

types of cells that are intermingled in the kidney. It will be important to mark and sort a certain progenitor domain using a fluorescent dye inserted by genetic manipulation and to examine the cell fate and gene expression profiles of cells in this domain. Indeed, this type of analysis is being developed, for example, by the GenitoUrinary Development Molecular Anatomy Project (GUDMAP) (<http://www.gudmap.org/>).¹⁴

THE ORIGIN OF ENDOTHELIAL CELLS

Once podocytes are formed, they secrete vascular endothelial growth factor (VEGF) and attract hemangioblasts, which differentiate into glomerular endothelial cells and their pericytes, namely, mesangial cells, thus forming vascularized glomeruli.¹⁵ Although classical interspecies grafting experiments suggest that the vasculature is of host origin, vascular endothelial progenitors could be present in the metanephric mesenchyme, because hypoxia or VEGF treatment induces vascular formation inside the mesenchyme in an organ culture setting.¹⁶ It has also been reported that vascular endothelial cells are detected when dissociated mesenchymal cells are cultured.¹⁷ However, this does not necessarily imply the existence of a single multipotent progenitor that differentiates into renal epithelial and vascular endothelial cells, because vascular progenitors in the heterogeneous mesenchyme may be selectively expanded. Indeed VEGF receptor (Flk1)-positive endothelial precursors are already separated from, and surround, the mesenchyme at the stage when the interaction between the mesenchyme and the ureteric bud starts (embryonic day 11.5).¹⁸ Consistent with this observation, *Sall1*-negative, but not *Sall1*-high, mesenchymal cells express endothelial markers, including Flk1 and VE-cadherin. Thus, at least *Sall1*-high progenitors are distinct from endothelial cell precursors.⁷ Careful clonal analysis is needed to address the origin of endothelial cells in the developing kidney.

THE ORIGIN OF STROMAL CELLS

Stromal cells reside in the outermost layer of the kidney cortex and surround the metanephric mesenchyme. Retinoic acid signaling in this stromal cell population leads to increased expression of Ret (the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor) in the ureteric bud and subsequently regulates ureteric bud branching.¹⁹ The origin of the stroma, however, remains unknown. At least at embryonic day 11.5, only *Sall1*-GFP^{low} cells express a marker of stroma (*Foxd1*, also known as *BF2*), and no colonies were formed from this population upon Wnt4 stimulation, suggesting that the stroma may not be derived from the progenitors of renal epithelial cells.⁷ Thus, the developing mesenchyme could contain vascular and stromal progenitors in addition to the *Sall1*-high epithelial progenitors that differentiate into glomerular podocytes and renal tubules.

DERIVATION OF RENAL PROGENITORS FROM ES CELLS

Now that we know that the metanephric mesenchyme contains epithelial progenitors and how they differentiate

into renal epithelial cells, how can we generate the mesenchyme itself? Clues to this come from developmental biology. The kidney develops in three stages: pronephros, mesonephros, and metanephros. The nephric duct (Wolffian duct) and nephrogenic mesenchyme develop from the intermediate mesoderm, which is located between the lateral and preaxial mesoderm. The Wolffian duct and nephrogenic mesenchyme elongate caudally toward the cloaca, and the Wolffian duct converts the adjacent mesenchyme into mesonephric tubules. Metanephric mesenchyme is formed at the caudal-most region of the nephrogenic mesenchyme.

Therefore, the progenitor population in the metanephric mesenchyme could be derived from the intermediate mesenchyme, although it remains to be determined whether metanephric mesenchyme is a direct derivative of nephrogenic mesenchyme in pro/mesonephros or a distinct population recruited from the surrounding tissue.

The transcription factors Pax2 and Pax8 control the initial differentiation from intermediate mesoderm to Wolffian duct; thus, mutant mice lacking both of these genes lack pronephros formation.²⁰ *Osr1* is the earliest marker expressed in the undifferentiated intermediate mesenchyme. Once Wolffian ducts are formed, *Osr1* expression disappears, whereas Pax2 remains to be expressed in the Wolffian ducts. Although *Osr1*-deficient mice show milder pro/mesonephric phenotypes than Pax2/Pax8-null mice, possibly due to genetic redundancy with other *Osr* gene family members, *Osr1*-null mice show an absence of metanephric mesenchyme, placing *Osr1* upstream within the metanephric gene cascade.²¹ Interestingly, *Osr1* is also expressed in the undifferentiated metanephric mesenchyme, and this gene could serve as a metanephric progenitor marker, such as *Six2*.

