

図1 腎臓発生の形態的な概略図

- (a) 胎生11.5日のマウス胎生。ウォルフ管は排泄腔に伸び、尿管芽が形成される。
- (b~d) 後腎間葉に侵入した尿管芽は伸長、分岐をする。後腎間葉の細胞は尿管芽周辺にて凝集する。
- (e) 尿管芽はさらなる分岐を続ける。凝集した間葉細胞は上皮化し、コマ形、C字体、S字体の形を次々と形成していく。S字体の上側は尿管、下側は糸球体を形成する。
- (f) 血管前駆細胞が入り込み、腎小体を形成していく。遠位尿管は集合管(尿管芽由来)とつながる。
- (g) 成熟した腎臓の構造。腎小体、尿管、集合管を合わせてネフロンとよぶ。

II. 分子と遺伝子から理解する腎臓発生のメカニズム

1. 尿管芽の形成と間葉への侵入

先に述べたとおり、尿管芽はウォルフ管から出芽して後腎間葉に侵入するのであるが、どのようなメカニズムをもって“正しい一点の場所”から“正しく1本のみの尿管芽”が出芽しているのかは、以前より腎臓発生学の一つの大きなテーマであった。ヒトでも、尿管芽が複数出芽するという症例(CAKUT)が存在している。尿管芽の分岐、伸長をつかさどる重要な分子として、TGF- β (transforming growth factor- β ; トランスフォーミング増殖因子 β)の一種である、GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) とその受容体c-Ret、共受容体であるGDNFR α (GDNF receptor- α)によるシグナル伝達系がある。c-Ret/GDNFR α は尿管芽に発現しており、間葉から分泌されるGDNFはc-Ret/GDNFR α を介して尿管芽の上皮細胞にシグナルを伝えている。GDNF、c-Ret、GDNFR α それぞれのノックアウトマウス(KOマウス)では尿管芽が形成されないことから、GDNFのシグナルが尿管芽の形成に必須であることがわかる。また、GDNFはその後の尿管芽の伸長にも重要であり、*in vitro*の培養系でもこのことが示されている。この時期に発現している遺伝子のKOマウスの解析により、このGDNF系を正に制御する因子、負に制御する因子がわかってきた。Pax2 (paired box gene 2)、Six1 (sine oculis-related homeobox homolog 1)といった転写因子は後腎間葉に発現し、GDNFのプロモーターに直接結合してその転写を促進している。同じく後腎間葉に発現するEya1 (eyes absent homolog 1)もSix1と転写複合体を形成し、GDNFを発現させている¹⁾。また、最近では、TGF- β ファミリーの一種であるGdf11 (growth/differentiation factor 11)のKOマウスで後腎

- *1 ちなみに、魚類、両生類の腎臓は中腎である。爬虫類、鳥類、哺乳類は後腎である。
- *2 腎小体は血液からの老廃物を濾過している。糸だまのように折りたたまった毛細血管を上皮組織が包んだような形状をしており、前者を糸球体、後者をボーマン嚢という。この毛細血管は内側から内皮細胞、基底膜、糸球体上皮細胞という3層構造になっており、血液はこの障壁で濾過され、原尿としてボーマン嚢に放出される。
ボーマン嚢からの原尿は尿管のさまざまなイオンチャネルによって再吸収を受ける。特徴的なループ構造をもち、集合管に開口している。
- *3 糸球体上皮細胞は足突起細胞(podocyte)ともよばれている。電子顕微鏡で観察すると、細かく分岐した“タコ足”のような突起がスリットをつくっていることがわかる。これが濾過障壁になっている。
- *4 糸球体内の結合組織、メサンギウムを構成し、細胞外基質を分泌している細胞。
- *5 腎小体、尿管、集合管を合わせた腎臓機能の1単位をこうよぶ。

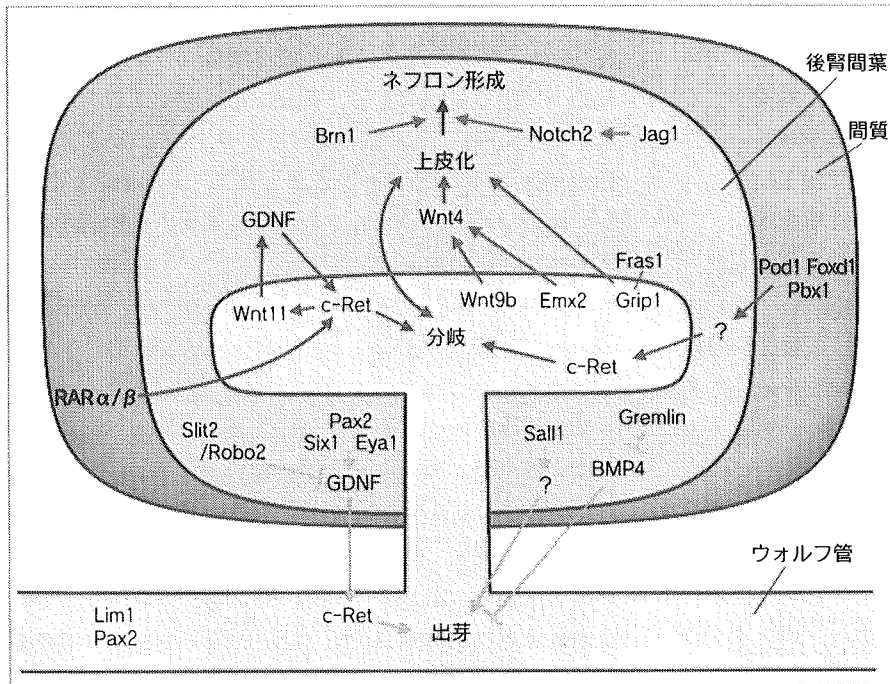


図2 腎臓発生の分子機構

尿管芽の出芽，尿管芽の分岐，後腎間葉の上皮化，ネフロン形成にかかわる遺伝子の関係をそれぞれ示した。間葉，間質，尿管芽がそれぞれ相互作用している。

間葉にGDNFの発現が消失し，尿管芽の出芽に異常がみられるといった報告がある²⁾。Gdf11はウオルフ管と後腎間葉に発現しており，GDNFの発現に何かしらのかたちで寄与していることが示唆される。

GDNFを抑制する因子としては，液性因子Slit2 (Slit homolog 2)とその受容体Robo2 (roundabout homolog 2)がある。Slit2またはRobo2のKOマウスでは尿管芽が多数形成される。GDNFの発現をみると発現域が広範囲になっており，このことから，Slit2/Robo2はGDNFの発現する領域を制限していることがわかる。しかし，このKOマウスにおいて，Eya1やPax2の発現は上昇していないため，前述のものとは違った機構でGDNFを制御していることが明らかとなった³⁾。今後も未知のGDNF制御機構が次々と明らかになっていくかもしれない。

GDNFに関与しないで尿管芽の形成，伸長を制御する因子もある。BMP-4 (bone morphogenetic protein 4；骨形成因子4)のKOマウスでは重複尿管や発芽位置の異常が起こる。つまり，BMP4は尿管芽の発芽，伸長を抑制している。最近の報告では，BMPのアンタゴニストであるGremlinのKOマウスでは，尿管芽の形成は起こるが後腎間葉に侵入できないことが示された⁴⁾。また，ジンクフィンガー蛋白質Sall1 (Sal like 1)は後腎間葉で発現しており，そのKOマウスでは尿管芽の発芽が

起こらない。しかし，GDNFの発現は失われておらず，また別の機構で尿管芽を制御しているようである⁵⁾。GDNF系を介さない新たな尿管芽制御機構についても今後の解析を期待したい。

2. 尿管芽の分岐と間質のはたらき

尿管芽は後腎間葉に侵入したのち，分岐を始める。ここでも依然としてGDNFによるシグナルは重要であるが，そのほかにも多くの因子が尿管芽の分岐を制御しているようである。Wnt11はWntファミリーの一種である。Wntは分泌型蛋白質であり，そのレセプターであるFrizzledを介してさまざまなシグナルを伝達する。このWnt11のKOマウスは尿管芽の形態異常と分岐減少によって，結果として腎臓の発育不全を起こす⁶⁾。Wnt11のKOマウスではGDNFの発現が低下しているが，逆に，c-RetのKOマウスでもWnt11の発現が減少していることが観察されている。ここには，後腎間葉はWnt11のシグナルによりGDNFを分泌し，尿管芽はc-Retを介してそのシグナルを受け，Wnt11を発現させるというポジティブフィードバック機構がみとれる。このように，Wnt11はGDNFのシグナル系にかかわって尿管芽の分岐を制御している。

WntやFGF (fibroblast growth factor；線維芽細胞増殖因子)にかかわる蛋白質もまた，尿管芽分岐にかかわ

っている。細胞表面に発現するHSPG(ヘパラン硫酸プロテオグリカン)やCSPG(コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)の糖鎖には、FGFやWntといった増殖因子が結合し、シグナル伝達にさまざまな影響を与えていると考えられている。HSPGであるGlypican3のKOマウスでは尿管芽の増殖能が上がって、過剰な分岐を起してしまう。また、増殖因子と結合する性質をもつためにヘパラン硫酸鎖が必須となる、Hs2st (heparan sulphate 2-O-sulphotransferase)のKOマウスでは尿管芽が分岐せず、後腎間葉の凝集も阻害される。またWnt11の発現も尿管芽の先端から消え、同時にc-Ret, GDNFの発現も減少する。この知見は先述の機構と整合性があり、HSPGとそれに結合する増殖因子との関係は重要であるということを示している。

間質に発現する遺伝子が間接的に尿管芽分岐を制御しているという例もある。後腎間葉などではレチノイン酸が産生されているが、その受容体RAR α /RAR β は間質に共発現しており、このRARの活性化が何らかのシグナルを介して尿管芽でのc-Retの発現を正に促進している。また、Pod-1 (tcf21), Foxd1 (Bf-2), Pbx1 (TALE homeodomain transcription factor)といった転写因子も間質に発現しており、尿管芽でのc-Retの発現に影響をしているという報告もある。以上のようなさまざまな因子が、直接あるいは間接的に尿管芽を制御していることがうかがわれる。

