

い表現型を示すが⁶⁾、これはPax8がPax2と重複した機能をもつためと考えられる。ニワトリにおける解析から、近接する外胚葉⁷⁾や沿軸中胚葉(体節)⁸⁾からのシグナルが中間中胚葉におけるPax2の発現に重要であるものと考えられている。また、Lim1ノックアウトマウスは後腎を欠損するが、中腎までは形成されPax2を発現することから、Lim1はPax2の下流で機能すると考えられる。

C. 後腎形成

後腎形成は2つの重要なイベント、すなわち、尿管芽の分岐・伸長と間葉-上皮転換のくり返しにより進行する。この過程で、尿管芽と間葉のあいだには相互的なシグナル作用がみられる。間葉から分泌されるGDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor, グリア由来神経栄養因子)は、尿管芽に発現するGDNF受容体であるRetおよびその

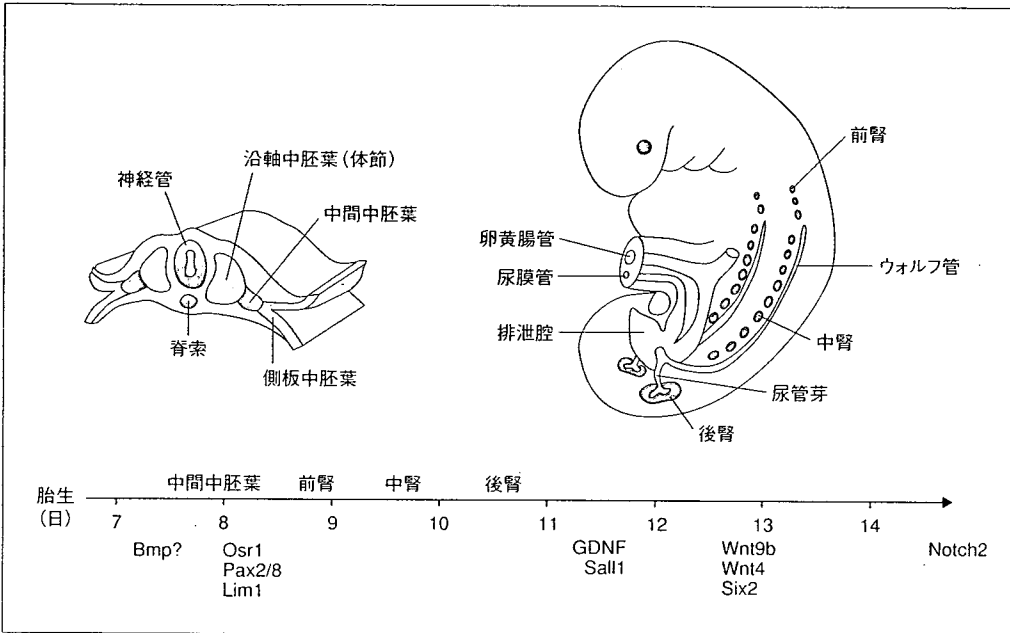


図2 マウスにおける腎臓発生の時系列

哺乳類では、中間中胚葉から3つの腎臓が吻側から尾側へむかって順次形成される。このうち、前腎、中腎は退化し、最終的には後腎が成体で機能する。下部に、腎臓形成に関与する遺伝子の一部を示す。

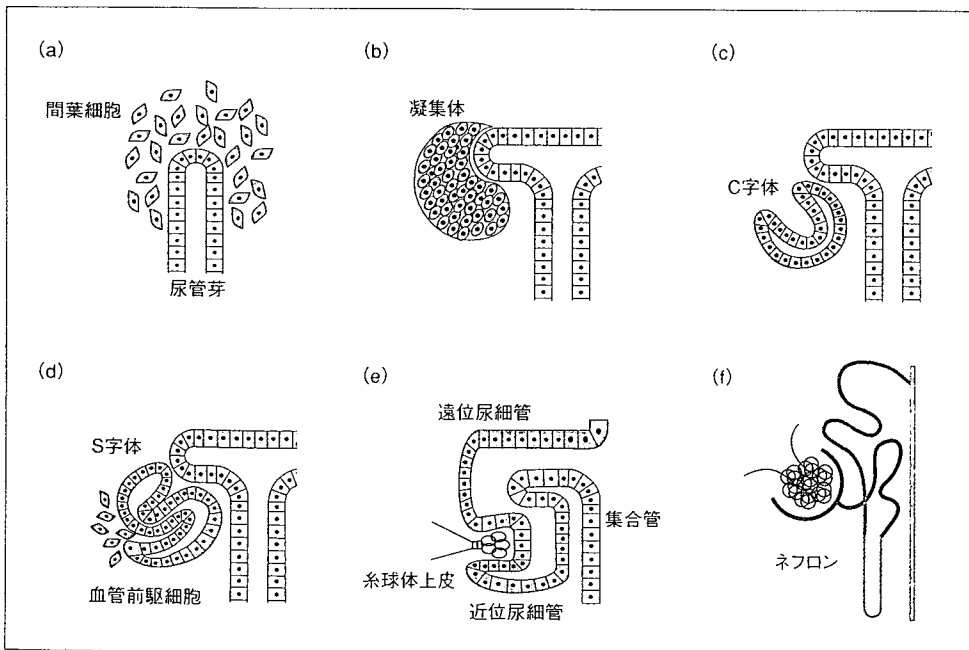


図3 ネフロンの発生

胎生10.5日にウォルフ管の尾側から尿管芽が分岐し、後腎間葉へ侵入を開始する(a)。間葉細胞は尿管芽の周囲に凝集体をつくる(b)。凝集体はC字体を経て(c)、S字体となり、血管前駆細胞を取り込みながら、遠位尿管芽と融合する(d)。S字体の部位ごとに糸球体上皮、近位尿管、遠位尿管へと分化する(e)。糸球体、尿管、集合管を合わせた腎臓機能の最小構成単位をネフロンとよぶ(f)。

共同受容体であるGDNF受容体 α に作用し、尿管芽の分岐と伸長を促進する。一方、尿管芽から分泌されるWnt9bは間葉におけるWnt4の発現を促進し⁹⁾、Wnt4は間葉自身に作用して間葉-上皮転換を促進する。これらの過程にかかわる多くの因子が知られており、詳細はほかの総説を参照されたい¹⁰⁾。

D. 糸球体、尿管への分化

糸球体や尿管の運命決定にはNotchシグナルが重要なはたらきをしている。Notchを切断して活性型にする γ セクレターゼの活性を欠損したマウス腎臓ではNotch1からNotch4まですべてのNotchシグナルが阻害されるが、このマウスではC字体やS字体が形成されず糸球体と近位尿管が欠失する¹¹⁾。別の報告によると、糸球体と近位尿管の分化にはNotch2が必要である¹²⁾。一方、ヘンレ係蹄の分化にはBrn1が必要であることが示されている¹³⁾。

糸球体の血管内皮細胞やメサンギウム細胞は血管前駆細胞から分化する。血管前駆細胞の由来が、後腎間葉かあるいは腎臓外部かについては意見が分かれている。糸球体上皮はVEGF (vascular endothelial growth factor, 血管内皮細胞成長因子) を分泌し、血管前駆細胞から内皮細胞への分化を促進する¹⁴⁾。内皮細胞はPDGF β (platelet-derived growth factor β , 血小板由来成長因子 β) を分泌し、血管前駆細胞からメサンギウム細胞の分化を促進する^{15,16)}。

II 腎臓の再生

腎臓の再生といっても、多種類の細胞からなる複雑な3次元構造を構築し、さらに血流や神経支配を適正に配置するような技術は、現時点で実現性が低い。腎臓の再生研究における当面の目標は、特定の腎臓細胞を誘導し細胞移植により損傷部位の機能を回復することであろう。移植細胞の分裂による組織再生に加え、細胞が周囲の残存組織に与える再生促進シグナルなどの効果も期待される。また、細胞移植に加えて、コラーゲンなどの生体材料を用いた足場に誘導した細胞を植えつけ、機能的な組織切片や臓器を構築して移植する組織工学の技術も進んでいる。最良の治療効果を得るためには、個々の病態にあわせて特定の分化誘導段階にある細胞を十分な量得る技術が必須である。

腎臓の再生医療に利用される細胞資源としては、成体前駆細胞、胎仔性前駆細胞、ES細胞があげられる。

1. 成体前駆細胞

成体の腎臓にその幹細胞は存在しないと考えられてきたが、最近になって、さまざまな前駆細胞の候補が提唱されている。これまでに報告されている候補として、DNA標識物質プロモデオキシウリジン (BrdU) の蓄積により区別される分裂速度の遅い (slow-cycling) 細胞¹⁷⁾、色素Hoechst 33342の排泄能が高いことで区別されるSP (side population) 細胞¹⁸⁾、CD24⁺CD133⁺細胞¹⁹⁾、Oct4発現細胞²⁰⁾、などがあげられる。しかし、これらが幹細胞の条件である自己複製能と分化能をあわせもつかどうかの検定は、現段階では腎臓マーカー発現で確認されるのみであって、さらに機能的アッセイを行なう必要がある。また、腎臓外に存在する成体前駆細胞として骨髄間葉系幹細胞や造血幹細胞があり、骨髄間葉系幹細胞が腎臓系列の細胞に分化したとの報告もある²¹⁾。

2. 胎仔性前駆細胞

マウスでは生後10日前後までネフロン形成が続いており、少なくとも胎生期マウスの後腎間葉には、多種類の腎臓構成細胞に共通の祖先である前駆細胞が存在する。筆者らは、後腎間葉に発現するSall1遺伝子を指標として、胎生期マウス後腎から腎臓前駆細胞の単離培養を行なった(図4)。Sall1遺伝子は腎臓発生に必須の遺伝子であり、Sall1ノックアウトマウスは尿管芽が後腎間葉へ伸長せず、後腎を欠損して出生直後に死亡する²²⁾。Sall1遺伝子座に蛍光蛋白質GFPを導入したノックインマウスの後腎間葉から、FACS (fluorescence activated cell sorting, フローサイトメーター) を用いてGFP高発現細胞を選別し、Wnt4を発現するフィーダー細胞上で培養すると、1個の細胞からコロニーが形成され、糸球体、近位尿管、遠位尿管のマーカーを発現する。また、これらのGFP高発現細胞を再凝集させ器官培養すると、3次元構造を再構築し糸球体や尿管様の構造が認められる²³⁾。

