

原 著

培養ヒト腎糸球体臓側上皮細胞の継代培養に関する基礎的検討

東京女子医科大学 第四内科学教室 (主任：二瓶 宏教授)

ツツイ タカアキ ニツタ コウサク ユムラ ワコ ニヘイ ヒロシ
筒井 貴朗・新田 孝作・湯村 和子・二瓶 宏

(受付 平成9年2月3日)

A Basic Study in Culturing Human Glomerular Visceral Epithelial Cells

Takaaki TSUTSUI, Kosaku NITTA, Wako YUMURA and Hiroshi NIHEI

Department of Medicine IV (Director: Prof. Hiroshi NIHEI)

Tokyo Women's Medical College

Visceral glomerular epithelial cells (v-GECs) are highly differentiated and specialized cells which form an important component of the glomerular filtration barrier. As v-GECs are highly differentiated cells, it is not elucidated whether v-GECs have the capacity to proliferate and whether GEC grown in culture are of visceral or parietal origin. We found this difference to be related to difficulty in culturing GEC beyond the 6th passage. With immunocytochemical methods, the cells which were difficult to culture were found to possess characteristics of v-GECs. In these cells, we investigated the mechanisms of cell death, particularly the appearance of apoptosis. Under serum free conditions, v-GECs degenerated in a time dependent manner. With flow cytometric analysis and agarose gel electrophoresis, cell death under serum free conditions and after 6th passages depended on apoptotic mechanisms based on the demonstration of DNA fragmentation. The addition of heparin and protein kinase C inhibitors, H-7 and staurosporin, suppressed cell degeneration and DNA fragmentation.

It was concluded that v-GECs could not be cultured beyond the 6th passage due to apoptotic mechanisms and the development of apoptosis appeared to require the activation of protein kinase C.

緒 言

培養糸球体細胞は様々な糸球体疾患モデルの病態生理学的解析に広く用いられている。培養メサングウム細胞が、最も多く検討がなされており、多様なサイトカイン、細胞外基質を産生し、糸球体上皮細胞、内皮細胞と協調しながら、糸球体の内部環境の維持や病的状態に関与しているとされる。糸球体内皮細胞は分離培養すること自体が難しく、メサングウム細胞に比べ発表数は著しく少ない¹⁾。

糸球体上皮細胞の培養では、糸球体由来の上皮細胞 (visceral-glomerular epithelial cell; v-GEC) とボウマン嚢由来の上皮細胞 (parietal-

glomerular epithelial cell; p-GEC) の二種類の細胞が継代培養可能と考えられている。従来行われている糸球体上皮細胞培養法で、単離糸球体よりクローニングして得られた敷石状の細胞が、果たしてv-GECなのか、p-GECなのかはいまだに議論的になっている。今までv-GECとされていたものが、p-GECであった可能性も否定はできない^{2)~4)}。この両者を分離して培養することは困難であり、今日まで糸球体上皮細胞を用いた研究が、培養そのものは比較的容易であるにも拘わらず、それほど普及しない理由もこの点にあると思われる。

v-GECは、in vivoでは足突起を有するなど、高

度に分化した細胞であり、一般には分裂しないとされる。この形質を培養した際にも有しているのなら継代培養は困難であると予想される。我々は、v-GEC と確認された初期培養を3回行い、そのうち3回とも7代以降の継代が困難である上皮細胞を用い、継代不能に陥る際のアポトーシスの関与とアポトーシスに対するヘパリンの作用を検討した。また、この過程に protein kinase C (PKC) が関与しているかどうか確かめるため、PKC 阻害薬の効果を検討した。

材料と方法

1. 糸球体上皮細胞の培養

既報⁵⁾のごとく、腎腫瘍のため摘出したヒト腎の正常部分より単離した糸球体を、酵素処理をせずに20% fetal calf serum (FCS), ITS premix (5 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml transferrin, 5ng/ml selenium) (Collaborative Research, USA) および抗生物質を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO, USA) で初代培養した。約10日後、糸球体より敷石状の細胞のクローンを確認後、0.25%トリプシン (GIBCO, USA) で細胞浮遊液とし、50 μ m のメッシュを通して残存糸球体を除いた。さらに数日間培養し、目的の細胞をクローニングシリンダーで25cm²の培養フラスコに移し、継代培養した。

