

放射光イメージングによる糖尿病腎糸球体構造評価

滝山由美

旭川医科大学 〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東 2-1-1

世良俊博

九州大学 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡744

中村匡徳

名古屋工業大学 〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町

要旨

日本における糖尿病患者数は現在1000万人に増加し、その30%が糖尿病腎症を発症する。糖尿病腎症は進行すると末期腎不全となり、人工透析または腎移植が生命維持のために必須となる。糖尿病腎症は21年前の1998年以来、日本における透析導入患者の原疾患第1位となり、最新報告の2017年では42.5%を占め、糖尿病腎症を患った患者16,492人が透析療法を開始している¹⁾ (Fig. 1)。腎臓に存在する糸球体は、体の中の老廃物を濾過する重要な働きを担っている。ヒトの2つの腎臓には、各々100万個の糸球体が存在するが、糖尿病による全糸球体の数と容積への影響についての報告はない。一方、新規糖尿病治療薬 SGLT2 阻害薬は、最近の大規模臨床試験²⁻⁴⁾により、その腎保護効果が明らかとなったが、全糸球体への影響については未だ検討されてはいない。本研究では、放射光マイクロCTによる腎糸球体イメージング法を開発し、2型糖尿病モデルマウスを用い、糖尿病と SGLT2 阻害薬による糸球体への影響について初めて明らかとした⁵⁾。

1. はじめに

糸球体 (Glomerulus) の数とサイズには個体差が存在し、ヒト糸球体数では10倍、糸球体容積では7倍の違いがあり、また一つの腎臓内においても、組織内分布により糸球体容積に8倍の差があるとされている⁶⁾。糸球体数の過少は、高血圧、腎不全の危険因子であり⁷⁾、糸球体数測定は、これら疾患の予測と予防のために重要である。糸球体数規定因子としては、出生前では胎内環境による出生時体重⁸⁾、出生後では糖尿病と加齢の影響があげられる。しかしながら、糸球体総数の測定は長時間を費やし、動物実験においても腎臓全体における全糸球体に対する糖尿病の

影響についての報告はない。新規糖尿病治療薬ナトリウム・グルコース共役輸送体2 (Sodium Glucose cotransporter 2; SGLT2) 阻害薬は、腎尿細管細胞に発現する SGLT2 を治療標的とする新規作用機序により、血糖降下、降圧、体重減少作用とともに、高血糖により惹起される糸球体過剰濾過を是正し、腎保護効果を呈することが報告されている⁹⁾が、全糸球体に対する影響については、検討されていない。そこで、本研究では、大型放射光施設 SPring-8 の放射光を利用することにより、定量的な取り扱いを可能とする新規糸球体イメージング法を開発し、糸球体に及ぼす糖尿病と SGLT2 阻害薬の影響を検討した。

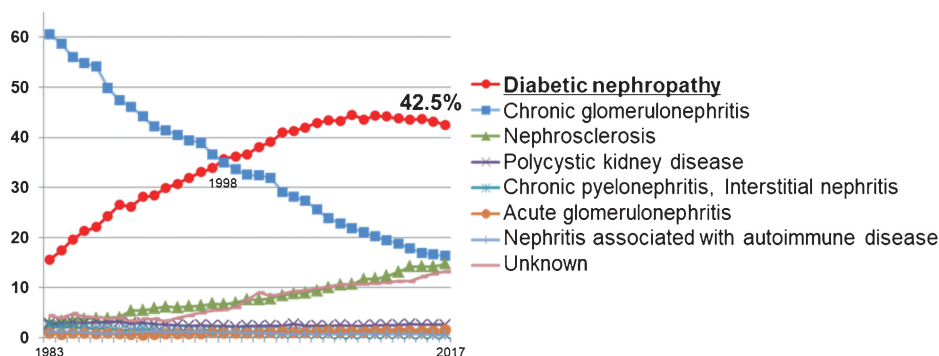


Fig. 1 (Color online) The growing prevalence of dialysis initiation in Japanese diabetic subjects. Adapted from the data reported by the Japanese Society for Dialysis Therapy (JSDT). (<https://www.jsdt.or.jp>).

