

## 新生子マウス腎皮質の間質に出現するアポトーシス細胞の起源

進藤 彰久, 佐々木和信

新生子マウス腎臓皮質の浅層に出現するアポトーシス細胞の局在と由来を明らかにすることを目的として、生後2日のマウス腎臓を光学および電子顕微鏡で観察した。新生子マウス腎臓皮質はネフロンに分化する腎胞と集合管へと分化する尿管芽およびこれらの間を満たす間質組織からなる。間質は樹状細胞質突起を有する間質細胞が網工を形成し、その間を新生毛細血管が走行する。間質にはTUNEL染色陽性を呈する死細胞が出現する。死細胞は皮質浅層にみられ、とくに後腎組織帽の髄質側の下端部に面する間質に多く、染色質の核縁凝集と核および細胞質の断片化を特徴とする。超微形態学的に核染色質の濃縮を呈する細胞は後腎組織帽内にも少数認められること、後腎組織帽内へ細胞質突起をのぼし死細胞を取り込む間質細胞や後腎組織帽下端に接する間質にアポトーシス小体を含む間質細胞が出現することから、新生子腎臓で皮質浅層の間質に出現するアポトーシス細胞の大多数は後腎組織帽の後腎芽細胞の細胞死に由来するとみなされる。(平成11年7月19日受理)

### Origin of Apoptotic Cells in the Interstitium of the Superficial Cortex of Newborn Mouse Kidneys

Akihisa SHINDO, Kazunobu SASAKI

To clarify the origin and localization of apoptotic cells in the superficial renal cortex of newborn mice, kidneys from two-day-old neonates were examined by light and electron microscopy. The cortex of the newborn mouse kidney contained ureteric buds, numerous metanephric tissues at various stages of nephron development, such as metanephric tissue caps, comma-shaped and S-shaped metanephric vesicles, and abundant cortical interstitium. The interstitium consisted of dendritic interstitial cells, which formed a supportive network around the metanephric tissues, and newly formed capillaries. Dying cells stained by the TUNEL assay were noted in the superficial cortical interstitium. TUNEL-positive cells showing chromatin compaction and margination were often localized in the cortical interstitium near the medullary edge of the metanephric tissue caps. A few metanephroblasts showing chromatin condensation also appeared within the metanephric tissue caps, and some of the interstitial dendritic cells extended their cytoplasmic processes into the metanephric tissue caps and contained large phagolysosomes. Since the interstitial cells near the medullary edge of the metanephric tissue caps often contained numerous apoptotic bodies, the majority of apoptotic cells in the interstitium of the superficial renal cortex of neonatal mice could be considered to originate from metanephroblasts in the metanephric tissue cap beneath the renal

capsule. (Accepted on July 19, 1999) *Kawasaki Igakkaishi* 25(3): 157-163, 1999

**Key Words** ① Renal cortex ② Interstitium ③ Apoptosis  
④ Ultrastructure ⑤ Mouse

## はじめに

新生子マウス腎臓の皮質には、ネフロンへと発達・分化した後腎組織帽、コンマ型腎胞、S字型腎胞および尿細管と集合管に分化する尿管芽が分布し、そしてこれらの間を間質が満たす<sup>1), 2)</sup>。新生子マウスの腎臓では細胞死が皮質と髓質に広く多数認められ、細胞死はネフロン形成細胞群の他に間質中にも観察できる<sup>3)</sup>。皮質のネフロン形成細胞群ではS字型腎胞の足細胞前駆細胞層とポーマン囊外壁細胞前駆細胞層に局在する<sup>4)</sup>。一方、皮質の間質領域に認められる細胞死に関する報告は今日、ほとんどみられない。本研究は腎臓の皮質間質に分布する細胞死の局在と由来を超微形態レベルで明らかにすることを目的とする。

## 材料と方法

使用動物は恒常的条件下 (22±2℃) で固形飼料 (オリエンタル酵母工業) と自由飲水とで飼育した生後2日のICRマウス10匹である。新生マウスを断頭後、両側腎臓を摘出し、次の方法で顕微鏡および電顕観察した。また一部の腎臓はパラフィンに包埋し、TUNEL法でDNAの断片化を顕微鏡下で観察した。