So, will it be possible to induce the formation of intermediate mesenchyme and nephrogenic mesenchyme of pro/mesonephros from a variety of cell sources, such as embryonic stem (ES) cells, and to direct them toward becoming metanephric mesenchymal progenitors? In frogs, treatment of the animal cap, a presumptive ectoderm of fertilized embryo, with activin and retinoic acid, efficiently and selectively induces pronephric tubules *in vitro*.²² Indeed, *Sall1* was cloned using this assay. Kim and Dressler²³ reported that embryoid bodies generated from ES cells treated with activin, retinoic acid, and Bmp7 express several markers, including Pax2 and Six2. When they cultured embryoid bodies with the spinal cord, a potent source of Wnt ligands, they formed a tubule-like structure. This is an interesting observation, but it remains to be determined whether these cells are metanephric mesenchyme or earlier stages of the kidney (pronephros/intermediate mesoderm), as in the case of the frog. Purification of a candidate cell population and a reliable functional assay are needed to verify this aspect. Nonetheless, these data suggest a mechanism of kidney progenitor formation that is conserved among species. If derivation methods of metanephric mesenchyme are established, we will be closer to the generation and manipulation of multiple cell lineages in the kidney.

DISCLOSURE

The author has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks all lab members for valuable discussion. This work was supported, in part, by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Herzlinger D, Koseki C, Mikawa T, Al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development* 1992; **114**: 565-572.
- Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 1994; **372**: 679-683.
- Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 1998; **125**: 4225-4234.
- Carroll TJ, Park JS, Hayashi S *et al*. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* 2005; **9**: 283-292.
- Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K *et al*. Murine homolog of *SALL1* is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 2001; **128**: 3105-3115.
- Takasato M, Osafune K, Matsumoto Y *et al*. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and *Sall1-GFP* knockin mice. *Mech Dev* 2004; **121**: 547-557.
- Osafune K, Takasato M, Kispert A *et al*. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 2006; **133**: 151-161.
- Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A *et al*. The murine homolog of *SALL4*, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with *Sall1* in anorectal, heart, brain, and kidney development. *Development* 2006; **133**: 3005-3013.
- Challen GA, Martinez G, Davis MJ *et al*. Identifying the molecular phenotype of renal progenitor cells. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2344-2357.
- Self M, Lagutin OV, Bwoling B *et al*. *Six2* is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *EMBO J* 2006; **25**: 5214-5228.
- Park JS, Valerius MT, McMahon AP. Wnt/ β -catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development* 2007; **134**: 2533-2539.
- Schmidt-Ott KM, Masckauchan TN, Chen X *et al*. β -Catenin/TCF/Lef controls a differentiation-associated transcriptional program in renal epithelial progenitors. *Development* 2007; **134**: 3177-3190.
- Cheng HT, Kim M, Valerius MT *et al*. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* 2007; **134**: 801-811.
- Little MH, Brennan J, Georgas K *et al*. A high-resolution anatomical ontology of the developing murine genitourinary tract. *Gene Expr Patterns* 2007; **7**: 680-699.
- Eremina V, Sood M, Haigh J *et al*. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; **111**: 707-716.
- Tufro A, Norwood VF, Carey RM *et al*. Vascular endothelial factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 2125-2134.
- Oliver JA, Barasch J, Yang J *et al*. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**: F799-F809.
- Robert B, St John PL, Abrahamson DR. Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am J Physiol* 1998; **275**: F164-F172.
- Batourina E, Gim S, Bello N *et al*. Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 74-78.
- Bouchard M, Souabni A, Mandler M *et al*. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev* 2002; **16**: 2958-2970.
- James RG, Kamei CN, Wang Q *et al*. Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells. *Development* 2006; **133**: 2995-3004.
- Osafune K, Nishinakamura R, Komazaki S, Asashima M. *In vitro* induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants. *Dev Growth Differ* 2002; **44**: 161-167.
- Kim D, Dressler G. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 3527-3534.

VI

腎臓の発生 その分子機構

山下和成・西中村隆一

哺乳類の腎臓発生のおもとなる“腎臓原基”は、後腎間葉細胞群に尿管芽が侵入することにより形成される。その後の発生は、両者の“相互作用”が形態形成の鍵となっている。尿管芽は後腎間葉からの刺激により伸長、分岐して尿道、腎盂、集合管を形成する。また、後腎間葉は尿管芽に分化誘導され、尿細管、腎小体、間質組織を構成する。近年、これらの過程におけるメカニズムが分子生物学的手法により明らかになってきた。ノックアウトマウス的手法より得られた知見を中心に、腎臓発生における分子機構のいくつかを紹介する。

