

200500190A

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ES細胞からの腎臓細胞誘導法の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西中村 隆一

平成18(2006)年 3月

目次

I. 総括研究報告	
ES 細胞からの腎臓細胞誘導法の開発-----	1
西中村 隆一	
II. 分担研究報告	
ES 細胞と腎臓に共通する分子機構の解明-----	9
小林 千余子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	15
IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	16

ES 細胞からの腎臓細胞誘導法の開発

主任研究者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究センター 教授

研究要旨

腎不全は難病指定とされ、社会的負担は大きいにもかかわらず、腎機能を回復させる画期的な治療法はいまだ存在しない。腎臓の再生研究に決定的に欠けているもの、それは腎臓前駆細胞を検定する系である。そこで我々は発生期腎臓から前駆細胞を同定する系を確立した。Sa111 は我々が単離した核内因子で、そのノックアウトマウスは腎臓を欠損する。この遺伝子座に GFP を導入したマウスでは、腎臓前駆細胞集団である後腎間葉が蛍光発色する。GFP が高発現する細胞を FACS で選別し、Wnt4 を発現するフィーダー上で血清非存在下に培養すると、1 個の細胞からコロニーが形成され、このコロニーは糸球体、近位尿細管、遠位尿細管という多系統へ分化することを見いだしている。本計画ではこのコロニーアッセイを基盤として、胚性幹(ES)細胞から腎臓前駆細胞の誘導を目指す。17 年度は、GFP 高発現の細胞群を再凝集させ器官培養すると 3 次元構造を再構築できることを示した(Development, 2006)。さらに ES を 2 次元で分化させる方法 (RIKEN の西川伸一らが開発) をほぼ再現し、分化誘導した各分画をコロニーアッセイと上述の器官培養に投入して検討を開始している。18 年度はこれをさらに進めるとともに、誘導の効率をあげるため、ES 細胞に遺伝子改変を行う計画である。本研究期間中は ES 細胞に専念することによって突破口を開き、その後国内外の施設と共同して、腎病態モデルでの効果、血液幹細胞、間葉幹細胞、臍帯血、成体腎臓細胞などへの応用を図りたい。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関
における職名

小林 千余子 熊本大学発生医学研究センター助手

A. 研究目的

日本で腎不全により人工透析を受ける人は23万人を超え、この10年で2倍となった。現在、慢性腎不全の原因の第1位は糖尿病であり、今後も増える一方である。腎不全は難病指定とされ、その医療費は

すべて国庫によって賄われるため、社会的負担は大きい。このような状況にもかかわらず、腎機能を回復させる画期的な治療法はいまだ存在せず、最終的には透析導入となる。この状況は申請者が臨床医だった10年前と何ら変わらない。腎臓領域に再生医療を導入しようと考えたときに、決定的に欠けているもの、それは腎臓前駆細胞を検定する系である。つまりES細胞や骨髄などから腎臓細胞を誘導しようとするとき、腎臓前駆細胞を同

定でき、かつその頻度まで算定できる確実で信頼できる系がなければならない。我々は、前駆細胞が存在する発生期腎臓をポジティブコントロールとして、そこから前駆細胞を同定する系を確立したので、これを基盤にES細胞からの誘導を試みる。まずES細胞を使用するのは、この細胞のみが *in vivo* で腎臓に分化することが証明されているからである。もちろんES細胞には倫理的な問題が伴うが、腎臓細胞を誘導する方法を見いだすことが先決である。これが成功してから、骨髄や臍帯血、あるいは患者の腎臓などに応用するのが望ましく、腎臓に分化しないかもしれない細胞で始めることはない。よって本研究期間中はESに専念する。より長期的には、腎臓誘導条件を広く開示すれば、骨髄間葉系幹細胞など多領域の研究者の参入が期待でき、飛躍的に実用性が増すであろう。また腎不全治療に向けた新しい方策の可能性を提示することになろう。腎臓は再生医療から最も遠い臓器と考える人も多く、現時点ではその通りであろうが、10年先を見越して今ここで力を入れなければ他臓器の流れから置いていかれるのではないだろうか。

B. 研究方法

本計画ではES細胞から腎臓前駆細胞への誘導を目指す。前駆細胞の同定とその頻度の検定は、上述のコロニーアッセイを使用する。概略を図1に示したので参照されたい。

1) ES細胞の分化誘導

ESの分化系として、培養皿で2次元に展開する方法（RIKENの西川伸一らが開

発）を主として使用する。この利点は、分化誘導後再解離が容易でFACSが可能であること、かつ側方中胚葉が *f1k1* 陽性画分に、沿軸中胚葉が *PDGFR* 陽性画分に存在することである。腎臓はこの2つに挟まれた中間中胚葉から生じるので、どちらかの画分に重複する形で腎臓前駆細胞を含む集団があると考えている。いずれにしても、コロニーアッセイを指標にしながら、腎臓前駆細胞が最も濃縮される画分をFACSで絞り込んでいくことになる。また検定系として、同じく我々が開発した器官培養法、新生マウスへの移植法も併用することによって、*in vivo* でも確かに前駆細胞としての機能があることを確認する。

2) ES細胞への遺伝子導入による誘導効率の改善

上の方法で腎臓前駆細胞が検出されたとしても、その頻度は極めて低いことが予想される。よって2つの工夫を行う。一つは、発生期に重要な遺伝子群をES細胞に導入して、誘導の効率を高めることである。腎臓発生カスケードの現時点での最上流 (*Sal11* より上流) に位置する *Pax2* を、ニワトリ沿軸中胚葉に導入すると異所性の腎管が誘導できることが学会レベルで報告されている。よって *Pax2* を薬剤で制御できる形でESに導入し、上記2次元誘導法で沿軸中胚葉を誘導中に *Pax2* の活性化を試みる。もう一つは検定系の更なる単純化、迅速化である。腎臓前駆細胞に特徴的な *WT1* と *Pax2* 遺伝子座にそれぞれ *GFP*, *CFP* という蛍光色素をノックインしたES細胞を作製する。これによって蛍光検出だけでその頻度が判明し、

現在の7-10日に比較して飛躍的に効率化される。もちろん蛍光頻度とコロニーアッセイが相関することは確認する必要がある。

最終的には腎病態モデルへの移植を行い、病態の改善を試みるわけだが、この時点で情報を公開し日本中の腎臓内科と広く共同研究を行いたい。各々得意とする病態モデルへ導入してもらった方が、迅速で網羅的に検討できると考える。そのためにも本研究期間中はESからの誘導に専念する。

(倫理面への配慮)

実験動物は、麻酔下での手術を行い、検体採取時には安楽死させ、無用な苦痛を与えないようガイドラインに従って取り扱う。

C. 研究結果

腎臓は前腎、中腎、後腎の三段階を経て形成される。成体哺乳類の腎臓は後腎だが、前腎はアフリカツメガエルのアニマルキャップから3日間で誘導が可能である。この系を用いてカエル腎管に発現する新規核内因子を単離し、さらにそのマウスホモログSa111を単離した。10個ものzincフィンガーを持つこのSa111は、腎臓前駆細胞集団である後腎間葉に発現し、かつノックアウトマウスは腎臓を完全に欠損することを見いだした(Development, 2001)。またヒトSALL1の変異も報告され、腎臓形成におけるSa111の種を超えた重要性が認識されている。さらにSa111の遺伝子座にGFPを導入したマウスをノックインの手法で作製し、腎

