

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591179

研究課題名(和文) 新型バーチャルスライドを用いた腎血管構築の再現と慢性腎臓病進展機構の解明

研究課題名(英文) High-resolution three-dimensional digital imaging of human renal microcirculation

研究代表者

上杉 憲子 (Uesugi, Noriko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70279264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの腎癌非癌部の手術摘出標本のパラフィン抱埋組織を用い、連続切片に100-150枚を作成し、免疫組織学的に血管や糸球体を同定し、その画像をバーチャルスライドにとりこみ、画像解析ソフトをもちい、腎内の微小循環(小葉間動脈から糸球体、輸出動脈)の3次元構築を作成を試み、成功した。この3次元構築では、2次元的な組織との比較検討ができ、また360度の回転が可能であり、血管同士、血管と糸球体の関連が直接的に観察できた。この方法は、今後血管障害による腎硬化症の解明に重要な武器となる。得られた結果について、論文を投稿している。現在Minor revisionでの審査待ちである。

研究成果の概要(英文)：We developed a new method to visualize human renal microvasculature in two- and three-dimensions (2D; 3D) using virtual microscopy. Serially cut 120-150 sections of paraffin-embedded human renal tissues from nephrectomized samples were double-immunostained with antibodies against CD34 (endothelial marker) and smooth muscle actin (arterial medial marker). Virtual microscopic images were processed with digital imaging analysis software. The resulting voxels (3 × 3 × 0.3 mm) included microvasculature from interlobular arteries to glomeruli, allowing visualization of 3D images of arteries and their direct connection to glomeruli and clarifying the underlying morphology of wall structures by corresponding 2D images.

The advantage of this method including visualizing the direct relationship between arterial changes and glomerular pathology by combining corresponding 2D and 3D images, which may provide new insight into the pathogenesis of arteriosclerotic nephrosclerosis.

研究分野：腎臓病理

キーワード：ヒト腎微小循環 3次元構築 腎癌非癌部

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病(CKD)の早期発見

①CKD は概念的には、基礎疾患は多様であるが、腎臓疾患、加齢や高血圧、糖尿病などの全身の血管障害を原因とする。CKD の問題点は、心血管系の合併症を伴い、しかもその死亡率が高いことである。CKD を早期に発見し、その進展を抑制することは現代医療の、極めて重要な課題である。

②CKD 早期発見は、アルブミン尿 (タンパク尿) をバイオマーカーとしたものであるが、糸球体からアルブミンが漏れる背景には、糸球体だけでなくその背景となる血管障害が関与していると考えられる。一方、軽症 CKD (stage 1,2) やそれ以前に出現する微量アルブミン尿でも、心血管系イベントのリスクが上昇することが 2002 年の PREVEND 研究や Pontremoli ら (CJASN 2010) により明らかにされ、日本でも Konta らは、東北地域の一般住民検診で、微量アルブミン尿を呈する症例を解析すると、加齢、高血圧、糖尿病が有意に多く、その半数は CKD stage 1,2 かそれ以前であることを示した。以上の結果は、アルブミン尿 (タンパク尿) が排泄される以前の糸球体が硬化しない段階でも血管障害が進行していることを示唆する。

(2) CKD 発症における腎内血管障害と 3 次元構築の必要性

①CKD 発症は腎内微小循環系が関与していることは明らかであるが、血管形態の変化は分節性の構築障害であり、障害の初期像を捉えるには 2 次元画像では極めて不十分である。

②早期 CKD でみられる微小循環系の生理学的な変化には、レニンアンジオテンシン系 (RAS 系)、圧負荷、自律神経が密接に関与するが、これら物質の腎内の血管や糸球体への作用は、腎臓の深さ (皮質外側、皮髄境界) によって異なることが動物実験で示されている。腎臓の部位による差は、従来の 2 次元画像による推測を超えて、高精度の 3 次元形態解析に基づくネフロン微小循環系の包括的理解が必要となる。

