

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461610

研究課題名(和文) 微細構造を基盤とした蛋白尿発症機序の解明：低真空走査型電子顕微鏡を用いた解析

研究課題名(英文) Morphological diagnosis of injured podocytes in various renal diseases with proteinuria by low vacuum scanning electron microscopy

研究代表者

岡田 晋一(okada, shinichi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：50343281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：各種腎疾患の腎生検組織パラフィン切片を低真空走査型電子顕微鏡(LVSEM)で観察評価し以下の成果を得た。アルポート症候群腎組織における糸球体基底膜の網目状構造の所見は、菲薄基底膜病との鑑別に有用な可能性がある。シクロスポリンは糸球体上皮細胞足突起の配列の異常や細胞体の変化を改善する。糸球体上皮細胞体の球形化は糸球体上皮細胞障害の悪化に向かう一過程を示しており原疾患の種類にはよらない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We observed renal biopsy paraffin sections of various renal diseases patients by low vacuum scanning electron microscopy (LVSEM). The glomerular basement membranes showed characteristic coarse meshwork appearances in AS, and thin and sheet-like appearances in TBMN. Cyclosporin improved changes of foot processes of podocytes and alterations of podocytes cell bodies. Round-shaped podocytes cell bodies possibly represent injuries of podocytes in various renal diseases.

研究分野：小児腎臓

キーワード：蛋白尿 糸球体上皮細胞 低真空走査型電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

蛋白尿は糸球体基底膜、糸球体上皮細胞などの傷害で出現するがその機序は完全には明らかにされてはいない。これまで私たちは低真空走査型電子顕微鏡を用いることにより糸球体上皮細胞の形態変化が蛋白尿出現と関連があることを見いだした。しかしながら、糸球体基底膜、糸球体内皮細胞などの腎臓構成物が蛋白尿にどのように関連しているかの詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、腎臓構成細胞の形態変化とその広がり(分布)を簡易で迅速に観察可能とする低真空走査型電子顕微鏡を用いることにより蛋白尿発症の機序を分子形態学的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

以下の研究は鳥取大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号:2107)。

(1) アルポート症候群と菲薄基底膜病腎組織の低真空 SEM での検討

鳥取大学医学部附属病院小児科で診断した、アルポート症候群 4 例(男:女 3:1、年齢 3-16 歳、中央値 12.0 歳)、菲薄基底膜病 6 例(男:女 1:5、年齢 8-19 歳、中央値 10.0 歳)の腎生検組織を低真空 SEM で検討した。それぞれの診断は、糸球体基底膜型コラーゲン鎖への蛍光抗体法、透過型電子顕微鏡法により行った。

低真空 SEM での検討は、腎生検組織パラフィン切片を脱パラフィンした後、白金-ブルーもしくは PAM 染色を行い低真空 SEM(日立卓上顕微鏡 TM-1000、3000)で行った。

(2) ネフローゼ症候群モデルであるピューロマイシンアミノヌクレオシド(PAN)腎症腎組織の低真空 SEM での検討

糸球体上皮細胞障害の評価を目的として、ヒト腎生検組織では検体量も限られていることから、確実に結果を得るためにラットを用いた実験腎炎により検討した。

6週齢雄性SDラットにピューロマイシンアミノヌクレオシド(PAN)を投与しPAN腎症を作成した。シクロスポリン投与群(治療群)と対照群(無治療群)とに分け、治療群にはシクロスポリン 5 mg/kg 体重/日を PAN 投与の 2 日前から腹腔内に 13 日間連日投与した。第 10 日に血液、尿、腎組織を得た。血清総蛋白、アルブミン、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニンと 1 日尿蛋白を測定した。腎組織は低真空 SEM による検討を行った。

(3) 種々の腎疾患切片の低真空 SEM での検討

発症機序の異なる種々の腎疾患の腎組織について低真空 SEM で検討した。対象疾患は

免疫複合体により発症する膜性増殖性糸球体腎炎、膜性腎症、ループス腎炎、糸球体内皮細胞障害により発症する溶血性尿毒症症候群、尿細管間質性疾患の Fanconi 症候群、Dent 病、先天代謝異常症による間質性腎炎である。低真空 SEM での検討はアルポート症候群腎組織と同様の手技で行った。

