

Tamami KIKUCHI

*Department of Cellular Physiology, Institute of Nephrology,
and Department of Internal Medicine (II),
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences.*

Shinichi OKADA

*Department of Cellular Physiology, Institute of Nephrology,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, and
Department of Pediatrics, Tottori University Faculty of Medicine.*

Takashi OITE

*Department of Cellular Physiology, Institute of Nephrology,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

Abstract

To analyze the repair process of glomerular capillary after injury, anti-mesangial cell anti-body-induced glomerulonephritis was induced in the rat. Isolated glomeruli were prepared from the kidneys by sieving method. Using focal laser scanning immunofluorescent microscopy, of which the advantages are able to visualize fluorescent molecules in a single plane of focus, to avoid the risk of artifacts by mechanical sectioning, to record images of serial sections at different depths of samples, and to analyze three-dimensionally, we showed that regeneration of glomerular capillaries seemed to proceed chiefly by angiogenetic branching from the remaining microvasculatures around the avascular lesions.

Key words: 腎糸球体, 糸球体毛細血管再構築, 血管新生, メサンギウム融解, 共焦点レーザー顕微鏡

緒 言

生体内の全血管の総全長は地球全周の6あるいは7倍と言われており, 全身の臓器・組織の恒常性維持には欠かせない臓器である。また傷害を受けた後の組織, 臓器が元通りに再生して行くには血管の修復をまず考慮すべきである。糸球体腎炎後の傷害糸球体が再構築する過程を形態学的に追跡した研究は幾つかある^{1)–3)}。私どもも糸球体硬化の進行性と血管再生不全の間に相関性があることを報告してきた⁴⁾。本研究ではメサンギウム傷害後の糸球体毛細血管の再生像を3次元的に解析する目的で, 単離糸球体を免疫染色した後に共焦点レーザー顕微鏡で観察する方法を導入し, 血管再生様式を形態学的に検討した。

対象と方法

すべての動物実験は新潟大学大学院医歯学総合研究科動物実験指針に従って行った。

1 実験動物: 4–5週令の雄性, Wistar ラットを用いた。

2 実験腎炎惹起プロトコール: 腎炎惹起には抗メサンギウム細胞抗体(抗Thy-1.1抗体)(ATS)は既報の抗体(1-22-3)を用い, 尾静脈より1mg/0.5mlを投与した⁴⁾。実験群をATS投与後3日目, 7日目, および無処置群(各群3匹)の3群に分けた。

