［課程－２］

審査の結果の要旨

氏名　長谷川 頌

本研究は、臓器透明化手法・3 次元免疫染色・ライトシート顕微鏡による高速 3 次元撮影を組み合わせることで腎臓全体における交感神経の 3 次元構造およびその病態における変化を解析したものであり、以下の結果を得ている。

1. マウス腎臓に対して CUBIC、ScaleS、iDISCO、Passive CLARITY という 4 つの透明化手法を適用して比較し、これらの中で CUBIC が再現性をもってマウス腎臓を高度に透明化できるという点で本研究の目的に最も適していることを示した。

2. 透明化したマウス腎臓を薄切せずに丸ごと染色する手法（3 次元免疫染色）を確立し、Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を用いて交感神経を標識し、Alpha smooth muscle actin (αSMA) 抗体を用いて動脈平滑筋を標識した上で、ライトシート顕微鏡を用いて 3 次元撮影を行った。その結果、交感神経は動脈の周囲を取り巻くように走行していることが明らかとなり、交感神経が動脈の収縮を制御していることが裏付けられた。

3. マウス腎臓の虚血再灌流障害（腎臓の血流が一時的に急激に低下することによる障害：急性腎障害）を起こし、10 日後の腎臓を透明化して観察した。その結果、交感神経マーカーで標識される領域が健康な腎臓と比べて約 70%減少していることが明らかになった。さらに、交感神経から分泌される神経伝達物質であるノルアドレナリンの量を測定したところ、虚血再灌流障害 10 日後の時点で腎組織内のノルアドレナリンが約 77%低下していたことから、障害後の腎臓において交感神経の機能異常が生じていることが裏付けられた。

4. 虚血再灌流後の経時的な変化を観察したところ、交感神経マーカーで標識される領域は障害直後に最も減少し、時間と共に徐々に回復するものの、28 日後にも完全には回復しておらず、障害後の交感神経の機能異常が長期間にわたって遷延していることが分かった。

5. マウス腎臓の 3 次元免疫染色に関しては、交感神経・動脈のみならず、Aquaporin 2 (AQP2) 抗体を用いた集合管の標識、Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) 抗体を用いた近位尿細管 S1/S2 セグメントの標識、Podocin 抗体を用いた糸球体の標識をそれぞれ確立し、腎臓全体における 3 次元構造を可視化することに成功した。さらに、糸球体の標

識を用いて糖尿病性腎臓病の早期における糸球体肥大および治療介入による糸球体肥大の改善を可視化した結果を示し、今回確立した臓器透明化と 3 次元免疫染色による全腎臓 3 次元解析の応用例を示した。

以上、本論文はこれまで分かっていなかった腎臓全体の交感神経の 3 次元構造を可視化し、虚血再灌流障害後に交感神経の異常が長期間にわたって遷延していることを明らかにした。本研究において確立された全腎臓 3 次元解析は、今までにない包括的な視点を提供することで今後の腎臓病研究において強力なツールとなることが期待される。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。