あわせて、各症例の発症から腎生検施行までの期間、腎生検時の尿蛋白量を検討した。

4. 研究成果

(1) アルポート症候群と菲薄基底膜病腎組織の低真空 SEM での検討

アルポート症候群腎組織の低真空 SEM での検討

PAM 染色を施行した腎組織の低真空 SEM 観察により、糸球体上皮細胞や糸球体内皮細胞を除去することなくそれらの下側に存在する糸球体基底膜の形状変化が示された。糸球体基底膜の厚さの不同や網目構造が認められた(図 1)。またこれらの変化は症例により差がみられた。

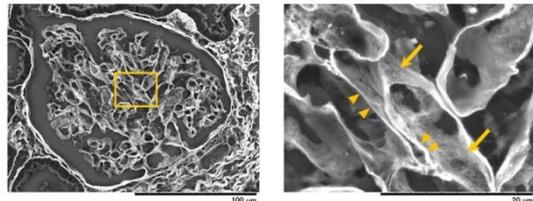


図 1 : アルポート症候群腎組織の低真空 SEM 像 (PAM 染色)。左図:弱拡大像。右図:左図四角内拡大像。糸球体基底膜の網目状構造(矢印)、厚さの不同(矢頭)が認められる

次に、白金-ブルー染色を施行後の低真空 SEM 観察では、アルポート症候群切片では糸球体上皮細胞体の球形化の所見が多くはないものの認められた。また、この所見は症例によりその有無が異なっていた。(図 2)

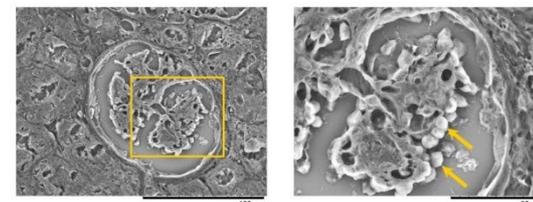


図 2 : アルポート症候群腎組織の低真空 SEM 像 (白金-ブルー染色)。左図:弱拡大像。右図:左図四角内拡大像。糸球体上皮細胞体の球形化(矢印)が認められる。

菲薄基底膜病腎組織での低真空 SEM での検討

PAM 染色施行した腎組織の低真空 SEM 観察では、一様に薄い糸球体基底膜が波打っている所見が得られたが、アルポート症候群腎組織にみられた網目構造は認められなかった。(図 3)

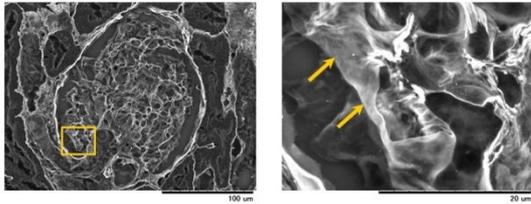


図3：菲薄基底膜病腎組織の低真空 SEM 像（PAM 染色）。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。薄い糸球体基底膜が波打っている(矢印)。

白金-ブルー染色を施行後の低真空 SEM 観察では、糸球体上皮細胞の形態はほぼ正常であった。(図4)

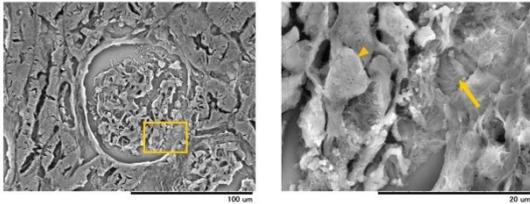


図4：菲薄基底膜病腎組織の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。糸球体上皮細胞足突起の配列の乱れはない(矢印)。糸球体上皮細胞体の形状の変化はない(矢頭)。

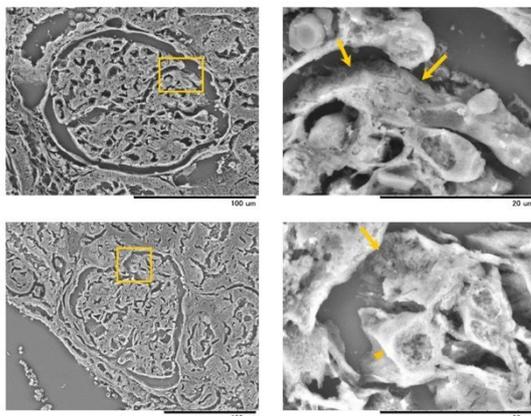
(2) ネフローゼ症候群モデルであるピュロロマイシニアミノヌクレオシド (PAN) 腎症腎組織の低真空 SEM での検討