3. 間葉の増殖・上皮化

尿管芽が分岐を進めるとともに、後腎間葉の細胞は尿管芽に誘導されて増殖と分化を進める。まず、尿管芽に集まって凝集塊をつくる。次にコンマ形、C字体、S字体をつくっていくが、これは管状の上皮組織であり、この過程での上皮化は必須の事項であるといえる。この上皮化における重要分子は、Wnt4である。Wnt4のKOマウスでは間葉が凝集するところで発生が止まり、それ以降の上皮構造をつくらない。このように、後腎間葉でのWnt4の発現は上皮化の開始に必須であるといえる。このWnt4の発現を制御し、上皮化をコントロールしている遺伝子がいくつか報告されている。Emx2 (empty spiracles homolog 2)は発達中の尿管芽で発現しているが、このKOマウスでは尿管芽が発芽して後腎間葉に侵入するが以降の分岐が起こらず、後腎間葉の上皮化も起こらない⁷⁾。このとき、後腎間葉にWnt4が発現してい

ないことからみて、Emx2は尿管芽が後腎間葉を刺激してWnt4の発現を誘導するという機構に何かしらの形で携わっているようである。最近、Wnt9bのKOマウスでWnt4, FGF8, Pax8が発現せず、尿管芽の侵入以降の発生が止まることが報告されており、Wnt4の上流で、かつ尿管芽から分泌されるもっとも初期の液性因子が同定されたことになる。

その他、Wnt以外にも、LIF (leukemia inhibitory factor), FGF2, TGF- β , BMP7, Notchなど、上皮化を制御するいくつかの候補が見つかっている。BMP7は上皮化に抑制的にはたらくているようである。最近の興味深い報告に、Fraser症候群の原因遺伝子*Fras1*とその結合蛋白質Grip1についての報告がある。Fraser症候群では45%の割合で先天性の腎臓欠失がみられる。Fras1は尿管芽の上皮細胞の基底側(間葉側)に発現している細胞外マトリックス蛋白質である。そのKOマウスの尿管芽は後腎間葉に侵入するが、後腎間葉に尿管芽からの誘導がかからず、後腎間葉はアポトーシスを起こす。尿管芽の成長もそこで止まってしまう⁸⁾。Grip1のKOマウスも同様の表現型を示している。Grip1はPDZドメインをもつ蛋白質で、後腎での発現位置はFras1と共局在する。*In vitro*の実験でGrip1はFras1とそのPDZドメインどうしで結合することが示されており、その機能を考えるうえで発現局在、表現型と整合性がある⁹⁾。このように、Fras1/Grip1は尿管芽の後腎間葉と直接接する基底側に発現することによって、間葉細胞の生存、上皮への分化を促進している。

4. 尿細管と糸球体の形成

後腎間葉にできたS字体は下部の一部を除いて尿細管へと分化する。腎小体はS字形のもっとも下部の部分がボーマン嚢、糸球体上皮細胞へと分化することによって形成される。これらの過程において重要な役割をもつ遺伝子を見ていくことにする。

転写因子であるBrn1 (Pou3f3)はヘンレのループと遠位尿細管の一部に発現しており、そのKOマウスは遠位尿細管の形成異常で生後24時間以内に死亡する¹⁰⁾。KOマウスの胎児は尿細管形成の途中(primitive loop stage)で発生が停滞している。細胞の増殖をBrdUの取込みにより調べてみると、この時期に明らかな細胞増殖の減少が観察された。また、Slc12a1, Umodといった尿細管分化マーカーの発現がなくなっていた。よって、Brn1

は尿細管の形態形成に対して何かしらの役割を果たしていることがわかる。

糸球体の形成にはNotchシグナルが重要な役割を果たしている。1回膜貫通型受容体Notchはリガンド(Jagged)の結合により活性化され、その細胞内ドメイン(NICD; Notch intracellular domain)が γ -セクレターゼによって切断される。NICDは核内に移行して標的遺伝子の転写を活性化する。このNotchの一種、Notch2の細胞外ドメインを欠損させたマウスでは、S字体までの発生に異常はないが、これ以降の発育が悪く、結果として糸球体の形成異常、血管内皮とメサンギウム細胞の消失が生じた。また、腎臓の大きさ自体も小さく、糸球体の数も少なくなっている。このように、Notch-2は糸球体形成の諸過程において重要な役割を果たしているようである。また、NICDの切断に必須である細胞膜蛋白質Presenilinを欠如したマウスでは、哺乳類の4種のNotch1~4からのシグナルがすべて阻害されるが、このマウスではコンマ形、S字体のほぼ完全な欠失が生じ、最終的に近位尿細管と糸球体上皮が形成されない。

ゆえに、Notch1, 3, 4に関しても後腎間葉の上皮化、ネフロン形成に対して役割を担っている可能性があるといえる。

糸球体内皮細胞、メサンギウム細胞は血管前駆細胞が分化したものであると思われるが、その前駆細胞は後腎間葉由来なのか、腎臓外部より侵入した血管からの由来であるのか、はっきりとはわかっていない。糸球体の前駆体が形成されると、その糸球体上皮細胞はVEGF(vascular endothelial growth factor; 血管内皮細胞成長因子)を発現、分泌するようになる。近くにある血管前駆細胞はVEGF受容体を介してシグナルを受け、糸球体内皮細胞へと分化を始める。今度は、糸球体内皮細胞がPDGF-B(platelet-deriver growth factor, B polypeptide)を分泌し、その受容体PDGFR- β (PDGF receptor- β)を発現する前駆細胞がメサンギウム細胞に分化するという機構が考えられている。このモデルがどこまで厳密に正しいかはわからないが、VEGFのKOマウスでは糸球体内皮細胞が形成されないし、PDGF-BやPDGFR- β のKOマウスでは血管周皮とメサンギウム細胞が欠如する。

加えて、Notch2のKOマウスではVEGFの発現量が低下しており、これらの間に因果関係がある可能性が高い。糸球体は腎臓のなかでももっとも再生能力の低い組織であるので、この形成機構のさらなる解明により、再生医療が実現することを期待したい。

■おわりに■

以上、腎臓の発生について形態形成とその分子機構をまとめてみたが、ここに挙げきれなかった研究成果はほかにも多数存在する(表1)。腎臓発生研究の今後の課題や方向性について考えてみたい。

今までの研究の流れから、尿管芽の形成・伸長にGDNFが重要な役割を担っていることは間違いないが、Sall1やGremlinのようなGDNFを介さない制御機構の存在も明らかになった。その他の

表1 ノックアウトにより腎臓に表現形を示す遺伝子

遺伝子	発現部位	腎臓における表現形
転写因子		
<i>Brn1</i>	N	尿細管の形成異常
<i>Emx2</i>	UB, MM	後腎間葉における上皮化の阻害、腎臓欠失
<i>Eya1</i>	MM	尿管芽の伸長不良、腎臓欠失
<i>Foxc1</i>	MM	複数の尿管芽出芽、複数の腎臓
<i>Foxd1</i>	S	ネフロンの減少、小さい腎臓
<i>Pax2</i>	UB, MM	尿管芽の伸長不良、腎臓欠失
<i>RARα, RARβ</i>	UB, MM, S	発育不全、腎臓欠失(double knockout)
<i>Sall1</i>	MM	尿管芽の伸長不良、腎臓欠失
<i>Six1</i>	MM	尿管芽の伸長不良、腎臓欠失
<i>WT1</i>	MM	後腎間葉のアポトーシス、腎臓欠失
液性因子		
<i>BMP4</i>	MM	重複尿管、腎臓の異常形成(hetero)
<i>BMP7</i>	UB, MM	ネフロンと集合管の減少、極度の発育不全
<i>FGF7</i>	S	ネフロンの減少、尿管芽の分岐不良、小さい腎臓
<i>Gdf11</i>	UB, MM, N	尿管芽の発芽不良、腎臓欠失
<i>GDNF</i>	MM	尿管芽の伸長不良、腎臓欠失
<i>Slit2</i>	MM	複数の尿管芽出芽、集合管の多重形成
<i>Wnt4</i>	MM	上皮化の不良、管構造形成不可、腎臓欠失
<i>Wnt11</i>	UB	尿管芽の分岐不良、小さい腎臓
受容体・その他		
<i>c-Ret</i>	UB	尿管芽の伸長不良、腎臓欠失
<i>Fras1, Grip1</i>	UB	後腎間葉のアポトーシス、腎臓欠失
<i>Glypican3</i>	UB, MM	尿管芽の分岐過多、集合管の部分的欠失
<i>Integrinα8</i>	MM, S	尿管芽の伸長不良、腎臓欠失
<i>Notch2</i>	N, G	糸球体の形成異常(hypomorphic)

N: 形成過程のネフロン, UB: 尿管芽, MM: 後腎間葉, S: 間質, G: 糸球体

未知の遺伝子，未知の機構を同定，解明していく必要がある。それはその後の尿管芽分岐，間葉の上皮化，ネフロン形成に関しても同様のことがいえる。また，どの分子が何の遺伝子を制御しているのか，すなわち，転写因子→液性因子・細胞外マトリックス→レセプター→細胞内シグナル伝達→転写因子→といったネットワークを時間の経過にそって明らかにしていく必要がある。

また，腎臓原基形成以前に致死の表現型を示す遺伝子も多数存在し，このような遺伝子の腎臓発生での役割については通常のノックアウトマウス的手法では解析できない。よって，腎臓でのみ特異的に遺伝子をノックアウトするコンディショナル・ノックアウトの系が確立されれば，解析の幅はさらに広がる。現在，腎臓特異的なノックアウトの報告が出はじめているが，まだ少ない。今後の成果に期待したい。

しかし，ばく大な数の遺伝子が存在し，時間の経過に沿ってその活動が次々に変化していく生物の発生過程を，どこまで解析しつくしたらゴールといえるのだろうか。一つの答えは，“必要性から十分性への移行”にあるのかもしれない。“ノックアウトすると腎臓がなくなる”よりも，“これを発現させさえすれば腎臓になる”の

ほうが一般の感覚には魅力的であるといえる。ノックアウトマウスでは基本的にはある因子の必要性しか示せないが，たとえば，器官培養への遺伝子導入やノックインマウス手法では，ある因子の発生に対しての十分性が示せるかもしれない。また，ES細胞や体性幹細胞を腎臓の細胞に分化させるという研究もこの型にあたり，再生医療への応用につながる。また，分子生物学以外の理解体系，たとえばシステムバイオロジーなどの参入にも期待したい。