2. v-GEC の同定

細胞を Lab-Teck slide glass (Nunk, USA) 上に培養し、冷アセトンで10分間固定後、糸球体上皮細胞のマーカーである、PP-44⁶⁾, PHM-5⁷⁾, および我々が作製した30-kD-protein に対するモノクローナル抗体⁸⁾を一次抗体とする間接蛍光抗体法で染色した。PP-44はラット由来であるが、ヒト糸球体にも交叉性を示し、PHM-5と30kD protein に対するモノクローナル抗体はヒト由来のものである。その他、ミオシンと第VIII因子関連抗原に対する抗体でも同様の染色を施行した。細胞形態は位相差顕微鏡で観察した。PP-44, PHM-5, 30-kD-protein に対するモノクローナル抗体にすべて陽性を示すクローンのみを選別し、2~5代目の細胞で以降の実験を施行した。

3. 細胞活性の判定

12-well の culture plate (Corning, USA) に v-GEC を5 \times 10⁴個/well ずつ蒔き、subconfluent になるまで培養した後に無血清培地地下におき、24時間ごとに培養上清中の浮遊細胞数と well への接着細胞数を血算板で算定した。また浮遊細胞はトリパンブルーで染色し95%以上の細胞が死細胞であることを確認した。死細胞の割合を下記のごとく算出した。

$\% \text{ degeneration} = \text{浮遊細胞数} / (\text{接着細胞数} + \text{浮遊細胞数})$

4. アポトーシスの確認

まず各周期の DNA 量を既報⁹⁾のごとく flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, USA) で検討した。25cm²の培養フラスコに subconfluent になるまで培養し、phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 で洗浄し、0.25% トリプシンで処理後、一部の細胞を PBS に浮遊させ、50 μ g/ml の RNase (Sigma, USA) で処理し、50 μ g/ml の propidium iodide で染色した後、flow cytometry で検討した。

次にアポトーシスの存在を証明するため既報¹⁰⁾のごとく DNA fragmentation の有無を3%アガロースゲル電気泳動で確認した。残りの細胞をトリプシン処理し、遠心分離により cell pellet とした。次いで buffer A (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 100 μ g/ml proteinase K) と0 $^{\circ}$ C でよく混合し、buffer B (buffer A : 20% SDS = 9 : 1) を等量加えて、proteinase K を追加した後、37 $^{\circ}$ C 1時間静止した。フェノール抽出にて核酸を純化した後に、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール = 10 : 10 : 1 に調整したものを等量加え抽出操作を繰り返した。最後にクロロホルムで同様の操作を繰り返して DNA を抽出した。その後、3%アガロースゲルで電気泳動し DNA fragmentation の有無を確認した。

5. ヘパリン、および PKC 阻害剤のアポトーシスへの作用

12-well の culture plate に v-GEC を subconfluent になるまで培養した後、ヘパリン

(1~10 μ g/ml) および PKC の阻害薬である H-7 (10⁻⁷M) および staurosporin (10⁻⁷M) の存在下, 非存在下の無血清培地で経時的に培養し, 細胞活性, アポトーシス出現への影響を検討した. なお, PKC 阻害薬の濃度を決定するにあたり細胞障害試験を行い, 10⁻⁶M 以上の濃度では LDH 放出率が有意に上昇し, 細胞障害性があると判断し, 10⁻⁸M 以下の濃度では効果のないことを確認し, 各々 10⁻⁷M とした.

6. 統計処理

結果は平均値 \pm 標準偏差で示した. Student's-t test または Bonferroni test で検定し, 危険率 5% 以下を有意水準とした.

