

ってC端を欠いた Sall 1 の N 端のみの欠損型タンパクが発現していると考えられ、Sall 1 の N 端タンパクが Sall 1 を含むすべての Sall と相互作用し、Sall タンパク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）としてはたらくことに起因することが示唆されている<sup>3)</sup>。

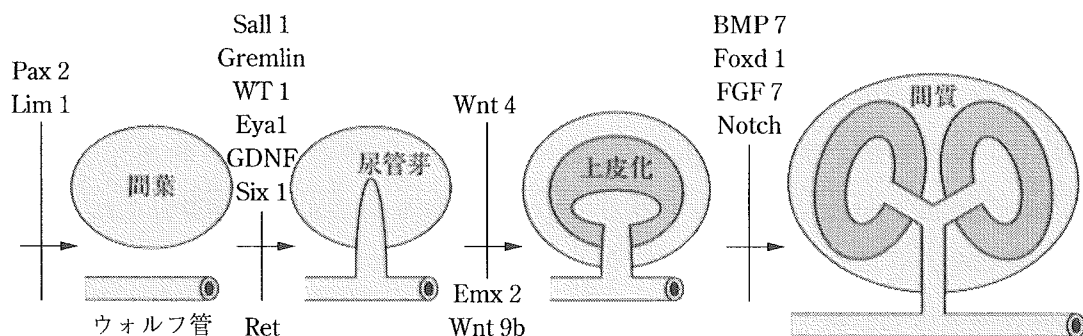
われわれが作製した Sall 2 欠失マウスは、外見上異常な表現型を示さず生存した<sup>4)</sup>。また、Sall 1 との二重欠失マウスを作成しても、Sall 1 の表現型をさらに重篤にすることはなかった。Sall 3 欠失体は周産期致死で咽頭や脊髄の発生に異常がみられるが、ほかの臓器では異常がみられない<sup>5)</sup>。しかし、Sall 1 と Sall 3 の二重欠失マウスを作製したところ、指の形成に異常が生じた。これは、Sall 1 と Sall 3 が一部の機能を補填し合っていることを示唆する。Sall 4 は眼の動きや手の異常を特徴とし、聴覚の欠失、心臓や腎臓の異常等の症状を示す遺伝病 Okihiro 症候群の原因遺伝子である<sup>6)</sup>。われわれが Sall 4 欠失マウスを作製したところ子宮着床直後に死亡し、さらに ES 細胞でも Sall 4 が必須であるということが判明している。つまり、腎臓と ES 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出てきている。

### 10.3 腎臓発生の分子機構

ここで腎発生の機構を、おもに分子に焦点を当てて順に解説する。これによって Sall 1 がどの過程に重要なのかを含め、腎臓全体の発生について理解して欲しい。

#### 10.3.1 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。つまり後腎間葉から尿管芽へ、逆に尿管芽から後腎間葉へ、という2方向のシグナルが存在するわけである。まず前者について述べる（図 10.9, 10.10 (a)）。



縦線は各遺伝子のノックアウトによって発生が障害される時期を示す。

図 10.9 腎臓発生の過程ではたらく遺伝子

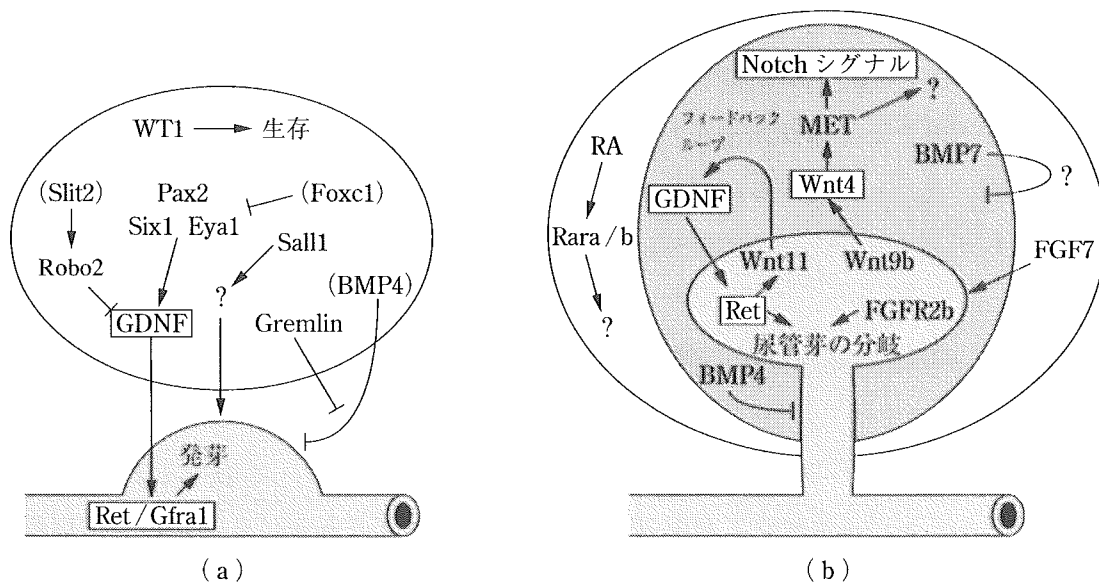


図 (a) は胎生 10.5 マウス後腎間葉における遺伝子カスケード。括弧付きの遺伝子は後腎管よりも前部の間葉で発現し、尿管芽の異所的な発芽を抑えている。図 (b) は尿管芽の間葉への侵入後の遺伝子カスケード。

図 10.10 腎発生における遺伝子の機能模式図

GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) は、後腎間葉から分泌される TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 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させ伸長させる機能をもつ、腎臓発生において非常に重要な分子である<sup>7)</sup>。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  $\alpha$ 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。この GDNF-Ret/Gfra 1 シグナルが入らないマウスでは、尿管芽が発芽しない、あるいは発芽しても伸長しないという表現型を示す<sup>8),9)</sup>。また Ret は犬の腎臓由来である MDCK 細胞において、細胞接着性を減少させ運動性を高めることが知られている<sup>10)</sup>。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、さらに接着性を弱めることで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。

ノックアウトマウスの解析によって、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), とした転写因子は GDNF の発現制御を介して尿管芽の形成に必須であることが知られている。Pax 2 と Six 1 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おり<sup>11)</sup>, Eya 1 は脱リン酸化酵素活性をもち Six 1 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<sup>12)</sup>。また逆に、後腎間葉よりも前部 (頭側) の間葉には、Foxc 1 (forkhead box c 1), BMP 4 (bone morphogenic protein 4), Slit 2 (slit

homolog 2) といった尿管芽発芽シグナルを抑制する因子が発現している。転写因子 Foxc 1 は GDNF や Eya 1 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<sup>13)</sup>。同様に液性因子 Slit 2 は受容体 Robo 2 (roundabout homolog 2) を介して GDNF の発現を抑制している。ただし、Slit 2, Robo 2 のノックアウトマウスでは Eya 1, Pax 2 の発現は上昇しておらず、Eya 1 や Pax 2 以外にも GDNF を制御するような未知の経路の存在が予想される<sup>14)</sup>。

このように GDNF は尿管芽の発芽伸長に必須であるが、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 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<sup>15)</sup>。BMP は GDNF とは独立に尿管芽の発芽や伸長を抑制していると考えられており、BMP のアンタゴニストである Gremlin の欠失によって BMP シグナルがさらに増強し、尿管芽の伸長が抑制されたと思われる。