▶▶KEY WORDS : 尿管芽 後腎間葉 相互作用 形態形成 上皮化

はじめに

腎臓は体内の老廃物を尿として排泄するための器官である。同時に、レニン、エリスロポエチンなどを生産し、生体の恒常性維持にもかかわっている重要な臓器である。そして、その発生過程は、尿管芽の美しい分岐、間葉の上皮化、複雑に張りめぐらされる血管新生、細かく入り組んだ糸球体の形成、と生物の形態形成として興味深い過程を多数含んでいる。このように魅力的な臓器であるが、腎臓の発生学はあまり活発であるとはいえない。腎臓の細胞の種類は20種を超えるといわれており、この組織の複雑さが研究を難しくしている。しかし発生のメカニズムを解き明かすことにより、再生医療への道を拓く糸口が見つかるかもしれない。本稿ではまず腎臓発生の形態的発達を時間の経過に沿って概観し、さらにその時はたらいっている分子・遺伝子のメカニズムを紹介する。

I. 形態からみる腎臓発生の概要

哺乳類の発生過程では、前腎、中腎、後腎が次々と形成されるが、われわれ哺乳類の成体腎は後腎に由来する*1。まず初めに中間中胚葉の前腎領域より左右一対のウォルフ管 (Wolffian duct) が形成され、尾側に向かって伸長して総排泄腔につながる (図 1a)。この過程でウォルフ管の周辺に前腎、中腎が形成される。しかし、中腎の一

部が生殖腺へと分化するのを除いて将来的には退行してなくなる。後腎はヒトで胎生35日、マウスで11.5日のときに、尾側から尿管芽 (ureteric bud) とよばれる枝分かれが起こり、それが周囲にある後腎間葉 (metanephric mesenchyme) へと侵入することにより形成される (図 1a~d)。尿管芽と後腎間葉の複合体は腎臓発生のおもともであるため、腎臓原基とよばれる。この腎臓原基は上皮 (尿管芽) と間充織 (後腎間葉) からなり、両者の相互作用によりその後の形態形成が展開される。

まず、尿管芽は後腎間葉に刺激されて伸長、分岐し、尿道、腎盂、集合管を形成する。一方、後腎間葉は尿管芽からの刺激により凝集し、上皮組織へと分化して、コンマ形、C字体、S字体を経て尿細管、腎小体*2を形成する。このS字形構造の上部は遠位尿細管となって集合管 (尿管芽由来) とつながり、中部と下部の一部は近位尿細管とヘンレのループ (Henle's loop) を形成する。それ以外の下部はボーマン囊 (Bowman's capsule) と糸球体上皮細胞*3に分化するが、この過程にメサンギウム細胞*4や毛細血管が入り込んで糸球体が形成される (図 1e~g)。こうして、ヒトの後腎では最終的にネフロン*5が約100万個形成される。また、後腎間葉の一部は間質 (stroma) へと分化し、尿管芽や凝集した間葉に影響を与える。以下ではこれらの過程における4つのイベントを取り上げ、その分子機構を解説する (図 2)。

Kazunari Yamashita¹, Ryuichi Nishinakamura², ¹筑波大学大学院生命環境科学科生物機能科学専攻, ²熊本大学発生医学研究センター 細胞識別分野 E-mail: ryuichi@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/stem/>

Renal development and its molecular mechanism

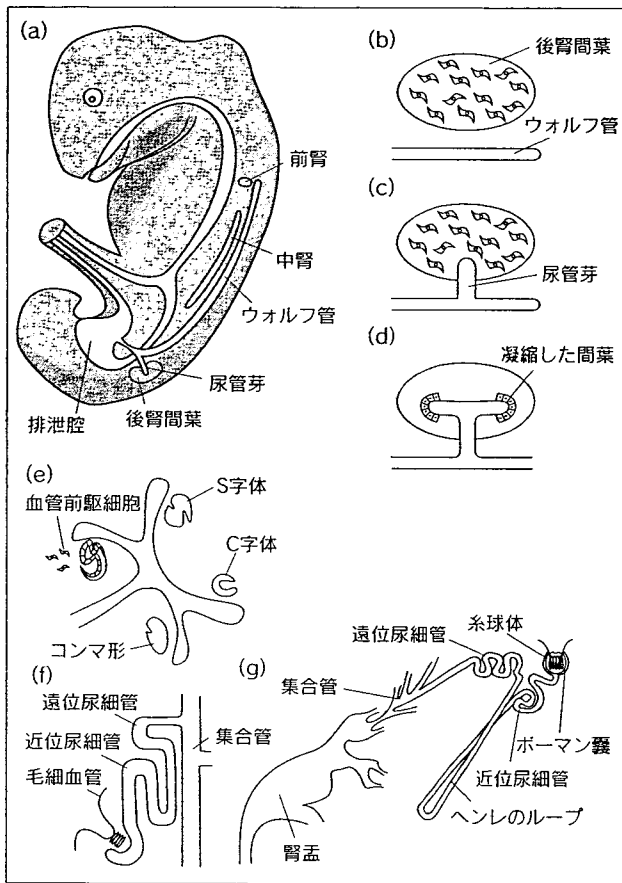


図1 腎臓発生の形態的な概略図

(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, 共役受容体である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。

