

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

10.1.2 慢性腎疾患に対する今日の治療法

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

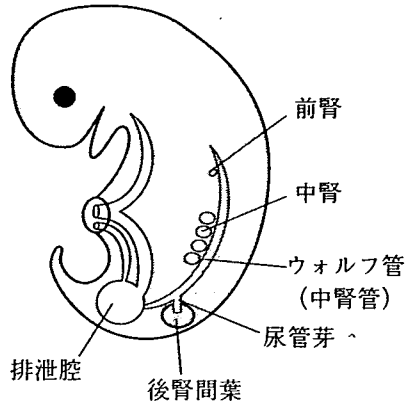
一方、人工透析は技術の進歩もあり、飛躍的に慢性腎不全患者の予後を改善させた非常に成功した治療法である。しかし、患者に厳しい食事制限や定期的な通院治療等の、生活の質 (quality of life) の低下を招くだけでなく、人工透析は腎臓の多彩な機能の一部である濾過機能を代償したに過ぎないことから生じるさまざまな長期合併症を引き起こす。また透析医療費は医療費全体の3%以上を占め、年間1兆円を超えようとしており、医療経済からみても大きな問題を生じている。したがって、末期慢性腎不全等の難治腎疾患に対する新しい根本的な治療法の開発が望まれている。

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

10.2 腎臓の発生

10.2.1 腎発生の概要

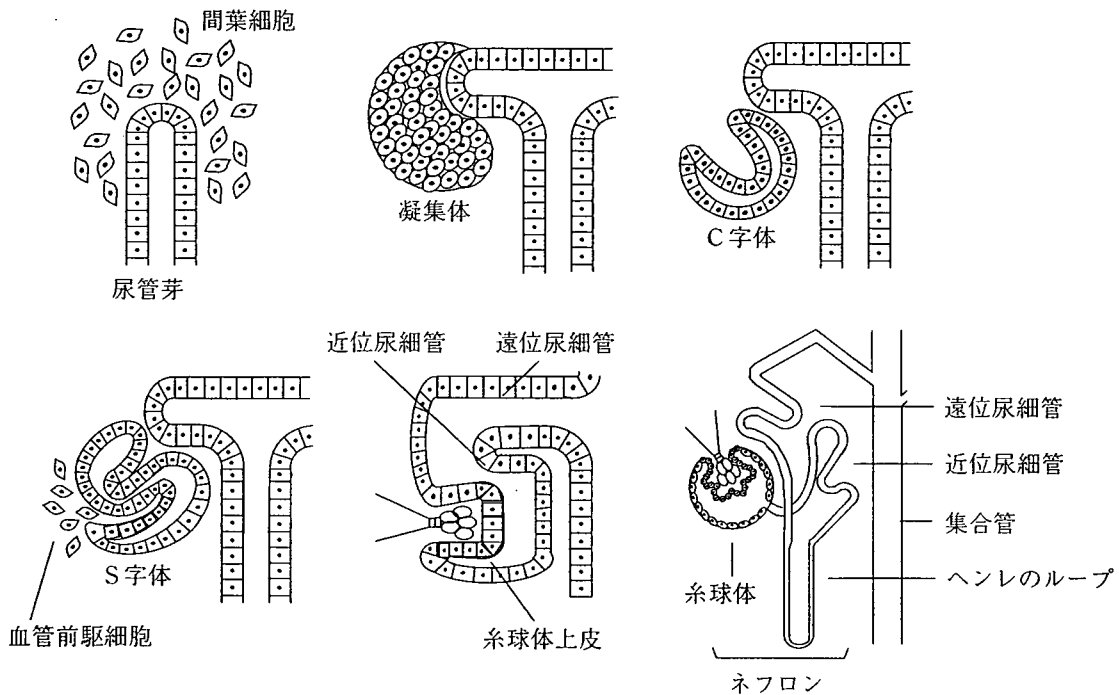
腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される (図10.1)。前腎、中腎のほとんどは、のちに退行変性し、哺乳類成体において機能する腎臓は後腎である。この後腎の形成は尿管芽と後腎間葉との相互作用から始まる。尿管芽のもととなるウォ