文 献

- 1) Xue, L. *et al.* : *Nature*, **426**, 247-254 (2003)
- 2) Esquela, A. F. *et al.* : *Develop. Biol.*, **257**, 356-370 (2003)
- 3) Grieshammer, U. *et al.* : *Develop. Cell*, **6**, 709-717 (2004)
- 4) Michos, O. *et al.* : *Development*, **131**, 3401-3410 (2004)
- 5) Nishinakamura, R. *et al.* : *Development*, **128**, 3105-3115 (2001)
- 6) Majumdar, A. *et al.* : *Development*, **130**, 3175-3185 (2003)
- 7) Miyamoto, N. *et al.* : *Development*, **124**, 1653-1664 (1997)
- 8) McGregor, L. *et al.* : *Nat. Genet.*, **34**, 203-208 (2003)
- 9) Takamiya, K. *et al.* : *Nat. Genet.*, **36**, 172-177 (2004)
- 10) Nakai, S. *et al.* : *Development*, **130**, 4751-4759 (2003)

4) 発生

3. 個体発生・形態形成における Wnt シグナル

稲永敏明, 西中村隆一

細胞間シグナル分子である Wnt の多彩な機能は多くの研究者をひきつけている。特に個体発生・形態形成への Wnt シグナルの関与は広くて深い。そこで本稿では「個体発生初期」「個体発生後期 (臓器形成)」「幹細胞」に分けてこの領域の最近の知見を概説する。

はじめに

Wnt は細胞間シグナル分子であり、細胞表面の受容体を介して細胞内へシグナルが伝達される。このいわゆる Wnt 経路にはこれまでにさまざまなものが報告されており、その下流 (標的分子およびそれに伴う細胞の変化) も多様である。本稿では特に動物の形態形成における Wnt 経路の役割について概説したい。

Wnt 経路の因子のノックアウトマウスのうち、発生・形態形成に関する表現型を示すものを表にまとめた (表)。もちろんこれがすべてではないが、これを見ると Wnt 経路の因子のノックアウトマウスではさまざまな形態形成異常を示すことがわかる。つまり個体の形態形成において Wnt 経路が果たしている役割は、

今のところくくりにはできない。このため、本稿でもいくつかの新しい知見を例として挙げることで、できるだけ俯瞰視してみたい。

1 Wnt 経路の概要

Wnt 経路については、これまで日本語英語問わずさまざまな総説で語られてきた。その詳細、最新情報は Nusse のホームページ (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>) を参照していただきたい。Wnt は細胞間にあり、これが細胞表面のレセプターである Frizzled や LRP に結合する。この下流がいくつかに分かれており、canonical 経路と呼ばれているのが β -カテニンを介する経路である (図 1)。一方、non canonical 経路と分類されているものは β -カテニン

[キーワード&略語]

Wnt シグナル, 個体発生, 形態形成, 幹細胞

APC : adenomatous polyposis coli

BMP : bone morphogenic protein

Dvl : dishevelled

FGF : fibroblast growth factor

JNK : c-jun N-terminal kinase

Lef : lymphoid enhancer binding factor

LRP : low-density lipoprotein receptor related protein

PCP : planar cell polarity

sFRP : secreted frizzled-related protein

Tcf : T-cell factor

Wnt signals in animal development

Toshiaki Inenaga/Ryuichi Nishinakamura : Division of Integrative Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University (熊本大学発生医学研究センター胚形成部門細胞識別分野)

表 Wntシグナル経路因子のノックアウトマウスとその表現型

Wntシグナル因子名	ノックアウトマウスの表現型
Wnt1	中脳, 小脳形成不全
Wnt3	原腸, 中胚葉, 体節形成不全
Wnt3a	体節, 脊索, 後肢, 脊柱形成不全
Wnt4	腎臓, 脳下垂体, 雌性生殖器形成不全
Wnt5a	前後軸の短縮, 鼻・舌・顎の短縮, 前肢後肢の短縮, 指の形成不全, 生殖器・肺の形成不全
Wnt7a	指や橈骨の形成不全, ミュラー管の異常
Wnt7b	肺の低形成
Wnt11	腎臓の低形成
β -catenin	前後軸の形成異常
Tcf2	内胚葉の欠損
Tcf3	沿軸中胚葉および沿軸中胚葉由来組織の拡張
Tcf4	腸管上皮の幹細胞の欠損
Tcf15	沿軸中胚葉の上皮化の異常 (体節, 軸骨格・骨格筋・末梢神経パターン)の異常
Tcf21	肺と腎臓の低形成
Lef1	歯, 乳腺, 毛髪, 歯状回顆粒細胞の欠損
Frizzled3	背側中枢神経の形成異常
Frizzled4	小脳, 視覚野, 食道の欠損

を介さない経路であり, PCP経路 (Wnt/JNK経路) や Wnt/ Ca^{2+} 経路などがあり, canonical経路と同じように標的遺伝子を発現させること以外に, 細胞内シグナル伝達系を活性化し, 細胞骨格に変化をもたらすなどの現象が知られている。

2 初期段階への関与

1) 体軸決定

表1のノックアウトマウスの表現型を見ると, なかでも体軸形成そのものや体軸方向に沿った器官形成の異常が目立つ。ヒトでは胎齢15日前後に円盤状のエピプラストが, マウスでは胎齢5.5日前後に筒状のエピプラストが形成される。以下マウスの場合 (図2) 胎齢5.5日から6日において, 胎盤側から見てエピプラストの遠位に臓側内胚葉 (DVE) が形成される。DVEは胎齢6日頃エピプラストの前方に移動し, 前方臓側内胚葉 (AVE) となる。一方, エピプラスト

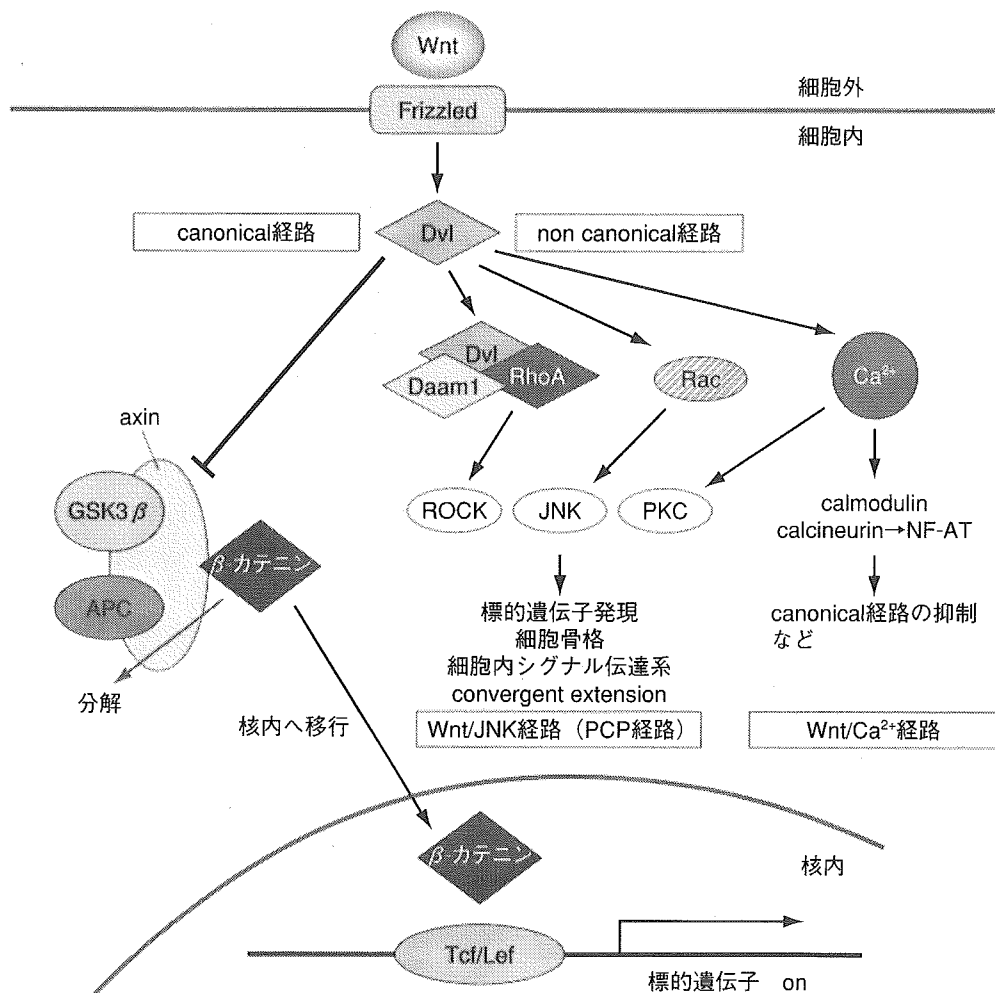


図1 Wnt経路

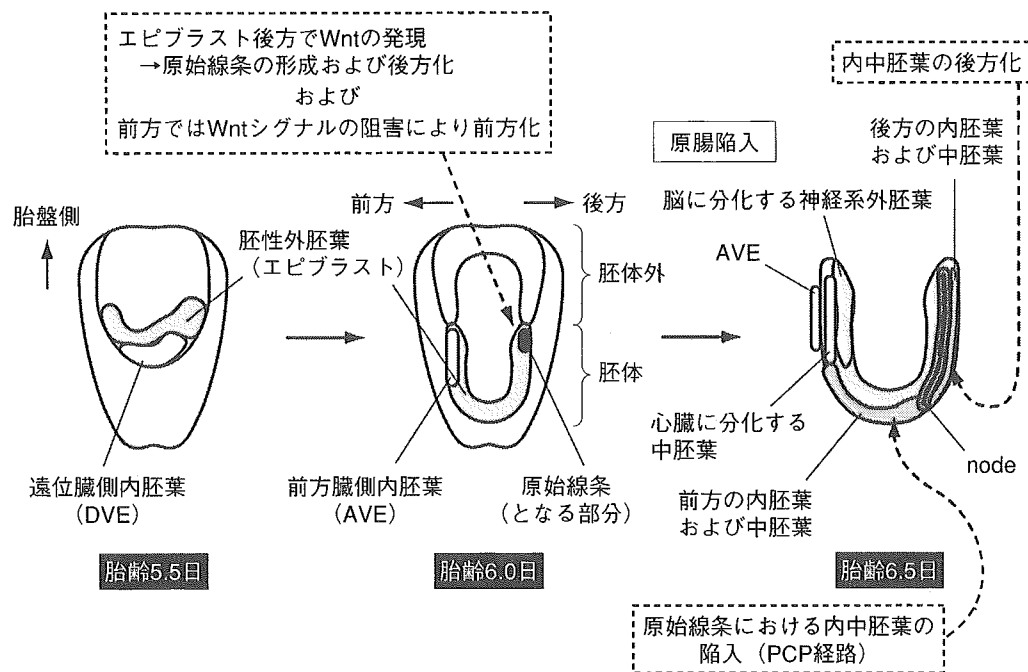


図2 体軸の形成 (マウス)