そのほか、後腎間葉中に存在する前駆細胞の指標として、胎生10.5日から後腎間葉に発現するSix2が注目されている。Six2ノックアウトマウスでは異所的に間葉細胞の早熟な上皮化が起こり、前駆細胞が減少し腎臓が低形成となる。Six2ノックアウトマウスの後腎間葉でWnt4の発現領域が拡大していることから、Six2はWnt4シグナルを抑制することにより間葉-上皮転換を阻害し、後腎間葉の前駆細胞を未分化な状態に保っているものと考えられる²⁴⁾。

3. ES細胞

ES細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) を成体に移植すると奇形腫を形成し, その組織中には糸球体様の構造も確認される. *in vitro* でES細胞から腎臓系列の細胞を誘導することができれば, 容易かつ豊富に得られる細胞資源として有用である. ヒトES細胞の利用には倫理的な問題があるが, 分化した皮膚線維芽細胞からの多能性幹細胞誘導が報告されており²⁵⁾, 体細胞をES細胞化し, そこから目的の細胞を分化誘導する方法によって倫理的問題を回避できる可能性が出てきた. また, ES細胞から*in vitro* で腎臓細胞を誘導・単離することができれば, さまざまな分化誘導段階にある細胞を多量に得ることができるため, 正常発生過程のモデルとして, また, 疾患の研究材料や薬効評価の道具としても利用価値が高い.

ES細胞からの腎臓細胞誘導については, これまでにいくつかの報告がある. Wnt4を導入したマウスES細胞から胚様体を形成させ, HGF (hepatocyte growth factor, 肝細胞増殖因子) とレチノイン酸を添加すると, 尿細管の分化が確認される²⁶⁾. 別の報告では, マウスES細胞から胚様

体を形成させると糸球体様の構造を形成し, 足細胞のマーカであるネフリンや遠位尿管管マーカーであるTHPなどを発現する²⁷⁾. また, アフリカツメガエルでは, 胞胚期の予定外胚葉領域 (アニマルキャップ) をアクチビンとレチノイン酸で処理すると前尿管が誘導される²⁸⁾. 前述のSall1遺伝子もこの系を利用してクローニングしたものである. アフリカツメガエルでの結果にヒントを得て, マウスES細胞からアクチビン, レチノイン酸およびBmp7存在下で胚様体を形成させ脊索と共培養すると, 中間中胚葉のマーカーを発現し尿管管構造が確認されるとの報告もある²⁹⁾.

このように, 腎臓前駆細胞を単離するさまざまなアプローチが行なわれているが, これまでの腎臓再生研究では, 前駆細胞を確実に同定するアッセイ系が欠けていた. これに対し, 筆者らの確立したSall1-GFPノックインマウスの後腎間葉から前駆細胞を単離培養する系は, 前駆細胞を1個の細胞単位で評価できる. この系に基づき, さらに, 筆者らはES細胞からの腎臓前駆細胞の誘導と単離をめざしている. この際, 必要十分な腎臓誘導因子を絞り込むと同時に, *in vitro* でも正常発生と同じ段階的な誘導が起こるのかを検証する必要がある.

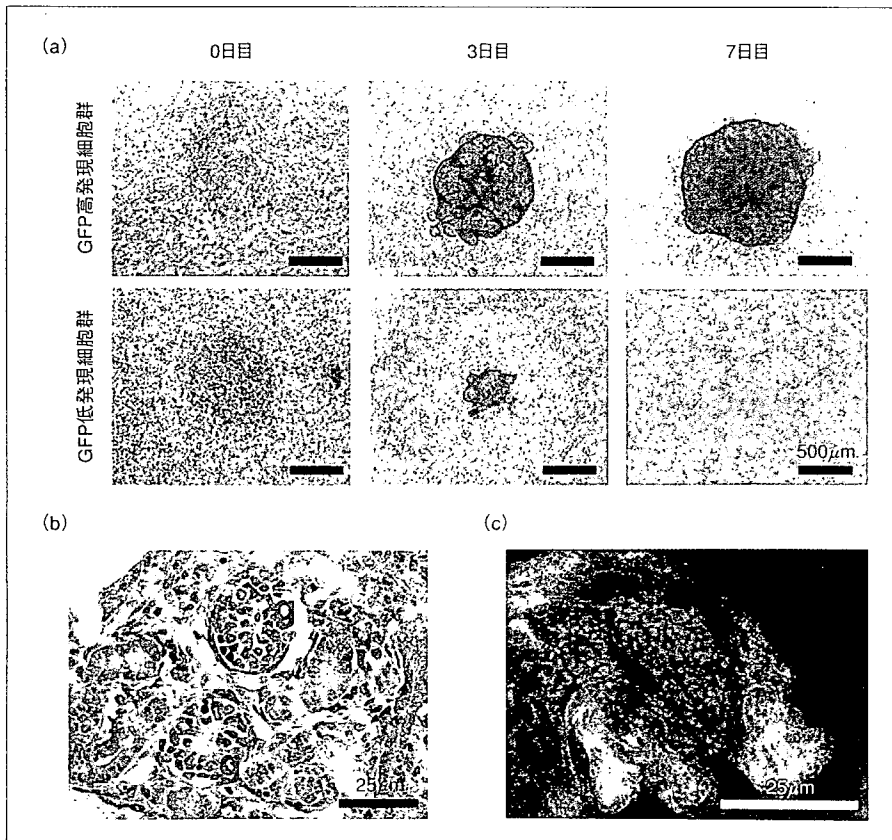


図4 後腎間葉細胞からの腎臓前駆細胞の単離

(a) Sall1 遺伝子座に GFP を導入したノックインマウスの後腎間葉から, FACS を用いて GFP 高発現細胞群と GFP 低発現細胞群を選別し, Wnt4 を発現するフィーダー細胞上で器官培養すると, GFP 高発現細胞だけが分化して 3 次元構造を再構築する.

(b) 培養 10 日目の Sall1-GFP 高発現細胞群のヘマトキシリン-エオシン染色像. 尿管管や糸球体様構造がみられる. g : 糸球体様構造, t : 尿管管様構造.

(c) Sall1-GFP 高発現細胞群の WT1 (赤, 足細胞マーカー) と LTL (緑, 近位尿管管マーカー) による二重染色像.

前駆細胞から各系列の細胞をどのように誘導するかも今後の大きな課題である。たとえば、Notch シグナルの制御により糸球体上皮や尿細管を分化誘導できるのか？ 神経発生や造血では、幹細胞から数系統の前駆細胞が分化し、さらにそれぞれの前駆細胞から多様な細胞が分化する細胞系譜の概念が確立されているが、腎臓構成細胞についてはそのような系譜はいまのところ明らかでない。最終的に20種類以上の腎臓構成細胞を生みだすおのおの系譜を追跡するためには、*in vitro* 分化系を用いたさまざまな条件下での検討が不可欠である。

おわりに

現在、わが国で人工透析を受ける人の数は26万人に達しており、腎不全などの医療費は年間1兆円をこえる。現時点で末期慢性腎不全に対する根治療法は腎移植しかないが、ドナーが決定的に不足しており、腎臓売買や病腎移植が重大な社会問題となっている。臓器移植に代わる新しい治療として再生医療が期待されており、今後、腎臓前駆細胞、さらに、前駆細胞から糸球体、近位尿細管、遠位尿細管細胞への分化機構が解明されることで、目的の腎臓細胞を分化誘導するための手がかりが得られることを願っている。

文 献

- 1) Dosch, R. *et al.*: *Development*, 124, 2325-2334 (1997)
- 2) James, R. G., Schultheiss, T. M.: *Dev. Biol.*, 288, 113-125 (2005)
- 3) James, R. G. *et al.*: *Development*, 133, 2995-3004 (2006)
- 4) Tena, J. J. *et al.*: *Dev. Biol.*, 301, 508-531 (2007)
- 5) Bouchard, M. *et al.*: *Genes Dev.*, 16, 2958-2970 (2002)
- 6) Torres, M., Gomez-Pardo, E., Dressler, G. R., Gruss, P.: *Development*, 121, 4057-4065 (1995)
- 7) Obara-Ishihara, T., Kuhlman, J., Niswander, L., Herzlinger, D.: *Development*, 126, 1103-1108 (1999)
- 8) Mauch, T. J. *et al.*: *Dev. Biol.*, 220, 62-75 (2000)

- 9) Qian, J. *et al.*: *Genomics*, 81, 34-46 (2003)
- 10) 山下和成・西中村隆一: 蛋白質 核酸 酵素, 50, 644-649 (2005)
- 11) Wang, P., Pereira, F. A., Beasley, D., Zheng, H.: *Development*, 130, 5019-5029 (2003)
- 12) Cheng, H. T. *et al.*: *Development*, 134, 801-811 (2007)
- 13) Nakai, S. *et al.*: *Development*, 130, 4751-4759 (2003)
- 14) Eremina, V. *et al.*: *J. Clin. Invest.*, 111, 707-716 (2003)
- 15) Leveen, P. *et al.*: *Genes Dev.*, 8, 1875-1887 (1994)
- 16) Soriano, P.: *Genes Dev.*, 8, 1888-1896 (1994)
- 17) Oliver, J. A. *et al.*: *J. Clin. Invest.*, 114, 795-804 (2004)
- 18) Challen, G. A. *et al.*: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, 1896-1912 (2006)
- 19) Sagrinati, C. *et al.*: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, 2443-2456 (2006)
- 20) Gupta, S. *et al.*: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, 3028-3040 (2006)
- 21) Yokoo, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 3296-3300 (2005)
- 22) Nishinakamura, R. *et al.*: *Development*, 128, 3105-3115 (2001)
- 23) Osafune, K. *et al.*: *Development*, 133, 151-161 (2006)
- 24) Self, M. *et al.*: *EMBO J.*, 25, 5214-5228 (2006)
- 25) Takahashi, K., Yamanaka, S.: *Cell*, 126, 663-676 (2006)
- 26) Kobayashi, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336, 585-595 (2005)
- 27) Kramer, J. *et al.*: *Differentiation*, 74, 91-104 (2006)
- 28) Uochi, T., Asashima, M.: *Dev. Growth Differ.*, 38, 625-634 (1996)
- 29) Kim, D., Dressler, G. R.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 3527-3534 (2005)