結 果

1. 臓側糸球体上皮細胞の培養, 同定

図 1 に培養 v-GEC の位相差顕微鏡像を示す. 初代培養では, 典型的な敷石状の外観 (図 1A) を呈するが, 継代を続けていくと徐々に線維芽細胞様に変化し, 紡錘状の外観 (図 1B) を呈するようになった. 無血清培地下に置くと, 細胞は円形化し浮遊細胞が増加した (図 1C). 通常の培養条件下でも, 6 代目以上の細胞は円形化し, 浮遊する傾向を示した.

免疫組織化学では, 継代培養が困難な細胞は PP-44 (図 2A), PHM-5 (図 2B), 30kD-protein に対する抗体 (図 2C) で細胞質が染色され, いずれも陽性であった. 継代培養が容易な細胞は 30 kD-protein に対する抗体でのみ染色された.

以上より継代培養が困難な細胞は v-GEC の特徴を有していた. このほか, ミオシンと第 VIII 因子関連抗原は陰性で, 糸球体内皮細胞やメサンギウム細胞ではないことが確認された.

2. 細胞活性, アポトーシスの証明, ヘパリンおよび PKC 阻害薬の効果

図 3 に v-GEC を無血清培地で培養した際の, アポトーシス出現に対するヘパリンの効果を示す. 48 時間培養後ヘパリンを添加しない場合, 約 65% の細胞が死滅するが, ヘパリン添加 (10 μ g/ml) により死細胞数の割合は約 44% へと有意に減少していた.

図 4 に無血清培地で 24 時間培養した細胞の

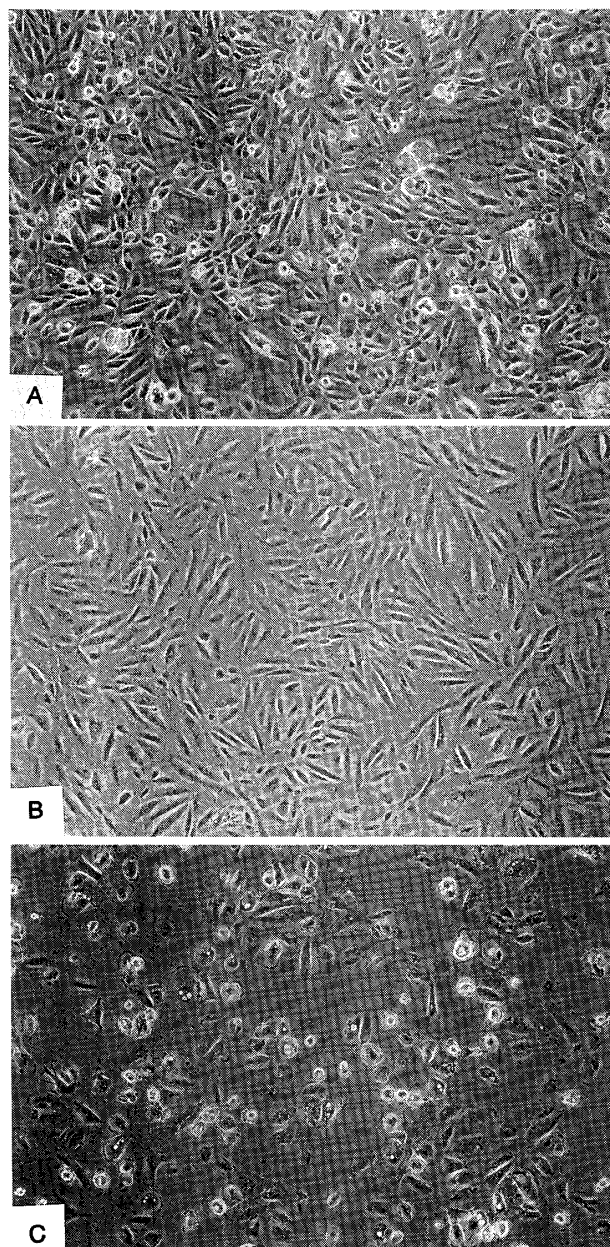


図 1 培養ヒト腎糸球体上皮細胞の位相差顕微鏡像
初代培養 (A) では敷石状の外観を呈するが, 継代を続けるに従い (B) 徐々に紡錘状の外観を呈するようになった. 無血清培地下 (C) では細胞は円形化し, 浮遊細胞が増加した. ($\times 200$)

flow cytometric analysis の結果を示す. G1 期の前に pre G1 peak が観察され, DNA の断片化が推察された. 本細胞が死滅する際はアポトーシスの過程をとると予想された.