Wntの関与を破線で示す。遠位臓側内胚葉 (DVE) はNodalやLefty2などの影響を受けて移動するが、その逆側にCryptoが発現して後方が決まり、DVEが移動した方が前方となる。このため厳密に言うとな前後を決定するのにWntの関与はないと考えられるが、その後の胚の前方化および後方化に関与している

では胎齢6.5日前後に、栄養外胚葉など胚外組織との相互作用により後方にprimitive streak (原始線条)の位置が決定され、ここから内胚葉および中胚葉が増殖し内側へ陥入する。これをgastrulation (原腸陥入)という。このとき原始線条の前側にはnode (ノード)と呼ばれる領域が形成され、AVEおよびノードはそれぞれ前方、後方におけるシグナリングセンターとして機能し、前方化および後方化シグナルを発現することでそれぞれでの器官形成を促す。このうち後方化シグナルの実体としてWntシグナルが重要であると考えられる。一方で前方化シグナルにはdickkopf1 (Dkk1)やsFRP-1といったWntシグナルの拮抗因子が含まれており、後方化への拮抗が前方化につながっていると考えられる。Wnt3のノックアウトマウスでは原始線条が形成されず、エピブラストは前後の分化や神経系への分化もなく増殖する。これらはWntシグナルが後方で発現することが前後軸の形成に非常に重要であることを示している¹⁾。またβ-カテニンのノックアウトマウスでは原始線条の形成がみられず、中胚葉の形成が起こらない²⁾。さらに原腸陥入期のマウス胚においてコンディショナルにβ-カテニンをノックアウトしたところ、原腸陥入は行われるものの、ノードの形

成が行われず、このために前後軸や体節の形成異常が起こっている可能性が指摘されている³⁾。

背腹軸の決定はアフリカツメガエルやゼブラフィッシュにおいてcanonical経路の活性化により背側の遺伝子の発現が促進され、背側軸の形成が行われていることが判明している。これを活性化するリガンドは存在せず、卵への精子侵入時のcortical rotationによりWntの下流が活性化されるという説が有力であった。しかし最近アフリカツメガエルにおいて、母親由来のWnt11が胚に対して作用することでcanonical経路を活性化し、背側軸の形成を起こさせていると報告された⁴⁾。この結果はこれまで一般にnon canonical経路の活性化にも作用するという示しており、意外な結果と言える。一方、哺乳類における胚全体の背腹軸決定メカニズムはあまりわかっていないが、Wntシグナルを阻害すると言われているaxinの変異マウスでは2次体軸が形成される。このことはWntシグナルが促している背側軸形成に対してaxinがネガティブに作用していることを示しており⁵⁾、哺乳類の背腹軸決定においてもWntシグナルが関与している可能性がある。

2) 原腸形成

Wntシグナルは体軸の決定だけでなく、原腸陥入が正しく起こり、内胚葉や中胚葉が形成されることにも関与している。原始線条やノード形成への関与以外にも、原腸陥入では中胚葉細胞の極性化および滑り込みという細胞レベルの制御にも必要である。原腸陥入における中胚葉細胞の動きをconvergent extension^{*1}と言ひ、それにはWnt11をリガンドとしたPCP経路の関与があることがアフリカツメガエルやゼブラフィッシュでの研究から明らかになっている。ゼブラフィッシュのWnt11変異胚では沿軸中胚葉細胞のconvergent extensionが低下しており、そのために体軸の異常な延長や単眼症(cyclopia)など頭部の異常がみられる⁶⁾。アフリカツメガエルにおいて、PCP経路の遺伝子発現を乱すことで中胚葉細胞表面のフィブロネクチン線維の形成および滑り込みに異常を呈することが報告されている⁷⁾。哺乳類の原腸陥入では卵生動物ほどダイナミックな細胞運動はみられないが、ヒトの神経管閉鎖不全症のモデルと考えられるloop-tailマウスで、その原因遺伝子として挙げられたVangl2が、ショウジョウバエにおけるPCP経路の因子であるStrabismus/Vangoghのホモログであることが報告された^{8) 9)}。他の神経管閉鎖不全症モデルマウスにおいても原因遺伝子がPCP経路の因子であることがわかっており、これらのことは細胞極性の確立が不完全なため、原腸陥入が正常に起こらず、神経板の管形成が不十分になった結果と考えられる。このようにPCP経路は哺乳類においても同じようなメカニズムで原腸陥入における細胞運動に重要な役割を果たしている可能性があり、またヒトの先天性疾患の原因遺伝子にもなりうることが示されている。ただし哺乳類において原腸陥入時にPCP経路を動かしているリガンドについては未だ報告がなく、今後の研究が待たれる。

3 臓器形成への関与

さらにWnt経路はより後期のさまざまな臓器形成への関与も知られている。ここではその中の一部の臓器について例として挙げてみたい。

1) 神経系

マウスでは原始線条の前方、背側の外胚葉が胎齢7日前後に下にある中胚葉からのシグナルで神経板(neural plate)および神経堤(neural crest)へ分化

し、神経板は脊索や周囲の外胚葉からのシグナルなどにより神経溝(neural groove)を経て胎齢8.5日ごろに神経管(neural tube)へと分化する。その後神経管は中枢神経の各部位へと分化していく。胎齢8.5日ごろ神経管の前方にいくつかのふくらみが生じ、それぞれが脳の各部位へと分化する。このとき中脳と後脳を区切るくびれた部分を峽部というが、ここでWnt1やFGF8が発現し、この部分がオーガナイザーとなって、前方に中脳を、後方に後脳を誘導する。このため、Wnt1のノックアウトマウスでは小脳と中脳の欠損がみられる¹⁰⁾。また神経管の背腹軸方向の分化にもWntシグナルの関与が知られており、腹側の前駆細胞はShhシグナルの影響で腹側の神経に分化し、その一方で背側ではWntおよびBMPによるシグナルが背側の神経の形質発現を促す働きをしているとされる。β-カテニンを終脳でコンディショナルにノックアウトしたマウスでは、腹側の神経系マーカーの発現が背側に拡大しており、また逆に過剰発現したところ、背側マーカーの発現が拡大していた¹¹⁾。さらにWnt1/Wnt3aのダブルノックアウトマウスの脊髄においては腹側の介在神経の分布が背側に拡大しているのがみられた¹²⁾。これらのことから中枢神経の前後、背腹軸方向の分化はcanonical経路の関与が大きいと考えられる(図3)。

また、さらに個々の組織中における細胞レベルの分化に対する関与もある。神経前駆細胞は自身が増殖する一方で、神経細胞もしくはグリア細胞へ分化するが、このとき神経前駆細胞はWntの作用により、canonical経路を介してneurogeninの転写が起こり、神経細胞への分化が促される¹³⁾。また近年Wnt1, Wnt3a, Wnt5aが中脳においてドーパミン作動性神経細胞の分化を促していることが明らかになった¹⁴⁾。

一方、末梢神経系のうち運動神経以外は神経管の背側にある神経堤細胞が主に分化してつくられる(運動神経は神経管の腹側が分化してつくられる)。神経堤細胞には自己複製能をもち、かつさまざまな領域へ遊

※1 convergent extension

日本語では「収斂と伸長」と訳される細胞運動。塊になっている中胚葉細胞がPCP経路の関与により両極性を確立し、互いが滑り込むことにより、中胚葉全体としては前後方向に伸長する。PCP経路は極性の確立に関与するだけでなく、アクチン細胞骨格系の制御を行うことにより、その後の滑り込み運動にも大きく関与していることがわかっている。

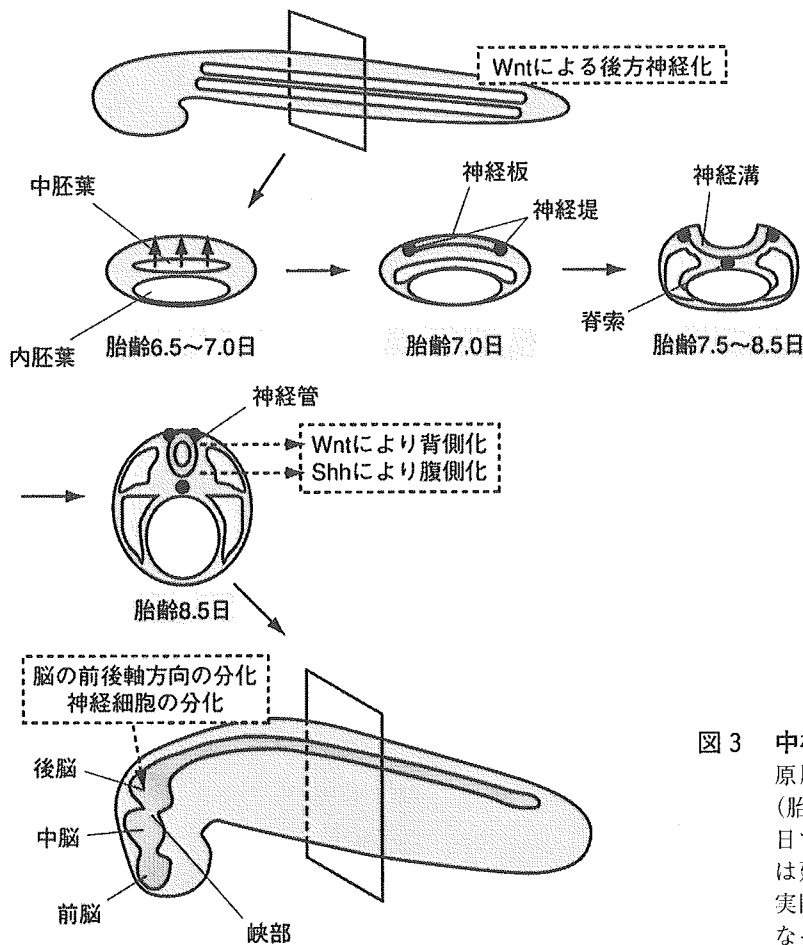


図3 中枢神経の形成 (マウス)

原腸陥入直後. 実際は前後軸は曲がっている (胎齢7.0日ではエビ反りのような姿勢, 胎齢8.5日ではおなかを丸めたような姿勢) が, ここでは延ばして図説する. また胎齢7.0日前後では, 実際は背腹軸方向はもっとつぶれたような形になっている. Wntの関与を破線で示している

走して自律神経, 感覚神経, グリアや平滑筋への分化能をもった幹細胞が存在しており, これを神経堤幹細胞 (neural crest stem cells) とする. 神経堤幹細胞は canonical 経路の作用により感覚神経への分化が誘導される. このとき BMP が存在していると感覚神経への分化は抑制され, 未分化状態が維持される. 逆に BMP だけのときは自律神経への分化が誘導される¹⁵⁾.

