

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08264

研究課題名(和文) IgA腎症における血尿の形態的基盤構築 ～的確で特異的な治療介入促進を目指す～

研究課題名(英文) Establishing a morphological mechanism of hematuria in IgA nephropathy. -Aiming to Promote Precise and Specific Therapeutic Interventions-

研究代表者

高木 美幸 (Takagi, Miyuki)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：80599895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではIgA腎症での血尿発症機序解明のため、FIB-SEM法を用いて3次元の係蹄壁の超微細構造解析を目的とした。まず動物腎炎モデルの観察を行ったが、予想よりも安定した血尿所見の検出が難しいことから、ヒトIgA腎症の腎生検組織を用いた解析を進めることとした。ヒト腎生検組織観察は、FIB-SEM法よりも広域な観察が可能なArray Tomography(AT)法を使用し、ヒト腎組織の観察方法を確立するとともに、これによるヒトIgA腎症腎組織(特に肉眼的血尿を認めた症例)の観察により、血尿を来す形態異常と思われる特異的な病理所見を高頻度に確認することができたため、現在論文報告準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果として、ヒト腎生検組織の3次元構造解析にAT法の利用を確立することができ、今後効率的にヒト腎生検組織観察が可能となったと考えられる。さらにはヒトIgA腎症腎組織(特に肉眼的血尿を認めた症例を抽出して)の観察結果から、糸球体係蹄壁における血尿の原因となる三次元的な構造の特定、係蹄壁構造異常による血尿発症機序の解明に近づくことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of hematuria in IgA nephropathy through ultrastructural analysis using the FIB-SEM method. Initially, we observed a mouse model of nephritis. However, detecting stable hematuria proved to be more challenging than anticipated. Additionally, because the FIB-SEM method makes it difficult to observe the entire glomerulus, we decided to use renal biopsy tissue from human IgA nephropathy for further analysis. We observed the human renal biopsy tissue using the Array Tomography(AT) method, which offers a broader range of observation than the FIB-SEM method. This allowed us not only to observe the human renal tissue more comprehensively but also to establish a reliable method for doing so with the AT technique.

By examining human IgA nephropathy renal tissues, particularly in cases with gross hematuria, we frequently identified specific pathological findings that may be morphological abnormalities resulting in hematuria.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：血尿 IgA腎症 Array Tomography法

1. 研究開始当初の背景

糸球体腎炎における**血尿**、蛋白尿は、早期治療介入が必要な疾患を発見する上で簡易かつ低侵襲で検出されるとても有用な所見である。**血尿**、蛋白尿を検出しようとする糸球体腎炎の中で **IgA 腎症**は、慢性腎不全から透析療法導入となる原因疾患のうち、糖尿病性腎症に次ぐ慢性糸球体腎炎として最も高頻度の腎炎であるが、その早期診断や根本治療法が求められる。

IgA 腎症における腎予後に関する臨床指標の中で、蛋白尿は、診断時の数値、治療介入後の数値による予後予測因子として有用であることが報告されている (Reich HN, et al. J Am Soc Nephrol. 18:3177-83. 2007)。一方で**血尿**は、IgA 腎症において高頻度で認められ、腎障害に寄与する機序が想定されているにも関わらず、血尿が生じる機序、糸球体への IgA 沈着と血尿の因果関係については明確な結論が得られていない。また、血尿の程度は糸球体炎症の程度と相関するとされ、この炎症性変化により糸球体血管壁の破綻が生じ血尿が起きると提起されているものの、十分な説明とはなっていない。