2. 実験方法

2.1 マウス腎臓標本作製

高血糖・肥満を呈する自然発症2型糖尿病マウス (*db/db*)¹⁰⁾を、対照群マウス (*db/m*) とともに、糖尿病腎症進行期である22週齢時に実験に用いた (Fig. 2a)。SGLT2 阻害薬治療マウス群 (*db/db+SGLT2i*) は、8週齢から14週間、血糖降下作用を呈する SGLT2 阻害薬 luseogliflozin 混餌 (15 mg/kg/day) を与え (Fig. 2b)、同じく22週齢時に腎標本作製した。腎固定摘出標本は、マウス心臓左室からカニューレを挿入し、ヘパリン (300 U) を one-shot 投与5分後、ヘパリン 2 U/ml 含有の生理食塩水で灌流した。引き続き、42°Cに加温した 8% (wt/vol) のゼラチン入り 40% (vol/vol) 硫酸バリウム造影剤を注入・凍結固定し、腎摘出標本を作成した。

2.2 放射光マイクロ CT イメージング

実験は、大型放射光施設 SPring-8 の医学・イメージン

グビームライン BL20B2 で行った¹¹⁾。腎臓凍結サンプルをカプトン膜と発泡スチロール製の断熱チャンバー内に設置した回転ステージ上に固定し、CT撮影中はドライアイスを用いてチャンバー内の温度を低温に保ちサンプルの凍結状態を維持した。X線エネルギーは37.6 keV もしくは 35 keV とし、蛍光体 (GADOX (Gd₂O₂S: Tb³⁺, P43), 厚さ: 25- μ m) を用いて可視光に変換し投影像を撮影した。露光時間を100 ms, 投影数を1800枚/180°として撮影時間を3分以内とし、すべての投影像を取得後一般的なフィルタ補正逆投影法によってCT再構成を行った。取得画像の解像度は2,048×2,048×1,320ピクセルであり、1ボクセルの大きさは15.5³ μ m³であった。

2.3 腎糸球体抽出解析法

血管内に造影剤を注入したことにより、糸球体は周囲組織よりもエックス線の吸収値が大きくなる。その結果として、サンプルをCT撮影すると、糸球体は高い輝度値 (CT値) をもって白いCT像として描出される (Fig. 2d)。

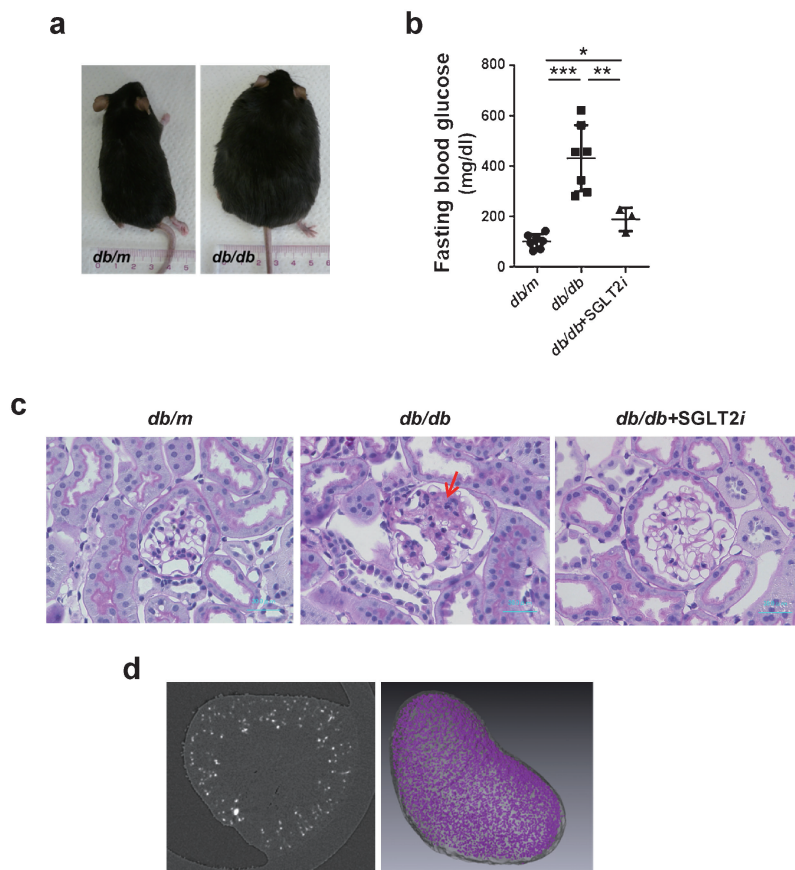


Fig. 2 (Color online) Synchrotron Radiation Micro-Computed Tomography at SPring-8.

