

腎臓の初期発生

Early development of the kidney

由利俊祐 西中村隆一

Key words : 腎臓発生, 後腎間葉, 尿管芽, MET, GDNF

はじめに

腎臓の発生は, 上皮(尿管芽)の分岐, 侵入, 間葉の上皮化, 糸球体形成, 血管の侵入という過程を経る. これらの各ステップは発生学の基礎的な研究課題であり, 形態形成の解明のモデルとして魅力的な臓器であるといえる.

本稿では, 腎臓の発生の仕組みを踏まえ, 最新の腎発生における分子機構の研究の動向を述べたい.

1. 形態的な視点からの腎初期発生の概要

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, 哺乳類成体で機能する腎臓は後腎である. この後腎の形成はWolff管と後腎間葉との相互作用から始まる. Wolff管は後腎形成の前に前腎と中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ゆき, 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分岐し, 後腎間葉へ侵入を始める. 尿管芽は後腎間葉を周りに凝集させ, キャップ状の構造を形成させる. 逆に後腎間葉は尿管芽の分岐を誘導し, 自らはキャップの形を変化させながら上皮化し, 管へと分化を始める. 後腎間葉はまずコマ型の凝集体を作り, 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Henle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Bowman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1). 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. この過程が分岐した尿管芽一つ一つで行われ, 最終的にヒトでは約100万個のネフロンが形成される.

2. 腎発生開始シグナルの機構

1. で述べたように, 後腎の発生は最初に後腎間葉とWolff管から伸びる尿管芽との相互作用で開始される. まずは, 尿管芽の発芽以前の時期で, 後腎間葉とWolff管に発現している遺伝子とその機能を検討する.

GDNF(glial-cell-line-derived neurotrophic factor)は腎臓発生において非常に重要な分子である. 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, Wolff管に作用して尿管芽を発芽させ伸長させる機能をもつ¹⁾. 尿管芽にはGDNFの受容体分子であるRet(ret proto-oncogene)とそ

Shunsuke Yuri, 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 細胞識別分野

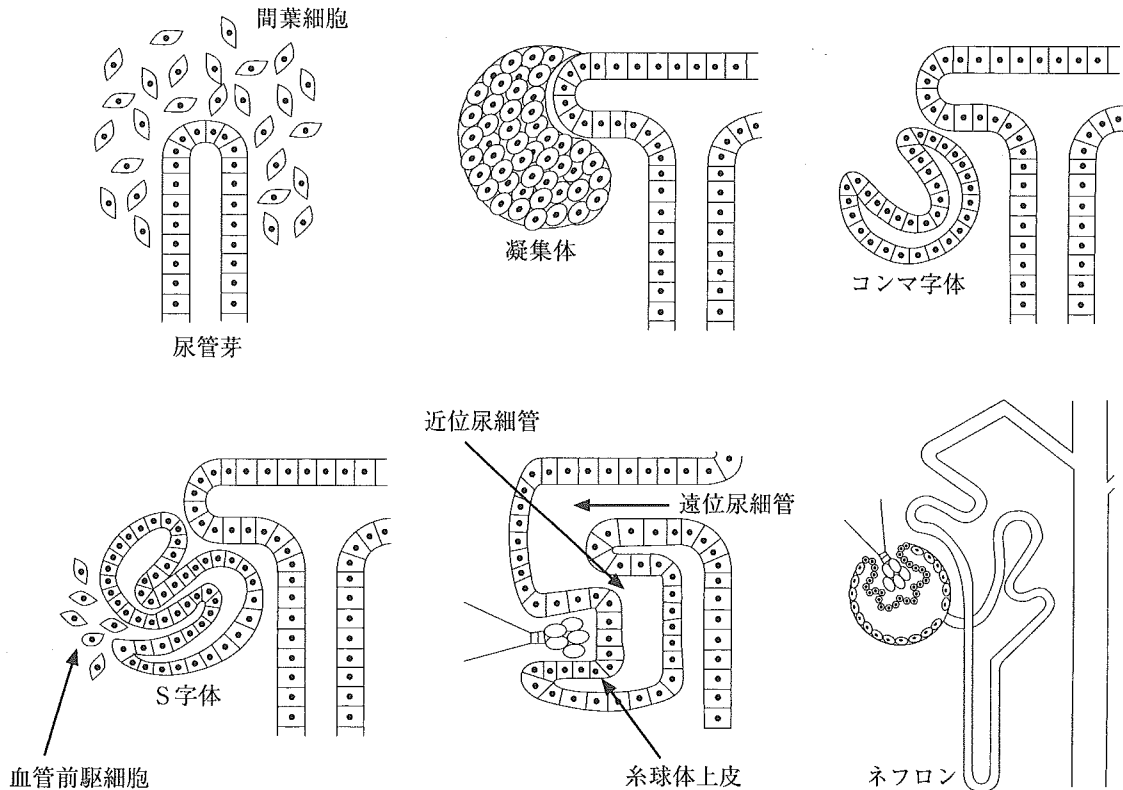


図1 ネフロンの発生

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作る。凝集体はコンマ字体を経てS字体となり、血管前駆細胞を取り込みつつ、遠位で尿管芽と融合する。S字の部位ごとに遠位尿細管、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。

の共同受容体の Gfra1 (GDNF family receptor $\alpha 1$) 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。

GDNF の発現を正に制御する転写因子である Pax2 (paired box gene 2), Six1 (sine oculis-related homeobox 1 homolog), Eya1 (eyes absent homolog 1) は、後腎間葉に発現しており、尿管芽の形成に必須であることが知られている。Pax2 と Six1 は GDNF のプロモーター領域に結合し GDNF の発現を直接的に制御している。Eya1 は脱リン酸化酵素活性をもち、Six1 と転写複合体を形成することで GDNF の発現を開始している²⁾。また、TGF- β ファミリーの一種である Gdf11 (growth/differentiation factor 11) のノックアウトマウスは、後腎間葉で GDNF の発現が消失し、尿管芽の出芽がなくなるという報告もある³⁾。Gdf11 は Wolff 管と後腎間葉に発現しており、GDNF の発現を制御している可能性も示

唆される。

後腎間葉より前部の間葉では、GDNF の発現を抑制する因子として Foxc1 (forkhead box c1) や Slit2 (slit homolog 2) が発現している。転写因子である Foxc1 は GDNF や Eya1 の発現を抑制し尿管芽が複数個発芽するのを抑えている。液性因子である Slit2 はその受容体である Robo2 (roundabout homolog 2) を介することで GDNF の発現を抑制している。Slit2 あるいは Robo2 のノックアウトマウスでは GDNF の発現が広範にわたっており、尿管芽が多数形成される。つまり、Slit2/Robo2 は GDNF の発現領域を制限していることがわかる。ただし、Slit2, Robo2 のノックアウトマウスでは Eya1, Pax2 の発現は上昇しておらず、Eya1 や Pax2 以外にも GDNF の発現を制御するような未知の経路の存在が示唆される⁴⁾。

一方、尿管芽側でも GDNF/Ret シグナルが制

御されていることが知られている。受容体型チロシンキナーゼのアンタゴニストで尿管芽で発現している Sprouty1 が尿管芽での GDNF シグナルを阻害していることが報告された。Sprouty1 のノックアウトマウスでは、尿管芽における GDNF シグナルへの感受性が高まり、尿管芽が複数みられる⁵⁾。このように GDNF は間葉側のリガンドの発現量だけでなく、尿管芽側でも受容体以降の反応性を調整されていることが明らかになった。

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。BMP4 (bone morphogenetic protein 4) は尿管芽の発芽、伸長を抑制している。BMP のアンタゴニストである gremlin は、後腎間葉から分泌され、尿管芽の間葉への侵入に必須な役割をもつ。gremlin のノックアウトマウスでは尿管芽の最初の発芽は起こるが、その後の伸長が起こらず、結果的に後腎間葉への侵入が阻害される⁶⁾。また、Townes-Brocks 症候群の原因遺伝子である Zn フィンガー蛋白 Sall1 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。それにもかかわらず、Sall1 ノックアウトマウスの後腎間葉における GDNF の発現は失われていないことがわかっている⁷⁾。

3. 尿管芽の分岐

次に後腎間葉に侵入した尿管芽は分岐を始める。GDNF/Ret シグナルは尿管芽の発芽だけでなく、後腎間葉に侵入した後の尿管芽の分岐にも重要なシグナルである。前述の Foxc1, BMP4, Slit2, Robo2 などの GDNF シグナルを抑制する因子のノックアウトマウスでは腎肥大や集合管の多重形成など尿管芽の異常増殖・分岐が原因の表現型がみられる。分泌型の蛋白である Wnt11 は尿管芽の先端に発現しており、そのノックアウトマウスでは尿管芽の分岐の減少がみられる。Wnt11 のノックアウトマウスでは GDNF の発現が低下しており、逆に c-Ret のノックアウトマウスでも Wnt11 の発現の低下がみ

