

原 著

マウス胎仔腎臓由来細胞による培養下での renal tubulogenesisにおける形態学的検討

永野 忠相

Morphological Study of the Renal Tubulogenesis in the Organoid Culture by Fetal Mouse Kidney-derived Cells

Tadasuke Nagano (Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Kawagoe, Saitama 350-8550, Japan)

The organoid culture method using completely isolated cells from fetal organ is a useful tool for studying organogenesis. Using this method, we investigated the renal development, especially renal tubulogenesis, by a combination of electronmicroscopy, lectin-histochemistry, and reverse transcription linked polymerase chain reaction (RT-PCR). Completely isolated cells from fetal mouse kidneys were seeded onto a membrane filter. After 7 days in culture, a dome-shaped cellular mass consisted of tubule-like structures was formed. Some short microvilli and basement membrane were observed. After 14 days in culture, microvilli became longer, and the number of microvilli was increased. The tubule-like structure showed a positive staining of lectins [*Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and Wheat germ agglutinin (WGA)]. Expression of aquaporin-2 (AQP-2) could be detected after 1 day in culture. When the culture periods were prolonged, the expression of AQP-2 was not detectable. Based on the findings of morphological features and lectin-histochemical staining patterns, we concluded that the tubule-like structure was recognized as a primitive collecting duct. Organoid culture method presented here is a useful tool for studying the development of the kidney.

Keywords: kidney, culture, tubulogenesis, lectin, collecting duct, aquaporin

J Saitama Med School 2004;31:89-94

(Received January 9, 2004)

緒 言

腎臓の起源は後腎管から派生した上皮系の尿管芽と中胚葉由来の後腎細胞塊(間葉細胞塊)であり,尿管芽から集合管が,間葉細胞塊から糸球体,尿細管が形成される.さらに最終的な腎形成は集合管と尿細管が結合し,多数のネフロン集合体としての腎臓が形成されるという複雑な過程を経る.ネフロンが形成される過程,いわゆる nephrogenesis における尿管芽からの集合管の形成・成長と分岐,間葉細胞から上皮細胞への形質転換にともなう尿細管の形成など,これらの管腔を持った構造物の形成 (renal tubulogenesis) に関する機構は複雑で十分に解明されているとはいえない.これらを解明する為に *in vitro* では monolayer culture をはじめ organ culture, high density culture

(mass culture) など種々の培養法が用いられてきた.

Murata ら¹⁾は,胎仔小腸より単離した細胞を高密度で培養する organoid culture により,数日間の培養で絨毛の形成がみられ *in vivo* に近い構造をもった小腸が形成されることを報告している. Organoid culture は培養細胞を空気と medium の interface で培養する方法であり, cell-specific micro-environment の形成を容易にするといわれており²⁾,上皮細胞と間葉系細胞の間の cell-cell interaction や renal tubulogenesis の過程における cell-matrix interaction を観察するのに有用な方法である.我々はこの organoid culture を胎仔腎臓に応用し,管腔を持った構造物が形成されることを報告した³⁾.今回この管腔を持った構造物が何れのネフロン・セグメントに相当するものか,形態学的およびレクチンによる組織化学的観察を行い検討した結果,形態的には集合管と思われる所見が得られた.また,これらの管腔を持った構造物が集合管として機能的

な分化を示しているかを調べるため、集合管に特異的な水チャンネルであるAquaporin-2 (AQP-2) の発現についてReverse Transcription linked Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) によりさらに検討を加えた。