さて、われわれの作成した Sall 1 ノックアウトマウスではどうだろうか。このマウスでは後腎間葉が形成されるが、小さく、尿管芽も形成される。しかし尿管芽は後腎間葉に侵入していないか、あるいは侵入しても、その後の分岐は著明に障害されていた (口絵 21, 図 10.8 参照)<sup>1)</sup>。つまり Sall 1 は、上述の遺伝子群と同様、尿管芽の伸長という、後腎発生の最も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 10.9, 10.10 (a) 参照)。後腎間葉に Sall 1 が発現することによって、尿管芽を引き寄せる何らかの因子が分泌されると考えられる。その一番の候補は当然 GDNF であるが、Sall 1 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。これは GDNF のほかに、Sall 1 の支配するもう一つ以上の何らかの液性因子が存在するか、もしく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。

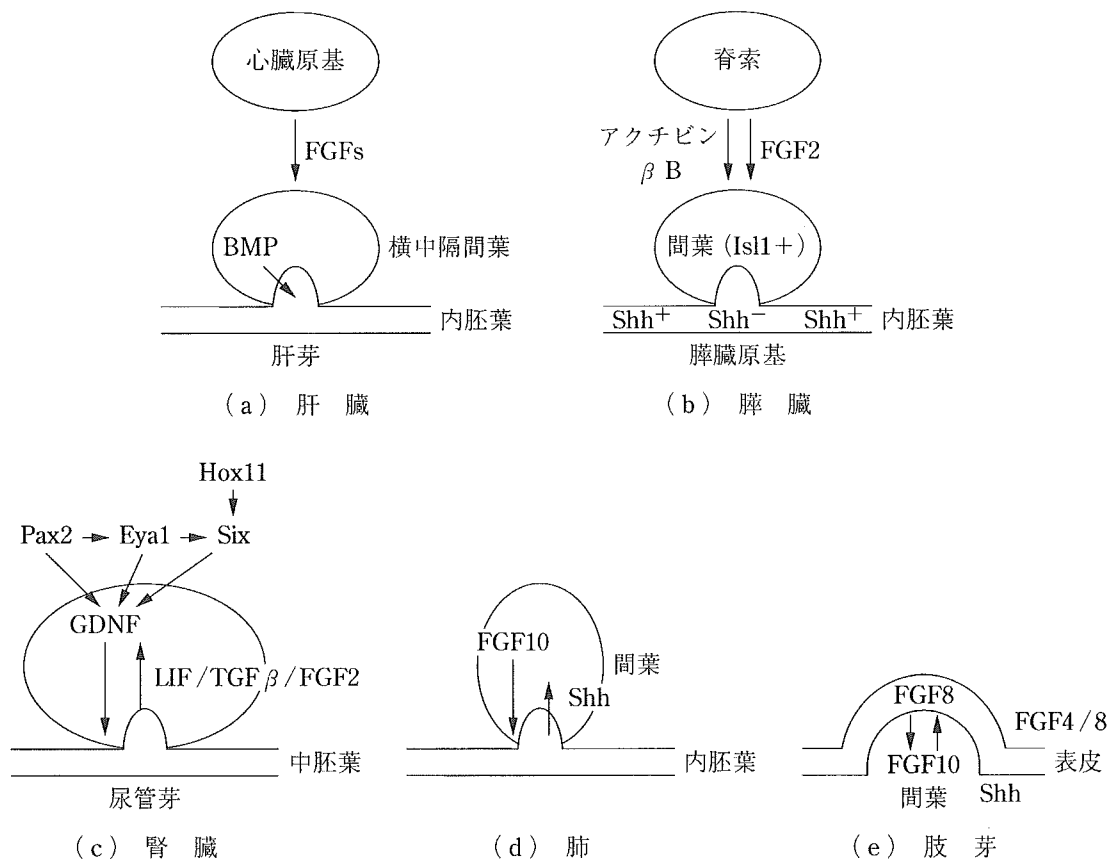
### 10.3.2 尿管芽の分岐

GDNF-Ret/Gfra 1 シグナルは尿管芽の発芽だけでなく、尿管芽が後腎間葉に侵入した後の分岐 (枝分かれ) にも重要なシグナルである (図 10.10 (b) 参照)<sup>16)</sup>。実際に前述の Foxc 1, BMP 4, Slit 2, Robo 2 等の 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。

GDNF-Ret/Gfra 1 シグナル以外にも尿管芽の分岐にかかわる因子は同定されている。例えば、細胞表面タンパクである Glypican 3 のノックアウトマウスでは尿管芽や集合管の増殖能が高まっている<sup>17)</sup>。Glypican 3 を含むプロテオグリカンファミリーには、ヘパラン硫酸鎖が修飾されており、これが FGF (fibroblast growth factor) や Wnt といったリガンドに

結合して、そのシグナル伝達に影響している。つまり Glypican 3 は尿管芽の増殖因子に対する応答性を低下させ、その増殖能を抑制するはたらきをもつと考えられている。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  $\alpha/\beta$ ) 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<sup>18)</sup>。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 2b を介して尿管芽の成長・分岐を制御している<sup>19)</sup>。

このように、尿管芽の伸長・分岐の機構は GDNF-Ret/Gfra 1 シグナル以外にも、プロテオグリカン、種々の増殖因子、間質からのシグナル等、さまざまな異なる因子により複雑に制御されている。こういった分岐の機構は腎臓だけでなく、さまざまな臓器の形成にもかかわる。肺、肝臓、膵臓、乳腺、唾液腺などは分岐した管腔上皮の周りに間葉が集合して構成されるので、その分岐機構にかなり共通の分子、例えば BMP, FGF, sonic hedgehog (Shh) などを使用しており、これらは肢芽の形成にも共通している (図 10.11)。



上皮の分岐機構にはかなり共通の分子、例えば BMP, FGF, sonic hedgehog (Shh) 等がかかわっている。

図 10.11 さまざまな臓器における上皮-間葉相互作用の共通性

体内に向かって分岐していく管腔構造は、体外に向かって分岐していく肢芽の位相的な裏返し、つまり体内に伸びていく指と考えれば、その共通性が理解されるであろう。もちろん、大雑把な共通性とともに関器によって異なる点（例えば GDNF は腎臓のみではたらくなど）も存在することは理解しておかなければならない。

### 10.3.3 間葉の上皮化

今度は、尿管芽から後腎間葉へのシグナルについて述べる。たいていの臓器は上述の間葉と上皮（腎臓における尿管芽）と相互作用、および上皮の分岐で説明できるのであるが、腎臓はこれにさらにひとひねりが加わる。それは間葉自体も上皮になり（つまり管を形成し）、尿管芽由来の上皮とつながるということである。この間葉の上皮化を MET (mesenchymal-to-epithelial transformation) と呼んでいる。この MET によって糸球体、近位および遠位尿細管、ヘンレのループという腎臓としての機能をつかさどるそのかなりの部分が分化してくることになる。

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、*in vitro* の系を使えば尿管芽の侵入がなくとも上皮化することができる。後腎間葉は、例えば胎児脊髄との共培養により、尿管芽なくして 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。この本体は Wnt 4 であることが判明している<sup>20),21)</sup>。つまり Wnt 4 が間葉で発現するとそれが間葉自身にはたらく、MET が促進されるということである。実際、脊髄からは Wnt 4 が分泌されているし、Wnt 4 ノックアウトマウスでは MET が起こらない (図 10.9, 10.10 (b) 参照)。しかし Wnt 4 は尿管芽では発現しておらず、尿管芽から分泌され後腎間葉を上皮化するような、真の誘導物質の同定が待たれていた。いままでに、LIF (leukemia inhibitory factor) や FGF 2, TGF- $\beta$  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はたらくと間葉に Wnt 4 が発現し、その作用によりさらなる上皮化が進行する<sup>22),23)</sup>。しかし、その候補因子の多くがノックアウトマウスの解析において腎発生に軽度な表現系しか示さないなかで、尿管芽から分泌される Wnt 9b が後腎間葉の MET に必須であるとの報告がなされた。