られる。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正のフィードバック機構が見て取れる⁸⁾。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。

また、間質 (stroma) も尿管芽の分岐の制御をしている。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 c-Ret の発現を正に制御している⁹⁾。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 の発現に影響を及ぼしているという報告もある。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。FGF7, 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 FGFR2b を介して尿管芽の成長・分岐を制御している。

4. 間葉の上皮化 (mesenchymal-to-epithelial transformation: MET) の機構

次に、後腎間葉は尿管芽の侵入後に上皮への分化を開始する。この間葉の上皮化 (MET) における重要な因子は Wnt4 である。Wnt4 は間葉で発現しており、そのノックアウトマウスでは、間葉が尿管芽の周りに凝集するところで発生が止まり、上皮化しないという表現型がみられる。この間葉での Wnt4 の発現を制御する液性因子が尿管芽から分泌されていると考えられていたが、その正体は長らく謎であった。最近、尿管芽で発現する Wnt9b のノックアウトマウスが作製され、そのマウスは MET が起こらず、Wnt4 や FGF8, Pax8 が発現しなかった¹⁰⁾。つまり、尿管芽から分泌される Wnt9b が間葉に働きかけて、Wnt4 の発現を誘導し、Wnt4 が間葉自身に働いて MET が起こることになる。

Wnt4 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

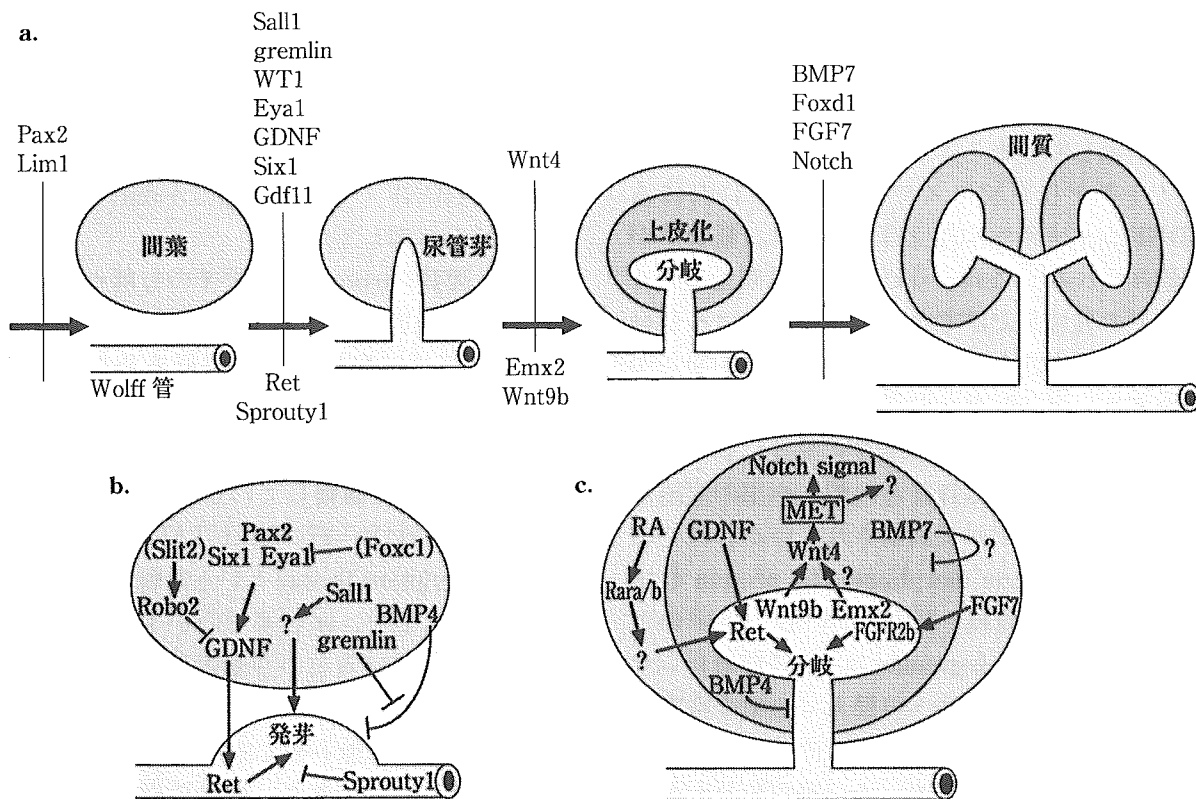


図 2-a 腎臓発生過程で働く遺伝子

縦線は各遺伝子のノックアウトによって発生の障害される時期を示す。

- b E10.5 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。
- c 尿管芽の間葉への侵入後の遺伝子カスケード

換していく。上皮化の進行過程では、Wntばかりでなく BMP や Notch シグナルもかかわっていることも知られている。BMP7 は間葉に発現し、そのノックアウトマウスでは間葉が S 字体を形成したあたりで発生が停止する。また、*in vitro* の実験系で、BMP7 は間質の増殖を促進しつつ間葉の分化を抑制する。これは BMP7 が間質の増殖を制御することで間質から分泌される何らかの間葉上皮化制御因子の分泌量を制御し、結果的に間葉の上皮化を抑制するためと考えられている¹³⁾。また、Notch シグナルは Notch の細胞内ドメイン NICD (Notch intracellular domain) が γ -secretase によって切断されることで活性化されるが、最近になって、この切断に必須である細胞膜蛋白 presenilin を欠如したマウスの腎臓で

は、MET は開始されるものの、コンマ・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ことが報告された¹²⁾。後腎間葉の運命決定機構は未解明であったが、このように後腎間葉の上皮化の段階での細胞運命決定に Notch シグナルが関与することがわかってきた。

おわりに

本稿では主にノックアウトマウスの実験で腎臓に表現型がでる遺伝子を中心に腎臓の初期発生を述べてきた(図 2)。腎臓の発生に深くかかわる遺伝子が腎臓発生以前の段階で死に至る表現型を示すものの中に存在する可能性もあり、更に理解を深めるためにはそのような遺伝子を

時期特異的にノックアウトすることも必要となってくるだろう。

また、後腎間葉はWnt4の発現によりコンマ・S字体、糸球体、尿細管へと分化が進むが、同じ間葉細胞が糸球体から尿細管まで様々な分化系

をもつようになる機構は、まだ十分に明らかになつたとはいえない。尿管芽や間質が分泌する因子の濃度勾配によるものなのか、間葉細胞自身のプログラムによるものなのか、興味深い問題である。

■ 文 献

- 1) Pichel JG: Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* **382**: 73-76, 1996.
- 2) Li X, et al: Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426**: 247-254, 2003.
- 3) Esquela AF, et al: Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Dev Biol* **257**: 356-370, 2003.
- 4) Grieshammer U, et al: SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* **6**: 709-717, 2004.
- 5) Basson MA, et al: Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell* **8**: 229-239, 2005.
- 6) Michos O, et al: Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* **131**: 3401-3410, 2004.
- 7) Nishinakamura R, et al: Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* **128**: 3105-3115, 2001.
- 8) Majumdar A, et al: Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development* **130**: 3175-3185, 2003.
- 9) Batourina E, et al: Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* **27**: 74-78, 2001.
- 10) Carroll TJ, et al: Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* **9**: 283-292, 2005.
- 11) Dudley AT, et al: Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes Dev* **13**: 1601-1613, 1999.
- 12) Wang P, et al: Presenilins are required for the formation of comma- and S-shaped bodies during nephrogenesis. *Development* **130**: 5019-5029, 2003.

腎臓発生を制御する分子機構

熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野
山田斎毅 長船健二 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取ってきた。しかし、腎機能の一部を代替しているにすぎず、また、透析医療費の増加は社会的な問題となりつつある。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。そこで本稿では、現在までにわれわれが進めてきた研究を基に腎臓発生分子機構を解説する。その後、腎臓という器官の再生の可能性についても述べる。

腎発生必須遺伝子 *Sall 1*

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。鳥類、哺乳類では前腎、中腎は一時的な器官であり、間もなく退化してしまう。しかし、最も単純で原始的な前腎を研究することは腎発生を解明していくために有用である。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のアニマルキャップという予定外胚葉を切り出し、アクチビンとレチノイン酸を加えると前腎を試験管内で誘導することができる¹⁾。このアッセイを利用してわれわれは、前腎で発現している新規遺伝子 *Xsal-3* を単離

Molecular mechanisms of kidney development

key words: *Sall 1*, Wnt 4, 後腎間葉

した²⁾。さらに、この遺伝子を指標にマウス後腎から *Sall 1* という Zinc フィンガードメインを10個持つ遺伝子を同定した。この遺伝子の機能を解明するために *Sall 1* のノックアウトマウスを作製したところ、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(図1)。

