

ラット腎糸球体およびラット腎尿細管のコラーゲン・ゲル培養

奈良県立医科大学第1内科学教室

高井正秀, 土肥和紘, 藤井謙裕, 石川兵衛

COLLAGEN GEL MATRIX CULTURE OF RENAL GLOMERULUS AND RENAL TUBULE OF THE RAT

MASAHIDE TAKAI, KAZUHIRO DOHI,
YOSHIHIRO FUJII and HYOE ISHIKAWA

The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received December 1, 1990

Summary: The present study relates to the chronological morphological examination of the effects of collagen gel matrix on the growth of renal tissue cultures. Glomeruli, small clumps of tubules and isolated renal tubular preparations were dissociated from rat kidney. These tissues were cultured on and within collagen gel.

When glomeruli were cultured on collagen gel, we observed monolayer outgrowth of cobblestone-like cells. After about 7 days, fibroblast-like cells appeared. However, when glomeruli were cultured within collagen gel, we observed only the outgrowth of a few fibroblast-like cells.

In the small clumps of tubules cultured on collagen gel surface, cobblestone-like cells appeared after about 3 days. These cells remained in culture for a long time (about 7 days). After that, fibroblast cells were seen. When the small clumps of tubules were cultured within collagen gel, we observed three-dimensional outgrowths. In general, they gave a duct-like appearance. Rarely, they gave a foot process-like appearance.

When isolated renal tubular preparations were embedded within a three-dimensional collagen gel matrix, a duct-like appearance was shown. The growth of such duct-like structures increased by addition of epidermal growth factor (EGF).

These observations indicate that collagen as extra-cellular matrix plays a very important role in the growth of renal tubular epidermal cells.

Index Terms

collagen gel culture method, renal tissue culture, renal glomerulus, renal tubule.

緒 言

腎臓は糸球体と尿細管からなるネフロン集合体である。その構成細胞についてみると、糸球体はメサンギウム細胞、内皮細胞および上皮細胞から構成されている。尿細管は12の分節に区分されており、各分節にはそれぞれ特有の尿細管上皮細胞が存在している。この他にも傍糸球体装置を形成する細胞群や髄質間質細胞などが存在

しており、腎は多様な細胞の集合体といえる。

全腎から分離した細胞群は、他臓器の細胞群に比して培養が容易であり、しかもウイルス高感受性であることからウイルス培養に利用されてきた。最近では、それぞれの構成細胞が純培養されるようになり、これらの培養細胞は生化学や生理学の研究に利用されている。しかし、従来の細胞培養法はいずれもプラスチックディッシュ培養によっていた。

生体では細胞は、組織液ばかりでなく、他種細胞や細胞外基質にも囲まれて生存している。最近、細胞の分化・発生・増殖などにおける細胞間基質の有用性が論じられるようになり、細胞間基質の1つであるコラーゲンを利用する培養法が注目をあびている¹⁾。

そこで著者らは、各種腎組織培養系に対するコラーゲンの培養基質としての影響を検討するために各種腎組織をコラーゲンゲル上(平板培養)およびコラーゲンゲル内(包埋培養)で培養し、培養組織の増殖形態を観察した。さらに包埋培養については、epidermal growth factor (EGF)の添加実験、電顕観察などを実施した。

方 法

腎組織の分離

体重150gのWistar雄ラット(紀和実験動物、和歌山)を脱血死させた後、大動脈内にカニューレを挿入して腎を生理食塩水で還流した。ついで腎を摘出し、0.01M 磷酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline; PBS, pH 7.2)で洗浄した。以上の操作で得られた腎を細切後、sieving法によりNo. 60メッシュ、No. 120メッシュ、No. 280メッシュの順に腎組織をふるい分けした。No. 120メッシュ上から尿管管塊を、No. 280メッシュ上から単離糸球体を得た。次に、得られた尿管管塊および単離糸球体にPBS溶液を加え、1,000rpm・5分間の遠心操作を3回繰り返して洗浄し、不純物を取り除いた。また単離尿管管の分離を目的に、尿管管塊の一部に酵素液の0.02%コラゲナーゼ(Sigma, Type II)PBS溶液と0.03%ヒアルロニダーゼ(Sigma, Type V)PBS溶液を加え、37°C・20分間攪拌して酵素処理を行った。この1回目の酵素処理では上清を捨て、2回目の酵素処理には新しい酵素液を加えて37°C・20分間攪拌して尿管管を分離し、上清を採取した。3回目の酵素処理後には尿管管が分離しやすいように太口ピペットで吸入・噴出を繰り返した後、上清を採取した。2・3回目の酵素処理で得られた上清を集めて1,000rpm・5分間遠心し、酵素液を除去した。その沈渣に培養液を加えて攪拌した後、No. 100メッシュで濾過して未分離の組織片を除去し、濾液を回収した。濾液を200rpm・5分間遠心して単離尿管管を得た。

