

第21回例会 開催報告

小児科学教室

楊 國 昌

杏林医学会第21回例会講演会は、新潟大学医歯学総合科腎研究施設構造病理学分野から、以下のお二人の先生方をお招きした。現在、腎の糸球体上皮障害は、多彩な腎疾患の病態の主因と考えられている。両講師は、糸球体上皮障害を惹起する責任分子や障害の新たな指標の同定について研究されている。以下に、ご講演の内容の要旨を示す。

講演1. In vivoに近い糸球体上皮細胞の培養法

矢尾板 永信

糸球体上皮細胞は足細胞と呼ばれるように細胞突起の発達した高度に分化した細胞である。しかし、その培養細胞は、細胞株はもちろんのこと、初代培養であってさえも、多くの特異形質を失い、特異的遺伝子の発現を低下させている。生体と同じ密な培養条件で見ると、足細胞様形態は失われ、緻密な一次突起・二次突起のない単純な形となっている。

我々は、これまでラット足細胞の初代培養を用い、ヘパリンの添加と胎児ウシ血清の濃度低下によって、足細胞特異的な遺伝子発現が顕著に増大することを報告してきた(Nephrology (Carlton). 19: 195-201, 2014)。これを基に、形態が生体内の状態に近づく培養系の確立を試みた。生体では、細胞が密に寄り添っていることから、細胞間に隙間の無い培養条件を細胞外基質のコートイングから検討した。その結果、fibronectin, collagen type Iに比べ、lamininが高率に隙間の無い状態をもたらすことがわかった。lamininコートイング、胎児ウシ血清の濃度低下、ヘパリンの添加の組み合わせにより、培養数日で一部の細胞に細胞突起の伸長が認められた。さらに分化誘導を引き起こすことが報告されているレチノイン酸(ATRA)を加えたところ、培養4日目より著明な細胞突起の伸長とかみ合わせが形成され、足細胞様の形態が形成された。細胞間には、スリット膜構成分子nephrinとpodocinの集積が観察され、その細かい曲線を描く分布から、未発達ながら二次突起の形成も示唆された。細胞密度の検討から、この形態形成には、生体内に相応する細胞密度が必要であることもわかった。

以上の培養条件は、足細胞の形質維持のメカニズムを探るうえで有用な手段になると考えられる。

講演2. EMARS法によるタンパク質複合体解析：糸球体上皮細胞間接着装置を構成するタンパク質群の同定

吉田 豊

上皮細胞間は通例強い力学的負荷に耐える接着結合とデスモゾームによって接着している。しかし、基底膜を介して糸球体毛細血管を取り囲んでいる腎糸球体上皮細胞(ポドサイト)の足突起間の接着部位にはこれらの細胞間接着装置は存在せず、スリット膜と呼ばれる特殊な細胞間接着装置とタイト結合が存在する。

糸球体毛細血管には濾過圧として働く高い血圧に起因する強い張力が生じている。この張力に耐える構造をスリット膜とタイト結合のみで説明することには疑問がある。我々は、ポドサイトの細胞間接着装置の新規構成分子を発見することを目的として、Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)法を用いて細胞表面タンパク質複合体解析を行った。

EMARS法は、生細胞の任意の膜表面タンパク質の近傍(200-300nm)にある分子群を細胞外からfluoresceinで標識し同定する方法として近年開発されたものであり、膜タンパク質の細胞外ドメインを認識する抗体を用いて、標識分子をhorseradish peroxidase (HRP)で標識後、fluorescein-tyramideを加え、発生したラジカルにより周辺の分子をfluorescein標識する反応を利用している。生じたラジカルは速やかに活性を失うため、この反応はHRPの近傍に限定される。

我々はポドサイトの細胞間接着装置の構成分子を網羅的にfluorescein標識するため、スリット膜の構成分子であるnephrinの細胞外領域を認識する5-1-6抗体をラットの単離糸球体に反応させ、抗fluorescein抗体を用いた免疫沈降法により標識タンパク質を回収し、質量分析計でタンパク質を同定した。糸球体単離は、通常のsieving法ではポウマン囊に覆われた糸球体が多くなるため、磁気ビーズで灌流後、コラゲナーゼで消化する方法を採用し、ほぼ100%ポウマン囊のない単離糸球体を用いた。これらの方法により、既知のスリット膜構成分子nephrin, Nephl, podocinに加えて、JAM-A, claudin-5, GLEPP1, CAR, CRB2, Thsd7aなどの微量成分まで同定できることがわかった。