以上から、*Sall 1* は腎臓の発生に必須な遺伝子であることが示された³⁾。

後腎発生初期の分子機構

ここで後腎の初期発生について述べる。後腎の形成は尿管芽と後腎間葉との相互作用から始まる。まずウォルフ管と呼ばれる管が、体軸に沿って頭側から尾側へと伸長していき、途中で枝分かれして尿管芽が形成される。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、後腎間葉へ向かって伸び始める。マウス11.5日目に、尿管芽が後腎間葉に侵入すると、相互作用により間葉は凝集し、上皮化が起こる。上皮化した間葉由来の細胞は糸球体上皮、尿細管へと分化し、前者に向けて血管が侵入して機能的糸球体が形成される。一方、尿管芽は間葉からの刺激を受けて分枝を続け、最終的には集合管および尿管となり、間葉由来の上皮である遠位尿細管とつながる。こうして機能的腎単位であるネフロンが完成する(図2)。

前述の *Sall 1* は、尿管芽には発現しないが後

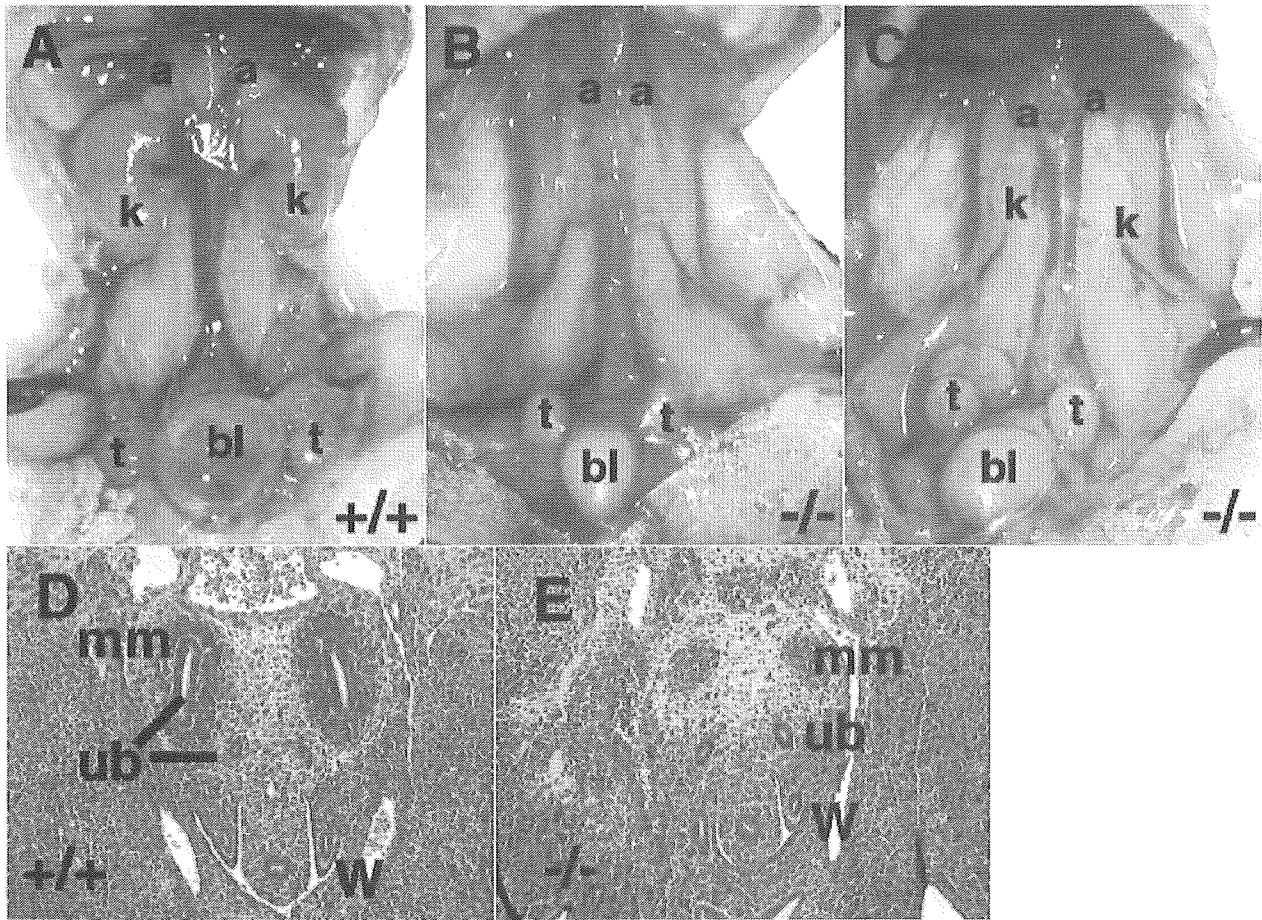


図 1

A, B, C: *Sall1* ノックアウトマウスの腎臓は、欠損する(B)か、非常に小さい(C)。B, Cともに膀胱に尿が存在しない。Aは正常マウス。k: 腎臓, t: 精巣, bl: 膀胱, a: 副腎
 D, E: *Sall1* ノックアウトマウス(E)での尿管芽侵入阻害。Dは正常マウス
 mm: 後腎間葉, ub: 尿管芽, W: ウォルフ管

腎間葉に非常に強く発現している。さらに *Sall1* のノックアウトマウスでは後腎間葉は小さいながら形成され、尿管芽も形成されるものの、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枝は著明に障害されていた(図1E)。すなわち *Sall1* は、尿管芽の後腎間葉への侵入という後腎発生初期段階の重要なステップに必須であることが判明した(図2)。

この時期の重要な遺伝子として、後腎間葉で発現している GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) という TGF- β (transforming growth factor- β) ファミリーに属する液性因子がある。GDNF はウォルフ管に作用して尿管芽を発芽させ伸長させる機能を持つ、腎臓

発生において非常に重要な分子である⁴⁾。その受容体である Ret (ret proto-oncogene) と共同受容体の Gfra 1 (GDNF family receptor α 1) は尿管芽で発現しており、間葉で分泌された GDNF はこの受容体を介して尿管芽へとシグナルを伝える^{5,6)}。この作用により尿管芽が発芽伸長し後腎間葉へと侵入することで後腎発生が進む。*Sall1* のノックアウトにより尿管芽の侵入が阻害されることから、尿管芽を引き寄せる何らかの因子の分泌が障害されたと考えられた。その一番の候補は当然 GDNF であるが、*Sall1* ノックアウトマウスの後腎間葉における GDNF の発現は失われていなかった³⁾。これは、尿管芽の発芽伸長に必須である別の機構が存在することを意味している。

Sall 1 による制御

Wnt 4 による制御

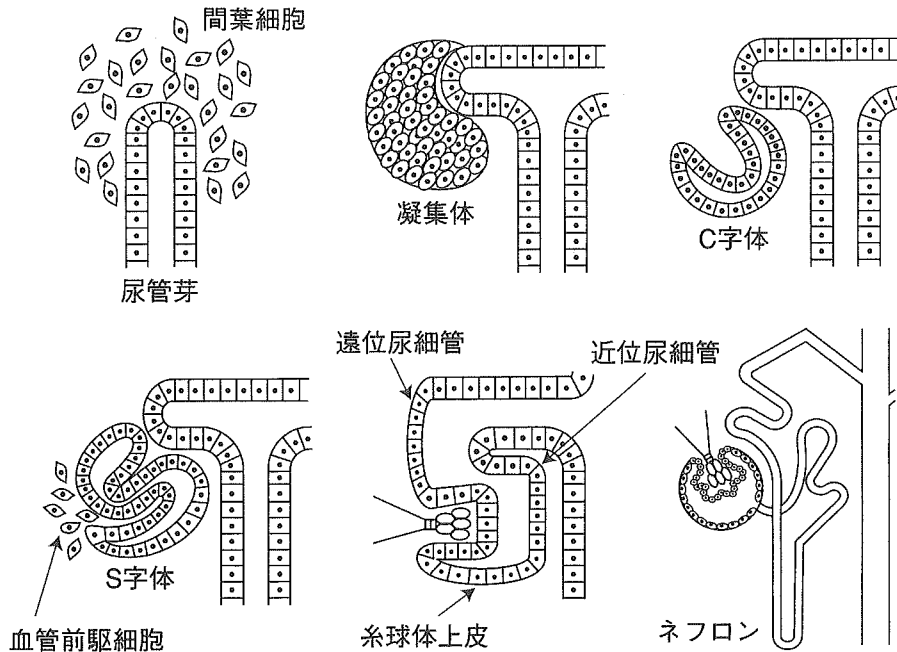


図 2 後腎発生図

尿管芽の間葉への侵入には Sall 1 が必須である。その後の間葉から上皮への転換(MET)には Wnt 4 が必須である。

後腎発生中期の分子機構： 間葉の上皮化(mesenchymal-to-epithelial transformation： MET)

間葉に侵入した尿管芽は間葉に働きかけ、間葉から上皮への転換(MET)を誘導する(図2)。Sall 1 が尿管芽の侵入に関わっていることは示されたが、MET にはどう関わっているのだろうか？ 後腎間葉は脊髄との共培養により、尿管芽がなくても 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。そこで Sall 1 ノックアウトマウスの後腎間葉と脊髄との共培養を試みたところ、サイズは小さいが上皮化が起きていることが観察された。このことから、Sall 1 が後腎間葉の上皮化には関わっていないことが示唆された³⁾。