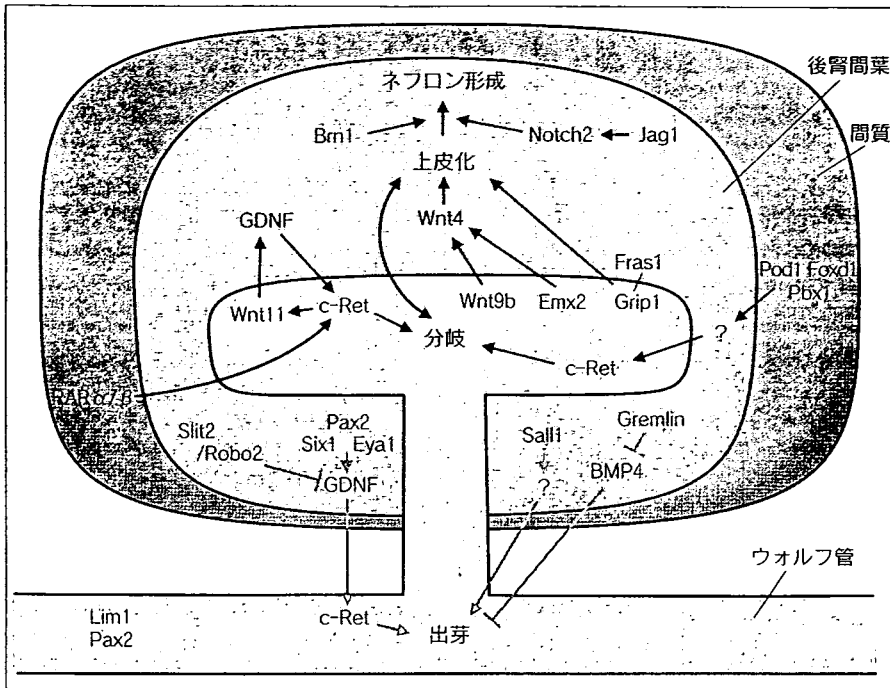


図2 腎臓発生の分子機構

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、尿管芽の出芽に異変がみられるといった報告がある²⁾。Gdf11はウォ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、過剰な分岐を起こしてしまう。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、直接あるいは間接に尿管芽を制御していることがわかれる。

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ドメインどうして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。

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の手法では, 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、

今のところ一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。

■ 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ブラストが, マウスでは胎齢5.5日前後に筒状のエピブ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ブラストの遠位に臓側内胚葉 (DVE) が形成される。DVEは胎齢6日頃エピブラストの前方に移動し, 前方臓側内胚葉 (AVE) となる。一方, エピブラスト