摘出した腎臓を剃刀刃で1mm角に細切した後、カルノフスキー液 (4%パラホルムアルデヒドと5%グルタルアルデヒドの0.15Mカコジル酸緩衝混合液, pH 7.4) にて12時間4℃で前固定し、ついで1%4酸化オスミウム (0.15Mカコジル酸緩衝液, pH 7.4) にて2時間4℃で後固定した。酢酸ウランNaCl溶液に浸漬して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。ガラスナイフで1μm厚の準超薄切片を作製し、トルイ

ジンブルーで染色して顕微鏡で観察した。さらに超ミクロトーム (LEICA社製) を用い、厚さ約100nm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 II (日本電子社製) で80kVにて観察した。

## TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法

生後2日のマウス腎臓を4%パラホルムアルデヒド液 (リン酸緩衝生理食塩水-PBS, pH 7.4) で4℃にて12時間固定後、パラフィン包埋し、厚さ3μmの腎前額断切片を作成した。前報<sup>3)</sup>と同様にTUNEL反応液 (POD, CAT, No. 1684817, Boehringer Mannheim社製) を用いてDNAの断片化を顕微鏡レベルで検出した。

なお、本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認 (No. 99-059) を受け、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施した。

## 成 績

### 1. 腎皮質に出現する細胞死のTUNEL法による観察

新生子マウス腎皮質には様々な発達段階の腎小体が含まれる。すなわち被膜直下から皮髓境界領域に向かって後腎組織帽、コンマ型腎胞、S字型腎胞が層状に分布し、皮質の深層には完成された腎小体が認められる (Fig. 1)。細胞核の強度濃縮と縮小を呈する死細胞は後腎組織帽、コンマ型腎胞には少ないが、ネフロン構成細胞群のうち特にS字型腎胞に多く、足細胞前駆細胞層とポーマン囊外壁細胞前駆細胞層に局在する。しかしながら、TUNEL染色で陽性を呈する死細胞はネフロン形成細胞群の間に広く分布する腎皮質の間質にも認められる (Fig. 2)。皮質間質の細胞死は被膜とS字型腎胞の間の領域、すなわち被膜直下の皮質浅層で後腎組織帽を取り囲む間質に多い (Fig. 2)。

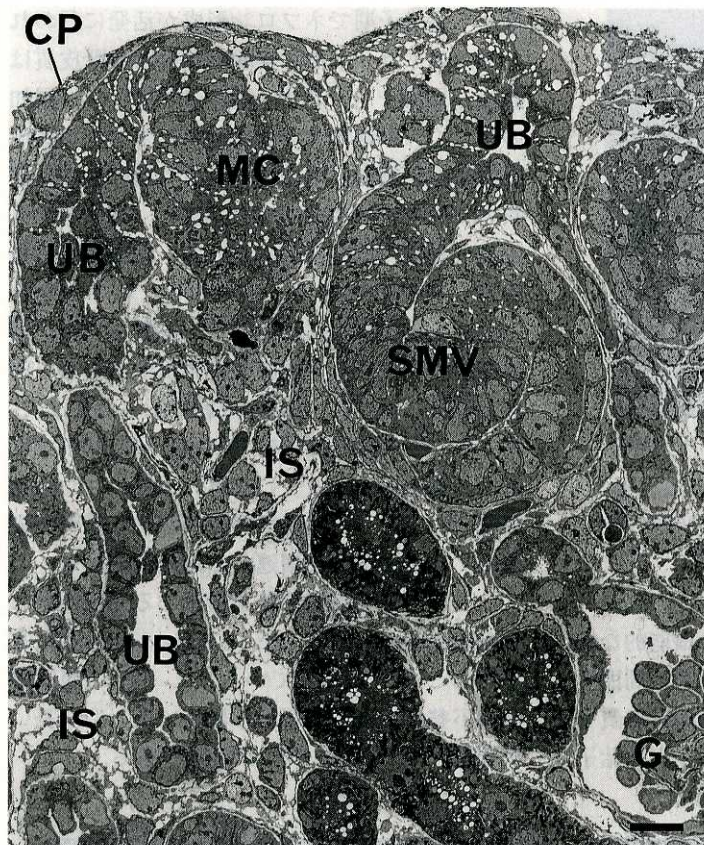


Fig. 1. A low power electron micrograph of the renal cortex. Two days after birth.

The outer cortex beneath the renal capsule (CP) contains metanephric tissue cap (MC) and S-shaped metanephric vesicle (SMV), interstitium (IS) and ureteric bud (UB). A developing glomeruli (G) can be seen in the deep cortex. Bar = 10  $\mu$ m.