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

図 10.1 後腎の発生

ルフ管（中腎管）は、後腎形成のまえに中腎と前腎の形成に寄与しているが、その後、体軸に沿って尾側へと伸長していき、途中で尿管芽と呼ばれる枝分かれを形成する。ヒトでは胎生 35 日目、マウスでは胎生 10.5 日目にこの尿管芽が枝分かれし、後腎間葉へ向かって伸び始める（図 10.2）。

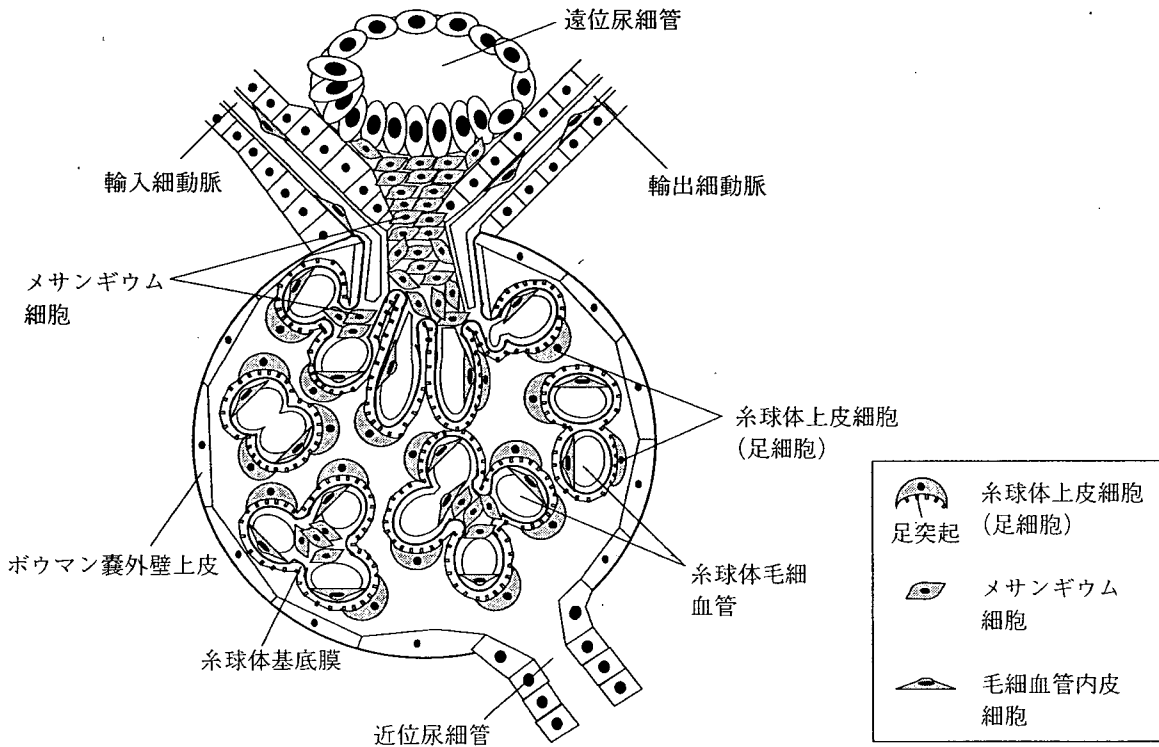


尿管芽が間葉細胞に侵入すると、間葉細胞は尿管芽のまわりに凝集体を作る。凝集体はC字体を経てS字体となり、血管前駆細胞を取り込みつつ、遠位で尿管芽と融合する。S字の部位ごとに遠位尿細管、近位尿細管、糸球体上皮へと分化する。糸球体、尿細管、集合管を合わせた腎臓機能の最小構成単位をネフロンと呼ぶ。

図 10.2 ネフロンの発生

マウス胎生 11.5 日目には尿管芽は後腎間葉に侵入し、間葉を凝集させ尿管芽のまわりにキャップ（帽子）状の構造を形成する。逆に後腎間葉は尿管芽の枝分かれを誘導し、自らはキャップの形を変化させながら上皮性の管へと分化を始める。後腎間葉は、まずコンマ型の凝

