

# マウス新生子腎臓における腎小体の発達とアポトーシス

## —電子顕微鏡観察—

進藤 彰久

マウス新生子腎臓を電子顕微鏡で観察し、腎小体の形成過程で出現する細胞死とアポトーシスの関連、さらに細胞死の局在と由来を明らかにした。新生マウス腎臓皮質には造腎帽子から完成腎小体まで種々の発達段階の腎小体が層状に配列する。腎胞内で腎小体を構成する細胞のうち死に至る細胞は、ボーマン嚢腔が明瞭となるS字型腎胞から未熟腎小体中出现する。S字型腎胞において細胞死はボーマン嚢細胞群にみられ、足細胞とボーマン嚢外壁細胞のいずれの層にも死細胞の取り込みに由来する大型二次ライソゾームが認められる。死細胞は核染色質が核膜にそって高度に凝集後、小型化、断片化されて隣接する細胞に貪食される。この死細胞は超微形態レベルでアポトーシスと判定され、足細胞とボウマン嚢外壁細胞との境界部、すなわちボウマン嚢上皮細胞移行部で多く認められた。未熟腎小体では死細胞がボーマン嚢腔にも少数出現しており、死細胞は明瞭大型の液胞や脂肪滴を含有し、超微形態の特徴からボウマン嚢外壁細胞由来と考えられる。プログラム細胞死は腎小体の形成と関連し、ボーマン嚢細胞群の分化・成熟ならびにボウマン嚢腔の発達と関連して出現する。

(平成10年9月22日受理)

## Development of the Renal Corpuscle and Occurrence of Apoptosis in the Newborn Mouse Kidney — An Ultrastructural Study —

Akihisa SHINDO

Apoptosis occurring in the developing renal corpuscle of fetal and neonatal ICR-mice was ultrastructurally examined. Kidneys were removed at 18 days of gestation and at 0 and 2 days after birth, fixed in Karnovsky's fluid and embedded in Epon 812 for ultrathin sections. Renal corpuscles at various developmental stages could be observed in the cortex of the newborn kidneys. Metanephric caps were located in the subcapsular cortex, and the superficial cortex contained comma-shaped and S-shaped metanephric vesicles. Immature and mature renal corpuscles could be seen in the deep cortex near the cortico-medullary junction. In both S-shaped metanephric vesicles and immature renal corpuscles, dead cells appeared among Bowman's epithelial cells. Dead cells could be recognized in both the visceral and parietal epithelial cell layers. Both epithelial layers often contained large heterophagosomes containing cell debris derived from apoptotic cells. The nuclei of dying cells became very condensed, and the heterochromatin aggregated. Apoptotic cells were fragmented, forming apoptotic bodies to be phagocytosed by neighboring cells. Apoptotic cells were frequently recognized near the border of the visceral and parietal epithelium. In

immature renal corpuscles, some dead cells also appeared within Bowman's space, and their ultrastructures suggested that they were of parietal epithelial cell origin. Based on our ultrastructural observations, programmed cell death in the neonatal renal cortex is considered to appear in relation to development of the renal corpuscle. In particular, apoptosis may play an active role in the differentiation and maturation of Bowman's epithelial cells and formation of the Bowman's space.

