

## FIB-SEM 法を活用した糸球体足細胞の立体構造解析

## Three-Dimensional Structure of Podocytes Revealed by FIB-SEM Tomography

市村浩一郎<sup>a, b\*</sup>, 角田宗一郎<sup>b</sup>, 坂井 建雄<sup>a</sup>

Koichiro Ichimura, Soichiro Kakuta and Tatsuo Sakai

<sup>a</sup>順天堂大学大学院医学研究科解剖学・生体構造科学<sup>b</sup>順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター形態解析イメージング研究室

**要旨** 足細胞は糸球体における血液の選択的濾過に必須な上皮細胞であり、複雑な突起構築を有する。足細胞はボウマン腔と呼ばれる腔所に面していることから、走査電顕法によりその立体構造が解析されてきた。しかし、従来の走査電顕法による解析にはいくつかの限界があり、足細胞の正常構造、発生過程、病態変化の三次元的な理解は完全とは言えなかった。私どもは FIB-SEM 法を足細胞の三次元構造解析に適用し、従来の方法では解析が困難であった多くの問題を解決できた。本講座では、FIB-SEM 法で明らかにできた足細胞の立体構造を、正常状態、発生過程、病態変化という 3つの観点から概説したい。

**キーワード**：糸球体、足細胞、FIB-SEM、ブロック断面 SEM 観察法、立体再構築

## 1. はじめに

足細胞 (podocytes) は糸球体の表面をなす上皮細胞であり (図 1)、独特な突起構築を持つ<sup>1,2)</sup>。糸球体とは腎臓において血液を濾過することで尿を生成する組織であり、足細胞は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。糸球体疾患患者では足細胞の突起構築に特異的な形態変化を生じるため、病態の評価には足細胞の電顕観察が重視されている。

足細胞はボウマン腔 (尿腔, 図 1 (b, d) のアスタリスク) と呼ばれる空間に面しているため、SEM による形態観察に適し、現在に至るまで足細胞の形態解析には SEM が大きな役割を果たしてきた (図 1 (a, c))。しかし、従来の SEM 観察だけでは足細胞の立体構造を詳細に解析することは困難であった。その主な理由は二つあり、一つは足細胞が糸球体基底膜という基質に張り付いているために、裏面 (接着面) の観察が困難であること、もう一つは糸球体の表面が起伏に富み、足細胞の一部が深い谷間に入り込んでいるためである。

こうした問題を乗り越え、足細胞の全体像を詳細に把握するには、連続超薄切片の TEM 観察が有用であるが<sup>3~5)</sup>、この手法は高度なグリット操作と多大な労力を要することから、一般の研究者がこれを活用することは現実的には難しい。

そこで、第 3 の手法として挙げられるのが、近年活用が進んでいる FIB-SEM や SBF-SEM である<sup>6,7)</sup>。これらの電顕法は樹脂包埋したサンプルを SEM の鏡体内で切削し、切削面

から断面像を得る手法であり、切削と撮影は全自動で繰り返し行うことができる。得られた連続像から任意の構造を抽出・再構築し、立体構造を解析できる。著者らは FIB-SEM を足細胞の立体構造解析に応用し、これまで知られていなかった足細胞の新しい構造を見出すことに成功してきた。

本講座では、足細胞の立体構造についての従来の知見について述べた後に、FIB-SEM 解析で明らかになった足細胞の立体構造について、正常状態、発生過程、病態変化という 3つの観点から概説したい。なお、FIB-SEM や SBF-SEM の技術的な側面については、多くの優れた総説が発表されており<sup>6,7)</sup>、詳細はそちらを参照されたい。

## 2. 足細胞の立体構造～従来の認識～

正常な成熟足細胞は 3つのコンパートメント (細胞体、一次突起、足突起) からなり (図 1)、これらが順に連なり構造階層をなすとこれまでは考えられてきた (図 2 (a))<sup>2)</sup>。一次突起とは細胞体から直接伸びる太い突起で、一次突起から出る細い突起が足突起である。隣接する足細胞どうしは足突起によって噛み合っており、足突起間の隙間 (スリット間隙) を通じて濾過が行われる。スリット間隙には特殊化したタイト結合であるスリット膜が張られている。スリット膜は「バリア」としての機能を持ち、血漿タンパク質の尿への漏出を防いでいる。