材料と方法

1. Organoid culture

ICRマウス胎仔、胎令16日の腎臓を実体顕微鏡下で摘出し、Hanks液 (HBSS) 中でメスを用い細切した。HBSSで洗浄した後0.1% collagenase/dispase/HBSS (Boehringer Ingelheim GmbH, Germany) を用い37°Cで60分間静かに振動させながらincubateした。HBSSで数回洗浄した後上清を捨て、5 mlのgrowth mediumを加えた後、ピペティングし細胞を単離した。孔サイズ20 μ mのナイロンメッシュでろ過し、室温で10分間800 rpmで遠心した後上清を捨て、高密度細胞浮遊液を作製した。直径3.5 mmの培養皿にstainless steel網をおきその上にmembrane filterを重ねその上に高密度細胞浮遊液を20 μ l ($3.6-5.5 \times 10^6$ cells) ずつ直径5~6 mmにspotした。培養皿にはHam's F-12 mediumにglucose; 2 mg/ml, penicillin; 50 units/ml, streptomycin; 50 μ g/ml, nonessential amino acids; 10 μ l/ml, 10% calf serumを加えたgrowth mediumを2.5 mlずつ入れ37°C, 5% CO₂ in air で培養した。培養液は2日毎に交換した。培養に用いた試薬は Invitrogen Co., CA, USAより入手した。

2. 電子顕微鏡による観察

培養開始より1日目、7日目、14日目にmembrane filter上の培養細胞を2.5% glutaraldehydeと1% tannic acidを含む0.1M phosphate buffer (pH 7.2) で前固定した後、1% osmium tetroxideを含む0.1M phosphate bufferで後固定し、エタノールで脱水、Eponに包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニール・クエン酸鉛による2重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (JOL 1010, Nihon Denshi, Tokyo, Japan) で観察した。また、organoid cultureで観察された管腔構造物との比較のために、胎仔(16日齢)マウス腎臓を培養細胞と同様に処理、超薄切片を作成し電子顕微鏡にて観察した。

3. レクチンによる組織化学的反応

培養開始より1日目、7日目、14日目の材料を10%中性ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。4 μ mのパラフィン切片を作製し、作製した切片を脱パラフィンした後、0.1%トリプシン (Sigma-Aldrich, Co., MO, USA) と室温で10分間反応させ前処理を行った。内因性パーオキシダーゼ活性をブロックするために0.03%過酸化水素水 (DAKO Co., Hamburg, Germany) を切片上に滴下し室温で10分間保存した。精製水で切片上の試薬を洗い流した後、phosphate-buffered saline (PBS) 中に5分間

浸漬させた。PBSを用いて100倍希釈したレクチン溶液を切片上に滴下し室温で60分間反応させた。用いたレクチンは*Dolichos biflorus* (DAB); specific for GalNAc α 1-3GalNAc, Wheat germ agglutinin (WGA); specific for GlcNAc, *Glycine max* (SBA); specific for GalNAc α 1-3Gal, ならびに*Ulex europaeus* (UEA-1); specific for the terminal α -L-fucoseである。レクチンはE-Y Lab., Co. CA, USAより入手した。PBSで数回洗浄した後、室温で30分間peroxidase標識 streptavidinと反応させた。PBSで洗浄後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) (DAKO Co., Hamburg, Germany) を用いて発色させた。MayerのHematoxylinによる対比染色を行った後、脱水、透徹後非水溶性封入剤を用いて封入した。

4. AQP-2のRT-PCR

胎齢16日マウス腎臓ならびに培養開始より1日目、3日目、7日目、14日目にAQP-2の発現をRT-PCR法を用いて検討した。mRNAの分離は μ MACS mRNA isolation Kit (Daiichi Chem., Tokyo, Japan) を用いて行った。mRNA isolation Kitのプロトコールに従い胎齢16日マウス腎臓、培養したそれぞれの時期の細胞塊を液体窒素の中に入れ粉碎しLysis/Binding Bufferを加え完全に溶解した。溶解した液を13,000 rpmで3分間遠心した後、Oligo (dT) MicroBeadsを加え、カラムを通過させることによってmRNAを溶出した。エタノール沈殿後、You Prime First Strand Beads (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) を用いcDNAを合成した。合成したcDNAをtemplateとしTakara PCR Thermal Cycler MP (Takara Shuzo Co. Ltd., Shiga, Japan) を用いRT-PCRを行った。AQP-2のprimer designならびに条件は、Zharkikhら⁴⁾の報告に従った。PCR産物は1%アガロースゲルを作製、Mupidを使用しTris-Borate-EDTA buffer (Takara Shuzo Co. Ltd., Shiga, Japan) で電気泳動を行い分析した。

