

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大山 富三
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 920 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Distinct differences between cultured podocytes and parietal epithelial cells of the Bowman's capsule
(培養ポドサイトと培養ボウマン嚢壁側上皮細胞の明確な違い)

論文審査委員 主査 教授 河内 裕
副査 教授 成田 一衛
副査 准教授 三上 剛和

博士論文の要旨

背景と目的

腎糸球体のポドサイトとボウマン嚢壁側上皮細胞 (PEC) は、形態学的にも発現する遺伝子タンパク質でも明らかに異なるが、糸球体病変ではポドサイトは特異形質を失い、PEC はポドサイトマーカーを発現し、両者の区別を困難にしている。培養でも、病変と同様の変化が起こる。ポドサイトは特異的構造である細胞突起の嵌合、スリット膜を失い、PEC のような単純な形態をとる。同時にポドサイト特異的遺伝子の発現は極端に減少する。一方、PEC は、発現レベルは低いもののポドサイト特異的遺伝子を発現するようになる。このように培養では両細胞の特性の違いが曖昧になり、細胞の同定および細胞の分化形質を研究する上で問題となっていた。

培養でポドサイトと PEC の区別が不明瞭となる主な原因の1つは、ポドサイトが培養中に特異形質を失うことにある。最近、申請者らは、ポドサイトが分化形質を再現する培養条件を確立した。本研究では、この条件下で同じように培養されたポドサイトと PEC を比較することによって両者の細胞の特徴の違いを明らかにできるかどうかを検討した。

方法

ラットの腎臓を6・mの鉄粉粒子を含むPBSで灌流し、鉄粉粒子を糸球体に留めた。ポドサイト培養の場合、灌流腎臓の腎皮質を細切し、コラゲナーゼで消化後、100・mのセルストレーナーに通し、磁石で糸球体を集めた。得られた糸球体は、ほぼすべてがボウマン嚢で覆われていない糸球体であり、ここから生えだしてきた細胞をポドサイト由来とした。PEC 培養の場合、コラゲナーゼ消化を行わずに従来の段階的なシービング法で灌流腎皮質から糸球体を分離し、さらに磁石を用いて尿細管の混入を1%程度までに抑えた。これ得られた糸球体の半分はボウマン嚢で覆われていた。コラゲナーゼ消化無しでのシービング法ではポドサイトが傷害されることから、この糸球体培養で増殖してきた細胞を PEC 由来とした。それぞれの単離糸球体を、5%胎仔牛血清(FBS)を含む培地で4日間培養後、生えだしてきた細胞を継代培養した。継代培養で

は、ラミニンコーティングしたスライドガラスに、コンフルエントになる細胞密度で培養を行った。継代6時間後に培地を0.5%FBS, 0.2 mg/ml 硫酸デキストラン(DS), 0.2・M ビタミンA 誘導体(ATRA)を含む培地に変え、更に24時間後、培地を0.2・M ATRAのみを含むFBSおよびDSを含まない培地に変えた。これ以降はこの0.2・M ATRAのみの培地で維持培養し、免疫染色、遺伝子発現定量の実験に用いた。

結果

単離糸球体の初代培養では、ポドサイトは細胞突起を伸長し、しばしば隣接する細胞と交差し、細胞間には隙間が見られた。これに対し、PECは細胞同士が交差することなく、隙間なく結合し単層の敷石様多角形の形態を示した。継代培養後、ポドサイトは、コンフルエントにも拘らず細胞突起を伸長し、継代培養6日目には生体内の形態と酷似した突起同士の嵌合を形成した。一方、PECは敷石様形態を維持したままであった。アドヘレンス結合(AJ)構成成分である α -カテニン、カドヘリン6を免疫染色で調べると、ポドサイトでは培養初期に部分的に染色が見られたが、継代培養4日目以降には消失していた。PECでは初代および継代培養の全期間を通して細胞全周性に明確な染色が見られた。ポドサイトマーカーであるポドシン、ネフリンの免疫染色では、継代培養4日目以降、すべてのポドサイトに強い染色を示したが、PECには検出されなかった。また、ポドサイトマーカーであるWT1、シナプトポディンは、ポドサイトに比べ弱かったものの、PECに有意に染色された。PECマーカーのPAX8は、PECは全ての細胞で常に陽性だったが、ポドサイトでは初期に一部の細胞のみが陽性であったが、継代培養では経時的に消失した。RT-PCR法でポドサイトおよびPECマーカーの遺伝子発現レベルを測定したところ、ポドサイトとPEC双方にそれぞれのマーカーを検出したが、免疫染色と一致して発現レベルは有意に差があった。

考察

実験で用いた2種類の培養細胞は、両方とも単離糸球体由来でありながら形質が明らかに異なっていたこと、継代培養以降の細胞形態、免疫染色、特異遺伝子発現が生体内のポドサイトとPECに酷似していたことから、それぞれポドサイト由来とPEC由来と考えられた。

ポドサイトが見せた細胞間隙、細胞突起の伸長、隣接細胞との交差は非上皮細胞に観察される性質であり、PECの敷石様多角形の形態は典型的な上皮細胞の特徴である。これらは、両者の違いを端的に示している。カドヘリンを介した細胞間結合(AJ)構成分子の発現量の差はこの違いを説明しうる。

ポドサイトはPECマーカーを、PECはポドサイトマーカーを、低レベルではあるが発現していることが示された。したがって、従来、培養細胞がポドサイト由来である根拠として、ポドサイトマーカーの発現のみが挙げられてきているが、PECと区別する上でPECマーカー発現が低いことを示すことも必要である。

以上から、本研究の培養条件は、ポドサイトとPECの細胞生物学的な解析に貢献していくものと期待される。

審査結果の要旨

腎糸球体のポドサイトとボウマン嚢壁側上皮細胞(PEC)は、明らかに異なる細胞であるが、培養での特異形質の消失によって、両細胞の区別が困難になっている。本研究は、ポドサイトの分化形質を再現する培養条件下でポドサイトとPECを培養し、その違いを明らかにすることを目的とした。ラットを使い、磁気ビーズ灌流とコラゲナーゼ消化による糸球体単離からポドサイトを、従来の多段階的シービング法での糸球体単離からPECを培養し、胎仔牛血清を含まず、デキストラン硫酸、レチノイン酸を含む培地で培養した。その結果、本培養条件で、ポドサイト特異タンパク質、特異遺伝子の発現がポドサイトにPECよりも極端に多く、逆にPEC特異タンパク質、特異遺伝子の発現がPECにポドサイトよりも極端に多かったことから、本研究で使った細胞の由来が確かめられた。また、ポドサイトは常に細胞突起を伸展する傾向があり、

PECは常に敷石状配列を示した。これら形態の違いは、カドヘリン、カテニンの発現がポドサイトに少なく、PECに多いことに関連付けられた。

本研究は、ポドサイトとPECの違いを培養系で初めて明確に示し、また用いた培養細胞の由来に根拠を与えたもので、学位論文としての価値を認める。