内山裕佳子

略歴：2007年 熊本大学大学院医学教育部博士課程 修了，同年熊本大学発生医学研究センター 客員研究員。

研究テーマ：腎臓発生。

西中村隆一

略歴：1996年 東京大学大学院医学系研究科博士課程 修了，東京大学医科学研究所 客員助教授を経て，2004年より熊本大学発生医学研究センター 教授。

研究テーマ：腎臓発生をノックアウトマウスを使ってかつ幹細胞学的視点から解析している。複雑な3次元立体構造の構築や血管の配置など解明すべき点も多く、挑戦しがいのある課題だと考えており、この独創的な分野に多くの人が参入することを願っている。

【腎臓は再構築できるか？】

How to make the kidney

稲永 敏明・西中村 隆一

Inenaga Toshiaki Nishinakamura Ryuichi

Key words

metanephros, embryonic stem cell, mesenchymal stem cell, kidney development

要約

再生医療の一環として腎臓を再構築することは現時点では困難な課題である。しかし腎臓再生に向けて、成体あるいは胎児腎臓細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、胚性幹細胞などを使った多くの試みがなされており、尿細管や胎児腎臓の前駆細胞は同定されつつある。また間葉と尿管芽の相互作用による腎臓発生の分子機構も急速に解明が進んでいるが、さらに腎臓前駆細胞の確実な検出系の確立、前駆細胞から各種細胞系譜への運命決定機構の解析が必要である。

これらの知見を組み合わせることで、複雑な構造を有する腎臓を再構築することが必ずできるようになるはずである。

はじめに

末期腎不全のように腎機能と構造が荒廃してしまった場合に、腎臓を新たに再構築することは夢物語だろうか？ 多種の細胞を誘導したのちそれらを3次元立体構造に構築し、さらに血管系と結合する必要がある。これを実現するのは現時点では確かに困難である。

まず足細胞など一系統の細胞に限って誘導し、その細胞種の機能を代償することを目指すのが現実的と思われるが、これすら実現していない。しかし腎臓発生の過程をなぞることで、腎臓再構築へのヒントが得られるのではないだろうか。

本稿では腎臓発生の概略を述べたあと、現時点での再生への試みをまとめ、さらに発生に沿った腎臓再構築の可能性を考察する。

1. 腎臓の発生

腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される(図1)。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。

この後腎の形成は尿管芽と後腎間葉との相互作用から始まる。後腎間葉はGDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) という液性因子を分泌して尿管芽を引き寄せさせる。後腎間葉に侵入した尿管芽はWnt9bを分泌し、それに反応した間葉は自らWnt4を分泌し、これが間葉自身に働いて、間葉は上皮性の管へと分化する。この管はその後S字型に変化し、その上部が近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿管管となり尿管芽と合流する。S字体の下部はボウマン嚢および糸球体上皮細胞(足細胞, podocyte)へと分化し、そこに毛細血管が入り込んで糸球体が形成される(図2)。

一方、尿管芽は分岐を重ね、集合管と尿管になる。この分化プロセスが分岐した尿管芽の枝一つ一つで行われ、最終的にヒトでは50万-100万個のネフロンが形成される。後腎間葉から糸球体、近位及び遠位尿細管、ヘンレのループという腎臓としての機能を司る大部分が発生することになるため、後腎間葉は多能性をもった前駆細胞集団ともいえる。

足細胞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。足細胞がVEGF (vascular endothelial growth factor)

熊本大学 発生医学研究センター 細胞識別分野: Division of Integrative Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University

〒860-0811 熊本市本荘2-2-1 Fax: 096-373-6618

E-mail: ryuichi@gpo.kumamoto-u.ac.jp

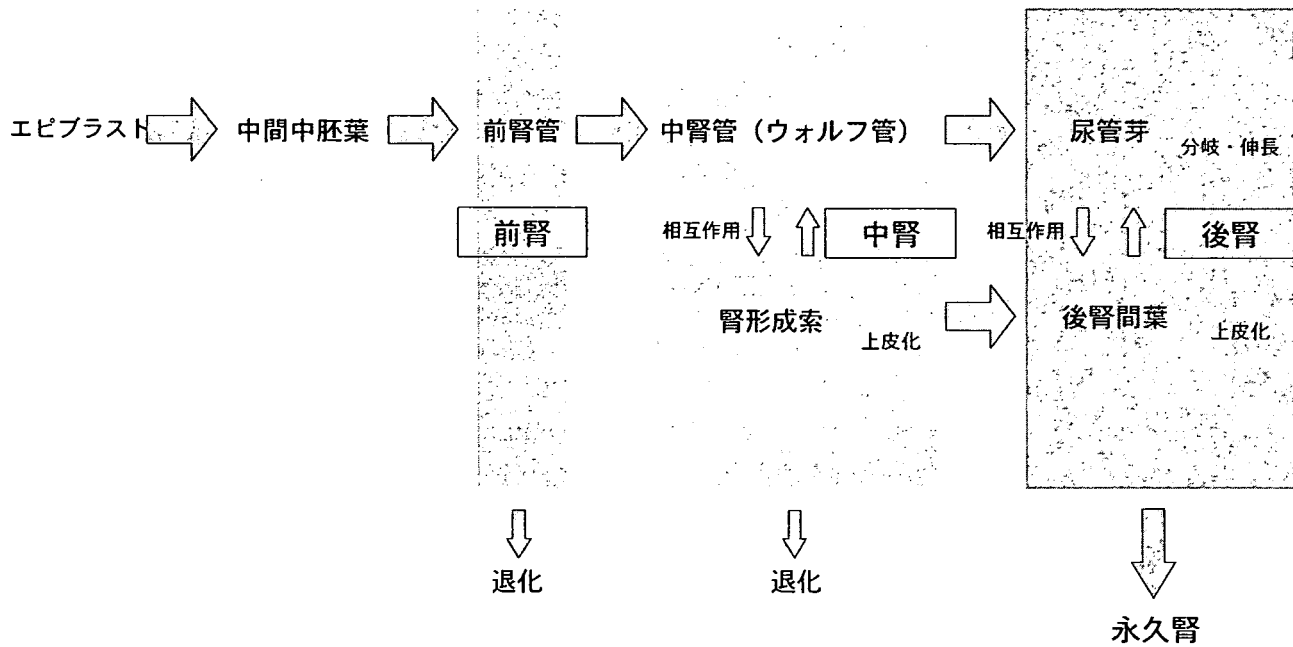


図1 哺乳類における腎臓発生

腎臓は前腎、中腎、後腎の順で形成される。哺乳類の永久腎である後腎は腎形成素の後端が特異化した「後腎間葉」と中腎管より発芽した上皮である「尿管芽」との相互作用により形成される。

を発現して血管内皮を呼び込み、さらに血管内皮がPDGF-B (platelet-derived growth factor, B polypeptide)を分泌してメサンギウム細胞を呼び込むという図式が提唱されている。

2. 腎臓再生の試み

(1) 成体腎臓内の前駆細胞

side population (SP) 細胞はDNA結合色素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を含む。よって他の臓器でもSP細胞に体性幹細胞が存在する可能性があると考えられた。しかし腎において、SP細胞が成体腎の幹細胞であると考えられる報告はない。

腎臓のSP細胞を急性腎不全モデルマウスに静脈注射すると、腎機能の改善が見られたとの報告があるが、投与されたSP細胞は間質のみに留まっており、肝細胞増殖因子 (HGF) などの増殖因子を分泌することが主因であると考えられる¹⁾。造血幹細胞の表面抗原であるSca-1を発現する細胞が成体マウス腎臓の間質に存在し、これを分離して虚血再灌流モデルに投与したところ、尿管管や間質に存在していた

とするという報告もある²⁾。しかしドナー細胞とホスト細胞との融合、つまり4倍体になっている可能性を否定できていない。実際、造血幹細胞の多彩な分化能の報告のほとんどは、細胞融合によると考えられるようになっており、腎臓研究においても慎重な検討が必要である。

組織幹細胞の持つ特徴の一つに細胞周期が遅いことがある。このために幹細胞は、BrdUなどのDNA合成期に取り込まれるラベルを長く保持することになる。近位尿管にそのような細胞が存在しており、単離してFGFやHGFの存在下で培養すると管腔構造を形成することが報告された³⁾。また、近位尿管のS3セグメントから細胞を培養し、虚血再灌流モデルに投与したところ、尿管管に成着したとの報告もある⁴⁾。これらの細胞は、急性腎不全からの尿管の再生時に重要な機能を果たしている可能性が示唆されるが、分化能はあくまでも尿管にとどまり、幹細胞とはいえない。しかも急性尿管障害は臨床的に治癒しうる病態である。