ヘパリンの濃度を変えて無血清培地に添加し, 24 時間培養後の細胞より DNA を採取し, アガロースゲル電気泳動にかけた (図 5). ヘパリン無

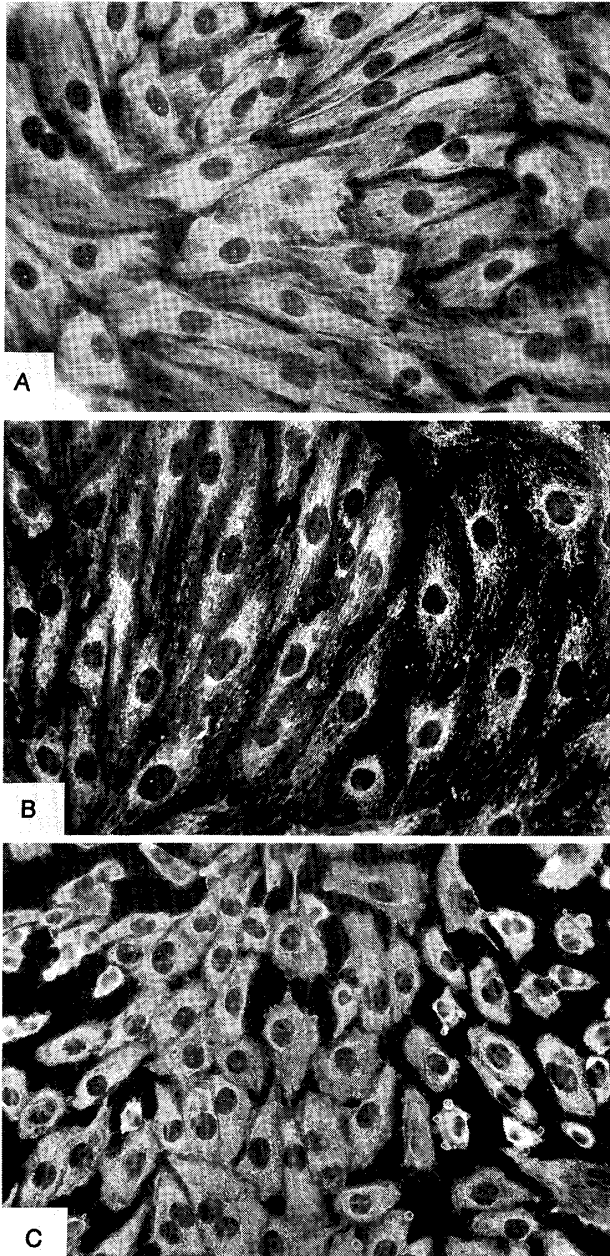


図2 培養ヒト腎糸球体上皮細胞の間接蛍光抗体法による各細胞マーカーの発現
一次抗体としてPP-44 (A), PHM-5 (B), 30kD-protein に対する抗体 (C) を用い、いずれも細胞質が染色されている。(×400)

添加(レーン3)の場合、バンドは梯子状でDNAの断片化がみられ、アポトーシスの存在が証明された。ヘパリンの添加(レーン1~2)によりDNAの断片化は消失したことからヘパリンはアポトーシス発現を抑制する作用を有していると考えられた。また、通常培養条件下の6~7代目のv-GEC(レーン5~6)においてもDNAの断片化

