

糸球体上皮細胞障害マーカーとしてのデスミン (小児腎疾患の進行阻止に関する研究) (進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究)

木原 達, 矢尾板 永信, 山本 格

4系統(SHR, WKA, Lewis, F 344)のラットを用い、腎糸球体上皮細胞のデスミンを間接蛍光抗体法、及び免疫電顕法で検索した。デスミン陽性上皮細胞の数、デスミン陽性の程度は、系統、糸球体、細胞間に差がみられた。各系統とも、10週齢のラットに比し、25週齢のものでは、デスミン陽性細胞の数、及び週齢のものでは、デスミン陽性細胞の数、及び程度は増していた。アミノヌクレオシド腎症では、尿蛋白の推移に並行して、デスミンの増強、減弱がみられた。

糸球体、上皮細胞、デスミン

【研究方法】SHR, WKA, Lewis, F 344 の4系統のラットを用い、10, 25, 50週齢の雌雄を検索した。(i)間接蛍光抗体法 (a)腎凍結切片：クリオスタットで $2\mu m$ にした切片をアセトンで $4^{\circ}C$ 5分固定した。一次抗体として、マウス monoclonal 抗デスミンまたはビメンチン抗体、二次抗体としてFITC標識家兔抗マウス IgG抗体を用いたものと、一次抗体として家兔抗デスミン抗体、二次抗体としてFITC標識ヤギ抗家兔 IgG抗体を用いたもので行なった。対象として、一次抗体として、PBS, 正常家兔血清, 正常マウス血清を用いた。二次抗体はすべて正常ラット血清で吸収したのを用いた。抗デスミン抗体は、蛍光抗体法上、培養線維芽細胞と反応せず、ビメンチンとの交叉はなかった。一次抗体が、マウス monoclonal 抗体のとき、必要に応じて TRITC 標識家兔抗ラット糸球体基底膜抗体を用いた二重蛍光抗体法を行なった。(b)単離糸球体：エーテル麻醉下で開腹したラット腹腔大動脈より、腎をPBSで灌流後、PLPで5分灌流固定を行なった。PBSで洗浄後、メッ

シュ法にて、糸球体を単離した。単離糸球体は、0.2% Triton X-100で5分処理し、PBSで3回洗浄した後、二重蛍光抗体法を行なった。洗浄は、300 rpm 5分で行なった。一次抗体として、マウス monoclonal 抗ビメンチン抗体と家兔抗デスミン抗体、二次抗体は、TRITC標識ヤギ抗マウス IgG抗体とFITC標識ヤギ抗家兔 IgG抗体を用いた。(ii)免疫電顕 PLPで灌流固定後摘出した腎を細切し、さらに4時間PLPで固定した。dimethyl formamideで脱水した試料を $-20^{\circ}C$ 、紫外線を照射しながら、メタクリレート系樹脂(GMA)に包埋した。超薄切片をニッケルグリットに載せ、家兔抗デスミン抗体と反応させた。反応部位の局在は金コロイドを結合させた protein A-gold で検討した。(iii)アミノヌクレオシド腎症の作製 puromycin aminonucleoside (PAN) $10^{mg}/100g$ BWを10週齢のラットに1回腹腔注射にて作製した。(iv)尿蛋白測定 代謝ケージにて、24時間尿を採取し、TCA沈澱によるレーザーネフロメーターで測定した。

新潟大学医学部腎研究施設病理形態学部門

Kihara Itaru, Yaoita Eishin, Yamamoto Tadashi,

Niigata University School of Medicine, Institute of Nephrology

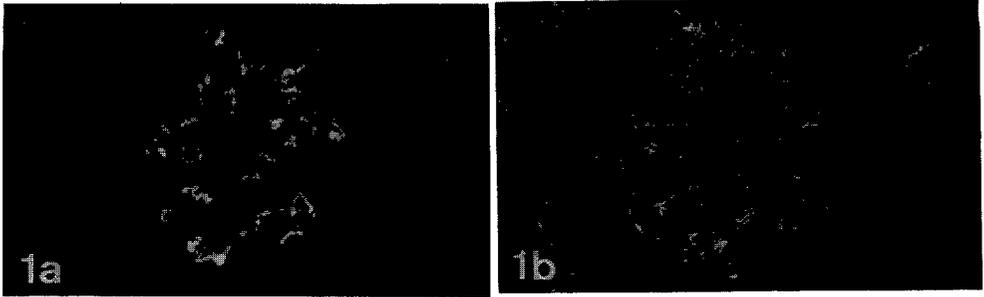


図1 a, b : SHRラット(雄10週齢)の糸球体におけるデスミン分布を二重蛍光抗体法で示した。aはデスミンを, bは基底膜の位置を示す。デスミンはメサングウムにみられ, 上皮にはみられない。

