

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

文 献

- 1) Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, et al : Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNE. *Nature* **382** : 73-76, 1996
- 2) Xue L, et al : Eya protein phosphatase activity regulates Six 1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426** : 247-254, 2003
- 3) Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, et al : Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* **131** : 3401-3410, 2004
- 4) Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, et al : Murine homolog of SALL 1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* **128** : 3105-3115, 2001
- 5) Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, et al : Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* **27** : 74-78, 2001
- 6) Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, et al : Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell* **99** : 377-386, 1999
- 7) Carroll TJ, McMahon AP : Wnt signaling in tubule induction. *The American Society of Nephrology*, 2003
- 8) Cheng HT, Miner JH, Lin M, Tansey MG, et al : amma-secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse kidney. *Development* **130** : 5031-5042, 2003
- 9) McCright B, Gao X, Shen L, Lozier J, et al : Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch 2 mutation. *Development* **128** : 491-502, 2001
- 10) Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, et al : Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* **111** : 707-716, 2003
- 11) Soriano P : Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF betareceptor mutant mice. *Genes Dev* **8** : 1888-1896, 1994
- 12) Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, et al : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416** : 542-545, 2002
- 13) Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG : Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416** : 545-548, 2002
- 14) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, et al : Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425** : 968-973, 2003

* * *

Sall1 タンパク(SALL1)

小宮千佳 小林千余子 西中村隆一

腎臓形成遺伝子 *Sall1* の単離とその機能

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

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

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

Sall ファミリーに関連する病気

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

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

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

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

最近になって得られた新しい知見

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

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

文 献

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

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。後腎間葉はまずコン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管とHenleのループ、上部は遠位尿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囊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

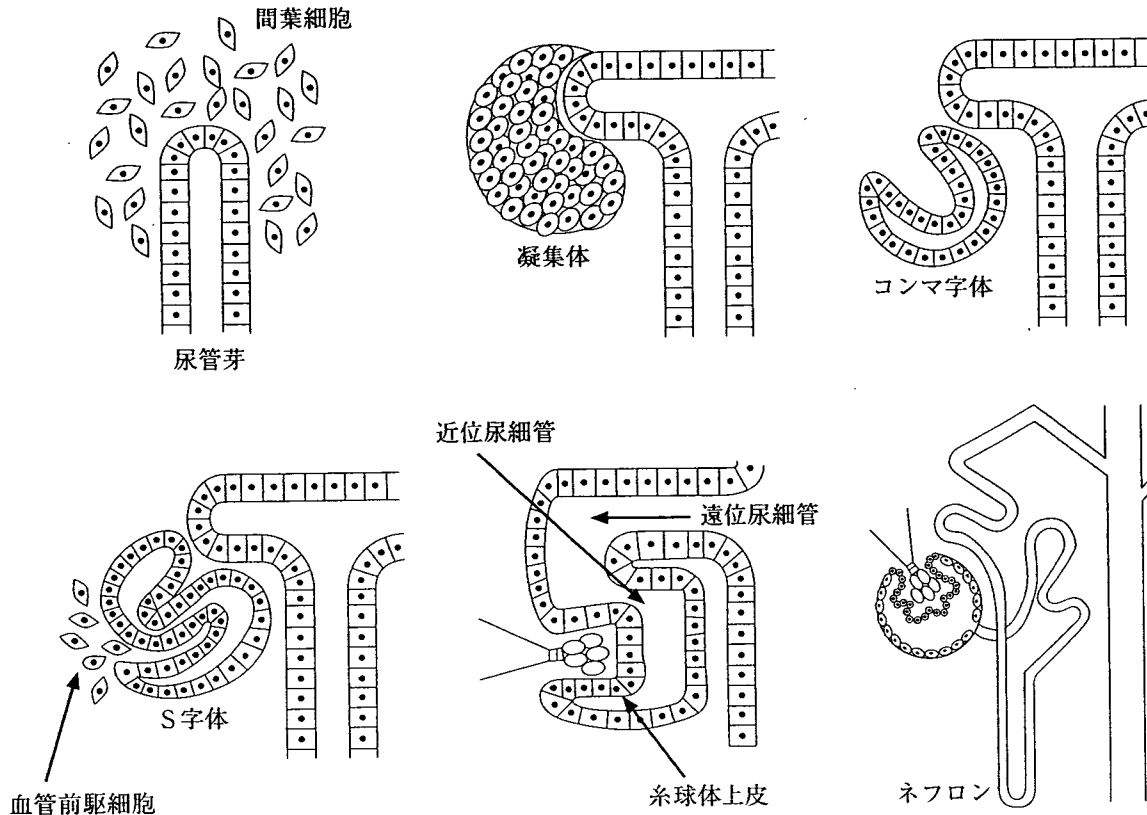


図1 ネフロンの発生

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⁹⁾。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⁹⁾。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取れる⁹⁾。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 が起こるということになる。