2) 心臓

心臓は側板中胚葉の前方から分化する (マウスでは胎齢7.5日から8日頃). この領域に発生し, 心臓に分化する一群の細胞を cardiogenic mesoderm とする. Wnt は cardiogenic mesoderm の心臓への分化に抑制的に働いており, canonical 経路を抑制する Dkk-1 や Crescent により心臓の発生が起こる¹⁶⁾. 一方, アフリカツメガエルに Wnt11 のドミナントネガティブを投与することにより心臓発生が阻害されること, そこに Wnt11 を加えることで心臓発生が回復すること, さらに胚性癌腫 (embryonic carcinoma: EC) 細胞においても Wnt11 が non canonical 経路 (Wnt/JNK 経路)

を介して心臓発生にむしろ促進的に機能しているということが示されており¹⁷⁾, Dkk-1 は canonical 経路を阻害する代わりに JNK 回路を促進していると考えられる. ES 細胞からの心筋細胞誘導に Wnt11 が促進的に働いているという報告もあり¹⁸⁾, 心筋発生にはむしろ JNK 経路の果たす役割が大きいと思われる.

3) 腎臓

腎臓は中間中胚葉より分化する. マウスでは胎齢8日に前腎管が前方の体節の腹側の中間中胚葉に発生し, 周囲の間葉を前腎に分化させる. 前腎はその後退化するが, 前腎管は後方へ伸び (前方は退化する), 中腎管となる. 中腎管とその背側にできる nephrogenic code と呼ばれる間充織が相互作用をすることにより前方から中腎, 後腎が形成される. 哺乳類では最終的に機能する腎臓となるのは後腎であり, 予定後腎領域にある間充織を後腎間葉 (metanephric mesenchyme) とする. 胎齢10.5日ごろ中腎管からは後腎間葉に向けて尿管芽 (ureteric bud) が伸びてきて分岐を繰り返すが, この先端に後腎間葉が凝集し (胎

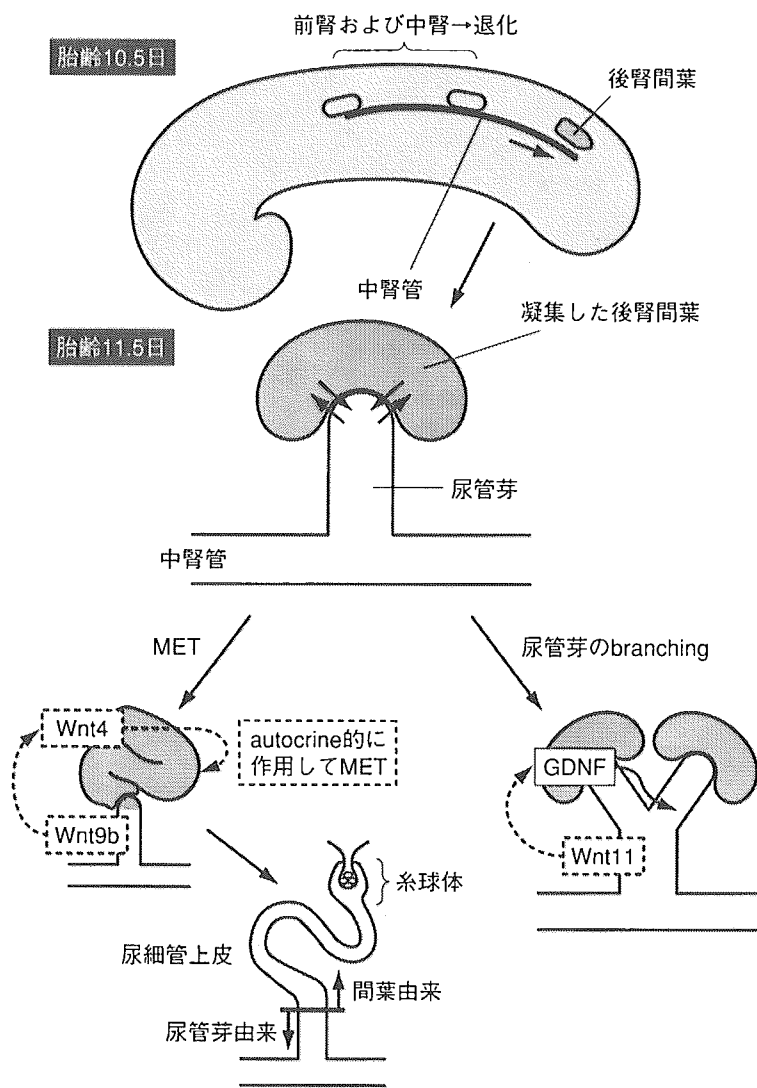


図4 腎臓の形成 (マウス)

後腎間葉が尿管芽の周囲に凝集して相互作用をすることにより、METや尿管芽のさらなるbranchingが起こると考えられる。Wntの関与を破線で示す

齢11.5日)、後腎間葉と尿管芽の相互作用により後腎間葉からは糸球体から遠位尿管までが、尿管芽からは集合管から下流がつくられる(図4)。間葉系細胞の集団である後腎間葉のこのような上皮系細胞への変化をmesenchymal-epithelial transition (MET)と言う。Wnt4は尿管芽からの作用により後腎間葉で発現し、autocrine^{※2}的に作用してMETを起こす因子であると考えられ、Wnt4ノックアウトマウスではMETが起こらない。このWnt4を誘導する尿管芽からのシグナルは長い間謎であったが、最近それがWnt9bで

あるという報告がなされた¹⁹⁾。Wnt9bのノックアウトマウスではWnt4が発現せずMETも起こらない。よって尿管芽からのWnt9bが後腎間葉に働いてWnt4が発現し、それが後腎間葉自身に働いてMETが起きる、という図式が提唱されている。一方、Wnt11ノックアウトマウスは正常よりやや小さい腎臓ができるが、これは尿管芽の分岐が少なくなっているせいでネフロン数が減っていることが報告されている²⁰⁾。尿管芽から分泌されるWnt11が後腎間葉に作用してグリア細胞由来神経因子(GDNF)を分泌させ、これが尿管芽に作用して分岐を起こさせるというメカニズムが抑制されているためと考えられる。

※2 autocrine

細胞間に分泌されたサイトカインなどの細胞間シグナル伝達物質を、分泌した細胞自身が受容して細胞内にシグナルを伝達させ、細胞増殖や分泌促進などの変化が起こること。「細胞」を「組織」と言い換えた場合を指すこともある。

4 幹細胞と癌

近年注目されているのがWntシグナルと幹細胞との関係である。幹細胞はこれまで述べてきたような発

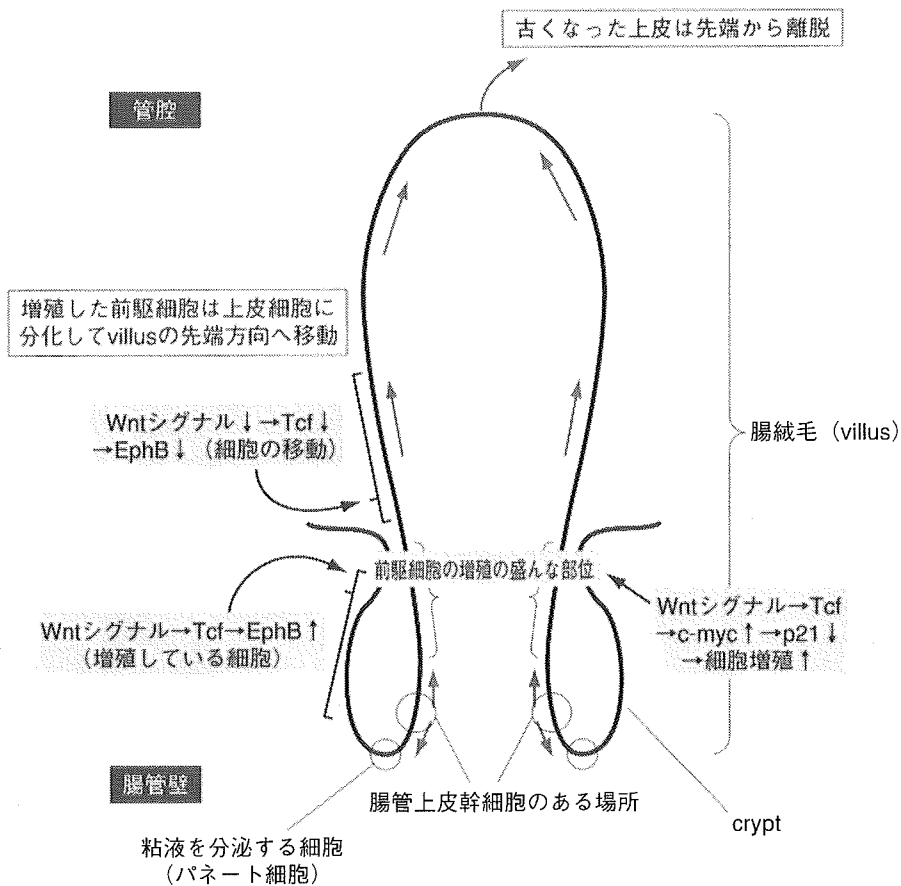


図5 小腸上皮の正常状態における転写因子Tcfの下流因子とその役割

本文中に出てくる2つの標的遺伝子についての図を示す。c-mycは前駆細胞の増殖に、EphB受容体はそのリガンドであるephrinBとともに増殖している前駆細胞および分化した上皮細胞の位置の制御に関与していると考えられる