先述のように、従来の SEM 観察では足細胞を腔側面からしか見ることができず、その立体構造は完全に把握されていなかった。特に、一次突起や細胞体と基底膜の関係については断片的にしか分かっておらず、また足細胞の高度な突起構造が発生期にどのように形成され、傷害時にどのように消失・回復するかはほぼ分かっていなかった。

<sup>a</sup> 〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

TEL: 03-5802-1023; FAX: 03-5689-6923

\* E-mail: ichimura@juntendo.ac.jp

2016年8月17日受付, 2016年11月7日受理

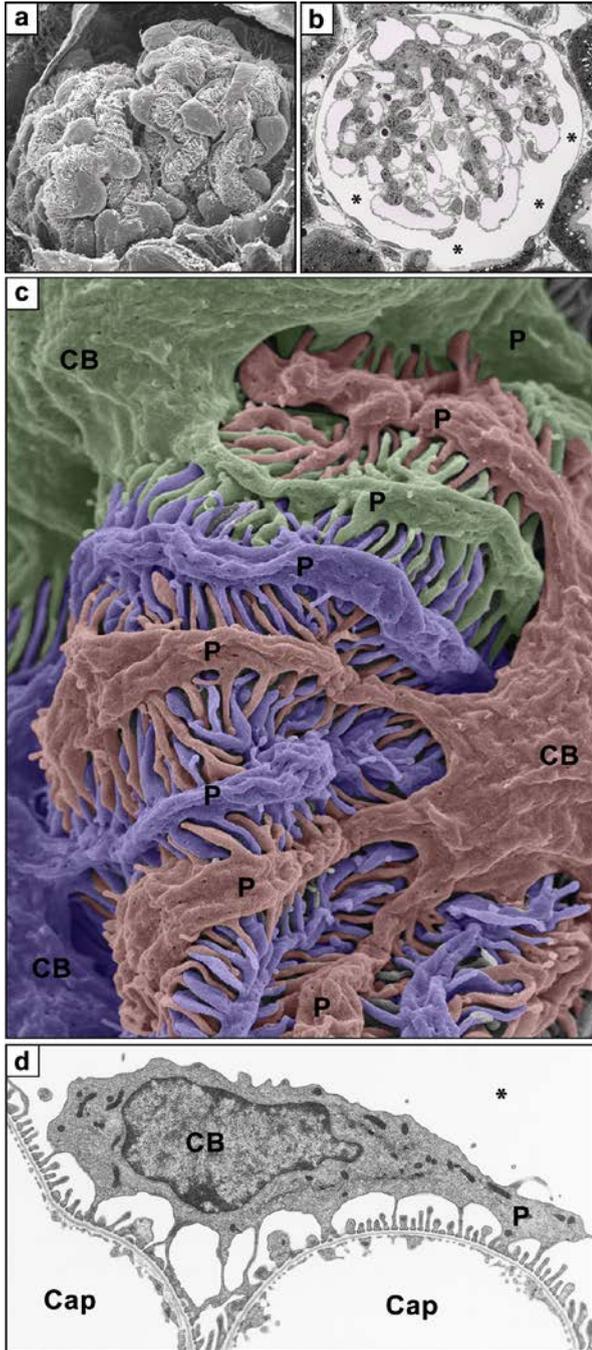


図1 従来の電顕法で見た糸球体と足細胞（ラット）  
 (a, b) 糸球体のSEM像 (a) とTEM像 (b). 糸球体の最表面に見えている突起を無数に伸ばしている細胞が足細胞である。(c) 足細胞のSEM像。隣接する3つの細胞を色を分けて示してある。細胞体 (CB) から太い一次突起 (P) が伸び出し、さらに一次突起から細かな足突起が無数に伸び出している。(d) 足細胞のTEM像。定圧灌流固定を施しているため、糸球体毛細血管 (Cap) の壁がピンと張り詰めている。アスタリスクはボウマン腔 (尿腔) を示す。