結 果

1. 光学、電子顕微鏡による観察

単離した細胞は培養1日目では集合し一塊となっていた (Fig. 1)。これらの集合した細胞には、細胞間の接着および細胞の極性はなく、基底膜の形成も認められなかった。培養7日目になると光顕像では細胞集塊はドーム状に盛り上がり、membrane filterに接している側を中心に、細胞が整列し管腔を示す構造物を認めた (Fig. 2A)。なかには管腔を示さず、一塊となっているものも認められた。この構造物を電子顕微鏡で見ると管腔を構成する細胞の配列は極性をもっていた。細胞同士は互いに接着し、細胞の基底直下には基底膜の形成が認められ、管腔側には短いながらも微絨毛が形成されていた (Fig. 2B)。管腔を構成する細胞には電子密度の低いものと高いものが認められ、一端が

拡張しいわゆる膨大部 (ampulla) を形成していた。電子密度の低いものは微絨毛に乏しく、電子密度の高いものはミトコンドリアが豊富であった。培養14日目になると、管腔を形成する細胞はより長く配列し、管腔を構成する細胞の細胞質にはミトコンドリアが豊富になり、管腔側に認められた微絨毛(あるいは micropliae) は7日目より発達し長くなっていた (Fig.

3A)。BrownとGluck⁵⁾が報告しているような細胞膜直下に H^+ を分泌する H^+ ATPaseである鋸歯状構造の小胞 (stubs) は明らかではなかった (Fig. 3B)。

今回観察された管腔を持った構造物との比較のために、Fig. 4に胎齢16日マウス腎臓の電子顕微鏡像を示した。16日齢では原始集合管の膨大部周辺に間葉系細胞の集合がみられ、間葉系細胞の集合は次第に原始

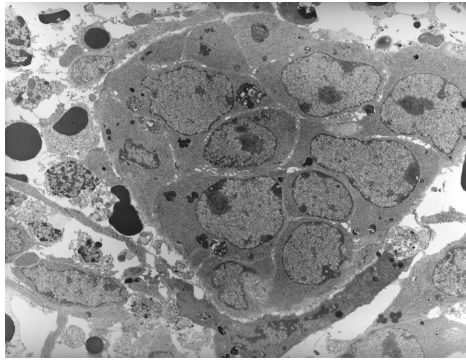


Fig. 1. After 1 day in culture : The cells were agglomerated into a cellular mass. The intercellular adhesion was obscure. Basement membrane was not observed at this time. x 2,500.

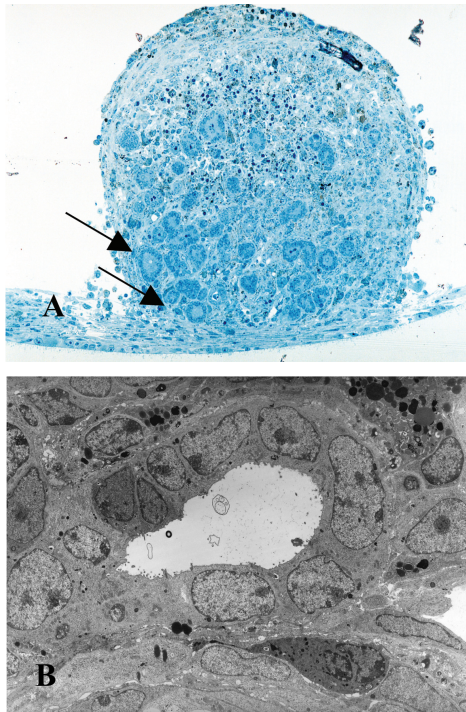


Fig. 2. A: After 7 days in culture: A high-density cell suspension grew into a dome-like cellular mass on a membrane filter. Tubule-like structures (arrows) were observed in the dome-like cellular mass. Toluidine-blue staining. x 50. **B:** Electron micrograph of the tubule-like structure. Cells adhered to each other and acquired cellular polarity. Basement membrane was formed under the epithelial cells, and microvilli were formed on the luminal side of some of the epithelial cells. x 2,500.

