

ラット腎糸球体培養におけるデスミン陽性上皮細胞

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

矢尾板 永信 木原 達

糸球体上皮細胞(VEC)を培養系で研究する第一段階として、糸球体培養におけるVECの同定を検討した。ラットVECに特異的に発現されている podocalyxin に対する抗体(I-A)を用い免疫染色を行なった。その結果、Large arborized cell に代表される細胞群がI-A陽性であり、またこれらの細胞は、デスミンを強く発現していた。このことは、培養VECが、病的条件下のVECに近い性質を有していることを示している。

糸球体上皮細胞, 培養, podocalyxin, デスミン

(はじめに)

腎糸球体上皮細胞(VEC)は、ほとんど細胞分裂を行なわないこと、糸球体濾過に重要な基底膜の主たる産生細胞であることなどから、研究者の関心を集め盛んに研究されている。その研究手段として、最もよく用いられているものの1つに、培養細胞がある。しかしながら、その同定は非常に曖昧で、糸球体培養によって得られる敷石状配列を呈する細胞としていることが多い。一方、VEC由来の細胞として、Large arborized cell と表現される細胞をあげる研究者もある。そこで、糸球体培養において、どの細胞がVEC由来であることを明らかにするため、VECに特異的な抗体を用いて検討した。

(方法)

WKYラット腎皮質より sieving によって、単離糸球体を主に含む組織片浮遊液を得た。この浮遊液より位相差顕微鏡下で、ボウマン嚢におおわれていない糸球体(G)、ボウマン嚢をともなった糸球体(B)を選別し、I型コラーゲンをコートした培養皿上、5%胎仔牛血清を含む培地で6日間培養した。

培養皿上に生え出した細胞を位相差顕微鏡、及び、蛍光抗体法で観察した。VECに特異的な

抗体としてI-A(podocalyxin に対するモノクロナル抗体)を用いた。また、デスミン、ビメンチン、ケラチン、 α 平滑筋型アクチン、von Willebrand factor に対する抗体でも検討した。I-Aによる免疫染色は、培養皿上の細胞をPLPで5分間固定した後、I-Aを反応させ間接蛍光抗体法で観察した。その他の抗体は、PLP固定後、0.2% Triton X-100で5分処理したもの、またはアセトン5分処理したものに用い、二重蛍光抗体法を行なった。(結果)

位相差顕微鏡による観察では、Gの培養において、Gの培養皿への付着率は低く、培養皿上への細胞の生え出しもまれであった。しかし、非常に低い率であったが、Large arborized cellも、敷石状配列を呈する細胞も認められた。これに対し、Bの培養は、以前に報告した如く(1)、培養皿への付着率、及び細胞の生え出す率共に高かった。生え出した細胞のほとんどは小型(30-50 μ m)の敷石状配列を呈する細胞であり、少数ながら、Large arborized cell(200-300 μ m)も観察された。VEC由来の培養細胞をみるには、Gより生え出す細胞を対象とするのが適切と考えられるが、Gから細胞が生え出す率が非常に低いため、GとBの区別なく集め