### 3. FIB-SEM法による足細胞の立体構造解析

実験動物において足細胞のFIB-SEM解析を行う場合には、腎臓を定圧灌流固定することが望ましい。定圧灌流固定とは、

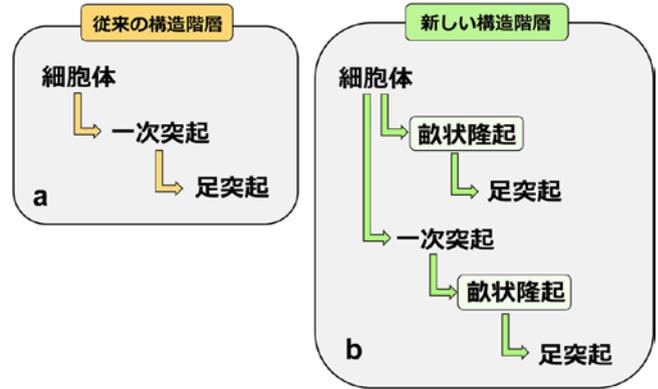


図2 足細胞の新・旧構造階層性  
 (a) 従来の単純な構造階層。(b) FIB/SEM法を活用した立体構造解析により、足突起は細胞体・一次突起の裏面にてできる畝状隆起から伸び出すことが新たに判明した。

固定液を血圧と同等（もしくはそれ以上）の静水圧で動脈内に注入し、目的の臓器を効率よく固定する方法である（定圧灌流装置VFP-1 (Cat No. 437) は日新EM (株) から購入できる）。この方法は超微形態の死後変化を最小限に抑えるだけでなく、糸球体の毛細血管壁をピンと張り詰めたまま固定し、毛細血管表面を覆う足細胞を生時と同じ状態に引き伸ばしておく利点があり、再構築像も美しいものとなる。

サンプルは細胞膜のコントラスト増強のために多重ブロック染色を施したのち、アルコール脱水したサンプルをエポキシ樹脂に包埋している。硬化した樹脂包埋サンプルの表面をダイヤモンドナイフで露出し、糸球体の領域からFIB-SEM (Helios NanoLab 650, FEI) により通常は400～700枚の連続断面像を撮影する。連続断面像からの足細胞の抽出（セグメンテーション）と再構築には立体構築解析システムAmira 6.0 (FEI) を用いている。

#### 3.1 正常な足細胞の立体構造<sup>8)</sup>

立体再構築像を表面（腔側面）から見ると、従来のSEM像をよく再現していることが分かる（図3 (a)）。足細胞は糸球体基底膜に接着しているため、従来のSEMでは足細胞を裏面（接着面）から観察することは困難であるが、立体再構築像ならば裏面の観察も容易に行える（図3 (b, f)）。意外なことに、裏面は足突起によって占められているように見え、一次突起や細胞体の位置が一見分からない。

単一の足細胞の再構築像を観察すると、足突起が一次突起から伸び出る様子を明瞭にすることができる。表面から見ると、一次突起と足突起の関係は葉脈のように見えるが、裏面から見るとその関係はそう単純ではない（図3）。一次突起の下面には畝状に隆起した部分（畝状隆起 ridge-like prominence）が形成され、足突起はこの畝から左右に向って伸びている（図3 (d)）。つまり、畝状の隆起は一次突起の接着装置であるとともに、足突起と一次突起の連結装置であるともいえる。細胞体の下面においても同様な様式で足突起が伸び出しており（図3 (e)）、足細胞の正確な構造階層は（図2 (b)）

