

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) (要約)

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 生体機能調節医学専攻 腎構造病理学分野

氏名 大山 富三

---

## 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、我々は、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

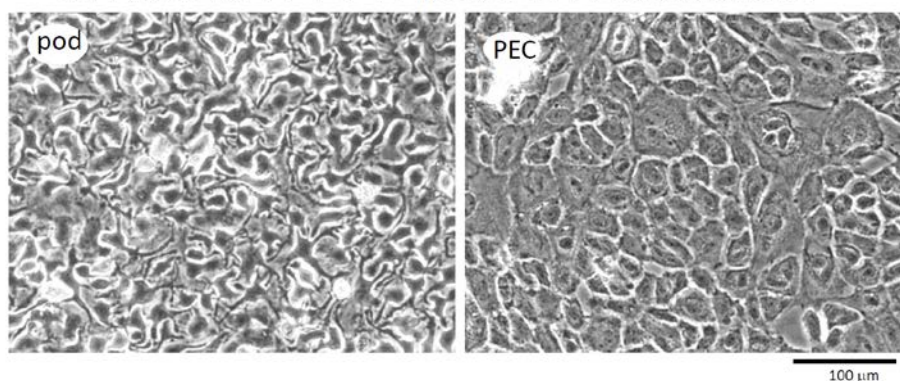
ラットの腎臓を 6 $\mu$ m の鉄粉粒子を含む PBS で灌流し、鉄粉粒子を糸球体に留めた。ポドサイト培養の場合、灌流腎臓の腎皮質を細切し、コラゲナーゼで消化後、100 $\mu$ m のセルストレーナーに通し、磁石で糸球体を集めた。得られた糸球体は、ほぼすべてがボウマン嚢で覆われていない糸球体であり、ここから生えだしてきた細胞をポドサイト由来とした。PEC 培養の場合、コラゲナーゼ消化を行わずに従来の段階的なシービング法で灌流腎皮質から糸球体を分離し、さらに磁石を用いて尿細管の混入を 1%程度までに抑えた。これで得られた糸球体の半分はボウマン嚢で覆われていた。コラゲナーゼ消化無しのシー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、ラミネ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  $\mu$ 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  $\mu$ M ATRA のみを含み 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  $\mu$ 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（図 pod），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（図 PEC）。アドヘレンス結合(AJ)構成成分である  $\alpha$ -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。

継代培養4日目のポドサイト (pod) と PEC の位相差顕微鏡写真



#### 考察

実験で用いた 2 種類の培養細胞は、両方とも単離系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。

#### 結論

本研究の培養条件によって、ポドサイトと PEC の培養細胞が明確に異なる形質を示すことが明らかとなった。