生および形態形成に欠かすことのできない「材料」の供給源である。幹細胞は「自己複製能」と「多分化能」を一番の特徴とするが、このうち前者の維持にWntシグナルが深く関与している。またいくつかの組織で、このような幹細胞の自己複製能の維持の異常が癌につながっていることがわかっている²¹⁾。このため個体発生、形態形成とは少しずれるが、これらと表裏一体の関係とも言える幹細胞と癌について言及する。

1) 組織幹細胞の維持と発癌

例えば小腸の上皮は幹細胞が腸陰窩 (crypt) と呼ばれる部位に存在し、ここで増殖・分化した上皮細胞が腸絨毛 (villus) の先端方向へ移動する。このようにして新しい上皮がcryptの根元の方から補充される一方で、古くなった上皮はvillusの先端から脱落する(図5)。Tcf4のノックアウトマウスではcrypt中の幹細胞および前駆細胞が丸ごとみられなくなった状態になる²²⁾。Tcfはc-mycのプロモーターに結合し、転写

を促進する²³⁾。さらにc-mycはcell-cycle inhibitorであるp21を低下させ、細胞増殖を促進させると考えられる。一方、EphB受容体はTcfによって転写促進される標的遺伝子であり、そのリガンドであるephrinBとともにcrypt-villusで発現の強弱に勾配をもち、このEphB-ephrinBの系は増殖している前駆細胞をcryptに、分化した細胞をよりvillusの先端方向の位置に、それぞれ配置する役割をしていることがわかっている²⁴⁾。このようにWntシグナルは標的遺伝子を介して、腸管上皮の維持に重要な働きをしていると考えられる。

一方、adenomatous polyposis coli (APC) の遺伝子に変異があるヒトでは結腸ポリープが高率にみられることが知られている。APCはWntシグナルがないときにβ-カテニンの分解に関わっている複合体の一因子である。このAPCの変異が起るとWntがないときでもβ-カテニンの分解が起らないため、β-カ

テニンは核に移行し、細胞周期関連因子などの標的遺伝子の転写を on にする。これが癌化につながっていると考えられる²⁵⁾。最近、結腸癌や直腸癌においてこのような Wnt シグナルの異常があるにもかかわらず EphB の発現が低下していることが報告された。実際に腸管で EphB の発現を低下させたところ、悪性度の高い腺癌の形成をみた²⁶⁾。つまり EphB は増殖を促進しているのではなく、増殖細胞が悪性化して周囲に拡大していくのを制限していると考えられる。これらのことを合わせると、少なくとも組織幹細胞においては正常な Wnt シグナルは自己複製能の「正常な範囲での」維持を、複数の標的遺伝子の発現を介してバランスをとりつつ行っているということが言えそうである。

2) 胚性幹 (ES) 細胞

三胚葉すべてに分化することのできる能力 (pluripotency) をもつ ES 細胞は発生研究、および再生研究に欠かせないツールであり、現在は大きく分けると分化誘導のための研究、および未分化の維持のメカニズムの研究が盛んに行われている。両者における Wnt シグナルの関与も大いに注目されている。レチノイン酸添加により神経系へ誘導したマウス ES 細胞において発現の変動している遺伝子を網羅的に検索したところ、Wnt シグナルのアンタゴニストである sFRP2 が候補として挙げられた。また Wnt1 を加えて培養を行うことで神経系への分化が抑制されたという報告は、Wnt の阻害により神経分化が誘導されることを示している²⁷⁾。

また、マウスとヒトの ES 細胞の未分化が維持される際に Wnt シグナルの活性化を伴うという報告もある²⁸⁾。しかし最近の流れでは未分化の維持には Wnt は十分条件ではなく、おそらく他の因子がより重要なのではないかという意見が強いようである。組織幹細胞と ES 細胞の間でも Wnt の役割は差があるのかもしれない、これからさらなる解析が待たれる。

おわりに

Wnt シグナルは個体発生、形態形成に重要な役割を果たしている。まず初期段階で体軸を規定し、器官をつくる際の位置情報のような役割を担う。しかしその後、それぞれの組織中でさまざまな働きをしていることを考えると、シグナルの受け手側の要因が大きいよ

うに思われる。これからのこの分野の研究では受け手側の細胞、およびそこで変動する標的遺伝子を具体的に組み合わせて理解することがさらに重要になるであろう。そしてそれによって Wnt シグナルの全容がだんだんと明らかになっていくことを期待したい。

文献

- 1) Liu, P. et al. : Nature Genet., 22 : 361-365, 1999
- 2) Huelsken, J. et al. : J. Cell Biol., 148 : 567-578, 2000
- 3) Lickert, H. et al. : Dev. Cell, 3 : 171-181, 2002
- 4) Tao, Q. et al. : Cell, 120 : 857-871, 2005
- 5) Zeng, L. et al. : Cell, 90 : 181-191, 1997
- 6) Heisenberg, C.-P. et al. : Nature, 405 : 76-81, 2000
- 7) Goto, T. et al. : Curr. Biol., 15 : 787-793, 2005
- 8) Kibar, Z. et al. : Nature Genet., 28 : 251-255, 2001
- 9) Montcouquiol, M. et al. : Nature, 423 : 173-177, 2003
- 10) McMahon, A. P. & Bradley, A. : Cell, 62 : 1073-1085, 1990
- 11) Backman, M. et al. : Dev. Biol., 279 : 155-168, 2005
- 12) Muroyama, Y. et al. : Genes & Dev., 16 : 548-553, 2002
- 13) Hirabayashi, Y. et al. : Development, 131 : 2791-2801, 2004
- 14) Castelo-Branco, G. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 12747-12752, 2003
- 15) Kleber, M. et al. : J. Cell Biol., 169 : 309-320, 2005
- 16) Marvin, M. J. et al. : Genes & Dev., 15 : 316-327, 2001
- 17) Pandur, P. et al. : Nature, 418 : 636-641, 2002
- 18) Terami, H. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 325 : 968-975, 2004
- 19) Carroll, T. J. et al. : Dev. Cell, 9 : 283-292, 2005
- 20) Majumdar, A. et al. : Development, 130 : 3175-3185, 2003
- 21) Reya, T. & Clevers, H. : Nature, 434 : 843-850, 2005
- 22) Korinek, V. et al. : Nature Genet., 19 : 379-383, 1998
- 23) He, T.-C. et al. : Science, 281 : 1509-1512, 1998
- 24) Batlle, E. et al. : Cell, 111 : 251-263, 2002
- 25) Bientz, M. & Clevers, H. : Cell, 103 : 311-320, 2000
- 26) Batlle, E. et al. : Nature, 435 : 1126-1130, 2005
- 27) Aubert, J. et al. : Nature Biotech., 20 : 1240-1245, 2002
- 28) Sato, N. et al. : Nature Med., 10 : 55-63, 2004

<筆頭著者プロフィール>

稲永敏明 : 2005年3月東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻博士課程修了。現在は熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野客員研究員として腎臓発生の分子メカニズムの研究を行っている。

腎臓発生を制御する分子機構*

山田斎毅** 西中村隆一**

はじめに

日本では腎不全治療において人工透析が浸透しており、技術の進歩により一応の成功を収めてきた。しかし、腎機能の一部を代替しているにすぎないこと、透析医療費の増加、診療報酬点数削減に伴い安価な材料を選択することによる質の低下の恐れなど、社会的に多くの問題を抱えている。

その中で従来の治療法にかわる新しい治療法として、再生療法が近年注目を浴びている。腎臓再生を実現するためには、腎臓の発生を理解することが不可欠である。そこで、現在までにわかってきた腎臓の発生機構を解説しながら、腎臓という器官の再生の可能性について述べる。

I. 腎発生の概要

哺乳類の腎臓（後腎）の形成はウォルフ管と後腎間葉との相互作用から始まる。ウォルフ管は後腎形成の前に中腎と前腎の形成に寄与しているが、その後体軸に沿って尾側へと伸長していき、途中で尿管芽と呼ばれる枝分かれを形成する。ヒトでは胎生 35 日目、マウスでは 10.5 日目にこの尿管芽が枝分かれし、後腎間葉への侵入を始める（図 1）。尿管芽は後腎間葉を凝集させ尿管芽の周りにキャップ（帽子）状の構造を形成させる。逆に後腎間葉は尿管芽の枝分かれを誘導し、自らは

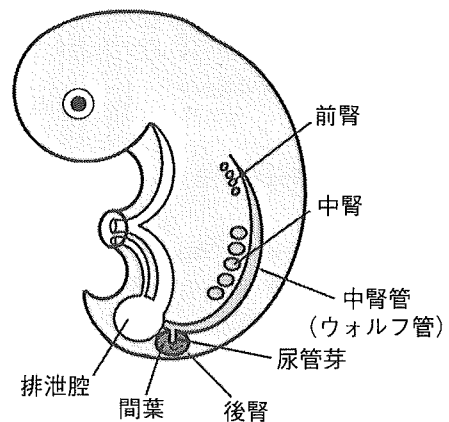


図 1 後腎の発生

マウス胎生期 11.5 日の腎臓発生。尿管芽が後腎間葉に侵入し始める。

キャップの形を変化させながら上皮性の管へと分化を始める。後腎間葉はまずコンマ型の凝集体をつくり、その後 S 字型に変化する。この S 字の下部の一部と中間部は近位尿細管とヘンレのループ、上部は遠位尿細管となり尿管芽と癒合する。尿管芽は集合管へと分化する。そして、S 字の下部は半球状となりこの中央の隙間に毛細血管内皮細胞とメサンギウム細胞が入り込む。S 字の底辺をなす二層の上皮はボーマン嚢および糸球体上皮細胞（足細胞）へと分化し、最終的に成熟した糸球体が形成される（図 2）。これが一つのネフロン（腎機能の最小構成単位）の形成過程である。最終的にヒトでは 50 万～100 万個のネフロンが形成さ