臓前駆細胞集団である後腎間葉が光ることを確認した(Mech Dev, 2004)。このマウスの胎児期腎臓からGFPが高発現する細胞群をFACSで選別し、Wnt4を発現するフィーダー上で無血清の条件下で培養すると、1個の細胞からコロニーが形成され、このコロニーは糸球体、近位尿細管及び遠位尿細管という多系統へ分化することを、本研究申請時までに見いだしていた(図2)。

17年度は以下の結果を得た。

- 1) まずコロニーアッセイの更なる検討を行った。腎臓間葉中のGFP高発現の細胞群を再凝集させ液相と気相の境界面で器官培養すると、5日間で3次元構造を再構築でき、その中には糸球体様構造や尿細管様構造が認められた。これらは各種マーカーで陽性に染まり、分化していることが証明された。これに対してGFP陰性の細胞群からの凝集塊は数日中に消失した。よってSa111を高発現する後腎間葉細胞中に腎臓前駆細胞が存在し、これは3次元立体構造を再構築できることを証明した(図3)。さらにWnt4の下流では、 β -catenin経路ではなく、Rac, Rho, JNKといったnon-canonical経路が働いていることを示し、これらを論文として発表した(Development, 2006)。
- 2) さらにこの系を基盤にして、ES細胞からの腎臓前駆細胞誘導を試みた。現在までにESを2次元で分化させる方法をほぼ再現し、分化誘導した各分面をコロニーアッセイと器官培養に投入して検討を開始している。具体的にはES細胞をOP9細胞上、あるいはIV型コラーゲン上で平面培養したあと、Flk1とPDGFRの二つのマーカー

一でソートし、各分画をWnt4発現フィーダー上で、あるいは器官培養系で検討を行っている。また誘導の効率をあげるため、Pax2を薬剤制御下に誘導できるESを作成中である。

3) 腎臓のコロニーアッセイ確立の過程でいくつものWnt発現フィーダーを試用したが、その上清をES細胞にも投与したところ、ESが未分化に維持されることを見出した。詳細な検討の結果、上清中にはWntの他に微量のLIFが存在することが判明し、丹羽らとの共同研究によって、このLIFとWntの相乗効果によってのみESは未分化能を維持でき、Wnt単独では維持できないことを明らかにした (BBRC 2006)。ヒトESがWntのみで維持できることが他グループによって報告されているが、これも真実ではないことを我々を含む複数のグループが提唱しており、ES細胞はWntのみでは維持できないことがほぼ支持されつつある。これは本計画からは予想外の副産物であった。

D. 考察

平成17年度は腎臓前駆細胞検定系の確立に時間を費やして、それを発表することができた。これは腎臓前駆細胞をprospectiveに同定する初めての系であり、独自性の高いものであると自負している。また前駆細胞がどのように運命決定されていくかを追える可能性があり、ノックアウトマウスをこの系に投入することによって、腎臓という臓器に、造血領域で研究されているようなlineage commitmentのコンセプトを導入できるのではないかと考えている。言い換えると、

組織や切片のレベルでしか検討されていなかった腎臓形成が、単一細胞レベルで解析できるようになる可能性を秘めている。

本来の目的であるES細胞からの腎臓前駆細胞の誘導実験は始まったばかりであり、ようやく2次元でのES細胞からの中胚葉誘導の再現に成功した。この方法においては、側方中胚葉がf1k1陽性画分に、沿軸中胚葉がPDGFR陽性画分に存在する。腎臓はこの2つに挟まれた中間中胚葉から生じるので、どちらかの画分に重複する形で腎臓前駆細胞を含む集団があると考えている。問題は腎臓特異的なマーカーが存在しないことであり、Sall1を含む既存の遺伝子は決して腎臓特異的ではない。これを克服する為に上記コロニーアッセイを開発したわけであるが、腎臓以外の細胞が全くコロニーを作らないのか、中間中胚葉や中腎が後腎と同様にコロニーを作るのか、ES細胞からどこまでの(中間中胚葉、中腎、後腎)誘導が可能なのか、といった未解決の問題を含んでいることは常に念頭に置かなければならない。その為にもこれらの点を明確にしつつ、より確固とした検定系に改善していく必要がある。それと同時に、より効率の良い誘導法を目指しての遺伝子導入や、複数マーカーのラベリングによる検定の簡便なES細胞の作成も必要であろう。

E. 結論

Sall1を高発現する後腎間葉細胞中に腎臓前駆細胞が存在し、これは3次元立体構造を再構築できることを証明した。さらにESを2次元で分化させる方法をほ

ば再現し、分化誘導した各分画をコロニーアッセイと上述の器官培養に投入して検討を開始している。18年度はこれをさらに進めるとともに、誘導の効率をあげるため、腎臓発生カスケードの現時点での最上流 (Sal11 より上流) に位置する Pax2 を、薬剤で制御できる形で ES に導入し、上記 2 次元誘導法で中胚葉を誘導中に Pax2 の活性化を試みる。本研究期間中は ES 細胞に専念することによって突破口を開き、その後、国内外の施設と共同して、腎病態モデルでの効果、血液幹細胞、間葉幹細胞、臍帯血、成体腎臓細胞などへの応用を図りたい。

F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象とした検討を行っていないので、該当する情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishinakamura R, Takasato M. Essential roles of *Sall1* in kidney development.

Kid. Int. (2005) 68(5): 1948-1950.

2. Osafune K, Takasato M, Kispert A, Asashima M, and Nishinakamura R. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* (2006) 133(1): 151-161.

3. Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimamoto D, Niwa H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res*

Commun. (2006) 343(1):159-166.

2. 学会発表

1. 西中村 隆一 Essential roles of *Sall* family in kidney development 日本腎臓学会国際シンポジウム、2005年6月25日、横浜

2. 西中村 隆一 腎臓発生の分子機構 第8回日本組織工学会、2005年9月1日、東京

3. Nishinakamura R, and Osafune K. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. 2nd international symposium of dynamics of developmental systems. Nov. 5, 2005, Chiba.

4. Sakaki-Yumoto M, Sato A, Takasato M, Aburatani H, Yoshida N, Nishinakamura R. Murine homologue of *SALLA*, a causative gene for Okhiro syndrome, is essential for early embryogenesis and proliferation of embryonic stem cells. International symposium on germ cells, epigenetics, reprogramming and embryonic stem cells. Nov. 17, 2005, Kyoto.

5. Nishinakamura R. Molecular mechanisms of kidney development. The 2nd China-Japan cooperative life science symposium in Kunming, Nov. 24, 2005, China

6. 山下 和成, 佐藤 朗, 王 碧昭, 西中村 隆一 ジンクフィンガー蛋白

Sa111 の機能解析 第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 8 日、福岡

7. 榊 真代、吉田 進昭、油谷 浩幸、西中村 隆一 ジンクフィンガー蛋白 Sa114 の機能解析 第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 9 日、福岡

8. 小川 和也、西中村 隆一、下里 大輔、丹羽 仁史 Wnt シグナルによるマウス ES 細胞未分化維持効果の検討 第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 9 日、福岡

9. 西中村 隆一 Sa11 ファミリーによる腎臓発生の分子機構 第 111 回日本解剖学会 2006 年 3 月 29 日、神奈川

3. その他

1. 山下和成、西中村隆一 「腎臓発生-その分子機構」発生システムのダイナミクス 蛋白質核酸酵素 (共立出版社) 50(6):644-649, 2005.

2. 稲永敏明、西中村隆一 「個体発生・形態形成における Wnt シグナル」サイトカインの多彩な機能と臨床応用 実験医学増刊(羊土社) 23(20):149-156, 2005.