(Accepted on September 22, 1998) *Kawasaki Igakkaishi* 24(3): 141-148, 1998

**Key Words** ① Renal corpuscle ② Apoptosis ③ Bowman's epithelial cell  
④ Mouse ⑤ Ultrastructure

## はじめに

尿生成の基本的な構造である腎小体は、糸球体毛細血管系の内皮細胞とメサンギウム細胞、さらに毛細血管ループと直接接するボウマン嚢内壁由来の足細胞とボウマン嚢腔を隔てるボウマン嚢外壁細胞が主たる構成要素である。腎臓の発生において、間葉細胞集団である造腎帽子内への間葉組織の進入と毛細血管の形成によって、尿細管へと分化する細胞群とボウマン嚢壁細胞群の境界が明瞭になる<sup>1)</sup>。胎生後期から新生子期のマウスの腎臓皮質と髄質には、多数の細胞分裂像に混じって細胞死が観察される<sup>2)~4)</sup>。我々は腎臓皮質における細胞死がとくにボウマン嚢壁細胞群に多いことを報告した<sup>5)</sup>。本研究は先に行った光顕レベルの観察に引き続き、皮質に生ずる細胞死について、腎小体の発達に伴うボウマン嚢壁細胞の分化と関連して検討し、アポトーシスに至る細胞の局在と由来を超微形態レベルで同定することを目的とする。

## 材料と方法

材料は胎生18日の胎子10例、生後0日と生後2日のICRマウス新生子各々10例の総計30例から摘出した腎臓を用いた。雌性成熟マウスを一晩雄性マウスと交配し、翌朝を妊娠0日とした。妊娠18日目でクロロホルムにて深麻酔後に開腹し、子宮より胎子を摘出した。マウス新生子は生後0日と生後2日で断頭した。胎子および新生子から両側の腎臓を摘出し、次の方法で

電顕観察用標本を作成した。すなわち腎臓を剃刀刃で1mm角に細切した後、4%パラホルムアルデヒドと5%グルタルアルデヒド混合液(カルノフスキー液:0.1Mカコジレート緩衝液, pH7.4)にて2時間4℃で前固定し、ついで1%4酸化オスミウム(0.15Mカコジ酸緩衝液, pH7.4)にて2時間4℃で後固定した。0.5M酢酸ウランNaCl溶液で一晩ブロック染色後、上昇エタノールにて脱水し、Epon 812に包埋した。超マイクローム(Leica社製)を用い、厚さ約110nmの超薄切片をダイヤモンドナイフで作製後、クエン酸鉛で染色し、JEM-2000EXで80kVにて観察した。なお、光学顕微鏡で比較観察するために約1μm厚のエボン準超薄切片をガラスナイフで作成し、トルイジンブルー染色を施した。なお、本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け(No.97-030)、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

## 成 績

胎生18日、生後0日および2日の腎臓では、ネフロン形成が急速に進行する。皮質の被膜直下には間葉細胞集団の造腎帽子が多く、その直下にはコンマ型腎胞やS字型腎胞が分布し、完成された腎小体は皮質深層の皮髄境界領域の近くに観察される。すなわち新生子腎臓皮質には皮質浅層から深層まで成熟段階の異なるネフロンが層状に配列し、細胞死はS字型腎胞と未熟な腎小体においてボウマン嚢の発達と関連して出現する。

### A. 新生子腎臓の皮質浅層の腎胞と細胞死

ネフロンが形成される最初の段階は、後腎の被膜直下で尿管芽の先端に間葉細胞が集合する造腎帽子である (Fig. 1a)。造腎帽子は間葉細胞が楕円体状に細胞集塊を形成したもので、造腎帽子を構成する細胞の大きさは長径約  $10\ \mu\text{m}$ 、短径約  $4\ \mu\text{m}$ 、核は直径約  $7\ \mu\text{m}$ 、核内は染色質に乏しく明調で、直径約  $1\ \mu\text{m}$  の核小体が内核膜に接して数個存在する。細胞質はリボゾーム  $5\sim 8$  個からなる多数のポリゾームと粗面小胞体およびミトコンドリアをわずかに含む。

造腎帽子内に結合組織が細隙状に進入してカンマ型腎胞となる (Fig. 1b)。カンマ型腎胞では進入した結合組織を境界として立方状細胞の尿細管細胞群とボーマン嚢壁細胞群とはじめて区分される (Fig. 1c)。ボーマン嚢壁細胞群は腎胞の髄質側に位置し、 $2\sim 3$  層の細胞で構成され、結合組織進入部では楕円状、尿細管部移行部付近では立方状を呈する。楕円状細胞は造腎帽子細胞に比べて扁平である。核は染色質に乏しく明調で、核小体も数個存在する。一方、立方状細胞は球状核を有する。造腎帽子とカン