Wnt 9b のノックアウトマウスでは、尿管芽は発芽し後腎間葉へ侵入するが、後腎間葉の MET 後、マーカー遺伝子である Wnt 4 や FGF 8, Pax 8 が発現していない、つまり MET を起こさないことがわかった<sup>24)</sup>。これによって Wnt 4 の上流で、かつ尿管芽から分泌される最も初期の液性因子が同定されたことになる。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 9b を含めた尿管芽からのシグナル伝達が必須であると考えられる。このほかにも、尿管芽で発現しているホメオボックス型転写因子 Emx 2 (empty spiracles homolog 2) のノックアウトマウスでは、尿管芽

が発芽し後腎間葉に侵入するが、上皮化が誘導されず、その際に後腎間葉で発現するはずの Wnt 4 が発現しないことがわかっている<sup>25)</sup>。よって、この因子も Wnt 9 b-Wnt 4 の経路にかかわっている可能性がある。

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、C 字体・S 字体から尿細管、糸球体へと転換していく。Frizzled には Wnt への結合能をもつ分泌型のホモログである sFrp (secreted Frizzled-related proteins) が存在するが、sFrp 1 は間質に発現して Wnt シグナルを抑制し、逆に sFrp 2 は上皮化の進行した部分に発現して Wnt シグナルを亢進することで上皮化の促進をしている<sup>26)</sup>。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、そのノックアウトマウスでは間葉が S 字体を形成した辺りでアポトーシスが進行し発生が停止する<sup>27)</sup>。また *in vitro* の実験系では、BMP 7 は間質の増殖を促進しつつ間葉の分化を抑制した。これは BMP 7 が間葉細胞のアポトーシスを抑制して生存させる機能をもつだけでなく、間質の増殖も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機能をもつためと考えられている<sup>28)</sup>。

最近の興味深い報告に、Fraser 症候群の原因遺伝子 Fras 1 (Fraser 1) とその結合タンパク、Grip 1 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。Fras 1 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タンパクである。そのノックアウト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<sup>29)</sup>。Grip 1 のノックアウトマウスも同様の表現型を示している。Grip 1 は PDZ ドメインをもつタンパク質で、後腎での発現位置は Fras 1 と共局在する。*in vitro* の実験で Grip 1 は Fras 1 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<sup>30)</sup>。このように、Fras 1/Grip 1 は尿管芽の後腎間葉と直接接触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。

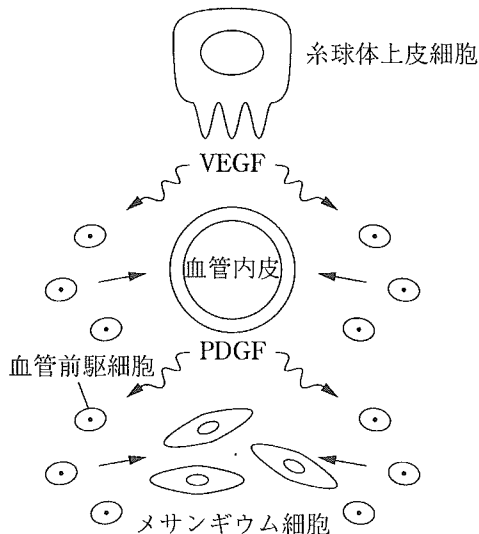
#### 10.3.4 糸球体形成

糸球体は、血液を濾過して原尿を生成する装置であり、腎臓において最も重要な機能の一つをつかさどる。糖尿病、慢性腎炎などではこの糸球体がおもに障害されるため、糸球体をどうやって再生できるかは臨床的に大きな問題である。糸球体は、毛細血管とその支持組織メサンギウムと、それらを覆う糸球体上皮とボウマン嚢上皮の二層の上皮から構成される (図 10.3 参照)。いわば、糸だまのように折りたたまれた毛細血管を上皮組織が包んだような形状をしており、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 (足細

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ウマン嚢に放出される。

糸球体上皮(足細胞)は後腎間葉由来の組織であるが、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。

糸球体における血管内皮分化誘導因子としては VEGF (vascular endothelial growth factor) が知られている。形成された糸球体上皮細胞から分泌された VEGF は、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(図 10.12)。これは糸球体上皮特異的に VEGF をノックアウトしたマウスで、血管内皮が形成されないことで証明される<sup>31)</sup>。ついで血管内皮から PDGF-B (platelet-derived growth factor, B polypeptide) が分泌され、その受容体 PDGFR- $\beta$  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。実際この PDGFR- $\beta$  のノックアウトマウスでは血管周皮とメサンギウムが欠失することが報告されている<sup>32)</sup>。つまり糸球体上皮細胞が VEGF を発現して血管内皮を呼び込み、さらに血管内皮が PDGF-B を分泌してメサンギウム細胞を呼び込むという図式である。



糸球体上皮細胞が VEGF を分泌して血管内皮の分化を誘導し、さらに血管内皮が PDGF-B を分泌してメサンギウム細胞の分化を誘導する。

図 10.12 糸球体上皮細胞からの誘導過程

また、糸球体上皮細胞の機能も近年注目を浴びている。この細胞は基底膜に向かって多数の足突起を出しているので、足細胞, podocyte (タコ足細胞の意味) とも呼ばれている(図 10.3 参照)。この多数の足突起どうしの間にはネフリン (nephrin) などの細胞外因子が伸び、それらが絡み合って非常に小さな分子の篩ふるいを形成している。これによって血液に含まれる大切なタンパクが尿に漏れないようになっており、これが障害されるとタンパク尿となり、いわゆるネフローゼ症候群が引き起こされる<sup>33)</sup>。基底膜も細かい分子の篩を形成してお

り、糸球体は二重のメッシュをもつことになる。このように糸球体上皮細胞（足細胞）は上述したように VEGF を分泌して糸球体内に血管を呼び寄せるとともに、血管からのタンパクの漏出を防いでいる重要な細胞である。この発生機構が注目されているのも当然であろう。

Notch シグナルは進化的によく保存された細胞内シグナル伝達経路で、多くの生物種で細胞運命の決定や組織発生に重要な役割をもつ。Notch シグナルは Notch の細胞内ドメイン NICD (Notch intracellular domain) が  $\gamma$ -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タンパク Presenilin の欠如したマウス腎臓では、MET は開始されるものの C 字体・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細胞（足細胞）が形成されないことが報告された<sup>34)</sup>。また、Notch 2 活性の非常に低下したマウスの糸球体では、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<sup>35)</sup> (C 字体・S 字体は形成される。前述の Presenilin の欠損は Notch 1~4 のシグナル伝達を阻害するので、よりシビアな表現型になったと考えられる)。ただし、糸球体の数そのものも大きく減少しており、Notch 2 シグナルが糸球体形成の複数の段階で必須であることは間違いない。

MET を起こしたあと、後腎間葉がどの方向に分化するのかの運命決定機構は、長い間解明されていなかったが、このように Nocth シグナルが関与することがわかってきた。今後この過程を詳しく調べることによって、自由に糸球体や近位および遠位尿細管を作れるようになるためのヒントが得られるはずである。

