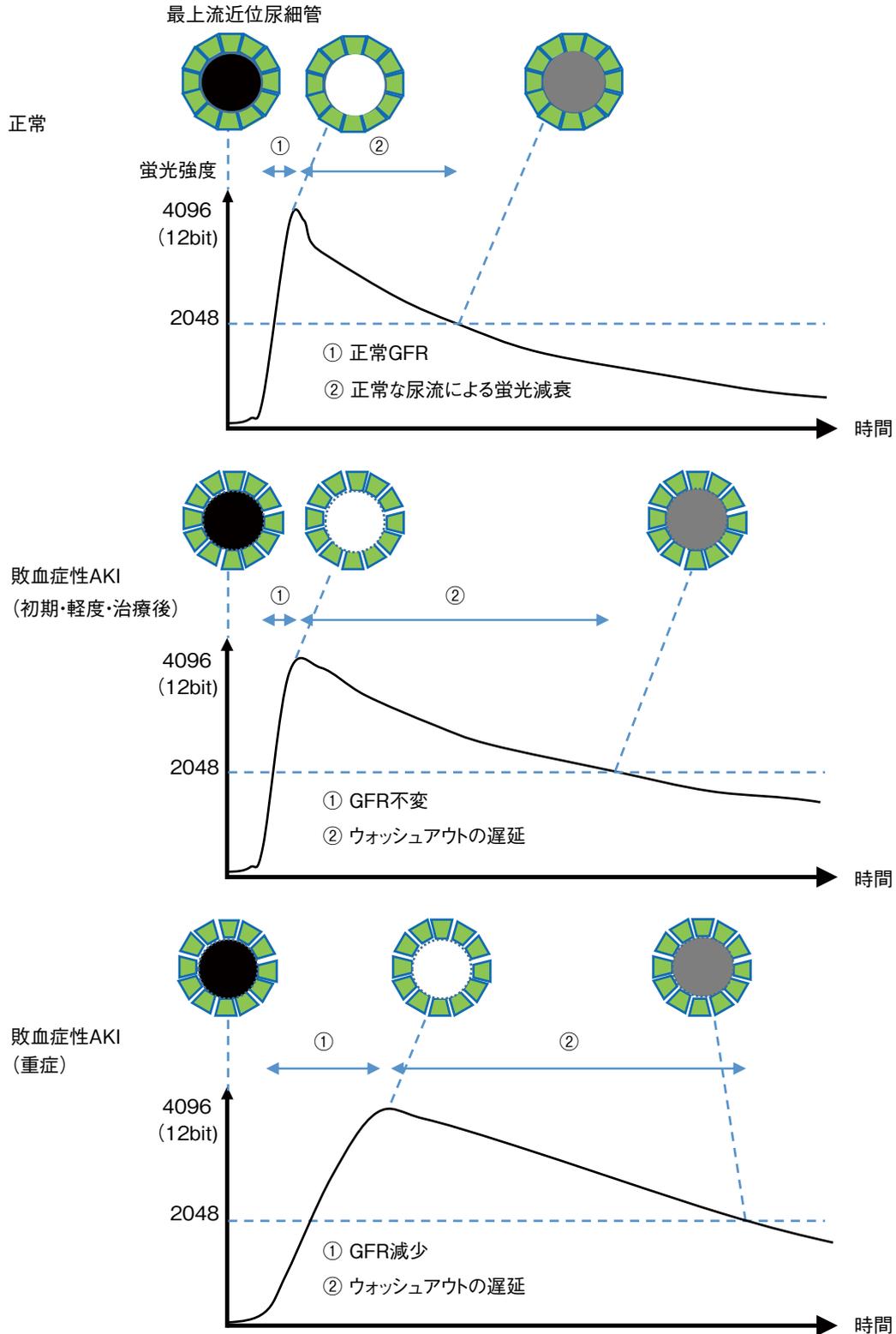


図 近位尿細管最上流部に流れ込む FITC 結合イヌリンの蛍光強度変化を捉えることで計測できる、糸球体濾過と近位尿細管から下流へのウォッシュアウト

① 流入時間：蛍光色素流入からピークまでの時間で、GFR と逆相関する。

② 流出時間：蛍光強度が半減するまでの時間で、下流尿細管へのウォッシュアウトを表わす。

上段：正常

中段：GFR が維持された状態でも近位尿細管から下流尿細管への流出が遅延する。

下段：GFR の減少に伴い、蛍光強度の立ち上がりが緩やかになる。

おわりに

2光子レーザー顕微鏡は、培養細胞や採取検体で観察された現象を生きた動物で確認できるという点で、非常に強力な実験ツールである。しかし開発当初は、あまりに先駆的で強力なツールであったために、報告された観察像に対してさまざまな議論がなされた。特に、顕微鏡の扱いに習熟しているものの麻酔下小動物実験は初めてであったグループと、その逆のグループとが混在することになり、コメント、レター、査読を通して「artifact」の8文字が踊り狂うような時代が続いた。その後、10年ほどかけて腎臓における生体イメージング法のルールのようなものが成熟してきた。他のすべての実験法と同じであるが、意図してかどうかにかかわらず、ステップのうちの一つを間違えるだけで見えてくる像が全く変わってしまうこともある。黎明期には、そこに気づかず mislead が発生してしまった。「直接見せる」という説得力の高さゆえに、使用している研究者はより一層高い確実性・再現性の確認が求められる。