a. Control *db/m* mice and diabetic *db/db* mice.

b. Glucose lowering effect of SGLT2 inhibitor. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$; One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison post hoc tests.

c. The attenuation of glomerular lesion (red arrow) in SGLT2 inhibitor-treated *db/db* mice (periodic acid-Schiff staining, Bars, 30 μ m).

d. The axial image of the kidney of mice injected with contrast medium (left) and the glomeruli assessed by the program Amira (right).

このCT値の差を利用して、画像処理によって糸球体を抽出した (Fig. 2d)。抽出に、領域成長法を用い、一定のCT値を有するボクセルをシード点とした。抽出された物体については、その形状異方性と体積を評価し、基準を満たしたものを糸球体と判断した。異方性評価には、抽出された物体の主成分分析から最大固有値 λ_{\max} および最小固有値 λ_{\min} を求め、

$$\psi = 1 - \frac{\lambda_{\min}}{\lambda_{\max}}$$

から、異方性評価指標 ψ とした。ここで、 λ_{\max} および λ_{\min} は、抽出した糸球体の分散共分散行列の最大および最小固有値であり、球体であるほど $\psi = 0$ 、また血管のように細長いほど $\psi = 1$ に近づく。

撮影の項で説明したように、35 keV および37.6 keV の2種類のX線エネルギーを使用した。このような撮影時のX線エネルギーの変更により、同一画像処理条件では抽出される糸球体の大きさが変わる。そこで、同一の糸球体を35 keV と37.6 keV の両エネルギーで撮影し、その体積変化率を評価した結果、両エネルギーで撮影された糸球体体積には、良好な線形関係が認められた (決定係数 $r^2 = 0.974$)。そこで、データに対して近似直線の式を求め、35 keV で撮影した糸球体に対しては、式を用いて体積を補正した。抽出および体積補正された白いCT像の内、異方性指標 ψ が0.75以下、かつ、補正後の体積が43,826–631,932 μm^3 のものを糸球体と定義した。なお、補正後の体積を等価直径にすると、53–129 μm となる。また、腎臓内での糸球体の空間分布を解析するために、腎臓の重心から外表面までを10等分し、各層に含まれる糸球体の数を計測した。

3. 結果

3.1 糸球体数と容積：SGLT2 阻害薬による糸球体分布の再構築

糖尿病 *db/db* マウスは、対照群 *db/m* マウスに比べ高血糖を呈し、SGLT2 阻害薬 luseogliflozin は有意に *db/db* マウスの高血糖とともに (Fig. 2b)、糸球体病変を改善したが (Fig. 2c)、総糸球体数 N_{glom} はマウス3群間で有意差を認めなかった (Fig. 3a)。SGLT2 阻害薬は、糖尿病 *db/db* マウスに見られる糸球体肥大を減少しなかったが (Fig. 3b)、腎肥大を有意に改善した (Fig. 3c)。腎臓体積に占める総糸球体容積は1.5%未満であることから、SGLT2 阻害薬による腎肥大改善作用は、糸球体以外の器官、つまり尿細管・間質への効果であることが示唆された。