しかし近年、治療経過中の血尿が悪い腎予後と関連する可能性が報告されている (Sevillano AM, et al. J Am Soc Nephrol. 28:3089-99. 2017) 他、腎生検組織の卓上型低真空走査電子顕微鏡 (LV-SEM) を使った糸球体基底膜の観察により、糸球体基底膜に小孔、小破綻が散見され、赤血球の漏出しつつある像がとらえられるなど血尿の機序解明に期待しうる報告が出された (Masuda Y, et al. Clin Exp Nephrol. 19:427-35. 2015)。これまで糸球体の微細構造は主に透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察されてきたが、近年 Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) tomography 法により SEM 像を三次元的に解析することが可能となった。これは標本の切削と撮影を自動で行うことで、細胞の断面像を連続して得ることができ、特定領域の立体的像を再構成できる。先の LV-SEM は、簡易的に腎生検組織の光顕スライドの切片全層を部分的な立体像として観察ができる反面、糸球体基底膜のみの観察である。一方で FIB-SEM は、従来の SEM では観察困難だった細胞の裏側 (底面) なども解析可能となり、さらには細胞の結合領域における構造変化も追跡できる。最近、本学研究基盤センターが所有する FIB-SEM を用いた解析により、蛋白尿を呈する実験腎炎モデルの糸球体上皮細胞の、足突起消失過程に 2 つの形態変化を発見したことが報告された (Ichimura K. et al, J Am Soc Nephrol. 30(1):96-108. 2019)。

2. 研究の目的

本研究では、「係蹄壁障害時には基底膜の断裂・融解・小孔形成と共に糸球体上皮細胞の突起構造の消失や剥離、内皮細胞の剥離などが起きることで赤血球の尿管側への漏出、つまり血尿を来す」という仮説の元、血尿が生じている際の糸球体係蹄壁の微細構造の異常を解明するため、FIB-SEM を用いて、実験腎炎モデルマウス・ラットの糸球体係蹄壁における係蹄壁障害時の三次元構造を観察し、その微細構造の変化を分析する。さらにはこの結果をヒト IgA 腎症における糸球体の観察で検証する。

これを受けて、ヒトの糸球体疾患の病理解析へ FIB-SEM 法による立体再構築法を導入し、ヒト IgA 腎症における糸球体係蹄壁の変化を推定することが期待できる。本研究を通じ血尿とその周辺環境を形態学的に詳細に把握し、IgA 腎症における血尿発症の機序を明らかにできれば、腎炎進行度 (疾患の特異的な活動性) 評価が可能となる。

3. 研究の方法

本研究計画では、血尿が生じている際の糸球体係蹄壁の微細構造の異常を解明するため、FIB-SEM 法を用いて馬杉腎炎ラットおよび gddY マウスの糸球体係蹄壁構造の 3 次元的形態観察を行い、腎炎の活動性と腎機能によって係蹄壁障害時の糸球体上皮細胞、基底膜、内皮細胞がどのように構造変化を起こすのか分析する。さらにはヒト IgA 腎症における糸球体の観察で検証することで、ヒト腎炎における係蹄壁の微細構造の異常がどのように尿所見異常に反映されるかを解明する。これに向けて研究期間中に以下の研究項目を設定する。

(1) 活動性の高い腎炎における血尿の発生過程を観察、解析する

血尿の形態基盤解明には確実に血尿をきたす動物モデルの観察が必須であるが、馬杉腎炎は、腎糸球体基底膜に対する自己抗体によって引き起こされる血尿が認められる激しい腎疾患 (ヒトのグッドパスチャー症候群) のモデルとして古くから知られている。

・馬杉腎炎ラットの FIB-SEM 法を使った糸球体係蹄壁 (糸球体上皮細胞、基底膜、内皮細胞) を観察する

・血尿発生時の係蹄壁の構造変化 (それぞれの細胞の相互作用も含めて) を分析する

(2) 腎炎が慢性化した状態の尿所見の発生過程を観察、解析する

当教室で近年樹立した IgA 腎症自然発症マウス (grouped ddY: gddY) (Okazaki K. et al, J Am Soc Nephrol. 23(8):1364-74. 2012) は、IgA などの糸球体への沈着様式やメサンギウム増殖像がヒト IgA 腎症に似ていることから、ヒト IgA 腎症の解析に適しているモデルであり、gddY マウスは早期より腎糸球体の組織学的な炎症性変化を認め、週齢を重ねると糸球体硬化が増加して腎機能低下を来す。