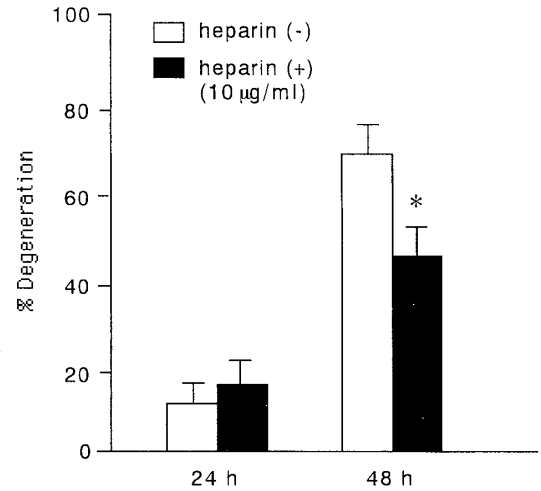


図3 培養ヒト腎糸球体上皮細胞の細胞死に対するヘパリンの効果

* : $p < 0.05$ vs. heparin (-).

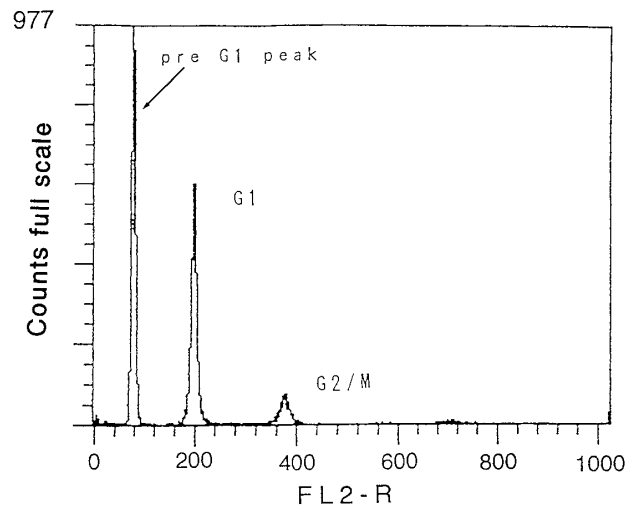


図4 flow cytometric analysis による pre G1 peak の観察

がみられ、 $10\mu\text{g/ml}$ のヘパリンの添加により6代目のv-GECにおけるDNAの断片化は消失した。

PKCの阻害薬であるH-7 (10^{-7}M) を無血清培地に添加し、死細胞数算定による細胞活性でアポトーシスへの影響をみた。図6に示すように、H-7添加により24時間後、48時間後ともに死細胞数の有意な減少が観察された。また、 10^{-7}M の staurosporin という PKC の阻害薬を用いても同様の結果が得られた(% degeneration : 24時間 $36 \pm 1.5\%$, 48時間 $44 \pm 2.4\%$)。これらの結果よりアポトーシスにはPKCの活性化が関与していると

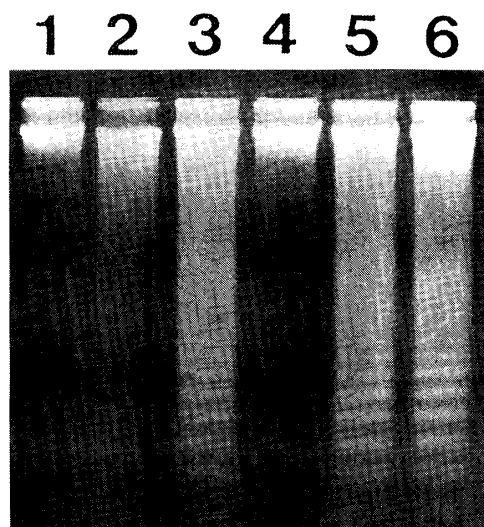


図5 アガロースゲル電気泳動による DNA の断片化の証明

1 : ヘパリン 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加, 2 : ヘパリン 5 $\mu\text{g/ml}$ 添加, 3 : 無血清培地のみ, 4 : 6 代培養, ヘパリン 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加, 5 : 6 代培養, ヘパリン無添加, 6 : 7 代培養, ヘパリン無添加.