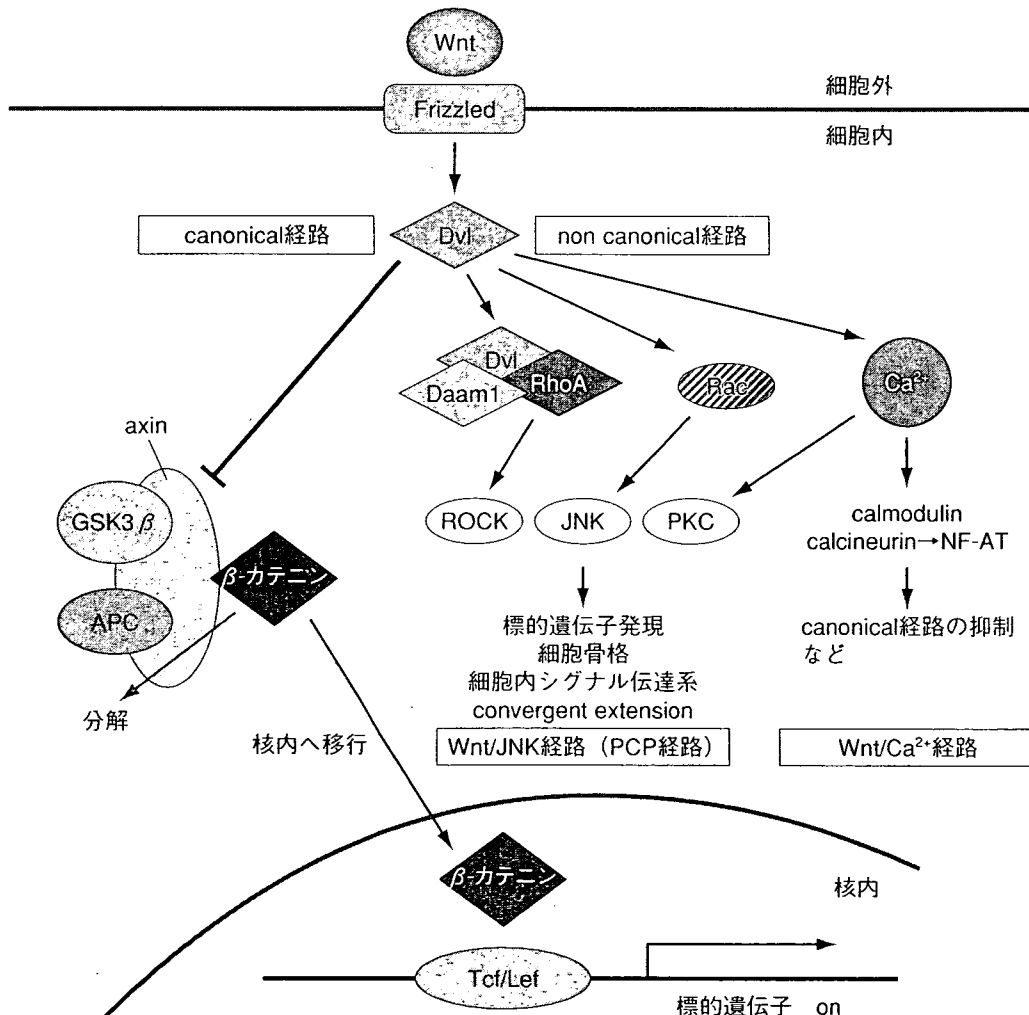


図1 Wnt経路

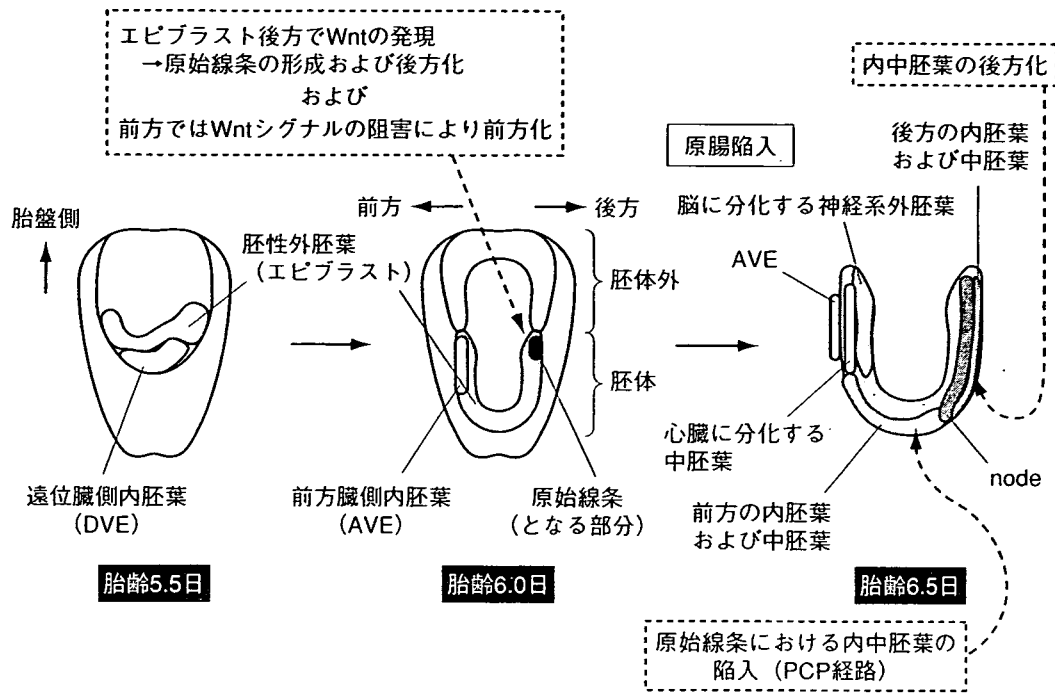


図2 体軸の形成 (マウス)

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経路を活性化すると信じられていたWnt11が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} と言い、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/Van Gogh 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 の転写が起これ、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。