SGLT2 阻害薬治療群では表在皮質層の糸球体数が増大する一方、皮質中層の糸球体数が減少傾向を呈し、糸球体分布が変化していた (Fig. 3d)。更に、*db/db* マウスは、*db/*

m マウスと比較し、腎臓肥大とともに平均糸球体容積が腎臓髄質から皮質の全層にかけて増大傾向を示し、特に皮質中層で有意に増大していた (Fig. 3e)。

3.2 糸球体数・糸球体容積規定因子

糸球体数・糸球体容積と生理学的代謝指標との相関関係について検討したところ、総糸球体数 N_{glom} は、平均糸球体容積 V_{glom} (相関係数 $r = 0.500$, 有意確率 $p = 0.003$)、収縮期血圧 ($r = 0.342$, $p = 0.048$) と相関した。尚、相関係数 $r = 0$ は相関無し、 $r = 1$ (-1) は完全に正 (負) の相関を持つことを示し、有意確率 p は0.05未満で統計学的に有意であることを示す。 V_{glom} は、空腹時血糖 ($r = 0.494$, $p = 0.003$)、尿中アルブミン排泄量 ($r = 0.507$, $p = 0.002$) と相関関係を呈した。特に空腹時血糖は、*db/m* マウス、*db/db* マウスの V_{glom} と、それぞれ強い相関関係 (db/m ; $r = 0.872$, $p < 0.0001$, db/db ; $r = 0.787$, $p = 0.0008$) を呈したが、血糖改善を呈した SGLT2 阻害薬治療群 *db/db* マウスには認められないことから、SGLT2 阻害薬治療により糸球体容積は、血糖以外の因子に規定されることが示唆された。腎体積 V_{kidney} は、体重 ($r = 0.479$, $p = 0.004$)、空腹時血糖 ($r = 0.699$, $p < 0.001$)、過去1~2か月間の血糖の状態を反映する指標 HbA1c ($r = 0.642$, $p < 0.001$)、そして平均血圧 ($r = 0.438$, $p = 0.010$) など、糖尿病状態に変化する生理学的代謝指標と相関を呈しており、糖尿病腎症の早期診断基準の参考事項¹²⁾とされている腎肥大が糖尿病腎症の存在を示唆することを改めて明らかとした。多重線形回帰分析の結果、 V_{glom} については尿中アルブミン、飲水量、摂食量、 V_{kidney} , N_{glom} が規定因子であった。 N_{glom} については V_{kidney} , V_{glom} が、 V_{kidney} については体重、HbA1c がそれぞれ規定因子であった。

4. まとめ

放射光を使用した全腎組織3次元的糸球体抽出法糸球体を開発し、腎組織全体を解析することを可能とした。高血糖により引き起こされる糖尿病腎症においては、血糖は腎体積の規定因子であったが、総糸球体数と糸球体容積の規定因子ではなかった。一方、糖尿病腎において腎保護効果を有する SGLT2 阻害薬は、血糖非依存的に糸球体分布と腎体積、糸球体体積に影響を与えていた。これら作用は、SGLT2 阻害薬に惹起される血行動態、尿細管細胞糖代謝、酸素代謝によると考えられ、高血糖そのものではなく、これら作用機構に介在する因子こそが、糖尿病腎症の真の治療標的であることが示唆された。

謝辞

本研究における放射光を利用したマイクロCTイメージングは SPring-8 の2012年度、2013年度の重点グリーン/ライフ・イノベーション推進課題2012B1772, 2013A1655,