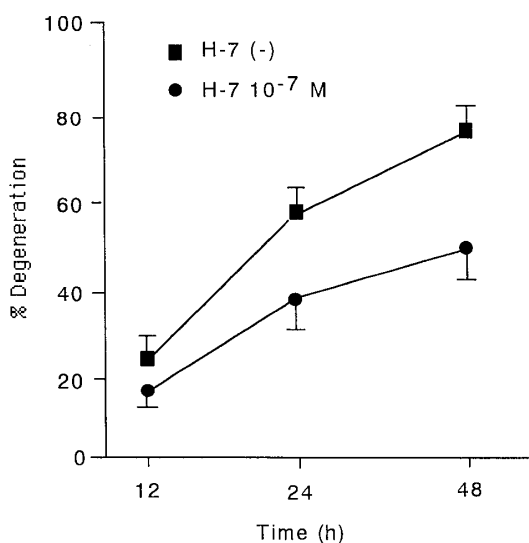


図6 培養ヒト腎糸球体上皮細胞の細胞死に対する PKC の阻害薬である H-7 の効果

考えられた。

また, v-GEC であることを確認した 4 代目の細胞を用いて, 通常の培養条件下で同様の実験を行ったところ, flow cytometry で pre G1 peak が検出され, その peak の細胞をアガロースゲル電気泳動で分析したところ, DNA fragmentation が確認された。この変化は, 無血清培地で得られ

たように, ヘパリンの添加で濃度依存性に抑制された。実際, 継代用の培地に 10 $\mu\text{g/ml}$ のヘパリンを添加して培養することにより, 10 代目までの継代が可能となった。

考 察

単離糸球体よりクローニングする方法では, 臓側糸球体上皮細胞 (v-GEC) とボウマン嚢上皮細胞 (p-GEC) を分離して培養することは困難である。Norgaard ら²⁾は, ラットで形態学的に単離糸球体より成長してきた細胞を検討し, v-GEC は p-GEC と比較して, はるかに大型の細胞でしばしば多核を呈し, 増殖能は大変低く, 継代は困難であると述べている。また, Holthofer ら⁴⁾は, 免疫組織化学の手法を用い, ラット由来の単離糸球体自体には v-GEC の形質を発現している細胞は認めるが, 単離糸球体から成長してくる細胞は, いかに培養条件を調整しても v-GEC の形質を有する細胞は認めないと報告している。以上はラットを用いた検討で, ヒトの v-GEC に関する検討はなされていない。

我々は, 3 回の異なる継代実験を行い, 単離糸球体からクローニングして得られた上皮細胞に 6 代以上継代培養が困難なものが 3 回とも存在し, また継代が容易なものも存在する可能性が考えられた。v-GEC は増殖能が低いことより, 継代培養が困難な細胞が v-GEC と想定し, 今回の検討を行った。

はじめに単離糸球体から得られた敷石状の細胞を免疫組織化学的に染色し, PP-44, PHM-5, 30 kD-protein に対する抗体のいずれも陽性を呈するクローンを選別した。これら三種の抗体でヒト正常腎組織を染色したが, 臓側腎糸球体上皮細胞にのみ陽性を示すのは, PP-44のみでその他の抗体はボウマン嚢上皮細胞, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞などにも陽性であった。培養困難な細胞のみが PP-44陽性であったことより, この細胞が v-GEC の形質を有していると考えられる。位相差顕微鏡像は敷石状の外観を呈し, 継代を重ねると紡錘化してくるが, これは形質が徐々に変化していくためと思われる。無血清培地下に置いたり, 6 代以上の継代培養により細胞は円形化し, 浮遊

細胞が目立つようになるが、なんらかの機序で死滅していくためである。

細胞が死滅する際には、大きくネクロシスとアポトーシスという二つの機序がある。培養細胞が継代できずに死滅する時、どちらの機序が強く関与しているかは不明であるが、腫瘍細胞や腫瘍ウイルス遺伝子導入細胞以外の培養細胞では継代数は有限であり、アポトーシスの関与が強いと思われる。v-GECが継代培養が困難である理由として、アポトーシスをきたしやすいことによる可能性が想定される。