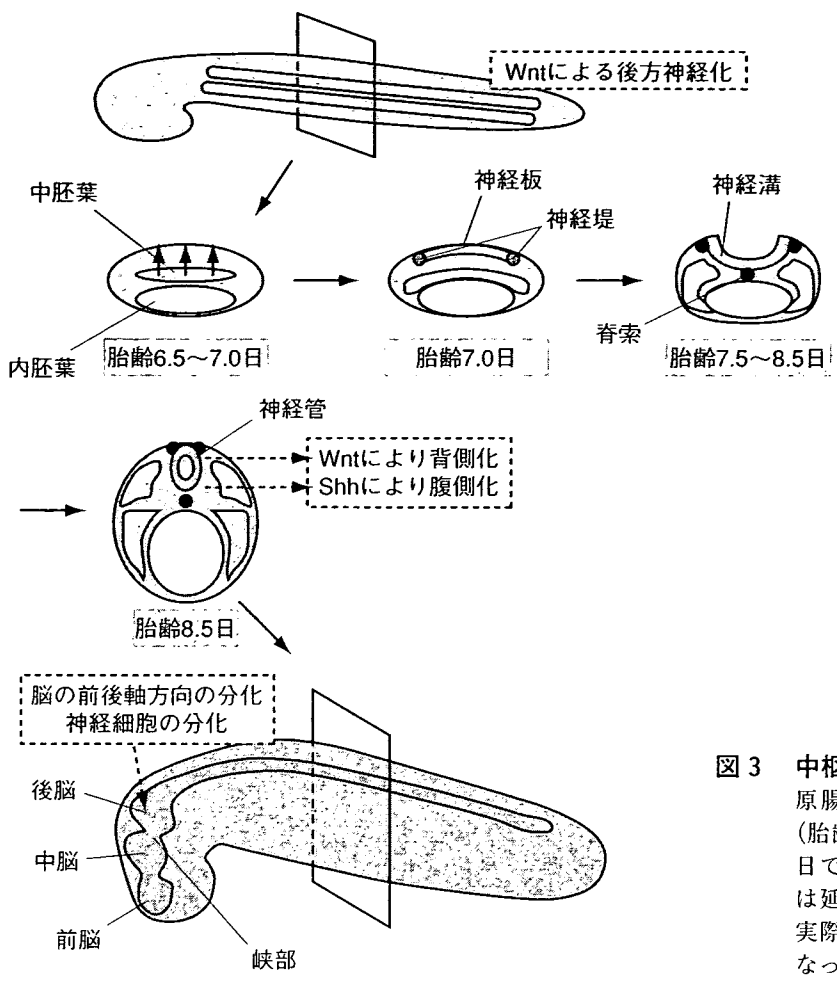


図3 中枢神経の形成 (マウス)
 原腸陥入直後. 実際は前後軸は曲がっている (胎齢7.0日ではエビ反りのような姿勢, 胎齢8.5日ではおなかを丸めたような姿勢) が, ここでは延ばして図説する. また胎齢7.0日前後では, 実際は背腹軸方向はもっとつぶれたような形になっている. Wntの関与を破線で示している

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) と言う. 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 と言う. 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) と言う. 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