それでは間葉の上皮化にはどんな因子が関与しているのだろうか。その本体は間葉自身で発

現する Wnt 4 であることがわかっている⁷⁾。すなわち、尿管芽と脊髄からは誘導物質が分泌されており、間葉に Wnt 4 が発現し、その作用により間葉の上皮化が進行する。尿管芽からの誘導物質は長い間謎であったが、最近これが Wnt 9 b であることが同定された⁸⁾。つまり、尿管芽から Wnt 9 b が分泌され、これによって間葉から Wnt 4 が誘導され、さらに Wnt 4 が間葉自身に働いて MET を開始することになる。

Sall 1 を用いた腎臓前駆細胞の同定

後腎間葉は MET によって尿細管上皮、糸球体上皮と分化していくため、後腎間葉中に腎臓前駆細胞が存在する可能性が考えられる。そこでわれわれは、後腎間葉細胞を1個ずつに解離し、MET に必須な遺伝子である 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作り、糸球体、尿細管のマーカー

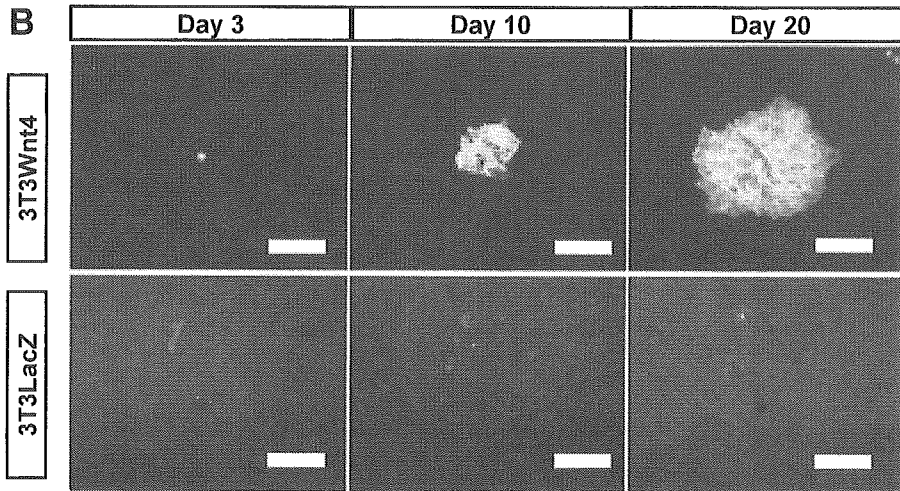
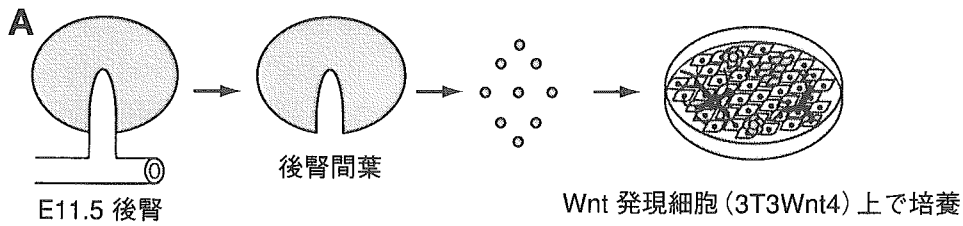


図 3

- A : 後腎間葉細胞を単離し培養する方法
 B : 後腎間葉細胞 1 個からコロニーが形成されていく。3T3Wnt4 : Wnt を発現している細胞, 3T3LacZ : Wnt を発現しない細胞

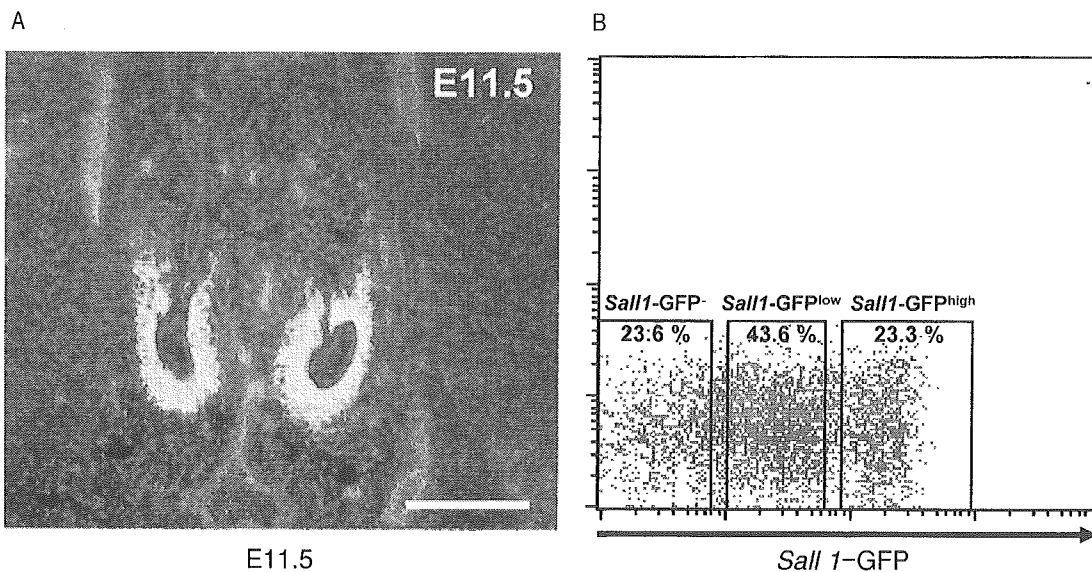


図 4

- A : *Sall1*-GFP マウスにおける胎生 11.5 日の後腎。間葉細胞が緑色に光っている。
 B : *Sall1*-GFP マウスの後腎間葉を GFP の強さによって 3 分画 (GFP^{high}, GFP^{low}, GFP⁻) に分けた。

を発現した。これは、後腎間葉中の 1 個の細胞から MET を経て複数の系統が出現することを示している。つまり、最初の 1 個は多能性前駆

細胞であることが示唆された(図 3)。さらに *Sall 1* が後腎間葉に発現することを利用して、*Sall 1* 遺伝子座に蛍光蛋白質 GFP を導入した

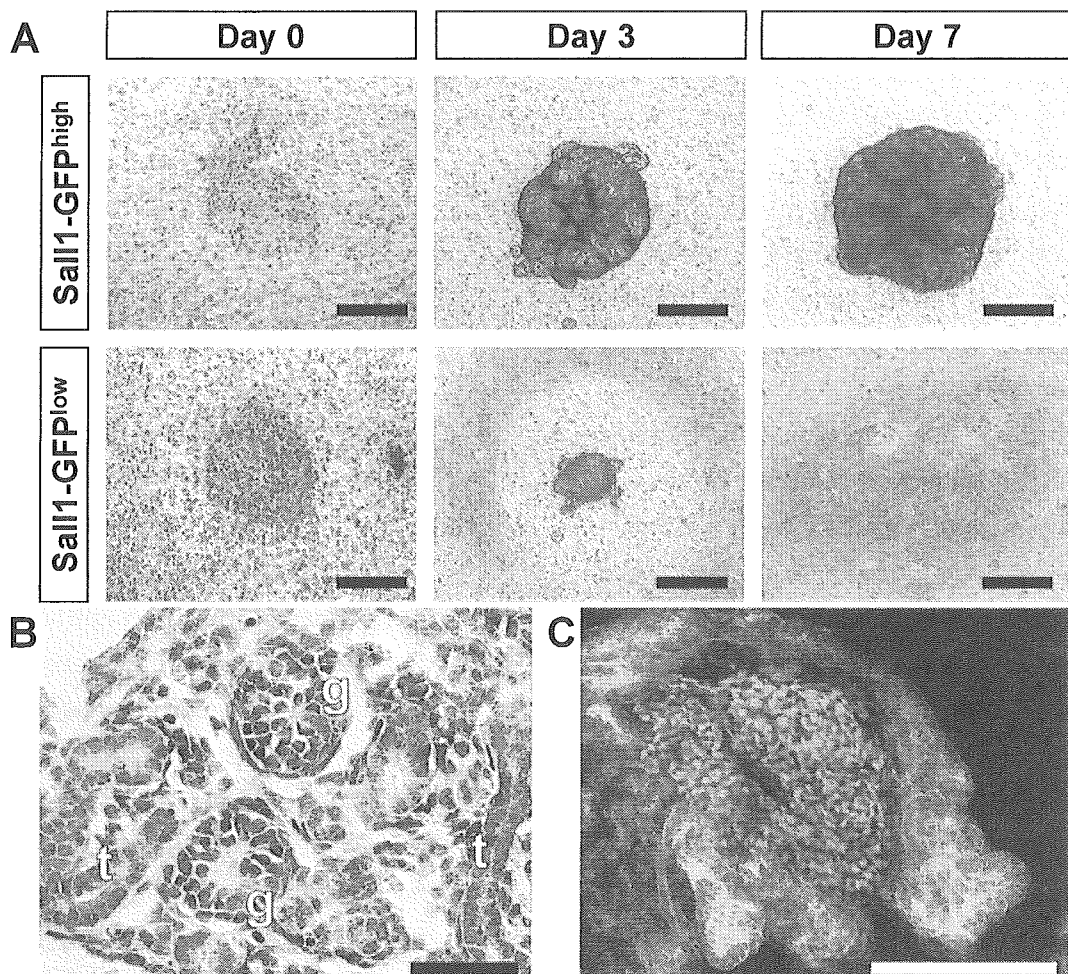


図 5

- A : *Sall1*-GFP^{high}の細胞から三次元立体構造が再構築された。
 B : A の組織図。糸球体様構造と尿管芽様の管腔構造がみられた。
 g : 糸球体様構造, t : 尿管芽様管腔構造
 C : A の免疫染色。糸球体のマーカー (WT 1, 赤) と近位尿細管のマーカー (LTL, 緑) が発現している。