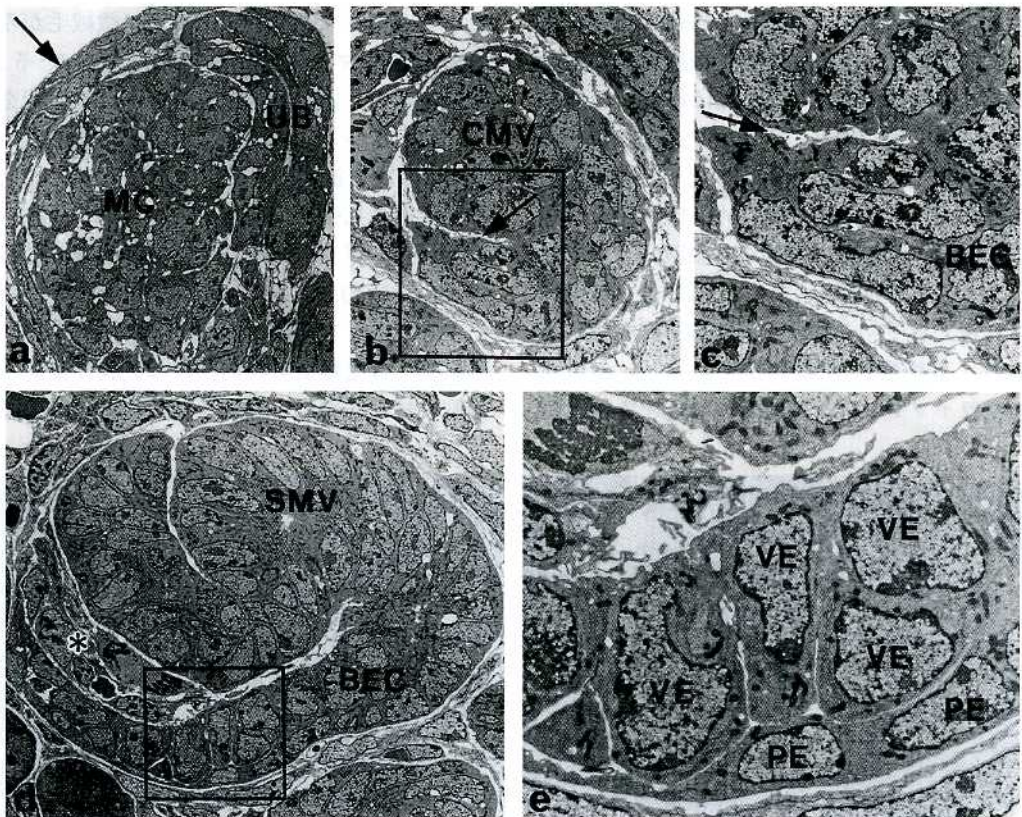


Fig. 1. Renal corpuscles at various developmental stages in the renal cortex. Two days of age.

a : A metanephric cap (MC) and ureteric bud (UB). The arrow indicates the renal capsule.  $\times 900$ .

b : A comma-shaped metanephric vesicle (CMV). The arrow indicates connective tissue invading the metanephros.  $\times 1,000$ .

c : Micrograph of the framed area in b. Connective tissue (arrow) separates the group of Bowman's epithelial cells (BEC) from the metanephric vesicle. The Bowman's epithelial cells consist of three cell layers.  $\times 2,200$ .

d : An S-shaped metanephric vesicle (SMV). A capillary (\*) appears in the connective tissue invading the metanephric vesicle. BEC=Bowman's epithelial cell.  $\times 900$ .

e : Micrograph of the framed area in d. The Bowman's epithelial cells consist of two layers ; a visceral epithelial cell layer (VE) and a parietal epithelial cell layer (PE). The visceral epithelial cells are cubical or cylindrical and the parietal epithelial ones are equally flattened.  $\times 3,500$ .