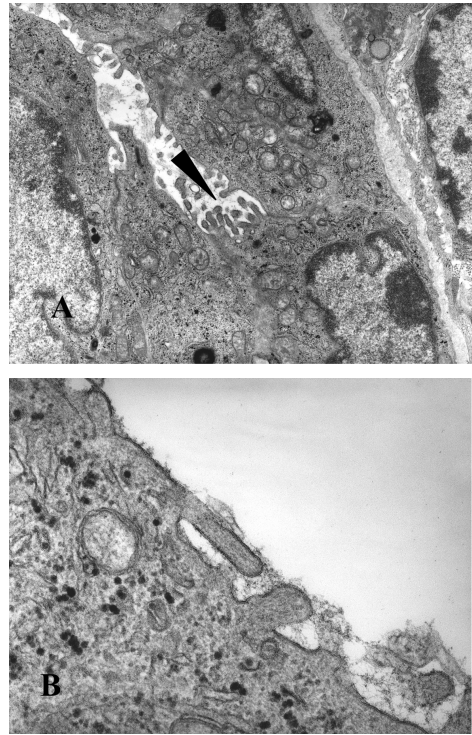


Fig. 3. A: After 14 days in culture: The microvilli (arrow heads) had increased both in number and in length compared to those observed at 7 days. x 9,500. **B:** A higher magnification of the electron micrograph of figure 3A taken after 14 days in culture. The stud-shaped structures were unclear. x 48,000.

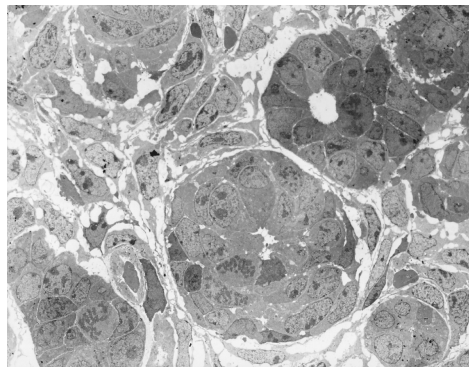


Fig. 4. Electron micrograph of fetal mouse kidney (16 days of gestation). The cells were agglomerated into a cellular mass with a lumen. Short microvilli were observed in the luminal side. x 1,000

集合管の両側において管状のまとまりを示しはじめた。なかには尿細管に分化してはじめている細胞群も存在していた。

2. レクチンによる組織化学的反応

DAB, WGA, SBA, UEA-1の4種類のレクチン反応をみると、培養7日目に認められた管腔を持った構造物のいくつかにDAB, WGA反応陽性所見をみとめた (Fig. 5)。陽性所見は管腔を持った構造物を構成する細胞のうち、内腔側に認められた。SBA, UEA-1においては管腔を持った構造物において陽性所見は認められなかった。

3. AQP-2のRT-PCR

胎齢16日のマウス腎臓でAQP-2の遺伝子発現が認められた。培養1日目にはAQP-2の遺伝子発現が認められたが、培養開始後3, 7, 14日目ではAQP-2の発現は認められなかった (Fig. 6)。

考 察

電子顕微鏡による観察

ネフロン発生については、超微形態的に6つの段階があり、第1期；後腎胚帽期、第2期；腎胞形成期 (stage I: Larsson)、第3期；口唇体形成期、第4期；S字状期 (stage II: Larsson)、第5期；糸球体形成初期 (stage III: Larsson)、第6期；糸球体形成期 (stage VI: Larsson) に分けられている^{6, 7)}。今回、培養下において観察されたのは、第1期と第2期までで、第1期は