#### 10.4 尿の流れが発生を制御する

これまでは、遺伝子のカスケードによって腎臓が発生することを述べてきたが、後期の腎臓発生、特に尿細管の増殖が適切にコントロールされ管が正しい太さに維持されるためには、さらに機械的刺激が必要なことが明らかになってきた。Pkd 1, 2 をはじめとする一群の遺伝子群の異常によって尿細管が異常に拡大し、腎嚢胞を呈することが知られている<sup>36)</sup>。特に pkd 1 の異常は常染色体優性遺伝する腎嚢胞症 (polycystic kidney disease, PKD) を呈し、透析に至る疾患のなかで遺伝性のもものでは第 1 位を占めている。これらの遺伝子産物は尿細管に存在する繊毛 (cilia) に局在することが判明し、尿が流れてこの繊毛が動かされることによって、カルシウム流入をはじめとするシグナル系が動き、尿細管の過増殖を抑えていると考えられる<sup>37)</sup>。この繊毛によるシグナルが障害されると尿細管が増殖し過ぎて腎嚢胞が形成されるわけである。

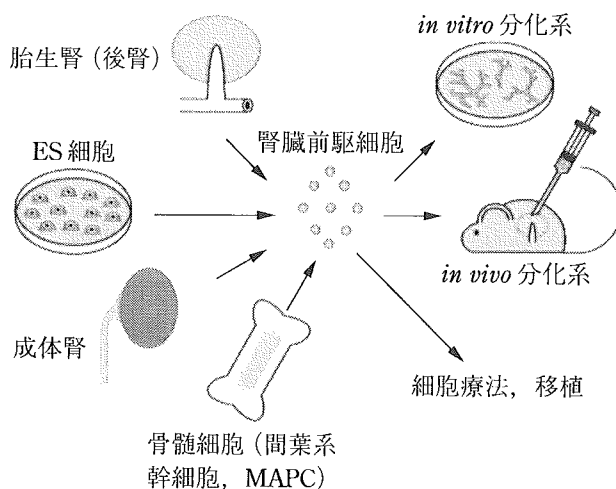
おもしろいことに、繊毛のシグナルにかかわる遺伝子群のノックアウトマウスの多くは、左右軸の異常も伴う。臓器は完全な左右対称ではなく、肝臓は右に、脾臓は左にあるし、心



臓も左に寄っている。腸の位置も左右非対称である。これらの左右差は、発生初期の胎児のノードと呼ばれる場所で最初に決定されるが、ここには繊毛が生えており、繊毛が動くことによって右から左に向けてのわずかな液の流れができています。これによって遺伝子が左右非対称に発現することが明らかになっている<sup>38)</sup>。Pkd 1, 2 をはじめとする繊毛の遺伝子群はここでもはたらいており、共通の遺伝子群が左右軸形成と腎嚢胞症に重要なはたらきをもっていることになる<sup>39)</sup>。現在、この繊毛シグナルの下流が精力的に研究されている。

## 10.5 腎臓は再生できるか

腎臓に再生医療が応用されるのは、ほかの臓器と比較しても最後だろうと考える人が多い。膵臓ならインスリン産生性 $\beta$ 細胞、パーキンソン病ならドーパミン産生ニューロンといったように、1種類の細胞を誘導できさえすれば治療が可能になる。しかし、腎臓においてはそういう細胞は存在せず、多種類を誘導したのち、それらが三次元立体構造をもって構築され、さらにそれが血管系と結合される必要がある。これが実現するのは現時点では確かに困難である。よって1種類の細胞が障害されているような病態、例えば podocyte だけが障害されている状態に、podocyte を誘導し治療するという方法が最も実現に近いと思われる。あるいは尿細管細胞を誘導し、あとに述べる細胞工学的デバイスと組み合わせることも考えられる。腎臓細胞を誘導するもとなる細胞としては、何が適切だろうか。可能性のあるものとして ES 細胞、骨髄幹細胞、成体、あるいは胎児の腎臓などが挙げられる (図 10.13)。



胎生腎 (後腎間葉), ES 細胞, 成体腎, 骨髄細胞などから前駆細胞を誘導し, *in vitro* および *in vivo* のアッセイ系を確立したのち, 細胞療法などの再生医療に活用する。

図 10.13 腎幹細胞研究および再生医療開発の展望

### 10.5.1 ES 細胞からの誘導

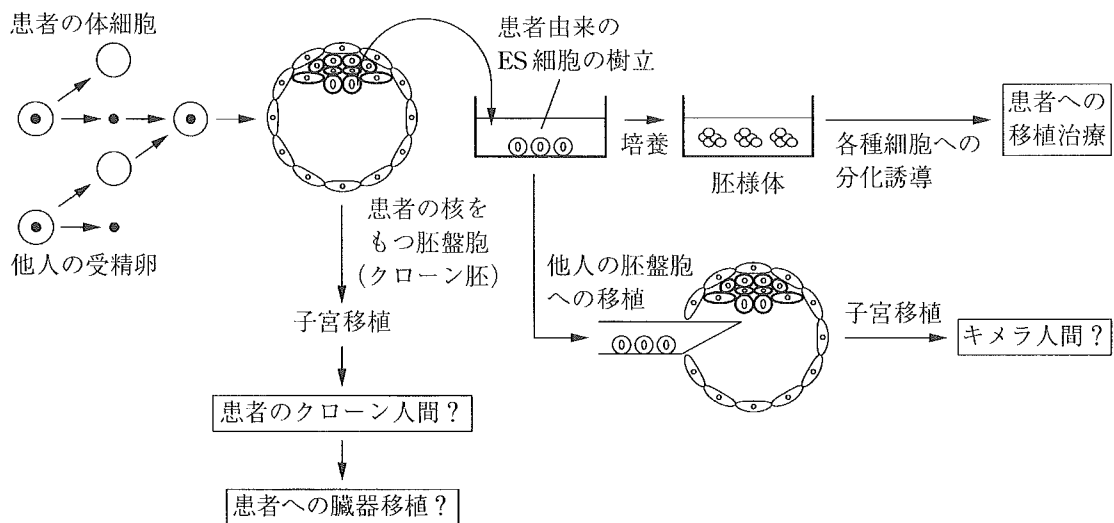
〔1〕 ヒト ES 細胞の樹立 ES 細胞は前述のとおり多分化能をもつ細胞だが、1998 年にヒトの ES 細胞が樹立され、この分野は新たな展開を迎えた<sup>40)</sup>。つまりマウスの場合と同様に、ヒト ES 細胞から各種臓器細胞を試験管内で作ってヒトに移植するというのが夢物

語でなくなってきたわけである。

例えば、糖尿病治療のためにインスリンを産生する膵臓細胞を作って移植する、パーキンソン病にドーパミン産生細胞を移植する、アルツハイマー病や脊髄損傷に神経細胞を移植する、心筋梗塞に心筋細胞を移植する、といったことが考えられる。実際、ヒト ES 細胞から血液細胞や神経細胞、肝臓細胞は誘導できる。しかしヒトでもマウスでも三次元の立体構造を伴った形態形成は起こらず、しかも各種細胞が入り交じった状態で分化してくる。

移植を目標としたときに問題となるのは、目的とする純粋な細胞群を誘導単離することである。例えば、神経を誘導して移植したつもりが骨や肝臓などもできてしまったら不都合であるし、未分化状態の ES 細胞が残っていると、そこから奇形腫と呼ばれる腫瘍が生じることが明らかになっている。よって、できるだけ純粋な細胞集団を誘導し、集める方法を開発する必要がある。

