

第3回

ポドサイト研究会

Japanese Society of Podocyte Biology

プログラム・抄録集

日時：2019年3月16日（土） 13:00～18:30

会場：東京医科歯科大学3号館3階 医学科講義室2

第3回ポドサイト研究会 開催のご挨拶

杏林大学医学部小児科学教室 楊 國昌

この度、第3回ポドサイトカンファレンスの開催を担当させて頂くことになりました。

3年前に、伝統ある弥彦ポドサイトセミナーが、発展的にポドサイトカンファレンスとして名称変更となりました。今回から、持ち回り開催にするということで、昨年末に河内裕先生から、開催担当のご依頼を頂きました。私自身の残された現職の時間も少ないこともあり、迷うことなくお受け致しました。

仕事場のPCの近くの壁には、今も2002年に新潟で開催された第4回国際ポドサイトシンポジウムでの集合写真を飾っています。シンポジウムは、新潟大学の有壬記念館で開催され、諸外国からも多くの著名な研究者が参加されました。懇親会は、全員が弥彦の温泉旅館にバスで移動し、大座敷で皆が畳に座り、文字通りの日本式大宴会を楽しんだことを懐かしく思い出します。私にとっては、隣りに座った基底膜研究で有名なJeffrey H Minerと知り合った記念すべき大宴会でもありました。彼には、2年前に私が主催した小児腎臓病学会で講演して頂きましたが、人との縁というのは、本当に不思議なものだと思います。

最近、ASN meetingでも、ポドサイト関連の演題は少なくなり、会場での参加人数も以前ほど多くなく、若干寂しい感があります。しかし、ポドサイト研究において解明できたことは、実際は殆どないのが現実です。ポドサイト障害の根幹を救済する新薬の開発など、やるべき事はまだまだ残されています。

今回は、一般演題12題を投稿して頂きました。どれも、新規性の高い、興味深い演題ですので、活発なご討議をお願い申し上げます。また、特別講演は、筑波大学の柳沢裕美先生に、Short Fibulins in Development and Diseaseのタイトルで、英語でご講演を頂きます。さらに、Louisville UniversityのJon Klein先生に、Proteomic Discovery in Glomerular disease : Nephrology Moves Towards Precision Medicineのタイトルでお話を頂きます。これらのご講演内容が、今後の我々のポドサイト研究の進歩に役立つことを確信しております。

懇親会は、新潟のように座敷で行いたいと思いましたが、東京では難しいため、近くの有名なフレンチの立食に致しました。ご満足頂けることを確信しておりますので、奮ってご参加下さい。それではスタッフ一同、東京で皆さんをお待ちしております。

2019年2月吉日

参加者の皆様へ

◆ 会期

2019年3月16日 土曜日 13時～18時30分

◆ 会場

東京医科歯科大学3号館3階 医学科講義室2

◆ 参加登録

当日会場受付で参加登録し、参加費をお支払いの上、ネームカードを付けてご入場ください。

◆ 会費

参加費 4,000円

懇親会費 6,000円

◆ 発表

発表時間：発表8分、質疑応答6分、計14分です。スケジュールが過密のため時間厳守でお願いいたします。

発表形式：PowerPoint2013による口演となります。PowerPoint 2013がインストールされたWindowsおよびMacのパソコンをご用意いたします。

データ受付：前日までに電子メールの添付にてデータファイルをお送りいただくか、当日会場受付にてUSBメモリーでデータをご提出ください。当日受付される場合は発表されるセッションの前のセッションの終了時間の30分前までにご提出ください。ご提出されたデータは研究会終了後に事務局が責任をもって破棄させていただきます。

PCの持ち込みについて：PCの接続準備に時間を要してしまうためできるだけ避けていただきたいと思います。どうしても必要な方は事務局までご相談ください。

◆ 懇親会会場

ビストロ備前

東京都千代田区神田駿河台4-3 新お茶の水ビル 1F・2F

◆ 連絡先

第3回ポドサイトセミナー運営事務局

杏林大学小児科 担当：田中 絵里子、牛山 久美子

〒181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2

電話：0422(47)5511 (内線3621)

e-mail: podocyte@ks.kyorin-u.ac.jp

プログラム

13時00分 開会のご挨拶

杏林大学医学部小児科学教室 楊 國昌

第1部：一般演題

口演1 13時04分～14時00分

座長：京都大学大学院医学研究科腎臓内科学 横井 秀基

1-1. PDZ 蛋白質 NHERF2 は Ephrin-B1 と相互作用し、スリット膜機能維持に重要な役割を果たす
新潟大学腎研究センター腎分子病態学分野 福住 好恭

1-2. ポドサイト障害におけるボウマン嚢壁側上皮細胞の遊走メカニズム
筑波大学大学院腎・血管病理学 井藤 奈央子

1-3. CD44 は老化に伴うボウマン嚢上皮細胞(PECs)の変化に重要である
群馬大学大学院医学系研究科腎臓・リウマチ内科学 浜谷 博子

1-4. ループス腎炎のポドサイトにおける SLAMF6 分子を標的とした機能解析と治療応用の可能性
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科先進予防医学共同専攻先進予防医学講座
リウマチ膠原病内科学分野(第一内科) 井川 敬