マウスを作製した。このマウスの後腎間葉を GFP の強さによって 3 群に分け、Wnt 4 発現細胞上で培養したところ、GFP が強く発現している細胞群 (*Sall 1*-GFP^{high}) に多能性前駆細胞が存在することがわかった (図 4)。また、*Sall 1*-GFP^{high}の細胞を単離したあと再集合させ、Wnt 4 を発現する細胞上で培養したところ、糸球体様構造や尿管芽様の管腔構造が生じた。すなわち、*Sall 1* を強く発現する後腎間葉から三次元立体構造を再構築できたことになる。

以上から、*Sall 1* を発現する後腎間葉に前駆細胞が確かに存在し、この細胞から糸球体と尿管が作られていくことが判明した⁹⁾(図 5)。

おわりに

腎臓の再生医療を目指し、様々な細胞から腎臓前駆細胞を誘導する試みがなされているが、腎臓前駆細胞を同定する実験系が存在していないために、多くの研究が明白な結論に至っていない。われわれが開発した腎臓前駆細胞を同定する系を用いれば、ES 細胞などから分化させた後、分化した細胞が腎臓前駆細胞の性質を持つか否かの判断ができる可能性があり、腎臓の再生医療に大きく貢献できると期待される。今回は *Sall 1* に絞って述べたが、広く腎臓発生に

関わる分子機構を学びたい方は他の総説を参照されたい¹⁰⁾。

REFERENCES (参考文献)

1. Moriya N, Uchiyama H, Asashima M. Induction of pronephric tubules by activin and retinoic acid in presumptive ectoderm of *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ* 1993 ; 35 : 123-8.
2. Onuma Y, Nishinakamura R, Takahashi S, et al. Molecular cloning of a novel *Xenopus* spalt gene (Xsal-3). *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 264 : 151-6.
3. Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, et al. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 2001 ; 128 : 3105-15.
4. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 1996 ; 382 : 73-6.
5. Suchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, et al. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 1994 ; 367 : 380-3.
6. Enomoto H, Araki T, Jackman A, et al. GFR alpha 1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 1998 ; 21 : 317-24.
7. Kispert A, Vainio S, McMahon AP, et al. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 1998 ; 125 : 4225-34.
8. Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, et al. Wnt 9 b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* 2005 ; 9 : 283-92.
9. Osafune K, Takasato M, Kispert A, et al. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 2005 ; 133 : 151-61.
10. 高里 実, 西中村隆一. 腎臓発生の分子機構. *実験医学増刊* 2005 ; 23 : 100-6.

腎臓形成のメカニズムと再生への挑戦

10.1 はじめに

10.1.1 腎臓をめぐる現在の状況

腎臓は老廃物を排出すると同時に、体内の電解質、水分の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。腎機能が失われると水分と種々の毒性物質が蓄積し、意識混濁、肺水腫による呼吸困難、高カリウム血症などで死に至るため人工透析が必要となる。さらに腎臓は内分泌器官としても重要で、レニンを産生することによって血圧の調節にもかかわり、ビタミンDの活性化を通して骨代謝にもかかわる。よって長期透析患者においては血圧と骨の異常が高率に認められる。

また、造血作用のあるエリスロポエチンの主要産生臓器であるため、腎不全では赤血球維持に異常をきたし、重度の貧血となる。このためかつては頻回の輸血が必要であり、それによってウイルス性肝炎、ひいては肝硬変、肝がんなどの被害を被った。エリスロポエチンの発見によってこの問題は解決されたが、それ以前に輸血を受けた人はこれからもこの問題から逃れることはできない。また、エリスロポエチンはほぼ一生にわたって週に数回投与する必要があり、医療費の高騰を招いている。

日本で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、腎機能がいったん悪化するとそれを改善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10年前とほとんど変わっていない。

腎臓は自然には再生しない器官であり、人工透析や腎移植技術が確立されたがゆえに、基礎研究や臨床においても新しい再生医療の取り組みから遅れている感がある。本当に腎臓の機能を回復させる方法はないのだろうか。もし腎臓の幹細胞なるものが存在すれば、あるいはそれを別の細胞源から誘導できれば、それを移植することによって腎機能を改善できないだろうか。いまずぐには難しいとしても、腎臓の発生を理解することで腎臓を再生する手立て

が考えられないだろうか。腎臓の発生に関する研究は始まったばかりであり、現在までにわかってきた腎臓発生の概要を解説しながら、腎臓という器官形成の複雑さ、おもしろさ、再生の可能生について考えていきたい。

10.1.2 慢性腎疾患に対する今日の治療法

糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎炎や高血圧性腎硬化症等の腎疾患により、末期腎不全に陥った場合の治療法として、現在のところ、おもに二つの方法が行われている。一つは死体および生体からの腎移植であり、もう一つは血液または腹膜を介しての人工透析である。腎移植は免疫抑制剤の進歩に伴ない、生着率も9割程度と非常に高い成功率を収め、また損なわれた腎機能を完全に補うことができる点で根本的な治療法となり得る。しかし、慢性的なドナー不足や移植後の免疫拒絶抑制剤による発がんや感染症等の副作用のため、一般的な治療法とはなり得ていない。

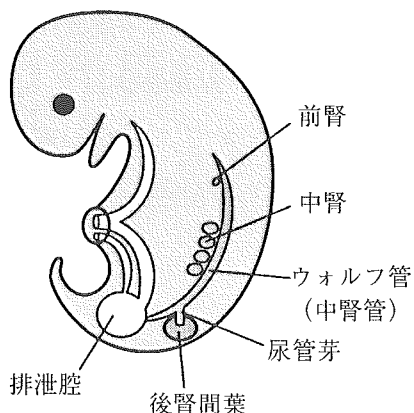
一方、人工透析は技術の進歩もあり、飛躍的に慢性腎不全患者の予後を改善させた非常に成功した治療法である。しかし、患者に厳しい食事制限や定期的な通院治療等の、生活の質 (quality of life) の低下を招くだけでなく、人工透析は腎臓の多彩な機能の一部である濾過機能を代償したに過ぎないことから生じるさまざまな長期合併症を引き起こす。また透析医療費は医療費全体の3%以上を占め、年間1兆円を超えようとしており、医療経済からみても大きな問題を生じている。したがって、末期慢性腎不全等の難治腎疾患に対する新しい根本的な治療法の開発が望まれている。

こうした従来の治療法に代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。皮膚、骨、軟骨、角膜などについては、実際に患者に試用する臨床研究がわが国でも進められている。しかし腎臓においては、哺乳類では前腎、中腎という二つの胎生期の腎臓を経て後腎 (最終的な腎臓) を形成するという発生過程の複雑さ、後腎においても特異的機能を有するように分化した多数の細胞種を含む構造上の複雑さ等の理由により、発生機構の解明や、それに基づく幹細胞生物学および再生医療の研究がほかの臓器に比べ大きく立ち遅れ、いまだ基礎研究の段階である。