2. 研究の目的

軽症 CKD 群における腎内小血管の形態的变化、血管障害と糸球体障害との関連、腎臓内の部位特異的組織障害を明らかにする。

(1) そのためにヒト腎癌非癌部を用いた臨床所見と 2 次元画像解析をおこなう。ヒト腎癌非癌部は、腎臓の部位による血管や糸球体障害の同定が可能で、検体が十分量採取でき、死戦期の影響がなく尿細管や間質の状態も解析できること、免疫染色が容易であるなどと有用な点が多い。①臨床所見の解析 高血圧、高脂血症、糖尿病など血

管障害に関与する臨床症状とそれに関与する検査血管、腎機能。

②2 次元の画像解析 硬化糸球体、間質障害、動脈硬化の程度 (内膜肥厚度や硝子化率)

(2) 血管障害と糸球体、間質の直接障害の検討を確定するために、腎癌非癌部のパラフィン抱埋切片を用いた 3 次元構築を確定する。

①これを達成するためにバーチャルスライド画像からヒト癌組織の微小血管の 3 次元構築に取り組んでいる日本歯科大学の青葉らの方法を採用し、ヒト腎臓の組織での微小血管の 3 次元構築が可能であるか検討する。

②この方法において、CKD の初期での血管の構造異常を検出できるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 症例と検体の収集

①腎癌非癌部の組織検体を研究期間内に総数 80 例を目標に組織検体の収集を行う。

②臨床症状の検討：年齢、性、身長、体重、腎機能や尿所見、e-GFR、合併症 (心疾患、高血圧、糖尿病) を検討する。

(2) 3 次元画像解析

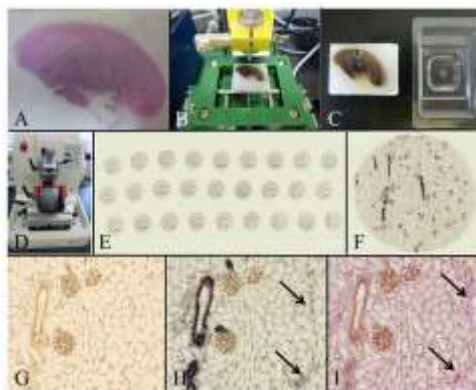


図 1

①腎癌非癌部 (A) から 3 mm 四方の検体をマイクロアレイヤー (B) を用い作成し (C)、自動薄切装置 (D) により 3 $\mu$ m 厚の 200 枚の連続切片を作成、スライドガラスに配列 (8-9 連続標本 $\times$ 3 列) する (E-F)。

②血管内皮マーカー CD34 (G) と平滑筋マーカー smooth muscle actin (SMA (F, H) の 2 重免疫染色を行い、それに PAS 染色 (I) をほどこし、それぞれの画像をバーチャルスライド (NanoZoomer、浜松ホトニクス) により対物 $\times$ 40 倍の分解能でデジタル画像として保存する (E-I)。

③連続組織画像の立体構築：バーチャルスライドにより保存された画像について、RATOC 社 TRI-SRF2 ソフトをもちい、隣接する画像間での位置合わせ操作により 3 次元構築を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト腎癌非癌部の通常のパラフィン抱埋切片からの腎内微小循環系の3次元構築に成功した。

バーチャルスライドシステムによって保存された免疫染色を施した2次元画像から、以下の画像にしめすように腎内微小循環系（小葉間動脈—輸入動脈—糸球体—輸出動脈—傍尿細管毛細血管）の3次元構築を構成することができ、この成果を後述するように国内外を含めて、学会に報告し、論文を作成した。論文は現在 minor revision の段階である。

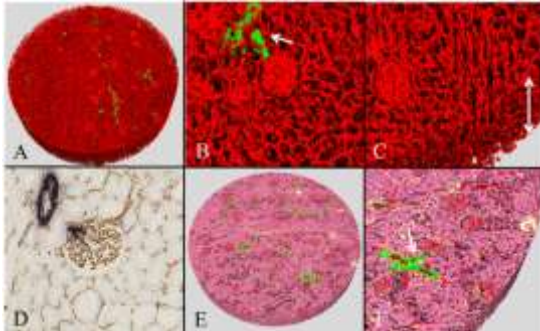


図 2

3次元画像(A-C, E-F) とその対応する2次元画像(D) A-C, E-F: 赤 CD34、緑 SMA、ピンク PAS 陽性部位 D: 茶色 CD34、青 SMA