原始後腎帽とよばれる原始集合管の膨大部周辺に帽子状の間葉系細胞の集合がみられ、間葉系細胞の集合は次第に原始集合管の両側において管状のまとまりを示しはじめる時期に相当している。第2期；腎包形成期は原始集合管の両側において管状のまとまりを示し帽子状の間葉系細胞の腎包が形成される時期である。培養下ではこれ以降の段階はみられないように思われ、今回観察された管腔を持つ構造物は形態学的に集合管の可能性が最も高いように思われる。

レクチン反応

胎仔腎臓から完全に単離した細胞から形成された管腔を持つ構造物が何れのネフロン・セグメントに属しているのかを調べるためにレクチン反応を行った。レクチン反応はレクチンが特定の糖鎖と特異的に結合する性質を利用し glycoconjugate を検出するために用いられている⁸⁾。この glycoconjugate は器官の形態発生や細胞の形質転換において重要な役割を担っているといわれている⁹⁾。発生期の腎臓においては第4期；S字状期の尿細管原器にはすでにいくつかのレクチンが発現しているといわれている¹⁰⁾。Laitinenら¹¹⁾は胎齢11～18日の腎臓で、近位、遠位尿細管、集合管のWGA, DBA, SBA, UEA-1の反応性を調べ、WGAは近位、遠位尿細管、集合管で陽性であるがDBAは集合管のみ陽性であるとしている。Hanaiら¹²⁾も胎仔期から高齢のマウスにおける腎臓で16種類のレクチンを用いて検討しているが、胎仔期、新生仔期においてDAB陽性所見を認めるのは集合管のみであったと述べている。培養下で認めた管腔を持った構造物においてもDAB陽性を認め、今回観察された管腔を持った構造物は形態学的、レクチンによる組織化学的反応から集合管であると推測された。

成熟した集合管は、水やNa輸送にかかわる主細胞 (principal cells) と酸塩基平衡に関わる介在細胞 (intercalated cells) といった機能の異なる2つの細胞から構成されている。今回みられた管腔を持った

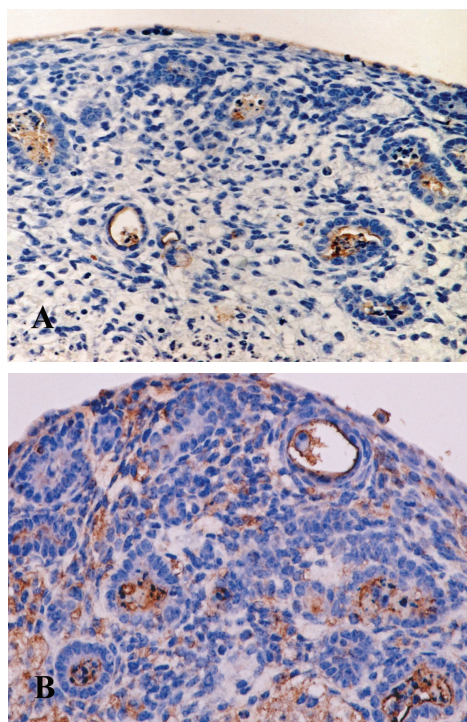


Fig. 5. (A) DAB, (B) WGA. DAB and WGA positive staining was observed on the luminal side of the cells in the tubule-like structures. x 250.



1: Fetal mouse kidney(16 days of gestation)
2: Organoid culture day 1
3: Organoid culture day 3
4: Organoid culture day 7
5: Organoid culture day 14

Fig. 6. Gene expression of AQP-2. AQP-2 gene expression was detected after 1day in culture. However, gene expression of AQP-2 was not detectable when the culture was prolonged.