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

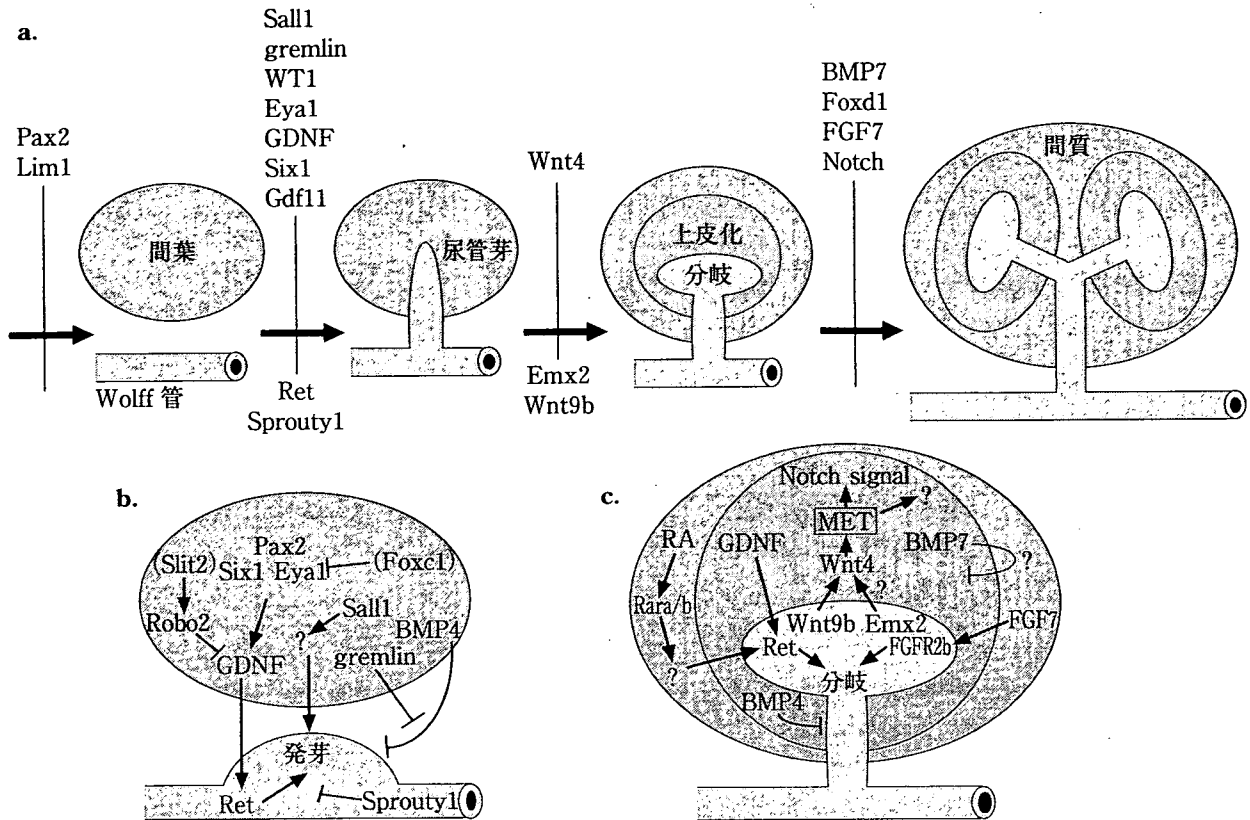


図 2-a 腎臓発生過程で働く遺伝子

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¹⁰。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ることが報告された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収めてきた。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

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

Molecular mechanisms of kidney development

key words : *Sall 1*, Wnt 4, 後腎間葉

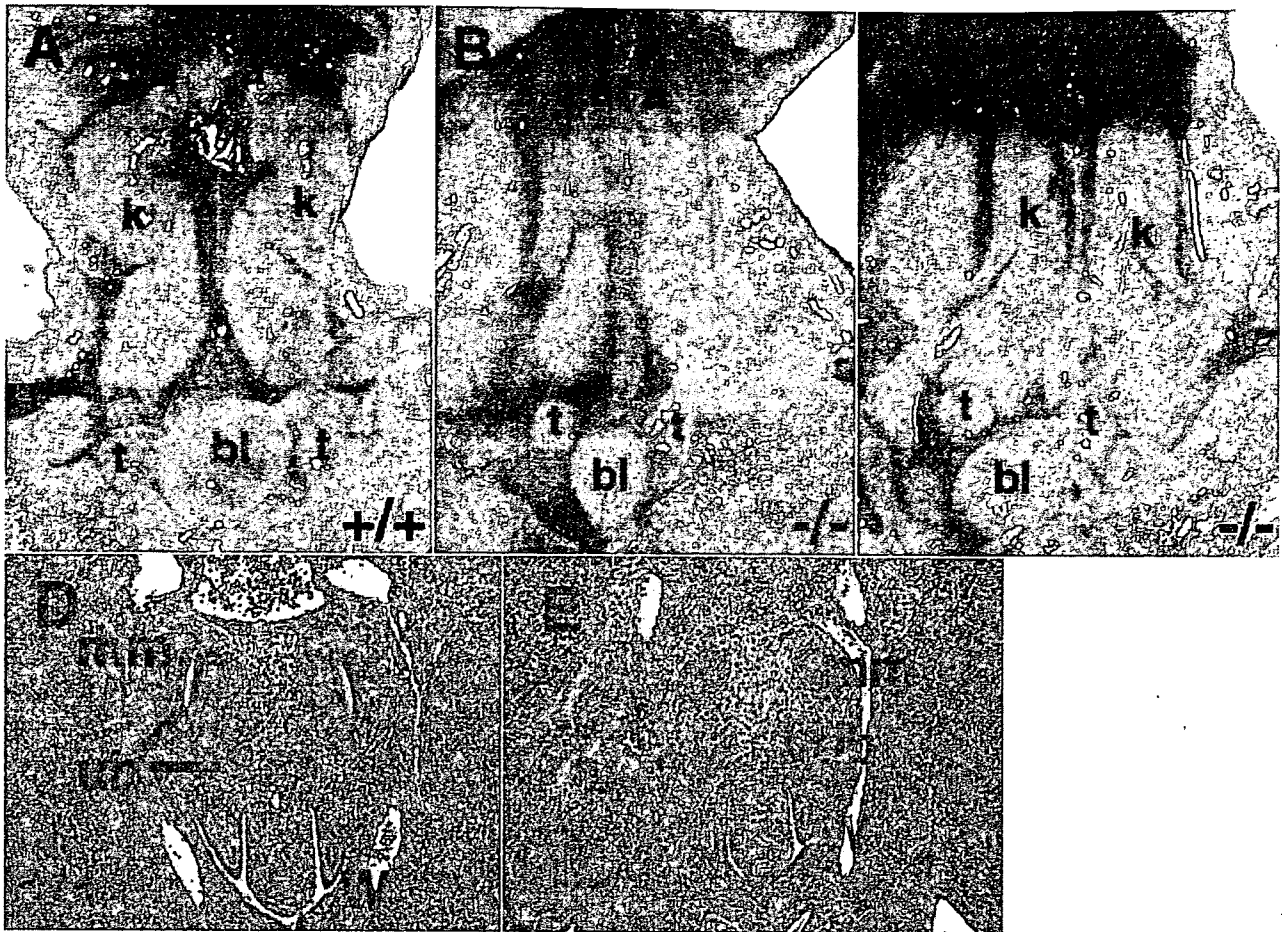


図 1

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の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ると考えられた。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