## 2. 皮質浅層の間質に出現する細胞死

### 1) 腎被膜直下の細胞組織構成

新生マウス腎臓の皮質浅層では、被膜直下で分枝する尿管芽とその先端にネフロン前駆細胞集塊である後腎組織帽がみられる (Fig. 1)。尿管芽は単層の円柱上皮が狭い内腔を取り囲む管状構造を呈する。後腎組織帽は後腎芽細胞の集団で径約40  $\mu$ mの球型ないし楕円形を呈する。後腎芽細胞は一様に多角形状を呈し、隣接する細胞間には狭い細胞間隙が存在するが、細胞間隙の一部が拡張して球状間隙を呈することがしばしばある。後腎組織帽に内腔の形成は認められない。尿管芽と後腎組織帽の間を間質がうめ、間質は細長い細胞質突起を多数有する間質細胞

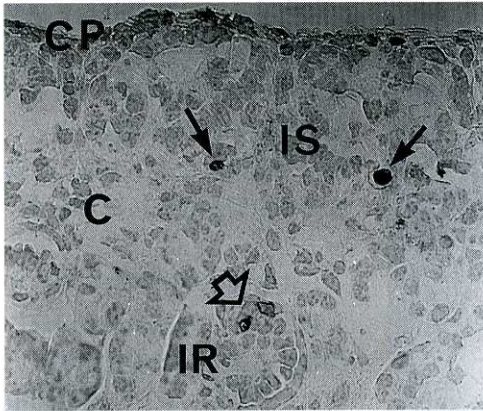
で満たされる。間質細胞と後腎組織帽の後腎芽細胞とはその超微形態的な差異は明瞭である。間質細胞の細胞質突起によって形成される粗な網工の中には新生毛細血管が含まれる (Fig. 3)。

2) 皮質間質での細胞死の局在  
新生マウス腎臓の皮質浅層に出現する細胞死は皮質間質の他に、少ないけれども後腎組織帽内にも認められる (Fig. 4)。いずれの部位における細胞死も核染色質の強度の凝集と核の断片化が特徴で、超微形態的にアポトーシスによる細胞死と判断できる。後腎組織帽にみられる細胞死はとくに細胞集塊の下極、すなわち後腎組織帽を形成する後腎芽細胞群のなかでも特に腎被膜とは反対の髓質側に位置する後腎芽細胞中に多い。この死細胞に対して後腎組織帽を取り囲む間質から間質細胞が細胞質突起を長く伸ばし、死細胞を取り込む像もしばしば認められる (Fig. 5)。また、後腎組織帽の

下極に接する間質には、死細胞に由来する他家食胞を大量に含む間質細胞も認められる (Fig. 6)。なお、間質中で間質細胞の中にも核に強度の染色質の凝集を呈するものが少数ではあるが存在する (Fig. 7)。皮質間質において、より深層のコンマ型腎胞やS字型腎胞集団には、死細胞ならびに死細胞に由来する大型食胞を有する間質細胞は比較的少ない。