3. 山田斎毅、西中村隆一 「腎臓発生を制御する分子機構」腎と透析 (東京医学社) 59(3), 527-531, 2005

4. 小宮千佳、小林千余子、西中村隆一 「Sa111 タンパク」タンパク・遺伝子からみた分子病 生体の科学 (医学書院)

56(5):544-545, 2005

5. 由利俊祐、西中村隆一 「腎臓の初期発生」分子腎臓病学 日本臨床 64(2):33-37, 2006.

6. 山田斎毅、長船 健二、西中村隆一 「腎臓発生を制御する分子機構」腎臓 (東京医学社) 28(3):157-162, 2006

7. 小林 千余子、西中村 隆一 「腎臓形成のメカニズムと再生への挑戦」再生医療のための発生生物学 (浅島誠編著) (コロナ社) 204-233, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1. ESからの腎臓細胞誘導

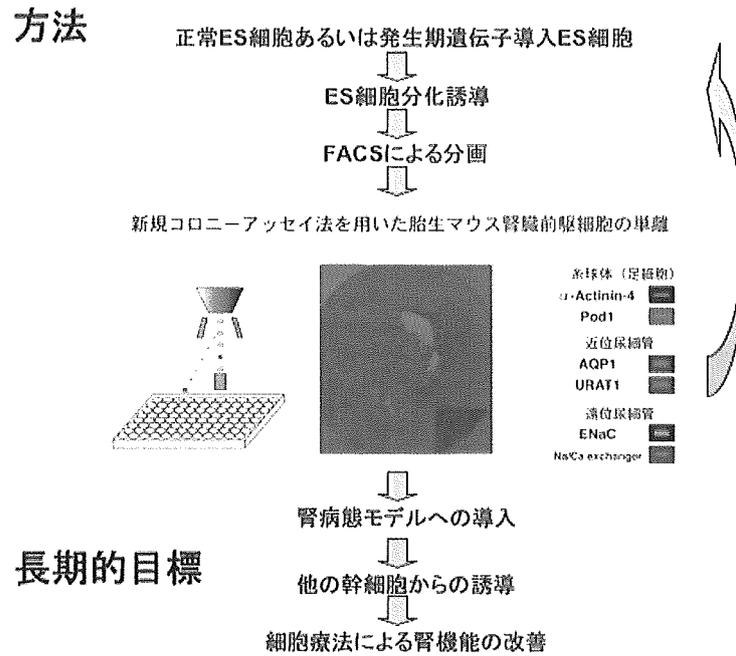


図2. 1個の後腎間葉細胞からのコロニー形成

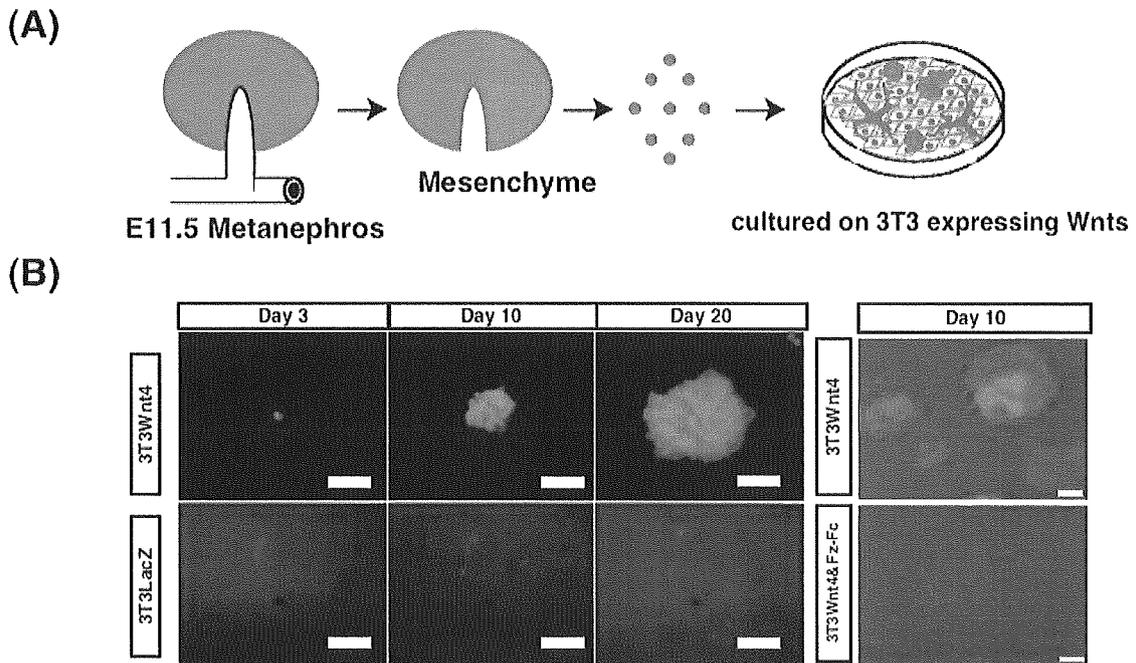
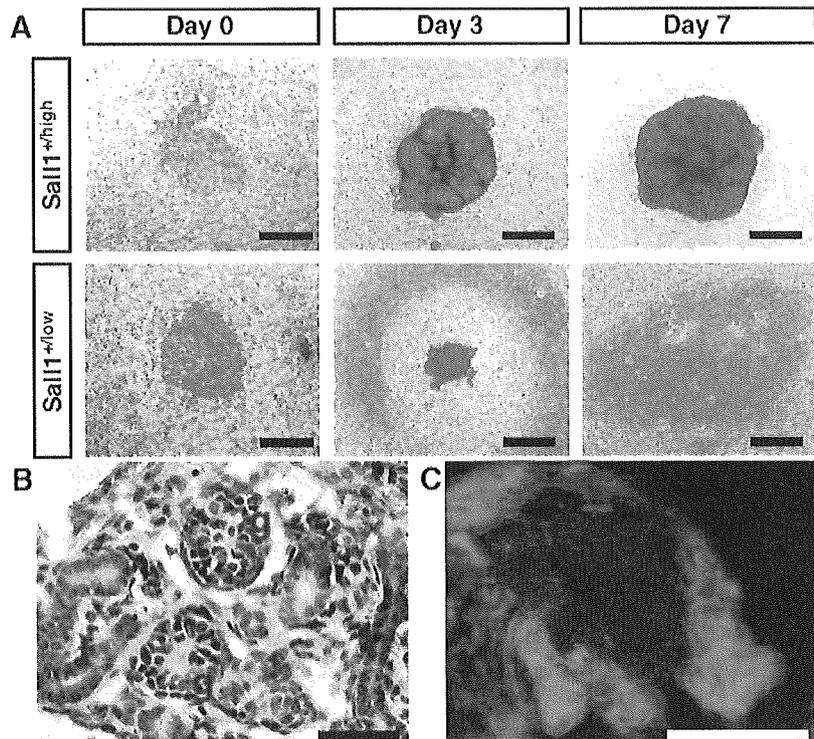


