

## 糸球体上皮細胞の培養をめざして

新潟大学医学部腎研究施設構造病理学分野（主任：山本 格教授）

矢尾板 永 信

Glomerular Epithelial Cell Culture

Eishin YAOITA

*Department of Renal Pathology, Institute of Nephrology,  
Faculty of Medicine, Niigata University*

Glomerular epithelial cells (GECs) play crucial roles in morphogenesis and repair of the glomerulus. Injury to GECs may be the starting point for eventual glomerular tuft destruction. In spite of the biological and pathological significance of GECs, the unanimous culture system of GECs has not been established. Although cobblestone-like polygonal cells have been described as cultured GECs, their origin remains controversial. GECs are damaged during the isolation of glomeruli by the conventional sieving method, and cellular outgrowth from glomeruli devoid of Bowman's capsule (decapsulated glomeruli) has been too limited for definitive characterization of cell types. Therefore, we devised an isolation method that does not use mechanical force. The result produced substantial numbers of outgrowths from decapsulated glomeruli. Morphologically, these cells were distinctly different from cobblestone-like polygonal cells. Cells growing from decapsulated glomeruli showed intense staining for podocyte-specific markers (podocalyxin), but no staining for markers specific to mesangial cells (Thy-1), endothelial cells (RECA-1), indicating that these cells were of GEC origin. In addition, some phenotypes specific to GECs *in vivo* were expressed in cultured parietal epithelial cells of Bowman's capsule and tubular epithelial cells. These fin-

---

Reprint requests to: Eishin YAOITA,  
Department of Renal Pathology,  
Institute of Nephrology, Faculty of Medicine,  
Niigata University,  
Asahimachi-dori 1, Niigata,  
951-8510 JAPAN.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部腎研究施設構造病理学分野  
矢尾板永信

dings indicate that valid conclusions about experimental outcomes depend on clearcut definition of the cell types involved.

Key words: kidney, glomerular epithelial cells, podocytes, culture  
腎臓, 糸球体上皮細胞, タコ足細胞, 培養

## はじめに

腎臓に心拍出量の20%の血量が流れ込み、約200万個ある糸球体では1日140ℓという膨大な糸球体ろ過、すなわち原尿の産生が行われている。この膨大な原尿産生により、生体は高い活動性を維持しつつも、内部環境の恒常性を保つことができる。慢性腎不全の主な原因である糖尿病性腎症、IgA腎症などの慢性糸球体腎炎では、糸球体の構造が次々と崩壊し、最終的にはほとんど血液の通わない癥痕化した組織となる。糸球体が壊れていく機序を解明しようとしたとき、糸球体を傷害する側と糸球体を修復維持する側の両方の機序を考慮に入れなければならない。前者については膨大な数の研究がなされ多くの因子が関わっていることが示されてきている。それに対し、後者については、糸球体構成細胞間の相互作用、細胞基質間の相互作用が関わっていることが考えられるが、実質的には全くわかっていない。我々は糸球体構築の形成・維持のメカニズムについて糸球体上皮細胞(GEC)を中心に検討している。ここでは、糸球体形成維持における上皮細胞の重要性を示す報告を簡単に紹介し、その細胞生物学的解析のために必要なGECの培養がどのようなものかについてを述べたい。

### 糸球体形成維持における糸球体上皮細胞(GEC)の重要性

糸球体発生過程でのGECの重要性は後腎原基培養の実験で明瞭に示されている。胎生11日のマウスの腎臓には、未分化な細胞のみで上皮細胞は無い。この未分化な腎臓を取り出し、脊椎の一部と一緒に培養すると、上皮細胞が分化誘導され、不完全ながら糸球体をはじめネフロンが形成されてくる。この糸球体を観察すると、GECのみから出来上がっていて、他の糸球体構成細胞を欠いている<sup>1)</sup>。このことは、GECに基本的な糸球体構築を作り上げるプログラムが存在していることを意味している。同様なことは、平滑筋、繊維芽細胞の増殖に必要な増殖因子(PDGF)、またはその受容体をノックアウトしたマウスでも示されている。この場合、メサンギウム細胞の無い糸球体が形成されてくる<sup>2)3)</sup>。ただし、

