

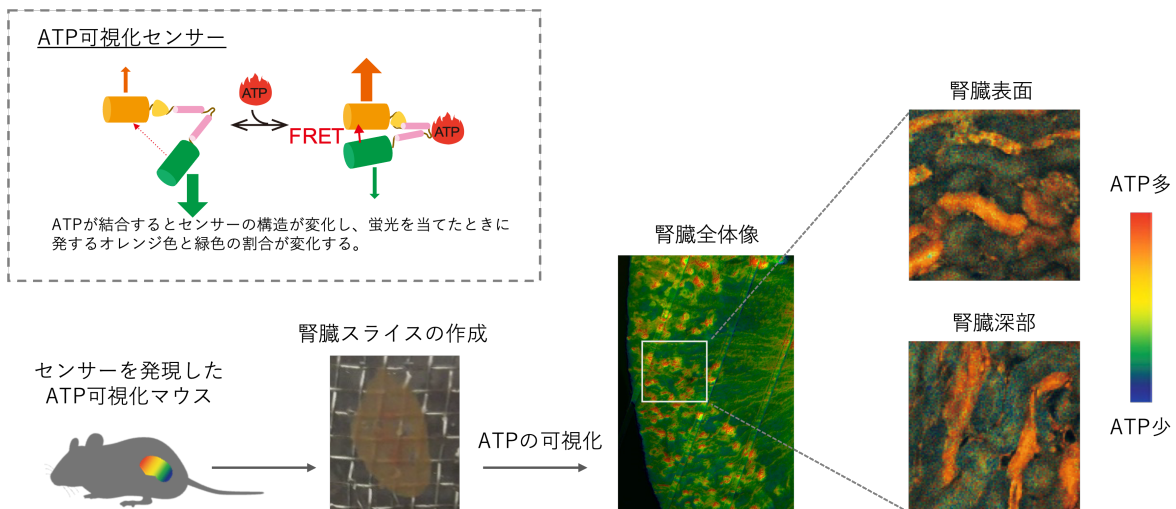
2024年7月9日

腎臓全領域におけるエネルギー動態の可視化 —腎臓病の病態解明や薬剤開発に役立つ新技術—

概要

アデノシン三リン酸 (ATP) は全ての生物に共通するエネルギー通貨であり、さまざまな生命活動に不可欠な非常に重要な分子ですが、これまで ATP を可視化する技術が未熟であったため、その詳細は謎に包まれていました。京都大学医学研究科 腎臓内科学 柳田素子教授 (兼・高等研究院ヒト生物学高等研究拠点 (WPI-ASHBi)主任研究者)、山本恵則 ASHBi 特定研究員 (研究当時、現；京都大学医学部附属病院 腎臓内科学 特定病院助教) らの研究グループは、これまでに細胞内 ATP 濃度を可視化する FRET¹ バイオセンサーを全身発現させた ATP 可視化マウスを作成し、生体腎の時間的・空間的 ATP 動態を高精度かつリアルタイムに捉えることに成功しましたが、腎臓のごく表層の ATP しか評価できないという技術的制約がありました。本研究では、同マウスの腎臓からスライス切片を作成し、特定の培養条件下で観察することにより、これまでは観察が不可能だった腎臓のより深部の領域の観察を可能としました。本技術は、細胞培養実験のように介入実験が非常にやりやすいうえに、実際の生体内の腎臓と同様の複雑な三次元構造を保っているため、生体内の状況をよく反映しています。また、一つの腎臓から複数のサンプルを作成することができるため、動物愛護の観点からも非常に有用であると考えられます。本研究により、腎臓のさまざまな部位での ATP の産生経路の違いや、腎毒性を持つ薬剤の投与時における部位ごとの障害の違いを明らかにすることができました。本技術は、腎臓病の原因をエネルギー代謝の観点から解明することや、腎臓病の新規薬剤開発に役立つと考えられます。

本成果は、2024年7月8日に国際学術誌「*Kidney International*」にオンライン掲載されました。



<研究の背景>

腎臓病は、今や成人の8人に1人が罹患する新たな国民病とも言われています。その一方で、有効な治療法の開発はまだ遅れており、腎臓の機能が廃絶し透析療法が必要となる患者さんの数は年々増えてきています。そのため腎臓病の病態メカニズムを解明し、新たな治療法を発見することは喫緊の課題です。