(2) 骨髄由来間葉系幹細胞

骨髄の間葉系幹細胞は患者本人から採取することが可能であり、移植しても拒絶反応の心配もない。

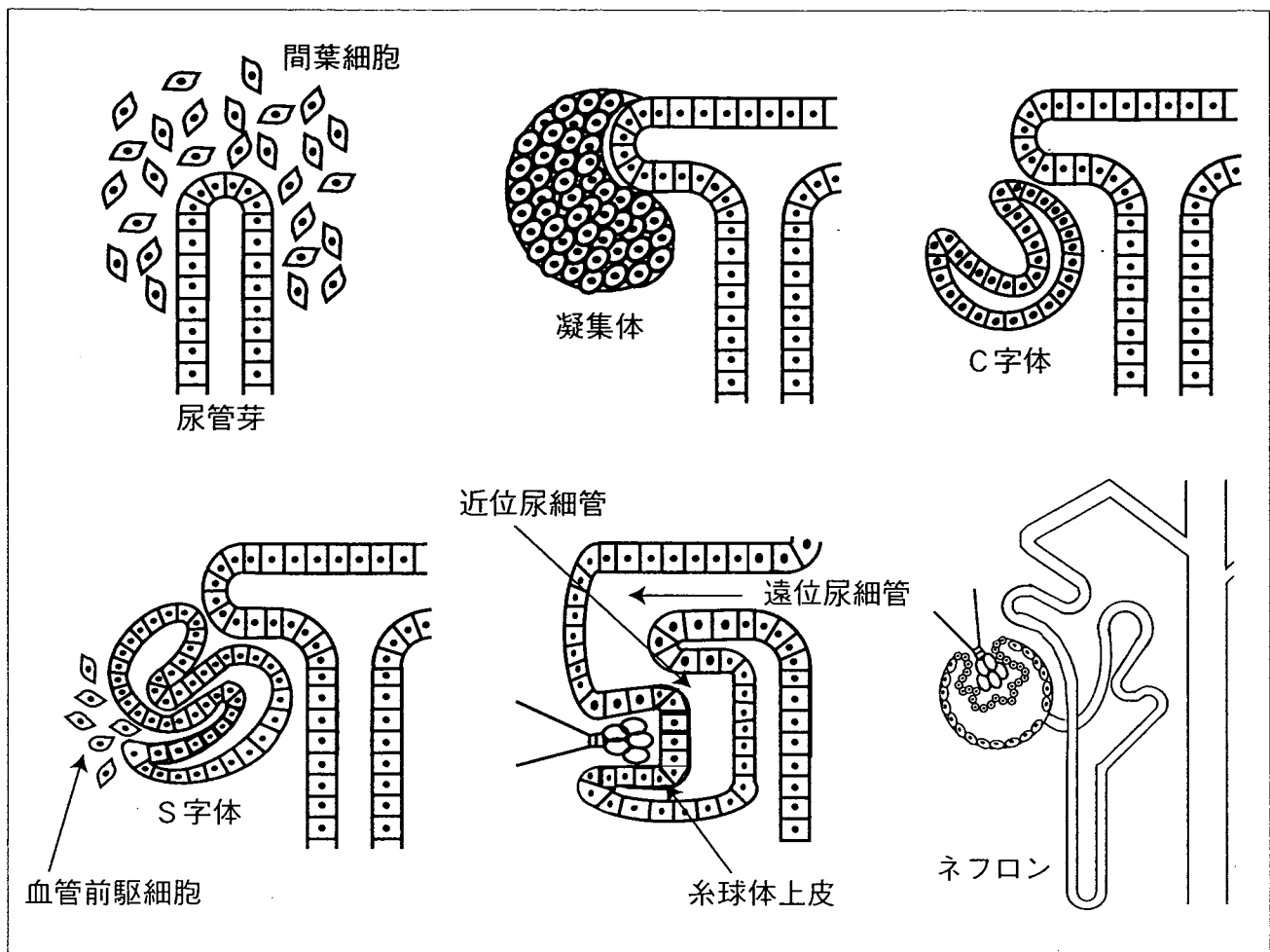


図2 後腎の発生

尿管芽の先端に後腎間葉細胞が凝集し、相互作用が起こる。尿管芽はさらに分岐し、集合管及び尿管を形成する。一方、間葉細胞は上皮化しS字体を形成する。その上部は近位及び遠位尿管やヘンレのループを形成し、下部はボウマン嚢および糸球体上皮細胞に分化する。下部にはさらに血管が侵入し糸球体が形成される。

GDNF遺伝子を導入したヒト間葉系幹細胞を、ラット胎仔の後腎形成部位に注入し、全胚培養後その部位を摘出し、ラット大網に移植すると血管が入った腎臓の構造が作られ、このとき間葉系幹細胞由来細胞は足細胞や尿管管上皮細胞に分化していた⁹⁾。

胎生期後腎への移植が必要なことを、臨床応用するときにはどうするかは課題であるが、間葉系幹細胞の能力が示されたと言える。但しこれも細胞融合の可能性は否定されていない。

(3) 胚性幹細胞 (ES細胞)

ES細胞は理論的には、体を構成するすべての細胞になりうる能力を持つ。ES細胞を浮遊培養すると胚様体を形成する。この際、レチノイン酸、アクチビンA、およびBMP7を添加するとGdnfなど発生期遺伝子の発現が見られ、これをマウス胎仔腎被膜

下に注入すると、尿管管の一部にES細胞由来の細胞が成着していた⁹⁾。またWnt4遺伝子を導入したES細胞を用いて同様に胚様体を誘導し、HGF、アクチビンAで培養すると、集合管のマーカであるアクアポリン2の発現が見られた⁷⁾。この他、腎臓発生で最も早期から発現するPax2にGFP遺伝子やLacZ遺伝子をノックインしたES細胞を用いて、GFPやLacZによる発色を目印にしたBMPによる誘導実験も報告されている⁸⁾。これらも移植の際の細胞融合の検討はなされていない。

3. 腎臓の再構築を目指して

このように腎臓の再生をめざして、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、

移植によってみられる分化能だけでは、単なるホスト細胞との融合を否定できない。

こうした現状を打破する為には、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必須となる。我々は最近その可能性をもつアッセイ系を開発した。

アフリカツメガエル胞胚のアニマルキャップと呼ばれる部位を切り取り、レチノイン酸とアクチビンを作用させるとわずか3日間で前腎管が誘導され、これをオタマジャクシに移植すると機能することが既に90年代前半に証明されている。

我々はこの系を用いて新たな遺伝子Sall1を単離し、それが哺乳類の腎臓発生に必須であることを示した。さらにSall1を高発現する後腎間葉中に腎臓前駆細胞が存在し、これをWnt4発現細胞上で培養すると、コロニーが形成されることを証明した¹⁰⁾。つまり後腎間葉が誘導できれば、それをコロニーとして検出することが可能になったわけである。今後これを指標にES細胞などから誘導を試みたいと考えている。

後腎間葉が誘導されたとしても、今度はそれを目的の細胞系譜へ分化させることが必要である。例えば足細胞を誘導したいなら、それに向けた制御法を開発しなければならない。それには間葉が上皮化したあと、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管のうちどの方向に分化するのかの運命決定機構を解明する必要がある。そこから、自由に糸球体や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。上述のコロニー形成においてもこの過程はランダムであり、Wnt以外の機構が示唆されている。

さらにこれら多種の細胞を3次元構造をもった腎臓に再構築するには何が必要だろうか？この過程はさらに複雑なことが予想されるが、意外に簡単に達成できる可能性もある。

上述のSall1を高発現する腎臓前駆細胞を再凝集させて培養すると、糸球体や尿細管様の組織をもった3次元構造が再構築される。もちろん腎臓本来の構造には及びもつかないが、前駆細胞がある程度の構造を作りうる意外な結果である。

さらに最近、歯の間葉と上皮を単一細胞にしたあとそれぞれ再凝集させ、近い距離において移植すると、本物に近い歯が形成されることが報告されている¹¹⁾。腎臓も間葉と上皮（尿管芽）から形成されるので同様のことが可能かもしれない。さらに完全な

形を再現するには、尿管芽の分岐を模した生体吸収性素材の足場のまわりに、間葉と上皮を発生させていくというティッシュエンジニアリング的手法を考慮する必要があるだろう。

おわりに

理論的には、ES細胞は腎臓を含むすべての体細胞になりうるので、まずES細胞を使って方法論を確立し、他の細胞からの誘導にはそれを応用するということも考えられる。但しヒトES細胞には生命倫理の問題が密接に関わるため、臨床応用には高い壁が存在する。それをバイパスするために、体細胞を未分化な状態に戻す、つまりES細胞化する試みも活発に行われている。最近では、マウス線維芽細胞に4つの遺伝子を導入すると、多能性をもつES細胞様の細胞（iPS細胞）ができることが報告されており¹²⁾、夢が現実になる日も意外に近いかもしれない。

文 献

- 1) Hishikawa K, Marumo T, Miura S. et al. *J Cell Biol* 2005; 169: 921-8.
- 2) Dekel B, Zangi L, Shezen E. et al. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3300-14
- 3) Maeshima A, Sakurai H and Nigam SK. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 188-98
- 4) Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M. et al. *FASEB J* 2005; 19: 1789-97
- 5) Yokoo T, Fukui A, Ohashi T. et al. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1026-34
- 6) Kim D and Dressler GR. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3527-34
- 7) Kobayashi T, Tanaka H, Kuwana H. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 585-95
- 8) Bruce SJ, Rea RW, Steptoe AL. et al. *Differentiation* 2007
- 9) Moriya N, Uchiyama H & Asashima M. *Dev Growth Differ* 1993; 35: 123-8.
- 10) Osafune K, Takasato M, Kispert A. et al. *Development* 2006; 133: 151-61
- 11) Nakao K, Morita R, Saji Y, et al. *Nat Methods* 2007; 4: 227-30
- 12) Takahashi K and Yamanaka S. *Cell* 2006; 126: 663-76

腎臓の初期発生における Sall1 の働き

由利俊祐** 西中村隆一**

I. Sall1 とは

Sall ファミリー遺伝子は、ショウジョウバエの領域特異的ホメオティック遺伝子である spalt (sal) 遺伝子のホモログであり、特徴的な複数の二重ジンクフィンガーモチーフをもっている。ショウジョウバエで、sal は頭部、尾部分節の最終分化や、羽の発生に重要な役割を果たしている。

マウスの Sall1 遺伝子は、1,322 個のアミノ酸からなる核内に局在する蛋白質であり、合計 10 個のジンクフィンガーモチーフを有している。Sall1 は、尿管芽が後腎間葉に侵入する以前（胎生 10.5 日）から間葉に発現し、侵入時（胎生 11.5 日）には尿管芽を取り囲む後腎間葉のみで強く発現している。Sall1 は腎臓のほかに、中枢神経系、耳胞、心臓、肢芽、肛門などに発現している。中枢神経系では脳室周囲の神経幹細胞が存在する領域に、肢芽では progress zone という未分化細胞が増殖する部分で発現が認められ、腎臓に限らずほかの未分化細胞でも何らかの役割をもつ可能性が示唆される。

Sall1 のノックアウトマウスは、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り、ほかの臓器には明らかな異常が認められない（図 1）。このことから Sall1 が腎臓の発生に必須であることがわかる。Sall1 ノック