PAN 腎症の推移

第10日の1日尿蛋白量は無治療群が678 mg+/-24.6、治療群が572.0 mg+/-21.5であり有意に治療群が低値であった(P<0.05)。血清アルブミンは両群で差がなかったが尿素窒素、クレアチニン値は治療群が高値であった。シクロスポリンによる尿蛋白減少効果が認められた。

PAN 腎症腎組織の低真空 SEM での検討

白金-ブルー染色を施行後の低真空 SEM 観察で、無治療群では糸球体上皮細胞足突起の正常なみ合わせ構造は消失していたが、治療群では足突起の構造に回復がみられた。また糸球体上皮細胞細胞体の形状は、無治療群では糸球体上皮細胞が確認できないほど荒廃した所見であったが、治療群では糸球体上



皮細胞細胞体が確認でき、球形化の所見は認められなかった。(図5)

図5(前段)：PAN 腎症腎組織の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。上段：無治療群、下段：シクロスポリン治療群。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。無治療群(上段)では、糸球体上皮細胞足突起の配列が消失している(矢印)が、シクロスポリン治療群(下段)では足突起の配列は回復し(矢印)糸球体上皮細胞体もみられている(矢頭)。

(3) 種々の腎疾患切片の低真空 SEM での検討

白金-ブルー染色を施行後の低真空 SEM 観察では、免疫複合体により発症する膜性増殖性糸球体腎炎、膜性腎症、ループス腎炎では糸球体上皮細胞足突起の配列の異常があり一部には細胞体の球形化がみられた。糸球体内皮細胞障害により発症する溶血性尿毒症性症候群では糸球体上皮細胞細胞体の球形化の所見が認められた。一方、Fanconi 症候群、Dent 病、間質性腎炎では糸球体上皮細胞足突起の異常はごく軽度のみであった。

一方、PAM 染色を施行した腎組織の低真空 SEM 観察では、疾患特異的糸球体基底膜の所見は認められなかったが、膜性腎症腎組織では基底膜への電子沈着物を認めた。(図6-14)

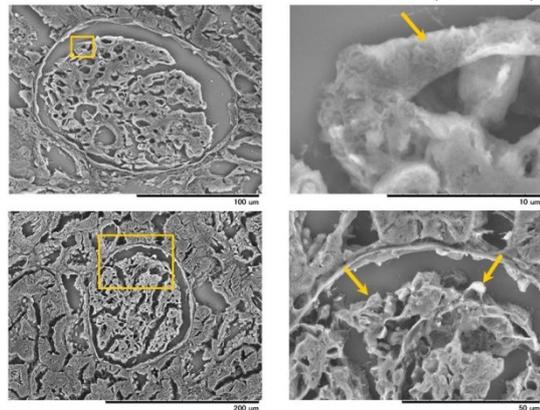


図6：膜性増殖性糸球体腎炎腎組織の低真空 SEM 像(白金-ブルー染色)。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。上段：糸球体上皮細胞足突起の配列の異常が認められる(矢印)。下段：糸球体上皮細胞体の球形化がみられる。

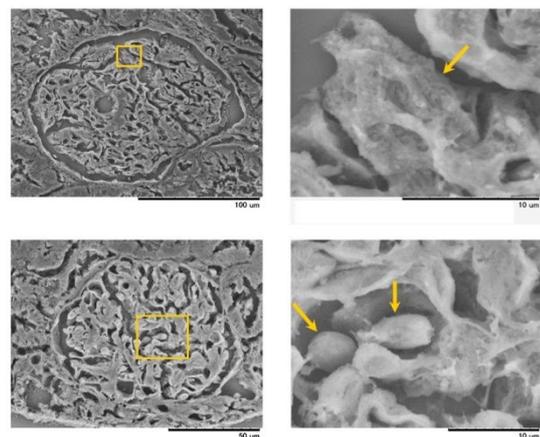


図7：膜性腎症腎組織の低真空 SEM 像(白金-ブルー染色)。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。上段

：糸球体上皮細胞足突起の配列の異常が認められる(矢印)。下段：糸球体上皮細胞体の球形化がみられる(矢印)

