

# 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







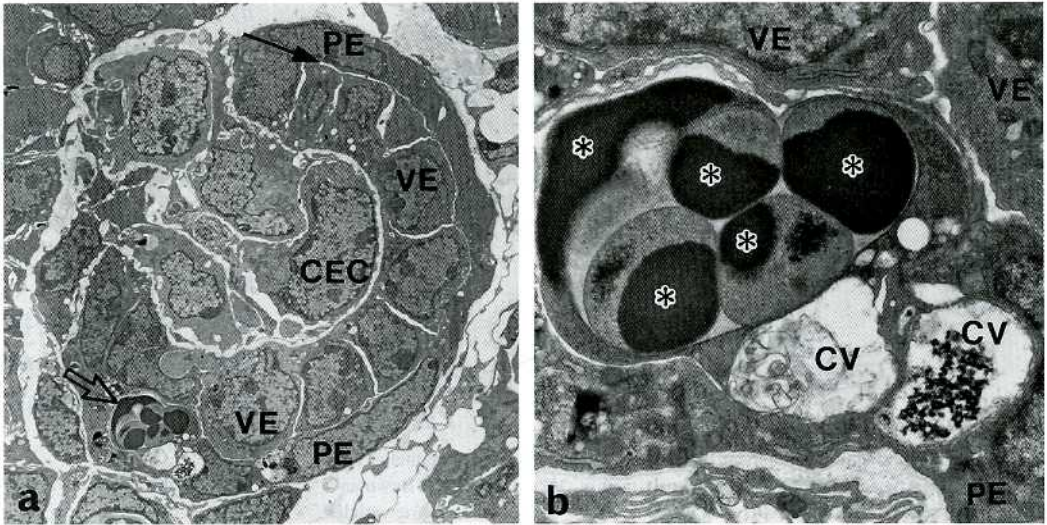


Fig. 3. An immature renal corpuscle and cell death. Two days of age.

- 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.  $\times 9,500$ .

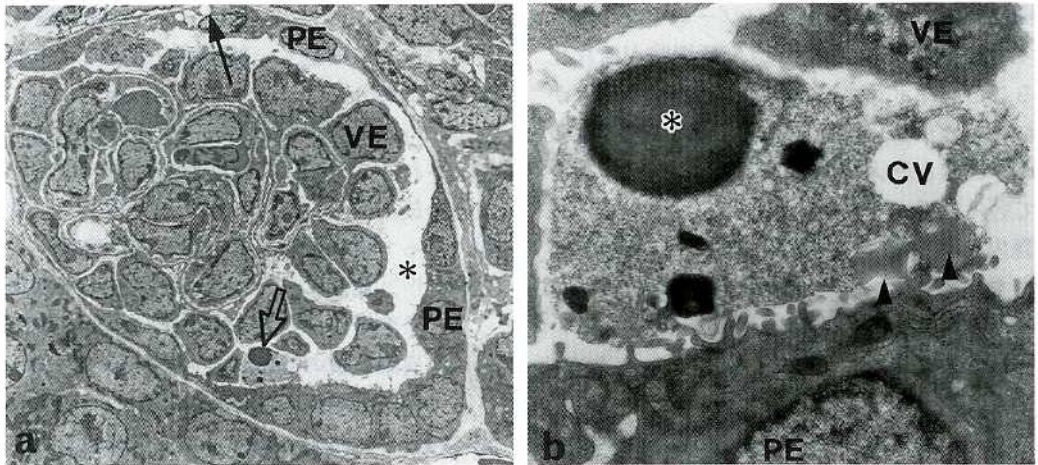


Fig. 4. An immature renal corpuscle. Two days of age.

- 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、

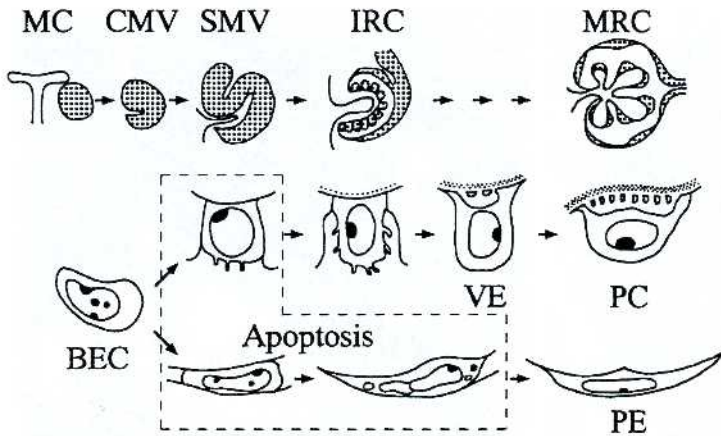


Fig. 5. Diagram showing development of renal corpuscles, Bowman's epithelial cells and the occurrence of apoptosis. Apoptosis mainly takes place in the Bowman's epithelial cells (both visceral and parietal cells) of the S-shaped metanephric vesicles and immature renal corpuscles. BEC=Bowman's epithelial 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