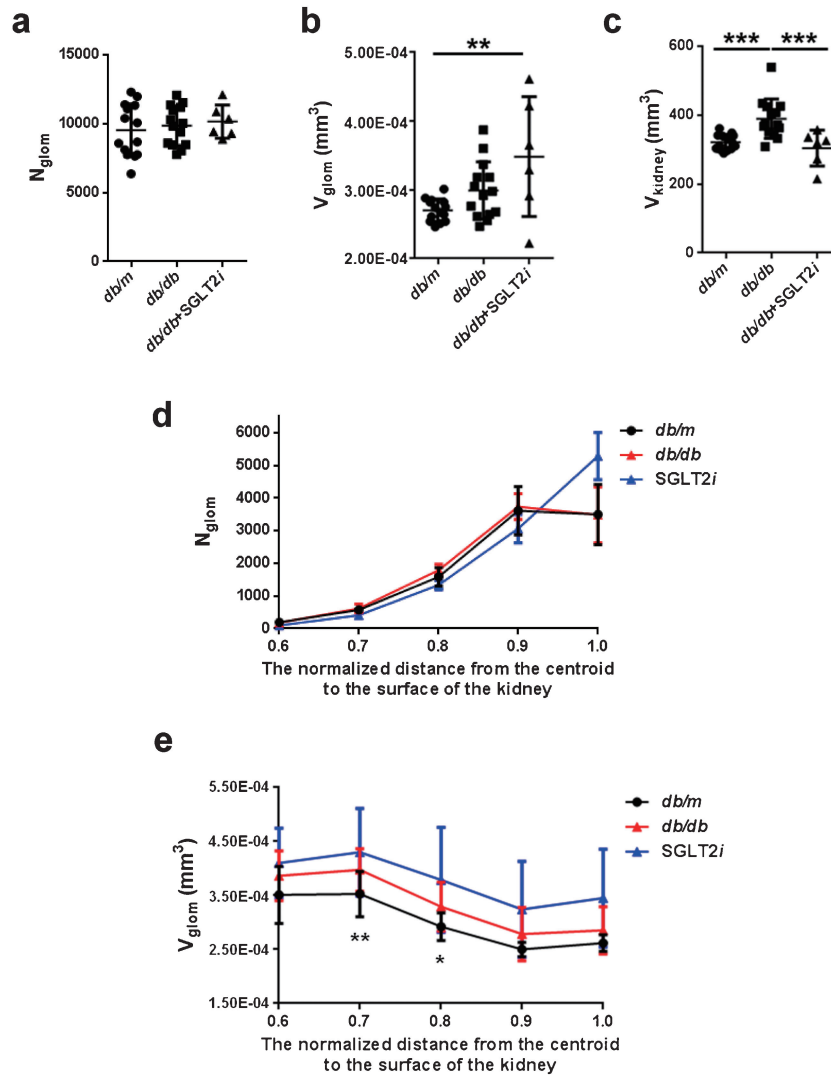


Fig. 3 (Color online) Glomerular number and volume estimated by synchrotron radiation micro-CT in Spring-8.

a. Total glomerular number (N_{glom}) in kidneys.

b. Mean glomerular volume (V_{glom} , $p^{**} < 0.01$).

c. Mean renal volume (V_{kidney} , $p^{***} < 0.001$)

d. Distribution of glomerular number in whole kidney.

e. Distribution of glomerular volume in the cortex ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, db/m vs. db/db). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$; One- and two-way repeated-measures ANOVAs with Bonferroni's multiple comparison post hoc tests.

2013年度一般課題2013B1739, 2015年度スマート放射光活用イノベーション戦略推進課題2015A1878のもとに行われたものである。

参考文献

- 1) 一般社団法人日本透析医学会「わが国の慢性透析療法の現状 (2017年12月31日現在)」
<https://docs.jsdt.or.jp/overview/>
- 2) C. Wanner, S. E. Inzucchi, J. M. Lachin, D. Fitchett, M. von Eynatten, M. Mattheus, O. E. Johansen, H. J. Woerle, U. C. Broedl and B. N. Zinman: *N. Engl. J. Med.* **375**, 323 (2016).
- 3) B. Neal, V. Perkovic, K. W. Mahaffey, D. de Zeeuw, G. Fulcher, N. Erondou, W. Shaw, G. Law, M. Desai and D. R. Matthews: *N. Engl. J. Med.* **377**, 644 (2017).
- 4) S. D. Wiviott, I. Raz, M. P. Bonaca, O. Mosenzon, E. T. Kato, A. Cahn, M. G. Silverman, T. A. Zelniker, J. F. Kuder, S. A. Murphy, D. L. Bhatt, L. A. Leiter, D. K. McGuire, J. P. H. Wilding, C. T. Ruff, I. A. M. Gause-Nilsson, M. Fredriksson, P. A. Johansson, A. M. Langkilde and M. S. Sabatine: *N. Engl. J. Med.* **380**, 347 (2019).
- 5) Y. Takiyama, T. Sera, M. Nakamura, K. Ishizeki, Y. Saijo, T. Yanagimachi, M. Maeda, R. Bessho, T. Takiyama, H. Kitsunai, H. Sakagami, D. Fujishiro, Y. Fujita, Y. Makino, A. Abiko, M. Hoshino, K. Uesugi, N. Yagi, T. Ota and M. Haneda: *EBioMedicine* **36**, 329 (2018).
- 6) V. G. Puelles, W. E. Hoy, M. D. Hughson, B. Diouf, R. N. Douglas-Denton and J. F. Bertram: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **20**, 7 (2011).