図3. 3次元構造の再構築



ES 細胞と腎臓に共通する分子機構の解明

分担研究者 小林 千余子 熊本大学発生医学研究センター 助手

研究要旨

Sal1 はショウジョウバエからヒトまで保存された zinc フィンガー蛋白で、哺乳類では 4 種類 (Sal11-4) 存在する。我々は以前マウス Sal11 を発生期腎臓から単離し、このノックアウトマウスは腎臓を欠損することを見いだした。今回新たに開発した腎臓前駆細胞検定系を利用して、Sal11 を欠失する後腎間葉には、前駆細胞は同頻度で存在するものの、その増殖が低下していることを明らかにした。これに対して Sal14 のノックアウトは胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、胚盤胞の内部細胞塊からの増殖障害が観察された。胚性幹細胞 (ES 細胞) は内部細胞塊から由来するため、Sal14 を欠損する ES 細胞を作製したところ、同様に増殖異常が認められた。これらの結果から、腎臓と ES 細胞に Sal1 ファミリー遺伝子を介する共通の機構が存在することが示唆された。Sal11/4 の二重ヘテロマウスでは腎臓が欠損すること、この二つの遺伝子は細胞内で共局在し結合することから、Sal11 と Sal14 が二量体を形成して腎臓発生に関わる可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本で腎不全により人工透析を受ける人はこの 10 年で 2 倍となり、そのコストは 1 兆円と医療費の 3% を占めるに至っている。にもかかわらず、腎機能を回復させる画期的な治療法はいまだ存在せず、最終的には透析導入となる。腎臓の再生は確かに困難な課題であるが、そのヒントはその発生機構にあると考え、我々は腎臓発生の分子機構解明に取り組んでいる。

本計画は、Sal1 ファミリー遺伝子を中心として、ES 細胞と腎臓に共通の機構を解明することによって、腎臓再生への足がかりを得ることを目的とする。Sal1 はショウジョウバエからヒトまで保存された zinc フィンガー蛋白で、哺乳類では 4

種類 (Sal11-4) 存在する。我々は以前マウス Sal11 を発生期腎臓から単離し、このノックアウトマウスは腎臓を欠損することを見いだした。腎臓の形成不全を伴うヒト SALL1 の変異も報告されており、種を越えた Sal11 の機能が提唱されている。しかしその分子機構は、発生期腎臓の小ささによる生化学的解析の困難さから解明が進んでいない。一方 Sal14 のノックアウトマウスを作成したところ、胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、胚盤胞の内部細胞塊からの増殖障害が観察された。胚性幹細胞 (ES 細胞) は内部細胞塊から由来するため、Sal14 を欠損する ES 細胞を作製することができれば、ES 細胞は試験管内で無限に増殖するため、生化学的にその詳細な機能が解明できると考えた。

そしてその知見を腎臓形成にフィードバックすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 腎臓における Sal11 の機能解明

総括報告書に詳述の通り、腎臓前駆細胞集団である後腎間葉を、Wnt4 を発現するフィーダー上で血清非存在下に培養すると、1 個の細胞からコロニーが形成され、このコロニーは糸球体、近位尿細管、遠位尿細管という多系統へ分化する。これは腎臓前駆細胞を同定する系なので、Sal11 ノックアウトマウスの後腎間葉をこの系に投入した。

2) ES 細胞における Sal14 の機能解明

Sal14 のノックアウトを作成したところ、胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、胚盤胞の内部細胞塊からの増殖障害が観察された。胚性幹細胞(ES 細胞)は内部細胞塊から由来するため、Sal14 を欠損する ES 細胞を作製することを計画した。Sal14 のヘテロ ES 細胞のもう一方の遺伝子座を破壊するベクターを構築し、ES 細胞に導入、相同組み換え体を選別した。得られた ES 細胞について、増殖、分化の検討を行った。

3) Sal11 と Sal14 の相互作用

Sal11 と Sal14 のヘテロマウスを交配して、二重ヘテロマウスを作成し、その表現型を調べた。また ES 細胞を用いてこの二つの遺伝子の相互作用を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、麻酔下での手術を行い、検体採取時には安楽死させ、無用な苦痛を与えないようガイドラインに従って取り

扱った。

C. 研究結果

1) 腎臓における Sal11 の機能解明

Sal11 ノックアウトマウスの後腎間葉を我々の開発した新規コロニーアッセイに投入した。するとコロニーは正常と同じ数が形成され、かつ E-cadherin をはじめとする分化マーカーの発現も保たれていた。しかしノックアウトのコロニーは明らかに小さかった。これは Sal11 が腎臓前駆細胞の形成と分化には必須ではないが、その増殖に必須であることを示唆している (図 4)。

2) ES 細胞における Sal14 の機能解明

Sal14 のノックアウトは子宮着床直後に死亡したため、着床前の胚盤胞を用いて培養を行った。正常の胚盤胞からは内部細胞塊が増殖してくるが、ノックアウトからの増殖は顕著に障害されていた。さらに Sal14 を欠失する ES 細胞を作成しようと試みたが、非常に低頻度でしか単離できず、Sal14 が ES 細胞に必須であることが疑われた。そこで条件付きノックアウト作成の技法で、loxP 配列で Sal14 のエクソンをはさんだ ES 細胞を一旦作成し、そこに Cre を導入することで、Sal14 欠失 ES 細胞を単離することに成功した。この細胞は非常に増殖が遅く、Sal14 が ES 細胞の増殖に必須であることが明らかになった (図 5)。これに対して未分化能や形態は保たれており、増殖低下が異常な分化のためではないことが示された。

4) Sal11 と Sal14 の相互作用

Sal11 と Sal14 の二重ヘテロマウスを作成したところ、全例が生直後に死亡し、

外脳症や鎖肛等の症状とともに、腎臓形成異常が認められた (図6)。両側腎臓を欠損するもの、片腎を欠損するもの、両側とも正常なもの、と多様な症状であった。これは遺伝学的にこの二つの遺伝子が相互作用することを意味するので、ES細胞においてその局在を調べたところ、Sal11 と Sal14 が共局在することが判明した。さらに免疫沈降法によって、内在性の蛋白同士が結合することが示され、これが二重ヘテロマウスの症状を説明する機構ではないかと考えられた。

D. 考察

Sal14 欠失 ES 細胞の作成、解析によって、Sal14 が ES 細胞の増殖に必須であることが明らかになった。一方 Sal11 は腎臓前駆細胞の増殖に必須である可能性が高くなっており、ES 細胞と腎臓という二つの細胞系に Sal1 を介した共通の機構が存在する可能性が示唆された。ES 細胞は遺伝子導入などが容易でかつ大量に増やせるので、遺伝学的生化学的解析に適している。Sal14 の ES 細胞における分子機構を解明し、それを腎臓に応用することによって、Sal11 の腎臓における機構を解明できるのではと考えている。既に Sal14 欠失 ES 細胞をマイクロアレイにかけることによって、網羅的な下流探索を始めている。また Sal14 と結合する因子の探索も必要であろう。

Sal11 と Sal14 の二量体形成仮説は単純でわかりやすい。実際、外脳症や鎖肛等の症状はそれで説明できると考えている。しかし発生期腎臓において Sal11 と Sal14 が局在するののかについては、現在ま

でのところ確証が得られておらず、今後も検討を続けたい。もちろんそれ以外の可能性も念頭に置いて実験を進める必要がある。

E. 結論

Sal11 が腎臓前駆細胞の増殖に、Sal14 が ES 細胞の増殖に、必須である可能性が浮上し、腎臓と ES 細胞に Sal1 を中心とした共通の分子機構があることが示唆された。Sal14 の ES 細胞における分子機構を解明し、それを腎臓に応用することによって、Sal11 の腎臓における機構を解明していきたい。本研究全体の目標である ES 細胞からの腎臓前駆細胞誘導法の開発に対しては、今後 Sal1 ファミリーの遺伝子発現の制御に取り組みたい。これを明らかにすれば、ES 細胞をどのように処理すれば Sal11 陽性の腎臓前駆細胞を誘導できるかのヒントになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
投稿中 1件
2. 学会発表
なし (2006年6月発表予定)
3. その他
 1. 小宮千佳、小林千余子、西中村隆一
「Sal11 タンパク」 タンパク・遺伝子からみた分子病 生体の科学 (医学書院) 56(5):544-545, 2005
 2. 小林 千余子、西中村 隆一 「腎臓形成のメカニズムと再生への挑戦」