培養方法

培養液は、RPMI 1640(日水製薬社製)に5vol%のウシ胎児血清(FCS, Chimera Biomedics Corporation製)、10μg/mlのstreptomycin(明治製菓社製)、10,000u/dlのpenicillin G(明治製菓社製)を添加して作成した。培養基質としてのコラーゲン溶液は、0.2%希塩酸コ

ラーゲン溶液(Cellmatrix Type I-P:新田ゼラチン社製)、10倍濃度のRPMI溶液および再構成用緩衝液を、8:1:1の割合で冷却しながら混合して作成した。なお、再構成用緩衝液は0.05N, NaOH(100ml)に対して重炭酸ソーダ(2.2g)、HEPES(4.77g)を溶かして作成したものである。コラーゲンゲルによる包埋培養は榎並²⁾³⁾らの方法に準じて以下のように行った。プラスチックディッシュ(35×15mm; Corning社製)に先に用意したコラーゲン溶液1mlを注ぎ、約15分間・37°Cの恒温処理後、コラーゲン溶液がゲル化するのを待ってゲル層を基礎層とした。次に上記で得られた各種腎組織(単離糸球体・尿管管塊および単離尿管管)をコラーゲン溶液中に浮遊させ、この各種腎組織浮遊コラーゲン溶液1mlを基礎層上に重層し、再び約15分間37°Cの恒温処理をした。重層した各種腎組織浮遊コラーゲン溶液が完全にゲル化した後、その上に5%FCS加RPMI溶液を2ml加えた。

コラーゲンゲル平板上培養(平板培養)はそれぞれコラーゲンゲルの基礎層(平板)上に、培養液中に各種腎組織を浮遊させたものを重層して行った。

尿管管包埋培養系におけるepidermal growth factor (EGF; 東洋紡社製)添加の効果については培養液中に0.01μg/mlの割合でEGFを添加して尿管管包埋培養を行った。

位相差顕微鏡による検討

各培養系は37°C・5%CO₂の条件下で静置し、増殖形態を経時的に位相差顕微鏡で観察した。

電顕による検討

尿管管塊包埋培養における増殖形態の電顕的標本は以下の手順で処理した。コラーゲンゲル上の培養液を捨ててPBSで洗浄後、4%オスミウム酸を加えて固定した。固定後試料を細切して、アルコール脱水処理後、エポキシ樹脂内に包埋して電顕試料とした。

結 果

位相差顕微鏡による検討

糸球体平板培養: 培養開始3日から上皮細胞が増殖を開始し、培養開始5日には上皮細胞は高度に増殖をしていた(Photo 1A)。しかし培養開始7日目からは線維芽様細胞が増殖し始め、培養開始14日頃には線維芽様細胞の増殖が上皮細胞の増殖を凌駕していた(Photo 1B)。