* Molecular mechanisms of kidney development

key words : 後腎間葉, MET, Notch, 三次元構造

** 熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野 YAMADA Seiki, et al
〔〒860-0811 熊本市本荘 2-2-1〕

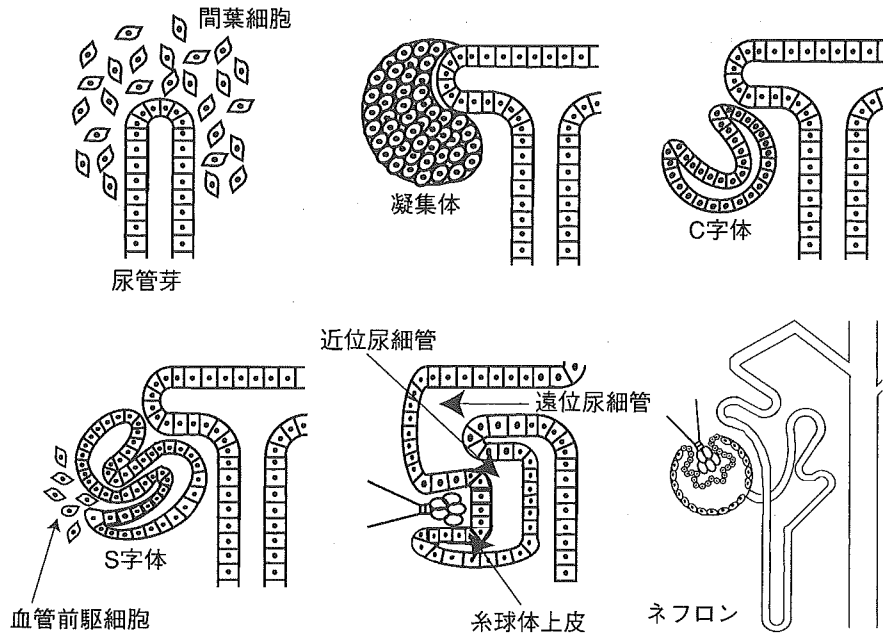


図2 ネフロンの発生

尿管芽が間葉細胞に侵入すると、間葉細胞は尿管芽の周りに凝集体をつくる。凝集体はコマ字体を経てS字体となり、血管前駆細胞を取り込みつつ、遠位で尿管芽と癒合する。S字の部位毎に遠位尿細管、近位尿細管、糸球体上皮へと分化し、血管前駆細胞はメサンギウムと血管内皮へと分化する。

れる。以下では、この腎発生の機構を主に分子に焦点を当てて順に解説する。

II. 腎発生開始シグナル

すでに述べたように、後腎の発生は後腎間葉とウォルフ管から伸びる尿管芽との相互作用で開始される。その開始を尿管芽の発芽以前の時期で、後腎間葉とウォルフ管にそれぞれ発現している遺伝子とその機能を検討する(図3-A)。

GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) は後腎間葉から分泌される TGF- β (transforming growth factor- β) ファミリーに属する液性因子で、ウォルフ管に作用して尿管芽を発芽、伸長させる機能を持つ。尿管芽には GDNF の受容体分子である Ret (ret proto-oncogene) とその共同受容体の Gfra 1 (GDNF family receptor α 1) が発現しており、間葉で分泌された GDNF はこの Ret を介して尿管芽へとシグナルを伝える。つまり、後腎間葉より分泌された GDNF が

Ret を介して発芽部位の細胞増殖を促進し、尿管芽の発芽を可能にさせるというカスケードが示唆される。

この時期の後腎間葉に発現している、Pax-2 (Paired box gene 2), Eya 1 (Eyes absent homolog 1), Six 1 (Sine oculis-related homeobox 1 homolog), といった転写因子は GDNF の発現を直接制御して尿管芽の形成に必須であることが知られている²⁾。後腎間葉よりも前部の間葉では、液性因子 Slit 2 が受容体 Robo 2 (roundabout homolog 2) を介して GDNF の発現を抑制している。同様に Foxc 1 (forkhead box c 1) も GDNF 抑制を介して、尿管芽が複数個発芽するのを抑えている。

このように GDNF は尿管芽の発芽に必須であるが、後腎間葉と尿管芽との相互作用の開始が GDNF によってすべて制御されているわけではない。BMP 4 (Bone morphogenic protein 4) は尿管芽に作用して間葉への侵入を抑制する。逆に BMP 4 のアンタゴニストである Gremlin は、後

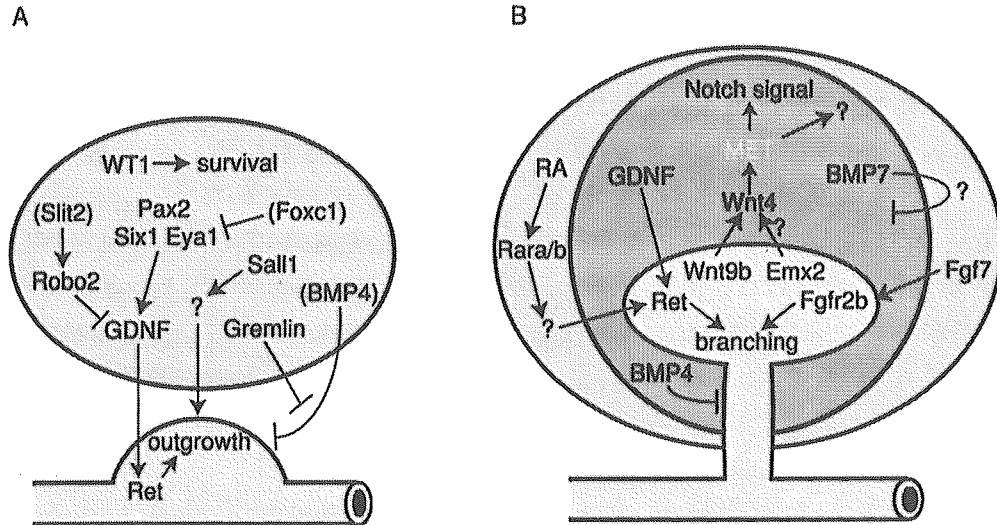


図 3 ネフロンの発生

腎発生における遺伝子の機能模式図。

A : E 10.5 マウス後腎間葉における遺伝子カスケード。括弧付きの遺伝子は後腎管よりも前部の間葉で発現し、尿管芽の異所的な発芽を抑えている。

B : 尿管芽の間葉への侵入後の遺伝子カスケード。

腎間葉から分泌され、BMP 4 と拮抗することで尿管芽の侵入を可能にする³⁾。また、Townes-Brocks 症候群の原因遺伝子である Zn フィンガータンパク Sall 1 は、ノックアウトマウスでは尿管芽が発芽せずに腎発生が行われないう表現型を示すが、これも GDNF の系とは別の機構により後腎間葉と尿管芽との相互作用を制御していると考えられる⁴⁾。

III. 尿管芽のブランチング

GDNF-Ret/Gfra 1 シグナルは後腎間葉への尿管芽侵入後のブランチング (枝分かれ) にも重要なシグナルである。また、間質 (stroma) も尿管芽のブランチングの制御をしている。間質は枝分かれした尿管芽や凝集した間葉の周辺に発生する組織である。間質ではレチノイン酸受容体 Rara/Rarb (retinoic acid receptor α/β) が共発現しており尿管芽での Ret の発現を正に制御している⁵⁾。しかし、どんな因子が間質から尿管芽へとシグナルを伝えているのかは依然不明である。FGF 7, 10 はその候補因子の一つであり、尿管芽

周囲の間質に発現し、尿管芽に発現するレセプター-FGFR 2 b を介して尿管芽の成長・分岐を制御している (図 3-B)。

IV. 間葉の上皮化 (Mesenchymal-to-Epithelial Transformation : MET)

後腎間葉は生体内では尿管芽の侵入後に上皮への分化を開始するが (図 2), *in vitro* で尿管芽の侵入がなくとも脊髄との共培養により MET を起こし、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管へと分化することができる。つまり、尿管芽からも脊髄からも後腎間葉を上皮化するような、誘導物質が分泌されていることがわかる。今までに、LIF (leukemia inhibitory factor) や FGF 2, TGF- β 等いくつかの候補因子が同定されており、実際にこれらの因子が後腎間葉に働くと、間葉に Wnt 4 が発現しその作用により更なる上皮化が進行する⁶⁾。なかでも、尿管芽から分泌される Wnt 9 b が後腎間葉の MET に必須であるとの報告がなされ、Wnt 9 b は後腎間葉の MET 後マーカー遺伝子である Wnt 4 や FGF 8, Pax 8 の発現に重要な

役割をもつことがわかった⁷⁾。つまり、後腎間葉の MET 開始には間葉自身の分泌する Wnt 4 が必須であり、Wnt 4 の発現誘導には Wnt 9 b を中心とする尿管芽からのシグナル伝達が必須であると考えられる。

Wnt 4 を発現した後腎間葉は Wnt の受容体である Frizzled を介して自立的に上皮化を進行させ、コンマ・S 字体から尿細管、糸球体へと転換していく。上皮化の進行過程では、Wnt ばかりでなく BMP シグナルもかかわっている。BMP 7 は間葉に発現し、Wnt 4 の作用と拮抗すると考えられている。

V. 糸球体形成

糸球体は毛細血管とその支持組織メサンギウム、およびそれらを覆う糸球体上皮とポーマン囊上皮から構成される。糸球体上皮は後腎間葉由来の組織だが、毛細血管とメサンギウム細胞は血管前駆細胞由来の組織である。この血管前駆細胞が発生過程の腎臓内部で発生した内在性のものか、それとも外部の血管前駆細胞が入り込んだ外来性のものかは不明であるが、いずれにせよ糸球体形成過程では、糸球体上皮細胞が血管前駆細胞の分化を誘導するという機構がわかっている。

まず糸球体上皮の形成には Notch シグナルが必須である⁸⁾。Notch 2 の活性が低下すると糸球体上皮の形成異常と、血管内皮とメサンギウム細胞の欠失が生じる⁹⁾。

次に、形成された糸球体上皮細胞から血管内皮分化誘導因子 VEGF が分泌され、VEGF 受容体を発現する血管前駆細胞の血管内皮への分化を誘導する¹⁰⁾。先の Notch 2 は、糸球体上皮で発現する VEGF の発現量を調節して、糸球体の血管内皮形成に関与している可能性が示唆されている。