〔2〕 自分の ES 細胞は作れるか さて、ヒト ES 細胞から各種臓器の細胞が誘導可能になったとして、さらにどんな問題が残っているか。他人の ES 細胞から作った細胞の場合、当然、免疫による拒絶反応が出現する。それに対して自分自身の ES 細胞を作ってそれから目的細胞を誘導すれば、拒絶反応はあり得ないので理想的である。それにはクローン技術を使えば理論的には可能である (図 10.14)。



患者の体細胞、例えば皮膚の細胞から核を取り出し、他人から提供された核を除いた受精卵に入れ、患者由来の核をもった受精卵、そして胚盤胞を作る。そこから患者の核をもった ES 細胞を樹立し、患者に完全に適合する各種細胞を誘導し移植する。しかし、クローン化した胚盤胞をそのまま子宮に戻してしまうと、患者自身のクローン人間が生まれる可能性があり、それを自分の治療に使うという事態も考えられる。また患者の ES 細胞を他人の胚盤胞に戻して子宮移植を行うとマウスと同様にキメラ人間が誕生する可能性もある。このように ES 細胞を使った治療は両刃の剣であることを理解しなければならない。

図 10.14 ES 細胞を使った医療の可能性

自分の体細胞、例えば皮膚の細胞の核を取り出して、核を抜いた受精卵に入れクローン胚を作る。これを胚盤胞の段階まで発生させそこから ES 細胞を樹立すれば、これは自分自身の ES 細胞である。この ES 細胞から作った細胞はすべて拒絶反応なしに自分に移植することができる。ES 細胞は無限に増えるし凍結保存もできるので、いったん作っておけば将来どんなところにも移植可能になるはずである。

一見、夢のような技術であるが、倫理的な問題がいくつもある。まず、クローン胚作成用の受精卵はどこから調達するのか。不妊治療用に体外受精した卵の余りがあるが、クローンを作るといって他人からもらえるのか。この受精卵は子宮に戻せばヒトが誕生するわけだが、これを使ってよいのか。また、核を自分のものに入れ替えたクローン胚も、同様に子宮に戻せば自分自身のクローン人間が生まれる可能性がある。これをばらばらにして ES 細胞を作ってよいのか。さらには ES 細胞を他人の受精卵に戻せばキメラ人間の作成が可能になるかもしれないし、遺伝子操作された人間が作られるかもしれない。つまりどこからが生命なのか、どういうルールのもとに行うのか、といったはっきりした厳しい規制を設けなければ、非常に危険なものになる可能性が高いのである。

現在、クローン人間作成はもちろん禁止されているが、2004年7月に政府の生命倫理専門調査会により、再生医療の研究目的でのヒトクローン胚の作成容認の報告書が発表された。これにより ES 細胞を使った治療に現実味が増し、研究が加速すると考えられる。

〔3〕 ES 細胞から腎臓誘導への試み ES 細胞からの腎臓誘導に関する報告はほとんどなく、ES 細胞を腎皮膜下に移植して形成された奇形種 (teratoma) 中に、糸球体様構造が形成されることや<sup>40)</sup>、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) や神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) 下で分化させて、レニンを発現する細胞が誘導されたことぐらいである<sup>41)</sup>。これはあとで述べるように、腎臓のアッセイが確立していないことが大きな原因であり、ほかの臓器に比べ立ち遅れている。

そもそもヒト ES 細胞自体がヒト受精卵 (胚盤胞) から樹立されているので、ES 細胞はヒトの生命を犠牲にして作られたと考えることもできる。胚盤胞は、現在、数多く行われている妊娠中絶の胎児よりもずっと早期であるが、それはヒトの生命といえるのだろうか。こういった問題からヒト ES 細胞の樹立はタブーとされ、米国においても政府予算は下りなかった。そこでこの規制を受けないベンチャー企業が出資して、ヒト ES 細胞が樹立されたわけである<sup>40)</sup>。いったんヒト ES 細胞ができてしまうと企業の独走を許しては危険だという機運が生まれ、1999年にクリントン政権下の米国ではヒト ES 細胞の研究が解禁されたが、その後、保守派のブッシュ政権下では厳しく制限されている。日本では厳しい制限付きで認められ、京都大学が国産のヒト ES 細胞の樹立に成功している。科学的・倫理的な厳密な審査を通過した研究室だけが、このヒト ES 細胞を使用できるしくみになっている。

### 10.5.2 骨髄幹細胞からの誘導

ES細胞以外に使える幹細胞はないのであろうか。骨髄に存在する間葉系幹細胞はその候補である。間葉系幹細胞からは、骨、脂肪、骨格筋、さらには心筋細胞までも分化誘導可能である。骨髄細胞の一部を精製し、心筋梗塞を起こしたマウスの心臓に注入したところ、心臓の筋肉となって生着したとの報告もある。間葉系幹細胞は、本人の骨髄から分離可能なので倫理的問題は存在しない。ただし、ES細胞のようにほぼ無限に未分化のまま増殖させることは、いまのところできていないし、あらゆる種類の細胞に分化できるわけではないので、その可能性は限られるが一部は実用化されつつある。

骨髄中のもう一つの幹細胞である血液幹細胞にも、移植によって同様の多分化能があることが多く発表されている。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の細胞と融合したものである疑いが生じている<sup>42)~44)</sup>。

これによって、一度はES細胞から体性幹細胞に傾きかけた流れが止まり、両者併存の形で研究が進んでいる。腎臓においても骨髄や造血幹細胞を移植した場合、メサンギウム細胞や尿細管細胞に分化したとの報告がある<sup>45),46)</sup>。しかし、特に後者は細胞融合の可能性は否定されていない。

将来的には、まずES細胞からの誘導方法を確立したのち、体細胞を未分化な状態に戻し(つまりES細胞化し)、誘導をかけるということを目指すことになると思われる。そのためには核のリプログラミング機構の解明なども必須であろう。つまり、幹細胞と体細胞とでは何が共通で、何が異なるのかを明らかにすることが重要であり、その意味でSallファミリーが幹細胞と腎臓ではたらいっているというわれわれの結果は、この問題にヒントを与えてくれるのではないかと期待している。

### 10.5.3 成体腎からの腎臓前駆細胞単離

臨床的な応用面から考えて、体性幹細胞からの細胞療法や臓器再生が検討されている。骨髄、神経、皮膚、肝臓、生殖腺など多くの臓器において臓器特異的体性幹細胞が同定されているが、腎臓においては現時点で明らかなものは報告されていない。

候補として、近年注目されたside population (SP)細胞がある。DNA結合色素のHoechst 33342を強く排出する性質で定義された細胞群で、骨髄中では造血幹細胞の分画に含まれる<sup>47)</sup>。よって、ほかの臓器でもSP細胞に体性幹細胞を含む可能性があると考えられた。しかし、成体ラット腎のSP細胞を経静脈的に移植した報告<sup>48)</sup>をはじめ、腎においてSP細胞が成体腎の幹細胞であると考えられる報告はまだない。

#### 10.5.4 胎児腎臓からの腎臓前駆細胞単離

このように、腎臓の再生を目指して、腎臓幹細胞あるいは前駆細胞の同定や骨髄幹細胞やES細胞等を用いて、腎臓前駆細胞の誘導を目指す研究が多数行われている。しかし移植により証明される分化能は、単なるホストの細胞と融合したものである疑いが生じている。こうした現状を打破するためには、腎臓前駆細胞を検出する試験管内、および生体内のアッセイ系を構築する必要がある。つまり、誘導をかけるもとの細胞が何であれ、誘導された細胞が本当に腎臓幹細胞なのか、前駆細胞なのかを判定する手段の開発が、腎臓の再生研究をするうえでは急務となる。では、そういったアッセイ系を開発するうえでのポジティブコントロールとして何を用いればよいだろうか。