糸球体包埋培養: 培養開始3日から線維芽様細胞が増殖し始めたが、以後の増殖はほとんどなくついには増殖を停止してしまった(Photo 2)。

尿管管塊平板培養: 培養開始3日頃から上皮細胞が増

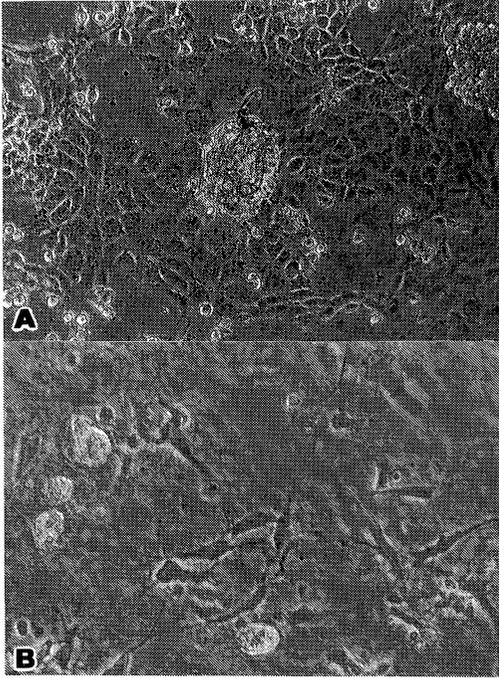


Photo 1. Phase photomicrographs of glomeruli on collagen gel. (A) Culture grown for 5 days. The outgrowth of cobblestone-like cells were observed ($\times 100$). (B) Culture grown for 14 days. Fibroblast-like cells grew up ($\times 200$).

殖し始め、培養開始 5 日には上皮細胞は高度に増殖していた (Photo 3A)。一方、培養開始 7 日頃からは線維芽細胞が増殖し始め、培養開始 14 日には線維芽細胞の増殖が高度となっており、そのために上皮細胞は死滅した (Photo 3B)。

尿管管塊包埋培養：培養開始 3 日頃から尿管管塊から培養細胞が増殖して管腔様構造物を形成し始め、管腔様構造物の骨格は培養開始 5 日には明瞭となった (Photo 4A)。そして培養開始 7 日には構造物がそれぞれ放射状に成長していた (Photo 4B)。培養開始 14 日頃から線維芽細胞の増殖が認められた (Photo 4C)。また、一部の尿管管塊は足突起様の増殖を示した (Photo 4D)。

単離尿管管塊包埋培養：単離尿管管塊包埋培養でも尿管管塊包埋培養と同様に管腔様構造物が増殖するかどうかを検討した。その結果、単離尿管管塊包埋培養でも管腔様構造物の増殖が確認された (Photo 5)。

単離尿管管塊包埋培養の EGF 添加実験では、管腔様構造物の増殖は無添加の場合に比して添加した場合がより長期間認められた (Photo 6)。

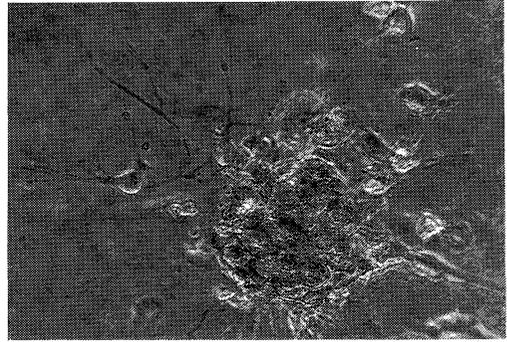


Photo 2. Phase photomicrograph of glomeruli were cultured within collagen gel for 5 days. A few outgrowth of fibroblast-like cells were shown. And after, their growth were stopped ($\times 200$).

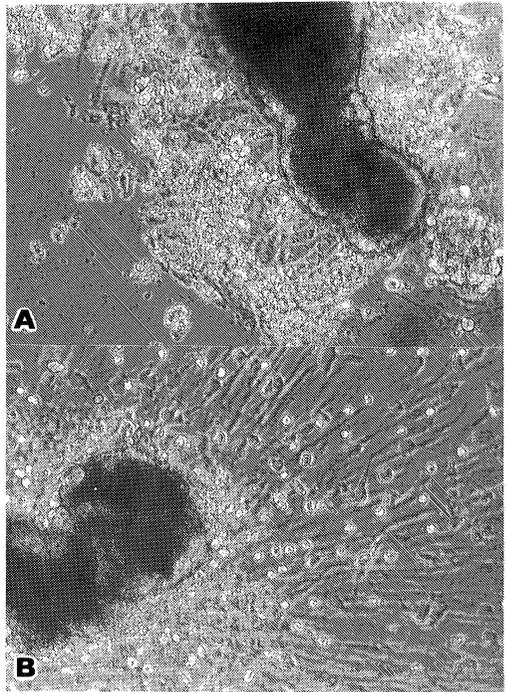


Photo 3. Phase photomicrograph of the small clump of tubules cultured on collagen gel. (A) Culture grown for 5 days. The outgrowth of cobblestone-like cells were observed ($\times 200$). (B) Culture grown for 14 days. Fibroblast cells grew up ($\times 200$).