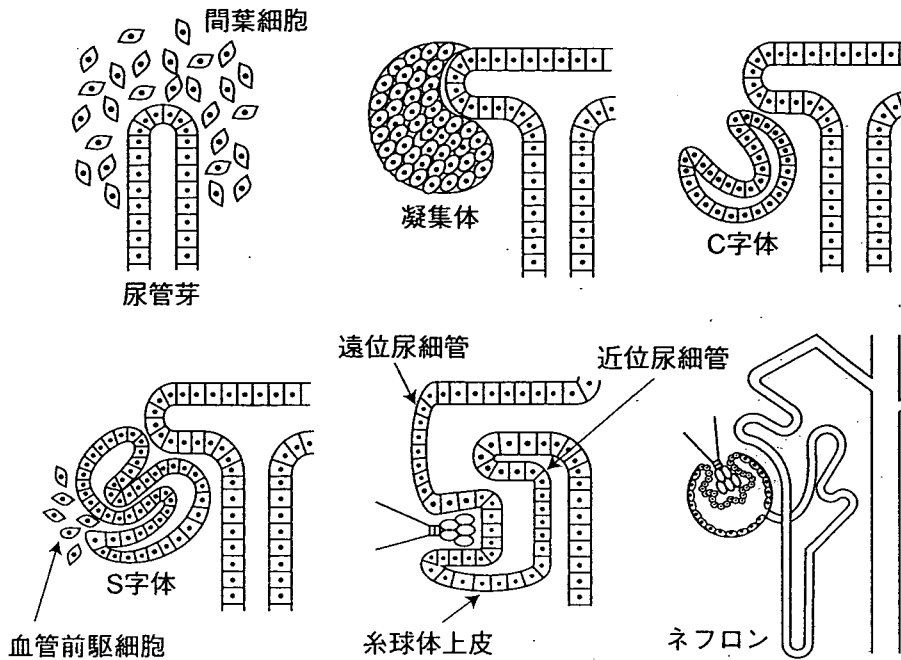


図 2 後腎発生図

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-

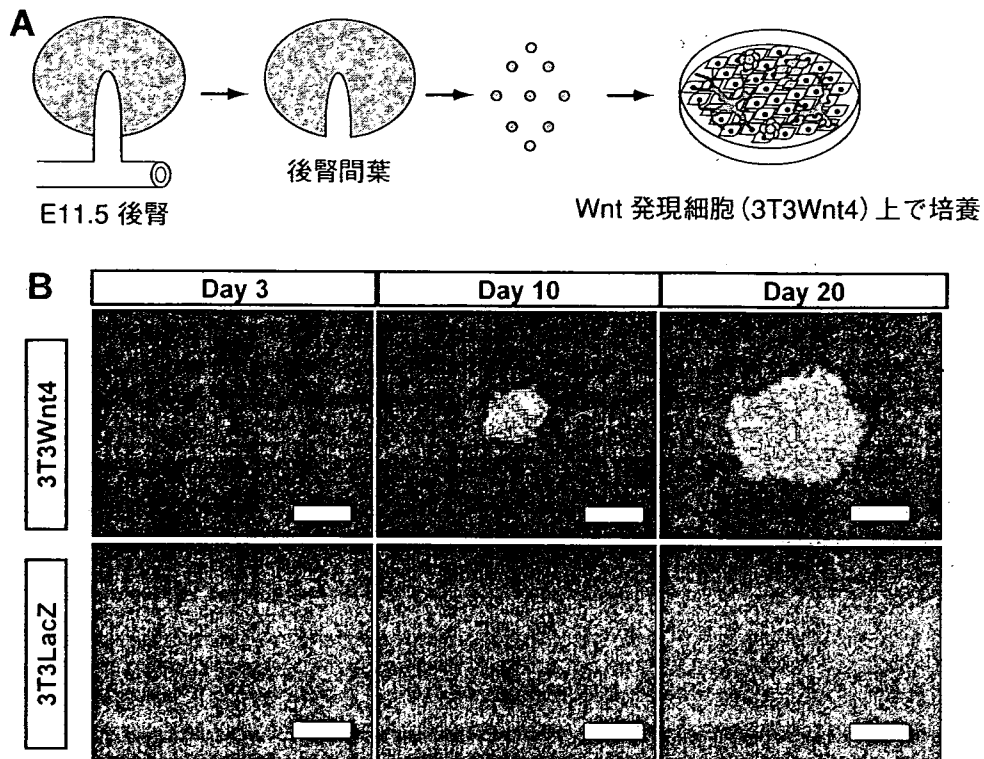


図 3

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

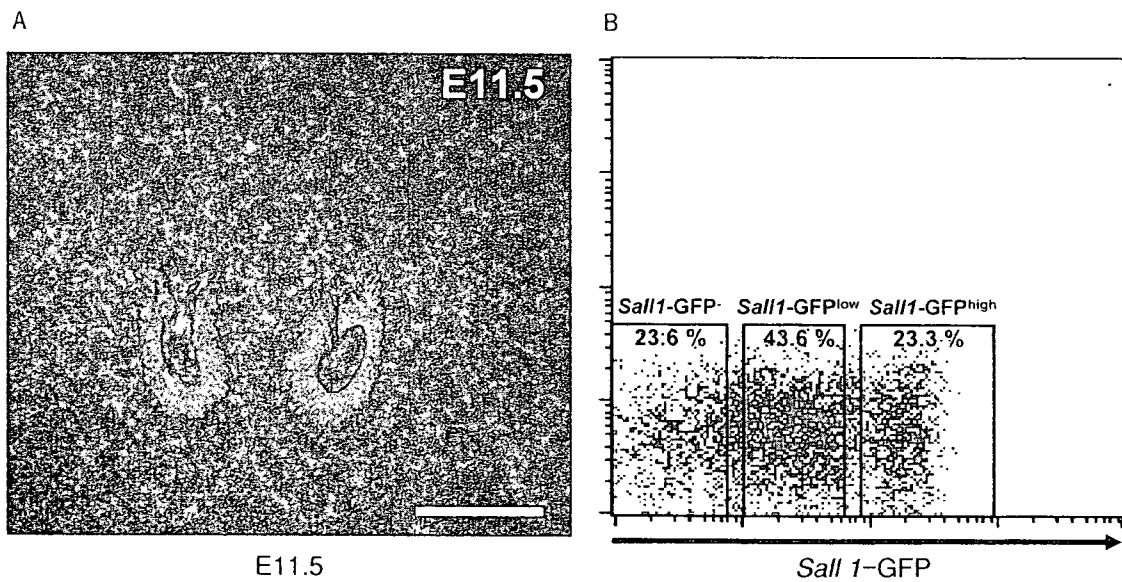


図 4

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

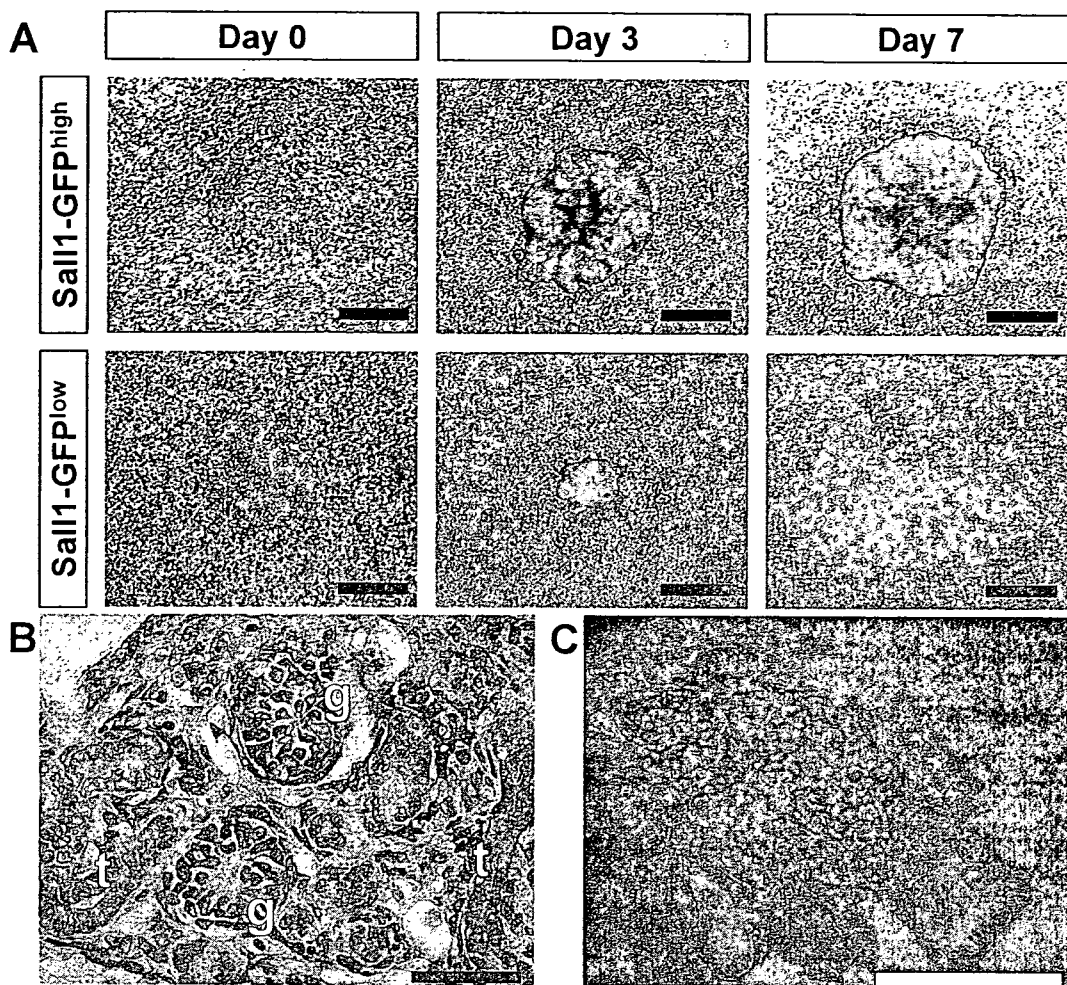


図 5

- 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(WT1, 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(*Sall1*-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, *Sall1*-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, *Sall1* 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, *Sall1* 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 *Sall1* 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.

【腎の発生・発達と腎再生】

Sall familyと腎の発生・幹細胞

Sall family in kidney development



井上秀二(写真) 西中村隆一

Shuji INOUE and Ryuichi NISHINAKAMURA

熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野

◎腎は老廃物の排泄や体内の恒常性の維持などの重要な役割を担い、必要不可欠の臓器であるが、自然には再生しない。現在の腎不全治療は多くの問題を抱えており、これに代わる新しい治療法として再生医療が注目を浴びている。腎再生を実現するためには腎の発生を理解することが重要である。本稿では腎の発生機構をおおまかに述べ、Sall1の腎発生における役割、およびSallファミリーであるSall4の機能、さらにSall1を使った腎前駆細胞の同定について解説する。

Key word Sall1, 腎発生, ES細胞, 再生医療

腎発生の分子機構

腎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。ヒトを含めた哺乳類では前腎と中腎は発生期に退行し、最終的に後腎から腎が形成される¹⁾。

後腎の発生は後腎間葉とWolff管から伸びる尿管芽との相互作用からはじまる。GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) は後腎間葉から分泌される。TGF- β (trans-forming 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形成・伸長させる機能をもつ²⁾。尿管芽にはGDNFの受容体分子であるRetとその共同受容体のGfra1 (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を介して尿管芽へシグナルを伝える。このGDNF-Ret/Gfra1シグナルが入らないマウスでは尿管芽が形成されない。また、受容体チロシンキナーゼに抑制的に働くSprouty1がWolff管に発現しており、GDNF-Ret/Gfra1シグナルを負に制御している³⁾。よってSprouty1のノックアウトマウスではWolff管から複数の尿管芽が形成され