3 尿蛋白の測定: 既報に従いBiuret法を用いて行った⁵⁾。

4 免疫組織学的検索法: 腎臓を摘出後, 腎皮質

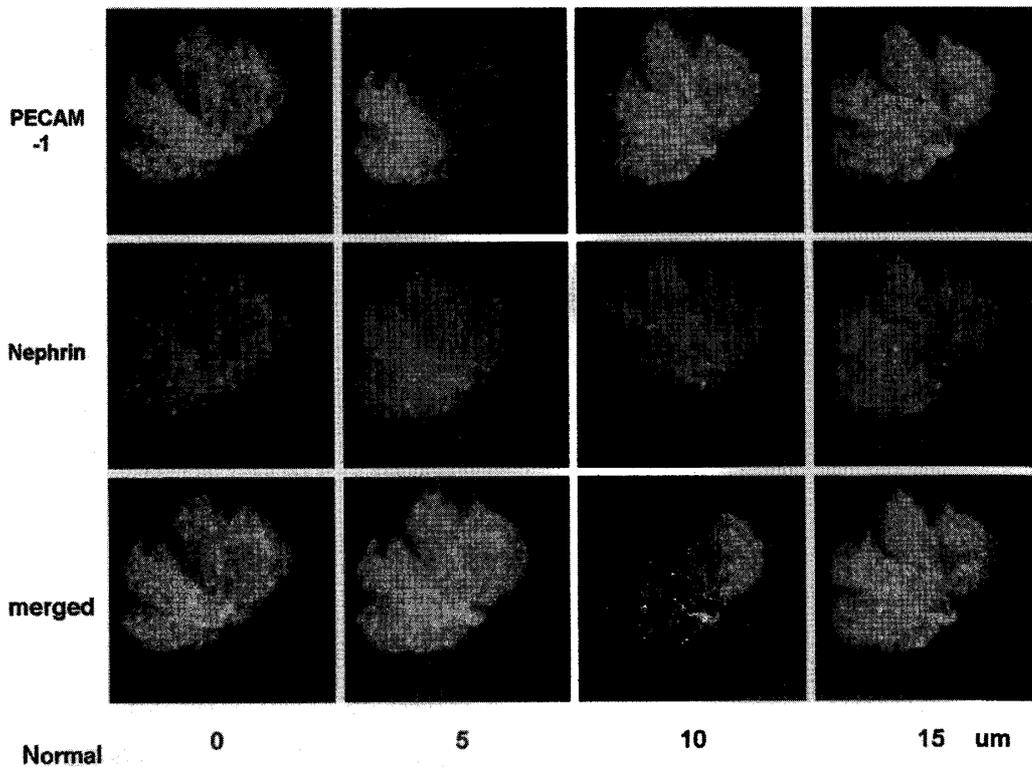


図 1

細切片からメッシュを用いた sieving 法により単離糸球体を採取する。この標本を 4% paraformaldehyde で 2 時間固定、洗浄した後に 2% Triton X で 1 分間処置する。洗浄後一次抗体を加えて 4℃で 1 時間反応した。洗浄後、蛍光色素標識二次抗体を加えて 4℃で 1 時間反応させた。血管内皮細胞の免疫染色は抗ラット platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1; CD31) マウス単クローン抗体を 1 次抗体として反応させ、2 次抗体には FITC 標識ウサギ抗マウス抗体を用いた。さらに糸球体毛細血管の局在を明らかにするため、上皮細胞のマーカである nephrin に対する 1 次抗体 (ウサギで作製)、および TRITC 標識ヤギ抗ウサギ抗体で反応させ、染色した。免疫染色した単離糸球体の立体解析は共焦点レーザー顕微鏡 (MRC1024, バイオラド) を用い既報に従った⁶⁾。

結 果

蛋白尿は 3 日目がピークで平均 111.5 mg/日、5 日目以降は減少し 7 日目には正常域に戻っていた。

単離糸球体の光顕所見の特徴は、3 日目ではメサンギウム融解であり、著しい場合には小動脈瘤様の病変を呈する。また 7 日目になるとメサンギウム細胞増殖像を呈する (結果省略、文献 4 参照)。

図 1 は無処置群の単離糸球体 PECAM-1 染色像を示す。ATS 投与後 3 日目の糸球体 (図 2) では、PECAM-1 が染色されない 3 次元的にも空洞様の領域が存在し (矢印)、この部位は光顕上小動脈瘤に一致している。小動脈瘤の周囲には残存している微小血管が染色されているが、正常糸球体の係蹄血管とは異なり輪郭がはっきりしない。小動脈瘤は血管極 (時計 9 時の位置) に近い部位