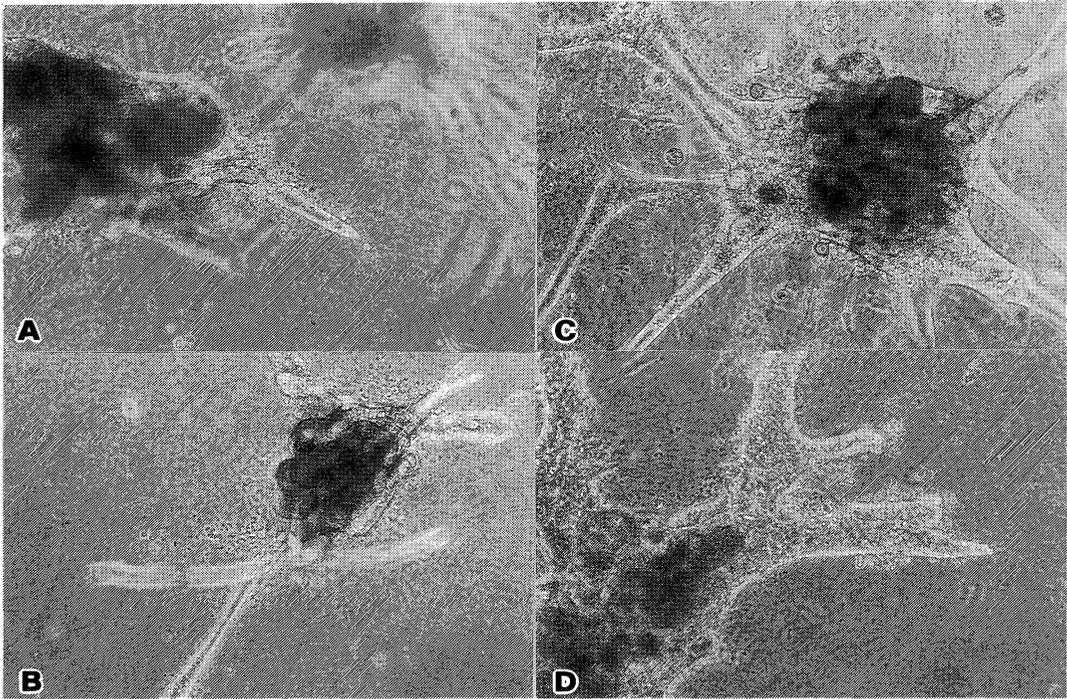


Photo 4. Phase photomicrograph of the small clump of tubules cultured within collagen gel. (A) After 5 days culture. Duct like appearance were shown ($\times 200$). (B) After 7 days culture. Duct like appearance grew up ($\times 200$). (C) After 14 days culture. Fibroblast cells were shown ($\times 200$). (D) Foot process like appearance grew up ($\times 200$).

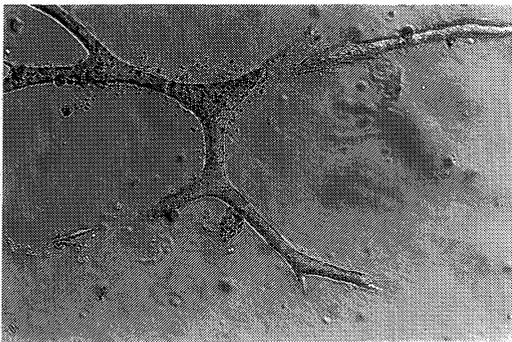


Photo 5. Phase photomicrograph of outgrowth derived from isolated renal tubular preparations ($\times 200$).

電顕による検討

尿細管塊包埋培養における管腔様構造物の詳細を検討するために電顕的観察を行った。管腔様構造物は、未熟な細胞の集合からなり、内部に空隙を認めた。しかし、管腔側基底膜の存在は明らかにできなかった (Photo 7, Photo 8)。

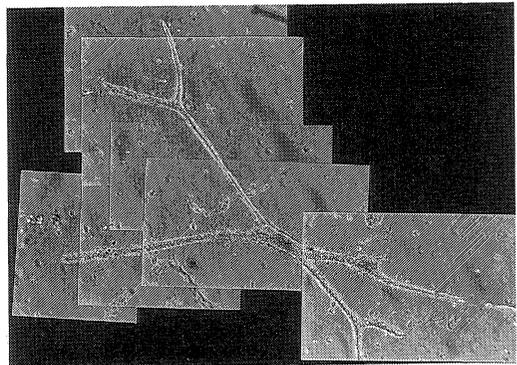


Photo 6. Phase photomicrograph of the small clump of tubules cultured within collagen gel. The growth of duct like appearance increased by addition of epidermal growth factor (EGF) ($\times 200$).