アウトマウスは胎生 11.5 日目の時点で異常が認められる。胎生 11.5 日目における腎臓は、尿管芽が後腎間葉に侵入し、この 2 つの組織間での相互誘導作用により後腎が形成される時期である。Sall1 ノックアウトマウスの後腎間葉は形成されるが小さく、尿管芽も、後腎間葉に侵入していないか、あるいはしていてもその後の分岐が顕著に障害される。つまり Sall1 は後腎発生の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¹⁾。この現象は後腎間葉が分泌する GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) が尿管芽上の受容体 Ret (ret proto-oncogene) とその共受容体 Gfra1 (GDNF family receptor $\alpha 1$) を介するシグナルによって尿管芽を後腎間葉に向けて引き寄せることが知られている（図 2）。しかし、Sall1 ノックアウトマウスでは GDNF の発現は維持されていることから、Sall1 は GDNF 以外の尿管芽侵入にかかわる因子の発現制御にかかわる可能性が示唆されている。また、Sall1 を高発現する後腎間葉の細胞を個々の細胞に解離して *in vitro* で培養し、コロニーを形成させると糸球体や尿細管のマーカーを発現することから、この後腎間葉細胞は糸球体、尿細管の前駆細胞であることがわかる。Sall1 ノックアウトマウスから形成されるコロニーは野生型のコロニーと比較して小さいため、後腎間葉に存在する前駆細胞の増殖にも Sall1 がかわると考え

* Roles of Sall1 in kidney development

key words : Sall1, 腎臓発生, 後腎間葉

** 熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野 YURI Shunsuke and NISHINAKAMURA Ryuichi
〔〒860-0811 熊本市本荘 2-2-1〕

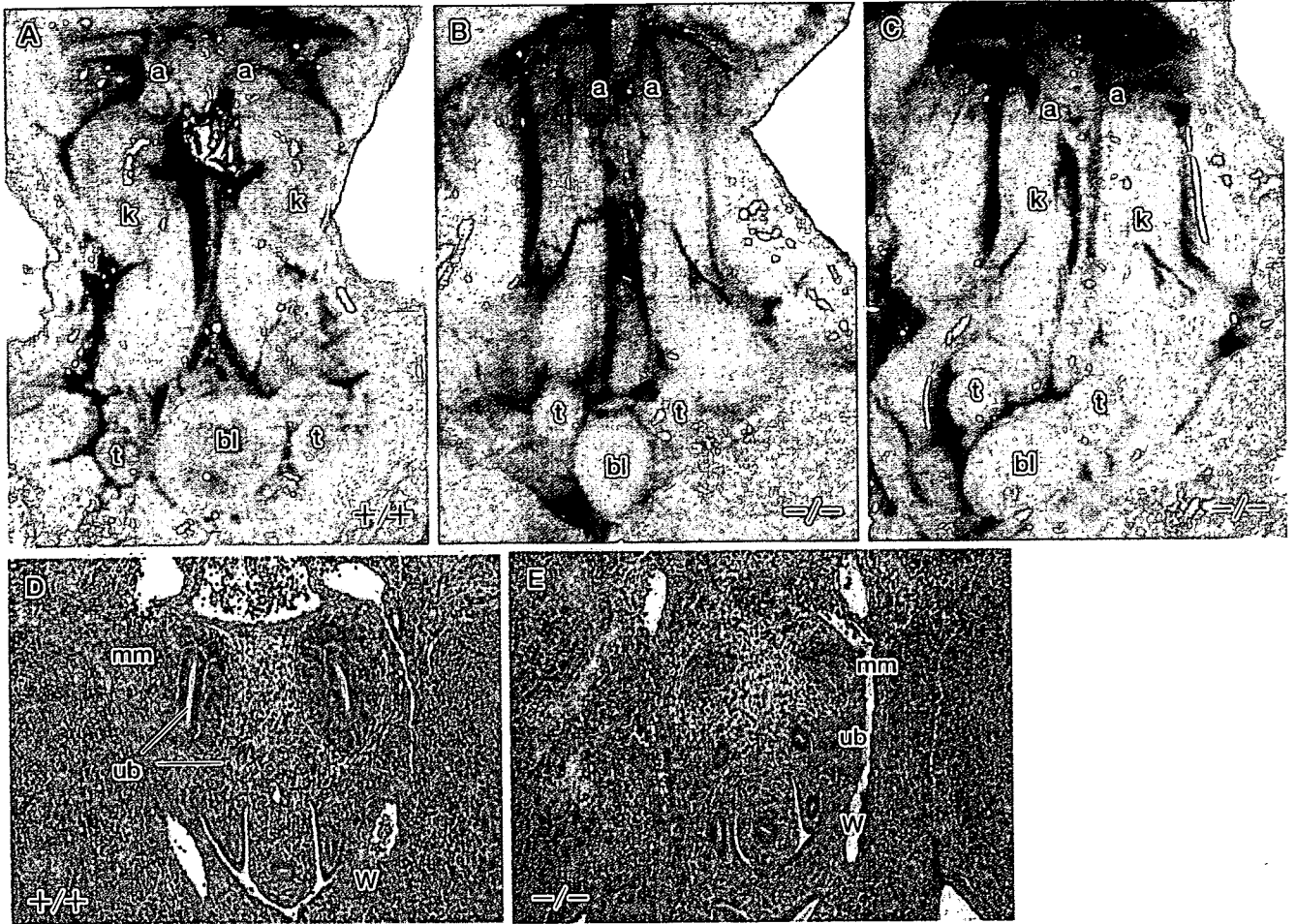


図1 Sall1 ノックアウトマウスにおける腎臓異常

A～C：生直後の腎臓 (k)。A は正常マウス，B，C はノックアウトマウス。B は腎臓の完全欠失，C は一部痕跡的な腎臓が認められる。ともに膀胱 (bl) に尿は認められない。副腎 (a)，精巣 (t) は正常。
 D，E：胎生 11.5 日の後腎。D は正常マウス，E はノックアウトマウス。正常マウスでは尿管芽 (ub) がウルフ管 (W) から分岐し，その周囲に間葉細胞 (mm) が集合するが，ノックアウトマウスでは後腎間葉まで侵入していない。

られる²⁾。

この Sall1 がどういう機序で後腎間葉に特異的に発現するのも興味深い課題である。Sall1 を制御する上流因子として考えられる分子として，Six1 (sine oculis-related homeobox 1 homolog) があげられる。Six1 や Pax2 (paired box gene 2) といった転写因子は 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，Eya1 (eyes absent homolog 1) 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 の発現を制御していることが知られている。Six1，Eya1 のノックアウトマウスでは，Sall1 の発現が消失し，Pax2 のノックアウトマウスでは，Sall1

の発現は残存する³⁾。このことから，Sall1 の発現は GDNF の発現制御とは異なり，Six1/Eya1 の複合体によって Pax2 とは無関係に制御されていることがわかる。

II. Sall ファミリーと疾患

ヒトとマウスでは Sall1 以外にも Sall2, 3, 4 と合わせて 4 つの Sall ファミリー遺伝子が知られている (図 3)。ヒトでは SALL1 など大文字で表記される。ヒトでの SALL1 の変異が Townes-Brocks 症候群という遺伝病において報告されている⁴⁾。これは，多指症，外耳や内耳，肛門の異常

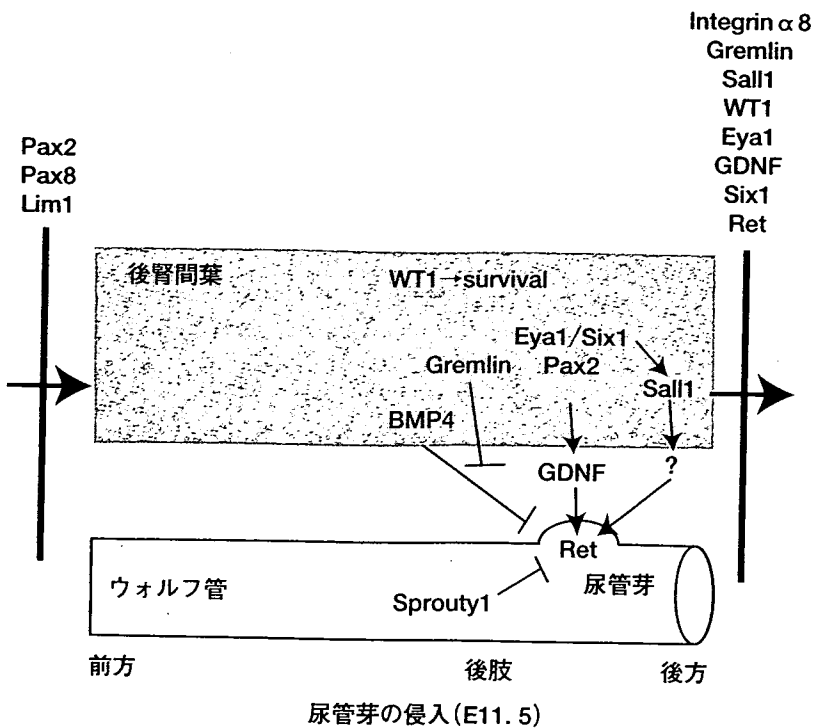


図2 腎臓（後腎）発生の分子メカニズム
縦線は各遺伝子のノックアウトによって発生の障害される時期を示す。

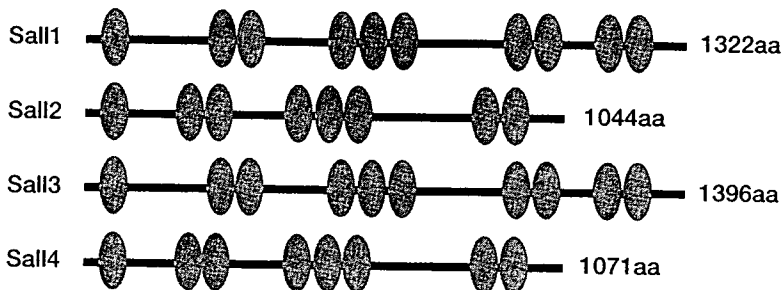


図3 マウス Sall ファミリーの構造
灰色楕円は Zn フィンガー構造をさす。Sall 蛋白は、複数の Zn フィンガーモチーフをもつ特徴的な構造をしている。