る。このようにGDNFは尿管芽の形成に必須であり、多くの遺伝子の制御によってGDNFが後腎間葉の狭い領域に発現する(図1-A)。これにより適切な位置に単一の尿管芽が形成されると考えられる。

尿管芽のブランチング

GDNF-Ret/Gfra1シグナルは、後腎間葉への尿管芽侵入後のブランチング(枝分かれ)でも重要である。また、間質(stroma)も尿管芽のブランチングの制御をしている。間質は枝分かれ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⁴⁾。しかし、何の因子が間質から尿管芽へとシグナルを伝えているかは明らかではない。FGF7 (fibroblast growth factor)、FGF10はその候補因子のひとつであり、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1-B)。

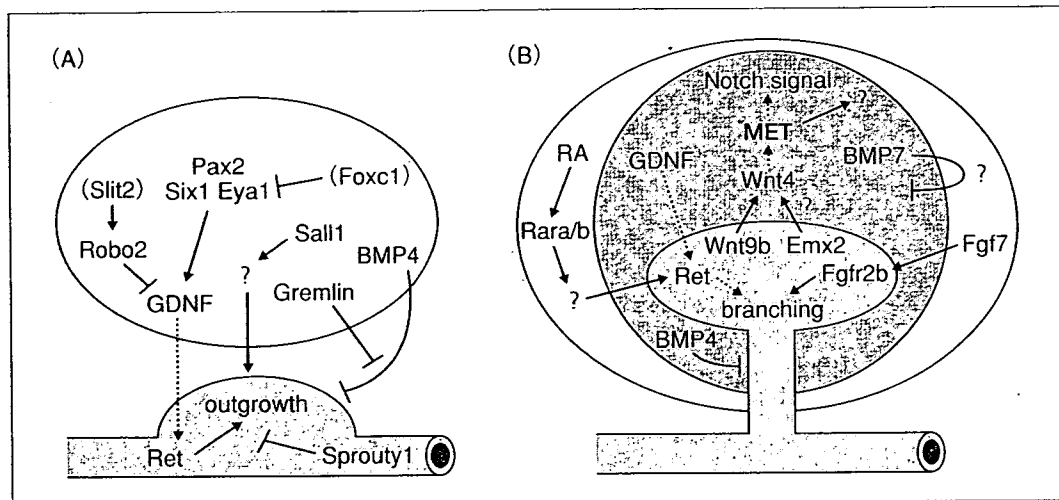


図 1 腎発生における遺伝子の機能(模式図)

A: E10.5 マウス後腎間葉における遺伝子カスケード。()内の遺伝子は後腎間葉よりも前部の間葉で発現し、異所性の尿管芽形成を抑えている。

B: 尿管芽の間葉への侵入後の遺伝子カスケード。

間葉の上皮化(mesenchymal-to-epithelial transformation: MET)

後腎間葉は尿管芽の侵入後に上皮への分化を開始し、糸球体や尿細管へと分化する。これは尿管芽から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考えられてきた。いままでにLIF(leukemia inhibitory factor)やFGF2, TGF- β などいくつかの候補因子が同定されている。しかし、ノックアウトマウス解析において、その候補因子の多くが腎発生では軽度な表現型しか示さないなかで、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た。Wnt9bのノックアウトマウスでは尿管芽は後腎間葉へ侵入するが、後腎間葉では管腔構造を認めない。MET後マーカーであるWnt4やFGF8, Pax8(paired box gene 8)の発現を認めず、METを起こさないことがわかった⁵⁾。これらより尿管芽からWnt9bが分泌され、これによって間葉でのWnt4の発現が誘導される。さらに、Wnt4は間葉自身に働いてMETが引き起こされることがわかった(図1-B)。

Sall1は腎発生に必須である

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の胞胚から切り出したアニマルキャップを培養して各種臓器を誘導する系が浅島らにより確立されている(前項参照)。この系ではアクチビンとレチノイン

酸の存在下に生理食塩水中で培養すると3日後に三次元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。この*in vitro*腎誘導系を用い、Zincフィンガードメインを8個もつ蛋白をコードする遺伝子Xsal-3をあらたに単離し、さらにそのマウスホモログであるSall1を単離した。Sall1はその配列よりヒトSALL1のマウスホモログと考えられた。

Sall1は、尿管芽が後腎間葉に侵入する以前であるマウス胎生10.5日から間葉に発現する。胎生11.5日以降も尿管芽での発現はみられないが、後腎間葉での強い発現が維持される。Sall1は腎のほかに、中枢神経系、耳胞、心臓、肢芽、肛門などでの発現を認めるが、そのノックアウトマウスの症状は腎に限局していた。つまりSall1ノックアウトマウスは尿管芽が伸長せず、腎が完全に欠損するか痕跡的であり、Sall1が腎発生にきわめて重要であることが証明された⁶⁾。しかし、Sall1ノックアウトマウスではGDNFの発現は失われておらず、GDNFのほかにSall1が制御する別の機構が存在することを意味している(図1-A)。

Sall4はES細胞に必須であり、Sall1と協調して腎を形成する

前述のようにSall1は腎以外でも発現しているにもかかわらず、Sall1ノックアウトマウスでは他

の臓器には明らかな異常は認められなかった。ヒト *SALL1* の変異は Townes-Brocks 症候群という遺伝病を引き起こすことが報告されている。これは多指症や外耳・内耳の異常を主体とし、ときに腎や心臓の形成障害を伴う常染色体優性遺伝である。つまりヘテロ接合体でも症状を有し、マウスの *Sall1* ヘテロ接合体に異常を認めないことと一致しない。また、マウス *Sall1* ホモ欠失体でも指や耳の異常を認めなかった。