・gddY マウスの糸球体係蹄壁の構造変化を FIB-SEM 法を使って観察する

- ・馬杉腎炎での観察結果を基に、血尿を来す形態変化の過程を分析する
- (3) ヒト IgA 腎症との関連性を組織学的、臨床的に検証する。最終的には IgA 腎症における腎炎進展様式(活動性)評価を可能にする

当教室では腎生検症例のうち約 4 割が IgA 腎症と診断され症例が豊富であることから、腎炎の様々なステージの組織学的活動性観察にも、早期から慢性期まで腎機能進行度にも幅広く観察可能な環境である。

・本研究参加への同意を取得できたヒト IgA 腎症症例について、FIB-SEM 法を使って糸球体糸球壁の構造変化を観察する

・gddY マウスの解析で得られた血尿の発生過程がヒト腎組織においてどのように形態変化に反映されているかを検証する

・確認できた形態変化が臨床経過、尿所見と関連性があるかどうか検証し腎炎活動性評価の可否を判定する

4. 研究成果

(1) 動物腎炎モデルの形態観察

本研究では、血尿発症機序解明のため、先にFIB-SEM法を用いて馬杉腎炎ラットおよびgddYマウスの糸球体糸球壁の形態観察を行い、その後動物実験モデルの観察から得た所見をヒトIgA腎症腎生検組織における糸球体の観察で検証することとし研究を開始した。

まず初めに、ラット糸球体の観察を行い、ラット腎糸球体糸球壁の3次元的な基本構造を明らかにすることができた。

次にラット馬杉腎炎による糸球体異常所見の観察を試みたが、予想よりも腎炎による血尿の程度、頻度が少ないために安定した血尿検出が難しく、観察糸球体での赤血球漏出像といった血尿の責任病変を捉えることが難しかった。さらには、糸球体の一部には糸球壁構造異常はみられるものの、個体差があり腎炎特異的な異常かどうかの判別が難しいことがわかった。

そこで、馬杉腎炎モデルの観察からIgA腎症モデルであるgddYマウスの観察に切り替えて、観察マウスの数を増やして形態異常の比較検討を行った。しかしながら、gddYマウスは幼齢より腎糸球体の組織学的な炎症性変化を認め、週齢を重ねるとメサンギウム増殖像と共に糸球体硬化が増加するというヒトIgA腎症の臨床経過に似た組織経過をとるものの、血尿を来す腎炎所見の検出が難しいことから、観察数を増やしても血尿に準じる特異的病理所見の検出にたどり着くことが困難であった。

そのような状況から、動物モデルの糸球体形態観察では、特異的病理所見の検出にたどり着くことが困難であると判断し、研究対象の軸を動物腎炎モデルの観察から、ヒトIgA腎症腎生検組織の観察に切り替えることとした。

(2) FIB-SEM法とArray Tomography (AT)法の比較、AT法の腎糸球体観察における具体的な観察方法の検討

ヒトIgA腎症組織の観察を行うにあたり、できるだけ多くの症例の比較検討が必要であった。

当初観察方法として予定していたFIB-SEM法は、検体処理(固定、包埋)が特殊であるため、ヒト腎生検試料を使用する場合にも、生検時にFIB-SEM用として一部検体を取り分け、特異的な処理を行う必要があり、多症例の観察に適応するにはやや煩雑であると考えられた。またFIB-SEM法では観察範囲に限られる(実用的には50 μ m \times 50 μ mが限界)ため、最大直径が200 μ m近いヒト糸球体の全体像を捉えることはできないことが問題となった。

さらに、糸球体全体の観察ができずとも、血尿所見の頻度が多ければ観察可能と考えていたが、IgA腎症で見られる血尿病変は糸球体に低密度で限局的に存在するため、動物モデルの観察結果も鑑みると、FIB-SEM法では糸球体疾患における病変を狙って観察することは難しく思われた。また腎炎の病期が進行した症例の観察には、半月体や硬化など糸球体全体に及ぶ病変の観察も必要となると考えられ、観察対象を糸球体全体とする必要があると考えられた。さらにヒト腎生検組織は希少であることから、試料を切削しながら撮影するFIB-SEM法では観察後に試料がなくなってしまうこともあり、FIB-SEM法によりヒト腎生検組織を多症例観察することは難しいと判断せざるを得なかった。