10.2 腎臓の発生

10.2.1 腎発生の概要

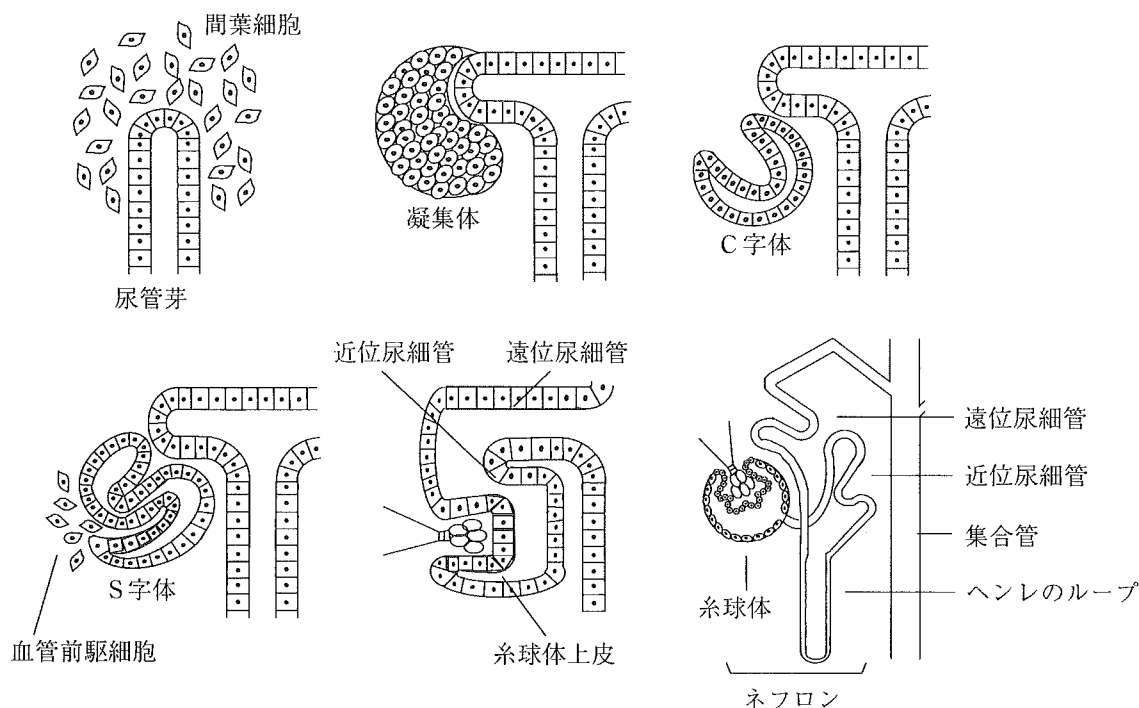
腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される (図 10.1)。前腎、中腎のほとんどは、のちに退行変性し、哺乳類成体において機能する腎臓は後腎である。この後腎の形成は尿管芽と後腎間葉との相互作用から始まる。尿管芽のもととなるウォ



マウス胎生期 11.5 日目の腎臓発生の様子。尾部へと伸長したウォルフ管は途中で尿管芽を発芽し、後腎間葉へ侵入をはじめます。

図 10.1 後腎の発生

ルフ管（中腎管）は、後腎形成のまえ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、マウスでは胎生 10.5 日目にこの尿管芽が枝分かれし、後腎間葉へ向かって伸び始める（図 10.2）。

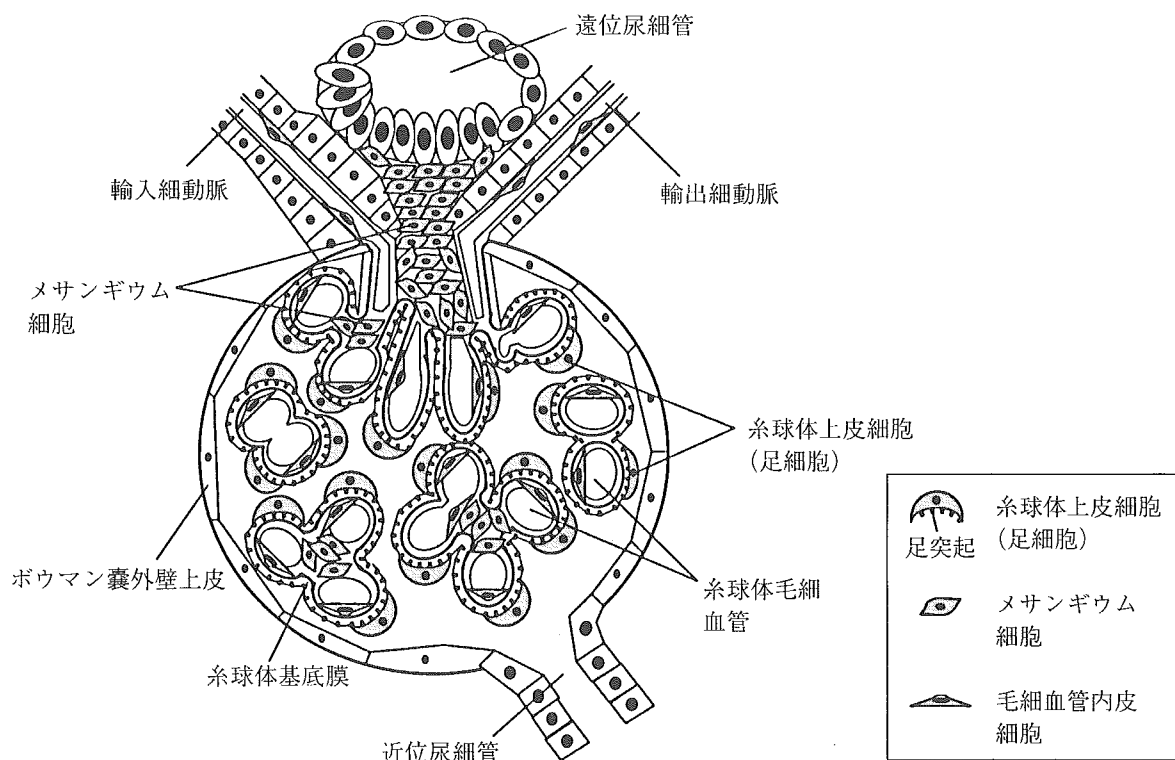


尿管芽が間葉細胞に侵入すると、間葉細胞は尿管芽のまわりに凝集体を作る。凝集体は C 字体を経て S 字体となり、血管前駆細胞を取り込みつつ、遠位で尿管芽と融合する。S 字の部位ごとに遠位尿細管、近位尿細管、糸球体上皮へと分化する。糸球体、尿管、集合管を合わせた腎臓機能の最小構成単位をネフロンと呼ぶ。

図 10.2 ネフロンの発生

マウス胎生 11.5 日目には尿管芽は後腎間葉に侵入し、間葉を凝集させ尿管芽のまわりにキャップ（帽子）状の構造を形成する。逆に後腎間葉は尿管芽の枝分かれを誘導し、自らは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（C字体）を作り、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になり、また上部は遠位尿細管となり尿管芽と合流する。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2層の上皮はボウ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10.3）。

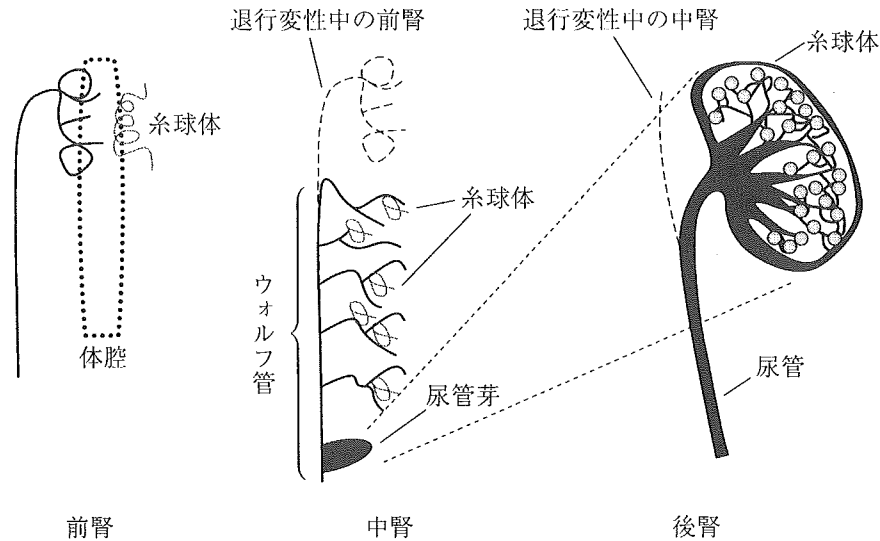


糸球体は、毛細血管網とその支持組織メサンギウムとそれらを覆う内外2層の糸球体上皮細胞、ボウマン嚢外壁上皮細胞からなる球状の小体で、輸入および輸出細動脈と接続しており、血管から原尿を尿細管へと濾過する。この際に毛細血管内皮細胞、糸球体基底膜、および足細胞の三者が濾過膜を形成し、血液の選択的透過を行う。

図10.3 糸球体の構造

糸球体は血液を濾過して原尿を生成する装置であり、ボウマン嚢に濾過された原尿は尿細管のさまざまなイオンチャネルにおいて再吸収を受ける。一方、尿管芽は分岐を重ね、集合管、尿管（腎臓と膀胱を結ぶ部分）となる。