## 考 察

成績で述べたように、マウス新生子腎皮質には核の断片化を呈する死細胞および死細胞に由来する大型の二次ライソゾームを含む細胞が間



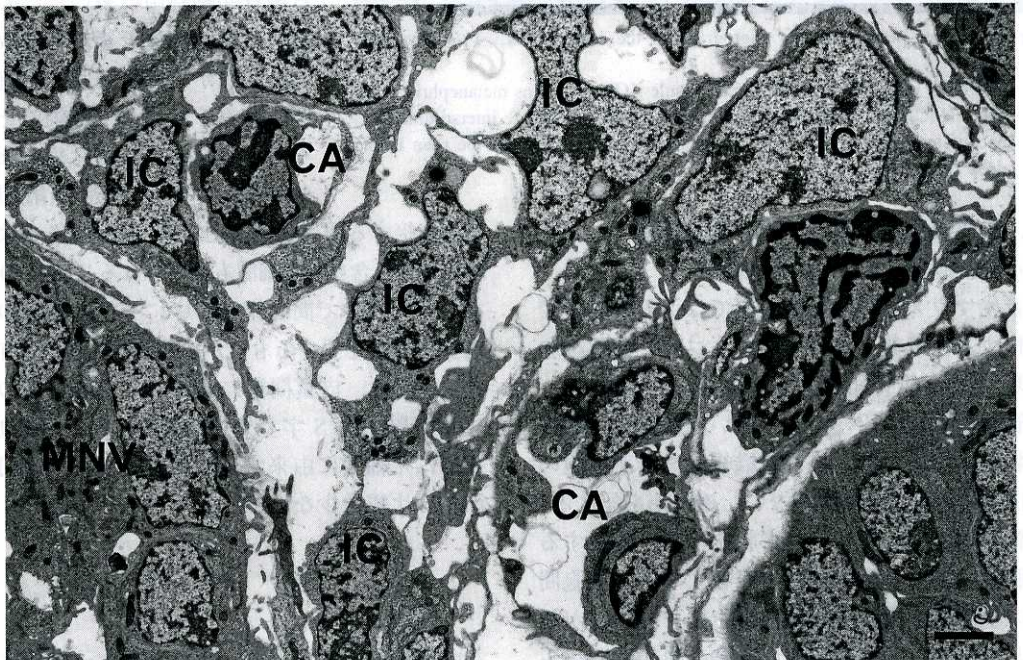
**Fig. 2.** A light micrograph of the renal cortex stained by TUNEL. Two days after birth.

Black arrows indicate TUNEL positive cells in the interstitium (IS), and the open arrow indicates an apoptotic cell in an immature renal corpuscle (IR). C: renal cortex, CP: capsule.  $\times 400$ .

質内に認められる。腎臓は尿生成の機能的な構造であるネフロンと尿管およびそれらの周囲をうめる間質から構成され、成熟動物の腎皮質で間質の占める面積比率は極めて少ないが、胎子

期から新生子期でネフロン形成が活発に行われるマウスやラットなど実験哺乳動物の腎皮質は豊富な間質を含むことが知られている<sup>1)</sup>。周知のごとく、糸球体および尿管のネフロン構成細胞の前駆細胞は胎生期や新生時期の腎皮質間質の後腎間葉細胞から分化する<sup>2)</sup>。胎生期から生後の腎臓の器官発生において、死細胞が出現することが知られ<sup>5), 6)</sup>、私共はとくにネフロンの発達と細胞分化に関連して、皮質ネフロン構成細胞にプログラム細胞死が出現することを前報で報告した<sup>3), 4)</sup>。今回の成績で示したように、ネフロン形成細胞群以外の間質に見られるプログラム細胞死は、とくに皮質の浅層、しかも被膜直下に多く、後腎組織帽を形成する後腎芽細胞のアポトーシスと関連する可能性が高い。

ラットの腎臓皮質間質を構成する間質細胞には超微形態学的に Type 1 と Type 2 の 2 種類存在することが知られている<sup>7), 8)</sup>。Type 1 間質細胞は不整形を呈し、細胞小器官に乏しく、長い細胞質突起を有するのが特徴である。一方、



**Fig. 3.** Interstitium of the superficial renal cortex. Two days after birth.

Dendritic interstitial cells (IC) form a supportive network around the metanephric vesicle (MNV). CA: newly formed capillary. Bar =  $2 \mu\text{m}$ .

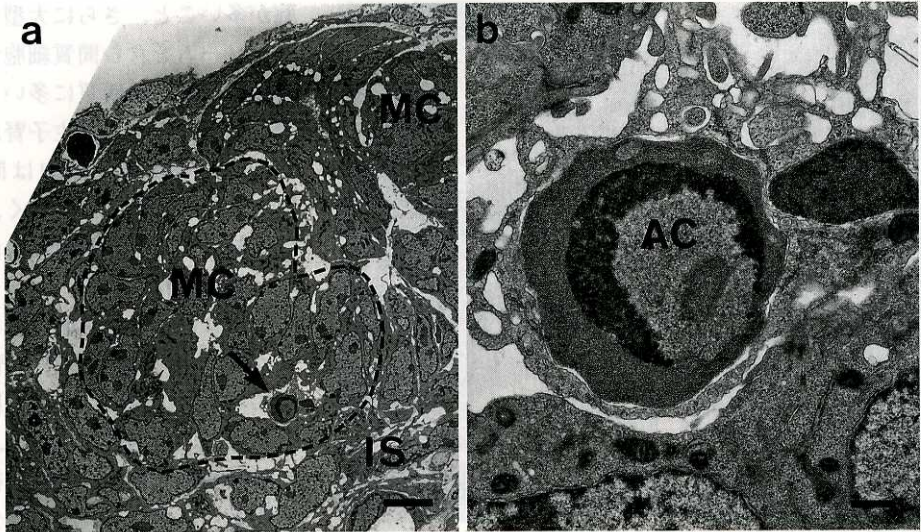


Fig. 4. Metanephric tissue caps. Two days after birth.