考 察

尿細管包埋培養における管腔様構造物の由来
尿細管塊をプラスチックディッシュ上およびコラーゲン

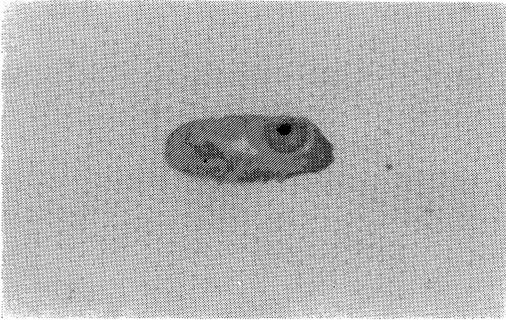


Photo 7. Light micrograph of thin Epon section from the same outgrowth as Photo 4B ($\times 100$).



Photo 8. Electron micrograph of thin section from the same outgrowth as Photo 4B. A lumen like cavity was shown ($\times 1500$).

ゲル上で培養すると、上皮細胞は尿細管塊周囲で敷石状に増殖するが、その増殖は長期間にわたっては維持されず、ついには線維芽細胞が増殖して上皮細胞の増殖を凌駕するようになる。しかし、尿細管塊をコラーゲンゲル内に包埋して培養すると、尿細管塊から3次的に放射状に伸びる管腔様構造物が認められた。この管腔様構造物の出現が平板培養での上皮細胞増殖期に一致することから、管腔様構造物は尿細管上皮細胞由来の構成細胞から形成されるものと推測される。加えて、EGFの添加によって管腔様構造物の活発な増殖をみた今回の成績は、管腔様構造物を構成する細胞が尿細管上皮細胞由来であることを示唆している。

管腔様構造物の構成細胞

尿細管塊包埋培養でみられたような管腔様構造物の出現は、現在までに乳腺上皮細胞および顎下腺上皮細胞のコラーゲンゲル内包埋培養で下記のごとく報告されている。1979年にYang *et al.*⁴⁾は、マウス乳ガン細胞をコ

ラーゲンゲル内で包埋培養すると8週間もの長期間にわたって管腔様構造物の増殖がみられたことを報告しており、翌年には正常乳腺上皮細胞においても同様の増殖像が観察されたという⁵⁾。さらに彼らは、同じ方法を用いてマウス顎下腺上皮細胞の培養を試みているが、乳腺細胞の場合と同様に顎下腺上皮細胞の増殖も3次的な管腔構造を示したと報告している⁶⁾。乳腺上皮細胞および顎下腺上皮細胞の両者は共に分泌性上皮であることから、コラーゲンゲル内包埋培養での管腔様構形成機序は分泌性上皮としての性格に由来するためと推測される。以上から、尿細管上皮細胞は分泌性上皮としての性格を有しているものと仮定できる。

前述の事項以外にも、尿細管上皮細胞の分泌性上皮としての特徴を示す事項として下記のものがある。以前から単層培養下で尿細管上皮細胞はドーム状構造を形成することが知られている⁷⁾。ドームとは、上皮細胞の増殖がconfluentとなった後、上皮細胞がディッシュから剝離して半球状に盛り上がった状態を意味する。この状態は細胞の培養液面からディッシュ接着面側への細胞内液体輸送の結果と考えられている。また、このようなドーム形成は分泌性上皮であるマウス乳腺上皮細胞培養によってもみられる⁸⁾ ことから尿細管上皮細胞が分泌性上皮としての特徴を持つものと思われる。

管腔様構造物の出現が糸球体包埋培養では認められなかった今回の成績は、糸球体より成長する細胞が糸球体上皮細胞およびメサンギウム細胞であり、いずれも分泌性上皮細胞でないことを示唆している。

また、一部の尿細管塊包埋培養では増殖細胞が管腔様構造を示さずに足突起様構造を示した成績については、増殖する細胞が異なることによるのか、あるいは他の条件、細胞の活動度の差によるものか不明である。

