

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08521

研究課題名（和文）足細胞におけるスリット膜の形成・消失・再生過程～電顕3D再構築法を活用した解析～

研究課題名（英文）3D morphological processes of slit diaphragm development and regeneration in podocytes

研究代表者

市村 浩一郎 (Ichimura, Koichiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10343485

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）：ポドサイトのスリット膜は血漿タンパク質の尿中への漏出を防ぐバリア機能を持つ。スリット膜はポドサイトの発生期に形成され、病態時に消失・再生するのだが、これら3つの過程の形態のプロセスは断片的にしか理解されていない。そこで、本研究では、電顕3D再構築法（FIB/SEMトモグラフィー）を活用し、「スリット膜の形成・消失・再生」の形態プロセスを立体的に完全解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで断片的にしか分かっていなかったスリット膜の形態変化を完全に解明できた。これらの成果は糸球体疾患の病態解明や診断を研究するうえで基礎的なデータとなる。さらに、FIB-SEMトモグラフィーによるポドサイト解析に関する詳細なプロトコル論文も数編出版でき、他のポドサイト研究者も本手法を活用できるようになった。

研究成果の概要（英文）：The slit diaphragms of podocytes function as a glomerular filtration barrier to prevent leakage of plasma proteins into the urine. The slit diaphragm is formed during podocyte development and disappears and regenerates during pathologic condition. These three morphological processes of the slit diaphragm alteration are only fragmentarily understood. In this study, we utilized volume electron microscopy (FIB/SEM tomography) to fully elucidate the 3D morphological processes of slit film formation, loss, and regeneration.

研究分野：解剖学、3D超微形態解析

キーワード：ポドサイト 足細胞 足突起消失 ネフローゼ症候群 FIB-SEM 3D超微形態解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ポドサイト(足細胞)は腎糸球体における血液の選択的濾過に必須の上皮細胞である。足細胞は複雑に発達した突起構築をなしており、その形態解析には走査電顕(SEM)がよく用いられる。これは足細胞がボウマン腔という広い腔に面し、SEM観察に適しているためである。従来のSEM観察により、足細胞の立体構造は大まかに理解されていたが、足細胞の接着面や糸球体毛細血管の谷間に位置する部位は従来のSEMでは観察が難しく、立体構造は完全には把握されていなかった。

そこで、研究代表者らは上述の問題を克服し、足細胞の立体構造を詳細かつ正確に解明するため、新しい電顕技術であるFIB-SEM法にいち早く着目してきた。FIB-SEM法はエポキシ樹脂に包埋された生物試料から連続超薄切片像に匹敵する画像シリーズ(数百枚)を自動で得る手法であり、連続像から任意の細胞やオルガネラを立体再構築することができる。これまでに行われた研究代表者らのFIB-SEM解析により、成熟足細胞が従来の教科書的な記載よりも複雑な構造階層を成すことが判明し、さらに、発生期における突起形成過程が解明された。

足細胞の細胞間結合装置はスリット膜と呼ばれ、足突起どうしの隙間(スリット間隙)を橋渡しする。血液はスリット間隙を通り原尿となるが、スリット膜は血漿タンパク質の原尿中への漏出を防ぐバリア機能を持つ。足細胞の細胞間結合は発生期や病態時にリモデリングされ、発生期にはタイト結合がスリット膜に置換され、病態時にはスリット膜が失われてタイト結合が再形成される。足細胞における細胞間結合の形態変化や構成分子の動態は、これまでの研究から大まかに理解されているが、突起構造のダイナミックな三次元的変化と絡めて検討されていないため、その理解は断片的なままである。

## 2. 研究の目的

スリット膜は足細胞の発生期に形成され、病態時に消失・再生するのだが、これら3つの過程の形態的プロセスは断片的にしか理解されていない。そこで、本研究では、FIB/SEM法を活用し、「スリット膜の形成・消失・再生」の形態プロセスを立体的に完全解明する。

## 3. 研究の方法

病態時の傷害足細胞において、正常なスリット膜構造が消失してタイト結合に置換わり、さらに病態の回復にともなってスリット膜が再生する形態的プロセスを観察するため、可逆性のネフローゼ症候群モデル(PAN腎症ラット)を用いる。

PAN腎症はピューロマイシン誘導体をラットに単回投与するだけで安定的に惹起できる。予備的な検討により、投与後2~7日の間に突起の再構築とスリット膜の消失し、30~50日で回復することが分かっている。そこで、スリット膜の消失過程の解析には2~7病日、再生過程の解析には10、20、30、50病日のラットを用いる各病日において、ラットを定圧灌流固定(約200mmHg)により、糸球体毛細血管壁が生時と同様にピンと張り詰めた状態で固定する。これにより、毛細血管の表面を覆う足細胞も同じように引き伸ばされ、再構築像が生時を反映した美しいものとなる。