新潟大学医学部腎研究施設病理形態学部門

Eishin Yaoita, Itaru Kihara

Institute of Nephrology, Niigata University School of Medicine

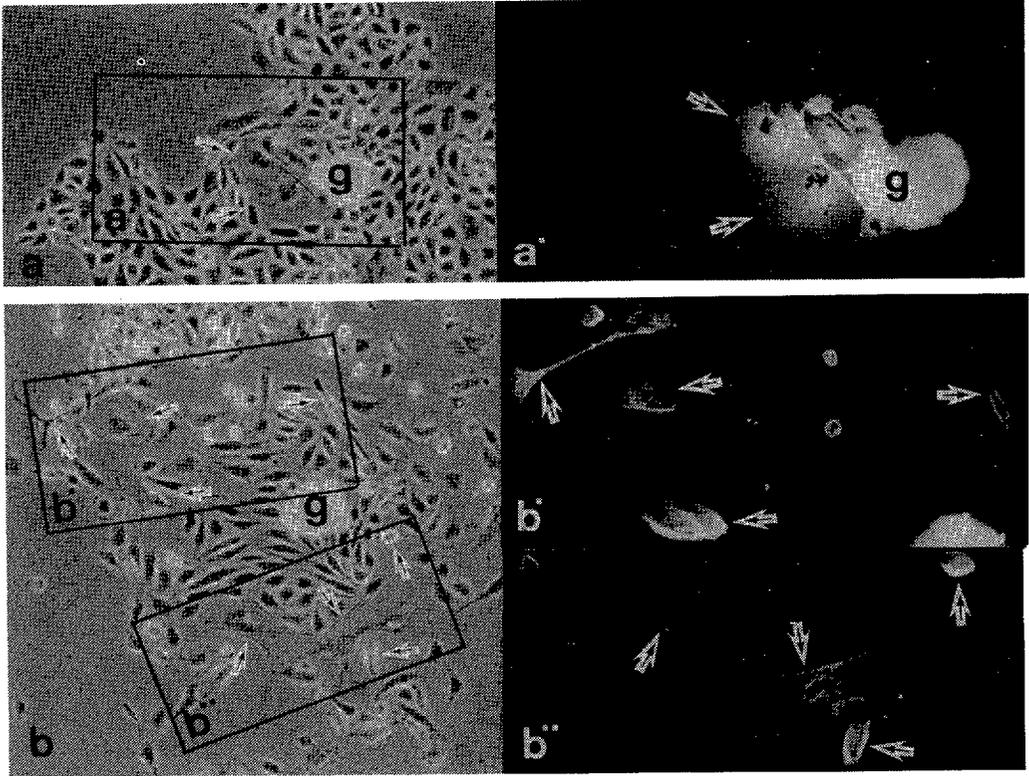


図1. 糸球体培養6日目の位相差顕微鏡写真(a, b)と1-Aによる蛍光抗体法写真(a', b', b'')。a, bにa', b', b''の対応する場所、細胞がそれぞれ黒枠、矢印で示してある。伸展した細胞ほど染色性が弱い傾向がある。g: 糸球体。

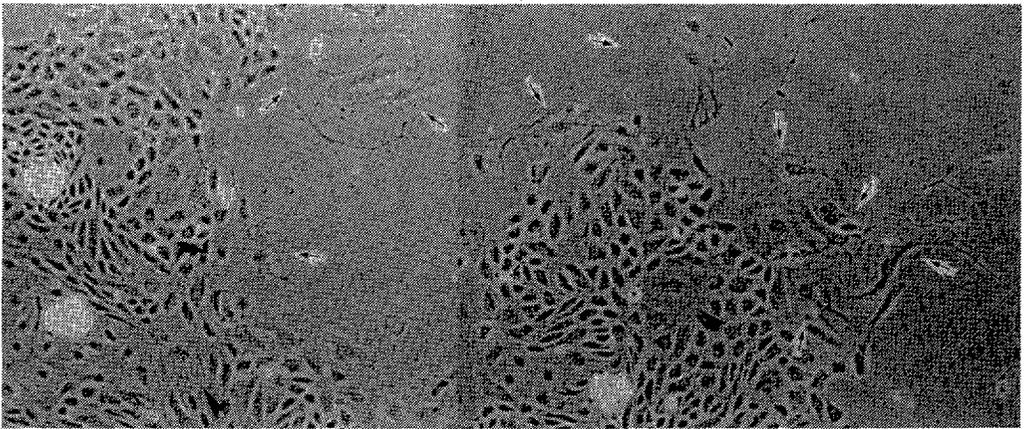


図2. 糸球体培養6日目の位相差顕微鏡写真。敷石状配列の中の多核の大型細胞(矢頭)及び周辺の非常に伸展した細胞(矢)が示してある。

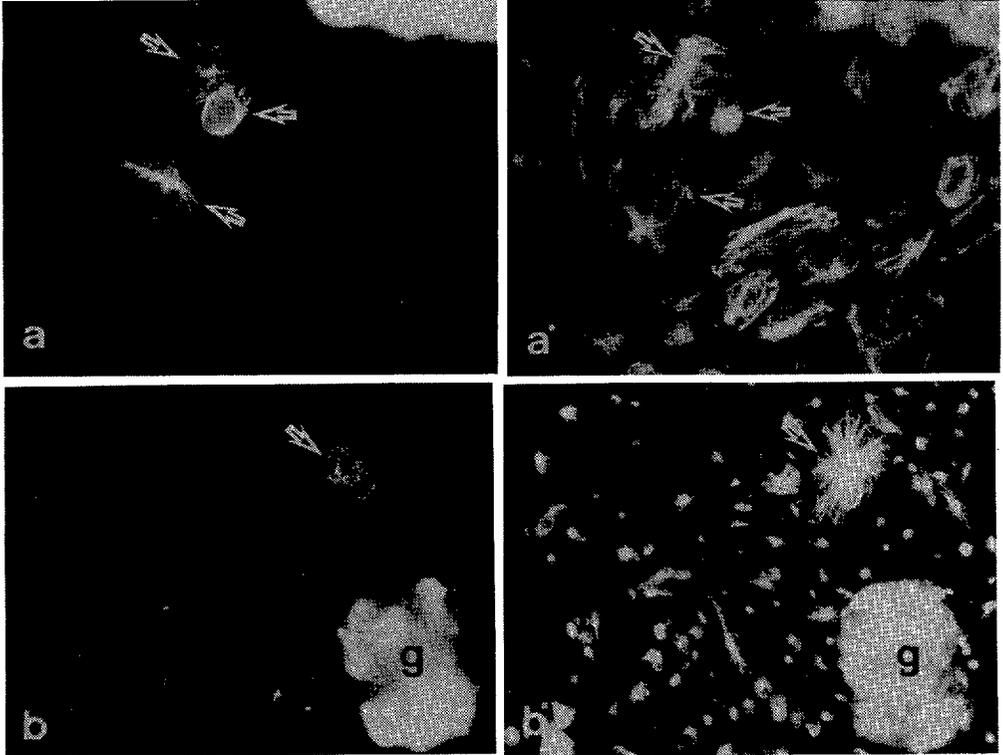


図3. 糸球体培養6日目の1-A (a, b)と抗デスミン抗体 (a', b')を用いた二重蛍光抗体法写真。対応する細胞が矢印で示してある。a, a': $\times 295$, b, b': $\times 148$, G:糸球体

