

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	電界放出形走査電子顕微鏡を用いた糸球体足細胞変化の解析 —3D Array tomography 法による表現型解析—
キーワード	① 糸球体上皮細胞、② 電子顕微鏡、③ 立体画像構築

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	サネヨシ テイナ 實吉 帝奈
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	久留米大学医学部 内科学講座 (腎臓内科部門) 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	久留米大学医学部 内科学講座 (腎臓内科部門) 助教
プロフィール	鹿児島県出身。2012年福岡大学医学部を卒業し、2014年に久留米大学内科学講座 (腎臓内科部門) に入局。現在は久留米大学病院で透析室管理や新患外来等を担当し、関連病院の腎臓内科外来を行っています。

1. 研究の概要

(1) 腎疾患の中でネフローゼ症候群を呈する疾患に、微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS)、膜性腎症 (MN)、巣状糸球体硬化症 (FSGS) が挙げられる。この3つの疾患を比較し、その形態学的特徴について検討した。中でも特徴的な上皮細胞障害を呈する MN において、IgG 沈着、PLA2R との関連を調べた。

① 2016年4月～2021年3月に本学研究施設で腎生検を行ったネフローゼ症候群を来す腎疾患のうち、MCNS(18名)、MN(32名)、FSGS(4名)を抽出し、PAS染色にてポドサイトの形態異常を解析するとともに、蛍光免疫染色による IgG 沈着と糸球体 PLA2R 発現量を Image J を用いて定量化し評価した。

(2) 膜性腎症の上皮細胞に焦点を当て、電子顕微鏡を使い、より詳細な形態変化を観察した。

① 過去に腎生検を施行した症例から検体を選択し、連続切片を作製、染色する。CLEM法を用い、糸球体の病変を観察し、光学顕微鏡と電子顕微鏡での相互関係を明らかにする。3D Array tomography法を用い、糸球体の3次元構造構築を行う。糸球体基底膜の病変を立体的に評価し、その周囲組織との関連を調べ、疾患の形態学的特徴を解明する。

2. 研究の動機、目的

腎疾患の確定診断において、腎生検による病理組織診断は極めて重要である。進行度や予後の評価を行うことで個々に合わせた治療が可能となる。しかし、組織の評価が解明できない症例に度々遭遇する。腎臓の糸球体には足細胞という糸球体の表面を成す上皮細胞が存在する。血液濾過の最終バリアとして働き、血漿タンパク質が尿中へ漏れ出るのを防ぐ重要な役割を持つ。上皮細胞障害は、MCNS、MN、FSGSなど多くの腎疾患で見られるが、その病態は未だ解明されていない。今回、本学研究施設で腎生検を行った症例の中で MCNS、MN、FSGS を比較し、その背景や形態学的特徴について検討した。

腎組織評価は、光学顕微鏡と蛍光抗体法、電子顕微鏡の3つを総合して行うが、それぞれ別の標本から作製するため、形態評価に限界が生じていた。その解決策として、低真空走査電子顕微鏡（低真空SEM）を用い、光学顕微鏡と電子顕微鏡を同一検体で照らし合わせて評価するCLEM法（Correlative light and electron microscopy）が構築されているが、その解像度は高くなく、立体構造を解析するのにも限界がある。電子顕微鏡においては、透過型電子顕微鏡法（Transmission Electron Microscopy: TEM）が主流であるが、試料の作成と画像の解析には手間と高度な技術を要し、診断が確定するまで数週間かかることもある。近年、集束イオンビーム複合加工観察装置（Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscope: FIB-SEM）を用いた糸球体の立体構造解析が研究されているが、広範囲で高解像な立体像は未だ解明できておらず、その報告も多くはない。2020年に電界放出形走査電子顕微鏡（JSM-IT800）が開発され、本学は全国医科大学で唯一導入している。これにより、広範囲・高解像度な画像評価が可能となった。今回、我々の研究で上皮細胞変化が特に目立った膜性腎症において、JSM-IT800を用いて、より詳細な形態変化を観察することとした。既報の形態変化としては、糸球体基底膜のspike、bubbly appearanceや高電子密度沈着物像が一般的であるが、本学研究施設においては、膜性腎症において上皮細胞の基底膜からの挙上や多核といった変化を多数の症例で確認した。CLEM法を用いて上皮細胞の変化と基底膜、その他小器官との関連や高電子密度が糸球体においてどのような立体構造をとっているかを解明する。また、3D Array tomography法を用い、上皮細胞の立体構造を明らかにする。上皮細胞の形状、走行を立体的に視覚化し、基底膜や内皮細胞など周囲の組織との関連を評価することで、疾患の特徴を捉え、新たな診断方法や病態解明につながると考える。