☕ Coffee Break (10分) ☕

口演2 14時10分～15時06分

座長：東海大学生体構造機能学/東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 松阪 泰二

2-1. FIB/SEM トモグラフィーで明らかにした足突起消失の全過程
～PAN 腎症におけるポドサイトの3D超微形態解析～
順天堂大学 医学部 解剖学・生体構造科学講座 市村 浩一郎

2-2. 透明化手法によるポドサイト及び糸球体の3次元解析
千葉大学大学院医学研究院腎臓内科学/京都大学大学院医学研究科腎臓内科学 山田 博之

2-3. 温度感受性不死化ポドサイトにおける入り組む樹状突起構造の再現
東京大学生産技術研究所藤井研究室/東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科
土肥 浩太郎

2-4. 巣状分節性糸球体硬化症における尿中ポドサイトサイズの検討
東京女子医科大学腎臓小児科 白井 陽子

☕ Coffee Break (10分) ☕

口演3 15時16分～16時12分

座長：千葉大学大学院医学研究院腎臓内科学 浅沼 克彦

3-1. Crb2 遺伝子が糸球体特異的に働かないマウスは蛋白尿を引き起こす

三重大学医学部附属病院腎臓内科 片山 鑑

3-2. Crumbs2 を介したシグナリングによる新規ネフローゼ症候群モデルマウスの樹立と解析

杏林大学医学部小児科 羽田 伊知郎

3-3. 傷害ポドサイトにおける P2X7 の役割

東海大学生体構造機能学/東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 山本 和佳

3-4. アルドステロン投与 GC-A ノックアウトマウスの糸球体病変における MMP-10 の役割

京都大学大学院医学研究科腎臓内科学 横井 秀基

☕ Coffee Break (18 分) ☕

第 2 部：特別講演

特別講演 1 16 時 30 分～17 時 20 分

座長：筑波大学大学院腎・血管病理学 長田 道夫

「Short Fibulins in Development and Disease」

Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced
Research Alliance (TARA), The University of Tsukuba

Hiromi Yanagisawa, M.D., Ph.D.

☕ Coffee Break (10 分) ☕

特別講演 2 17 時 30 分～18 時 20 分

座長：杏林大学医学部小児科学教室 楊 國昌

「Proteomic Discovery in Glomerular disease:
Nephrology Moves Towards Precision Medicine」

University of Louisville Clinical and Translational Sciences Institute

Jon B. Klein, MD., Ph.D.

18 時 20 分 事務局からご連絡

新潟大学腎研究センター腎分子病態学分野 河内 裕

18 時 25 分 次期会長からご挨拶

千葉大学大学院医学研究院腎臓内科学 淺沼 克彦

特別講演

【特別講演 1】

「Short Fibulins in Development and Disease」

Hiroshi Yanagisawa, M.D., Ph.D.

Professor of Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), The University of Tsukuba

Short fibulins are a family of matricellular proteins comprised of fibulins-3, -4, -5, and -7. Fibulin-5 was discovered as an elastin binding protein essential for elastic fiber development more than 15 years ago and we now know that fibulin-4 is also involved in elastic fiber formation as well as collagen fibril maturation by binding to lysyl oxidase, an elastin/collagen cross-linking enzyme. Whereas fibulin-5 deficient mice (Fbln5KO) live till adulthood and exhibit elongation and tortuous aortas, smooth muscle cell (SMC)-specific fibulin-4 deficient mice (Fbln4SMKO) develop ascending aortic aneurysms with activation of cofilin and disruption of actin filaments. Fbln4SMKO aortas show a marked upregulation of mechanical stress responsive molecules such as early growth response 1 (Egr1), angiotensin converting enzyme (ACE), and thrombospondin-1 (TSP1) at the early stage of aneurysm formation, which is triggered by the disruption of elastic lamina-SMC connections. Surprisingly, deletion of TSP1 prevents aneurysm formation and improves elastic lamina-SMC connections in Fbln4SMKO mice.

Fibulin-7, which domain structure is different from the rest of short fibulins, has been suggested to possess the distinct biological function(s). Fibulin-7 is highly expressed in subsets of renal tubular epithelium and almost undetectable in the aorta. Fibulin-7 is secreted and tethered to the pericellular matrix and strongly binds to heparin at the N-terminal coiled-coil domain. In cell culture, exogenously added heparin can release fibulin-7 into conditioned media. Fibulin-7 deficient mice (Fbln7KO) are healthy without obvious elastic fiber defects and are protected from high phosphate diet-induced renal calcification and fibrosis. Therefore, specific inhibitors of fibulin-7 or heparin derivatives may act as a new target for the prevention of chronic kidney disease.

【特別講演 2】

「Proteomic Discovery in Glomerular disease:

Nephrology Moves Towards Precision Medicine」

Jon Klein, M.D., Ph.D.