そこで、無血清培地にさらすことで細胞活性を抑制し、この時の細胞死滅の際のアポトーシス発現について検討した。無血清培地では、時間とともに浮遊細胞、すなわち死細胞は増加した。浮遊している細胞について flow cytometric analysis, アガロースゲル電気泳動を行い DNA の断片化が観察され、アポトーシスの存在が証明された。これらより無血清培地、換言すると growth factor の枯渇した状態で誘導される v-GEC の死滅にはアポトーシスが関与しているものと思われる。また、6代目以上の細胞を用いた実験からも同様の結果が得られ、継代が困難である理由として通常の培養条件下ではアポトーシスをきたすと考えられた。

Maeda らの報告¹¹⁾により、継代培養が困難な肝細胞の初期培養では細胞密度によってアポトーシスが誘導され、それはヘパリンの添加によって抑制されることが判明した。この報告に基づき、v-GEC を無血清培地で培養し、ヘパリンの添加による変化を観察した。低濃度のヘパリンの添加でアガロースゲル電気泳動では DNA の断片化は抑制され、死細胞数はヘパリンで有意に減少し、ヘパリンがアポトーシス発現を抑制することが示された。ヘパリンは血管平滑筋細胞やメサンギウム細胞の増殖を抑制することは広く知られている¹²⁾が、腎糸球体上皮細胞では Adler ら¹³⁾がヘパリンの増殖抑制作用を述べた以外には、ヘパリンと v-GEC との関連を示した報告はない。我々の検討では、ヘパリンには増殖抑制効果は認めなかった。

一方、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

などの PKC の刺激薬によってアポトーシスが抑制されるという報告¹⁴⁾¹⁵⁾と PKC 阻害薬によってアポトーシスが抑制されるという報告¹⁶⁾¹⁷⁾があり、細胞の種類や実験条件の違いによると考えられている。そこで、v-GEC を無血清培地で培養し、PKC 阻害薬である 10^{-7} M の H-7 および staurosporin を加え、アポトーシス発現への影響をみた。これらの PKC 阻害薬の添加でアガロースゲル電気泳動では DNA の断片化は抑制され、死細胞数も有意に減少し、今回の実験条件下ではアポトーシス発現には PKC の活性化が関与していることが示唆された。

実験腎炎のうちラット Thy 1 腎炎や、ヒトの糸球体腎炎のうち半月体形成性糸球体腎炎ではアポトーシスが組織障害の治癒過程で重要な役割を果たしている¹⁸⁾¹⁹⁾。また、アポトーシス抑制蛋白の Bcl-2 の発現をヒト腎生検組織で検討すると、メサンギウム増殖性腎炎で細胞増殖の激しい例で多く発現していたと報告され、アポトーシス発現抑制が糸球体内の細胞増殖の維持に関与している²⁰⁾。このように、糸球体疾患での糸球体内の細胞数の多少、障害治癒にアポトーシスは関係している。

v-GEC は足突起を有し高度に分化した細胞で、in vivo ではいかなる状況下でも分裂しないとされる²¹⁾²²⁾。障害により v-GEC が減少すると、残存した v-GEC が機能を代償するが、代償が破綻した場合、糸球体はその機能が廃絶していく²²⁾²³⁾。障害時の v-GEC の維持は重要であり、微少変化群にともなうネフローゼ症候群では、しばしば v-GEC の障害を認める。この際にヘパリンの持続点滴静注が行われるが、in vivo でヘパリンのアポトーシス抑制作用が発揮される可能性も考えられる。

PKC 阻害薬である H-7 および staurosporin の添加で死細胞数は減少したことより、アポトーシス発現には PKC の活性化が必要であると思われる。

まとめ

1. ヒト単離糸球体からは6代以上継代培養が困難なものと容易なものの二種類の上皮細胞が得られた。
2. PP-44, PHM-5は継代困難な上皮細胞にの

み陽性であり、これらの細胞が v-GEC の形質を有していると考えられた。

3. 無血清または血清添加培地で培養すると、v-GEC は時間とともにアポトーシスをきたす細胞が多くなり、接着細胞は浮遊した。この過程に PKC の活性化が関与していると考えられる。

4. ヘパリン、H-7 および staurosporin はアポトーシスの発現を抑制した。微少変化群によるネフローゼ症候群でのヘパリン投与は、v-GEC のアポトーシスを抑制している可能性がある。