を主体とし、ときに腎臓や心臓の形成障害を伴うもので、常染色体優性遺伝の形態をとる。これに対して Sall1 ノックアウトマウスの症状は、腎臓の欠失のみである。この違いは、ヒト変異では SALL1 の N 端のみからなる欠損型が発現し、これがすべての SALL ファミリーと相互作用し、その機能を抑制すると考えることで説明できる。実際、Sall1 の N 端を発現するマウスは、Townes-Brocks 症候群の症状を呈するし⁵⁾、Sall1 と Sall4 の二重ヘテロマウスでもその症状の一部が出現する。Sall4 単独のヘテロ欠失マウスでも心臓や肛門の異常が認められることから、Townes-Brocks 症候群でみられるこの 2 つの症状は主に Sall4 の機能抑制によると考えられる⁶⁾。

Sall2 欠失マウスは外見上異常な表現型を示さず生存する⁷⁾。また、Sall1 と Sall2 の二重欠失マウスにおいても、Sall1 の表現型がさらに重篤化することはない。

Sall3 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⁸⁾。しかし、Sall1 と Sall3 の二重欠失マウスでは、指の形成に異常が生じる（未発表データ）。これは、Sall1 と Sall3 が一部機能を補填し合っていることを示唆する。

SALL4 は眼の動きや手の異常を特徴とし、聴覚の欠失、肛門、心臓や腎臓の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。Sall4 の欠失マウスは子宮着床直後に死亡し、さらに

Sall4 は ES 細胞の増殖に関与する。Sall1 と Sall4 はそれぞれ腎臓と ES 細胞という、多分化能をもつ細胞の増殖と深くかかわることが示唆され⁶⁾、その分子機構の解明が待たれる。

III. Sall ファミリーの機能

Sall1 は転写が抑制状態となっているヘテロクロマチンに局在し、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を含む NuRD 複合体と結合することで遺伝子発現を負に制御する可能性が報告されている。Sall ファミリーは 1-13 アミノ酸までの配列が高度に保存されており、この領域を介して NuRD 複合体と結合することが明らかとなっている⁹⁾。Sall4 は心臓においては Tbx5 と協調的に働き、Gja5 や Nppa を正や負に、肢芽においては Fgf10 を正に制御するとされているが¹⁰⁾、腎臓において Sall1 が直接制御する下流遺伝子はいまだ不明であり、今後の検討が必要である。

文 献

- 1) Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, et al : Murine homolog of *SALL1* is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 128 : 3105-3115, 2001
- 2) Osafune K, Takasato M, Kispert A, et al : Identification of multipotent progenitors in the embryonic kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 133 : 151-161, 2006
- 3) Xu PX, Zheng W, Huang L, et al : Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney. *Development* 130 : 3085-3094, 2003
- 4) Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, et al : Mutations in the *SALL1* putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* 18 : 81-83, 1998
- 5) Kiefer SM, Ohlemiller KK, Yang J, et al : Expression of a truncated Sall1 transcriptional repressor is responsible for Townes-Brocks syndrome birth defects. *Hum Mol Genet* 12 : 2221-2227, 2003
- 6) Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, 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 : 3005-3013, 2006
- 7) Sato A, Matsumoto Y, Koide U, et al : Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Mol Cell Biol* 23 : 62-69, 2003
- 8) Parrish M, Ott T, Lance-Jones C, et al : Loss of the *Sall3* gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality. *Mol Cell Biol* 24 : 7102-7112, 2004
- 9) Lauberth SM, Rauchman M : A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J Biol Chem* 281 : 23922-23931, 2006
- 10) Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Arruda EP, et al : Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nat Genet* 38 : 175-183, 2006

* * *

1. 腎発生を制御する遺伝子および転写因子群

熊本大学発生医学研究センター 細胞識別分野 阪口 雅司
同教授 西中村隆一

key words Osr1, Wnt9b, sprouty1, Notch2, nephronectin, GDNF, Sall1

動 向

哺乳類の腎臓は、中間中胚葉から前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成され、成体の腎臓は後腎に由来する。マウスでは胎生8.5日に中間中胚葉からウォルフ管（中腎管）が形成される。ウォルフ管は尾側に向かって伸長しつつ、周囲に前腎と中腎を誘導する。しかし前腎と中腎は、中腎の一部が生殖腺へ分化するのを除いて、最終的には退行する。一方ウォルフ管はさらに尾側に伸長し、ヒトで胎生35日、マウスで10.5日目に、尿管芽という枝分かれを生じる。それが周囲の後腎間葉へ侵入し、尿管芽と間葉の2方向性の相互作用によって後腎が形成される。尿管芽は、後腎間葉からのシグナルを受けて伸長、分岐し、集合管と尿管を形成する（図1）。一方後腎間葉は、尿管芽からのシグナルにより上皮化し、糸球体および尿細管に分化していく。尿管芽は、放射状に伸長と分岐を続け、新しいネフロンほど腎臓の辺縁部に位置するわけだが、最終的にはヒトでは50～100万個のネフロンが形成される。本稿では、これらの過程における最新の研究成果を紹介する。より基本的な腎臓発生再生の分子機構については他の総説を参照されたい^{1,2)}。

A. 前腎、中腎発生の分子機構

転写因子Pax2とPax8は中間中胚葉から前腎への分化決定に必須であり、Pax2とPax8の二重欠失マウスでは前腎、中腎が形成されない。このマウスを利用したマイクロアレイ解析から、Gata3がPax2/Pax8の下流で働いていることが判明した³⁾。実際、Pax2ホモ欠失Pax8ヘテロ欠失のマウスにおいてGata3の発現は消失するが、Gata3の欠失ではPax2/Pax8の発現は保たれる。Gata3はウォルフ管に発現がみられ、Gata3の欠失マウスではウォルフ管の形態と尾側への伸張に異常を呈する。後述のGDNF受容体Retの発現が消失しており、これが原因の一つである可能性がある。よってウォルフ管では、Pax2/8-Gata3のカスケードが働いていることになる（図2）。一方、ウォルフ管周囲の間葉からは中腎の尿細管が形成されるが、この間葉においてはGata3は関与せず、むしろPax2/8の上流にSix1/Six4が存在する⁴⁾。

転写因子Osr1の発現はPax2より早い段階（マウス胎生8.0日）からみられるため、中間中胚葉に発現する最も初期のマーカーと考えられる（図2）。Pax2は中間中胚葉が上皮化してできたウォルフ管でも発現がみられるのに対して、Osr1は

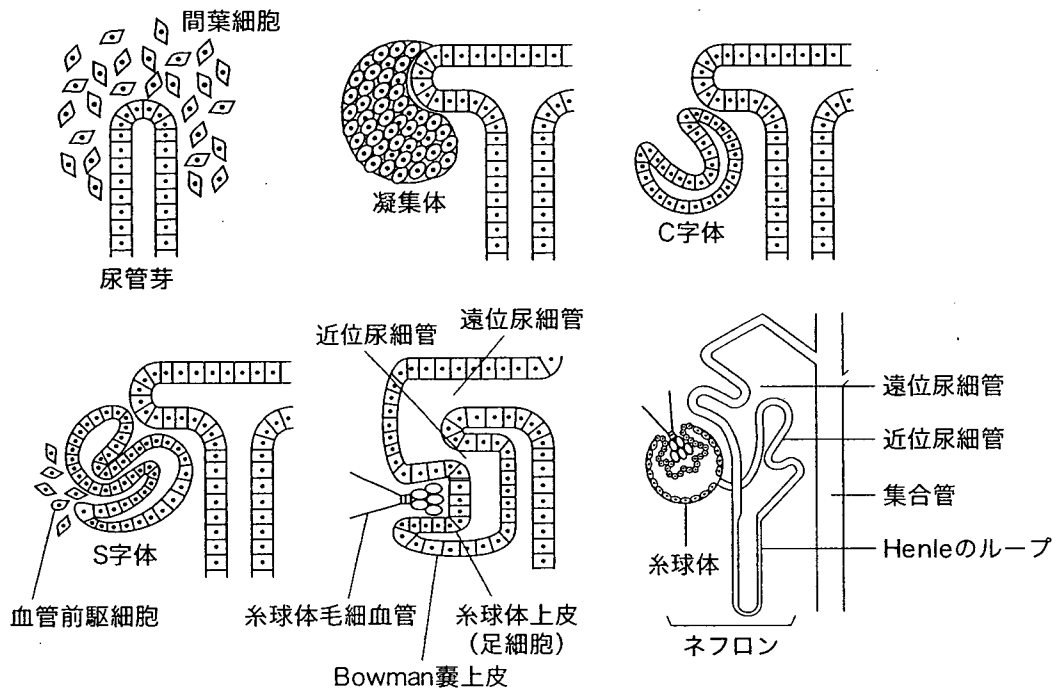


図1 ネフロンの発生

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する。凝集した間葉は上皮化して、C字体を経てS字体となり、その近位では血管前駆細胞を取り込みつつ、遠位では尿管芽と融合する。S字体はそ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、一方血管前駆細胞はメサンギウムと血管内皮へと分化して、腎臓機能の最小構成単位ネフロンが形成される。