マ型腎胞中に核分裂は多数出現するが、細胞死はほとんどみられない。カンマ型腎胞へ進入した結合組織内に毛細血管が出現し、腎胞は尿管部の円柱状細胞が迂曲してS字型を呈するようになる (Fig. 1d)。

S字型腎胞の先端部のボーマン囊壁細胞群は2層配列を呈するようになり、毛細血管と接する内層とS字型腎胞下辺縁部の外層に分かれる (Fig. 1e)。内・外両層は毛細血管進入部で連続し、両層の間にボウマン囊腔がわずかに形成されはじめる。内層は単層円柱細胞で、高さ4~8  $\mu\text{m}$ で血管進入部では背が低い。ボーマン囊外壁の細胞は厚さ2  $\mu\text{m}$ の単層扁平細胞である。S字型腎胞でボーマン囊壁細胞群に細胞死が出現する (Fig. 2a)。細胞死は細胞の小型化と核の形態変化を伴うのが特徴である。核は染色質が凝集して暗調化し、小型化した後に数個の小片に断片化する (Fig. 2b)。核断片を含有する死に至った細胞は隣接する細胞によって細胞ごと、もしくは細胞が小さく断片化されて貪食される。ボーマン囊内・外両層を構成する細胞には、死細胞に由来する径2~4  $\mu\text{m}$ の球状の2次ライソゾームを細胞質に含有する細胞が

多く出現する。

## B. 皮質深層の腎小体と細胞死

皮質の深層には、S字型腎胞以後の未熟腎小体や完成腎小体が分布する (Fig. 3a, 4a)。S字型腎胞で結合組織内に出現した毛細血管はループ形成が明瞭となり、徐々に糸球状を呈するようになる。未熟腎小体では迂曲する毛細血管にボーマン囊内壁細胞が接着し、隣接する内壁細胞は毛細血管側の細胞基底部分で連結、毛細血管と内壁細胞の間の基底膜が厚く著明となる。足細胞は高さ5~10  $\mu\text{m}$ の立方状ないし円柱状となり、ボウマン囊腔面と側面に微絨毛がみられる。ボウマン囊外壁細胞は厚さ2.5~5  $\mu\text{m}$ の扁平状で、内壁細胞との移行部は立方状を呈す。ボウマン囊外壁細胞の細胞質は径0.5~1  $\mu\text{m}$ の明調な液泡を含み、また部分的に拡大した核膜槽や拡張した粗面小胞体を含む細胞も認められる。ボウマン囊外壁細胞の内層への移行部近くでは約0.7  $\mu\text{m}$ の球状脂肪滴を含む細胞が多い (Fig. 3a, 4a)。ボウマン囊内壁細胞の基底側には毛細血管の周囲の基底膜に接着して細胞小柱と細胞足が形成されはじめ、細胞足間

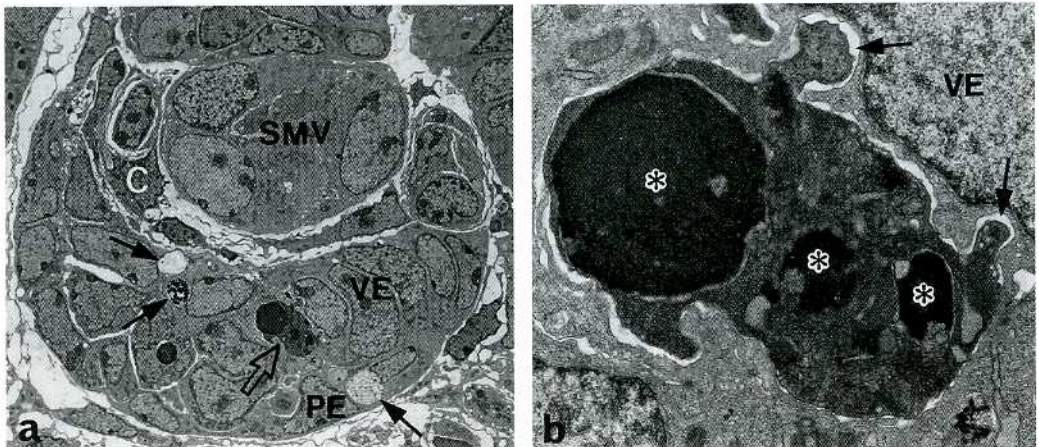


Fig. 2. Cell death in the Bowman's cell layer of an S-shaped metanephric vesicle. Two days of age.