各病実において、糸球体をFIB-SEMにより連続断面像を撮影し、得られた連続像から細胞の外形(輪郭)と細胞間結合装置を抽出・再構築する。FIB-SEMは本学に設置済みのHelios NanoLab 610(FEI社)を利用する。切削厚50nmで、約500枚の連続断面像を撮影する。

スリット膜を明瞭に可視化するため、高解像度での撮影が必要となるが、撮像の詳細な条件は予備的な検討により、ほぼ確定している。連続断面像からの足細胞の輪郭抽出と抽出した細胞の立体構築には形態解析ソフト Amira を用いる。ソフトの高度な使用法は販売業者マックスネットの技術者を適宜招き、指導を受けられるようになっている。

#### 4. 研究成果

##### 1) 3D 再構築像で見た足突起消失

基底面の観察から、足突起の消失過程には少なくとも2つの様式(1型・2型)があることが分かった。1型過程は足突起の太さが不均一になりつつ短くなっていく様式で、足細胞の全体に広く認められる。一方、2型過程は足突起が全長にわたって均一に細くなりつつ短縮してゆく。

##### 2) 足突起消失に付随する変化

###### ・自己細胞間結合の形成

PAN 腎症では、足細胞の一部で広範囲に足突起が失われることがある。これにともない、隣接する足細胞は消失部の両側から、基底膜の露出を防ぐために伸びだし、最終的に自己細胞間タイト結合 (autocellular tight junction) を形成することがある。なお、PAN 腎症はある程度自然治癒するが、自己細胞間タイト結合が、正常な構造への完全な回復を妨げている可能性がある。

###### ・断片化と断片脱落

足突起消失にともない、足細胞は様々な大きさの断片を形成する(少なくとも3つのタイプが見られる)。これらの断片は、形成初期には糸球体基底膜に接着しているが、やがて変性し、尿中へ脱落すると考えられる。このような断片のうち、大きなものには多胞体など細胞内小器官を含む場合が多く、脱落后に多胞体の内部にあるエクソソームが尿中に放出される。

##### 3) FIB/SEM 法の更なる活用

腎生検標本の病理形態解析に FIB/SEM 法を活用すべく、下記の基盤作りに取り組んでいる。

###### ・ヒトにおける正常な糸球体・ポドサイトの 3D 構造

###### ・自然加齢によるポドサイトの構造変化

ヒトの疾患を解析する場合には加齢変化と病態変化が複合している場合が多く、純粋な加齢変化を把握しておくことが必要

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ichimura K, Miyaki T, Kawasaki Y, Kinoshita M, Kakuta S, Sakai T.	4. 巻 30(1)
2. 論文標題 Morphological processes of foot process effacement in puromycin aminonucleoside nephrosis revealed by FIB/SEM tomography.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol	6. 最初と最後の頁 96-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1681/ASN.2018020139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichimura K, Kinose S, Kawasaki Y, Okamura T, Kato K, Sakai T.	4. 巻 30(7)
2. 論文標題 Anatomic characterization of the humeral nutrient artery: application to fracture and surgery of the humerus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Anat	6. 最初と最後の頁 978-987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1002/ca.22976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinose S, Kanaya Y, Kawasaki Y, Okamura T, Kato K, Sakai T, Ichimura K.	4. 巻 216
2. 論文標題 Anatomic characterization of radial and ulnar nutrient arteries in humans.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Anat	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1016/j.aanat.2017.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki Y, Matsumoto A, Miyaki T, Kinoshita M, Kakuta S, Sakai T, Ichimura K.	4. 巻 378
2. 論文標題 Three-dimensional architecture of pericardial nephrocytes in Drosophila melanogaster revealed by FIB/SEM tomography.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 289-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1007/s00441-019-03037-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyaki T, Kawasaki Y, Hosoyamada Y, Amari T, Kinoshita M, Matsuda H, Kakuta S, Sakai T, Ichimura K.	4. 巻 379
2. 論文標題 Three-dimensional imaging of podocyte ultrastructure using FE-SEM and FIB/SEM tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 245-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1007/s00441-019-03118-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyaki T, Kawasaki Y, Hosoyamada Y, Amari T, Kinoshita M, Matsuda H, Kakuta S, Sakai T, Ichimura K.	4. 巻 66
2. 論文標題 Volume scanning electron microscopy for 3D imaging of biological ultrastructure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Juntendo Med J	6. 最初と最後の頁 108-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.14789/jmj.2020.66.JMJ19-R19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----