Professor of Medicine and Vice-Dean for Research, University of Louisville School of Medicine / Director of University of Louisville Clinical and Translational Sciences Institute / Director of University of Louisville Core Proteomics Laboratory / James Graham Brown Foundation Endowed Chair in Proteomics

In recent years, proteomic analysis has seen growing use in the identification of mechanisms of glomerular and other renal diseases. Mass spectrometry has been used successfully to identify endogenous antigens that are the targets of autoantibodies. For example, a major breakthrough was achieved when two podocyte cell surface proteins (the PLA2 receptor and Thrombospondin type-1 domain-containing 7A) were identified that bind autoantibodies present in membranous nephropathy. Recently, a member of the protein DnaJ homolog subfamily was identified as a likely target antigen in fibrillary glomerulonephritis. This presentation will explain the fundamentals of proteomic analysis and how it was used to identify the PLA2 receptor antibody as a biomarker of membranous nephropathy. New discoveries using proteomics to understand focal segmental glomerulosclerosis will also be presented.

一般演題

1-1.

PDZ 蛋白質 NHERF2 は Ephrin-B1 と相互作用し、スリット膜機能維持に重要な役割を果たす
福住 好恭、張 瑩、安田 英紀、河内 裕

新潟大学腎研究センター腎分子病態学分野

【背景】我々は、これまでの検討でポドサイトスリット膜の Ephrin-B1 が細胞外部で Nephrin と cis 結合し、スリット膜のバリア機能維持に重要な役割を果たしていることを報告した。また、Ephrin-B1 が蛋白尿を呈する糸球体でリン酸化されていることを報告した。Ephrin-B1 は PDZ 結合モチーフを有しており、PDZ 蛋白質と相互作用することが考えられるが、ポドサイト細胞質における Ephrin-B1 関連分子は不明である。

【方法】ポドサイトの Ephrin-B1 関連分子を同定するため、ポドサイト特異的 Ephrin-B1 コンディショナルノックアウト(CKO)マウス糸球体材料を用いた次世代シーケンサ解析(RNA-seq 解析)を行った。その結果、Ephrin-B1 CKO マウス糸球体において、スリット膜で発現している PDZ 蛋白質 ZO-1、MAGI1、CASK の発現は変化していなかったが、PDZ 蛋白質 NHERF2 の発現が低下していた。本研究では、NHERF2 の Ephrin-B1 との相互作用を解析した。

【結果】Ephrin-B1 CKO マウス糸球体において、NHERF2 の mRNA 発現低下、及び染色強度の低下が観察された。正常糸球体では、NHERF2 と Ephrin-B1 の共局在が観察された。発生期糸球体では、NHERF2 と Ephrin-B1 染色は、Nephrin 染色がまだ観察されない S 字管期初期の糸球体で観察された。PAN 腎症(MCNS モデル)、抗 Nephrin 抗体誘導腎症(スリット膜特異的障害モデル)の糸球体では、NHERF2 染色の低下が観察された。HEK293 細胞強制発現系を用いた免疫沈降解析により、NHERF2 と Ephrin-B1 の結合性が観察された。リン酸化が誘導された Ephrin-B1 は NHERF2 との結合が観察されなかった。

【考察】NHERF2 は、スリット膜機能分子である Ephrin-B1 と相互作用し、スリット膜の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

1-2.

ポドサイト障害におけるボウマン嚢壁側上皮細胞の遊走メカニズム

筑波大学大学院 腎・血管病理学

井藤 奈央子、坂本 和雄、佐賀 信之、川西 邦夫、長田 道夫

【背景】糸球体硬化は、ポドサイト障害とそれに反応したボウマン嚢壁側上皮細胞(parietal epithelial cell: PEC)の増殖と遊走、基質産生による局所の癒痕形成で起こる。我々は、ポドサイトはケモカインである MIF や SDF1 を発現していること、さらにポドサイト障害に伴い PEC では、細胞接着、増殖、遊走に関わる CD44 が新たに発現することに着目し、PEC がポドサイト障害を感知して障害部位へと遊走するメカニズムについて検討した。

【方法】ポドサイト特異的障害(NEP25)マウスを用い、糸球体での MIF, SDF1, CD44, CXCR4 の発現を免疫組織染色で経時的に観察した。In vitro では、不死化マウス PEC(mPEC)を用いて MIF や SDF1 で刺激し、CD44 と CXCR4 の発現変化を real time PCR および Western blotting で検討した。また Boyden chamber を用いた Migration assay により、MIF や SDF1 で刺激後、および siRNA を用いた CD44 阻害後の遊走能の変化を評価した。

【結果】免疫組織染色では、NEP25 マウスの糸球体において、ポドサイト障害の進行に伴い CD44 陽性 PEC が増加した。同時に、MIF および SDF1 の受容体である CXCR4 陽性の PEC も増加し、それらは CD44 と共発現を示した。さらに CD44 陽性 PEC では、MIF や SDF1 の発現も観察された。In vitro では、MIF および SDF1 刺激後の mPEC において、CD44 および CXCR4 の発現増強と遊走能の亢進があり、CD44 阻害によりその遊走能は低下した。

【結論】ポドサイトに発現する MIF や SDF1 は、ポドサイト障害時には PEC に CD44 や CXCR4、さらには MIF や SDF1 を誘導し、PEC の遊走能獲得に寄与している可能性がある。

1-3.