- 7) W. E. Hoy, M. D. Hughson, J. F. Bertram, R. Douglas-Denton and K. Amann: J. Am. Soc. Nephrol. **16**, 2557 (2005).
- 8) V. A. Luyckx and B. M. Brenner: J. Am. Soc. Nephrol. **21**, 898 (2010).
- 9) P. Fioretto, A. Zambon, M. Rossato, L. Busetto and R. Vettor: Diabetes Care **39 Suppl 2**, S165 (2016).
- 10) K. Sharma, P. McCue and S. R. Dunn: Am. J. Physiol. Renal. Physiol. **284**, F1138 (2003).
- 11) S. Goto, K. Takeshita, Y. Suzuki, H. Ohashi, Y. Asano, H. Kimura, T. Matsushita, N. Yagi, M. Isshiki, H. Yamazaki, Y. Yoneda, K. Umetani and T. Ishikawa: Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. A. **467**, 682 (2001).
- 12) 猪俣茂樹, 羽田勝計, 守屋達美, 片山茂裕, 岩本安彦, 堺秀人, 富野康日己, 松尾清一, 浅野 泰, 槇野博史: 糖尿病 **48**, 757 (2005).

著者紹介



滝山由美

旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野 准教授

E-mail: taka0716@asahikawa-med.ac.jp

専門: 内科学・糖尿病学

【略歴】

1990年, 旭川医科大学大学院医学研究科修了。医学博士。旭川赤十字病院, ションス・ホプキンス大学, 旭川医科大学特任講師, 特任准教授を経て, 2017年より現職。



中村匡徳

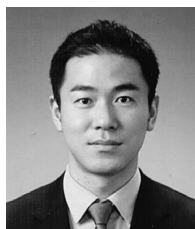
名古屋工業大学 電気・機械工学科 教授

E-mail: nakamura.masanori@nitech.ac.jp

専門: 生理流体力学, 計算生体力学

【略歴】

2003年, 北海道大学大学院博士後期課程修了。博士(工学)。東北大学, 大阪大学, 埼玉大学を経て, 2017年より現職。



世良俊博

九州大学工学研究院 准教授

E-mail: sera@mech.kyushu-u.ac.jp

専門: バイオメカニクス

【略歴】

2003年, 慶応義塾大学後期博士課程単位取得退学。2004年博士(工学)。(財)高輝度光科学研究センター, 理化学研究所, 大阪大学を経て, 2013年より現職。

Glomerular number and volume in diabetic kidney estimated by synchrotron radiation micro-computed tomography at SPring-8

Yumi TAKIYAMA

Asahikawa Medical University, 2-1-1-1 Midorigaoka Higashi, Asahikawa 078-8510, Japan.

Toshihiro SERA

Kyusyu University, 744 Motooka Nishi-ku Fukuoka 819-0395, Japan

Masanori NAKAMURA

Nagoya Institute of Technology Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555, Japan

Abstract Recent large-scale clinical studies demonstrate that sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors protect the diabetic kidney. However, clinical and animal studies have not shown the changes of the total glomeruli in the whole kidney treated with SGLT2 inhibitors. We performed computed tomography (CT) imaging on mice using synchrotron radiation to investigate the impact of luseogliflozin, a SGLT2 inhibitor, on the number and volume of glomeruli in the whole kidney. We did not observe a significant difference in the total glomerular number (N_{glom}) among mice. Luseogliflozin redistributed the number of glomeruli in different regions, accompanied by the normalization of diabetes-augmented renal volume (V_{kidney}). Diabetic *db/db* mice had a larger glomerular volume in the mid-cortex than did control *db/m* mice, and luseogliflozin increased the glomerular volume in all renal cortical zones of the whole kidney in *db/db* mice. According to the multivariate regression analysis, hemoglobin A1c level was the most relevant determinant of V_{kidney} , not N_{glom} or mean glomerular volume (V_{glom}), indicating that hyperglycemia induced renal (tubular) hypertrophy, but not glomerular enlargement. Based on our findings, SGLT2 inhibitors may alter glomerular distribution and size independent of their glucose-lowering effects.