a : A low-power electron micrograph of a Bowman's cell layer. Both visceral and parietal Boman's epithelial cells have large secondary lysosomes (arrows). The open arrow indicates a dying cell in the visceral epithelial cell layer (VE). C=capillary, PE=parietal epithelial cell, SMV=S-shaped metanephric vesicle.  $\times 1,500$ .

b : The dying cell in a. Three nuclear fragments (\*) are seen in the cytoplasm, and the arrows show phagocytosis of condensed cytoplasm by the neighboring visceral epithelial cells (VE).  $\times 10,000$ .

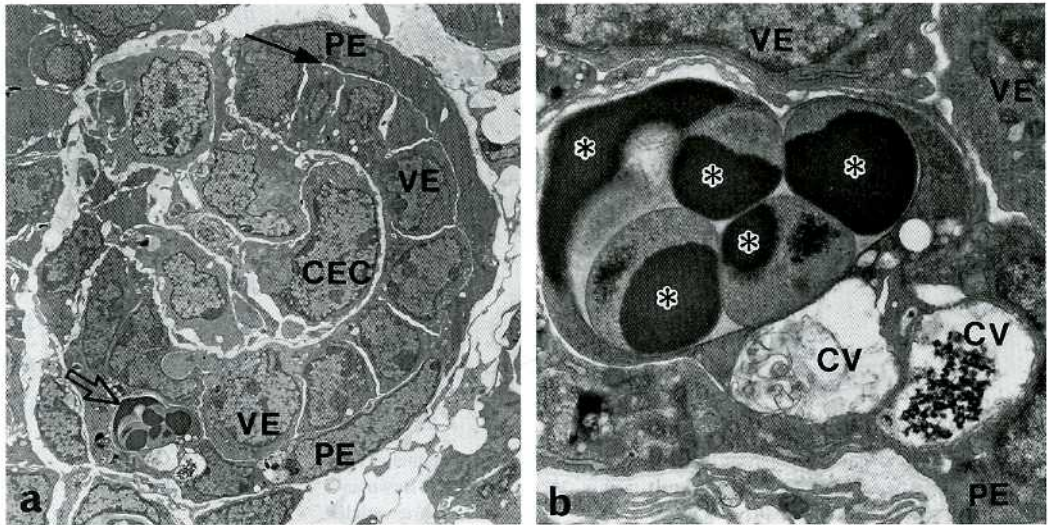


Fig. 3. An immature renal corpuscle and cell death. Two days of age.

- a : A low-power electron micrograph of the immature renal corpuscle. Capillary endothelial cells (CEC) have become large in size, and the Bowman's space (arrow) is very narrow. Apoptotic bodies (open arrow) can be seen in the Bowman's cell layer. PE=parietal epithelial cell, VE=visceral epithelial cell.  $\times 2,000$ .
- b : The apoptotic bodies in a. Five apoptotic bodies (\*) and two clear vacuoles (CV) were included by the parietal epithelial cell (PE). VE=visceral epithelial cell.  $\times 9,500$ .