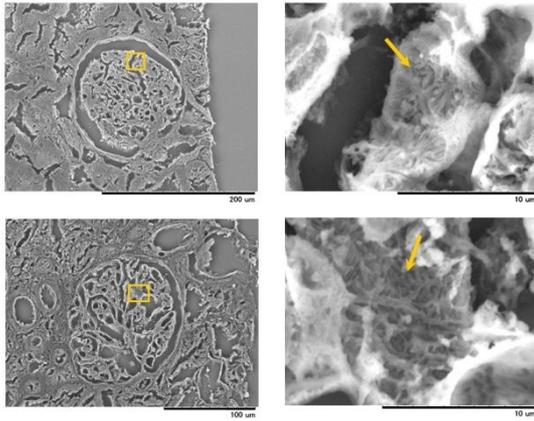


図 8：上段：ループ腎炎の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。下段：混合性結合組織病の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。糸球体上皮細胞足突起の配列の異常が認められる(上下段矢印)

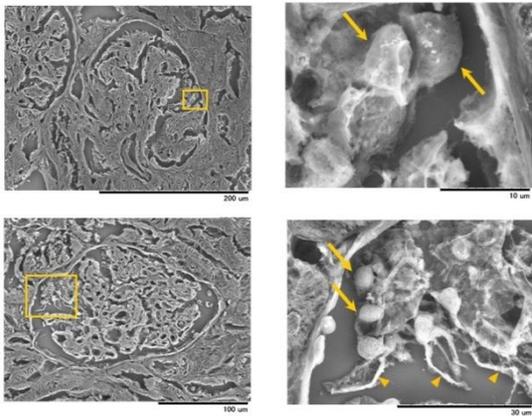


図 9：ループ腎炎の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。糸球体上皮細胞体の球形化が認められる(上下段矢印)

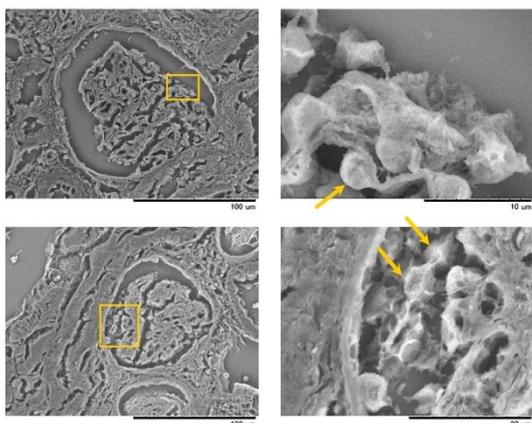


図 10：溶血性尿毒症症候群の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。糸球体上皮細胞体の球形化が認められる(矢印)

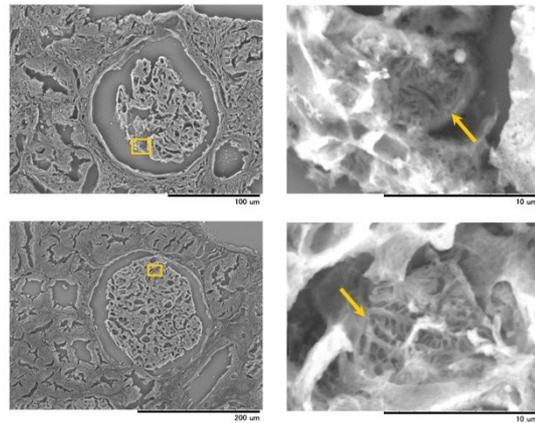


図 11：上段：Fanconi 症候群腎組織の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。下段：Dent 病腎組織の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。糸球体上皮細胞足突起の配列の異常は軽度である(矢印)。

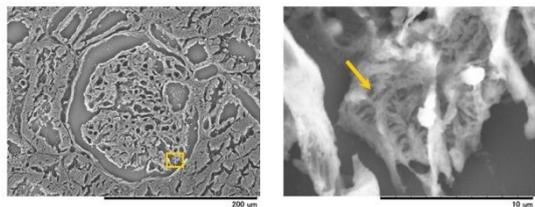


図 12：間質性腎炎腎組織の低真空 SEM 像（白金-ブルー染色）。左図：弱拡大像。右図：左図四角内拡大像。糸球体上皮細胞足突起の配列の異常は軽度である(矢印)。

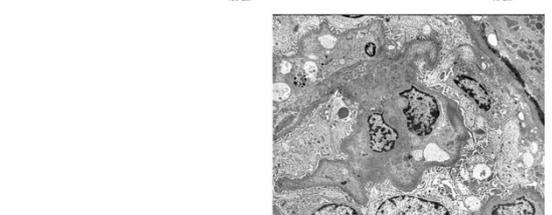
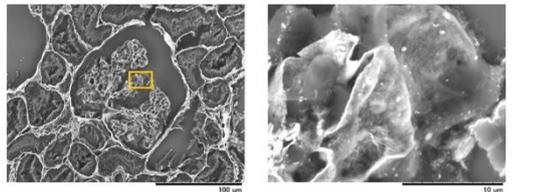