そこで、FIB-SEM法に代わる観察方法として、最近、FIB-SEM法よりも広域な観察範囲を持ち、糸球体を丸ごと観察可能なArray Tomography (AT)法が報告されるようになり(Agnes Burel et al, Development (2018) 145, dev160879. Kazuho Honda et al. Kidney Res Clin Pract 2023;42(2):155-165)、AT法はヒト腎生検組織観察に適応すると期待された。

AT法は、特定の処理を要しない通常の電顕試料ブロックを使うことができる。この試料ブロックからマイクロトームを使って1000枚に及び多数かつ広域(1000 \times 2000 μ m)の断面の連続超薄切片をリボン状に作製し、シリコンウエハーなどの硬質の基盤の上に回収の後、電子染色して、その試料をすべてSEMの反射電子モードで撮影できる(下比較表参照)。このようにAT法は、希少な試料を固定や包埋など無理なく処理できること、また、繰り返し観察できること、さらには糸球体全体像を3次元的にも観察可能とすることから、ヒト腎生検組織観察に適していると考えられた。しかしながらまだ腎組織の解析報告はまれであり、切片の回収方法や切片の連続性の確認など工夫を要したため、ヒト腎生検組織観察に適した具体的なプロトコルの確立を進めながら、次のヒトIgA腎症腎生検組織の観察に応用した。これについては現在論文報告準備中である。

ある。

	FIB-SEM法	AT法
標準観察範囲	50×50 μm x1000枚(切削厚:50nm) 詳細な検討に適しているが広範囲の観察は困難	1000×2000 μm x1000枚(切片厚:100nm) ミリメートルオーダーで広範囲の観察が可能
試料の処理	生検後特定の固定、包埋を要する	通常の腎生検で作成されたブロックを使用できる
観察後の試料	切削しながら撮影のため撮影後試料は消失する	試料が残るため、再観察可能

(3) ヒトIgA腎症症例の観察

ヒト腎生検組織における、血尿が生じた際の糸球体係蹄壁の微細構造の異常を観察するために、本研究参加への同意を取得できたヒトIgA腎症症例について、AT法を使って糸球体係蹄壁の観察を行った。

IgA腎症の観察対象の検討については、高頻度に炎症性変化による血尿所見の観察が期待できる症例として、臨床的には血尿が多く、組織学的には活動性が高い症例を中心に観察を進めたが、炎症性変化は認めるものの、赤血球漏出といった血尿所見は検出が難しかった。

そこで、血尿が確実に検出できるタイミングであれば、より高頻度に血尿を来す形態異常を観察、検証できると考え、組織学的に活動性が高い症例の中でも特に肉眼的血尿を認めた症例(かつ肉眼的血尿検出直後に生検が可能であった症例)について、糸球体全体にわたる観察を進めたところ、血尿に続くと考えられる炎症像と血尿を来す形態異常と思われる所見を効率的に確認することができた。この結果は現在論文報告準備中である。

今回の研究成果として、ヒト腎生検組織の構造解析にAT法の利用を確立することができ、今後効率的にヒト腎生検組織の3次元的な観察が可能となったと考えられる(投稿準備中)。さらにはヒトIgA腎症腎組織(特に肉眼的血尿を認めた症例を選出して)の観察結果から、糸球体係蹄壁における血尿の原因となる3次元的な構造の特定、係蹄壁構造異常による血尿発症機序の解明に近づくことができたと考えられる(投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 祐介 (Suzuki Yusuke) (70372935)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	
研究分担者	角田 宗一郎 (Kakuta Soichiro) (80551209)	順天堂大学・大学院医学研究科・准教授 (32620)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	本間 望 (Honma Nozomi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関