構造物には電子密度の低い主細胞に相当すると思われるタイプと、電子密度の高いミトコンドリアの豊富な微絨毛(あるいはmicropliae)のよく発達している介在細胞に相当すると思われるタイプの区別が可能であった。介在細胞は、 H^+ を分泌する α 細胞¹³⁾と HCO_3^- を分泌する β 細胞にさらに分類されるが、今回の検討では α 細胞であるか β 細胞かの区別は困難であった。ラットやマウスでは生後8-24時間までは、集合管には主細胞のみで介在細胞は現れないといわれる¹⁴⁾、が主細胞と介在細胞が同一の前駆細胞に由来するという報告もあり、これらの細胞がいずれが先かという問題は解明されていない¹⁵⁾。 β 細胞はレクチンの一種PNA陽性で、生後3週から出現するといわれ、また α 細胞が β 介在細胞に先駆けて出現し、また β 細胞は微絨毛(あるいはmicropliae)を持たないといわれることから β 細胞の可能性はないと思われる。機能的には、酸塩基平衡に関わっている介在細胞のうち α 細胞の H^+ ATPaseはapical membraneに存在し電顕的には10 nmの鉾様の構造をした小胞(stubs)としてみられる⁵⁾。培養下でできた管腔構造物の内腔側では、14日目には成熟mouseの集合管の介在細胞で認められるような微絨毛が存在しているが、細胞膜直下の鉾様の構造をした小胞は明らかではなかった。 α 細胞に存在する H^+ ATPaseは、ウサギの腎形成期の皮質外層集合管では、管腔側あるいは血管側のいずれにも偏在せず、細胞全体に分布し、極性を持たない¹⁵⁾。細胞の極性は未熟な細胞では初期からすでに存在するわけではなく、輸送にかかわる蛋白が細胞内で移動し、局在を決定することで確立するといわれ、培養下では未だ未分化の状態にあるものと思われる。

AQP-2の発現

Aquaporin (AQP) は水チャンネル蛋白のファミリーであり、現在までに10種類のAQPが見い出されている。その中でAQP-2は腎集合管においてarginine vasopressin (AVP) によって誘導される水チャンネルとして発見された¹⁶⁻¹⁸⁾。ラットにおいては胎生18日の集合管上皮にAQP-2の発現を認め、生後6-14日にはおよそ2.5倍に増加すると報告されている²⁰⁾。一方Yamamotoら¹⁷⁾はより早期からのAQP-2発現を確認し、胎齢16日よりmRNAが発現し、18日目にはさらに発現が増強し集合管のapical poleに発現が認められることを報告している¹⁹⁾。

今回の結果では、AQP-2遺伝子の発現は培養に用いた胎齢16日の腎臓では発現が認められたが、培養の時間経過とともに発現が認められなくなった。培養を開始し、培養7日目では管腔を持った構造物の管腔側には微絨毛が確認され、14日目ではその微絨毛は発達し長くなり、形態的、またレクチンによる組織化学的反応からは集合管に類似したものであるが、集合管としての機能蛋白であるAQP-2の発現は培養された細胞

塊には認められず、集合管として機能を示すまでには発達していない未分化な原始集合管と思われた。集合管としての機能の獲得には原尿の流れなどの刺激が加わることによって始めて集合管としての機能が示されるのではないかとと思われた。より生体内に近い環境における管腔を持った構造物の形成、そこに発現する機能蛋白とその遺伝子発現についてはorganoid cultureと回転培養を組み合わせるなど、培養法の改良も含めさらに検討する必要があると思われるが、今回用いたorganoid cultureは、renal tubulogenesisを*in vitro*で形態学的に検討する上で有用な方法の1つになると思われた。さらに本法はmetanephric mesenchymeと尿管芽からそれぞれ分離した細胞によるorganoid cultureと組み合わせることによりtubulogenesisさらにはnephrogenesisを*in vitro*で検討する為の有用な方法を提供するものと思われる。