再生医療のための発生生物学（浅島誠
編著）（コロナ社）204-233, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図4. Sall1 KOのコロニー

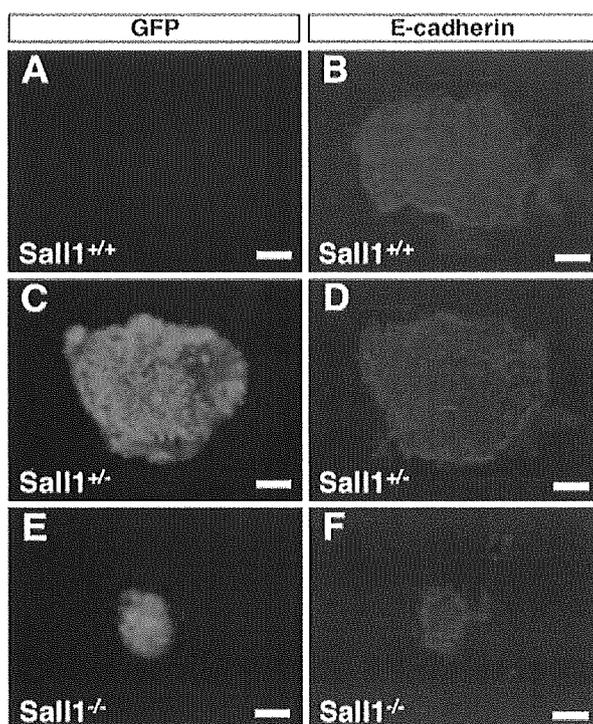


図5. Sall4 KO の増殖低下

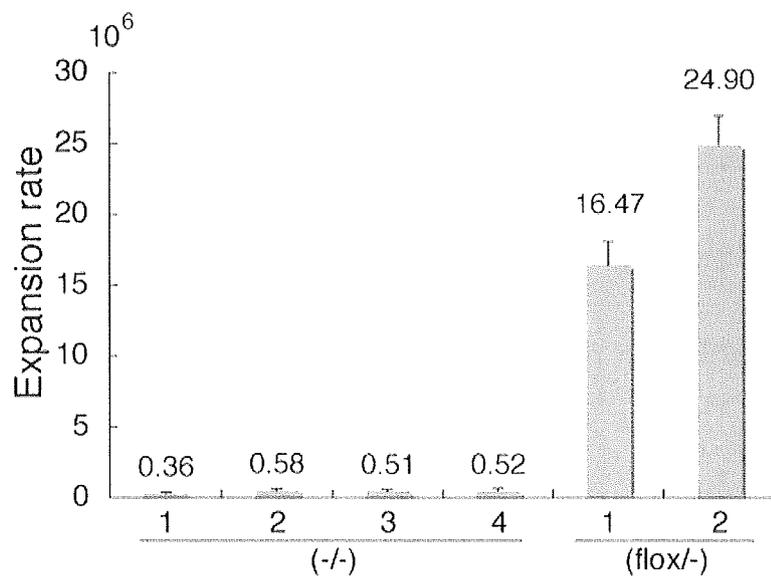
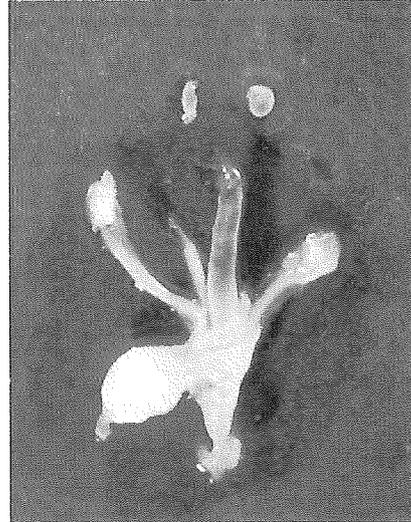
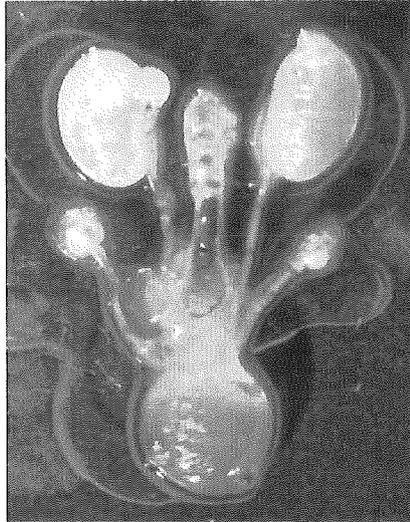


図6. Sall1/4 ダブルヘテロの 腎臓欠損

WT, Sall1 hetero, Sall4 hetero
Sall1/2, Sall2/3, Sall1/3, Sall2/4 het

Sall1/4 hetero



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小林 千余子、 西中村 隆一	腎臓形成のメカニズムと再生への挑戦	浅島 誠	再生医療のための発生生物学	コロナ社	東京	2006	204-233

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishinakamura R, Takasato M	Essential roles of <i>Sall1</i> in kidney development.	Kidney International	68 (5)	1948-1950	2005
Osafune K, Takasato M, Kispert A, Asashima M, and Nishinakamura R	Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay	Development	133 (1)	151-161	2006
Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H	Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells	Biochemical and Biophysical Research Communications	343 (1)	159-166	2006
山下和成、西中村隆一	腎臓発生—その分子機構	発生システムのダイナミクス 蛋白質核酸酵素	50 (6)	644-649	2005
稲永敏明、西中村隆一	個体発生・形態形成における Wnt シグナル	サイトカインの多彩な機能と臨床応用	23 (20)	149-156	2005
山田斎毅、西中村隆一	腎臓発生を制御する分子機構	腎と透析	59 (3)	527-531	2005
小宮千佳、小林千余子、 西中村隆一	<i>Sall1</i> タンパク	タンパク・遺伝子からみた分子病 生体の科学	56 (5)	544-545	2005
由利俊祐、西中村隆一	腎臓の初期発生	分子腎臓病学	64 (2)	33-37	2006
山田斎毅、長船 健二、 西中村隆一	腎臓発生を制御する分子機構	腎臓	28 (3)	157-162	2006

Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay

Kenji Osafune^{1,2,3}, Minoru Takasato^{2,4}, Andreas Kispert⁵, Makoto Asashima^{2,3} and Ryuichi Nishinakamura^{1,4,6,*}

Renal stem or progenitor cells with a multilineage differentiation potential remain to be isolated, and the differentiation mechanism of these cell types in kidney development or regeneration processes is unknown. In an attempt to resolve this issue, we set up an in vitro culture system using NIH3T3 cells stably expressing *Wnt4* (3T3Wnt4) as a feeder layer, in which a single renal progenitor in the metanephric mesenchyme forms colonies consisting of several types of epithelial cells that exist in glomeruli and renal tubules. We found that only cells strongly expressing *Sall1* (*Sall1*-GFP^{high} cells), a zinc-finger nuclear factor essential for kidney development, form colonies, and that they reconstitute a three-dimensional kidney structure in an organ culture setting. We also found that Rac- and JNK-dependent planar cell polarity (PCP) pathways downstream of *Wnt4* positively regulate the colony size, and that the JNK pathway is also involved in mesenchymal-to-epithelial transformation of colony-forming progenitors. Thus our colony-forming assay, which identifies multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney, can be used for examining mechanisms of renal progenitor differentiation.