腎臓は生体内で最も酸素を消費する臓器の一つであり、非常に多くのエネルギーを産生し消費しています。腎臓の大きな役割として、血液中に蓄積した老廃物や、過剰な水分やミネラルを尿の中に排泄することが挙げられますが、腎臓はこの体液の恒常性の維持のために、多量のエネルギーを消費しています。

そこで我々は、腎臓病においては、そのエネルギー不足によって腎臓が機能不全に陥っているのではないかと仮説を立てました。アデノシン三リン酸 (ATP) は全ての生物に共通する「エネルギー通貨」とも呼ばれる重要な分子ですが、これまで次々と産生され、消費されてゆく ATP の動態を可視化する技術がなかったため、その詳細は謎に包まれていました。その謎を解くため、我々はこれまでに、細胞内 ATP 濃度を可視化する FRET¹ バイオセンサーを全身発現させた ATP 可視化マウスを作成し、特殊な顕微鏡を用いることで、ATP の動態を高解像度かつリアルタイムに捉えることに成功しました。(*Journal of the American Society of Nephrology.*, 2020) しかしながら、この方法の技術的な制約として、腎臓のごく表層の ATP しか評価ができないという点がありました。腎臓の深部には、血液のろ過の中心的な役割を担う糸球体 (その中でも特に重要な細胞が足細胞と呼ばれる) に代表されるような腎臓病のメカニズムを理解する上で重要となる部位が存在するため、腎臓全領域における評価方法が望まれていました。

<研究手法・成果>

本研究では、ATP 可視化マウスの腎臓を取り出し、冷却した培養液の中で 300 μ m 厚の薄い腎臓のスライス切片を作成しました。我々はこの腎臓のスライス切片が、生体内と同様に ATP 産生が保たれるような培養条件を検証し、腎臓の全領域の ATP 動態の観察が可能なシステムの確立に成功しました。この新規システムは、生体に類似した三次元構造と機能性 (トランスポーター²による薬物取り込みなど) を保持しており、さらに1つの腎臓から複数のスライスを作成し、複数の実験条件を同時に試験することを可能としました。

細胞内での主な ATP 産生経路には、酸化リン酸化³ (電子伝達系) と 解糖系⁴ が知られていますが、我々はこの実験系を用い、酸化リン酸化の阻害剤の投与時には 遠位尿細管⁵ では ATP がよく保たれるのに対し、近位尿細管⁶ では著明に ATP が減少することを見出しました。一方、解糖系の阻害剤の投与時には糸球体の足細胞の ATP 低下が最も著明でありました。このようにそれぞれの部位での ATP 産生の仕組みが異なることを明らかにしました。

続いて、我々は腎障害時にどの部位がどのように ATP 変動を起こすのかを観察しました。虚血再灌流 (さいかんりゅう) モデルを模倣した系⁷ においては、虚血を起こすと近位尿細管と遠位尿細管の ATP が速やかに低下し、その後、再灌流後、近位尿細管の ATP 回復は、遠位尿細管と比較して不良であることがわかりました。さらには虚血時間が長くなるほど再灌流後の近位尿細管の ATP の回復は不良であることがわかりました。これらの現象は動物実験でも同様の所見が観察されており、このスライス培養系が動物内の代謝変化を反映していることがわかります。また抗癌剤であるシスプラチンは副作用として腎障害を

引き起こすことが知られていますが、この培養系にシスプラチンを投与すると、濃度依存的に、近位尿細管と遠位尿細管にて ATP の低下を認め、他の領域での ATP 低下は軽微に留まることがわかりました。さらに、アメリカ食品医薬品局（FDA）は、動物愛護の観点から、医薬品承認のための動物実験要件を撤廃しました。この決定により、動物実験を臓器チップやオルガノイドなどの実験で代替できるようになりました。しかし現在のところ、我々の研究対象である腎臓病を含め、代替法はまだ動物実験を完全に代替するには至っておらず、さらなる発展が待たれています。今回確立した新規システムは、薬剤評価に使用する動物数を減らす効果が十分に期待され、動物愛護の観点からも高いポテンシャルを持った実験系だと考えられます。

<展望>

この新しい ATP 可視化技術を用いて、虚血再灌流傷害モデルやシスプラチン腎症モデルだけでなく、様々な腎障害モデルで ATP 動態の観察・解析を進める予定です。今回の実験では、腎臓スライスを作成したあとに、培養下でさまざまな障害を与えましたが、マウスに障害モデルを惹起（じゃっき）したあとに、腎臓のスライス切片を作成することで、エネルギー動態を解析することも可能です。従来からあるメタボローム解析や質量分析イメージングといった代謝解析方法と本研究の ATP 可視化技術とが相互補完することで、今後、腎臓病の創薬開発において重要なツールとなることが期待されます。