この糸球体は分葉の無い、単一の血管腔からなる異常な構造を取っている。

GECは細胞分裂をほとんど行わない細胞であることが明らかになってきている。<sup>3</sup>H-thymidineを動物に静注して、DNA合成、細胞分裂を行っている細胞をオートラジオグラフィーで同定する実験での検討から、GECは生理的状態だけでは無く病的状態でも<sup>3</sup>H-thymidineを取り込むことはほとんど無いことが示されている<sup>4)5)</sup>。また、病的状態での観察から、多核のGECが稀に存在していることが報告されている。これも、仮にDNA合成、核分裂を行うことがあっても、細胞分裂までには至らない証拠として解釈されている。事実、GECが傷害され、基底膜から脱落してしまった場合、GECは細胞分裂によって補われることなく、対岸のポウマン囊壁側細胞(PEC)が増殖し、癒着・半月体といった不可逆的な組織変化を引き起こす。これと対照的に、メサンギウム細胞と内皮細胞は、増殖再生に富む細胞である。急性糸球体腎炎やラット実験腎炎であるThy-1腎炎<sup>6)</sup>では、広範囲にメサンギウム細胞と内皮細胞が障害を受けても、一定の期間の後には元通りの糸球体構造に修復されてしまう。

これらの実験結果から、GECが糸球体形成・維持に積極的に関わっており、細胞分裂能の欠いたGECの傷害は容易に糸球体の崩壊をもたらすことが推論される。

### 糸球体上皮細胞(GEC)の培養

GECの細胞生物学的特性を解析するため、30年以上前よりその培養が試みられて来ている。腎皮質を細切して得られた組織断片から、段階的なメッシュを用いたsieving法によって、大きさを基準に糸球体を単離することができる。この単離糸球体を培養すると、ほとんどの場合、数石様の単純な形態をした細胞が増殖し、多くの施設でこの細胞をGEC由来の細胞として研究が行われている。in vivoにおいては、GECは、タコ足細胞と呼ばれるような細胞突起を四方に伸ばした独特の形態をしている。多くの細胞が培養で分化形質を失うように、GECが培養によって脱分化を起こし、この数石様の細胞になったのだろうと考えている。現在用いられて

いる培養条件は, Harper らの方法<sup>7)</sup>を基本にしているものが多い。しかし, 10年前よりこの細胞の由来に疑問を投げかける報告が相次いでいる。ボウマン囊の混入を, 少ないながらも除外しきれないことが指摘され, Nørgaard を始め我々は PEC が糸球体培養で増殖してくること<sup>8)9)</sup>を, さらには Holthöfer ら<sup>10)</sup>, Weinstein ら<sup>11)</sup>は従来言われている培養 GEC は PEC の性質により近いことを報告した。その後, 用いている培養上皮細胞が GEC 由来か, PEC 由来かはしっかりしたコンセンサスが得られていない状態が続いている。