3. 研究の結果

(1) MCNS、MN、FSGSの3群間において、MCNSに比べ、MNとFSGSで上皮細胞の細胞質腫大（Podocyte cytoplasm）を有意に認めた（Figure1）。MNはMCNSに比べ有意に上皮細胞の基底膜からの挙上（Bridging）を認めた（Figure1）。MNにおいて、上皮細胞の細胞質腫大と基底膜からの挙上の程度はIgG沈着量と明らかな相関は認められなかったことから（Figure2）、MNの発症機序である基底膜への免疫複合体の沈着は上皮細胞障害とは関連しないと考えられる。MN症例においてBridgingがPLA2R発現量と有意な相関を認め（Figure3）、蛍光免疫染色では肥大した上皮細胞の細胞質にPLA2Rが過剰発現している像が高率に存在することから（Figure4）、PLA2Rに対する自己抗体がMNにおけるポドサイト障害の主因である可能性がある。

Figure 1: 疾患毎におけるポドサイトの粗大病変数

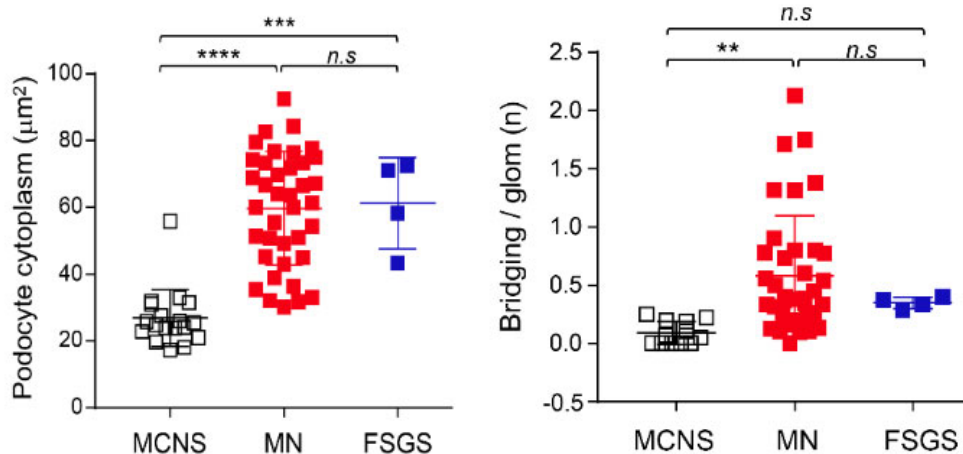


Figure 2: 膜性腎症における粗大病変とIgG沈着の相関

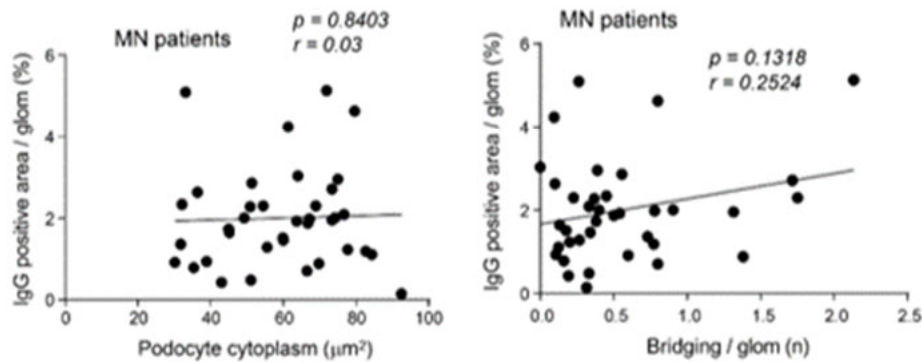


Figure 3: 膜性腎症における粗大病変とPLA2R陽性率の相関

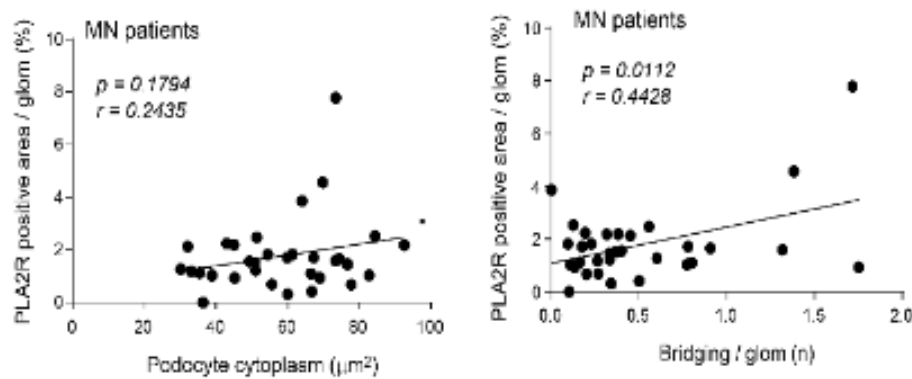
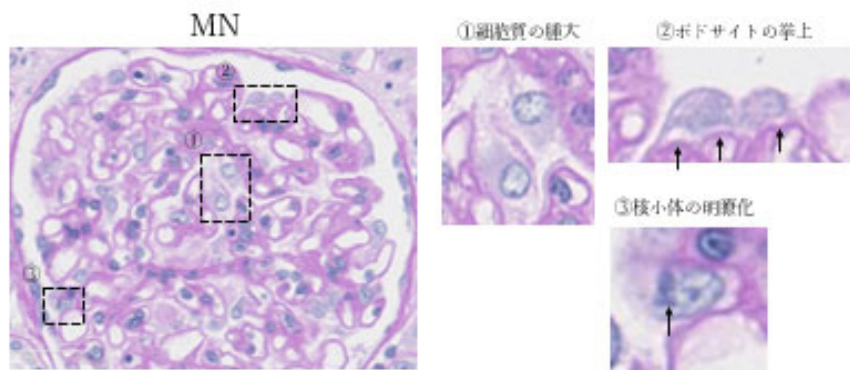
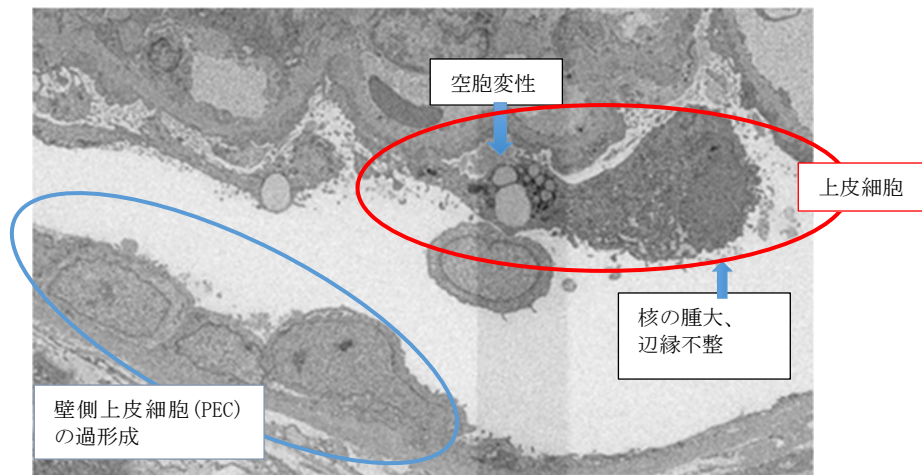


Figure 4: MN症例におけるポドサイト粗大変化