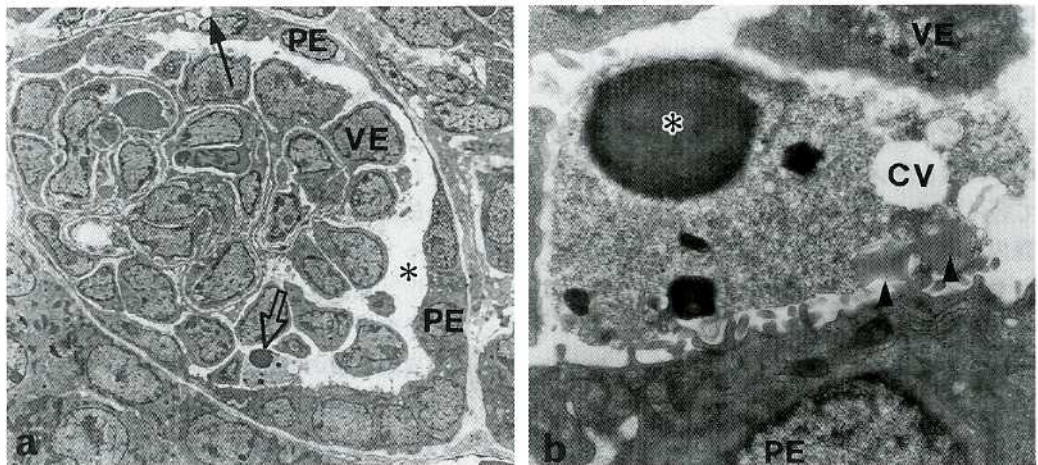


Fig. 4. An immature renal corpuscle. Two days of age.

- a : A low-power electron micrograph. The renal corpuscle has a complex capillary loop and a wide Bowman's space (\*). The open arrow indicates a dead cell in the space. The arrow indicates a clear vacuole in the parietal epithelial cells (PE). VE=visceral epithelial cell.  $\times 3,500$ .
- b : A dead cell in Bowman's space. The cytoplasm contains a condensed nucleus (\*), a clear vacuole (CV) and two lipid droplets (arrowheads). PE=parietal epithelial cell, VE=visceral epithelial cell.  $\times 10,000$ .

に幅 20 nm の濾過隙が形成され、皮質深層の糸球体の血管内皮細胞は有窓性となり、 Bowman 嚢腔が拡大、糸球体は複雑なループを形成して、腎小体は完成する。完成した腎小体の足細

胞で微絨毛は消失する。

皮質深層の未熟な腎小体においても、死に至った細胞が少数出現する (Fig. 3b, 4b)。Bowman 嚢外壁細胞と内壁細胞との移行部近くでは、

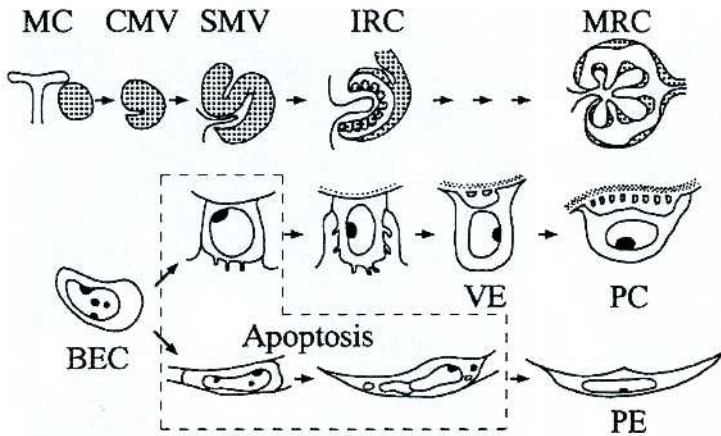


Fig. 5. Diagram showing development of renal corpuscles, Bowman's epithelial cells and the occurrence of apoptosis. Apoptosis mainly takes place in the Bowman's epithelial cells (both visceral and parietal cells) of the S-shaped metanephric vesicles and immature renal corpuscles. BEC=Bowman's epithelial cell, CMV=comma-shaped metanephric vesicle, IRC=immature renal corpuscle, MC=metanephric cap, MRC=mature renal corpuscle, PC=podocyte, PE=parietal epithelial cell, SMV=S-shaped metanephric vesicle, VE=visceral epithelial cell.