CD44 は老化に伴うボーマン囊上皮細胞 (PECs) の変化に重要である

浜谷 博子¹、Diana G. Eng²、Jeffrey W. Pippin²、廣村 桂樹¹、Stuart J. Shankland²

1. 群馬大学大学院医学系研究科腎臓・リウマチ内科学

2. 米国ワシントン大学腎臓部門

【背景・目的】 ボーマン囊上皮細胞 (PECs) は加齢に伴い PECs の活性化のマーカーである CD44 の発現が増加し、phosphorylated ERK1/2 (pERK) の発現上昇や細胞外基質の増加、上皮間葉転換 (EMT) などの変化が生じることが報告されている。また、ボーマン囊径、PECs の細胞数も加齢により増加するが、PECs 密度は低下することが知られている。CD44 ノックアウトマウス (KO) は野生型マウス (WT) に比べ巣状糸球体硬化症 (FSGS) の組織障害を軽減することが報告されている。今回、CD44 KO を用いて老化に伴う PECs の変化に対する CD44 の機能を検討した。

【方法】 WT と KO において、それぞれ若齢マウスと高齢マウスについて、計 4 群の免疫組織化学染色を施行した。各糸球体について、① WT vs KO、②若齢 vs 高齢、③皮質外層 (OC) vs 傍髄質 (JM) を比較した。

【結果】 WT では高齢の JM において分節性硬化、全節性硬化の増加を認めたが、CD44 KO では高齢でも OC、JM とも糸球体硬化はほとんどみられなかった。KO では老化に伴う糸球体肥大を抑制し、JM において糸球体上皮細胞数は保たれ、OC、JM とも糸球体上皮細胞密度の低下を抑制した。ボーマン囊径は若齢では WT、KO ともに OC に比べ JM で長く、高齢では径の拡大がみられたが、KO では WT より拡大は軽微であった。PECs の細胞数は、若齢では WT、KO ともに OC に比べ JM で多く、高齢では JM で増加がみられたが、KO では WT に比べ増加は軽微であった。PEC 密度は若齢では WT、KO ともに JM に比べ OC で低く、高齢ではそれぞれ低下したが、WT、KO で差はみられなかった。PECs における pERK、mTOR の下流の pS6RP、EMT のマーカーの α -SMA、vimentin の発現は、WT では高齢で増加し特に JM で強い発現がみられたが、KO では高齢での発現増加が抑制された。

【考察・結論】 WT の高齢マウスでは JM を中心とした糸球体硬化、糸球体肥大やボーマン囊径の拡大がみられたが、CD44 KO では軽微な変化であったことより、CD44 が老化に伴うこれらの変化に関与している可能性が示唆された。また、ERK シグナル経路や mTOR シグナル経路が CD44 に関連してこれらの変化に寄与していることが想定された。

1-4.

ループス腎炎のポドサイトにおける SLAMF6 分子を標的とした機能解析と治療応用の可能性

井川 敬、一瀬 邦弘、川上 純

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科先進予防医学共同専攻先進予防医学講座リウマチ膠原病内科学分野(第一内科)

【目的】全身性エリテマトーデス(SLE)におけるループス腎炎(LN)は生命予後を規定する重篤な病態である。LN の蛋白尿が出現する機序として、糸球体上皮細胞(ポドサイト)の形態・機能異常に起因する構造蛋白の発現低下が報告されている。このように物理的バリアとしてのポドサイトの役割は解明されつつあるが、LN でみられる免疫学的機序によるポドサイトの機能変化とそれによる腎臓への影響についてこれまで詳細に検討されていない。SLE 患者の CD4 陽性 T 細胞では Signaling lymphocyte activation molecule family 6 (SLAMF6) の発現が亢進し、IL-17 産生に関与していることが報告されている。今回、我々は SLAMF6 に着目し、LN におけるポドサイトの機能的意義を検討した。

【方法】健常人と LN 患者及び 8 週齢、16 週齢の対照群である B6 マウスと SLE 様の病変を呈するモデル動物である MRL/lpr マウスの腎組織を用いてポドサイトマーカーである nephrin と SLAMF6 の共発現を免疫蛍光染色により検討した。また B6 マウスと MRL/lpr マウスのポドサイトにおける nephrin および SLAMF6 発現をフローサイトメーターで解析した。さらにマウスの腎臓および脾臓由来の CD4+T リンパ球における SLAMF6 発現をフローサイトメーターで解析した。ヒトポドサイトを健常者と SLE 患者由来の IgG で刺激して、リアルタイム PCR によって mRNA レベルでの SLAMF6 の発現を分析した。