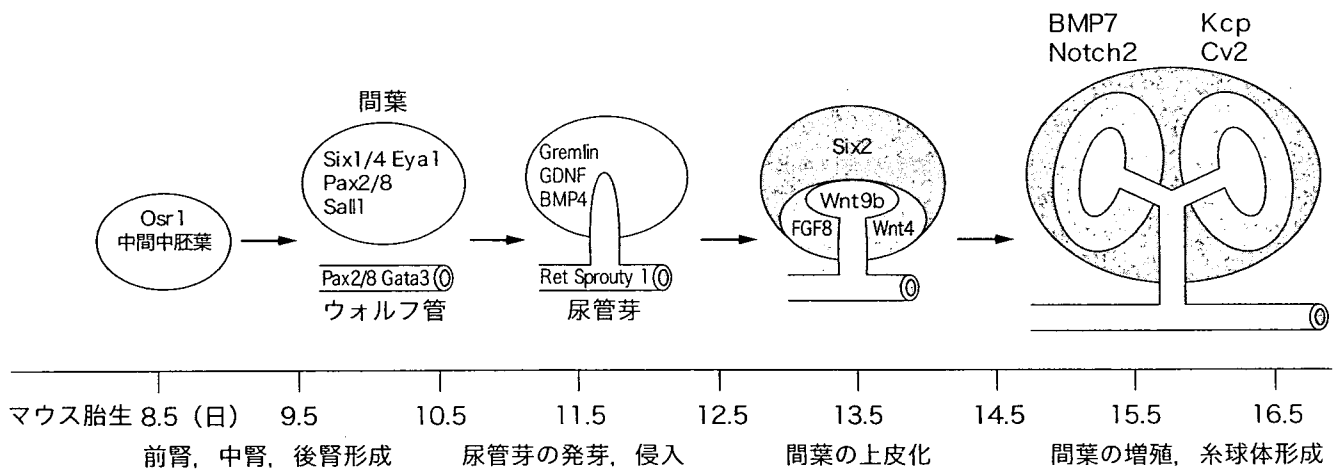


図2 マウス腎臓発生にかかわる遺伝子群

中間中胚葉から前腎、中腎、後腎が形成され、最終的には後腎が成体で機能する。図は、腎臓発生過程にかかわる遺伝子群とそれらの働く場所と時期を示す。

上皮化した部分からは消失する⁵⁾。さらにニワトリの中胚葉でOsr1を異所性に発現させるとPax2が誘導される。しかしOsr1欠失マウスではウォルフ管や中腎の形成に異常が認められるものの、

その症状は前述のPax2/Pax8の二重欠失マウスよりも軽い。これはOsr2によって補われている可能性もあり、検証が待たれる。少なくとも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構造が形成されない⁶⁾。

B. 後腎発生の分子機構

1. 後腎間葉の形成

Osr1の欠失マウスでは後腎間葉もまったく形成されず、間葉形成にかかわる既知の因子Eya1, Six2, Pax2, Sall1, GDNFなどの発現もみられない⁵⁾。よって、Osr1は後腎間葉形成のかなり上位に位置すると考えられるが、その分子機序は不明である(図3A)。

線維芽細胞増殖因子(FGF)の1型および2型受容体(FGFR 1, 2)二重欠失マウスでも、後腎間葉の形成異常が起こり、間葉中の細胞死の増加と増殖の低下がみられる⁷⁾。また間葉での転写因子Eya1, Six1の発現は保たれているが、Six2, Sall1, Pax2の低下を認め、FGFシグナルが

Eya1, Six1の下流, Six2, Sall1, Pax2の上流で機能していると考えられる(図3A)。

2. 尿管芽の後腎間葉への侵入

後腎の発生には、後腎間葉から尿管芽へ、逆に尿管芽から後腎間葉への2方向のシグナルが重要であり、まず前者について述べる。後腎間葉からは液性因子GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor)が分泌され、尿管芽の発芽、伸長そして分岐をうながす。Pax2, Eya1, Six1といった転写因子はGDNFの発現を制御している。さらにSix1/Six4欠失マウスでは腎臓および尿管が完全に欠損し、尿管芽もまったく形成されず、GDNF, Pax2, Pax8, Sall1の後腎間葉における発現も完全に消失する⁴⁾。よってSix1とSix4は協調してGDNFの発現を制御することで尿管芽を引寄せることになる(図3A)。

GDNFの制御には転写因子以外にも関与してい

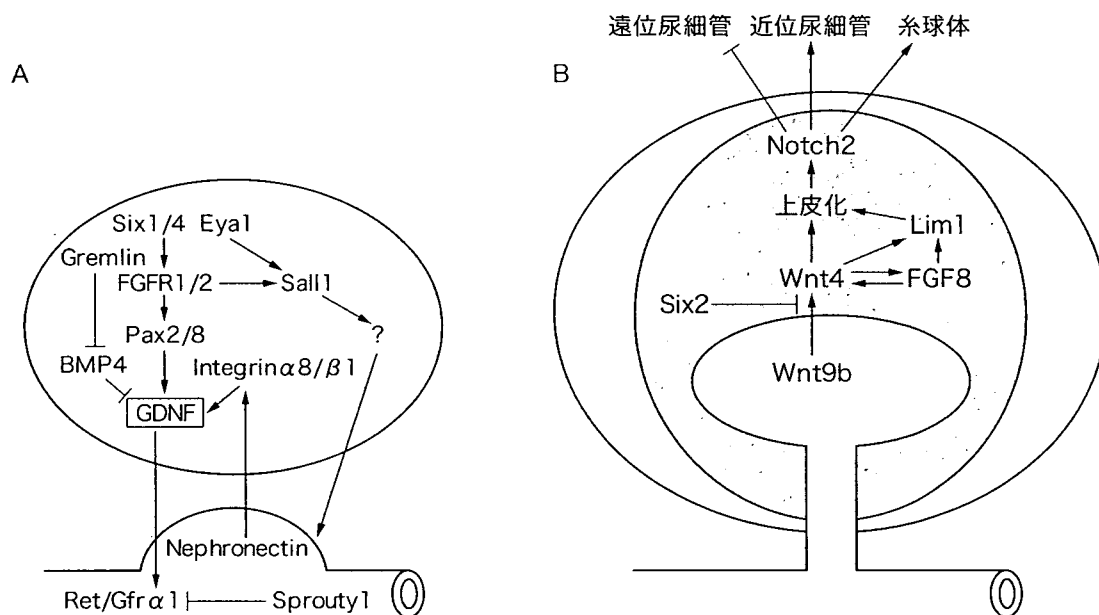


図3 後腎発生における間葉と尿管芽の二方向性シグナル

A: 後腎間葉から尿管芽へのシグナル

後腎間葉から分泌されたGDNFは、尿管芽のRet/Gfr α 1受容体にシグナルを伝え、尿管芽の発芽、伸長を起こす。

B: 尿管芽から後腎間葉へのシグナル

尿管芽から分泌されたWnt9bは、後腎間葉でWnt4を誘導し間葉の上皮化を起こす。上皮はさらにNotch2シグナルを受け、各系統へ分化していく。

る。細胞外マトリックス蛋白nephronectinは尿管芽に発現し、後腎間葉で発現する受容体インテグリン $\alpha 8/\beta 1$ のリガンドとして機能している(図3A)。nephronectinあるいはインテグリン $\alpha 8$ の欠失マウスでは、胎生11.5日の時期でのみGDNFの発現が一時的に下がり、尿管芽の分岐異常、ひいては腎臓欠損を呈する⁸⁾。つまりnephronectinはインテグリン $\alpha 8/\beta 1$ を介してGDNFシグナルの維持に関与しており、その機構にはEya1やPax2といった転写因子は関与していないとされている。

GDNFとは逆にBMP4 (bone morphogenetic protein 4)は尿管芽の発芽、伸長を抑制している。BMP4の拮抗因子であるGremlinの欠失マウスでは、尿管芽の伸長が起こらない。Gremlinは尿管芽と接する間葉から分泌されるが、その標的も自分自身であり間葉細胞内でBMPシグナルを抑制している⁹⁾。つまりBMPの拮抗因子であるGremlinの欠失によってBMPシグナルが増強し、尿管芽の伸長が抑制されたと考えられる。実際Gremlin欠失マウスからBMP4の量を下げると腎臓形成が回復する。詳細は未解明だが、BMPシグナルは最終的にはGDNFの制御につながると考えられる(図3A)。

一方、尿管芽にはGDNFの受容体RetとGfra1が発現している。Retは受容体型チロシンキナーゼであり、GDNFはRet/Gfra1を介して尿管芽の細胞にシグナルを伝えている。チロシンキナーゼの拮抗因子Sprouty1はウォルフ管に発現しており、この欠失マウスではウォルフ管から複数の尿管芽が形成される¹⁰⁾。よってSprouty1はGDNF-Retシグナルに対するウォルフ管の感受性を抑制することによって、尿管芽が一カ所からしか形成されないように制御していることになる(図3A)。

3. 間葉の上皮化

後腎発生における2方向性シグナルのうち後者、つまり尿管芽から間葉に向けてのシグナルについて述べる。これによって間葉は上皮に転換して管構造を形成し、S字体とよばれる構造を経て、最終的には糸球体や尿細管へと分化していく。この最初の引き金をひく、尿管芽からの液性因子がWnt9bである(図3B)。その欠失マウスでは間葉の上皮化が起こらず、上皮化の指標であるWnt4、FGF8、Pax8が発現しない¹¹⁾。Wnt9bは間葉においてWnt4を誘導し、Wnt4は間葉自身に働いて上皮化を促進する。さらにWntの下流で働く β -カテニン欠失マウスでも上皮化が障害されるし、Wnt9bあるいはWnt4欠失マウスにおいて β -カテニンを活性化することで部分的に上皮化が回復する¹²⁾。よってこの二つのWntの下流では β -カテニンを介した経路が働いていることがわかる。ただし β -カテニンを恒常的に活性化した場合、最終的に上皮は形成されないため、 β -カテニンは一過性に活性化したあと抑制されることが上皮化には必要と考えられる。

FGF8の欠失マウスでも上皮化が障害され、S字体が形成されない^{13,14)}。このマウスではWnt4、Lim1が低下しているが、Wntを供給しても上皮化は回復しないので、FGF8の機能は単にWnt4を誘導するだけではない。逆にWnt4欠失ではFGF8、Lim1が低下する。よってFGF8とWnt4が協調してLim1を制御することが上皮化に必須であると思われる(図3B)。実際Lim1欠失マウスでも上皮化の障害が認められている¹⁵⁾。よって、尿管芽からのWnt9bシグナルは、間葉においてWnt4、FGF8、Lim1を誘導することによって上皮化を進めるということになる。FGF8は上皮化以外に後腎間葉の生存にも必須であり、欠失マウスでは未分化な間葉細胞に細胞死が認められ、最終的に小さな腎臓が形成される。

4. 間葉の未分化細胞とその維持

後腎間葉の上皮化はすべての細胞で起きるわけではなく、Wnt4の刺激からのがれた細胞は上皮化せず、未分化のまま増殖する。Six2は未分化な間葉細胞に発現し、この欠失マウスでは、本来上皮化しない領域の間葉が上皮化を起こす¹⁶⁾。その部分ではWnt4が発現しており、これによって異所性に上皮化が進むと考えられる。また間葉では細胞死も認められ、最終的に小さい腎臓が形成される。つまり未分化な間葉細胞が枯渇してしまう。逆にSix2を活性化すると上皮化の抑制がみられる。よってSix2は、Wnt4による上皮化から後腎間葉を守り、生存も支持して、未分化な状態を維持すると考えられる(図3B)。これによって次のネフロン形成のための前駆細胞が保たれ、正常な大きさと分化程度をもった腎臓が形成されることになる。