ヒト *SALL1* のファミリーである *SALL4* は、眼球運動障害や上肢形成異常を示し、聴覚障害、心臓や腎の異常などの症状を示す Okihiro 症候群の原因遺伝子である。著者らが *Sall4* 欠失マウスを作成・解析したところ、*Sall4* ノックアウト胚は子宮着床直後に死亡し、内部細胞塊の増殖が著明に低下していた⁷⁾。ちなみに再生医療などで注目されている ES(胚性幹)細胞は内部細胞塊由来の細胞である。そこで ES 細胞で *Sall4* を欠失させると、その増殖が著明に低下し、*Sall4* が ES 細胞に必須であることが明らかになった。さらに、*Sall1*、*Sall4* のそれぞれのヘテロマウスでは腎に異常を認めないが、二重ヘテロマウスの一部では腎欠損がみられたため、*Sall1* と *Sall4* が協調して腎形成することが示唆された。これらから、後腎間葉と ES 細胞という 2 つの未分化な細胞において *Sall* ファ

ミリー共通の分子機構が存在する可能性があり、これを解明することによって幹細胞維持の一般則を導き出せるのではないかと期待している(「サイドメモ」参照)

後腎間葉には多能性前駆細胞が存在する

後腎間葉は、Wnt4 による MET を経て糸球体、近位尿細管、遠位尿細管へと分化していくため、この間葉のなかにこれら三系統の前駆細胞が存在すると考えられる。そこで胎生 11.5 日の後腎間葉を解離し Wnt4 を発現する細胞上で培養すると、1 個の細胞からシート状コロニーが形成され、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管などのマーカーを発現した。これは最初にまかれた 1 個の細胞が多系統に分化したことを示し、間葉中に腎の多能性前駆細胞が存在することを示している⁸⁾(図 2-A~C)。

前述のとおり *Sall1* は後腎間葉に発現しているため、*Sall1* の遺伝子座に蛍光蛋白質 GFP を挿入したマウスを作成した。そして、GFP の蛍光を指標として後腎間葉を flow cytometry (FACS) で選別したところ、GFP を強発現する分画のみからコロニーが形成された。つまり、この分画に多能性前駆細胞が存在することになる。さらに、この分画を再凝集させ、Wnt4 を発現する細胞上で器官培養すると糸球体や尿細管などの三次元構造を構築した(図 2-D~J)。これは、*Sall1* を強発現する前駆細胞分画をいったん解離して再集合させただけでも、ある程度腎らしき構造を取りうるということである。また、この実験系では発生期の腎が前駆細胞から分化していく過程を単一細胞レベルで解析できると考えられる。さらに、ES 細胞などを分化させ、その細胞が腎前駆細胞の特徴を備えているかを検定する系として使用できる可能性があり、腎の再生医療に役立つと考えられる。

サイド メモ

SALL1 蛋白の N 末端は抑制的 (dominant negative) に働く

Sall4 のヘテロマウスは肛門と心臓の異常を呈し、ヒト *SALL4* の変異が原因である Okihiro 症候群の症状の一部を再現できた。さらに、*Sall1* と *Sall4* のダブルヘテロマウスでは腎欠損を認め、外脳症や鎖肛、心室中隔欠損などの *Sall4* ヘテロにみられる症状の重症化を認めた。これらと *in vivo* のデータから、*Sall1* と *Sall4* が協調して臓器形成にかかわることが明らかになった。さらに、*Sall1* 蛋白の N 末端が *Sall4* に対し抑制的 (dominant negative) に働くことを解明した。すなわち、ヒト *SALL1* の変異による Townes-Brocks 症候群では *SALL1* の N 末端が産生され *SALL4* の機能を阻害する。このため *SALL1* 欠損だけでなく、*SALL4* の機能抑制による症状が出現する。これがヒトのほうがマウスより症状が重い原因と考えられる。

おわりに

腎発生は複雑で、その機構には不明な点が多かった。近年、その謎が徐々に明らかになっており、腎発生を踏まえた腎再生が夢物語でなくなる日も近いと考えている。著者らは腎の分化・誘導はかならずできると信じ、この領域の研究に取り

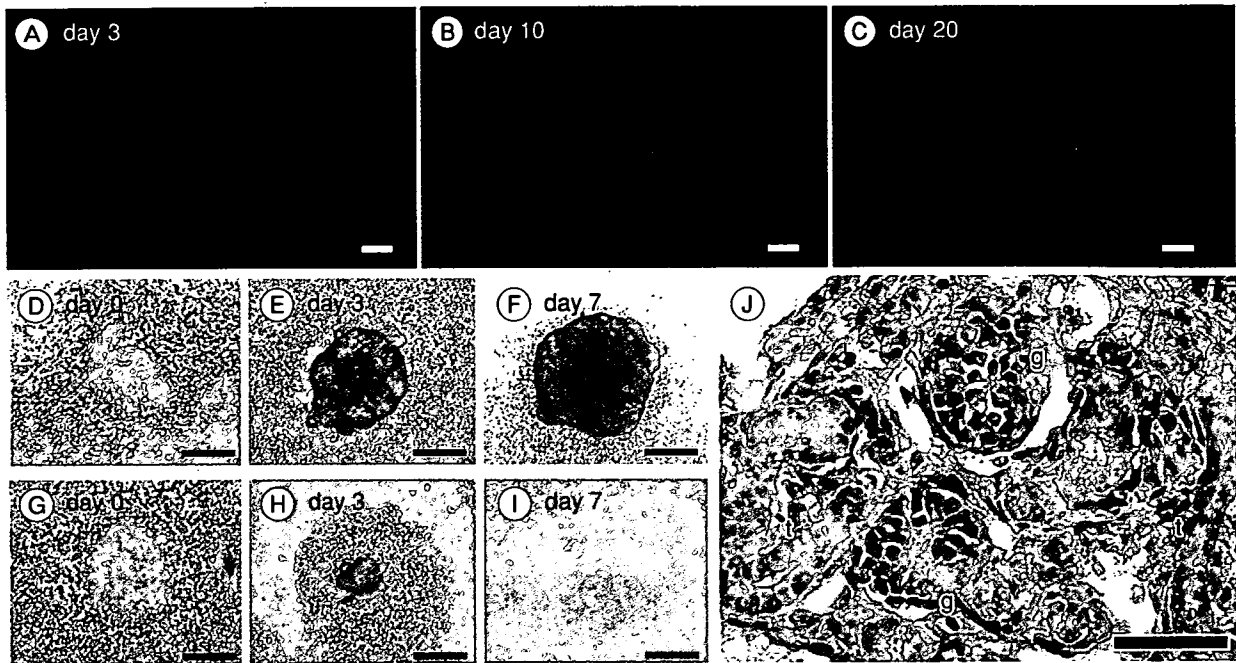


図 2 後腎間葉細胞の培養

A~C: Wnt4 を発現する細胞上で後腎間葉細胞を培養すると 1 個の細胞からコロニーを形成し多系統への分化を示した. bar: 50 μ m.