【結果】LN 患者及び MRL/lpr マウスの腎組織における nephrin 陽性細胞における SLAMF6 発現は、対照群と比較して亢進していた。フローサイトメトリーによる検討では、16 週齢の MRL/lpr マウスにおける nephrin 陽性細胞数は、対照群と比較して減少していたが nephrin 陽性細胞における SLAMF6 発現の割合は有意に高値であった。また腎臓、脾臓由来の CD4+T リンパ球で、対照群に比して、SLAMF6 の発現が亢進していた。健常人由来の IgG による刺激群と比較して、SLE 患者由来の IgG により刺激されたヒトポドサイトにおいて、mRNA レベルでの SLAMF6 の発現は増加していた。

【考察】今回、我々はヒトのループス腎炎および MRL/lpr マウスのポドサイトおよび CD4 陽性 T 細胞で SLAMF6 発現が亢進していることは確認できた。ポドサイトに発現した SLAMF6 はポドサイト機能に何らかの変化をもたらす可能性がある。またポドサイトは CD4 陽性 T 細胞と SLAMF6 を介して、細胞内シグナルに変化をもたらす、機能異常に寄与している可能性がある。しかしながら、SLAMF6 発現亢進がもたらす機能的意義の解明が達成されておらず、今後の検討課題である。

2-1.

FIB/SEM トモグラフィーで明らかにした足突起消失の全過程 ～PAN 腎症におけるポドサイトの 3D 超微形態解析～

市村浩一郎、坂井建雄

順天堂大学 医学部 解剖学・生体構造科学講座

演者らは FIB/SEM と呼ばれる連続撮影電顕により、足細胞の 3D 再構築像を作製し、これまでに正常なポドサイトの構造階層や発生期における突起形成過程を明らかにしてきた (*Sci Rep* 5:8993, 2015; *J Cell Sci* 130:132-142, 2017)。本研究では、これらの知見をもとに、PAN 腎症ラットにおける足突起消失の全過程を FIB/SEM 法により明らかにした (*JASN* in press)。

1) FIB/SEM 法による 3D 再構築像の作製

灌流固定を行った PAN 腎症ラットの腎組織を多重ブロック染色し、通常どおりエポキシ樹脂に包埋した。ブロックの表面をダイヤモンドナイフで切削したのち、FIB/SEM で 700 枚程度の連続断面像を取得し、ポドサイトの 3D 再構築を行った。

2) 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。

3) 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。

4) 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

げっ歯類とヒトの間で糸球体やポドサイトに構造の違いがある

・ 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

2-2.

透明化手法によるポドサイト及び糸球体の3次元解析

山田 博之^{1,2}、牧野 慎市¹、三宅 崇文²、柳田 素子²、浅沼 克彦¹

1. 千葉大学大学院医学研究院腎臓内科学
2. 京都大学大学院医学研究科腎臓内科学

【背景】慢性腎臓病において尿タンパクの有無は、腎予後および生命予後の重要な規定因子とされている。ポドサイトは腎糸球体において血清タンパクの最終濾過障壁として機能しており、尿タンパクを制御するためには、ポドサイトの詳細な形態解析は創薬開発に向けた重要なタスクの1つである。一般的にポドサイトの微細構造を観察するには、電子顕微鏡が必要であるが、3次元解析が難しいという側面がある。そこで我々は腎臓を透明化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてポドサイトが観察できれば、糸球体およびポドサイトを3次元的に尚且つ容易に観察できるようになると考えて検証した。

【方法】すでに報告されている透明化手法のうち、どの透明化手法が腎臓に適しているかを明らかにするために、ラットの腎臓を用いて **Nephrin** に対する免疫染色を行った上で、各透明化手法でラットの腎臓を透明化した。その透明化したサンプルを共焦点顕微鏡で観察し、上記の手法の中でどの透明化手法が糸球体およびポドサイトの3次元解析に適しているか検討した。また、ネフローゼ症候群の病態モデルであるピューロマイシン腎症ラット、抗糸球体基底膜抗体 **GBM** 腎炎ラットに対して透明化手法を応用して3次元的に解析した。

【結果】上記の透明化手法のうち、ほとんど全ての透明化手法で糸球体の3次元構造を構築することができた。3次元構築した糸球体を強拡大で観察した結果、一部の透明化手法において、スリット膜の折り曲がり構造を可視化することに成功した。ピューロマイシン腎症ラットでの検討では、スリット膜の折り曲がり構造が消失していることが確認できた。また、抗 **GBM** 腎炎ラットに対して透明化手法を用いて検討した結果、旧来の2次元での光学顕微鏡での検討と比べて、透明化を用いた3次元での解析は障害糸球体の検出率が有意に高かった(34.1 % vs. 14.6 %, $p<0.01$)。

【結論】**CUBIC** および **ScaleS** を始めとした蛍光免疫染色を併用した透明化手法は、ポドサイトの微細構造を3次元的に可視化することに成功した。また、3次元での糸球体解析は、旧来の方法と比較して糸球体障害を高感度で捉えることが可能であった。

2-3.