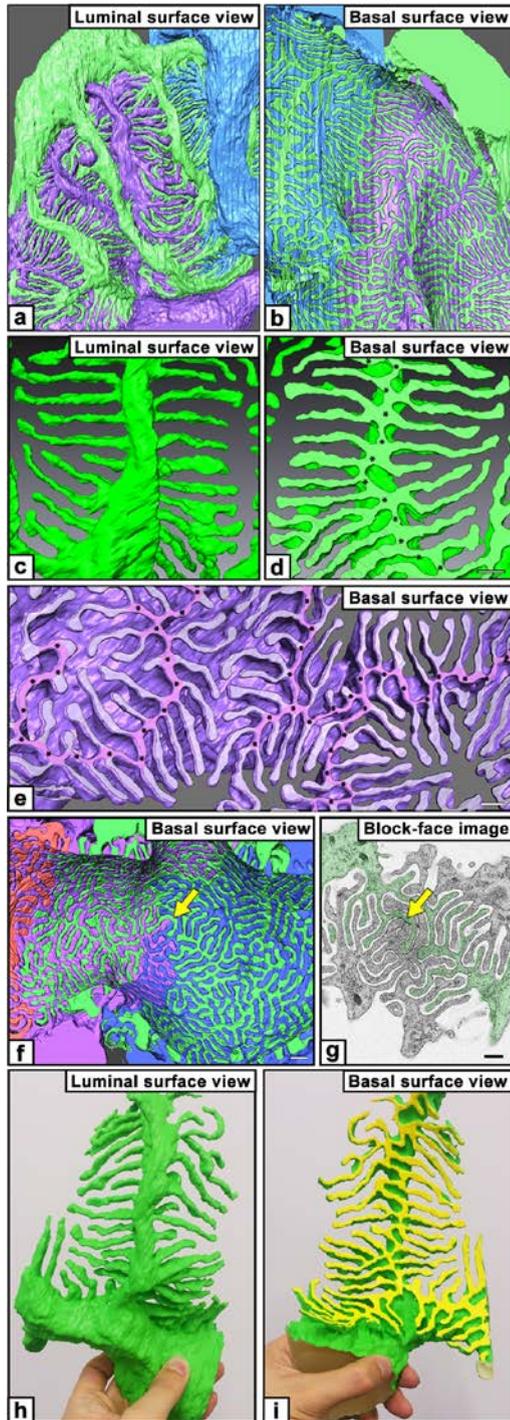


図3 成熟足細胞の立体構造 (ラット)

(a, b) 隣接する3つの成熟足細胞の再構築像。腔側面から見ると足細胞の3つのコンパートメント(細胞体、一次突起、足突起)のすべてが確認できるが(a)、裏面は足突起に占められている(b)。(c, d) 一次突起とそこから伸びる足突起の再構築像。腔側面から見ると葉脈のように単純な形態に思えるが(c)、裏面から見ると足突起は一次突起の裏面に形成された畝状の隆起を介してお互いにつながっている(d)。(e) 細胞体の裏面。細胞体でも一次突起と同様に畝状隆起が見られ、そこから足突起が伸び出ている。(f, g) 足細胞の3細胞間結合部(矢印)。スリット膜は形成されず、タイト結合に連結している。(h, i) 3Dプリンタで出力した成熟足細胞の一部分。硬質の半透明樹脂に出力したのち、腔側面を緑色、基底面(接着面)を黄色に着色した。

のようになっていると言える。また、先述したように、複数の足細胞が連結した状態だと裏面は足突起に占領されているように見えるが、これは畝状隆起の幅が足突起とほぼ同じであるため、細胞体や一次突起から出る畝状隆起を足突起と区別し難いことによる。

隣接する二つの足細胞間にはスリット膜が形成されるが、3細胞間結合部の構造はこれまで分かっていなかった。FIB-SEM解析では、しばしば足細胞の3細胞間結合部を見付けることができ、この部位ではスリット膜が形成されず形態的にはタイト結合をなすことが分かった(図3(f, g))。3細胞間結合部の同定は通常のTEMでは不可能であり、これもFIB-SEM解析により初めて判明したことの一つである。

なお、再構築像は3Dプリンタで出力し、手に取り観察することも可能であり(図3(h, i))、教材としても活用できる。

### 3.2 発生期における足細胞の突起形成過程<sup>9)</sup>

糸球体の発生過程は7つのステージに区分され、そのうち足細胞の突起形成が見られるのはS-shaped body stage, Capillary loop stage, Maturing glomerulus stageである(図4)。好都合なことに、これらのステージは発生期のひとつの腎臓内で全て観察することができる。

S-shaped body stageでは、足細胞は円柱状であり、タイト結合やアドヘレンス結合からなる結合装置複合体で連結され、円柱上皮を成している(図4(a1-a2), 5(a-d))。腔側面から見ると足細胞は敷石状に見えるが、反対に基底側から見る

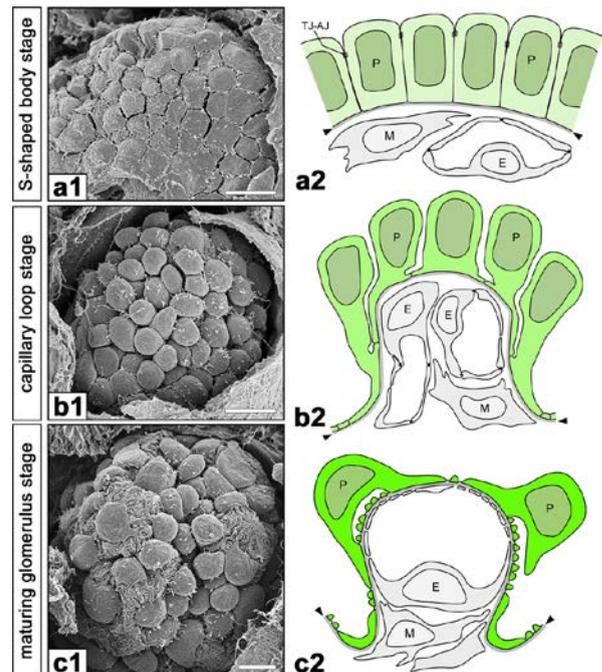


図4 糸球体の発生ステージ (ラット)