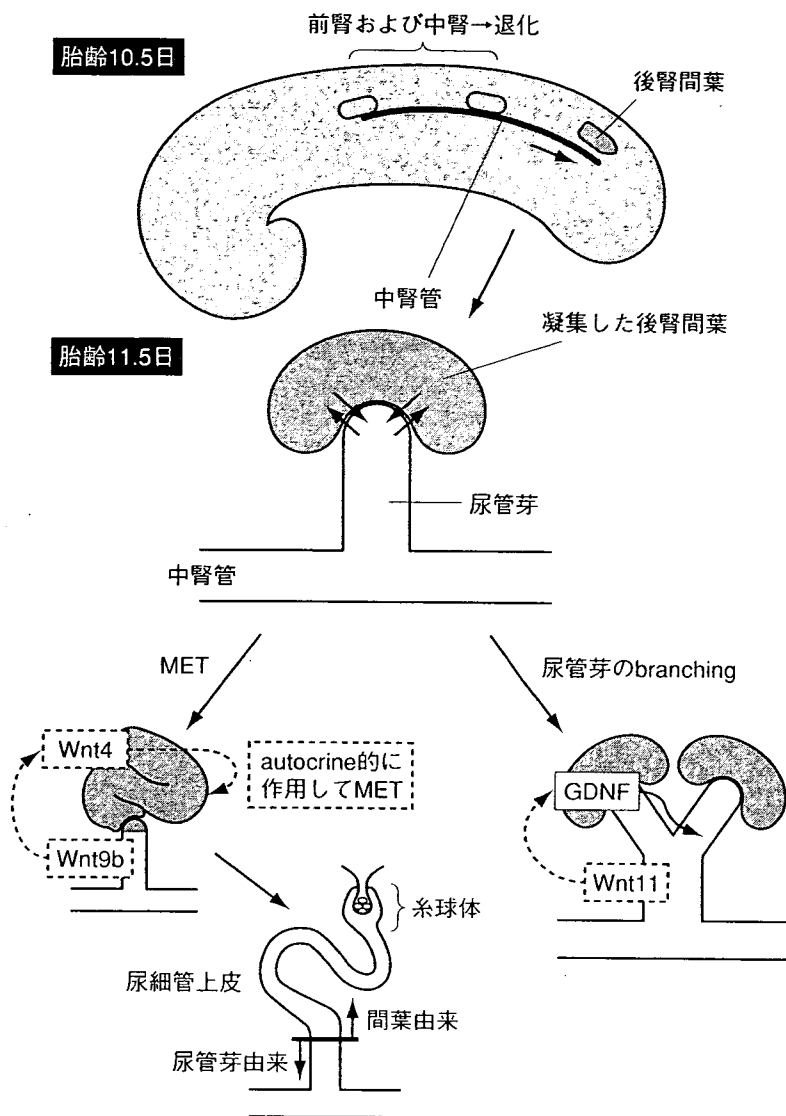


図4 腎臓の形成 (マウス)
後腎間葉が尿管芽の周囲に凝集して相互作用をすることにより、METや尿管芽のさらなるbranchingが起こると考えられる。Wntの関与を破線で示す

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、分泌した細胞自ら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

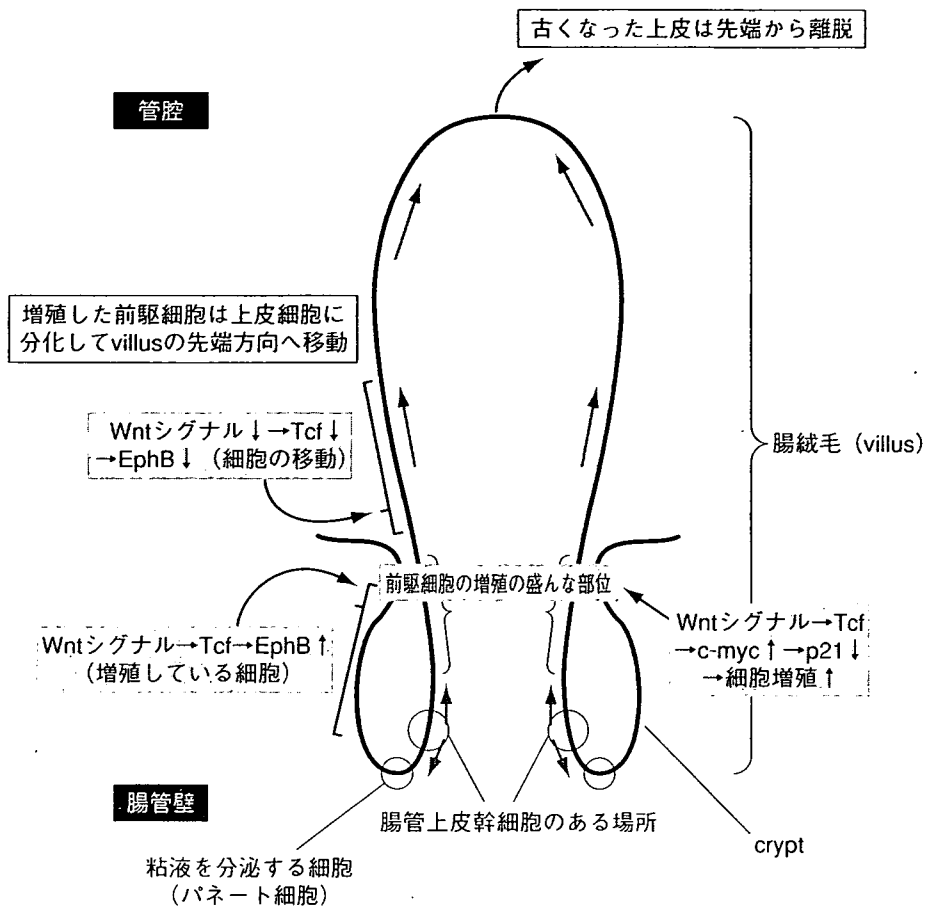


図5 小腸上皮の正常状態における転写因子Tcfの下流因子とその役割

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の変異が起こるとWntがないときでもβ-カテニンの分解が起これないため、β-カ

テニンが核に移行し、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 が候補として挙がった。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怖れなど、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