筆者にとって幸運であったことは、生体イメージングを行ううえでの小動物麻酔下実験にすでに習熟していた点も含まれる。2000年にはすでに麻酔下動物実験を開始しており、2光子レーザー顕微鏡実験を学び始めたときには、麻酔下小動物の全身血行動態維持、腎機能維持に関しては、10年の経験があった。その状態で、顕微鏡にも詳しい Peti-Peterdi 先生に師事したことが、短期間で確立できた一因と考えている。今後、2光子レーザー顕微鏡を始められる方には、まず小動物 ICU をイメージした麻酔下での動物状態維持に関する練習から始めることをお勧めする。微力ではあるが、ご相談いただければ、筆者の持っているノウハウはすべてお伝えしたい。

上述のほかにも細胞周期⁶⁾、傍尿細管毛細血管血流^{9,11)}、内皮細胞表層 glycocalyx¹²⁾、エリスロポエチン産生細胞の挙動¹³⁾、糖取り込み¹⁴⁾、好中球細胞外トラップなどが2光子レーザー顕微鏡を用いた生体腎イメージングにより測定可能であることを確認している。それにより腎研究が進歩し、今までわからなかったことが「見える」ようになれば、何よりの喜びである。

謝 辞

筆者は留学するまで腎臓に関してはほぼ無知だった(今となれば、薬剤師として利尿薬の作用機序をきちんと理解していたか怪しいとすら思っている)。そのような筆者が大島賞受賞の誉に与るまで

かかわっていただいた日本腎臓学会の諸先生方、特に大島賞の推薦人になっていただいた西山成香川大学薬理学教授に深謝致します。また加えて、研究初期の最も決定的な時期を指導していただいた大阪薬科大学薬理学講座の松村靖夫教授と故・高岡昌徳教授、現在は University of Alabama, Birmingham に移られた David Pollock 教授、受賞テーマにもなった特殊技術を教示いただいた University of Southern California の Janos Peti-Peterdi 教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、香川大学薬理学講座のメンバー全員への感謝も記して、結びとさせていただきます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Bank N, Mutz BF, Aynedjian HS. The role of "leakage" of tubular fluid in anuria due to mercury poisoning. *J Clin Invest* 1967; 46: 695-704.
2. Kondo N, Kiyomoto H, Yamamoto T, Miyatake A, Sun GP, Rahman M, Hitomi H, Moriwaki K, Hara T, Kimura S, Abe Y, Kohno M, Nishiyama A. Effects of calcium channel blockade on angiotensin II-induced peritubular ischemia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1047-1052.
3. Dunn KW, Sandoval RM, Kelly KJ, Dagher PC, Tanner GA, Atkinson SJ, Bacallao RL, Molitoris BA. Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C905-916.
4. Nakano D, Kobori H, Burford JL, Gevorgyan H, Seidel S, Hitomi H, Nishiyama A, Peti-Peterdi J. Multiphoton imaging of the glomerular permeability of angiotensinogen. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 1847-1856.
5. Roksnoer LC, Heijnen BF, Nakano D, Peti-Peterdi J, Walsh SB, Garrelts IM, van Gool JM, Zietse R, Struijker-Boudier HA, Hoorn EJ, Danser AH. On the origin of urinary renin: a translational approach. *Hypertension* 2016; 67: 927-933.
6. Nishioka S, Nakano D, Kitada K, Sofue T, Ohsaki H, Moriwaki K, Hara T, Ohmori K, Kohno M, Nishiyama A. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is essential for the beneficial effects of renal ischemic preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 2014; 85: 871-879.
7. Nakano D, Nishiyama A. Multiphoton imaging of kidney pathophysiology. *J Pharmacol Sci* 2016; 132: 1-5.
8. Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, Dunn KW, El-Achkar TM, Plotkin Z, Sandoval RM, Dagher PC. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1505-1516.
9. Nakano D, Doi K, Kitamura H, Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Nishiyama A. Reduction of tubular flow rate as a mechanism of oliguria in the early phase of endotoxemia revealed by intravital imaging. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 3035-3044.
10. Kitamura H, Nakano D, Sawanobori Y, Asaga T, Yokoi H, Yanagita M, Mukoyama M, Tokudome T, Kangawa K, Shirakami G, Nishiyama A. Guanylyl cyclase A in both renal proximal tubular

- and vascular endothelial cells protects the kidney against acute injury in rodent experimental endotoxemia models. *Anesthesiology* 2018 ; 129 : 296–310.
11. Kuwahara S, Hosojima M, Kaneko R, Aoki H, Nakano D, Sasagawa T, Kabasawa H, Kaseda R, Yasukawa R, Ishikawa T, Suzuki A, Sato H, Kageyama S, Tanaka T, Kitamura N, Narita I, Komatsu M, Nishiyama A, Saito A. Megalin-mediated tubuloglomerular alterations in high-fat diet-induced kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 27 : 1996–2008.
 12. Salmon AH, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, Bates DO, Peti-Peterdi J. Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1339–1150.
 13. Souma T, Nezu M, Nakano D, Yamazaki S, Hirano I, Sekine H, Dan T, Takeda K, Fong GH, Nishiyama A, Ito S, Miyata T, Yamamoto M, Suzuki N. Erythropoietin synthesis in renal myofibroblasts is restored by activation of hypoxia signaling. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 27 : 428–438.
 14. Zhang Y, Nakano D, Guan Y, Hitomi H, Uemura A, Masaki T, Kobara H, Sugaya T, Nishiyama A. A sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor attenuates renal capillary injury and fibrosis by a vascular endothelial growth factor-dependent pathway after renal injury in mice. *Kidney Int* 2018 ; 94 : 524–535.