

論文の内容の要旨

論文題目 Establishment of quantitative method for measuring intracellular
oxygen tension in kidney
(腎細胞内酸素分圧の定量的測定方法の確立)

氏名 平川陽亮

[背景]酸素は生体内で、酸化的リン酸化を含む多様な経路で使用されており、低酸素環境下において細胞は ATP など様々な物質の細胞内濃度の変化に対応する必要がある。細胞の低酸素に対する応答に関しては、HIF (hypoxia-inducible factor)がマスターレギュレーターとして働くことがよく知られている。HIF は 2 つのサブユニットから構成されるが、このうち HIF- α は酸素の存在下で水酸化を受け、水酸化された HIF- α はユビキチン化の後分解されるという、酸素依存的な分解による調節を受けている。HIF- α の水酸化は細胞内で生じることから、HIF の調節に際し重要なものは細胞内酸素分圧であると判断できる。

腎臓はその解剖学的特性から、通常の状態でも低酸素に晒されている。慢性腎臓病(CKD: chronic kidney disease)は、間質領域の線維化を病理学的な特徴とするが、間質の線維化が見られる疾患モデルでは腎臓の低酸素が進行していることから、CKD では腎臓は更なる低酸素に陥っているものと考えられている。ヒトにおいて CKD 患者でヘモグロビンが高いほど腎予後が良いことから、低酸素は CKD の増悪因子であると一般に考えられている。このように CKD が低酸素を誘発し、低酸素が CKD を加速させる悪循環が、CKD の進行に関する重要な問題点である。しかし CKD において、いつどのように低酸素が CKD の進行に関わっているかはまだ不明な点が多い。この理由の一つとして、HIF が腎臓の線維化に影響を及ぼすことが知られているものの、HIF の調節に関わる細胞内酸素分圧が、特に生体内において、正確に定量的に測定されることが困難であることが挙げられる。

これまで、生体内で酸素分圧を測定する手法として用いられたもののうち、定量的な酸素分圧の評価が可能な方法として、針電極法、blood oxygen level dependent MRI (BOLD-MRI)が挙げられる。しかしこれらの手法は、針電極法は局所の微小循環内の酸素分圧を、BOLD-MRI は静脈の酸素分圧を反映するという意味で細胞内酸素分圧の直接的な評価方法ではない。近年、りん光を用いた酸素分圧の生体内での定量化も行われているが、既報はすべて血管内分布性のりん光プローブを用いているため、やはり細胞内酸素分圧は反映されていない。一方、細胞内酸素分圧を感知していると考えられるものはピモニダゾール結合蛋白の評価と、HIF、あるいはその下流遺伝子の検出が挙げられる。しかしこれらの手法は、定量的な酸素分圧の評価にはつながらないという難点がある。

私は今回、りん光に着目した。りん光は光の一種で、蛍光と同様に励起光を受け励起状態となった分子が発する光であるが、蛍光との違いとして、その寿命が長い点、そして強度および寿命

が酸素依存性である点が挙げられる。この酸素依存性は、りん光は三重項励起状態の分子から発せられる光と定義されるが、この三重項励起状態の分子は酸素分子の衝突によりエネルギーを失うことに起因する。今回私が実験に使用したりん光プローブは BTPDM1 という分子で、中央にイリジウムを配した金属錯体で、脂溶性である。この BTPDM1 は、培養細胞において細胞内に分布すること、また生体に投与した際に腎臓に比較的多く分布し、血中から消失することが報告されており、腎臓における細胞内低酸素検出に適したりん光プローブであると期待された。このため BTPDM1 を用いて、腎臓の細胞内低酸素を検出可能かどうか、酸素分圧を推定可能かどうか調べる実験を行った。

[結果]最初に、BTPDM1 が全身投与の後、腎臓を構成する細胞のどの部位に集積するかを調べた。BTPDM1 投与後、半割した断面の実体顕微鏡での観察及び凍結切片の蛍光顕微鏡での観察の両者とも、BTPDM1 が尿細管細胞内に分布することを示唆した。このため、BTPDM1 投与後に腎臓から観察されるりん光は、尿細管細胞内の酸素分圧に依存するものと判断した。

次に、りん光強度測定とりん光寿命測定のどちらが腎臓の低酸素検出に有用であるかを検討するため、まずりん光強度測定で腎臓の低酸素が検出可能かを調べた。マウスにおいて腎臓の急性虚血、再灌流を生じさせても、りん光強度測定では腎臓からのりん光シグナルはほぼ不変であった。このため BTPDM1 を用いたりん光強度測定は腎臓での低酸素検出には不向きであると判断した。

