

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19523

研究課題名（和文）系球体周囲マクロファージは基底膜を貫く樹状突起によりポドサイト恒常性を維持する

研究課題名（英文）Periglomerular macrophages maintain podocyte homeostasis

研究代表者

古橋 和弘（Furuhashi, Kazuhiro）

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50835121

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、通常の組織学的観察で見出せず、生体顕微鏡を用いることで『系球体周囲マクロファージが系球体の外からボウマン嚢基底膜を貫いて、まるでボウマン腔内に“橋”をかけるようにポドサイトに到達している』という現象を世界ではじめて見出した。マクロファージが形成するユニークな樹状突起の生物学的意味として、『系球体周囲マクロファージはボウマン腔内およびポドサイトの状況を感じることによって、ポドサイト前駆細胞の増殖・分化を調整し、系球体の恒常性を維持する』という新概念の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、通常の組織学的観察で見出せず、最新のイメージング技術である生体顕微鏡・臓器透明化を用いることで初めて観察することができたマクロファージのユニークな構造と細胞間networkに関して、その生物学的意味を解明する。独自に開発した生体顕微鏡技術・組織固定技術・組織透明化技術を融合することで、本課題の科学的問いは初めて解決することができるため、独自性の高い挑戦的な研究である。本課題は組織幹細胞niche研究に細胞形態学・細胞動態学を取り入れた新たな研究フィールドを創出し、細胞形態に関わる蛋白を治療ターゲットとした新たな治療法へと発展させ、ポドサイト再生に関わる因子の同定へ発展させる。

研究成果の概要（英文）：We found a novel phenomenon that could not be detected by conventional histological observation: periglomerular macrophages penetrate the Bowman's basement membrane from outside the glomerulus and reach the podocytes as if they were "bridging" the Bowman's lumen. As the biological significance of the unique dendrites formed by macrophages, we verified the new concept that "periglomerular macrophages regulate the proliferation and differentiation of podocyte progenitor cells and maintain glomerular homeostasis by sensing the situation inside the Bowman's lumen and podocytes.

研究分野：腎臓内科

キーワード：再生 ポドサイト 免疫

1. 研究開始当初の背景

申請者は、自身の長年にわたる免疫細胞・幹細胞研究 (Nature Communications 2020、Nature Medicine 2019、cell stem cell 2018、JASN 2013) から、各臓器に存在する組織常在免疫細胞が局所での炎症制御・幹細胞増殖の司令塔として重要な役割を担っていると考えている。申請者は、透明化および生体顕微鏡による腎臓観察という独自のイメージング技術を駆使することで、これまでの組織標本では観察できなかったマクロファージのユニークな『糸球体周囲マクロファージが樹状突起を糸球体の外からボウマン嚢基底膜を貫通して原尿が流れる内腔に伸ばしている』という現象を世界ではじめて観察した。マクロファージが形成するユニークな樹状突起の生物学的意味として、『糸球体周囲マクロファージはボウマン腔内およびポドサイトの状況を感じることによって、ポドサイト前駆細胞の増殖・分化を調整し、糸球体の恒常性を維持する』という新概念の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、通常の組織学的評価で観察できず、生体顕微鏡・臓器透明化で初めて観察することができたマクロファージのユニークな構造と細胞間ネットワークの生物学的意味を解明する。さらに組織幹細胞 niche 研究に細胞形態学・細胞動態学を取り入れた新たな研究フィールドを創出し、ポドサイト再生に関わる因子の同定を目的とする。