通常の sieving 法による糸球体単離を行った場合, PEC の混入は多かれ少なかれ避け得ない<sup>8)9)</sup>。さらに, 尿管の混入もしばしば観察され, そこから上皮細胞 (TEC) の増殖も認められる<sup>9)</sup>。そこで, 我々はこのような PEC, TEC の混入を避けるため, sieving によって得られた単離糸球体に富む画分から, さらに位相差顕微鏡下でボウマン囊の被っていない糸球体だけを選び出し培養を試みた。また, 同じ手順でボウマン囊の被った糸球体だけ, または尿管断片だけを分離培養が可能である。驚いたことに, ボウマン囊の被った糸球体からは高率に敷石様上皮細胞が増殖してくるのに対し, ボウマン囊の被っていない糸球体からはほとんど細胞が生え出さなかった<sup>9)</sup>。この理由は, sieving 法によって糸球体が単離された場合, GEC は傷害を受け, ほとんどがアポトーシスに陥ってしまうことが証明されたことによって明らかとなった<sup>12)</sup>。そこで, GEC 傷害の原因と予想される sieving 操作をせず, 腎組織を細切するだけで単離される糸球体を位相差顕微鏡下で集め培養を行った。その結果, ボウマン囊を被っていない糸球体からの細胞の生え出しは顕著に改善した。図は, sieving 操作を除くというそれだけのことで観察が可能になった糸球体から培養されてくる細胞 (a) の位相差顕微鏡写真である。対照にボウマン囊の被った糸球体 (b), 尿管 (c) より増殖してくる細胞を示してある。明らかに, 異なった独特の形態をした細胞が糸球体より生え出している。典型的なものは, 多核で GEC の一次突起を思わせる構造物が細胞内にみられる。この細胞は, 糸球体の他の構成細胞である内皮細胞, メサンギウム細胞のマーカーである RECA-1, Thy-1 はそれぞれ陰性であり, GEC に特異的に多く発現しているポドカリキシンは陽性である。これらのことから, この細胞は GEC 由来であると結論付けられる。それに対して, 従来 GEC 由来とされてきた敷石様の細胞は, ボウマン囊の被っていない糸

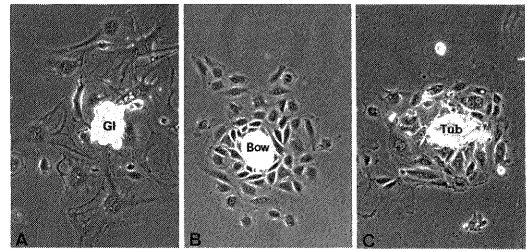


図 糸球体および尿管断片より生え出した細胞の位相差顕微鏡像

(A) ボウマン囊のない糸球体 (Gl) を培養し, 生え出してくる細胞を見たもの。(B) はボウマン囊を被った糸球体 (Bow) より, (C) は尿管断片 (Tub) より増殖してきた敷石様配列の細胞を示した。

球体からほとんど培養されてこない。ボウマン囊の被った糸球体からは高率に敷石様上皮細胞が増殖してくることと考え合わせると, PEC 由来とするのが妥当と考えられる。したがって, この培養系は三種類の培養細胞, すなわち GEC, PEC, TEC 由来の細胞を区別して培養できる系であり, これらを比較することにより GEC の特徴をより明確に示すことが可能になった。

糸球体培養における細胞同定が困難であった理由のひとつに, *in vitro* における形質変化がある。*in vivo* で見られた特性が失われたり, GEC 特異的と思われていたものが培養中 PEC, TEC にも発現することがある。そこで, GEC に特異的と考えられてきたマーカーについて, 上記の三種類の細胞を用いて, 培養においても GEC に特異的かどうかを検討した。ポドカリキシン, シナプトポドイン, WT1, ビメンチン, HSP27, P-31 はいずれもラット腎組織切片において GEC にもみられ, PEC, TEC には観察されない。またデスミンという中間径フィラメント蛋白質は, ラット GEC に陰性から陽性までさまざまな強さに染め出すことができ, 病的状態ではすべての GEC に著明に強く陽性になってくる<sup>13)</sup>。しかし, PEC, TEC にはいずれの状態においても陽性になってくることはない。このようなマーカーを培養細胞で検討した結果が表に示してある。確かに *in vivo* における GEC のマーカーはすべて, 培養 GEC に陽性となってくるが, 意外なことに, ポドカリキシンのみが GEC に特異的であり, 他のマーカーは PEC または TEC にも陽性となってくる。これは, PEC, TEC の培養系における形質変化を示している。しかし, 別の視点からみるとこのことが GEC の特徴

表 糸球体上皮細胞マーカーの培養系での特異性の検討

	GEC	PEC	TEC
ポドカリキシン	+	-	-
シナプトポダイン	+	±	-
デスミン	+	±	-
WT 1	+	+	-
ビメンチン	+	+	+
HSP-27	+	+	+
P-31	+	+	+

GEC: 糸球体上皮細胞, PEC: ポウマン嚢壁側上皮細胞,  
TEC: 尿細管上皮細胞.