結 語

- ① 胎児器官から完全に単離された細胞を使用したorganoid culture法を用い、胎仔マウスの腎臓から完全に単離された細胞をmembrane filter上で培養すると、培養7日目では、管腔を持った構造物が存在するドーム状の細胞集塊がmembrane filter上に形成された。
- ② 形成された管腔を持った構造物には基底膜と短いながらも微絨毛が観察された。
- ③ 管腔を持った構造物は形態学的に集合管と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御教示を賜りました埼玉医科大学総合医療センター第4内科御手洗哲也教授、解剖学教室金子勝治教授ならびに教室員各位に深く感謝致します。本研究の一部は、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター研究助成金、埼玉医科大学；落合記念研究助成金2002の補助を受けた。

文 献

- 1) Murata E, Zimmermann B, Merker H-J, Akita M, Kaneko K. Basement membrane formation of fetal mouse intestinal epithelial cells in organoid cultures. *Acta Anat* 1995;153:96-105.
- 2) Kopf-Maier P, Zimmermann B. Organoid reorganization of human tumors under in vitro condition. *Cell Tissue Res* 1991;264:563-76.
- 3) Nagano T, Murata E, Mitarai T, Kanozawa K, Matumura O, Akita M, et al. Roles of cell-matrix interaction during tubulogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:524A-5.

- 4) Zharkikh L, Zhu X, Stricklett PK, Kohan DE, Chipman G, Breton S, et al. Renal principal cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic mice. *Am J Physiol* 2002;283: F1351-64.
- 5) Brown D, Gluck S, Hartwing J. Structure of the novel membrane coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H⁺ ATPase. *J Cell Biol* 1987;105:1637-48.
- 6) Jokelainen D. An electronmicroscope study of the early development of the rat metanephric nephron. *Acta Anat* 1963;52(Suppl 47) 2-71.
- 7) Larsson L. The ultrastructure of the developing proximal tubule in the rat kidney. *J Ultrast Res* 1975;52:100-36.
- 8) Bretton R, Bariety J. A comparative ultrastructural localization of concanavalin A, WGA and RCA in the glomeruli of normal rat kidney. *J Histochem Cytochem* 1976;24:1093-100.
- 9) Holthofer H, Virtanen I. Glycosylation of developing human glomeruli: lectin binding sites during cell induction and maturation. *J Histochem Cytochem* 1987;35:33-7.
- 10) Nagata M, Tomari S. Development of renal tubular system. *Jintotouseki* 2002;53:15-8.
- 11) Laitinen L, Virtanen I, Saxen L. Changes in the glycosylation pattern during embryonic development of mouse kidney as revealed with lectin conjugates. *J Histochem Cytochem* 1987;35:55-65.
- 12) Hanai T, Usuda N, Morita T, Nagata T. Light microscopic lectin histochemistry in aging mouse kidney: Study of compositional changes in glycoconjugates. *J Histochem Cytochem* 1994;42:897-906.
- 13) Hagege J, Richet G. Dark cells of the distal convoluted tubules and collecting duct. Morphological data. *Fortsche Zool* 1975;23:288-98.
- 14) Clark Jr SL. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. *J Biophysic Biochem Cytol* 1957;3:349-62.
- 15) Minuth WW, Rudolph U. Successive lectin-binding changes within the collecting duct during postnatal development of the rabbit kidney. *Pediatr Nephrol* 1990;4:505-9.
- 16) Matsumoto T, Fejes-Toth G, Schwarz G J. Development expression of acid-base-related proteins in the rabbit kidney. *Pediatr Nephrol* 1993;7:792-7.
- 17) Yamamoto T, Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Yaoita E, Oita K, et al. Localization and expression of a collecting duct water channel, aquaporin, in hydrated and dehydrated rats. *Exp Nephrol* 1995;3: 193-201.
- 18) Fushimi K, Sasaki S, Yamamoto T, Hayashi M, Furukawa T, Uchida S, et al. Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct. *Am J Physiol* 1994; 267(4 Pt 2):F573-82.
- 19) Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Marumo Y, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 1993; 361:549-52.
- 20) Baum MA, Ruddy M, Hosseltel CA, Harris HW. The perinatal expression of aquaporin-2 and aquaporin-3 in development kidney. *Pediatric Res* 1998;43:6, 783-90.