(2) 過去に膜性腎症と診断された症例の腎生検組織(エポンプロック)を50nmの厚さで793枚薄切を行った。ウランで電子染色を行い、JSM-IT800で上皮細胞とその周辺を観察した。上皮細胞の変化としては、糸球体基底膜からの挙上、辺縁不整でいびつな形態変化を確認した。上皮細胞内には空胞変性を多数認め、核は腫大し、辺縁不整な形態変化を認めた。また、周辺には上皮細胞の微絨毛化を認めた。変性している上皮細胞形の近傍には、ボウマン嚢に存在する壁側上皮細胞(PEC)の過形成を認め、上皮細胞の変性に反応している可能性がある。



4. 研究者としてのこれからの展望

今回、膜性腎症で上皮細胞変化を多数認め、PLA2R に対する自己抗体がその原因である可能性が示唆された。また、JSM-IT800 による連続切片を観察すると、上皮細胞障害と PEC に何らかのつながりがある可能性がある。今後、撮影範囲を絞り、より精細な画像に仕上げることで、上皮細胞とその周辺のオルガネラの詳細な形態変化を観察する。(2) に関しては、立体構築が完成しておらず、今後研究を進め、立体構築を目指す。また、光学顕微鏡での上皮細胞変化と同病変部位を JSM-IT800 で照らし合わせ、形態の関係性を観察する。膜性腎症に限らず、Fabry 病など他腎疾患に関しても同様に光学顕微鏡と JSM-IT800 で病変部位の比較を行い、立体構築を評価する。糸球体基底膜と上皮細胞、内皮細胞の関係を立体的に明らかにし、これまで腎組織診断でも原因がわからなかった糸球体病変に対して、形態学的特徴が解明される可能性がある。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

今回、腎組織形態変化に着目し、疾患毎の特徴を把握することで、今後の腎組織診断の一助となり、またこれまで原因が明らかになっていない腎疾患の病態解明につながる可能性があります。まだ研究に足を踏み入れた段階ですが、今後もこの研究を進めて新たな発見が出来ればと思います。ご支援いただき誠にありがとうございます。