なお、本論文の要旨は第39回日本腎臓学会総会(1996年、倉敷)において発表した。

文 献

- 1) **Nitta K, Simonson MS, Dunn MJ**: The regulation and role of prostaglandin biosynthesis in bovine glomerular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2 : 156-163, 1991
- 2) **Norgaard JOR**: Rat glomerular epithelial cells in culture: Parietal or visceral origin? *Lab Invest* 65 : 549-557, 1991
- 3) **Weinstein T, Cameron R, Katz A et al**: Rat glomerular epithelial cell in culture express characteristics of parietal, not visceral, epithelium. *J Am Soc Nephrol* 3 : 1279-1287, 1992
- 4) **Holthofer H, Sainio K, Miettinen A**: Rat glomerular epithelial cells do not express podocytic markers when cultured in vitro. *Lab Invest* 65 : 549-557, 1991
- 5) **筒井貴朗, 新田孝作, 二瓶 宏ほか**: ヒト培養糸球体上皮細胞における membrane attack complex inhibitory factor 発現の意義. *日腎会誌* 36 : 89-94, 1994
- 6) **Mundel P, Gilbert P, Kriz W**: Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 kD protein. *J Histochem Cytochem* 39 : 1047-1056, 1991
- 7) **Kerjaschki D, Shakey DJ, Farquhar MG**: Identification and characterization of podocalyxin-major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cells. *J Cell Biol* 98 : 1591-1596, 1984
- 8) **Nitta K, Tsutsui T, Nihei H et al**: The role of novel 30-kD protein in human podocyte: Special relevance to proteinuria in glomerulonephritis. *Jpn J Nephrol* 35 : 1205-1211, 1993
- 9) **新田孝作, 内田啓子, 二瓶 宏ほか**: 培養糸球体内皮細胞の増殖制御におけるメサンギウム細胞の役割. *日腎会誌* 35 : 663-669, 1993
- 10) **新田孝作, 筒井貴朗, 二瓶 宏ほか**: 培養糸球体内皮細胞に対する cyclosporin A の直接作用. *移植* 28 : 662-667, 1993
- 11) **Maeda S, Kimura H, Koga N et al**: Cell density-dependent DNA fragmentation and its suppression by heparin in primary culture of adult rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 195 : 270-275, 1993
- 12) **Castellot JJ, Hoover RL, Harper PA et al**: Heparin and glomerular epithelial cell-secreted heparin-like species inhibits mesangial cell proliferation. *Am J Pathol* 120 : 427-435, 1985
- 13) **Adler S, Eng B**: Reversal of inhibition of rat glomerular epithelial cell growth by growth factors. *Am J Pathol* 136 : 557-563, 1990
- 14) **McConkey D, Hartzell P, Jondal M et al**: Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J Biol Chem* 264 : 13399-13402, 1989
- 15) **Forbes I, Zalewski P, Giannakis C et al**: Induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol ester. *Exp Cell Res* 198 : 367-372, 1992
- 16) **Kikaki H, Tadakuma T, Okada C et al**: Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol esters. *J Immunol* 143 : 1790-1794, 1989
- 17) **Pommier Y, Colburn N**: Acquisition of a growth-inhibitory response to phorbol ester involves DNA damage. *Cancer Res* 52 : 1907-1915, 1992
- 18) **Baker AJ, Mooney A, Hughes J et al**: Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 94 : 2105-2116, 1994
- 19) **Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H et al**: Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* 74 : 941-951, 1996
- 20) **Takemura T, Murakami K, Miyazono H et al**: Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 48 : 1886-1892, 1995
- 21) **Pabst R, Sterzel RB**: Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic study. *Kidney Int* 24 : 626-631, 1983
- 22) **Fries JW, Sandstrom DJ, Meyer TW et al**: Glomerular hypertrophy and epithelial injury

- modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab Invest* 60 : 205-218, 1989
- 23) **Nagata M, Kriz W** : Glomerular damage after uninephrectomy in young rat. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int* 42 : 148-160, 1992
-