発生初期では足細胞の細胞体は密集しており、糸球体はブドウの房のように見える(a1, a2)。突起の形成は細胞体の直下で既に始まっているが、従来の走査電顕観察ではこの過程を観察することができない。SEM像(a1, b1, c1)、足細胞の形態変化を示す模式図(a2, b2, c2)。

と隣接する細胞間で不規則に入り組んで見える (図 5 (a-d)).

次いで, Capillary loop stage の初期には, 足細胞は互いに細い突起 (原始足突起 primitive foot processes) により噛み合うようになる (図 5 (e)). 結合装置複合体 (図 5 (e) 黄色) は原始足突起の直上まで下行しているが, 原始足突起どうしの間にはスリット膜を含む細胞間結合装置は存在しない. さらに発生が進み Capillary loop stage の後期に入ると, 足細胞は複数の一次突起を形成する (図 5 (f, g)). これに伴い, 結合装置複合体は一次突起を縁取って位置するようになる. 原始足突起は主に一次突起から伸び出し, 長さが増すとともに, 分岐したものも見られるようになる.

Maturing glomerulus stage になると, 一次突起は太さと長さを増す (図 6 (a)). 結合装置複合体は原始足突起どうしの上に位置するようになり, 足突起は未熟足突起 (immature foot processes) となる. 一次突起の成熟過程は均一ではなく, ひとつの足細胞内に様々な成熟段階が見られる (図 6 (a) 1-5). 始め一次突起は広い面積で基底膜と接着しているが, その接着面が徐々に狭まり, 畝状隆起となる.

未熟足突起間の細胞間結合装置はスリット膜に置き換わると, 足突起間にスリット間隙ができ, 未熟足突起は成熟足突起 (mature foot processes) となる. さらに生後の発達過程で足突起内にアクチン線維の太い束が形成され, 高い糸球体内圧から糸球体壁を保護するうえで役立つ<sup>10,11)</sup>.

### 3.3 病態時における足細胞の突起消失過程

足細胞の高度な突起構造は種々の糸球体疾患において大きく損なわれ, 広い扁平な突起に再構築される<sup>12)</sup>. 病態時の突起再構築は足突起消失 (foot process effacement) と呼ばれ, 足細胞傷害の形態的指標として腎病理学の領域で重視されている. 足突起消失の過程は, 発生過程同様, これまでは部分的にしか理解されていなかったが, FIB-SEM 解析により詳細に理解することが可能となった (Ichimura et al., 投稿中).

我々は主にラットの PAN 腎症を用いて解析を行っているが, これはヒトの微小変化型ネフローゼ症候群のモデルであり, ピューロマイシン誘導体の単回投与で惹起できる. PAN 腎症の初期には, まず, 足突起の形状が不規則になり, 長さも短くなる. このとき, 畝状隆起の幅も広くなり, 一見, 発生過程を遡るかのような変化を見せる.

最終的には図 7 (a) に示すような扁平な突起にまで再構築される. 扁平な突起の辺縁には不規則な形状の足突起が残り, 隣接する足細胞と噛み合い構造を形成するが (図 7 (a, b)), 足突起どうしの間にはスリット膜は形成されず, 形態的にはタイト結合によって連結している.