次に、りん光寿命測定が腎臓で可能かどうか検討した。BTPDM1 投与後の腎臓から、りん光寿命測定に十分なほどのりん光が検出できることが明らかとなったため、前述の腎臓の急性虚血、再灌流においてりん光寿命が変化するかを調べた。すると、虚血前には 1.5 μ 秒であったりん光寿命が虚血により 3.1 μ 秒まで延長し、再灌流により再度 1.5 μ 秒まで短縮した。この結果により、BTPDM1 投与後のりん光寿命測定が腎臓の低酸素検出に有用であると考えられた。さらに他の腎臓低酸素のモデルとして、15%酸素あるいは 10%酸素吸入による低酸素血症、瀉血による貧血においてりん光寿命が延長するかどうかを検討したところ、これらのいずれにおいても、対照群と比して明らかにりん光寿命の延長が見られた。これらのことから、BTPDM1 投与後の腎臓のりん光寿命測定は、生体内での細胞内低酸素検出に有用であると考えられた。

さらに CKD モデルにおける低酸素の検出が可能かを検討した。CKD モデルとしては、片側腎臓虚血/再灌流(I/R)の 7 日後を採用した。I/R 7 日後では、腎臓には顕著な線維化は認められないが、りん光寿命が病側で対側と比して明らかに延長していた。また、腎障害の存在下でも BTPDM1 はやはり尿細管に分布することが凍結切片の観察から確認でき、このりん光寿命の変化は尿細管細胞内が I/R 病側腎では低酸素に陥っていることを示すと考えられた。ピモニダゾール及び CD31 の免疫染色を施行したところ、ピモニダゾール染色においては病側において尿細管の染色が増加していること、CD31 染色においては病側で毛細血管の脱落が認められることは、このモデルの病側腎が低酸素に陥っていることを傍証する所見であった。

りん光寿命測定の利点として、低酸素を定量的に評価できることの上に、酸素分圧の定量的可

能性が挙げられる。溶液内では、りん光寿命の逆数と酸素分圧が線形近似可能である。本手法においても、りん光寿命を酸素分圧に変換することが可能かどうかを検討した。不死化した近位尿細管細胞株である HK-2 細胞(human kidney 2 細胞)に BTPDM1 を添加し、様々な培養酸素分圧下でりん光寿命を測定した。その結果、1%以上の酸素濃度下であれば、HK2 細胞においてもりん光寿命の逆数と酸素分圧が線形近似可能であることが見出された。この結果を用いると、こまでの生体内の実験で得られたりん光寿命を酸素分圧に変換することが可能であった。

[考察]脂溶性りん光プローブである BTPDM1 を用いたりん光寿命測定で、生体内で低酸素の検出と酸素分圧の推定が可能であると報告した。本手法は主に定量性の面でピモニダゾール結合蛋白の評価と、酸素分圧の測定部位の面で針電極法と異なっている。りん光を用いて細胞内酸素分圧を施行した報告は複数見られているが、これを生体内の臓器で施行した報告はない。その理由として、私の手法はりん光寿命測定を用いていること、生体に投与後に細胞内のみ分布し血管内から消失していることが特徴といえる。

りん光寿命測定を用い、生体内での酸素分圧を測定したものとしては血管内分布性プローブによる報告がある。これらのプローブでは、りん光寿命と酸素分圧の検量線はウシ血清由来アルブミンを含有した緩衝液内でのプローブのりん光寿命と周囲の酸素分圧を測定することで作成することができる。これはウシ血清由来アルブミンを含有した緩衝液が血清環境と非常に類似しているという仮定が成り立つためである。対して今回のプローブは、細胞内で脂質二重膜上に分布していると考えられるが、生体内の脂質二重膜環境を完全に模する物質はなく、検量線の作成方法が問題であった。解決策として、培養細胞に BTPDM1 を投与し、様々な酸素分圧下でりん光寿命を測定することで検量線を作成した。しかし培養細胞の環境と生体内の細胞の環境にどこまで相同性があるかは不明であり、この方法が適切であるかは、この方法により得られた酸素分圧が適切であるかどうか依存する。

このため、本手法で得られた酸素分圧を、針電極法による測定値と比較した。針電極法では、通常の状態、10%酸素吸入、貧血において腎皮質の酸素分圧はそれぞれ 45-50mmHg、35mmHg、約 45mmHg であると報告されているものに対し、本手法では 51-70mmHg、24-36mmHg、34-54mmHg となった。通常の状態においてはやや高めの値であるものの、概して針電極法による測定値と大きな齟齬のない結果となっており、本手法は生体における腎尿細管の細胞内酸素分圧測定方法として信頼できるものであると判断された。しかし、生体内酸素分圧を定量的に測定する方法が他に存在しないため、この手法で得られた値が正しいかどうかは今後の研究を待つ必要がある。この他の問題点としては、BTPDM1 が尿細管に分布するとしたが、尿細管内のどの分画に分布するかが確認できない点、また生体内での細胞内小器官分布が確認できていない点が挙げられる。しかしこれらの問題点を鑑みても、本手法は生体内での低酸素検出及び評価に関し、新規性があり、非常に有用な手法であると考えられる。