集体（C字体）を作り、その後S字型に変化する。このS字の下部の一部と中間部は近位尿細管とヘンレのループになり、また上部は遠位尿細管となり尿管芽と合流する。そしてS字の下部は半球状となりこの中央の隙間に毛細血管内皮細胞とメサンギウム細胞が入り込む。S字の底辺をなす2層の上皮はボウマン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10.3）。

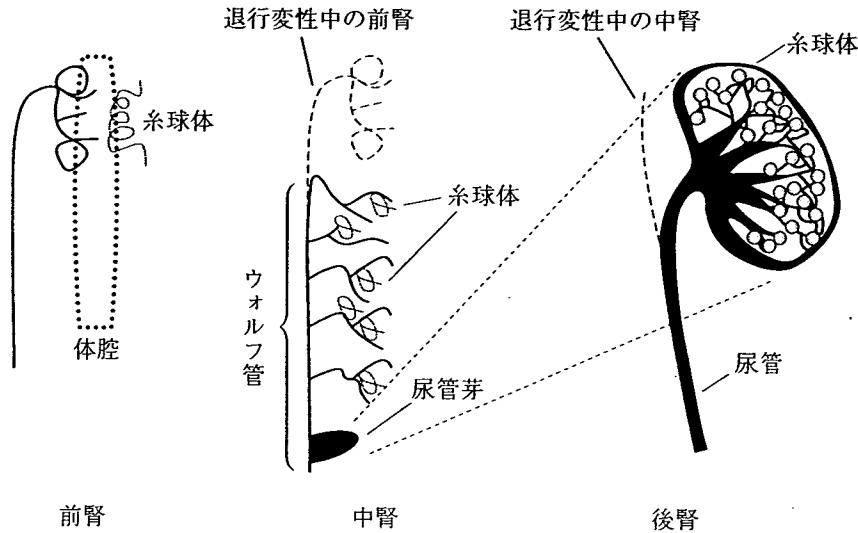


糸球体は、毛細血管網とその支持組織メサンギウムとそれらを覆う内外2層の糸球体上皮細胞、ボウマン囊外壁上皮細胞からなる球状の小体で、輸入および輸出細動脈と接続しており、血管から原尿を尿細管へと濾過する。この際に毛細血管内皮細胞、糸球体基底膜、および足細胞の三者が濾過膜を形成し、血液の選択的透過を行う。

図10.3 糸球体の構造

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

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



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

図 10.4 前腎、中腎、後腎の発生

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

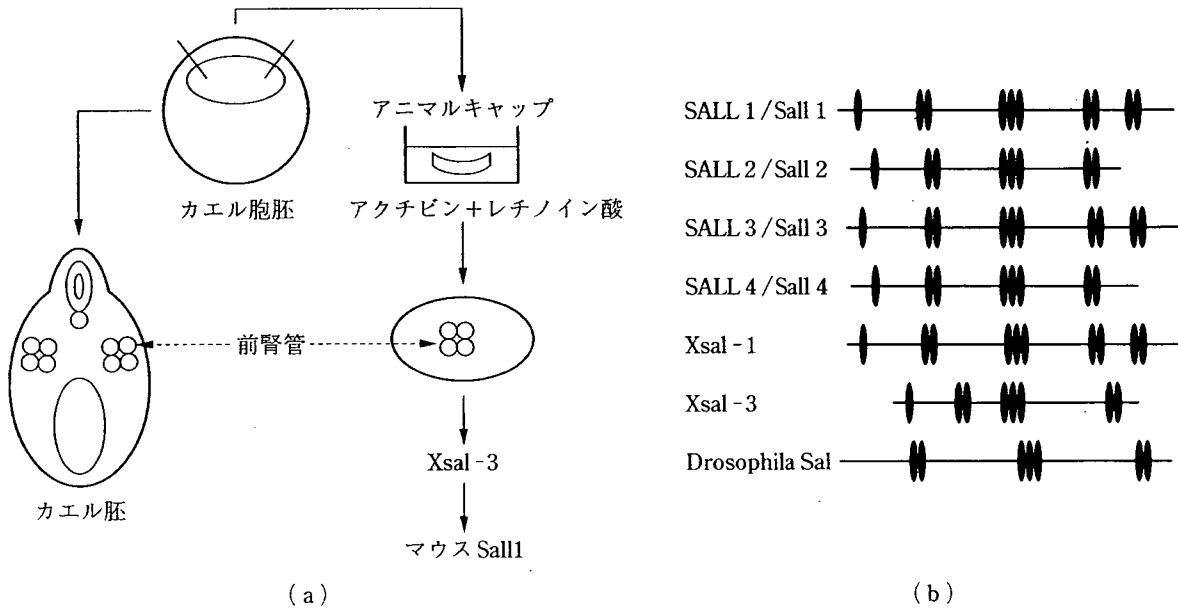
後腎と比較して、前腎は一つのネフロンからなる非常に単純な構造である。中腎はその尾側に発生し、数十のネフロンからなる (図 10.4)。哺乳類においては、中腎の一部は男性生殖器となるが、腎臓としての中腎は退行する。爬虫類、鳥類、哺乳類の最終的な腎臓は後腎であるが、魚類、両生類の最終的な腎臓は中腎である。例えばオタマジャクシは前腎であるが、成体のカエルは中腎を使っている。