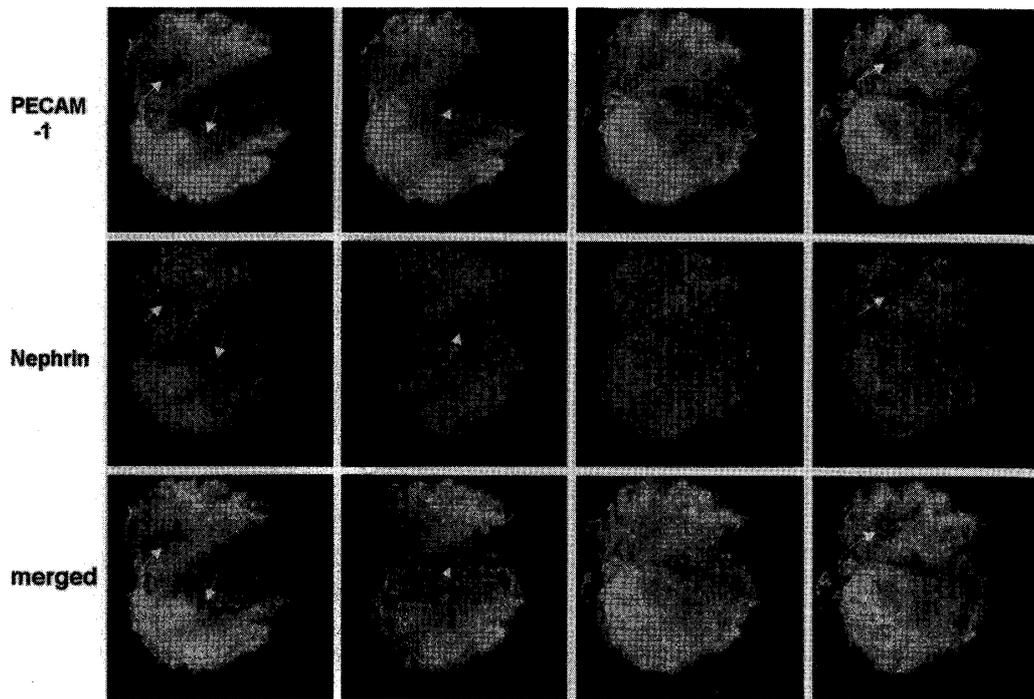


図2

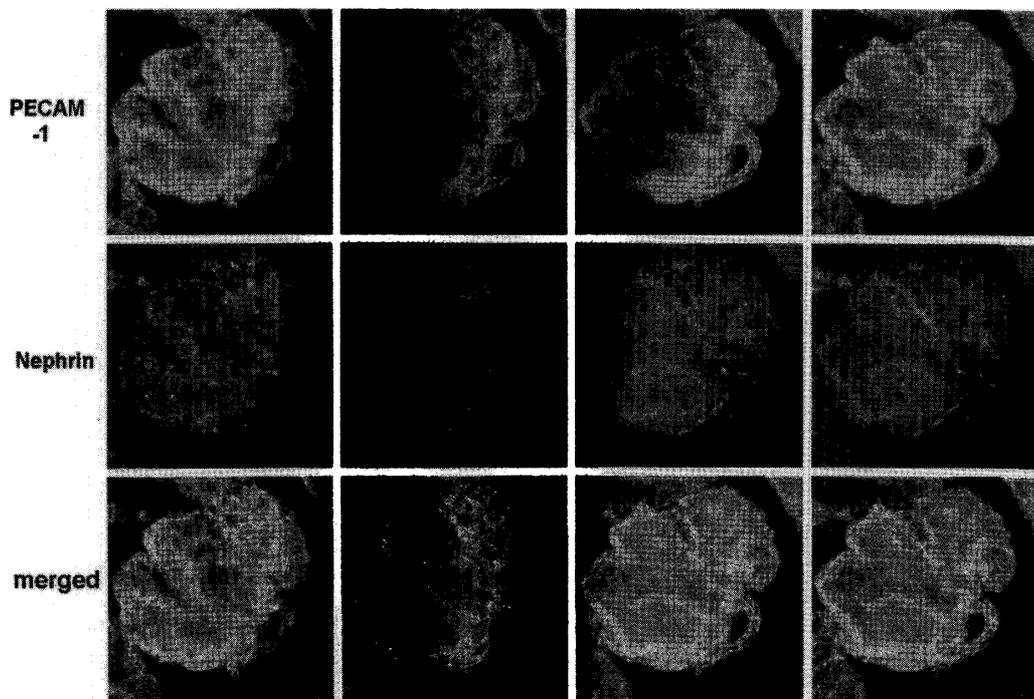


図3

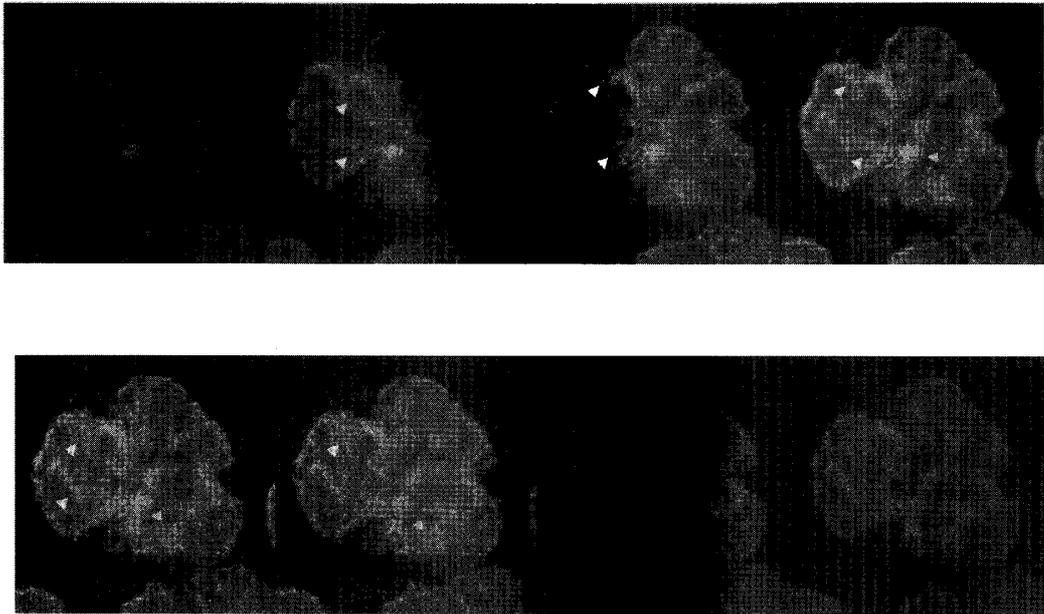


図4 連続像による糸球体毛細血管再構築の解析：ATS-GN, 7d

だけでなく末梢の係蹄にも存在している。さらに興味ある所見として、小動脈瘤に一致する部位でのnephrinの染色性が減弱していた。ATS投与後7日目(図3)では、メサンギウム融解後の細胞増殖部位と思われる周辺にPECAM-1で強く染色される微小血管が存在し、血管再生が進んでいると予想される。次にATS投与後7日目における糸球体の連続画像から微小血管の再生像を立体的に解析した(図4)。血管内皮細胞染色部位を追っていくとそれぞれ連続している箇所を見つけることができ、その伸展方向はメサンギウム融解後の細胞増殖部位と思われる周辺から内側に向かって見える。また血管極(時計6時の位置)のみならず、末梢係蹄からも分枝している。

考 察

血管の再生様式はAngiogenesisとVasculogenesisが知られている。Angiogenesisは傷害を免れた残存血管内皮細胞が増殖し、分枝状に伸長するも。一方Vasculogenesisは主に胎生期に観察されるもので、内皮細胞前駆細胞や血管芽細胞か

ら血管を形成するものである。本研究では小動脈瘤、あるいはその部位が細胞増殖病変に置き換わってきたと思われる部位の周辺に再生血管が認められる事、PECAM-1で染色される血管壁に連続性が見られる事、この血管再生は血管極からの血管新生のみならず、末梢の係蹄からも新生している事が確認された。これは血管再生の様式が残存血管からのangiogenesisが主体を占めていることを示している。メサンギウム融解部位はメサンギウム細胞の増殖を伴うが、今回の研究ではその中心部位からの血管再生像を確認できなかったことや血管極に集中した血管再生像を確認出来なかったことから、vasculogenesisによる血管再生が起こる可能性は否定的であった。一方、骨髄由来内皮前駆細胞が糸球体固有の残存ないし再生内皮細胞とともにキメラ状に再生血管を構成している所見(Green fluorescent protein-transgenic ratを用いた予備実験から)も頻度は少ないものの認められることから、傷害後の糸球体微小血管再生過程は単純なangiogenesisだけで説明できないと思われる。

最後に、今回用いた単離糸球体の共焦点レーザー

顕微鏡による3次元解析は optical sectioning によるため、標本作製上の物理的損傷を避け、in situ に近い像を取得できる事も強調したい。

謝辞

本論文は平成15年度医学研究実習(基礎配属)の成果をまとめたものである。実習から論文作成まで、共著者を含めた腎研究施設機能制御学分野の皆様にお世話になりました。ここに深く感謝いたします。また、抗ネフリン抗体を供与していただいた河内 裕助教授(腎研究施設分子病態学分野)にも感謝いたします。