足突起消失の過程は発生過程を遡るようにも見えるが, 発生過程には見られない特異な変化も生じる. そのひとつが, 「飛び地」状の細胞断片の形成である (図 7 (b)). これは, 再構築の過程で, 扁平な広い突起の下方に隣接する細胞の突起が千切れて, 孤立したものと考えられる. このような細胞断片を block-face 像で見ると, 細胞膜は不明瞭であり, 内部の電子密度が周囲と比べて著しく高まっている場合が多く,

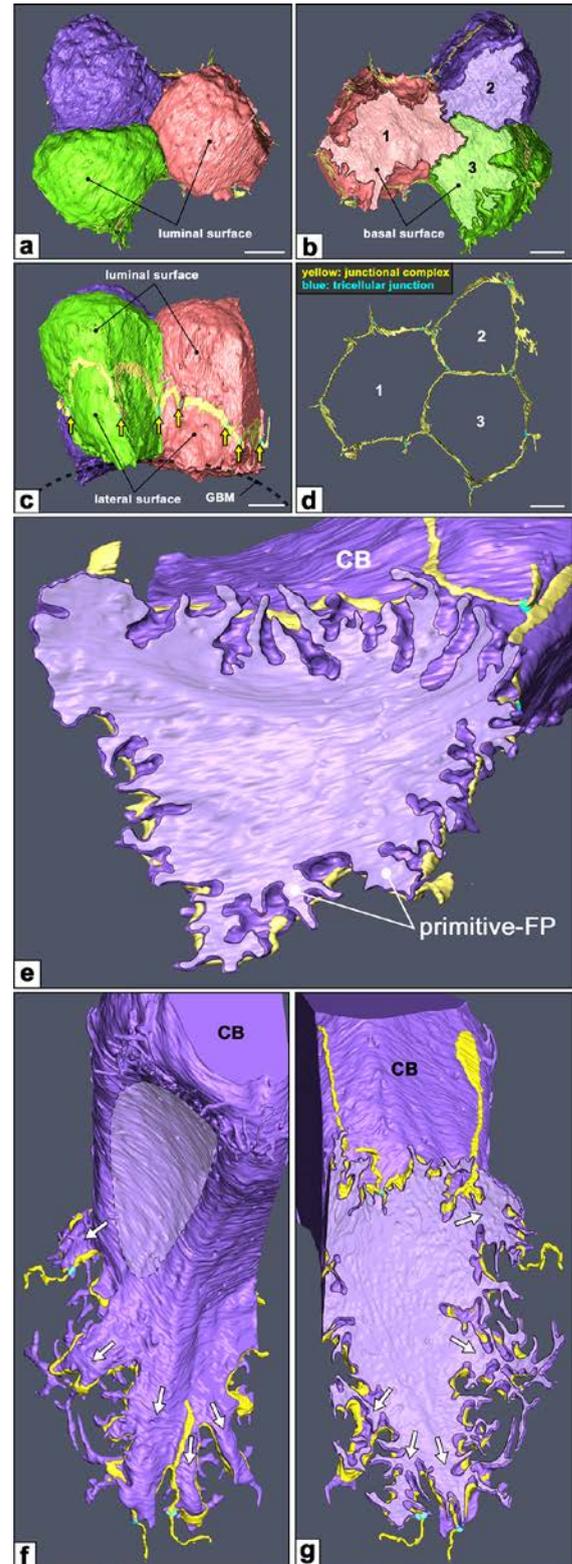


図 5 足細胞の発生過程 (ラット)

(a-d) S-shaped body stage. 足細胞は円柱状であり, 他の上皮細胞と同様に細胞間結合装置 (黄色) で連結している. (e) Capillary loop stage 初期. 原始足突起が形成されるが, 突起間にスリット膜は見られない. (f, g) Capillary loop stage 後期. 一次突起が見られるようになる. 細胞間結合装置は一次突起を縁取るように位置し, 原始足突起間にはスリット膜は見られない. CB 細胞体.

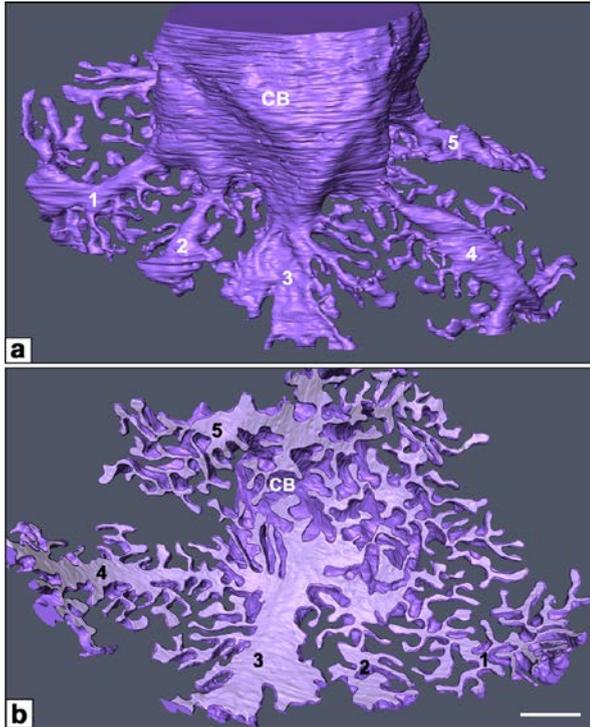


図6 足細胞の発生過程 (ラット)

Maturing glomerulus stage の足細胞. 一つの細胞内に様々な発達段階の一次突起 (1-5) が見られる. CB 細胞体.