(2) 3次元画像の構築-1 図2は、150枚の2次元の免疫染色画像(D)から、構成されたRed-Green-Blue(RGB)色調の3次元構築。2次元画像の免疫染色ではDAB発色で茶色に染色されるCD34は、RGBの色調で赤に、NBT発色にて青に染色されるSMAは、RGBで緑にあらわされる。3次元構築では、傍尿細管毛細血管網が赤で網の目状に構築され、糸球体は赤い球状に描出される(A-C)。さらに、SMAのimageを追加することにより、これらの毛細血管から動脈の識別が可能となった(B, E-F)。さらにPAS染色のimageを追加することにより、尿細管、間質、硬化糸球体の情報を得ることができる(E-F)。

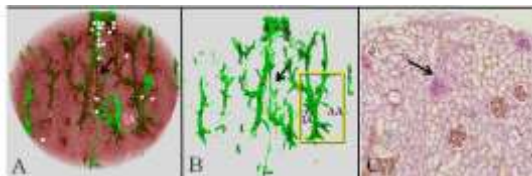


図3 A-B; 150枚の画像を重ねた3次元構築。Bは緑の色調のみ抽出し、血管樹(小葉間動脈から輸入動脈まで)の画像を得たもの。C; 2次元画像 →は硬化糸球体。

(3) 3次元画像の構築-2 図3は、図2Aを90度回転したものである。RGBの色調を変えることにより、Bのように動脈のみ

抽出することが可能である。我々の方法ではこのように多数の血管の走行を、3次元的に追うことが可能である。PAS染色を施した2次元画像では、Cの→のように硬化糸球体が同定できる。これを白の点として3次元画像(A)に描出し、硬化糸球体と血管の関係の抽出が3次元的に確認が可能となった。

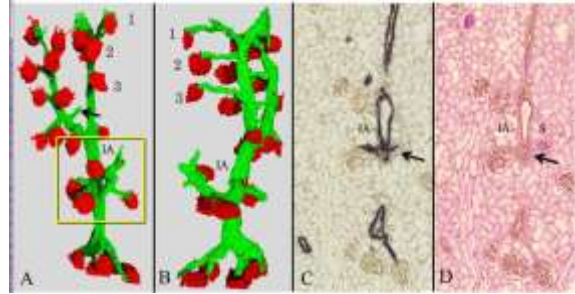


図 4

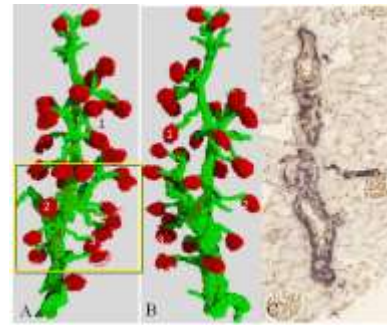


図 5

(4) 詳細な3次元構築 さらに詳細な血管構築を得るために図4、5に示すように1本の小葉間動脈とそれから分岐する輸入動脈さらに糸球体を含めた3次元構築を行った。それぞれの血管は360°の回転が可能で、個々の輸入動脈の蛇行を詳細に検討することができた。糸球体の形状の同定も可能であった。

(5) CKD早期例の画像の比較。この画像を用いてCKDの早期例を2例検討した(図4; 症例1, 図5 症例2)。いずれもCKD 2-3a相当の症例で、高血圧、糖尿病などの合併症のない症例である。腎機能は同じだが、症例2のほうが、2次元画像で硬化糸球体が多く、内膜肥厚や強く、硝子化が多い傾向にあった( $p < 0.07$ )。3次元画像では、症例2が症例1にくらべ、小葉間動脈の壁が不整で、輸入動脈の血管の蛇行が強かった。ただし、蛇行して輸入動脈につづく糸球体には明らかな変化がないことも確認され、すべての血管障害が、糸球体傷害を惹起するものではないことが明らかになった。