文 献

- 1) Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y and Yamanaka N: Recovery of damaged glomerular capillary network with endothelial cell apoptosis in experimental proliferative glomerulonephritis. *Nephron* 79: 206-214, 1998
- 2) Notoda M, Shinosaki T, Kobayashi T, Sakai T, Kurihara H: Intussusceptive capillary growth is required for glomerular repair in rat Thy-1.1 nephritis. *Kidney Int* 63: 1365-1373, 2003.
- 3) Yamanaka N and Shimizu A: Role of glomerular endothelial damage in progressive renal disease. *Kidney blood press* 22: 13-20, 1999.
- 4) Wada Y, Morioka T, Oyanagi-Tanaka Y, Yao J, Suzuki Y, Gejyo F, Arakawa M and Oite T: Impairment of vascular regeneration precedes progressive glomerulosclerosis in anti-Thy 1 glomerulonephritis. *Kidney Int* 61: 432-443, 2002.
- 5) Nakayama H, Oite T, Kawachi H, Morioka T, Kobayashi H, Orikasa M, Arakawa M and Shimizu F: Comparative nephritogenicity of two monoclonal antibodies that recognize different epitopes of rat Thy-1.1 molecule. *Nephron* 78: 453-463, 1998.
- 6) Bing Li, Yao J, Hoshiyama M, Morioka T, Suzuki Y, Arakawa M and Oite T: Nitric oxide increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via a phosphorylation-dependent mechanism. *J Am Soc Nephrol* 12: 2616-2624, 2001.