温度感受性不死化ポドサイトにおける入り組む樹状突起構造の再現

土肥 浩太郎^{1,2}、木村 啓志³、南学 正臣²、藤井 輝夫¹

1. 東京大学生産技術研究所 藤井研究室
2. 東京大学医学部附属病院 腎臓内分泌内科
3. 東海大学工学部機械工学科 木村啓志研究室

ポドサイトの形態は細胞体から伸長する一次突起と、一次突起より伸長する多くの足突起が隣接する細胞のそれと入り組み合うという特徴を持つ。しかし、単離された培養ポドサイトは、特徴的な形態を含む、生体内で発現する多くの形質を喪失する。培養ポドサイトの入り組む突起構造の再現においては、2017年に矢尾板らよりコンフルエントな細胞密度下における入り組む突起構造の培養法を報告している。その培養条件は、細胞密度以外にラミニン $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ (L521)の足場、レチノイン酸・硫酸化多糖類を含む無血清培地を特徴とし、その条件下でのポドサイトの細胞骨格においては、中間径フィラメントの一種であるビメンチンが樹状突起様に局在する。しかし、その再現が可能な細胞種は、ラット初代培養ポドサイトに限定される。

今回我々は、温度感受性マウスポドサイト(HSMP: heat sensitive mouse podocyte)を用い、矢尾板らの報告とは異なる無血清培地条件により、コンフルエントな細胞密度下における入り組む樹状突起構造を誘導する条件を発見した。その条件下で培養した HSMP のビメンチンの局在は、従来の 10% ウシ胎児血清を含む培地の条件下で培養した HSMP が細胞質内散在性パターンである事に比し、細胞核から伸長する樹状突起様のパターンをとる。

本発見は、不死化ポドサイトにおいても培養ポドサイトの細胞形態を *in vivo* 様へ誘導する事が可能である事を示唆すると考えられるため、ここに報告する。

2-4.

巣状分節性糸球体硬化症における尿中ポドサイトサイズの検討

白井 陽子¹、三浦 健一郎¹、横山 貴²、堀田 茂³、飯田 貴也¹、谷口 洋平¹、伴 英樹¹、高木 陽子¹、藪内 智朗¹、金子 直人¹、石塚 喜世伸¹、原 正則⁴、服部 元史¹

1. 東京女子医科大学腎臓小児科
2. 東京女子医科大学病院中央検査部
3. 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター病理検査室
4. 岩室健康増進センター

【背景】巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) は、微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) よりも多くのポドサイトが尿中で観察されるが、その形態はこれまで検討されていない。FSGS のポドサイトでは、Cdk inhibitor である p21 が核で陽性となることが報告されており、mitotic catastrophe の関与が論じられている。

【方法】当科に通院中の FSGS (13 例: 一次性 7 例、遺伝性 6 例)、MCNS (19 例)、糸球体腎炎 (GN 12 例: IgA 腎症 4 例、紫斑病性腎炎 4 例、ループス腎炎 1 例、ANCA 関連腎炎 2 例、感染関連腎炎 1 例) の症例で、eGFR が 60 ml/min/1.73m² 以上の症例を対象とした。早朝尿 10ml を採取し、沈渣を HE 染色で形態観察し、抗ポドカリキシン抗体と抗 p21 抗体で免疫染色をした。ポドカリキシン陽性かつ DAPI 染色で核を有する細胞を尿中ポドサイトと定義して、蛍光顕微鏡 (×400) で撮像した。画像は画像解析ソフト (Image J) を用いて、1 視野内の尿中ポドサイトの総面積を計測し、その視野内のポドサイト数で除した数値を尿中ポドサイトサイズ (×103 pixel/個) とした。中央値 (四分位範囲) で示し、Wilcoxon 検定を用いて検討した。

【結果】尿蛋白クレアチニン比は FSGS、MCNS、GN の疾患群間で有意差は認めなかった。FSGS の尿中ポドサイトは、核の腫大や二核を認めた。尿中ポドサイトサイズは、FSGS で 39.20 (31.18-66.27)×103 pixel であり、MCNS (11.22 (78.54-15.05)×103 pixel, P <0.01) および GN (9.11 (7.60-12.36)×103 pixel, P <0.01) よりも有意に大きかった。p21 の免疫染色は、FSGS の 11/11 例、MCNS の 2/16 例、GN の 7/11 例で陽性であった。

【考察】FSGS 例において、尿中ポドサイトは MCNS および GN に比し有意に大きな形態を示した。また、FSGS では核分裂の異常像が認められ、p21 陽性であることから細胞周期の制御機構の異常が示唆された。

3-1.