細胞断片は壊死していると考えられる. また, 正常な足細胞では細胞間結合は必ず隣接細胞間で形成されるが, 足突起消失時にはタイト結合からなる Autocellular junction が形成される点も特徴的である (図7 (b)).

PAN 腎症では数ヶ月で構造を回復すると言われているが, このように大きく再構築された構造が実際にどの程度回復するかは不明であり, 今後の FIB-SEM 解析の結果が待たれるところである.

#### 4. FIB-SEM 法による解析の課題とその解決策

FIB-SEM 法によりこれまで認識されていなかった足細胞の立体構造が明らかになり, 足細胞の構造解析における本法の威力が証明されたわけだが, いくつかの問題点も浮き彫りになってきた.

そのひとつは, FIB-SEM 法では細胞内のいくつかの構造が不鮮明, あるいは可視化できない点である. 足細胞の足突起内にはアクチン線維の太い束 (アクチン束) が存在し, 糸球体の高い内圧から糸球体壁を保護する役割を持っている<sup>11)</sup>. アクチン束は透過電顕像では突起内部に高電子密度の領域として認められるが, FIB-SEM 像では足突起の内部は均一なコントラストとなりアクチン束を見ることが難しい. これは, 多重ブロック染色の過程でオスミウム処理を比較的高い濃度で行うため, オスミウムのタンパク質に対するマセレーション効果が生じたためと推測される<sup>8)</sup>. これらの構造の可視化には染色方法や撮影条件の改善が必要であるとともに, 特定

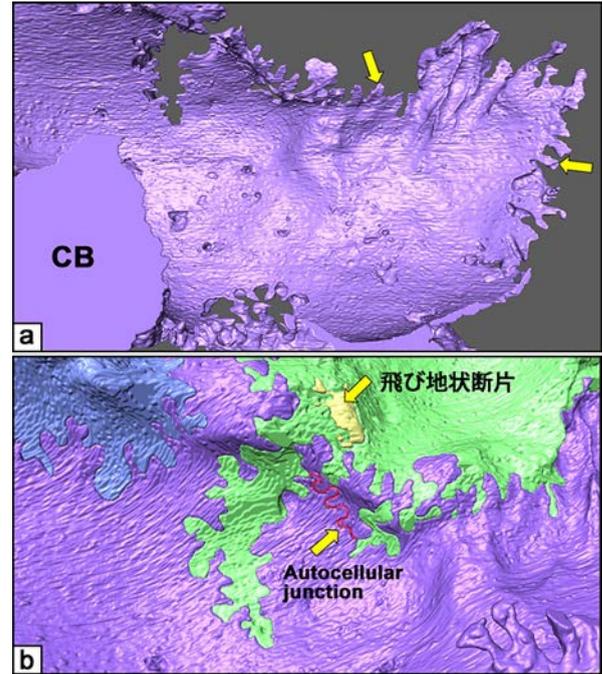


図7 傷害足細胞 (PAN 腎症ラット)

(a) PAN 腎症極期の足細胞. 高度な突起構造が扁平な広い突起に再構築されるが, 辺縁には不規則な足突起が残存する. (b) 正常な足細胞では見られない飛び地状の細胞断片や autocellular junction が形成される.