(6) 以上、パラフィン抱埋組織とバーチャルスライドシステムを用いたヒト腎微小循環系の詳細な3次元構築が構成できた。さらにそれが、CKDの初期の血管障害を抽出

することが可能で、CKD の発症初期の病態解明において有用な情報が得られた。さらに種々の病態における3次元構築像を本方法で検討することにより進行CKDの病態の解明にも有用であると考えられる。

<引用文献>

- ①Roberts N, Magee D, Song Y et al. Toward Routine Use of 3D Histopathology as a Research Tool. Am J Pathol 2012; 180: 1835-42.
- ②Kudo T, Shimazu Y, Yagishita H et al. Three-Dimensional Reconstruction of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma at Invasion Front. Int J Dent 2013; 13: 424-40.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ①Uesugi N, Shimazu Y, Aoba T, Kikkuchi K, Nagata M High-resolution three-dimensional digital imaging of human renal microcirculation: an aid to evaluate microvascular alterations in chronic kidney disease. Pathol. Int (in revision) 査読有
- ② Kurata M, Nose M, Aoba T et al. Microvasculature of Carotid Atheromatous Plaques: Hemorrhagic Plaques Have Dense Microvessels with Fenestrations to the Arterial Lumen. J Stroke Cerebrovasc D 2014; 23:1440-6 査読有
- ③Maruyama S, Shimazu Y, Aoba T et al. Three-dimensional visualization of perlecan-rich neoplastic stroma induced concurrently with the invasion of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2014; 43:627-636 査読有
- ④上杉憲子、長田道夫 血管炎の病理 日本腎臓学会誌 2014; 56: 87-97 査読無

[学会発表] (計11件)

- ① Noriko Uesugi, Yoshihito Shimazu, Michio Nagata. Glomerular microvascular remodeling cause polar vasculosis in human diabetic nephropathy:with Three dimensional visualization. Annual meeting of American society of nephrology (ASN), 2014 -11-14Pennsylvania Convention Center、 Philadelphia, PA, USA
- ② 腎疾患の病態解明における分子形態学の現状と今後の展望(ワークショップ) 第46回 日本臨床分子形態学会 2014年10月18日 TKP市ヶ谷カンファレンスセンター 東京 市ヶ谷
- ③ 上杉憲子 明日へのシンポジウム 腎内

動脈硬化の病理と問題点 第45回日本動脈硬化学会総会 京王プラザ 2014年7月18日 東京新宿

- ④ 上杉憲子 島津徳人、青葉孝明 長田道夫 ヒト腎組織の血管・糸球体・尿細管システムの3次元構築 103回病理学会 2014年4月25日 広島国際会議場 広島
- ⑤ Noriko Uesugi、Yoshihito Shimazu、Takaaki Aoba, Michio Nagata. Vascular Injury Promote Glomerulotubular Junction Abnormalities (GTAJ) which May Progress Chronic Kidney Disease (CKD): Three Dimensional (3D) Inspection of Vasculo-Glomerular Alterations Annual meeting of ASN, 2013 -11-6 Georgia World Congress Center、Atlanta, GA, USA
- ⑥ 上杉憲子 島津徳人、青葉孝明 長田道夫 慢性腎臓病(CDK)における糸球体尿細管接合部異常と動脈硬化の関与 第102回病理学会 2013年6月6日 ロイトン札幌 札幌
- ⑦ 腎内血管走行の3次元構築 弓状小葉間動脈の分枝と微小血管網 第101回病理学会 2012年4月24日 京王プラザ 東京新宿

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

日本歯科大学の歯学部 病理学教室のホームページに掲載

#### 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
上杉 憲子 (UESUGI NORIKO)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 70279264
- (2)研究分担者  
長田道夫 (NAGATA, MICHIO)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 10192238  
青葉 孝昭 (MONKA, SBURO)  
日本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 30028807
- (3)連携研究者  
島津 徳人  
日本歯科大学・歯学部 講師  
研究者番号: 10297947