上述のとおり、間葉由来の遠位尿細管は尿管芽由来の集合管に合流するので、これで尿が腎臓から膀胱に向かって流れていくことになる。糸球体、尿細管、集合管を合わせた腎臓機能の最小構成単位をネフロンと呼ぶ。この分化プロセスが、分岐した尿管芽の枝一つひとつで行われ、最終的にヒトでは50万～100万個のネフロンが形成される。これらから流れてきた尿は、小川が大河に注ぐように合流していき、最終的には左右1本ずつの尿管となり膀胱へと注ぐ（図10.4）。後腎間葉から糸球体、近位および遠位尿細管、ヘンレのループとい



前腎は一つのネフロンからなる非常に単純な構造である。中腎はその尾側に発生し、数十のネフロンからなる。後腎はウォルフ管の最も尾側に尿管芽と呼ばれる突起が出現し、その周りに間葉組織が集合して生じる。この尿管芽と後腎間葉との相互作用によって、数百万ものネフロンをもつ後腎が完成する。

図 10.4 前腎，中腎，後腎の発生

う腎臓としての機能をつかさどるかなりの部分が発生することになるため、後腎間葉は多能性をもった前駆細胞集団ともいえる。

後腎と比較して、前腎は一つのネフロンからなる非常に単純な構造である。中腎はその尾側に発生し、数十のネフロンからなる (図 10.4)。哺乳類においては、中腎の一部は男性生殖器となるが、腎臓としての中腎は退行する。爬虫類，鳥類，哺乳類の最終的な腎臓は後腎であるが、魚類，両生類の最終的な腎臓は中腎である。例えばオタマジャクシは前腎であるが、成体のカエルは中腎を使っている。

10.2.2 Zinc フィンガータンパク Sall 1 の単離

腎臓の発生にかかわる遺伝子を網羅的に単離しようと考えたとき、われわれはネフロンが数百万もある後腎より、1個しかない前腎のほうがアプローチが簡単ではないかと考えた。前腎はアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) で解析が進んでおり、特にアニマルキャップアッセイという予定外胚葉を培養して各種臓器を誘導する系が、東京大学の浅島らによって確立している (5章参照)。

アニマルキャップと呼ばれるアフリカツメガエル胚の動物極側の予定外胚葉領域は、正常では外胚葉組織である表皮や神経組織へと分化し、単独で培養すると不整形表皮となる。このアニマルキャップに対し、誘導因子であるアクチビンを適当な濃度で処理すると、筋肉、血球、脊索などの中胚葉組織に分化可能である。このアニマルキャップをアクチビンとレチ

ノイン酸の存在下に生理食塩水のなかで培養すると、わずか3日で三次元の立体構造をもった前腎管が形成されることが示されている。われわれはこの系に着目し、この前腎管を誘導する条件としない条件とで、遺伝子発現の差を検索した (図 10.5)。

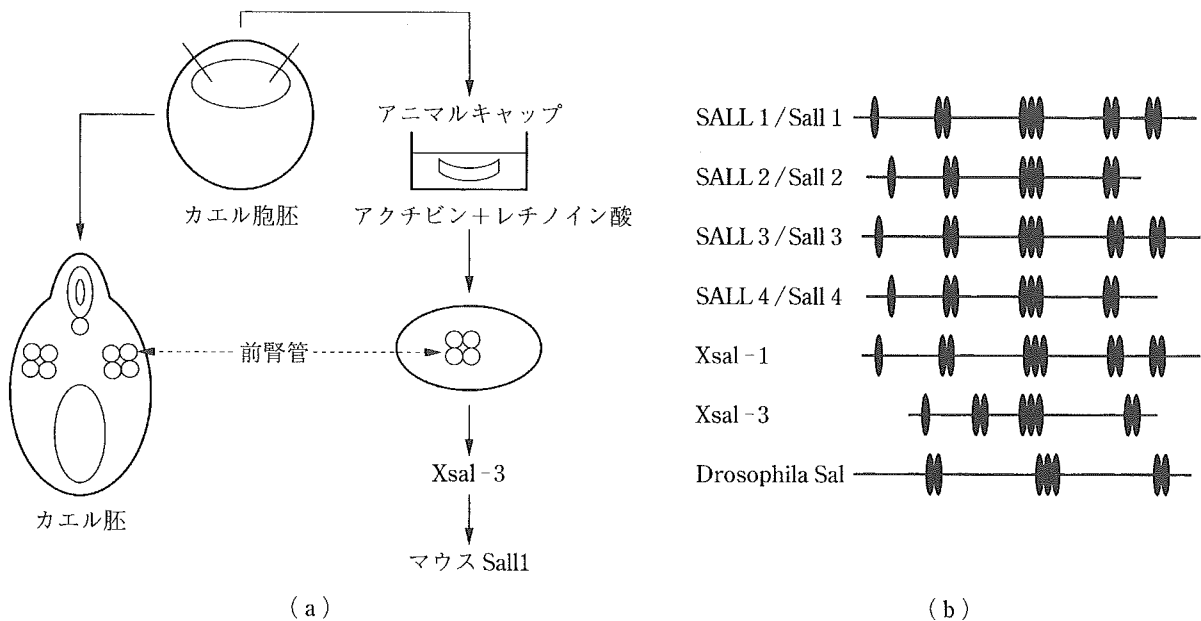


図 (a) は、アフリカツメガエルのアニマルキャップアッセイを用いた Xsal-3 および Sall 1 のクローニング。図 (b) は、Sall ファミリーの遺伝子構造 (卵形が Zinc フィンガーモチーフ)。SALL (ヒト), Sall (マウス)。Xsal の番号とヒト, マウスの番号は必ずしも対応しない。

図 10.5 Zinc フィンガータンパク Sall ファミリー

そのなかで、処理後、9~12 時間のサンプルの比較から単離されたのが、Zinc フィンガードメインを 8 個もつ新規タンパクをコードする遺伝子で、これを Xsal-3 と名づけた。この遺伝子はショウジョウバエの spalt (sal) という遺伝子のホモログで、確かに前腎に発現していた。しかし、そのほかに中枢神経系、耳胞、^{さいきゅう}鰓弓にも発現しており、前腎特異的とはいえなかった。さらにこの遺伝子をカエル受精卵に注入しても、何の変化も起こらなかったため、数あるハズレの遺伝子の一つと思われた。しかし、この遺伝子を指標にマウス後腎から新たな遺伝子が単離でき、これは配列からヒト SALL 1 のマウスホモログと考えられた (図 10.5)。そしてこの遺伝子 (Sall 1) の発現様式を調べたところ、興味深い事実が明らかになった。

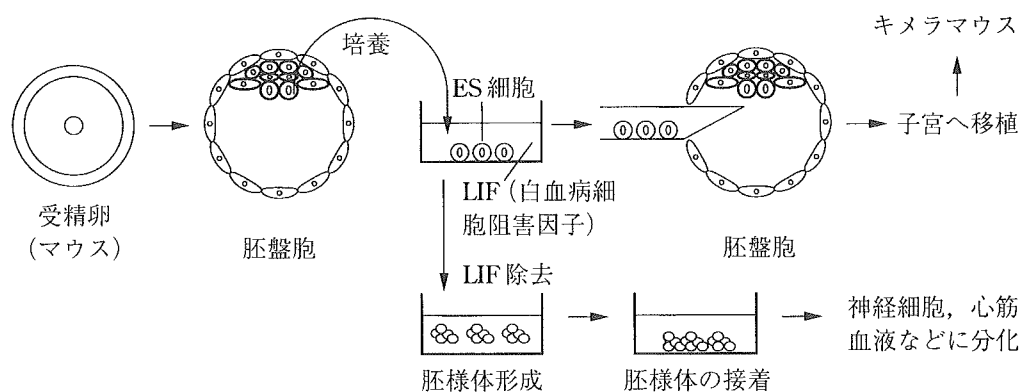
Sall 1 は、尿管芽が後腎間葉に進入する以前 (胎生 10.5 日) から間葉に発現し、侵入時 (胎生 11.5 日) には後腎の尿管芽には発現しないが、それを取り囲む後腎間葉に非常に強く発現していた。つまり、Sall 1 は腎臓前駆細胞集団である後腎間葉に発現していたのである。Sall 1 は腎臓のほかに、中枢神経系、耳胞、心臓、肢芽、肛門などに発現しており、

Xsal-3 との一部類似性が認められた。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に、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もつ可能性が示唆された¹⁾。この Sall 1 の機能の重要性を直接的に証明するには Sall 1 ノックアウトマウス、すなわち Sall 1 だけを欠失したマウスを作成するのが最も効果的である。Sall 1 だけを欠失したマウスが症状を呈した場合、それが Sall 1 の生体内での機能であるという証明になる。逆に何も起こらなければ、この遺伝子はたいては重要ではないのかもしれない。