D~F: *Sall1* 遺伝子座に GFP をノックインしたマウスの後腎間葉から *Sall1*-GFP^{high} の細胞群を選別・再凝集させ器官培養すると三次元立体構造を構築した. bar: 500 μ m.

G~I: *Sall1*-GFP^{low} の細胞群を選別・再凝集させ器官培養しても、この現象を認めない. bar: 500 μ m.

J: *Sall1*-GFP^{high} の細胞群を選別・再凝集させ 10 日間培養し、切片を HE 染色. 糸球体様構造と管腔様構造を認める. g: 糸球体様構造, t: 管腔様構造, bar: 25 μ m.

組んでいる。この分野に医・理・工学などの英知が結集し、1 日も早く実現できることを期待する。

文献

- 1) 高里 実, 西中村隆一: 発生・分化再生研究 2005 一腎臓発生の分子機構. 実験医学, **23**: 100-106, 2005.
- 2) Pichel, J. G. et al.: Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*, **382**: 73-76, 1996.
- 3) Basson, M. A. et al.: Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev. Cell*, **8**: 229-239, 2005.
- 4) Batourina, E. et al.: Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through *Ret* expression. *Nat. Genet.*, **27**: 74-78, 2001.
- 5) Carroll, T. J. 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.
- 6) Nishinakamura, R. et al.: Murine homolog of *SALL1* is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development*, **128**: 3105-3115, 2001.
- 7) Sakaki-Yumoto, M. et al.: The murine homolog of *SALL4*, a causative gene in Okhiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with *Sall1* in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development*, **133**(15): 3005-3013, 2006.
- 8) Osafune, K. et al.: Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development*, **133**: 151-161, 2006.

* * *

腎臓形成と再生

Kidney development and induction of renal lineage

内山裕佳子・西中村隆一

哺乳類の腎臓は、発生学的に中胚葉から分化する後腎に由来する。後腎は、のちに糸球体や尿管となる後腎間葉と、集合管や尿管になる尿管芽との相互作用により分化するが、その分子機構がノックアウトマウスの解析などから明らかとなってきた。腎臓は自己修復能が低く、その機能は多種類の細胞からなる複雑な構造に依存していることから、再生の困難な臓器と考えられてきたが、臓器移植に代わる将来的な根治療法として再生医療への期待が高まるなか、腎臓構成細胞を分化誘導する試みも徐々に進んでいる。

Key words

●後腎間葉 ●腎臓前駆細胞 ●ES細胞 ●Sall1

はじめに：腎臓の構造と機能

腎臓は、尿産生による水・電解質平衡の維持、有害物質の除去に加え、レニン産生による血圧調節やエリスロポエチン産生による造血、ビタミンD活性化による骨代謝にも関与する。尿の産生と排泄の機能単位はネフロンとよばれ、片側の腎臓に約100万個のネフロンが存在する。ネフロンは、毛細血管の塊である糸球体とそれを包むボーマン嚢、それにづく近位尿細管、遠位尿細管からなり、集合管へとつながる。おのおののネフロン由来の集合管は最終的に1本の尿管となり膀胱へ達する。ネフロンを構成する細胞は多様であり、血管内皮細胞、糸球体上皮細胞(たこ足細胞)、尿細管上皮細胞、メサングウム細胞、糸球体傍細胞など、少なくとも12種類以上の細胞が存在する(図1)。

このような腎臓の特異な構造はどのように形成されるのだろうか? その発生過程を知ることにより、腎臓再生への足がかりが得られるだろう。近年、腎臓発生の分子機構が急速に明らかになってきており、*in vitro*での腎臓細胞再生へむけた試みも徐々に進んでいる。本稿では、前半で腎臓の発生過程について概説し、後半で腎臓の再生研究の現状と今後の展望を述べる。

腎臓の発生

1. 腎臓発生の概略

腎臓は中胚葉に由来し、哺乳類では前腎、中腎を経て、最終的な腎臓である後腎が発生する(図2)。マウスでは胎生7.5日に原始線条の出現により中胚葉が確立され、神経管に隣接する中胚葉からは沿軸中胚葉(体節)が生じ、より遠位の中胚葉からは中間中胚葉と側板中胚葉が生じる。腎臓は、沿軸中胚葉と側板中胚葉とのあいだに位置する中間中胚葉に由来する。胎生8.5日に中間中胚葉から前腎管が生じ、前腎管の吻側では周囲の中胚葉から前腎が生じる。前腎は発生過程で退化するが、前腎管の尾側はウォルフ管(Wolffian duct)として残存する。前腎よりも尾側でウォルフ管から約50個の中腎が形成され、糸球体と近位尿細管様の構造を形成するが、男性生殖腺へ分化する一部を除き、ほかは前腎と同様に退化する。成体で機能する永久腎は、中腎よりもさらに尾側に形成される後腎に由来する。

後腎の発生は、胎生10.5日にウォルフ管の尾側から尿管芽(ureteric bud)が背側へむかって分枝し、間葉細胞集団へ伸長することによりはじまる(図3)。後述するように、尿管芽と後腎間葉の2つの構成要素の相互的な誘導作用により後腎が形成される。尿管芽の先端が枝分かれを重ねる一方、後腎間葉細胞は伸長した尿管芽の先端に集合して上皮化する。これは間葉-上皮転換(mesenchymal-to-epithelial transformation; MET)とよばれ、尿管芽の伸長・分岐とともに後腎形成の重要なステップである。上皮化した間葉細胞の集合体はC字体を経てS字体となる。S字体では