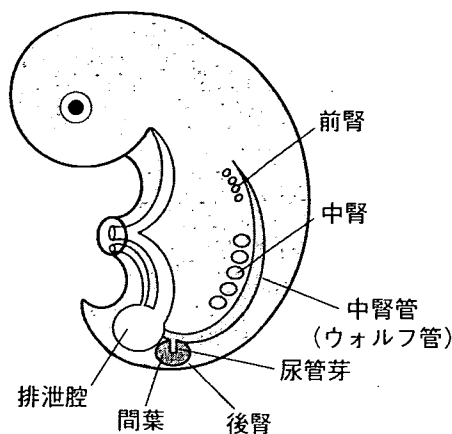


図 1 後腎の発生
マウス胎生期 11.5 日の腎臓発生。尿管芽が後腎間葉に侵入し始める。

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〕

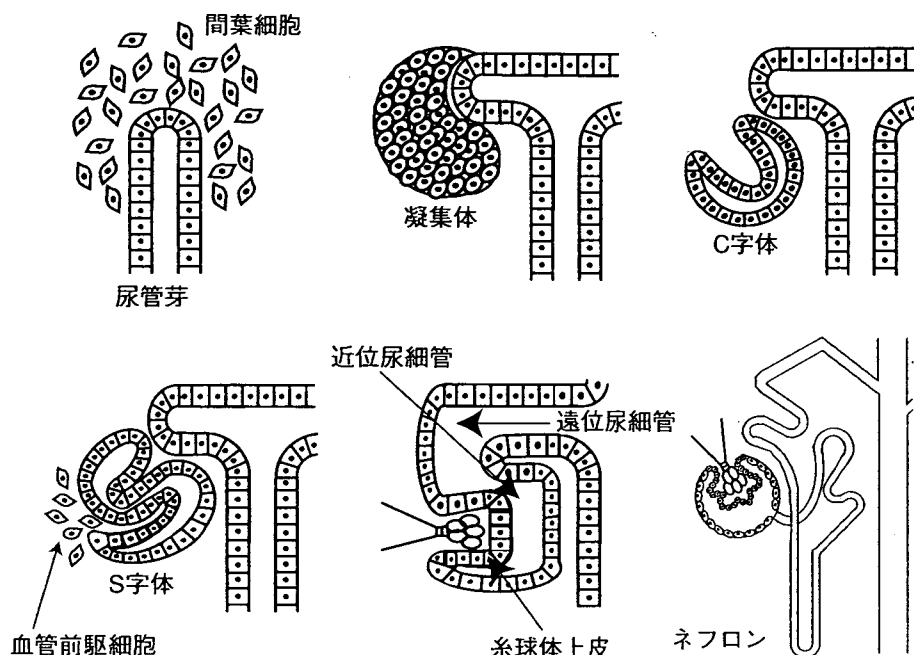


図2 ネフロンの発生

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)。

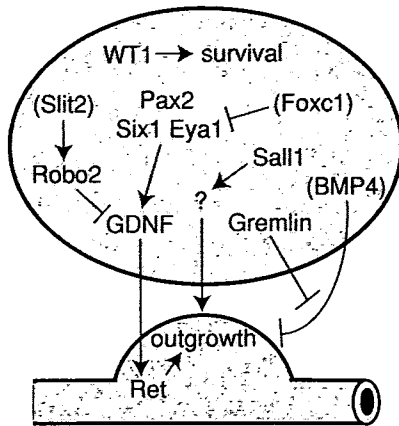
GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) は後腎間葉から分泌される TGF- β (transforming growth factor- β) ファミリーに属する液性因子で、ウォルフ管に作用して尿管芽を発芽、伸長させる機能を持つ¹⁾。尿管芽には GDNF の受容体分子である Ret (ret proto-oncogene) とその共同受容体の Gfra 1 (GDNF family receptor α 1) が発現しており、間葉で分泌された GDNF はこの Ret を介して尿管芽へとシグナルを伝える。つまり、後腎間葉より分泌され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

A



B

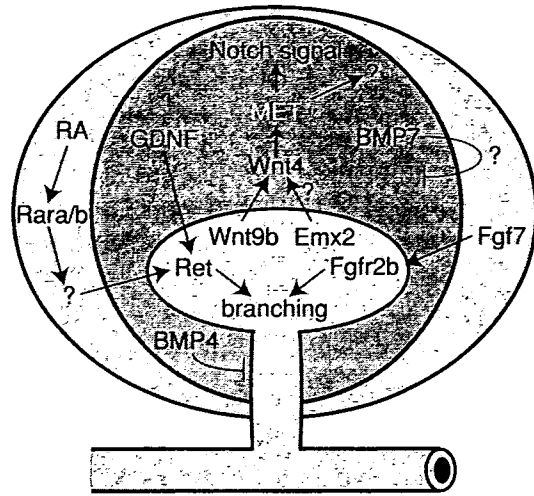


図3 ネフロン発生

腎発生における遺伝子の機能模式図。

A : 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。

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、BMP4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. 尿管芽のブランピング

GDNF-Ret/Gfra1シグナルは後腎間葉への尿管芽侵入後のブランピング（枝分かれ）にも重要なシグナルである。また、間質（stroma）も尿管芽のブランピングの制御をしている。間質は枝分かれ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。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（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FGF2, 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Wnt4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Wnt9bが後腎間葉のMETに必須であるとの報告がなされ、Wnt9bは後腎間葉のMET後マーカー遺伝子であるWnt4やFGF8, Pax8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 9b 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ボーマン嚢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もので、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