- a. The metanephric tissue cap (MC) includes a dying cell (arrow). IS : interstitium. Bar =  $5\ \mu\text{m}$ .  
 b. An apoptotic cell (AC) in a). The nucleus has a peripheral crescent of compact chromatin. Bar =  $0.5\ \mu\text{m}$ .

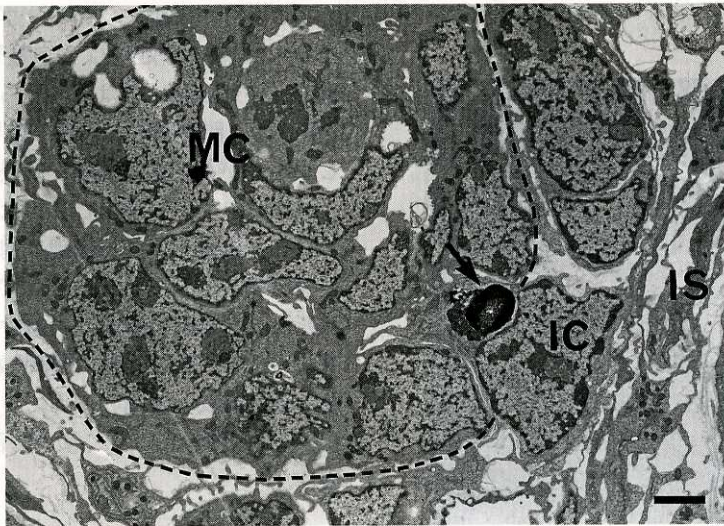


Fig. 5. A metanephric tissue cap. Two days after birth.

An interstitial cell (IC) extends the cytoplasmic process into the metanephric cap (MC) and includes a large phagolysosome (arrow). IS : interstitium. Bar =  $2\ \mu\text{m}$ .

Type 2 間質細胞は Type 1 細胞に比べると小型で、リンパ球様の球形を呈し、細胞質突起は少ない。新生子期の腎臓皮質では Type 1 間質細胞がほとんどを占め、Type 2 間質細胞は生後 4 週になって増加するという<sup>9)</sup>。成績で述べたように、生後 2 日のマウス腎臓皮質間質構成細胞は、細長い細胞質突起で連結する特徴をもち、

その超微形態からラットの Type 1 間質細胞に対応する形態を持つ。この間質細胞のうちのごくわずかにではあるが、核内の染色質の強度凝集を呈する細胞が存在する。アポトーシスは核の形態変化とくに染色質の強度の核縁凝集を特徴とする細胞死であるから<sup>10), 11)</sup>、Type 1 間質細胞自体も生後の腎臓発達過程でプログラム

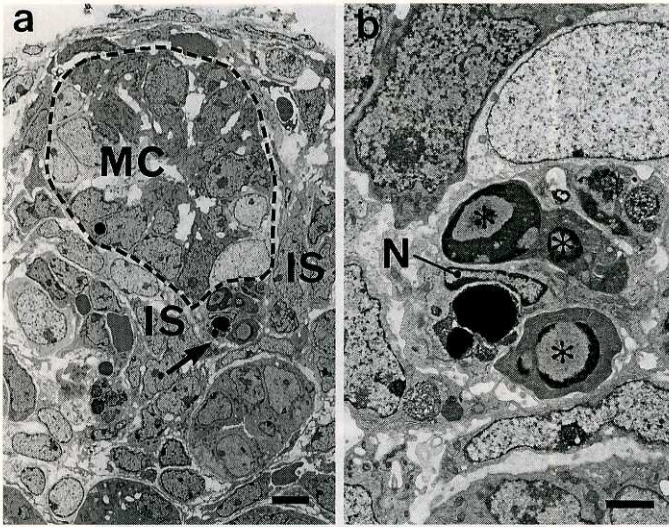


Fig. 6. Superficial cortex. Two days after birth.

a. A cluster of apoptotic cells (arrow). Dying cells are located in the interstitium (IS) near the medullary edge of the metanephric tissue cap (MC). Bar = 5  $\mu$  m.

b. An interstitial cell including numerous apoptotic bodies (\*). N: nuclei of the interstitial cell. Bar = 2  $\mu$  m.