た糸球体を培養し、検索を行なった。

図1が示す如く、小型の敷石状配列の細胞と1-Aは反応せず、Large arborized cell, 突起状に細く伸びた細胞、丸型の小型細胞に反応するものが観察された。これらの細胞は、しばしば2核、またはそれ以上の多核となり、敷石配列の細胞よりなるコロニーの周辺では、非常に伸展し細胞の辺縁は扇状または細長い突起を形成していた(図2)。この細胞突起は、他の細胞を横切ることもあった(図1b'左上の細胞参照)。

1-A陽性細胞は、デスミンが強く染め出された。1-A陰性の敷石状細胞もデスミンが強く染め出されたものも陽性であったが、これに比し、1-A陽性細胞の方が一般にデスミンの染色性

が強かった。特に、大型のLarge arborized cellでは、顕著であった(図3)。

他の免疫染色では、Large arborized cellは、ビメンチン、 α 平滑筋型アクチンが陽性で、von Willebrand factor, ケラチンは陰性であった。

(考察)

モノクロナル抗体1-Aは、podocalyxinを認識する抗体である(2)。podocalyxinは、ラットVECに主に存在するシアロ蛋白であり、僅かながら、内皮細胞にも存在する(3)。糸球体培養にみられた1-A陽性細胞は、内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor は陰性であったので、VEC由来の細胞と考えられる。この細胞がGより生え出す頻度が低い理由とし

てはNørgaard が指摘しているように、G表面の細胞が糸球体単離過程で傷害を受けている可能性が考えられる(4)。I-A陽性細胞は、Large arborized cellを含め、突起を伸ばした細胞、丸型の小型細胞にもみられた。したがって、位相差像で他の細胞と区別することは困難であるが、多核で大型のしばしば突起している細胞はI-A陽性と言ってよいようである。

多くの論文でいわれているような敷石状配列の細胞がVEC由来であるという所見は得られなかった。我々は、その形態学的特徴、Bより主に増殖してくる点より、ポウマン囊壁細胞(PEC)由来と考えている(1)。I-A陽性細胞と敷石状の配列を呈する細胞は、いくつかの共通点を持っている。双方とも、筋細胞に特異的とされているデスミン、 α 平滑筋型アクチンが染め出され、ビメンチンも強染される(1)。VECとPECが発生学上、非常に近縁の細胞に由来していることから、これらの共通点は説明されるかもしれない。

VECは、in vivoで生理的条件下、僅かしかデスミンが染め出されず、病的状態では、デスミンの染色性が非常に強くなる(5)。I-A陽性細胞にデスミンが強く発現されるのは、I-A陽性細胞が病的状態のVECに近い性質を有しているのではないかと考えられる。

ラット糸球体培養にみられるVEC、PEC、メサンギウム細胞由来と考えられる細胞は、すべてデスミンと α 平滑筋型アクチンを発現している(1, 6)。これらを区別する抗原としてpodocalyxin(VEC)とThy-1抗原(メサンギウム細胞)があげられる。しかしながら、podocalyxinの染色性は伸展した細胞では弱く、いつも陽性陰性を断定できるとはかぎらない。さらに多くのマーカーをみつけ出す努力が必要である。このようにして同定されたVECを選択的に集め、培養できれば、VECの代謝や傷害機序がより明確なものとなり、さらには、in vivoにおける糸球体荒廃形成の解明に貢献できるものと考えられる。

(文献)

1. Yaoita E, Yamamoto T, Saito M, Kawasaki K, Kihara I: Eur J Cell Biol 1991, in press
2. Miettinen A, Dekan G, Farquhar MG: Am J Pathol 1990, 137: 929-944
3. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG: J Cell Biol 1984, 98: 1591-1596
4. Nørgaard JOR: Lab Invest 1987, 57: 277-290
5. Yaoita E, Kawasaki K, Yamamoto T, Kihara I: Am J Pathol 1990, 136: 899-908
6. Yaoita E, Yamamoto T, Kihara I: In Shimizu F, Oite T (eds): Structural Basis for Glomerular Dysfunction. 西村書店, 新潟, 1991, in press



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



糸球体上皮細胞(VEC)を培養系で研究する第一段階として,糸球体培養における VEC の同定を検討した。ラット VEC に特異的に発現されている podocalyxin に対する抗体(1-A)を用い免疫染色を行なった。その結果, Large arborized cell に代表される細胞群が 1-A 陽性であり,またこれらの細胞は,デスミンを強く発現していた。このことは,培養 VEC が,病的条件下の VEC に近い性質を有していることを示している。