図 13：膜性増殖性糸球体腎炎の低真空 SEM 像（PAM 染色）。上段左図：弱拡大像。上段右図：左図四角内拡大像。下段：透過型電子顕微鏡像。糸球体基底膜領域には電子沈着物を軽度認める。

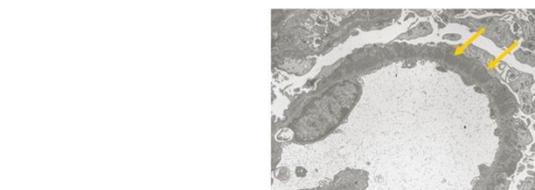
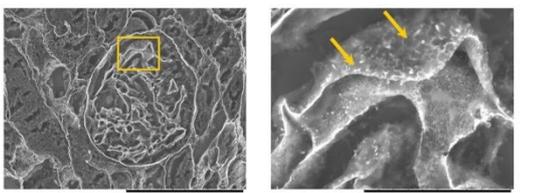


図 14：膜性腎症の低真空 SEM 像（PAM 染色）。上段左図

: 弱拡像。上段右図: 左図四角内拡大像。下段: 透過型電子顕微鏡像。糸球体基底膜領域に電子沈着物を認める(矢印)。透過型電子顕微鏡でも沈着物を認める(矢印)

上記の低真空 SEM 所見と臨床症状との関連では、糸球体上皮細胞の球形化の所見は初発時から蛋白尿が多い症例や経過の長い症例に多く、一方で腎生検施行時の尿蛋白量との関連は少なかった。

(4) 結論

低真空 SEM 観察で得られたアルポート症候群腎組織における糸球体基底膜の網目状構造の所見は、菲薄基底膜病との鑑別に有用な可能性がある。

シクロスポリンは糸球体上皮細胞足突起の配列の異常や細胞体の変化を改善する。

糸球体上皮細胞体の球形化は糸球体上皮細胞障害の悪化に向かう一過程を示しており原疾患の種類にはよらない可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Okada S, Inaga S 他 (他6名、1番目): Morphological diagnosis of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy by low vacuum scanning electron microscopy. Biomed Res 35:345-350, 2014

[学会発表] (計6件)

1. 岡田晋一、稲賀すみれ 他 (他6名、1番目): 低真空走査電子顕微鏡による各種腎疾患における糸球体上皮細胞形態変化の検討 第51回日本小児腎臓病学会 2016年7月7日~7月9日、ウインクあいち (愛知県名古屋市)
2. 岡田晋一、稲賀すみれ 他 (他7名、1番目): Alport 症候群の腎障害進行における糸球体上皮細胞の意義 第50回日本小児腎臓病学会 2015年6月18日~6月20日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
3. Shinichi Okada, Sumire Inaga 他 (他6名、1番目): Morphological alterations of podocytes in Alport syndrome investigated by low vacuum scanning electron microscopy. 52nd ERA-EDTA Congress 2015, 2015/5/28-31, London (U.K.)
4. 岡田晋一、稲賀すみれ 他 (他2名、1番目): 低真空走査型電子顕微鏡を用いた Alport 症候群と菲薄基底膜病の鑑別 第57回日本腎臓学会 2014年7月4日~7月6日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

5. 岡田晋一、稲賀すみれ 他 (他7名、1番目): 低真空走査型電子顕微鏡を用いた Alport 症候群の新規簡易診断法 第49回日本小児腎臓病学会 2014年6月5日~6月7日、秋田ビューホテル (秋田県秋田市)

6. 稲賀すみれ、岡田晋一 他 (他8名、2番目): 細胞を除去せずに腎糸球体基底膜の三次元構造解析を可能にする低真空 SEM 観察法 第70回日本顕微鏡学会 2014年5月11日~5月13日、幕張メッセ国際会議場 (千葉県千葉市)

[ホームページ情報] (計1件)

SEM 病理組織解析データベース

日立ハイテク S.I.navi

https://members.hht-net.com/sinavi/Menu/Appli/sem_patho/Pages/default.aspx

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 晋一 (OKADA Shinichi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号: 50343281

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

稲賀 すみれ (INAGA Sumire)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号: 60116358