KEY WORDS: Progenitor, Kidney, Colony-forming assay, *Sall1*, *Wnt*, PCP, JNK, Rho, Mouse

INTRODUCTION

Mammalian adult kidney, metanephros, is formed by reciprocally inductive interaction between two precursor tissues derived from the intermediate mesoderm, the metanephric mesenchyme and the ureteric bud. The ureteric bud induces the metanephric mesenchyme to differentiate into the epithelia of glomeruli and renal tubules, endothelial and stromal cells (Saxen, 1987). Inductive signals have been vigorously investigated, and several factors have been elucidated that trigger epithelialization of metanephric mesenchyme in explant culture system; the members of *Wnt* family (Herzlinger et al., 1994; Kispert et al., 1998), leukemia inhibitory factor (LIF) (Barasch et al., 1999; Plisov et al., 2001), and transforming growth factor β 2 (TGF β 2) (Plisov et al., 2001). These studies have also suggested the presence of clonal cells in mesenchymal rudiments, which sequentially form renal condensation, comma (C)- and S-shaped bodies, and terminally epithelia of glomeruli and renal tubules, and the existence of single epithelial precursors responding to LIF was demonstrated in mesenchyme (Barasch et al., 1999). One previous report suggested retrospectively the presence of multipotent cells in embryonic kidneys, demonstrating that cells in several portions of nephron were derived from a single stem cell using *lacZ* gene transduction with retrovirus into a single cell of mesenchyme (Herzlinger et al., 1992). However, none has isolated prospectively the renal progenitor cells with a multilineage differentiation potential from the embryonic kidney, and none has examined their differentiation mechanisms in a single cell culture. There has been a lack of assay systems that specifically identify renal progenitors, as in cases of

the neurosphere method for neural stem cells (Reynolds et al., 1992) and the colony assay for hematopoietic progenitors (Pluznik and Sachs, 1965; Bradley and Metcalf, 1966).

We previously generated mice in which the green fluorescence protein gene (*GFP*) was knocked into the locus of *Sall1* (*Sall1*-*GFP* mice), a zinc finger nuclear factor that is expressed in the metanephric mesenchyme and that is essential for kidney development (Nishinakamura et al., 2001; Takasato et al., 2004). *Sall1* is also expressed in the subventricular zone of the central nervous system and progress zones of limb buds, where neural and mesenchymal stem cells reside, respectively, leading to speculation that *Sall1* might have some association with stem cells in several organs, including the kidney.

Targeted disruption of *Wnt4* results in kidney agenesis and impairs mesenchymal-to-epithelial transformation (Stark et al., 1994), and co-culture with 3T3Wnt4 induces tubulogenesis in the mesenchyme rudiment in organ culture (Kispert et al., 1998), suggesting both essential and sufficient roles of *Wnt4* for epithelial differentiation of metanephric mesenchyme. Recently, *Wnt9b* expressed in the ureteric bud was shown to function upstream of *Wnt4* (Carroll et al., 2005). Thus, we attempted to set up assay systems that can identify and characterize the progenitor cells with multipotent differentiation potential from uninduced metanephric mesenchyme using *Wnt4* signal. *Wnt* genes are known to regulate multiple cellular functions using at least three intracellular signaling branches: the β -catenin pathway (canonical pathway), in which stabilized β -catenin interacts with members of the lymphoid enhancer factor/T cell factor (LEF/TCF) family of transcription factors and activates gene expression in the nucleus (Wodarz and Nusse, 1998; Miller et al., 1999); the planar cell polarity (PCP) pathway, which involves Jun N-terminal kinase (JNK) and the Rho family of small guanosine triphosphatases (GTPases) and which directs cytoskeletal rearrangements, coordinated polarization within the plane of epithelial sheets, and morphogenetic movements during development (Veeman et al., 2003; Wallingford et al., 2002); and the *Wnt*/ Ca^{2+} pathway, which leads to release of intracellular calcium and is implicated in *Xenopus* ventralization and in the

¹Division of Stem Cell Regulation, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan. ²Department of Life Sciences (Biology), Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan.

³ICORP, JST, Saitama 332-0012, Japan. ⁴Division of Integrative Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan. ⁵Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover, 30625 Hannover, Germany. ⁶PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan.

*Author for correspondence (e-mail: ryuichi@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp)

regulation of embryonic cell movements (Miller et al., 1999; Veeman et al., 2003; Wallingford et al., 2002). Mechanisms by which Wnt pathways mediate cellular effects in kidney development are poorly understood.

In this study, we established a novel colony-forming assay system using 3T3-expressing Wnt4 to identify renal progenitors in the metanephric mesenchyme. Combining our colony-forming assay with flow cytometry, we found that these progenitors could be enriched by using *Sall1* as a marker. We also examined the effects of Wnt downstream branches on the renal progenitors.

MATERIALS AND METHODS

In vitro colony-forming assay

Metanephric mesenchyme of embryonic day (E) 11.5 mice was isolated surgically from embryonic kidney rudiment. The mesenchyme was incubated in 0.05% trypsin-EDTA at 37°C for 10 minutes and then transferred to DMEM with 10% fetal calf serum. Mesenchymal cells were then mechanically dissociated by gentle aspiration through repeated pipetting. Metanephros of E14.5 and 17.5 embryos was incubated in 1 mg/ml Dispase (Invitrogen) at 37°C for 30 minutes then mechanically dissociated by repeated pipetting. NIH3T3 cells stably expressing Wnt3a, Wnt4 and *lacZ* (Kispert et al., 1998) were mitotically inactivated with mitomycin C before use. Single mesenchymal cells were sorted by FACS Vantage (Becton Dickinson) and plated onto these feeder cells at a low density (5×10^3 cells/well of 6-well plates), then cultured in DMEM/F12 with 5% knockout serum replacement (Invitrogen), 10 µg/ml insulin, 6.7 µg/ml sodium selenite, 5.5 µg/ml transferrin, 1×10^{-7} mol/l dexamethasone, 10 mmol/l nicotinamide, 2 mmol/l L-glutamine, 50 µmol/l β-mercaptoethanol, 5 mmol/l HEPES and penicillin/streptomycin.