マウスやラットの発生中の後腎を一塊として、新生マウスの腎臓に移植すると、ホストの腎臓にドナー由来の後腎組織が生着し、機能的に統合された尿細管や糸球体の細胞に分化することが報告されている。また最近、胎性期のヒトの後腎をマウスの腎皮膜下に移植すると分化したネフロンとともに嚢胞を形成し、そのなかに尿が産生されていることが報告された<sup>49)</sup>。これらの結果は移植された後腎細胞が成体内で分化能をもつことを示している。

また胎生期のマウス後腎間葉にレトロウイルスを用いて、まばらに LacZ 遺伝子を導入し発生を進ませたところ、ボウマン嚢上皮から遠位尿細管まで一つのネフロンの各部分の上皮に LacZ 発色がみられたという結果は、後腎間葉に前駆細胞が存在することを示している<sup>50)</sup>。

つまり、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 Sall 1 は後腎間葉に発現しているので、間葉を効率よく集めるのに非常によい道具となる。

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成し、EGFP による蛍光を指標として Sall 1 を発現する細胞をソートし、そのなかの一細胞から増殖し、多分化能を有する前駆細胞を単離する実験系の確立を行っている<sup>51)</sup>。いったん、この系が開発されれば、後腎間充織のみならず、骨髄、成体腎、ES細胞を含むさまざまな細胞から、腎臓前駆細胞を単離していくことができるはずである。そして、これを *in vitro* で未分化なまま増幅し、必要に応じて移植して腎機能を回復させることが究極の目標となる。

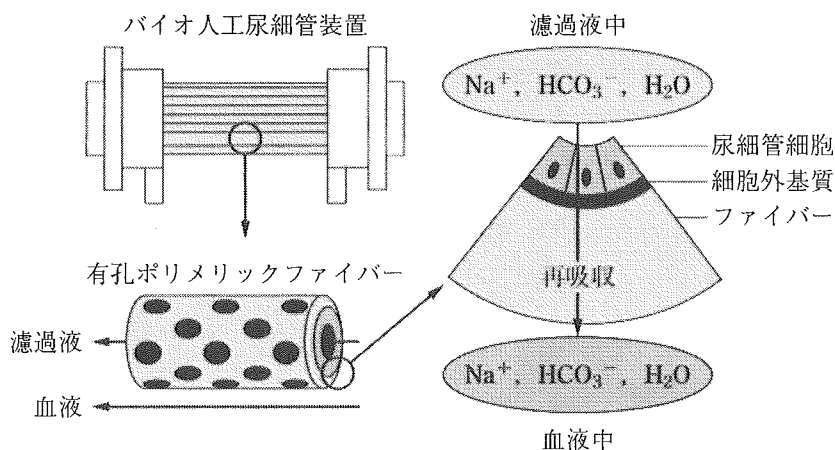
#### 10.5.5 細胞工学を用いた移植可能なバイオ人工腎臓

以下に、細胞と工学系を使った試みを述べる。この細胞を最終的にはどこから誘導するかが上述の課題と密接に関連する。

〔1〕 **バイオ人工糸球体装置** 一般的な人工透析では、濃度勾配による拡散と静水圧による限外濾過により不要物を除去しているが、糸球体の機能に類似した限外濾過主体の透析

膜が開発されてきた。これは、構造上内腔の狭い有孔ポリメリック中空ファイバーにより可能となったが、タンパクや血栓の付着による劣化が問題となる。それに対し、コラーゲンやラミニンなどの細胞外基質を付着させたファイバーの上に自己の血管内皮細胞を裏打ちすることで、長期間の生物適合をもたせたバイオ人工糸球体装置が考案された<sup>52)</sup>。さらに抗凝固能をもった遺伝子を導入すれば、内腔が狭く血栓で閉塞しやすい性質も改善できる<sup>53)</sup>。

〔2〕 **バイオ人工尿細管装置** 一方で、尿細管機能である再吸収による電解質のバランス維持は、人工膜だけでは不十分である。これは尿細管に存在するさまざまな channel, transporter によって初めて成り立つ。よってこのような機能をもったものは、上記で述べた血管内皮細胞を付着させたバイオ人工糸球体装置と同様に、今度は細胞外基質を付着させたポリメリックファイバーに尿細管細胞を裏打ちしたバイオ人工尿細管装置を作成することで実現できる (図 10.15)。これは同時に尿細管細胞で行われているアンモニアやグルタミン等に対する、一部の代謝機能も代替していることが示された<sup>54)</sup>。

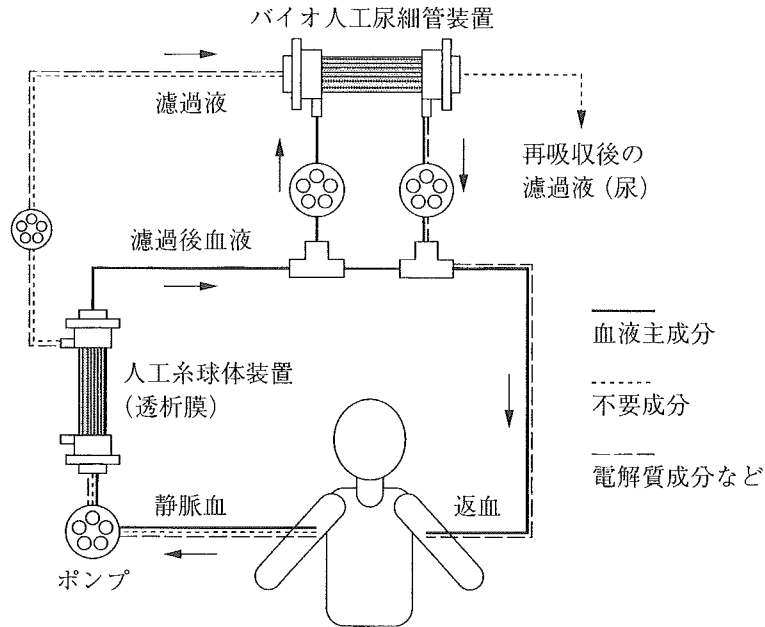


有孔ポリメリックファイバーの内側に細胞外基質を裏打ちし、尿細管細胞を付着させる。ファイバー内腔を通る濾過液より電解質や水が、ファイバー外を流れる血液へ向かって再吸収される。

図 10.15 バイオ人工尿細管の概念

〔3〕 **臨床治験に入ったバイオ人工腎臓** 以上により、人工糸球体装置から限外濾過された原尿を人工尿細管装置により再吸収させ、最後の排泄液を尿とすることが可能となる。ブタの尿細管細胞を裏打ちしたバイオ人工尿細管装置と人工糸球体装置からなる装置を腎不全状態のイヌにつなげた実験が行われ有効性が示された<sup>55)</sup>。さらに、現在、ヒトの尿細管細胞を裏打ちしたバイオ人工尿細管装置が開発され、これを組み込んだ体外式のバイオ人工腎臓が確立され、米国で実際に臨床治験が行われている (図 10.16)<sup>56)</sup>。

今後、これらの装置の大きさが体内に収められる程度となり、限外濾過と再吸収の効率のバランスがとれれば、それを移植することで、血液透析から離脱または、非常に回数を減じ