細胞外基質の役割

上皮性細胞の増殖および分化は間葉系細胞と相互作用の基に行われていると考えられている。特に間葉系細胞で合成分泌される細胞外基質は上皮性細胞の増殖および分化に対して重要な役割を担っていると思われる。そのために上皮細胞を単独に分離して単層培養しても、支持組織としての基質が存在しないので上皮細胞は増殖能および分化能を保持できないと想像される。事実、糸球体上皮細胞および尿細管上皮細胞の培養維持は従来のプラスチックディッシュ上培養では約5日間程度であるのに対し、今回のコラーゲンゲル上培養(平板培養)では7日間以上の上皮細胞培養の維持が可能であった。また間葉系細胞が細胞外基質を合成分泌している事実としては糸球体細胞によるコラーゲン合成を明らかにした報告⁹⁾

もみられる。

最近では、細胞の分化・発生・増殖などに対する細胞間基質の重要性が注目されるようになった。尿細管包埋培養での管腔様構造増殖を明らかにした今回の成績は、細胞の分化・増殖に対するコラーゲンの細胞間基質としての重要性を示唆したといえる。

コラーゲンゲル内包埋培養の利点

今回検討した尿細管包埋培養は、従来の培養法に比して、生体内により近い状態での培養法と考えられ、生体現象を再現できる培養法として有用と思われる。コラーゲンゲル内包埋培養は他の培養法に比して線維芽細胞増殖の少ないことも利点のひとつといえる。また、尿細管塊包埋培養と同様に単離尿細管包埋培養においても管腔様構造物が増殖した今回の成績は、各種尿細管分節ごとに分離して包埋培養し得ることを示唆している。

結 論

各種腎組織培養系に対する細胞外基質であるコラーゲンの影響を検討する目的でコラーゲンゲル上(平板培養)およびコラーゲンゲル内(包埋培養)で各種腎組織を培養し、細胞増殖を形態学的に検討した。

(1) 糸球体の平板培養では上皮細胞増殖後に線維芽様細胞が増殖し始めた。そして培養開始14日頃からは線維芽様細胞の増殖は上皮細胞の増殖を凌駕した。しかし、糸球体の包埋培養では線維芽様細胞はごく軽度の増殖を示したにとどまった。

(2) 尿細管塊の平板培養では上皮細胞は長期間(約2週間)にわたって増殖していた。尿細管塊包埋培養では管腔様構造物が3次元的な増殖を示し、単離尿細管の包埋培養でも尿細管塊と同様の増殖様式を示した。またこの管腔様構造物はEGFの存在下で高度の増殖性を示し約3週間にわたり成長した。

本論文の要旨は第29回日本腎臓学会総会(1987年、東京)において発表した。

文 献

1) Yang, J. and Nandi, S.: Growth of cultured cells

using collagen as substrate. *Int. Rev. Cytol.* 81: 249-286, 1983.

- 2) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橘陽一, 草間良恵, 古閑睦好: コラーゲン・ゲル培養法(I). *組織培養* 13: 26-30, 1987.
- 3) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橘陽一, 草間良恵, 古閑睦好: コラーゲン・ゲル培養法(II). *組織培養* 13: 64-68, 1987.
- 4) Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, D. and Nandi, S.: Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 3401-3405, 1979.
- 5) Yang, J., Richards, J., Gutzman, R., Imagawa, W. and Nandi, S.: Sustained growth in primary culture of normal mammary epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 2088-2092, 1980.
- 6) Yang, J., Larson, L. and Nandi, S.: Three-dimensional growth and morphogenesis of mouse submandibular epithelial cells in serum-free primary culture. *Exp. Cell Res.* 137: 481-485, 1982.
- 7) Leighton, J., Brada, Z., Estes, L. W. and Justh, G.: Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science* 163: 472-473, 1969.
- 8) Pickett, P. B., Pitelka, D. R., Hamamoto, S. T. and Misfeldt, D. S.: Occluding junctions and cell behavior in primary cultures of normal and neoplastic mammary gland cells. *J. Cell Biol.* 66: 316-332, 1975.
- 9) Scheinman, J. I., Brown, D. M. and Michael, A. F.: Collagen synthesis by human glomerular cells in culture. *Biochimica et Biophysica Acta* 542: 128-136, 1978.