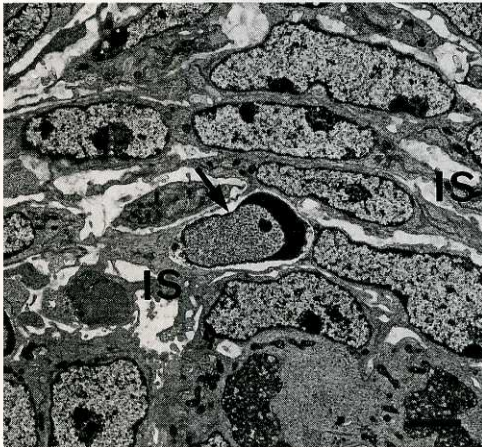


Fig. 7. An apoptotic cell (arrow) in the cortical interstitium (IS). Bar = 2  $\mu$  m.

細胞死に陥る可能性は否定できない。しかし、後腎組織帽の中に超微形態的にアポトーシスに陥った後腎芽細胞が出現し、一部の間質細胞は細長い細胞質突起を伸ばして後腎組織帽内の死細胞を取り込むこと、死細胞の分布には後腎組織帽の中でも局在があり、特に腎髄質側に死細

胞が多いこと、さらに大型二次ライソゾームを含む間質細胞が後腎組織帽と接する間質に多いことを考え合わせると、新生子腎皮質間質の TUNEL 陽性細胞は間質細胞に由来するものは少なく、大多数は後腎芽細胞の細胞死に由来すると見なされる。

ネフロン構成細胞群におけるプログラム細胞死は S 字型腎胞、特にボーマン嚢内・外壁細胞の分化と関連して発生する<sup>3), 4)</sup>。今回の電顕観察による所見は、後腎組織帽からコンマ型腎胞へと分化する際にもネフロン形成細胞にプログラム細胞死が発生し、ここでも細胞の選別が行われていることを示唆している。プログラム細胞死

に至った細胞の処理は S 字型腎胞のボーマン嚢内・外壁細胞層では隣接するボーマン嚢細胞が担当し、間質細胞の直接の関与はみられない。しかしながら、皮質浅層では後腎芽細胞が大型二次ライソゾームを含むことはまれで、細胞死に至った後腎芽細胞の処理は間質細胞が担当して間質内で処理されるため、TUNEL 陽性の細胞死が皮質浅層の間質に分布するようになると考えられる。間質細胞の死細胞処理への関与は、腎小体の形成と関連してネフロン形成細胞の貪食能の上昇によって、急速に消退するのであろう。

稿を終えるにあたり、電顕組織切片作成を指導していただいた須田満寿美氏、電顕観察の技術的指導をいただいた須田泰司氏、論文原稿作成に協力していただいた板野ちか子氏に感謝する。なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (10-807) および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. 2 nd ed, New York, Oxford University Press. 1990, pp 276-281
- 2) Brenner BM : The Kidney, vol 1, 5 th ed, Philadelphia, WB Saunders. 1996, pp 72-98
- 3) 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
- 4) 進藤彰久：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-, 川崎医学会誌 24 : 141-148, 1998
- 5) Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q : Apoptosis in metanephric development. J Cell Biol 119 : 1327-1333, 1992
- 6) Koseki C : Cell death programmed in uninduced metanephric mesenchymal cells. Pediatric Nephrol 7 : 609-611, 1993
- 7) Sven-Olof Birgitta, Urban, Bernhard : Experimental depletion of different renal interstitial cell populations. Am J Med Sci 295 : 252-257, 1988
- 8) Kevin V, Wilhelm : Anatomy of the renal interstitium. Kid Int 39 : 370-381, 1991
- 9) Birgitta, Sven-Olof : Postnatal development of the interstitial tissue of the rat kidney. Anat Embryol 182 : 307-317, 1990
- 10) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26 : 239-257, 1972
- 11) Majno G, Joris I : Apoptosis, oncosis, and necrosis. : An overview of cell death. Am J Pathol 146 : 3-15, 1995