死細胞に由来する二次ライソゾームを含む細胞が多く認められる (Fig. 3b). 死細胞が断片化することなくボウマン嚢腔内に出現することがまれに認められ, 死細胞は細胞質内に濃縮核の断片を数個と球状の脂肪滴や明調な液胞を含有している (Fig. 4b). 各腎胞期におけるボウマン嚢内・外壁細胞の特徴を模型的に Figure 5 に示す.

## 考 察

先の光顕レベルの研究に続いて行った本研究の意義は次の2点にある. 第1は電顕によって先の所見を確認した点, 第2はアポトーシス細胞の局在を解明した点である.

ネフロン形成がさかに行われているマウス新生子の腎臓では, 細胞分裂増殖像に混じって細胞死が大量に出現すること, さらにこれらの細胞死はプログラムされた細胞死であると報告されている<sup>3), 6), 7)</sup>. 我々は先に生後2日 ICR マウス腎臓に TUNEL 染色を施行し, 多数の陽性細胞を検出, 胎生および新生子腎臓には多数

のアポトーシスが生ずること, さらに皮質におけるネフロン形成と関連して, 特定の発達段階の腎臓に局所的に細胞死が生ずることを報告した<sup>5)</sup>. さて, アポトーシスは細胞死のなかでも, とくに器官・形態発生と密接に関連するプログラム細胞死として, 超微形態的な変化を中心にネクローシスと区別されとらえられてきた<sup>2), 8)~10)</sup>. 今日では DNA の特異的断片化を組織切片上で可視化した TUNEL 法がアポトーシスを検出する方法として広く用いられるようになって

きた<sup>11), 12)</sup>. しかしながら, TUNEL 染色でネクローシス細胞も一部陽性を呈することが報告されており<sup>13)</sup>, アポトーシスを確定するには TUNEL 法に加えて超微形態レベルの観察が必要とされる. アポトーシス細胞は核が強度に凝集した後, 核ならびに細胞が断片化して, 食細胞によって貪食されるという一連の経過をとるとい<sup>10)</sup>. 成績に述べたように, S 字型腎胞ならびに未熟腎小体にみられた死に至った細胞の核は, 異染色質の濃縮とその内核膜への偏在, さらに核・細胞質の断片化を伴うものであり, 先に報告した胎子と新生子マウス腎臓皮質における細胞死は, 本研究により超微形態レベルでもアポトーシスと確定できた.

アポトーシスにより死に至った細胞は, すでに報告したように<sup>3)</sup> ボウマン嚢細胞群に特に多い. ネフロン構成細胞群における細胞死は S 字型腎胞期から未熟腎小体の間に出現するが, 死細胞はとくに S 字型腎胞期で多く, 未熟腎小体にも少数の細胞死が観察できるが, 造腎帽子とコマ型腎胞ならびに完成腎小体には少ない. アポトーシスは腎小体の発達過程で均一に

出現するのではなく、S字型腎胞と未熟腎小体に特に多いことが今回の観察でも確認できた。さらに超微形態レベルの観察により次のことが明らかとなった。S字型腎胞期から糸球体毛細血管ループが発達し、ボーマン囊細胞群では足細胞とボーマン囊外壁細胞それぞれへの分化が明瞭となる。この時期はボーマン囊腔の形成開始時期に相応する。アポトーシスは腎小体の構成細胞のうち毛細血管内皮細胞には見られない。S字型腎胞の足細胞とボーマン囊外壁細胞との移行部に、細胞死に由来する二次ライソゾームが多くみられること、さらにコンマ型腎胞期ではボーマン囊細胞群の層が3層のこともあるから、細胞死は足細胞群とボーマン囊外壁細胞への分化と関連する他に、ボーマン囊腔の形成と密接に関連すると考えられる。未熟腎小体でも、ボーマン囊内・外壁細胞の移行部付近のボーマン囊外壁細胞は、貪食に由来する二次ライソゾームを含有する。また少数ではあるが死細胞がボーマン囊腔内に観察されることもある。未熟腎小体でボーマン囊腔内に出現する死細胞は、細胞質内に濃縮核の断片を含有するアポトーシスの特徴をもち、かつ球状の脂肪滴や明調な液胞が認められる (Fig. 4b)。この細胞内封入体はボーマン囊外壁細胞に多く認められることから、未熟腎小体のボーマン囊外壁細胞が死に至り、ボーマン囊腔に遊離した可能性が高い。未熟腎小体におけるボーマン囊外壁細胞のプログラム細胞死の意義は必ずしも明らかでなく、今後の課題である。