濾過液を尿細管細胞を裏打ちしたポリメリックファイバーよりなるバイオ人工尿細管装置に通すことで、電解質などの再吸収と代謝機能が代替され、最終濾過液はより尿に近いものとなる。矢印は血液などの流れる方向を示す。

図 10.16 体外式バイオ人工腎臓の概略図

ることができ、また排尿による排泄も可能であると考えられる。ただし、分化した血管内皮細胞や尿細管細胞がポリメリックファイバー上で長期間維持されるかどうかは鍵となる。

### 10.5.6 ブタからの腎臓移植

試験管内で腎臓全体を誘導するにはまだ時間がかかる。そこで別の方法として、ブタの腎臓を移植する方法も試みられている。

〔1〕異種腎移植の壁、 $\alpha$ Gal 抗原 生体や死体からの腎移植はドナー不足が問題になることより、そのドナーをヒト以外の動物に求めることが考えられている。腎移植が始められたころ、ヒツジやブタをドナーとした症例があったが、移植腎は数時間のうちに壊死してしまう。その原因は糖鎖抗原である galactose $\alpha$ 1-3 galactose $\beta$ 1-4 N-acetylglucosamine ( $\alpha$ Gal) 抗原を主体とする異種抗原と自然抗体による超急性拒絶反応が起こるためである<sup>57)</sup>。 $\alpha$ Gal 抗原をもたないヒヒやチンパンジーの腎臓をヒトに移植し、最長9か月生着したという報告はあるものの、これらの猿類は臓器の大きさがヒトに適していないことや動物愛護の面、移植需要に応えられる頭数の準備が難しいなど異種移植の対象として好ましくない点も多い。そこで現在では、 $\alpha$ Gal 抗原の問題を解決することでブタが異種移植の対象として相応しいと考えられている。これはブタとヒトが臓器の大きさや形の解剖学的な点も、血液生化学的な点も似ていることや、食用として飼育法が確立し、無菌飼育も可能で動物愛

護の面からも問題が少ないことによる。

〔2〕  $\alpha 1,3\text{GT}$  遺伝子ノックアウトブタによる試み まずはレシピエント側の抗 $\alpha\text{Gal}$ 抗体や補体の除去や活性化抑制が試みられ、超急性拒絶反応がある程度抑えられることが示された。しかし完全な除去や抑制は不可能で、またレシピエントとしてヒトを考えた場合、抗体や補体の除去などで易感染状態を起し得ることが問題となる。そこでクローン技術を応用した、 $\alpha\text{Gal}$ 抗原生成酵素である $\alpha 1,3$  galactosyltransferase ( $\alpha 1,3\text{GT}$ ) 遺伝子のノックアウトブタの作成が試みられた<sup>58),59)</sup>。現在、 $\alpha 1,3\text{GT}$  遺伝子ノックアウトブタからヒトに対し腎臓移植し、最長 80 日生存したことが報告されている<sup>60)</sup>。この場合でも残った拒絶反応を抑えるため、免疫抑制剤投与と胸腺、脾臓摘出術も同時に行なわれている。ヒト以外の動物からの移植であるため、未知の感染症の存在などの問題も考えられる。

## 10.6 おわりに

腎臓再生が困難なものであることは間違いない。しかし、腎臓発生の機構を突きつめることで得られるヒントも、また多いはずである。尿管芽と後腎間葉との相互作用から腎臓発生は開始するので、この過程における GDNF やそれ以外の機構の解明は、その一つになるだろう。また、同じ間葉細胞が糸球体から尿細管までさまざま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ったとはいえない。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、どのような機構で間葉の分化制御が行われているのか、非常に興味深い問題である。なぜなら、*in vivo* での間葉の分化制御機構の解明は、*in vitro* における間葉細胞の分化制御につながるからである。腎臓の再生医療とからめて、将来的に重要な課題になると思われる。腎臓は、ほかの臓器に先駆けて、腎移植や人工透析などの代替医療が進み確立されてきたが、それ以降の再生医療が遅れ気味である。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。

## 引用・参考文献

- 1) Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Scully, S., Lacey, D. L., Katsuki, M., Asashima, M. and Yokota, T. : Murine homolog of SALL 1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development, *Development*, **128**, 16, pp.3105-3115 (2001)
- 2) Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U. and Engel, W. : Mutations in the SALL 1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome, *Nat.*



- Genet., **18**, 1, pp.81-83 (1998)
- 3) Kiefer, S. M., Ohlemiller, K. K., Yang, J., McDill, B. W., Kohlhase, J. and Rauchman, M. : Expression of a truncated Sall 1 transcriptional repressor is responsible for Townes-Brocks syndrome birth defects, *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 17, pp.2221-2227 (2003)
  - 4) Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M. and Nishinakamura, R. : Zinc finger protein Sall 2 is not essential for embryonic and kidney development, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1, pp.62-69 (2003)
  - 5) Parrish, M., Ott, T., Lance-Jones, C., Schuetz, G., Schwaeger-Nickolenko, A. and Monaghan, A. P. : Loss of the Sall 3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 16, pp.7102-7112 (2004)
  - 6) Kohlhase, J., Heinrich, M., Schubert, L., Liebers, M., Kispert, A., Laccone, F., Turnpenny, P., Winter, R. M. and Reardon, W. : Okihiro syndrome is caused by SALL 4 mutations, *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 23, pp.2979-2987 (2002)
  - 7) Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J., Sariola, H., and Westphal, H. : Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF, *Nature*, **382**, 6586, pp.73-76 (1996)
  - 8) Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. : Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret, *Nature*, **367**, 6461, pp.380-383 (1994)
  - 9) Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R. O., Snider, W. D., Johnson Jr, E. M., and Milbrandt, J. : GFR alpha 1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys, *Neuron*, **21**, 2, pp.317-324 (1998)
  - 10) Tang, M. J., Worley, D., Sanicola, M. and Dressler, G. R. : The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells, *J. Cell. Biol.*, **142**, 5, pp.1337-1345 (1998)
  - 11) Brophy, P. D., Ostrom, L., Lang, K. M. and Dressler, G. R. : Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax 2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene, *Development*, **128**, 23, pp.4747-4756 (2001)
  - 12) Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Kronen, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aggarwal, A. K., Maas, R., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G. : Eya protein phosphatase activity regulates Six 1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis, *Nature*, **426**, 6964, pp.247-254 (2003)
  - 13) Kume, T., Deng, K. and Hogan, B. L. : Murine forkhead/winged helix genes Foxc 1 (Mf 1) and Foxc 2 (Mfh 1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract, *Development*, **127**, 7, pp.1387-1395 (2000)
  - 14) Grieshammer, U., Le, M., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M. and Martin, G. R. : SLIT 2-mediated ROBO 2 signaling restricts kidney induction to a single site, *Dev. Cell.*, **6**, 5, pp.709-717 (2004)
  - 15) Michos, O., Panman, L., Vintersten, K., Beier, K., Zeller, R. and Zuniga, A. : Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling

- controlling metanephric kidney and limb organogenesis, *Development*, **131**, 14, pp.3401-3410 (2004)
- 16) Sainio, K., Suvanto, P., Davies, J., Wartiovaara, J., Wartiovaara, K., Saarma, M., Arumae, U., Meng, X., Lindahl, M., Pachnis, V. and Sariola, H. : Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium, *Development*, **124**, 20, pp. 4077-4087 (1997)
  - 17) Cano-Gauci, D. F., Song, H. H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T. D., Grisaru, S., Soon, S., Sedlackova, L., Tanswell, A. K., Mak, T. W., Yeger, H., Lockwood, G. A., Rosenblum, N. D. and Filmus, J. : Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome, *J. Cell. Biol.*, **146**, 1, pp.255-264 (1999)
  - 18) Batourina, E., Gim, S., Bello, N., Shy, M., Clagett-Dame, M., Srinivas, S., Costantini, F. and Mendelsohn, C. : Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression, *Nat. Genet.*, **27**, 1, pp.74-78 (2001)
  - 19) Qiao, J., Uzzo, R., Obara-Ishihara, T., Degenstein, L., Fuchs, E. and Herzlinger, D. : FGF-7 modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney, *Development*, **126**, 3, pp.547-554 (1999)
  - 20) Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. and McMahon, A. P. : Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4, *Nature*, **372**, 6507, pp.679-683 (1994)
  - 21) Kispert, A., Vainio, S. and McMahon, A. P. : Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney, *Development*, **125**, 21, pp.4225-4234 (1998)
  - 22) Barasch, J., Yang, J., Ware, C. B., Taga, T., Yoshida, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parravicini, E., Malach, S., Aranoff, T. and Oliver, J. A. : Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF, *Cell*, **99**, 4, pp.377-386 (1999)
  - 23) Plisov, S. Y., Yoshino, K., Dove, L. F., Higinbotham, K. G., Rubin, J. S. and Perantoni, A. O. : TGF beta 2, LIF and FGF 2 cooperate to induce nephrogenesis, *Development*, **128**, 7, pp.1045-1057 (2001)
  - 24) Carroll, T. J., Park, J.S., Hayashi, S., Majumdar, A., McMahon, A. P. : Wnt 9 b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system, *Dev. Cell.*, **9**, 2, pp.283-292 (2005)
  - 25) Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, L. and Aizawa, S. : Defects of urogenital development in mice lacking Emx 2, *Development*, **124**, 9, pp.1653-1664 (1997)
  - 26) Yoshino, K., Rubin, J. S., Higinbotham, K. G., Uren, A., Anest, V., Plisov, S. Y. and Perantoni, A. O. : Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development, *Mech. Dev.*, **102**, 1-2, pp.45-55 (2001)
  - 27) Dudley, A. T., Lyons, K. M. and Robertson, E. J. : A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye, *Genes. Dev.*, **9**, 22, pp.2795-2807 (1995)
  - 28) Dudley, A. T., Godin, R. E. and Robertson, E. J. : Interaction between FGF and BMP

- signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme, *Genes. Dev.*, **13**, 12, pp.1601-1613 (1999)
- 29) Vrontou, S., Petrou, P., Meyer, B. I., Galanopoulos, V. K., Imai, K., Yanagi, M., Chowdhury, K., Scambler, P. J. and Chalepakis, G. : Fras 1 deficiency results in cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice, *Nat. Genet.*, **34**, 2, pp.209-214 (2003)
- 30) Takamiya, K., Kostourou, V., Adams, S., Jadeja, S., Chalepakis, G., Scambler, P. J., Haganir, R. L. and Adams, R. H. : A direct functional link between the multi-PDZ domain protein GRIP 1 and the Fraser syndrome protein Fras 1, *Nat. Genet.*, **36**, 2, pp.172-177 (2004)
- 31) Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H. P., Kikkawa, Y., Miner, J. H. and Quaggin, S. E. : Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases, *J. Clin. Invest.*, **111**, 5, pp.707-716 (2003)
- 32) Soriano, P. : Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice, *Genes. Dev.*, **8**, 16, pp.1888-1896 (1994)
- 33) Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruot-salainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A. and Tryggvason, K. : Positionally cloned gene for a novel glomerular protein —nephrin— is mutated in congenital nephrotic syndrome, *Mol. Cell.*, **1**, 4, pp.575-582 (1998)
- 34) Wang, P., Pereira, F. A., Beasley, D. and Zheng, H. : Presenilins are required for the formation of comma- and S-shaped bodies during nephrogenesis, *Development*, **130**, 20, pp. 5019-5029 (2003)
- 35) McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., Herzlinger, D., Weinmaster, G., Jiang, R. and Gridley, T. : Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch 2 mutation, *Development*, **128**, 4, pp.491-502 (2001)
- 36) Delmas, P. : Polycystins : from mechanosensation to gene regulation, *Cell*, **118**, 2, pp.145-148 (2004)
- 37) Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A. E., Lu, W., Brown, E. M., Quinn, S. J., Ingber, D. E. and Zhou, J. : Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells, *Nat. Genet.*, **33**, 2, pp.129-137 (2003)
- 38) Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. and Hirokawa, N. : Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF 3 B motor protein, *Cell*, **95**, 6, pp.829-837 (1998)
- 39) McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X. and Brueckner, M. : Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse, *Cell*, **114**, 1, pp.61-73 (2003)
- 40) Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 5391, pp.1145-1147 (1998)

- 41) Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A. and Benvenisty, N. : Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 21, pp.11307-11312 (2000)
- 42) Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W. : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion, *Nature*, **416**, 6880, pp.542-545 (2002)
- 43) Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G. : Changing potency by spontaneous fusion, *Nature*, **416**, 6880, pp.545-548 (2002)
- 44) Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J. and Alvarez-Buylla, A. : Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes, *Nature*, **425**, 6961, pp.968-973 (2003)
- 45) Masuya, M., Drake, C. J., Fleming, P. A., Reilly, C. M., Zeng, H., Hill, W. D., Martin-Studdard, A., Hess, D. C. and Ogawa, M. : Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells, *Blood*, **101**, 6, pp.2215-2218 (2003)
- 46) Kale, S., Karihaloo, A., Clark, P. R., Kashgarian, M., Krause, D. S. and Cantley, L. G. : Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule, *J. Clin. Invest.*, **112**, 1, pp.42-49 (2003)
- 47) Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S. and Mulligan, R. C. : Isolation and function properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo, *J. Exp. Med.*, **183**, 4, pp.1797-1806 (1996)
- 48) Iwatani, H., Ito, T., Imai, E., Matsuzaki, Y., Suzuki, A., Yamato, M., Okabe, M. and Hori, M. : Hematopoietic and nonhematopoietic potentials of Hoechstlow/side population cells isolated from adult kidney, *Kidney. Int.*, **65**, 5, pp.1604-1614 (2004)
- 49) Dekel, B., Burakova, T., Arditti, F. D., Reich-Zeliger, S., Milstein, O., Aviel-Ronen, S., Rechavi, G., Friedman, N., Kaminski, N., Passwell, J. H. and Reisner, Y. : Human and porcine early kidney precursors as a new source for transplantation, *Nature. Med.*, **9**, 1, pp. 53-60 (2003)
- 50) Herzlinger, D., Koseki, C., Mikawa, T., al-Awqati, Q. : Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction, *Development*, **114**, 3, pp.565-572 (1992)
- 51) Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M., Nishinakamura, R. : Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay, *Development*, **133**, 1, pp.151-161 (2006)
- 52) Humes, H. D., MacKay, S. M., Funke, A. J. and Buffington, D. A. : The bioartificial renal tubule assist device to enhance CRRT in acute renal failure, *Am. J. Kidney. Dis.*, **30**, 5-4, pp.28-31 (1997)
- 53) Rade, J. J., Schulick, A. H., Virmani, R. and Dichek, D. A. : Local adenoviral-mediated expression of recombinant hirudin reduces neointima formation after arterial injury, *Nat. Med.*, **2**, 3, pp.293-298 (1996)
- 54) Humes, H. D., MacKay, S. M., Funke, A. J. and Buffington, D. A. : Tissue engineering of