では未分化な後腎間葉には、糸球体にも尿細管にもなりうる多能性の前駆細胞が存在するのだろうか？ Sall1は我々が単離した後腎間葉に発現する核内因子で、前述のとおり尿管芽の侵入に必須である。Sall1の遺伝子座に蛍光物質GFPを導入したマウスの後腎間葉から、GFP高発現細胞、つまりSall1を強く発現する細胞を選別する。これをWnt4の存在下で培養すると、一個の細胞からコロニーが形成され、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管のマーカーを発現する¹⁷⁾。また、これらのGFP高発現細胞を凝集させ器官培養すると、糸球体や尿細管などの三次元構造が再構築される。よってSall1を高発現する細胞は、糸球体にも尿細管にもなりうる多能性の前駆細胞であるといえる。この系は、後腎間葉の増殖、上皮化と未分化維持、そして分化運命決定機構を単一細胞レベルで解析できる可能性を秘めている。

5. 糸球体と尿細管の形成

未分化間葉細胞はWntによって上皮に転換し

て管構造を形成し、S字体とよばれる構造を経て、糸球体や尿細管へと分化していく。このS字体では近位-遠位軸が成立しており、S字の下部(近位部)の底辺をなす二層の上皮は、Bowman嚢と糸球体上皮細胞(足細胞)に分化する。そしてこのS字の下部が形成する半球状の中央の隙間にメサンギウム細胞や毛細血管が入り込んで糸球体が形成される。上部(遠位部)は遠位尿細管となって集合管(尿管芽由来)と癒合し、中部と下部の一部は近位尿細管とHenleのループを形成する(図1)。

この近位-遠位のパターン形成にはNotchが働いている。一回膜貫通型受容体Notchはリガンド(Jagged1など)の結合により活性化され、細胞膜タンパクpresenilinによってその細胞内ドメインが切り離される。そして細胞内ドメインは核内に移行して標的遺伝子の転写を活性化する。presenilinを欠如したマウスでは、Notch1, 2, 3, 4すべてからのシグナルが阻害されるため、S字体のほぼ完全な欠失が生じ、最終的に糸球体上皮と近位尿細管が形成されない。Notch2を腎臓特異的に欠失させると、Wntの作用によって上皮化は正常に進むものの、やはりS字体の形成に異常が認められ、糸球体と近位尿細管というネフロンの近位部が欠損する¹⁸⁾。よってNotchファミリーのなかでもNotch2がこの過程の主体である。詳細な解析から、Notch2は近位-遠位の最初の決定ではなく、その後の近位部の確立に必須であると考えられる(図3B)。Notch2の変異による腎臓形成異常はヒトでも報告されている。Notch1も腎臓内で活性が認められるが、その欠失マウスでは腎臓異常はみられない¹⁸⁾。一方Notch2欠失時にはNotch1が残存するにもかかわらずNotch2を代償できないので、腎臓内のNotch1の活性は、Notch2標的遺伝子群を活性化できる閾値に達していないと考えられる。実際、Six2を発現する未分化間葉内でNotch1を強く活

性化すると、Notch2の活性がなくても近位尿管を誘導できる。

Notch2によって形成される中でも最も近位部からは、糸球体上皮細胞（足細胞）とBowman囊上皮が発生する。足細胞はアクチンに支持される多数の足突起を出しており、この足突起間にはネフリンなどからなるスリット膜が形成されている。ネフリンはSrc homology 2 (SH2)/SH3ドメインを含むアダプタータンパク質Nckと結合し、足細胞の細胞骨格を制御する。Nckの足細胞特異的欠失マウスでは、足突起の形成に異常が生じ、先天性のネフローゼ症候群が発症する¹⁹⁾。足細胞の形成過程については、他項を参照されたい²⁰⁾。足細胞はVEGF（血管内皮増殖因子）を分泌することによって血管内皮を誘引し、血管内皮の周囲細胞であるメサンギウム細胞とともに、糸球体が形成されていくことになる。

6. その他の制御因子

さらに二つのBMPシグナル増強因子について述べる。BMP7は間葉に発現し、その欠失マウスでは間葉がS字体を形成した辺りで、細胞死が進行し発生が停止する。また成体においては腎臓の線維化に対する抑制作用をもつとされる。アフリカツメガエルのKielinと相同性のあるKcp (Kielin/chordin-like protein) は、BMP7と結合してシグナルを増強すると考えられる。Kcpの欠失マウスには腎臓の発生異常はみられないが、片側尿管結紮による腎間質線維化誘導モデルや急性腎不全モデルで解析すると、KcpによるBMP7の活性化が失われ腎臓の線維化が進む²¹⁾。

ショウジョウバエの肩横脈 (cross-veins) の形成においてBMPシグナルを増強する遺伝子crossveinless 2 (Cv2) のマウスホモログは、骨や軟骨、腎臓、眼など数多くの組織や器官の形成に関与している。Cv2は後腎間葉に発現しており、Cv2欠損マウスの腎臓は小さく、腎糸球体の数も

減少している²²⁾。また、Kcpと構造的に類似しており、Cv2とKcpの両方を欠損させると、腎臓の異常がより顕著になることから、これらの遺伝子が協調的に働いていることが示唆される。

C. 腎臓発生からみた腎臓再生への展望

この数年で腎臓発生の理解は急速に進んでいる。今後も腎臓の部位特異的ノックアウトマウスの作成などから、新たな分子機構の解明が期待される。またアメリカが主導するGUDMAPプロジェクトでは、発生期腎臓で網羅的遺伝子発現解析を行い、それをもとに腎臓の各領域を蛍光ラベルできるマウスを作成し、さらにそこから詳細な遺伝子発現解析と分化能検討を行っている。これらの知見が集積すれば、当然腎臓を再生するヒントになると考えられる。もちろん腎臓を作る場合に克服しなければならない点は数多いが、いくつかの試みが報告されている。アフリカツメガエルでは、胎胚期の予定外胚葉をアクチビンとレチノイン酸の存在下に生理食塩水の中で培養すると前尿管が誘導されることが1990年代初頭から知られており、Sall1もこの系を利用して単離された。最近ES細胞をアクチビンとレチノイン酸で分化させると、Pax2やLim1などのマーカーが発現し、それを器官培養すると管様構造が認められることが報告されている²³⁾。これが本当に腎臓の管なのか、そうだとしたら前腎、中腎、後腎のどれなのか、など疑問は残るが、夢のある結果である。今後の腎臓発生学は、正確な発生機構の理解を基盤として、再生を目指していくことになる。この領域への若い世代の参入と挑戦を期待したい。

文献

- 1) 高里 実, 西中村隆一. 腎臓発生の分子機構. 実験医学増刊 発生・分化研究. 2005; 23: 100-6.

- 2) 内山裕佳子, 西中村隆一. 腎臓形成と再生 蛋白質・核酸・酵素. 2007. p.1413-8.
- 3) Grote D, Souabni A, Busslinger M, et al. Pax 2/8-regulated Gata 3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. *Development*. 2006; 133: 53-61.
- 4) Kobayashi H, Kawakami K, Asashima M, et al. Six1 and Six4 are essential for Gdnf expression in the metanephric mesenchyme and ureteric bud formation, while Six1 deficiency alone causes mesonephric-tubule defects. *Mech Dev*. 2007; 124: 290-303.
- 5) 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.
- 6) Tena JJ, Neto A, de la Calle-Mustienes E, et al. Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Dev Biol*. 2007; 301: 518-31.
- 7) Poladia DP, Kish K, Kutay B. Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the metanephric mesenchyme. *Dev Biol*. 2006; 291: 325-39.
- 8) Linton JM, Martin GR, Reichardt LF, et al. The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin $\alpha 8 \beta 1$ -mediated stimulation of Gdnf expression. *Development*. 2007; 134: 2501-9.
- 9) Michos O, Gonçalves A, Lopez-Rios J, et al. Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signaling during kidney branching morphogenesis. *Development*. 2007; 134: 2397-405.
- 10) Basson MA, Akbulut S, Watson-Johnson J, et al. Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell*. 2005; 8: 229-39.
- 11) 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: 283-92.
- 12) Park JS, Valerius MT, McMahon AP, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development*. 2007; 134: 2533-9.
- 13) Perantoni AO, Timofeeva O, Naillat F, et al. Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development*. 2005; 132: 3859-71.
- 14) Grieshammer U, Cebrián C, Ilagan R, et al. FGF8 is required for cell survival at distinct stages of nephrogenesis and for regulation of gene expression in nascent nephrons. *Development*. 2005; 132: 3847-57.
- 15) Kobayashi A, Kwan KM, Carroll TJ, et al. Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development*. 2005; 132: 2809-23.
- 16) Self M, Lagutin OV, Bowling B, et al. Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *EMBO J*. 2006; 25: 5214-28.
- 17) 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: 151-61.
- 18) 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: 801-11.
- 19) Jones N, Blasutig IM, Eremina V, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*. 2006; 440: 818-23.
- 20) Lin J, Patel SR, Cheng X, et al. Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease. *Nat Med*. 2005; 11: 387-93.
- 21) Ikeya M, Kawada M, Kiyonari H, et al. Essential pro-Bmp roles of *crossveinless 2* in mouse organogenesis. *Development*. 2006; 133: 4463-73.
- 22) Kim D, Dressler GR. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 3527-34.

腎臓形成のメカニズムと 再生への挑戦

10.1 はじめに

10.1.1 腎臓をめぐる現在の状況

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

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

日本で人工透析を受ける人は23万人を超え、この10年で2倍となった。現在、慢性腎不全の原因の第1位は糖尿病であり、今後も増える一方である。腎不全は難病指定とされ、その医療費はすべて国庫によって賄われるため社会的負担は大きい。このような状況にもかかわらず、腎機能がいったん悪化するとそれを改善させる画期的な治療法はいまだ存在せず、最終的には透析導入となる。この状況は10年前とほとんど変わっていない。

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