RT-PCR

Primers used for PCR were as follows:

Pax2, 5'-AGGGCATCTGCGATAATGAC-3' and 5'-CTCGCGTTCTCTCTCAC-3';
Lim1 (*Lhx1* – Mouse Genome Informatics), 5'-TGGACCGTTTCTCTTGAAC-3' and 5'-TGTTCTCTTTGGCGACACTG-3';
Eyal, 5'-CGGTFCGACCTCTATGGAAATGCAGGATCTAAC-3' and 5'-AACTTCGGTGCCATTGGGAGTC-3';
Sall1, 5'-TCTCCAGTGTGAGTTCTCTCG-3' and 5'-GTACAGTTCCTCTCAGGAC-3';
Wt1, 5'-ACCCAGGCTGCAATAAGAGA-3' and 5'-GCTGAAGG-GCTTTTCACTTG-3';
Hoxa11, 5'-GGATTTTGATGAGCGTGGTC-3' and 5'-GAGTAGCAGTGGGCCAGATT-3';
 glial cell line derived neurotrophic factor (*Gdnf*): 5'-CCCGAAGATTATCTGACCA-3' and 5'-TAGCCAAACCCAAGTCAGT-3';
 integrin α8, 5'-GGCGAAAGTGCAGTCTTAAA-3' and 5'-GAAGGAGACATTCGGAGTGG-3';
 integrin α3, 5'-CGGCTGTCAATATCCT-3' and 5'-CGAA-CATGTCCATCAGCAG-3';
 neural cell adhesion molecule (*Ncam*), 5'-ACGTCCGGTTCA-TAGTCCTG-3' and 5'-CTATGGTTCCCCATCCTTT-3';
 E-cadherin (cadherin 1 – Mouse Genome Informatics), 5'-GCACTCTTCTCCTGGTCTG-3' and 5'-GTTGACCGTCCCTTACAGT-3';
 K-cadherin (cadherin 6 – Mouse Genome Informatics), 5'-CTAGTGGCTTCCCAGCAAAG-3' and 5'-CGTACTTGGACCACAAATG-3';
Ret, 5'-GCGTCAGGGAGATGGTAAAG-3' and 5'-CATCAGGG-AAACAGTTGCAG-3';
Hoxb7, 5'-TTCCCCGAACAAACTTCTTG-3' and 5'-CGGAGAGG-TTCTGCTCAAAG-3';
 α-actinin-4, 5'-TGGTGCAACTCTCATCTTCG-3' and 5'-CCGCA-GCTTGTACATACTCAA-3';
 CD2-associating protein (CD2-AP), 5'-AGGAATTCAGCCACAT-CCAC-3' and 5'-CCTGAGCGTTGTGAGTTTCA-3';

P-cadherin (cadherin 3 – Mouse Genome Informatics), 5'-CAC-ACGACCTCATGTTACC-3' and 5'-GAAATGGTCCCCATCATCAC-3';
 podoplanin, 5'-TCTACTGGCAAGGCACCTCT-3' and 5'-GCTCTT-TAGGGCGAGACCTT-3';
 podocalyxin-like, 5'-ACTACATTGCCCGTCTCCAC-3' and 5'-AAA-TCCTCAGCTGGCTTGA-3';
 aquaporin 1 (*Aqp1*), 5'-CCTCCAGGCACAGTCTTCTC-3' and 5'-CAGTGGCCTCTGACTCTTC-3';
 chloride channel 5 (*Clcn5*), 5'-TGGGCTCTTCTGTTTGTCTT-3' and 5'-GCGAAGAAAGACGCCATAG-3';
 cubilin (intrinsic factor cobalamin receptor), 5'-CAACCTT-GCCCGTGTCTAT-3' and 5'-GTCTGAGTCATCGCTGTGGA-3';
 megalin (low density lipoprotein receptor-related protein 2 – Mouse Genome Informatics), 5'-CAGGGACTCCTCTGACGAAG-3' and 5'-CCTCTCCTTCTGGACAGTTCG-3';
 sodium glucose transporter 1 (*Sglt1*; *Slc5a1* – Mouse Genome Informatics), 5'-GCCATCATCTCTCGTCAT-3' and 5'-ACCACTG-TCCTCCACAAAGG-3';
Brn1 (*Pou3f3* – Mouse Genome Informatics), 5'-TCTATGGCA-ACGTGTTCTCG-3' and 5'-CGTCATGCGTTTTCCTTTT-3';
 Na-K-2Cl co-transporter 2 (*Nkcc2*; *Slc12a1* – Mouse Genome Informatics), 5'-CATGGCATTCAITCTCATCG-3' and 5'-GCAGAGG-CCACTAITCTTCG-3';
Clck2 (*Clcnkb* – Mouse Genome Informatics), 5'-CCTCTCA-CTTCTCCGTCTGG-3' and 5'-AAGAAAGTCCGCTGGCTGTA-3';
 polycystin 2, 5'-GGTGGTGGCAAACCTGAACAT-3' and 5'-TCTC-CAGCTTGACAATCACG-3';
 renal outer medulla K channel 2 (*Romk2*), 5'-TGGTCTCCAAA-GATGGAAGG-3' and 5'-ATGGCACCACACATGAAAGA3';
 epithelial Na channel (*ENaC*; *Scnm1g* – Mouse Genome Informatics), 5'-GCCTCACTGCTTTCAAGGAC-3' and 5'-CCAAGTGGGATACT-GGGCTA-3';
 Na/Ca exchanger, 5'-TGTGTTTACGTGGTCCCTGA-3' and 5'-TGG-AAGCTGGTCTGTCTCCT-3';
 polycystin 1, 5'-CTCTGTGCCCTCTGAGTCC-3' and 5'-TGGATCC-ATTCTTCAAAGC-3';
Foxd1, 5'-CTGGTGAAGCCTCCCTACTC-3' and 5'-GCCGTTGTC-GAACATGTCTG-3'; *Fkl1* (*Kdr* – Mouse Genome Informatics), 5'-CGATGGAAGAGGATTCTGGA-3' and 5'-CAAGGACCATCCCAC-TGTCT-3';
 VE-cadherin (cadherin 5 – Mouse Genome Informatics), 5'-ACCGATGACCAAGTACAGC-3' and 5'-TTCTGGTTTTCTGGC-AGCTT-3';
Cd45 (*Ptprc* – Mouse Genome Informatics), 5'-CCACCAGGGACT-GACAAGTT-3' and 5'-TAGGCTTAGGCGTTTCTGGA-3'; and
 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), 5'-TGATGA-CATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' and 5'-TCCTTGGAGGCCATGTA-GGCCAT-3'.
 PCR cycles were as follows: *Gapdh*, initial denaturation at 94°C for 2.5 minutes, followed by 22 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and final extension at 72°C for 10 minutes; other genes, initial denaturation at 94°C for 2.5 minutes, followed by 28-33 cycles of 94°C for 30 seconds, 58°C for 1 minute, 72°C for 30 seconds, and final extension at 72°C for 10 minutes.

Organ culture

In order to examine the in vitro differentiating potential of cell populations included in the metanephric mesenchyme, each cell population was separated by flow cytometry and was pelleted down by low-speed centrifugation (380 g). The resultant cell pellet (1×10^4 cells per pellet) was cultured on 3T3Wnt4 cells at air-fluid interface on a polycarbonate filter (0.4 µm, Nucleopore) supplied with DMEM plus 10% fetal calf serum at 37°C, 5% carbon dioxide. 3T3Wnt4 cells (50,000 cells in 50 µl medium) were seeded on the filter 24 hours before the experiments, as described (Kispert et al., 1998). To examine the influence of reagents on tubulogenesis, two metanephroi or mesenchyme rudiments from E11.5 embryos were cultured on a polycarbonate filter. For the culture of mesenchyme rudiments, 3T3Wnt4 cells were used as described above.