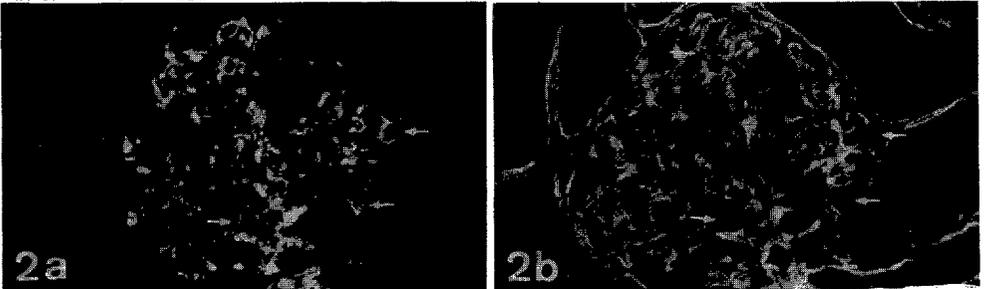


図2 a, b : WKAラット(雄10週齢)の糸球体におけるデスミン分布。a, bは図1に同じ。上皮(矢印)にデスミンを認める。

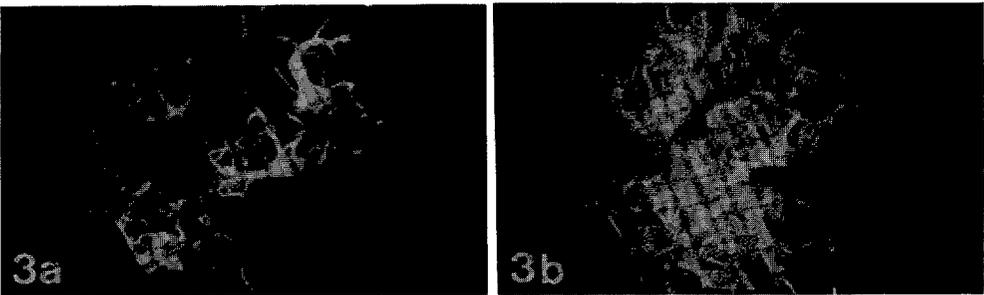


図3 a, b : SHRラット(雌10週齢)の単離糸球体表面の上皮をデスミン(a)とビメンチン(b)に対する二重蛍光抗体法でみたもの。SHRでも, 糸球体によっては図の如くデスミン陽性の上皮を多くもつものがある。

【結果】1. 糸球体上皮細胞におけるデスミン(図1,2,3):10週齢のラット糸球体をみると, ビメンチンはすべての上皮細胞に強く染め出され, メサングウムは, 上皮に比し弱く認められた。これに対しデスミンは, メサングウムに最も強く認められ, 上皮には弱く染色された。このデスミンの程度は, 系統間に差があり, SHRでは少なく, WKAでは多くみられた。Lewis.

F344はこれらの中であった。免疫電顕では, 足突起内にはみられず, より太い細胞突起内のみられた。デスミン陽性上皮細胞は, その数, 強さの程度とも糸球体間, 細胞間に差があり, 分布においても一定の傾向を見い出せなかった。雌雄の差は認められなかった。また尿中の蛋白量に系統間の差を示し得なかった。

2. 加齢による変化(図4):25週齢の糸球



図4 a, b, c : SHRラット(雄10週齢(a), 25週齢(b), 50週齢(c)) 糸球体上皮のデスミンにおける加齢による変化

体で、すでにどの系統でも10週齢に比し、デスミンの程度は強くなっていた。この増強は雌に比し、雄に顕著であった。SHRでは、他の系統に比し増強の程度が強く、50週齢ではなお一層の増強がみられた。このデスミンの加齢による変化に比し、蛍光抗体法上ビメンチンの増強は、有意に認められなかった。

8. アミノヌクレオシド腎症での変化(図5, 6) : PAN 投与後、4日間の間隔をおいて急激な尿蛋白が出現した。2週目では500~1200mg/dayも蛋白尿がみられ、3週目頃より低下し、7週目では200~300mg/dayまでに低下した。どの系統でもこれらの尿蛋白の推移に並行し、上皮におけるデスミンの増強と減弱がみられた。PAN投与後5日目では明確ではないが、7日目では明らかな増強がみられた。2週目では、さらにデスミンの染色性は強くなり、7週目では減弱していた。しかし、7週目のものも、非投与のものに比べれば、まだ強かった。2週目でもすべての糸球体が均一にデスミンが増強しているわけではなく、糸球体間に差を認めた。また免疫電顕でも、上皮細胞内のデスミンの増強が示されたが、基底膜に接する電子密度の高い微細線維の層にはみられなかった。デスミンに観察されたような変化は、ビメンチンには示し得なかった。

【考案】デスミンは、筋細胞に特異的な中間径フィラメントとして考えられてきたが、近年毛細血管や小静脈の内皮細胞にも存在すること

が明らかになってきた。また、血管平滑筋細胞についても、すべてが一様にデスミン陽性ではなく陰性の細胞と陽性の細胞が混在して存在している。培養血管平滑筋細胞は、多くの場合、デスミンの陽性率が低下してくることが知られている。このようなデスミンの分布、変化がデスミンのどのような機能によるものなのかは、未だ推測の域を出ない。本研究では、糸球体上皮細胞にもデスミンが存在してくることを示している。そのデスミンの程度は、細胞間に差があり、陰性から陽性まで、様々の程度のものが混在していた。やはり、上皮細胞におけるデスミンの機能は不明のままであるが、アミノヌクレオシド腎症でのデスミンの変化は、有力な手