Crb2 遺伝子が糸球体特異的に働かないマウスは蛋白尿を引き起こす

片山 鑑¹、伊藤 雄伍²、河内 裕³、楊 國昌⁴、伊藤 正明¹

1. 三重大学医学部附属病院 腎臓内科
2. 聖路加病院 腎臓内科
3. 新潟大学 腎研究センター腎分子病態学分野
4. 杏林大学 小児科学

【背景】Crumbs 2, **Crb2** は腎臓において糸球体上皮細胞特異的に発現することが知られており、ゼブラフィッシュで **crb2** をノックダウンすると腎障害によると考えられる心不全を引き起こす。その後、ヒトにおいて 2 つのグループから **CRB2** 遺伝子の変異がステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS) 発症に関与していることが報告され (Ebarasi L et al. Am J Hum Genet 2015, Slavotinek A et al. Am J Hum Genet 2015)、**CRB2** 遺伝子が SRNS を引き起こす単一遺伝子である可能性が高まっている。しかしながら、**Crb2** フルノックアウトマウスは胎生致死になるため、腎臓における役割は解明できていない。

【方法】 **Crb2** 遺伝子の腎臓での機能を観察できるように、我々は **Cre-loxP** システムを用いて糸球体上皮細胞特異的に **Crb2** をノックアウトしたマウスを作製した。糸球体上皮細胞特異的に **Cre** リコンビナーゼを発現する **NPHS2-Cre** マウスと **Crb2** 遺伝子のエクソン 7 と 8 を **loxP** ではさんだ **Crb2** コンディショナルノックアウトマウスを交配させて、尿・血液・腎組織を 2 ヶ月齢で **NPHS2-Cre** マウス群・**Crb2 flox/flox** マウス群・**NPHS2-Cre & Crb2 flox/flox** マウス群、6 ヶ月齢で **Crb2 flox/flox** マウス群・**NPHS2-Cre & Crb2 flox/flox** マウス群で比較・検討した。

【結果】 **NPHS2-Cre & Crb2 flox/flox** マウスは、2 ヶ月齢の時点で、**NPHS2-Cre** マウスあるいは **Crb2 flox/flox** マウスと比べて高度の蛋白尿を呈することが判明したが、血清尿素窒素・血清クレアチニンは 3 群で著変なく、糸球体硬化指数や尿細管障害指数に有意な差を認めなかった。6 ヶ月齢の時点でも、**NPHS2-Cre & Crb2 flox/flox** マウスは **Crb2 flox/flox** マウスと比べて高度の蛋白尿を呈した。血清尿素窒素・血清クレアチニンは 2 群間で有意さを認めなかったが、**NPHS2-Cre & Crb2 flox/flox** マウスは **Crb2 flox/flox** マウスと比べて糸球体硬化指数や尿細管障害指数は有意に悪化していた。

【結語】 糸球体上皮細胞での **Crb2** 遺伝子の発現は、蛋白尿発症に重要な機能を司ることが示唆された。

3-2.

Crumbs2 を介したシグナリングによる新規ネフローゼ症候群モデルマウスの樹立と解析

羽田 伊知郎¹、田中 絵里子¹、小谷 昌史¹、濱野 翔¹、高橋 昌兵¹、三上 直朗¹、
西堀 由紀野¹、秋元 義弘²、森 怜香³、平山 吉朗³、清水 章⁴、楊 國昌¹

1. 杏林大学医学部小児科
2. 杏林大学医学部解剖学
3. デンカ株式会社
4. 日本医科大学解析人体病理学

【背景】ネフローゼ症候群の発症機序の詳細は未だ不明な点が多い。発症の鍵となる分子の同定には、既存の非生理的条件下におけるネフローゼモデル動物ではなく、ポドサイトの生理学的機能に基づいたモデル動物の樹立と解析が必須である。本研究では、ヒトと齧歯類のポドサイトスリット膜上部に発現する **Crumbs2**(**Crb2**)を介するシグナリング異常による新規ネフローゼモデルマウスを樹立し、その発症におけるシグナル経路を解析することを目的とした。

【方法】C3H マウスに **Crb2** リコンビナント蛋白を単回あるいは複数回で皮下免疫し、血清中の抗 **Crb2** 抗体を産生させた。抗 **Crb2** 抗体産生マウスの尿蛋白量を測定し、ポドサイトの形態変化およびアクチン繊維の変化を病理学的に観察した。次に **Crb2** と相互作用のあるアクチン線維関連分子の発現変化と機能を解析した。

【結果】3 回皮下免疫を行なった 16 匹のマウス全例において、血清中の抗 **Crb2** 抗体の上昇を確認した。また、免疫回数に関わらず全例で初回免疫の 4-7 週以降より尿蛋白が認められた。糸球体組織像は光顕で微小変化を示し、免疫蛍光染色では、ポドサイト足突起への **IgG** 沈着が観察された。**C3** の沈着はなかった。電顕像では、ポドサイトの足突起癒合と、癒合した足突起内の高電子密度領域が観察され、免疫電顕にてその領域に一致したアクチンの集積が認められた。腎組織の染色および単離糸球体を用いた発現蛋白の解析では、腎症において **Ezrin** の **Thr567** リン酸化が亢進していた。**Crb2** を強制発現した細胞を用いて共免疫沈降を行ったところ、**Ezrin** と **Crb2** の結合が証明された。また、**Crb2** 強制発現細胞へ抗 **Crb2** 抗体を投与すると、**Ezrin** の **Thr567** リン酸化が亢進することが観察された。

【考察】**Crb2** は一回膜貫通型の蛋白であり、その細胞内ドメインで **Ezrin** と結合する。**Ezrin** は細胞膜 - 細胞骨格クロスリンカー蛋白であり、その **Thr567** リン酸化によって活性が調節されている。本ネフローゼモデルマウスの尿蛋白発症機序は、抗 **Crb2** 抗体がポドサイトの **Crb2** 細胞外ドメインに作用し、その結果 **Ezrin** の過剰なリン酸化を引き起こし、最終的にポドサイト足突起内の細胞内骨格を変容させたことによるものと推察された。

3-3.