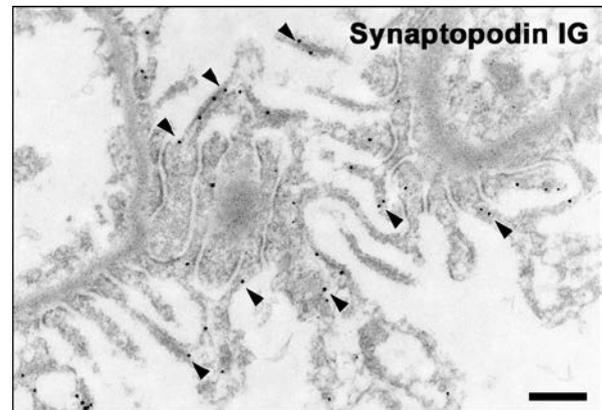


図8 足細胞における synaptopodin の分布 (ラット)

2次抗体にナノゴールド標識抗体を用い, 金増感を施している. Synaptopodin は足突起のアクチン束に局在するアクチン結合タンパク質.

の構造物を包埋前イムノゴールド法で標識し (図8), その位置を可視化することも原理的には可能である. しかし, 抗原の種類によっては標本全体を均一に標識することが難しい場合が多く, こちらも方法の改良が必要な段階にある.

足細胞の FIB-SEM 解析でもう一つ問題となるのが, 連続断面像から目的の細胞を抽出する作業 (セグメンテーション) をマニュアルで行わなければならない点である. 足細胞の複雑性から自動抽出は現時点ではほぼ不可能である. 連続像を一枚一枚見ながら行う抽出作業は, 数百枚の TEM 像を観察

することに匹敵し、その過程で重要な所見を見出せることも多々あり、意義のある作業ではあるものの、解析の効率化には高度な自動抽出を可能とした画像解析ソフトの開発が切望される。

## 5. おわりに

今後はFIB-SEM解析を一層活用し、足細胞に残された形態問題を解決してゆくとともに、ネフロン構成細胞の全種類を網羅した「Kidney Cell 3D Atlas」の作製を目指している。

## 謝 辞

本研究はJSPS 科研費 15K18960, 23590226 の助成を受けたものである。また、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(S1311011, S1101009) の補助も受けた。

## 文 献

- 1) Ichimura, K. and Sakai, T.: Evolutionary morphology of podocytes and primary urine-producing apparatus. *Anat. Sci. Int.*, (in press)
- 2) Kriz, W. and Kaissling, B.: Structural organization of the mammalian kidney. in Seldin, D.W. and Giebisch, G. (Ed.), *The Kidney, Physiology and Pathophysiology*. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 587–654 (2000)
- 3) Harris, K.M., Perry, E., Bourne, J., Feinberg, M., Ostroff, L. and Hurlburt, J.: Uniform serial sectioning for transmission electron microscopy. *J. Neurosci.*, **26**, 12101–12103 (2006)
- 4) Hoffpauir, B.K., Pope, B.A. and Spirou, G.A.: Serial sectioning and electron microscopy of large tissue volumes for 3D analysis and reconstruction: A case study of the calyx of Held. *Nat. Protoc.*, **2**, 9–22 (2007)
- 5) Ichimura, K., Kurihara, H. and Sakai, T.: Primary cilia disappear in rat podocytes during glomerular development. *Cell Tissue Res.*, **341**, 197–209 (2010)
- 6) Kubota, Y.: New developments in electron microscopy for serial image acquisition of neuronal profiles. *Microscopy*, **64**, 27–36 (2015)
- 7) Ohno, N., Katoh, M., Saitoh, Y., Saitoh, S. and Ohno, S.: Three-dimensional volume imaging with electron microscopy toward connectome. *Microscopy*, **64**, 17–26 (2015)
- 8) Ichimura, K., Miyazaki, N., Sadayama, S., Murata, K., Koike, M., Nakamura, K., Ohta, K. and Sakai, T.: Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. *Sci. Rep.*, **5**, 8993 (2015)
- 9) Ichimura, K., Kakuta, S., Kawasaki, Y., Miyaki, T., Nonami, T., Miyazaki, N., Nakao, T., Enomoto, S., Arai, S., Koike, M., Murata, K. and Sakai, T.: Morphological process of podocyte development revealed by block-face scanning electron microscopy. *J. Cell. Sci.* (in press)
- 10) Ichimura, K., Kurihara, H. and Sakai, T.: Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 1589–1600 (2003)
- 11) Ichimura, K., Kurihara, H. and Sakai, T.: Actin filament organization of foot processes in vertebrate glomerular podocytes. *Cell Tissue Res.*, **329**, 541–557 (2007)
- 12) Inokuchi, S., Shirato, I., Kobayashi, N., Koide, H., Tomino, Y. and Sakai, T.: Re-evaluation of foot process effacement in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.*, **50**, 1278–1287 (1996)