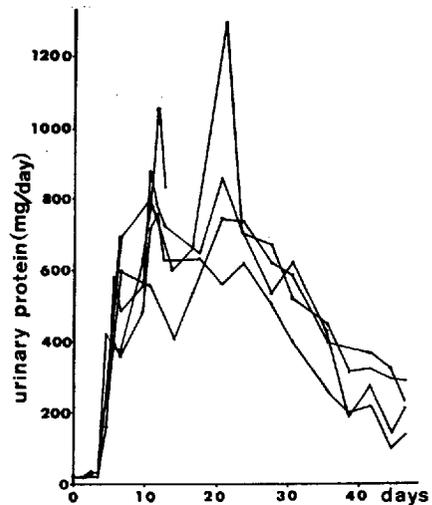


図5 PAN投与後の尿蛋白の経時的な変化

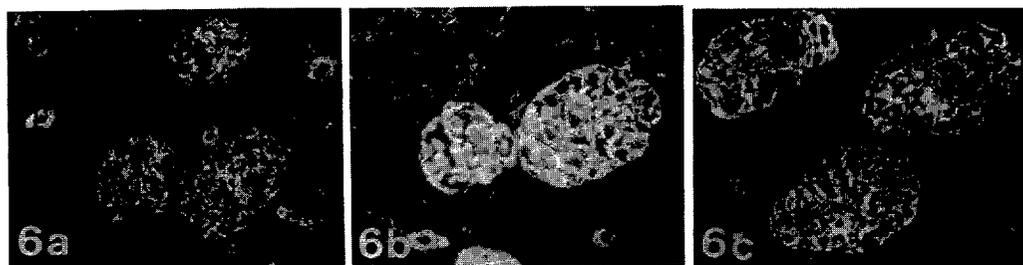


図6 a, b, c: PAN投与後のWKAラットの糸球体デスミンの経時的変化。a: PAN投与前, b投与後2週目, c投与後7週目。

掛りとなるのではないかと考えられる。

アミノヌクレオシド腎症では、糸球体上皮細胞の変化が観察され、足突起の退縮、空胞化、剥離、細胞表面のシアル酸減少が示されている。また、培養系でもPANは上皮細胞細胞を強く障害することが報告されている。このように、アミノヌクレオシド腎症では、上皮細胞に過度の負荷がかかっていることが想定されている。この状況下で、上皮細胞にデスミンがふえてくる。そして尿蛋白の回復と並行して、デスミンが減弱してくる。ここでは報告しなかったが、他の実験腎炎のモデルでも、デスミンの増強が観察されている。以上の結果より、上皮におけるデスミン増強と上皮にかかる負荷の間になんらかの関係が存在することが考えられる。

生理的な状態でも、糸球体係蹄壁には40~50 mmHgの圧がかかっており、壁を通じて濾過液が常時産生されている。このように糸球体上皮細胞には物理的な負荷が常にかかっており、10週齢の糸球体上皮にみられたデスミンの強弱は、この負荷の強弱を示している。能性が考えられる。³H-Thymidineをラットに投与した実験からボウマン嚢上皮、尿細管上皮は生理的条件下で頻りに分裂しているのに対し、糸球体上皮細胞はほとんど分裂しないことが報告されている。したがって、加齢に伴うデスミンの増強は、長期間の負荷にさらされた結果生じた上皮細胞の変化を示しているとも解釈される。

生理的条件下及びアミノヌクレオシド腎症でみられた糸球体間のデスミンの差は、糸球体病

変の特徴である巣状分節状の分布と共通する機序があるのではないかと考えている。また、系統間にみられるデスミンの差は、系統間で上皮にかかる負荷の程度が異なるのか、あるいは遺伝的にデスミンの表出の程度が異なるのかは不明である。

糸球体上皮細胞はビメンチンに富む細胞として知られている。免疫電顕が示す如くデスミンの分布は、ビメンチンの分布に一致するが、他の細胞系で示されている如く、ビメンチンとデスミンが同一の中間径フィラメントを構成しているかについては、なお一層の検索が必要である。

上皮細胞におけるデスミンの変化は、足突起の退縮と同様に、様々な負荷が上皮にかかったときに共通して生じる反応としてとらえられる。そういう意味で、デスミンをみることは、光顕レベルで上皮にどの程度の負荷が生じているのかをみる上で有用であると思われる。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



4 系統(SHR,WKA,Lewis,F344)のラットを用い,腎系球体上皮細胞のデスミンを間接蛍光抗体法,及び免疫電顕法で検索した。デスミン陽性上皮細胞の数,デスミン陽性の程度は,系統,系球体,細胞間に差がみられた。各系統とも,10 週齢のラットに比し,25 週齢のものでは,デスミン陽性細胞の数,及び週齢のものでは,デスミン陽性細胞の数,及び程度は増していた。アミノヌクレオシド腎症では,尿蛋白の推移に並行して,デスミンの増強,減弱がみられた。