一般にプログラム細胞死を来した細胞は隣接する細胞もしくは遊走性マクロファージによって貪食される<sup>10), 14)</sup>。ボーマン囊細胞群の中に生じた死細胞の処理は隣接する細胞すなわちボーマン囊内・外両壁細胞がおこなっていて、ここにマクロファージが出現することはない。従ってこの時期のボーマン囊内・外壁細胞は貪食性が非常に高いと考えられる。しかしながら、未熟腎小体においては、一部の死細胞は隣接する細胞に取り込まれることなく、ボーマン囊腔に放出される。このような死細胞は尿路をへて体外へと排出される運命をたどると推測できる。毛細血管ループに沿って成熟をつづける足細胞内に、貪食による二次ライソゾームはほとんど見られない。S字型腎胞と未熟腎小体の死細胞処理に関連する違いは、尿生成に関連する足細胞・ボーマン囊外壁細胞の機能分化・成熟に関連すると推測できよう。すなわちS字型腎胞のボーマン囊細胞群に比べ、発達しつつある腎小体の足細胞・ボーマン囊外壁細胞ではいずれもその貪食能が著しく低下すると考えられる。

稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導をいただいた佐々木教授に深甚なる謝意を表すとともに、実験について御協力いただいた解剖学教室員および組織・電子顕微鏡センターの技術員に深謝する。なお、本研究の一部は日本私学振興財団私立大学等経常費補助金特別補助 (大学院重点特別経費・学生分、1997年度) の助成を受け行われた。

## 文 献

- 1) Rugh R : The Mouse. 2nd ed, New York, Oxford University Press. 1990, pp 276-281
- 2) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26 : 239-257, 1972
- 3) Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q : Apoptosis in metanephric development. J Cell Biol 119 : 1327-1333, 1992
- 4) Garcia-Porrero JA, Ojeda JL, Hurlle JM : Cell death during the postnatal morphogenesis of the normal rabbit kidney and in experimental renal polycystosis. J Anat 126 : 303-318, 1978
- 5) 進藤彰久 : 胎生および新生マウス腎臓における細胞死の組織学的観察 - 特に皮質ネフロン形成細胞の分化との関連 -。川崎医学会誌 24 : 7-15, 1998

- 6) Coles HSR, Burne JF, Raff MC : Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 118 : 777-784, 1993
- 7) Koseki C : Cell death programmed in uninduced metanephric mesenchymal cells. *Pediatric Nephrol* 7 : 609-611, 1993
- 8) Majno G, Joris I : Apoptosis, oncosis, and necrosis : An overview of cell death. *Am J Pathol* 146 : 3-15, 1995
- 9) Uchiyama Y : Apoptosis : The history and trends of its studies. *Arch Histol Cytol* 58 : 127-137, 1995
- 10) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR : Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251-306, 1980
- 11) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493-501, 1992
- 12) Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E : In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method ; Improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 44 : 959-968, 1996
- 13) Yasuda M, Umemura S, Osamura Y, Kenjo T, Tsutsumi Y : Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi ; Pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch Histol Cytol* 58 : 185-190, 1995
- 14) Camp V, Martin P : The role of macrophages in clearing programmed cell death in the developing kidney. *Anat Embryol* 194 : 341-348, 1996