<研究プロジェクトについて>

本研究は以下の資金の援助を受けて行われました（以下、研究開発代表者：柳田素子）。

- ・国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）・革新的先端研究開発支援事業（AMED－CREST）「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「腎臓病において組織障害と修復を制御する微小環境の解明と医学応用」、腎疾患実用化研究事業「ヒト腎臓病における 3 次リンパ組織の役割の解明と治療介入対象としての蓋然性の検討」、健康・医療分野におけるムーンショット型研究開発等事業「炎症誘発細胞除去による 100 歳を目指した健康寿命延伸医療の実現」、橋渡し研究戦略的推進プログラム「アカデミア発先端医療技術の早期実用化に向けた実践と連携」、老化メカニズムの解明・制御プロジェクト 個体・臓器老化研究拠点
- ・文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「腎構成細胞「亜集団」の細胞老化が腎臓の老化と障害応答性に与える影響の解明」
- ・文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」

<研究者のコメント（山本恵則）>

現代においても、腎機能を改善させる画期的な薬剤の開発は未だに困難な状況です。その原因として、腎臓が多種多様な細胞から構成され、腎臓の機能はそれらの細胞間の複雑な相互作用のバランスの上で成り立っているからだと考えられます。本技術に限らず、複数の細胞の機能を経時的に解析できる実験手法は、今後も重要になると考えられます。腎臓病や透析で苦しむ患者さんが減るよう、引き続き、病気の根本的な原因解明を目指して研究・診療に取り組んでいきたいと考えています。

<論文書誌情報>

Yamamoto, S., Yamamoto, S., Takahashi, M., Mii, A., Okubo, A., Toriu, N., Nakagawa, S., Abe, T., Fukuma, S., Imamura, H., Yamamoto, M., & Yanagita, M. (n.d.). Visualization of Intracellular ATP Dynamics in Different Nephron Segments under Pathophysiological Conditions Using the Kidney Slice Culture System. *Kidney International*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2024.05.028>

<用語解説>

1. FRET (Fluorescence resonance energy transfer) : 蛍光共鳴エネルギー移動の略称。本システムでは、細胞内 ATP が高い時に蛍光共鳴エネルギー移動という現象が起こり、顕微鏡で感知できる緑色とオレンジの蛍光色の強度の割合が変化することで ATP 量が検出される仕組みとなっています。
2. トランスポーター : 主に細胞膜に存在する、薬物などの分子の輸送を担うたんぱく質のこと。
3. 酸化的リン酸化 : ミトコンドリア内膜で、NADH の酸化に共役して起こるリン酸化反応 (電子伝達系) のことで ATP を生合成する。
4. 解糖系 : 無酸素下でもグルコースを分解し、ATP を産生することのできる糖代謝経路。
- 5.6. 近位尿細管、遠位尿細管 : 腎臓に入った血液は最初に糸球体という場所でろ過され、尿の元となる原尿が作られます。原尿はその後、最初に近位尿細管、その後に遠位尿細管を通過し、最終的に本当に不要なものだけが尿として体外に排泄されます。原尿中の水、電解質、アミノ酸、糖などの多くのものは重要な物質なので、尿細管を通過する間に再吸収されます。
7. 虚血再灌流 (さいかんりゅう) モデル : 腎障害を引き起こす最も一般的な手法と知られます。生体では腎動・静脈を一定時間遮断したのち、血流を再開 (再灌流) させることで腎障害を惹起 (じゃっき) します。スライス培養では、培養液中の酸素や、栄養素を抜くことで虚血に似た状態を模倣します。

<参考文献情報>

Shinya Yamamoto, Masamichi Yamamoto, Jin Nakamura, Akiko Mii, Shigenori Yamamoto, Masahiro Takahashi, Keiichi Kaneko, Eiichiro Uchino, Yuki Sato, Shingo Fukuma, Hiromi Imamura, Michiyuki Matsuda, Motoko Yanagita (2020). Spatiotemporal ATP dynamics during acute kidney injury predicts renal prognosis, *Journal of the American Society of Nephrology*, DOI: [10.1681/ASN.2020050580](https://doi.org/10.1681/ASN.2020050580)
プレスリリース> https://ashbi.kyoto-u.ac.jp/ja/news/20201012_research-result_yanagita/