10.2.3 ノックアウトマウスの作製方法

受精卵の第 1 段階である胚盤胞の内部細胞塊は、その後、胎児全体に分化する多能性幹細胞集団である。ここから樹立された細胞株が ES 細胞である (図 10.6)。ES 細胞とは embryonic stem cell (胚性幹細胞) のことで、この細胞は、未分化状態のままでは無限に培養することが可能であると同時に、ある条件下で血液、神経、心臓の筋肉などさまざまな系列の細胞に分化させることができる。さらに未分化な ES 細胞を別の胚盤胞に注入し、それを子宮に戻すことによって、ES 細胞由来の細胞と胚盤胞由来の細胞が入り交じったキメラマウスが作製できる。つまり、ES 細胞からマウス個体が作製できるわけである。このマウスの生殖腺もキメラになっているので、その精子は ES 由来かホスト由来かのどちらかになり、それが子孫に受け継がれることになる。

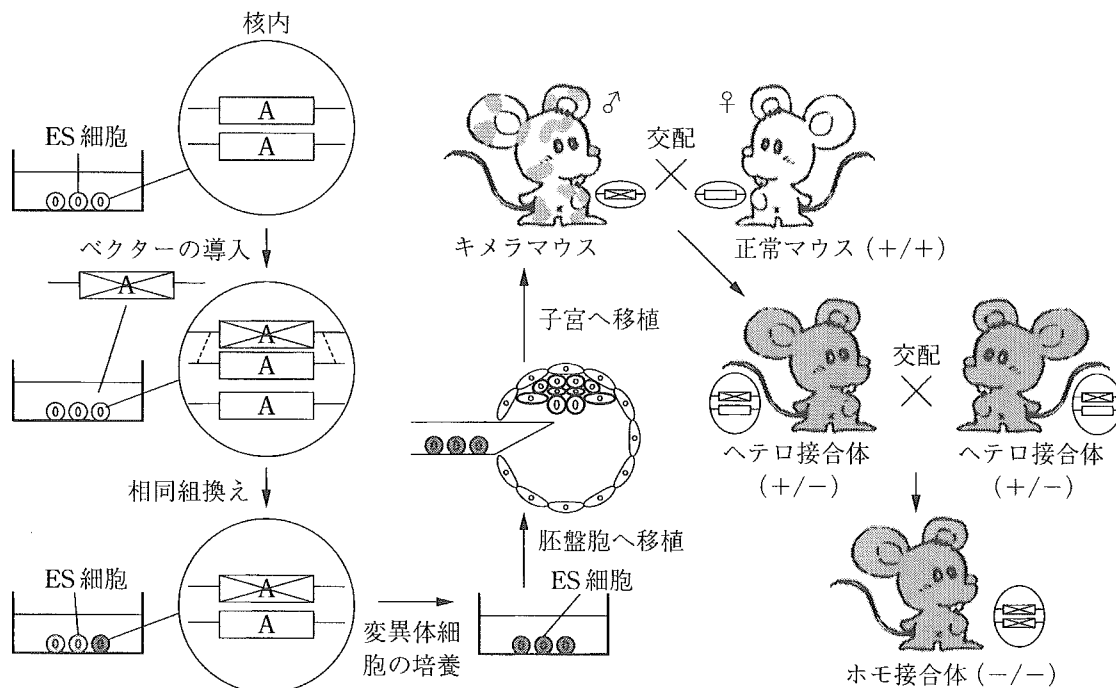
一方、ES 細胞は遺伝子操作が比較的容易で、相同組換えという方法を使って遺伝子のエ



受精卵の第 1 段階である胚盤胞の内部細胞塊は、その後、胎児全体に分化する多能性幹細胞集団であり、ここから樹立された細胞株が ES 細胞である。マウスの場合、LIF (白血病細胞阻害因子) を使用すると効率良く樹立できる。ES 細胞をほかの胚盤胞へ注入し、さらにマウスの子宮へと移植すると ES 細胞由来の細胞と、受け手の胚盤胞由来の細胞の入り交じったキメラマウスが生まれる。ES 細胞を培養皿に付着させず、かつ、LIF なしの状態では培養すると、細胞どうしが凝集しマリモのような胚様体を形成する。これをさらに培養皿に張り付けて培養すると、胚様体がくずれ、さまざまな細胞が分化してくる。

図 10.6 ES 細胞の樹立と分化

クソンなりイントロンなり、好きなところを欠失させることができる (図 10.7)。哺乳類は 2 倍体なので、二つある遺伝子座の一方が欠失した ES 細胞ができるわけである。そのうえでキメラマウスを作製し、それを正常なメスと交配させて ES 細胞由来の精子と正常なメスの卵子から子孫ができると、半分の子孫が欠失した遺伝子を受け継ぐ。これをヘテロ接合体と呼び、二つある遺伝子座の一方が欠失していることになる。このヘテロ接合体どうしを交配すると、メンデルの法則により 4 分の 1 の確率でホモ接合体、つまり二つの遺伝子座がともに欠失するマウスが完成する。これがノックアウトマウス作製の概要である。この遺伝子改変マウスの作製技術の開発によって生命科学は飛躍的に進歩を遂げた。



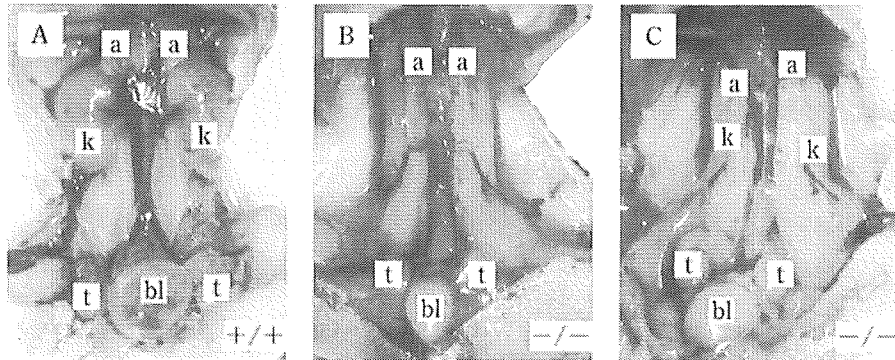
ES 細胞は細胞内にベクターを導入することで、相同組換えを起こし、好きなところを欠失させることができる。このように目的の遺伝子を欠失させた変異体 ES 細胞のみを培養し、胚盤胞へと移植し、それを仮親のマウスの子宮へ移植するとキメラマウスが生まれる。このとき、ES 細胞と胚盤胞の毛色が異なるように設定すれば、毛色の混じったマウスが生まれる。キメラマウスのオスと正常なメスとを交配させることで、ES 細胞由来の精子 (目的遺伝子を欠失している) と正常なメスの卵子から子孫ができると、二つある遺伝子座の一方が欠失したヘテロ接合体ができることになる。このヘテロ接合体どうしを交配すると、ホモ接合体、すなわち二つの遺伝子座をともに欠失するマウスが完成する。

図 10.7 ノックアウトマウスの作製法

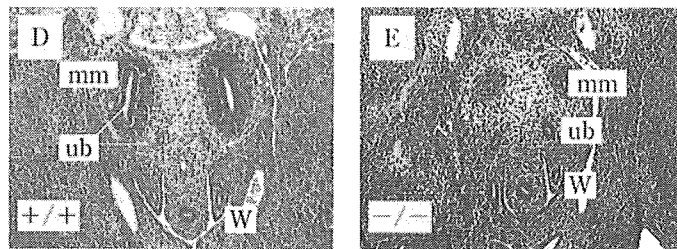
10.2.4 Sall1 は腎臓発生に必須である

この技術を利用して Sall1 を欠失するマウスを作製した。ヘテロ接合体どうしを交配して生まれたマウスの 4 分の 1 が生直後に死亡し、これらはすべてホモ接合体、つまり Sall1 ノックアウトマウスであった。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（図10.8，口絵21参照）。Sall1は腎臓以外でも発現しているにもかかわらず，ほかの臓器には明らかな異常は認められなかった。これによって，Sall1は腎臓の発生にきわめて重要であることが証明された¹⁾。



図A～Cは生直後の腎臓（図中のk）を示したものであり，図Aが正常マウス，図BとCがノックアウトマウスである。図Bでは腎臓の完全欠失が認められるが，図Cでは一部痕跡的な腎臓が認められる。また，図BとCでは，ともに膀胱（図中のbl）に尿は認められない。副腎（図中のa）と精巣（図中のt）は正常である。



図D，Eは胎生11.5日の後腎を示したものであり，図Dが正常マウス，図Eがノックアウトマウスである。正常マウスでは，尿管芽（図中のub）がウォルフ管（図中のW）から分岐し，その周囲に間葉細胞（図中のmm）が集合しているが，ノックアウトマウスでは間葉までは侵入していない。

図10.8 Sall1ノックアウトマウスにおける腎臓異常（口絵21参照）

10.2.5 そのほかのSallファミリーの機能

ヒトとマウスではSall1以外にもSall2, 3, 4と，合計四つのSall関連遺伝子が知られている（図10.5参照，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起こすことが報告されている²⁾。これは，多指症，外耳や内耳の異常を主体とし，時に腎臓や心臓の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ヘテロ欠失体がまった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。Townes-Brocks症候群では，Sall1遺伝子の変異によ