Retroviral infection

The cDNA clones of the active mutant form of β -catenin (*pUC-EF-1 α - β -catenin^{SA-3HA}*) (Miyagishi et al., 2000), the full length of rat axin (*pBSK5-rAxin*) (Ikeda et al., 1998), and both constitutively-active and dominant-negative mutant forms of human *Rac1* and *RhoA* with N-terminus flag tag [*pCAGIP-flag-Rac1 (Val)*, *pCAGIP-flag-Rac1 (Asn)*, *pCAGIP-flag-RhoA (Val)*, *pCAGIP-flag-RhoA (Asn)*] were subcloned into retroviral vector *pMY-IRE5-EGFP* (Kitamura et al., 2003). To produce recombinant retrovirus, these plasmid vectors were transfected into the virus packaging cell line PLAT-E (Morita et al., 2000) using FuGENE (Roche), and supernatant from the transfected cells was collected to infect cells of the metanephric mesenchyme. The viral supernatant was centrifuged at 20,000 g overnight at 4°C to concentrate the virus. To infect mesenchymal cells with the retrovirus, dissociated mesenchymal cells were resuspended into the concentrated virus supernatant with adding polybrene. The suspension was centrifuged 1400 g for 4 hours at room temperature. After washing with PBS, mesenchymal cells were plated onto 3T3 feeder cells.

Immunocytochemistry and lectin staining

The colonies formed on 3T3Wnt4 feeder were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at 4°C. After washing with PBS, PBS containing 2% skimmed milk and 0.1% Triton-X was incubated as a blocking solution for 1 hour at room temperature. The fixed dishes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubating with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. The following antibodies were used: rabbit anti-Pax2 (Babco), rabbit anti-WT1 (Santa Cruz), mouse anti-E-cadherin (Becton Dickinson), rabbit anti-AQP1 (Chemicon), and rabbit anti-phosphorylated JNK1 and 2 (Biosource). Rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) and anti-mouse IgG (Chemicon) were used as secondary antibodies. To examine the expression of a proximal renal tubule-specific marker, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated *Lotus Tetragonobulus* lectin (LTL; Vector Labs) was used. After each step, the cultured cells were washed three times with PBS containing 0.1% Triton-X. For detection of Sall1, mesenchymal cells derived from *Sall1-GFP* heterozygote embryos were cultured on 3T3 feeder and subjected to GFP immunostaining procedure using rabbit anti-GFP (Molecular Probes). Rhodamine-conjugated peanut agglutinin (PNA; Vector Labs) staining was done as described (Gilbert et al., 1994). Organ culture tissues were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 hour at 4°C and incubated in PBS including 0.1% saponin (Sigma) for 1 hour at 37°C, then the same staining procedure was carried out. Staining with rabbit anti-secreted frizzled-related protein 2 (sFRP2; Santa Cruz) and FITC-conjugated *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA; Vector Labs) were also used on sections of paraffin-embedded explants to examine the effect of reagents on tubule formation and branching, respectively.

RESULTS

In vitro colony formation from E11.5 metanephric mesenchyme

We cultured single cells from the metanephric mesenchyme of E11.5 embryos, using 3T3Wnt4 as a feeder layer in a serum-free condition. The metanephric mesenchyme of transgenic mice ubiquitously expressing enhanced green fluorescence protein (EGFP; Okabe et al., 1997) was used to distinguish mesenchyme-derived cells from feeder cells, and single cells sorted by flow cytometry were cultured at a low cell density on 3T3Wnt4. This culture condition resulted in the formation of sheet-like colonies not formed on 3T3lacZ (Fig. 1A, upper panels), while scattered fibroblast-like cells were observed in both conditions (Fig. 1A, lower panels, arrows). Colonies were not formed in the presence of frizzled (Fz)-Fc chimeric protein, a Wnt inhibitor, thus confirming an essential role of Wnt4 for colony formation (Fig. 1B). Colonies were not formed by culturing in the conditioned medium from 3T3Wnt4 without feeder cells (data not shown). Colonies were also formed on 3T3Wnt3a, but not in feeder-free conditions using a purified recombinant Wnt3a protein (data not shown). These data suggested the requirement of other signals from

3T3 cells, in addition to the Wnt signals for the colony formation. In the presence of serum, colonies were not formed even on 3T3Wnt4, and some factors in the serum might prevent colony formation (data not shown). When colonies on 3T3Wnt4 were dissociated and plated onto fresh feeder cells at day 10 of culture, few colonies were obtained, and maintenance of these colonies could not be achieved (data not shown). When we tried colony-formation by using polycarbonate filters, which separate mesenchymal cells from the feeder layer, colonies were formed but the number of colonies formed was much smaller than that formed by directly culturing on feeder cells (data not shown).

To characterize the molecular profiles of the colonies, genes expressed in the metanephric mesenchyme were examined by RT-PCR using RNA from the colonies together with 3T3Wnt4 (Fig. 1C). All the mesenchymal genes examined (*Pax2*, *Lim1*, *Eya1*, *Sall1*, *WT1*, *Hoxa11*, *Gdnf*, integrin α 8, integrin α 3, *Ncam*, E-cadherin and K-cadherin) were expressed, and the expression continued to day 20 (Fig. 1C, lanes 3-5). By contrast, when cultured on 3T3lacZ, the expression of these genes was below the detection level (lanes 7-9). The expression of ureteric bud markers (*Ret* and *Hoxb7*) were not detected in mesenchyme separated from ureteric bud, suggesting that the separation was successful (lane 1). To determine the potential for differentiation within the colonies, markers for terminally differentiated epithelia in glomeruli (podocyte), proximal or distal tubules, and the loop of Henle were also examined (glomeruli: α -actinin-4, *CD2-AP*, P-cadherin, podoplanin and podocalyxin; proximal tubule: *Aqp1*, *Clec5*, cubilin, megalin and *Sglt1*; Henle's loop: *Brn1* and *Nkcc2*; Henle's loop or distal tubule: *Cck2*, polycystin 2, and *Romk2*; distal tubule: *ENaC*, Na/Ca exchanger and polycystin 1. These markers encode: (1) cytoskeletal or structural proteins: α -actinin-4, *CD2-AP*, P-cadherin, podoplanin and podocalyxin; (2) transcription factor: *Brn1*; (3) water or ion channels: *Aqp1*, *Clec5*, *Cck2*, *Romk2*, *ENaC*, and polycystin1 and 2; and (4) transporters: cubilin, megalin, *Sglt1*, *Nkcc2* and Na/Ca exchanger. As shown in Fig. 1C, almost all the genes examined were expressed at day 20 on 3T3Wnt4 (lane 5), while these markers were not expressed on 3T3lacZ (lanes 7-9). To ascertain that these genes were expressed by the colony-forming cells, colonies were formed from GFP transgenic mesenchyme, and cells expressing GFP were separated from feeder layers by using flow cytometry sorting. RT-PCR using RNA from these cells suggested that the marker genes examined were indeed expressed by colony-forming cells (lane 10). Furthermore, we made use of immunocytochemistry and found that Pax2 (Fig. 1D-F), E-cadherin (Fig. 1G-I), Sall1 (Fig. 1J,K), and Aqp1 (Fig. 1L,M) were expressed on colonies. The expression of Pax2 and E-cadherin was not detected on immunocytochemistry at day 3, and was subsequently upregulated by day 10, which was consistent with the result of RT-PCR (Fig. 1D,E,G,H). These data suggest that dissociated cells from the metanephric mesenchyme form colonies on 3T3Wnt4 feeder cells in serum-free conditions, and that these colonies contain differentiated epithelia expressing marker genes for epithelia in glomeruli (podocyte), proximal or distal tubules, and the loop of Henle.

Colonies are derived from a single multipotent renal progenitor

To confirm that these colonies were derived from a single cell, each single cell sorted from the EGFP transgenic mesenchyme was cultured in an individual well of 96-well plates coated with 3T3Wnt4. The sheet-like colony was found in 166 wells out of a total of 1632 (10.2%) from three independent experiments (Fig. 2A).