+: 陽性, ±: 一部の細胞が陽性, -: 陰性

を表しているように思われる。すなわち、一般の上皮細胞が培養という細胞密度・細胞外基質の希薄な状態で始めて発現してくるような形質を、GECは *in vivo* で発現維持しているのである。そして、この特徴のためこれまでの培養 GEC の報告に食い違いが生じてきたものと考えられる。

## む す び

現在、GEC の培養は、ようやくどの細胞が GEC 由来であるかが分かってきた状態である。研究の目標は、この培養細胞を用いて *in vivo* の GEC の性質を明らかにすることである。そのためには多くのハードルを乗り越えなければならない。培養細胞は、*in vivo* で特徴的に見られる足突起、スリット膜を失っている。また、ほとんどの細胞が多核であるように細胞分裂を行っているようには思われない。したがって、*in vivo* と同じ形質を発現する条件の設定、cell line の確立が今後必要となってくる。そのような問題を克服したとき、培養系は GEC の細胞生物学に大きな貢献をしえるのではないかと期待している。

## 文 献

- 1) Bernstein, J., Cheng, F. and Roszka, Z.: Glomerular differentiation in metanephritic culture. *Lab. Invest.* 45: 183~190, 1981.
- 2) Leveen, P., Pekny, M., Gebe-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E. and Betsholtz, C.: Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and he-

matological abnormalities. *Genes Dev.* 8: 1875~1887, 1994.

- 3) Soriano, P.: Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF b-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 8: 1888~1896, 1994.
- 4) Pabst, R. and Sterzel, R.B.: Cell renewal of glomerular cell types in normal rats: an autoradiographic analysis. *Kidney Int.* 24: 626~631, 1983.
- 5) Kihara, I., Yaoita, E., Kawasaki, K. and Yamamoto, T.: Limitation of podocyte adaptation for glomerular injury in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Pathol. Int.* 45: 625~634, 1995.
- 6) Yamamoto, T. and Wilson, C.B.: Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat. *Kidney Int.* 32: 514~525, 1987.
- 7) Harper, P.A., Robinsen, J.M., Hoover, R.L., Wright, T.C. and Karnovsky M.J.: Improved methods for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int.* 26: 875~880, 1984.
- 8) Nørgaard, J.O.R.: Rat glomerular epithelial cells in culture: Parietal or visceral epithelial origin? *Lab Invest* 57: 277~290, 1987.
- 9) Yaoita, E., Yamamoto, T., Saito, M., Kawasaki, K. and Kihara, I.: Desmin-positive epithelial cells outgrowing from rat encapsulated glomeruli. *Eur. J. Cell Biol.* 54: 140~149, 1991.
- 10) Holthöfer, H., Sainio, K. and Miettinen, A.: Rat glomerular cells do not express podocytic markers cultured *in vitro*. *Lab. Invest.* 65: 548~557, 1991.
- 11) Weistein, T., Cameron, R., Katz, A. and Silverman, M.: Rat glomerular epithelial cells in culture express characteristics of perietal, not visceral, epithelium. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3: 1279~1287, 1992.
- 12) Ishikawa, Y. and Kitamura, M.: Spontaneous apoptosis of podocytes in explanted glomeruli. *Kidney Int.* 54: 2008~2013, 1998.
- 13) Yaoita, E., Kawasaki, K., Yamamoto, T. and Kihara, I.: Variable expression of desmin in rat glomerular epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 136: 899~908, 1990.