Yukako Uchiyama, Ryuichi Nishinakamura
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
E-mail : uchiyama@kumamoto-u.ac.jp
ryuichi@gpo.kumamoto-u.ac.jp
URL : <http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/icb/index-j.html>

近位-遠位軸が成立しており、近位部に血管内皮細胞が侵入して糸球体へ分化する。遠位部は尿管芽と融合し、近位尿管、遠位尿管を形成する。一方、尿管芽は集合管、尿管へ分化する。そのほかの間葉細胞は間質を形成する。尿管芽は放射状に伸長と分岐を続けるので、新しいネフロンほど腎臓の辺縁近くに位置することになる。

2. 腎臓発生の分子機構

このように、最終的にネフロンを構成する細胞の大部分は後腎間葉から尿管芽との相互作用により分化し、その分子機構については詳細な解析が行なわれている。一方、中胚葉から前腎、中腎が分化する過程や、後腎間葉から最終的に多種類の細胞が分化する過程については未解明の部分が多い。

A. 中間中胚葉の運命決定

中間中胚葉の運命決定にはBmpシグナルが関与すると考えられている。アフリカツメガエルの中胚葉ではBmp4の濃度により、高濃度では血液、中濃度では腎臓、低濃度では筋や脊索が誘導される¹⁾。ニワトリでは、高濃度のBmp2は側板中胚葉を誘導し、低濃度では中間中胚葉を誘導することが示されている²⁾。哺乳類における中胚葉分化の分子基盤についての報告はほとんどない。

B. 前腎、中腎の形成

中間中胚葉では、形態的な変化以前にOsr1, Pax2, Lim1などのマーカーが発現する。現在、知られているなかでもっとも早期に発現がみられるのはOsr1であり、胎生8.0日以降、間葉で発現が認められるが、上皮化した細胞では検出されない。Osr1ノックアウトマウスではウォルフ管や中腎の形成に異常が認められ、後腎間葉も欠損する。ニワトリの中胚葉でOsr1を異所性に発現させるとPax2などのマーカーが誘導されることから、Osr1は腎臓前駆細胞の誘導に必要であると考えられる³⁾。Osr1ノックアウトマウスは後述のPax2とPax8のダブルノックアウトマウスよりも軽い表現型を示すが、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュでOsr1とOsr2の両方をノックダウンすると腎臓構造が形成されないことから⁴⁾、Osr1はOsr2によって補われている可能性もある。

一方、Pax2は胎生8.5日より尿管と間葉の両方で発現が認められる。Pax2を異所性に発現させると腎臓上皮に分化することから、Pax2は腎臓系列の運命決定にかかわっていると考えられる⁵⁾。Pax2とPax8のダブルノックアウトマウスの中間中胚葉では、前尿管形成に必要な間葉-上皮転換がみられず、前腎、中腎、後腎が形成されない⁵⁾。Pax2のみのノックアウトマウスはダブルノックアウトマウスよりも軽

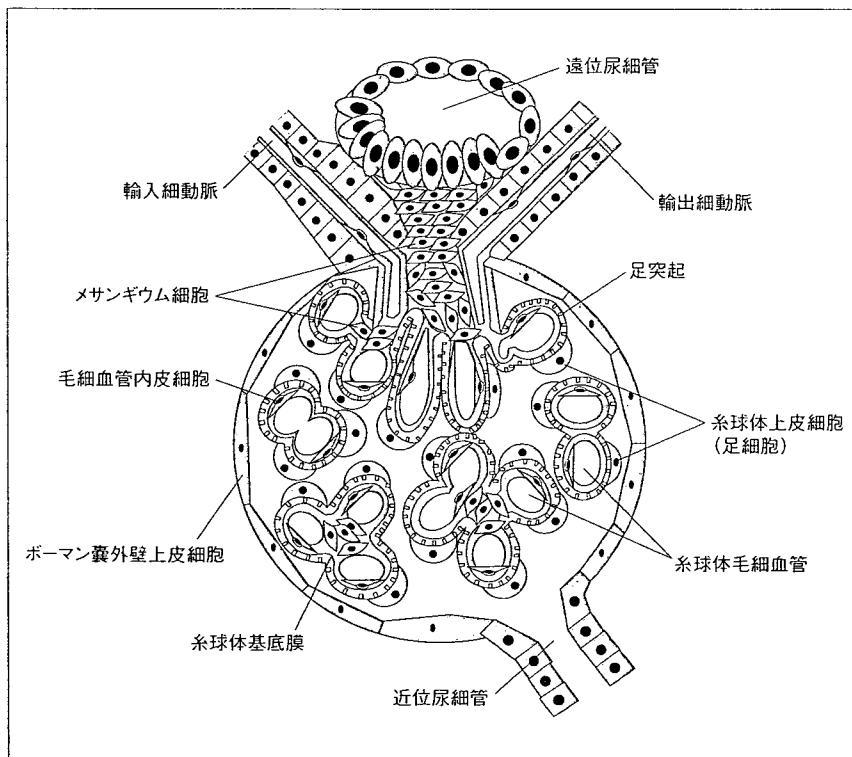


図1 糸球体の構造

糸球体は、毛細血管網とその支持組織であるメサンギウム細胞、それらを覆う内外2層の系球体上皮細胞、および、ボーマン嚢外壁上皮細胞からなる球状の小体で、輸入細動脈および輸出細動脈と接続している。腎臓には毎分約1.2リットルの血液が流れ込み、糸球体で毛細血管内外の圧力差により濾過され原尿となる。毛細血管内皮細胞、糸球体基底膜、および、足細胞の3者が濾過膜を形成し、選択的透過を行なう。原尿は尿管で物質の分泌や水分の再吸収を受け、尿として排泄される。尿管の機能は、尿管が形成する特殊なループ構造(ヘンレ係蹄)や、尿管上皮細胞が部位特異的に発現するさまざまなチャネルやポンプに依存している。