最後に、血管内皮から PDGF-B (platelet-derived growth factor, B polypeptide) が分泌され、その受容体 PDGFR- β を発現する血管前駆細胞が分化しメサンギウムが形成される¹¹⁾。このように糸球体の発生では、発生の各段階で必須な分子

が明らかにされており、その発生機構が解明されつつあるといえる。

VI. Sall 1 を用いた腎臓の再生研究

現在、腎臓の再生をめざして、腎臓幹細胞の同定や、骨髄幹細胞や ES 細胞などを用いて腎臓前駆細胞の誘導をめざす研究が多数行われている。しかし、近年、ES 細胞が骨髄細胞や神経細胞と融合すること、さらに骨髄細胞が肝臓、神経、心臓の細胞と融合することが判明し、移植により証明される分化能は単なるホストとの細胞融合である疑いが生じている^{12~14)}。つまり、マーカーのみの検索や移植の繰り返しだけでは、細胞融合の可能性は否定できず、再生研究を考えた場合不十分なものとなる。

こうした現状を打破するためには、得られた、あるいは誘導された細胞が本当に腎臓前駆細胞なのかを判定する手段の開発が急務となる。そのためにはポジティブコントロールとして、腎臓に分化することが自明であり、前駆細胞の存在が示唆される後腎間葉をまず利用するのが成功の可能性が高いと考えられる。この点で前出の Sall 1 は後腎間葉に発現しているのも、間葉を効率よく集めるのに非常に良い道具となる。われわれは、Sall 1 遺伝子座に蛍光タンパク質を発現する EGFP 遺伝子を導入したマウスを作製し、EGFP による蛍光を指標として Sall 1 を強く発現する細胞つまり後腎間葉細胞を単離し、Wnt 4 を発現する細胞上で培養した。すると細胞はシート状のコロニーをつくり、糸球体、尿細管のマーカーを発現した。また単離した細胞を再集合させると三次元構造を再構築することも明らかにした(投稿中)。この実験系を用いれば ES 細胞を分化させた後、分化した細胞が腎臓前駆細胞の特質をもつか否かの判断ができ、腎臓の再生医療に大きく貢献できると期待される。

おわりに

以前に比べ、腎臓発生のメカニズムも幹細胞に

関することも多くのことが解明されてきた。しかし、腎臓特有の複雑な発生ゆえ不明なことも多く、機能的な腎臓をつくれるかどうかは未知数である。しかし、われわれが示したアッセイを指標として幹細胞に対して試行錯誤しながら分化誘導していけば、腎臓誘導は可能ではないかと考え真剣に取り組んでいる。また、社会を含めあらゆる分野からの再生医療に対する熱意が必要である。腎臓内科学、発生生物学、分子生物学、組織工学などさまざまな分野の知識を集学的に結晶化した研究が進められることを期待したい。

文 献

- 1) Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, et al : Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* **382** : 73-76, 1996
- 2) Xue L, et al : Eya protein phosphatase activity regulates Six 1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426** : 247-254, 2003
- 3) Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, et al : Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* **131** : 3401-3410, 2004
- 4) Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, et al : Murine homolog of SALL 1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* **128** : 3105-3115, 2001
- 5) Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, et al : Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* **27** : 74-78,

2001

- 6) Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, et al : Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell* **99** : 377-386, 1999
- 7) Carroll TJ, McMahon AP : Wnt signaling in tubule induction. *The American Society of Nephrology*, 2003
- 8) Cheng HT, Miner JH, Lin M, Tansey MG, et al : amma-secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse kidney. *Development* **130** : 5031-5042, 2003
- 9) McCright B, Gao X, Shen L, Lozier J, et al : Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch 2 mutation. *Development* **128** : 491-502, 2001
- 10) Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, et al : Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* **111** : 707-716, 2003
- 11) Soriano P : Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF betareceptor mutant mice. *Genes Dev* **8** : 1888-1896, 1994
- 12) Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, et al : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416** : 542-545, 2002
- 13) Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG : Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416** : 545-548, 2002
- 14) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, et al : Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425** : 968-973, 2003

* * *

Sall1 タンパク(SALL1)

小宮千佳 小林千余子 西中村隆一

腎臓形成遺伝子 *Sall1* の単離とその機能

腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される。前腎、中腎のほとんどは後に退行変性し、哺乳類成体において機能する腎臓は後腎である。腎臓に特異的に発現する遺伝子を同定するために、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の前腎で発現している *Xsal-3* 遺伝子¹⁾を指標にマウス後腎から新たな遺伝子を探索したところ、10個のジンクフィンガーモチーフをもつ *Sall1* が発見された。*Sall1* は尿管芽が後腎間葉に進入する以前(胎生10.5日)から後腎間葉付近で発現しはじめ、侵入時(胎生11.5日)には後腎の尿管芽を取り囲む、腎臓前駆細胞集団であると考えられる後腎間葉に強く発現していた。さらに、中枢神経系では脳室周囲の神経幹細胞が存在する領域、肢芽では progress zone という未分化細胞が増殖する部分で発現が認められ、腎臓に限らずほかの未分化細胞でも何らかの役割を持つ可能性が示唆された²⁾。そこで *Sall1* を欠失するマウスを作製したところ、すべてのノックアウトマウスが生直後に死亡した。開腹してみると、腎臓が完全に欠損しているか、非常に小さい痕跡的な腎臓が認められるのみであったため、*Sall1* は腎臓の発生に必須であることが証明された。さらにノックアウトマウスでは、尿管芽は後腎間葉に侵入していないか、あるいはしてもその後の分岐は著明に障害されていた。つまり、*Sall1* が後腎発生のもっとも初期段階の重要なステップである尿管芽の侵入に必須であることが判明した。

Sall1 はショウジョウバエにおいて領域特異的ホメオ遺伝子である *spalt* (*sal*) 遺伝子のマウスホ

モログである。*spalt* は特徴的な複数の二重ジンクフィンガーモチーフをもち³⁾、ヒトから線虫に至るまで広く保存されたタンパク質でもある。

Sall ファミリーに関連する病気

ヒトとマウスでは *Sall1* 以外にも *Sall2*, *3*, *4* と計四つの *Sal* 関連遺伝子が知られている(ヒトは *SALL1*, *2*, *3*, *4* と大文字で記載される)。ヒトでの *SALL1* の変異は Townes-Brocks 症候群という遺伝病をおこすことが報告されている⁴⁾。これは多指症、鎖肛、外耳や内耳の異常を主体とし、時に腎臓形成障害を伴うもので、常染色体優性遺伝の形態をとる。つまり、ヘテロの状態で症状を呈するわけで、マウスの *Sall1* ヘテロ欠失体が全く正常であることと一致しない。また、*Sall1* ホモ欠失体でも指や耳の異常は認められなかった。そこで、*Sall* ファミリーの個々の遺伝子を欠失させてみると、*Sall2* ノックアウトマウスでは外見上異常な表現型を示さず生存した⁵⁾。また、*Sall1* との二重欠失マウスを作製しても *Sall1* の表現型をさらに重篤にすることはなかった。*Sall3* ノックアウトマウスでは周産期致死で咽頭や脊髄の発生に異常が見られるが、ほかの臓器では異常が見られない⁶⁾。しかし、*Sall1* と *Sall3* の二重欠失マウスを作製したところ、指の形成に異常が生じた。つまり *Sall1* と *Sall3* が一部機能を補填し合っていることを示唆する。

Townes-Brocks 症候群では、*SALL1* 遺伝子の変異によってC端を欠いた *SALL1* のN端のみの欠損型タンパク質が発現していると考えられ、*SALL1* のN端タンパクが *SALL1* を含むすべての *SALL* と相互作用し、*SALL* の機能を阻害する

ドミナントネガティブ体(内在性のものに打ち勝って阻害効果を示すもの)として働くことに起因することが示唆されている。事実, *Sall1* の N 末端のジンクフィンガードメインの一つを残したノックアウトマウスでは, Townes-Brocks 症候群と類似した表現型が指, 肛門, 耳, 腎臓ともに得られている⁷⁾。

SALL4 は眼の動きや手の異常を特徴とし, 聴覚の欠失, 腎臓および脊髄形成異常などの症状を示す遺伝病, Okihiro 症候群の原因遺伝子である⁸⁾。われわれが *Sall4* ノックアウトマウスを作製したところ, ヘテロで肛門, 脊髄形成異常が確認されており, ホモでは子宮着床直後に死亡することがわかった。さらに ES 細胞でも *Sall4* が必須であるということが判明している(未発表)。つまり, 腎臓と ES 細胞(多能性幹細胞)に *Sall* ファミリーを介して共通の機構が存在する可能性がでてきている。

最近になって得られた新しい知見

Sall ファミリータンパク質は核内に局在し, 様々な組織で重要な働きをしているが, 分子メカニズムは完全には解明されていない。近年, *Sall1* タンパク質の N 末端のジンクフィンガードメイ

ンの一つがヒストンデアセチラーゼ(HDAC)やクロマチンリモデリング因子と結合し, クロマチン構造を変化させることで, 転写抑制に関わっているとの報告がなされた⁹⁾。しかしながら, 同じく *Sall1* タンパクの N 末端が転写活性に関わっているとの報告もなされ¹⁰⁾, 渾沌とした状態である。転写抑制あるいは活性の生化学的なメカニズムを確定するために, *Sall1* により転写調節された *in vivo* でのターゲット遺伝子が同定されることが重要となってくるだろう。

文 献

- 1) Onuma Y et al: *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 151-156, 1999
- 2) Nishinakamura R et al: *Development* **128**: 3105-3115, 2001
- 3) Kuhnlein RP et al: *EMBO J* **13**: 168-179, 1994
- 4) Kohlhase J et al: *Nat Genet* **18**: 81-83, 1998
- 5) Sato A et al: *Mol Cell Biol* **23**: 62-69, 2003
- 6) Parrish M et al: *Mol Cell Biol* **24**: 7102-7112, 2004
- 7) Kiefer SM et al: *Hum Mol Genet* **12**: 2221-2227, 2003
- 8) Kohlhase J et al: *Hum Mol Genet* **11**: 2979-2987, 2002
- 9) Kiefer SM et al: *J Biol Chem* **277**: 14869-14876, 2002
- 10) Sato A et al: *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 103-113, 2004