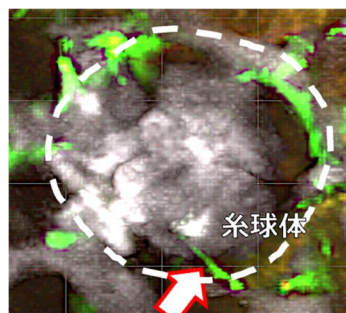
3. 研究の方法

生体顕微鏡による腎臓マクロファージの観察にて、『糸球体周囲マクロファージが糸球体の外からボウマン嚢基底膜を貫いて、まるでボウマン腔内に“橋”をかけるようにポドサイトに到達している』という現象を世界ではじめて見出した。このユニークな現象の生物学的意味を解明するため、樹状突起伸長を抑制できる conditional knock out mouse (A flox マウス) を CRISPR/Cas9 により作成する。マクロファージ特異的に gene A を欠損させるために、CX3CR1CreER マウスと A flox マウスを交配する。さらに、マクロファージによるポドサイトの恒常性維持を解明するため、遺伝子改変マウスと骨髄移植技術を使用したユニークなマウスを作成する。また、この実験系でポドサイト再生のタイミングで腎臓からポドサイトをフローサイトメトリーで抽出し、single cell RNA-Seq を行うことでポドサイト再生に関わる因子を同定する。

4. 研究成果

我々は、通常の組織学的観察で見出せず、生体顕微鏡を用いることで『糸球体周囲マクロファージが糸球体の外からボウマン嚢基底膜を貫いて、まるでボウマン腔内に“橋”をかけるようにポドサイトに到達している』という現象を世界ではじめて見出した。マクロファージが形成するユニークな樹状突起の生物学的意味として、『糸球体周囲マクロファージはボウマン腔内およびポドサイトの状況を感じることによって、ポドサイト前駆細胞の増殖・分化を調整し、糸球体の恒常性を維持する』という新概念の検証を行った。

生体顕微鏡により糸球体外マクロファージが糸球体内に樹状突起を伸ばしていることを確認していたが、臓器透明化条件を最適化することで透明化した腎臓においても糸球体外マクロファージが糸球体内に樹状突起を伸ばしていることを確認した(図1)。さらに、血球全体において樹状突起進展を阻害することで、ポドサイトの再生が促進することを確認した(図2)。また、マクロファージの樹状突起進展の阻害は、腎炎を改善させることを見出した。さらなる詳細な解析を進めるために、マクロファージ特異的に樹状突起伸長を抑制すると同時にポ

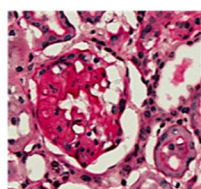


糸球体周囲において、マクロファージが樹状突起を糸球体の外からボウマン嚢基底膜を貫いて、まるでボウマン腔内に“橋”をかけるようにポドサイトに到達している

基底膜を貫いたマクロファージ

図1. 申請者が生体顕微鏡・透明化で観察したマクロファージのユニークな特徴

(A) 本マウスモデルで巣状分節性糸球体硬化症を誘導した。



(B) gene A を欠損させると蛋白尿の改善が早くなり、ポドサイトの再生を示唆する

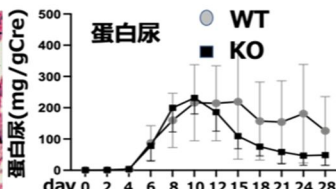


図2. Gene A は、樹状突起伸長によりポドサイト前駆細胞の再生維持に関わる

ドサイト特異的細胞障害を起こすことを可能とするマウスモデルを作成し、糸球体恒常性および再生に関わる糸球体周囲マクロファージの役割について解明を進めた。樹状突起伸長を抑制できる conditional knock out mouse (A flox マウス) を CRISPR/Cas9 により作成した。マクロファージ特異的に gene A を欠損させるために、CX3CR1CreER マウスと A flox マウスを交配した。さらに、マクロファージによるポドサイトの恒常性維持を解明するため、遺伝子改変マウスと骨髄移植技術を使用したユニークなマウスを作成し、解明を進めた。再生ポドサイトを同定しようと試みており、安定した評価同定法が完成した際には、この実験系でポドサイト再生のタイミングで腎臓からポドサイトをフローサイトメトリーで抽出し、single cell RNA-Seq を行う予定である。

本研究は、組織幹細胞 niche 研究に細胞形態学・細胞動態学を取り入れた新たな研究フィールドを創生し、樹状突起伸長に関わる標的蛋白を治療ターゲットとした新たな治療法へと発展させ、ポドサイト再生に関わる因子の同定へと結びつける独自性の高い挑戦的な研究である。

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	丸山 彰一 (Maruyama Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	田中 章仁 (Tanaka Akihito) (20846290)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	

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