傷害ポドサイトにおける P2X7 の役割

山本 和佳^{1,2}、岡部 匡裕^{1,2}、松阪 泰二¹

1. 東海大学生体構造機能学
2. 東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科

我々は以前、hCD25 発現(+)/非発現(-)ポドサイトが混在するモザイクマウスに hCD25 特異的免疫トキシン LMB2 を投与し、hCD25(-)ポドサイトも間接的に障害されることを発見した。障害伝播の機序として DAMPs の関与が考えられた。

モザイクマウス(n=4)に LMB2 25ng/gBW を投与し、FACS で回収したポドサイトの mRNA を解析した。LMB2 投与 4 日後、DAMPs の一つである細胞外 ATP の受容体 P2X7 の mRNA が、hCD25(+)ポドサイトで 3000 倍以上、hCD25(-)で 59 倍に増加した。P2X7 は炎症や細胞死のシグナル伝達を担う。初代培養ポドサイトに P2X7 発現プラスミドを導入し ATP(1mM)を投与した。2 時間後、共導入した EGFP は 53.4%の細胞で消失し、18.6%の細胞が Propidium Iodide を取り込んだが、細胞外 LDH 活性は上昇しなかった。ATP 投与 1 時間後、28.2%の細胞で Caspase-3 活性を認めた。Caspase-3 阻害薬はこの細胞死を 27.6%抑制したが、Caspase-1 阻害薬では 4.7%の抑制に留まった。P2X7(-)や ATP(-)の対照ではこれらの反応は観察されなかった。

以上の結果、障害糸球体のポドサイトで発現が亢進する P2X7 は、細胞外 ATP による即時的細胞死の誘導に関与する可能性が考えられた。細胞死はパイロプトーシスではなく、アポプトーシスが主体であった。

3-4.

アルドステロン投与 GC-A ノックアウトマウスの糸球体病変における MMP-10 の役割

横井 秀基¹、大崎 啓介¹、加藤 有希子¹、石井 輝¹、森 慶太¹、森 潔²、向山 政志³、柳田 素子¹

1. 京都大学大学院医学研究科腎臓内科学
2. 静岡県立大学薬学部、3.熊本大学生命科学部腎臓内科学

【背景】これまで我々はポドサイトにおいてナトリウム利尿ペプチド/グアニル酸シクラーゼ-A 受容体 (GC-A)系がアルドステロンによるポドサイト障害に拮抗することを示してきた。片腎摘、アルドステロン投与、高塩食負荷 (U-ALDO) 全身性 GC-A KO マウスが高度の糸球体障害をきたすことを報告してきたが、GC-A の下流因子に関して不明な点があった。

【方法】糸球体障害に影響する遺伝子群を解析するために、U-ALDO 野生型マウスと U-ALDO GC-A KO マウスの糸球体 mRNA 発現変化をマイクロアレイにより解析し、GC-A KO 群で上昇する matrix metalloproteinase-10 (MMP-10)を同定した。そのため、全身性 GC-A KO マウスと全身性 MMP-10 KO マウスを交配して全身性 GC-A/MMP-10 ダブルノックアウト(DKO)マウスを作製し、U-ALDO 負荷下の血圧及び腎障害について検討し、その機序を解析した。

【結果】MMP10 発現は U-ALDO 負荷 GC-A KO マウスにおいて糸球体内の細胞、特に内皮細胞に発現亢進を認めた。GC-A/MMP-10 DKO マウスでは全身性 GC-A KO マウスと比較し、U-ALDO 負荷において、投与 4 週におけるアルブミン尿が 80%低下した。DKO マウスでは GC-A KO マウスと比較して糸球体腫大やメサンギウム領域拡大の改善を認め、WT1 染色で podocyte 数が維持されていた。さらに、電子顕微鏡所見にて DKO マウスで foot process effacement 及び GBM 肥厚の軽減を認めた。血圧は差を認めなかった。また、培養ヒトポドサイトに TGF-β 刺激を加えると、MMP-10 発現の上昇を認めた。次にヒト腎生検組織において MMP-10 発現を検討したところ、ANCA 関連血管炎、ループス腎炎や IgA 腎症の糸球体で発現亢進を認めた。最後に、MMP-10 が分解する基質としてネフリンに着目し、活性化ヒト MMP-10 とリコンビナントヒトネフリンを試験管内で反応させ、MMP-10 がネフリンを分解することを明らかにした。

【結論】アルドステロンを投与した GC-A KO マウスで MMP-10 を欠損させると腎障害が軽減し、MMP-10 阻害が治療標的になる可能性が想定される。