10.2.2 Zinc フィンガータンパク Sall 1 の単離

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

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

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



図(a)は、アフリカツメガエルのアニマルキャップアッセイを用いたXsal-3およびSall1のクローニング。図(b)は、Sallファミリーの遺伝子構造(卵形がZincフィンガーモチーフ)。SALL(ヒト)、Sall(マウス)。Xsalの番号とヒト、マウスの番号は必ずしも対応しない。

図10.5 ZincフィンガータンパクSallファミリー

そのなかで、処理後、9~12時間のサンプルの比較から単離されたのが、Zincフィンガードメインを8個もつ新規タンパクをコードする遺伝子で、これをXsal-3と名づけた。この遺伝子はショウジョウバエのspalt (sal) という遺伝子のホモログで、確かに前腎に発現していた。しかし、そのほかに中枢神経系、耳胞、^{さいきゅう}鰓弓にも発現しており、前腎特異的とはいえなかった。さらにこの遺伝子をカエル受精卵に注入しても、何の変化も起こらなかったため、数あるハズレの遺伝子の一つと思われた。しかし、この遺伝子を指標にマウス後腎から新たな遺伝子が単離でき、これは配列からヒトSALL1のマウスホモログと考えられた(図10.5)。そしてこの遺伝子(Sall1)の発現様式を調べたところ、興味深い事実が明らかになった。

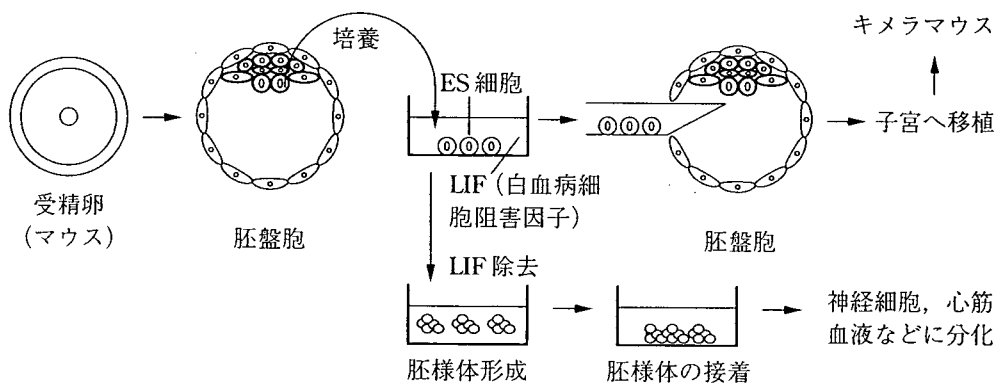
Sall1は、尿管芽が後腎間葉に進入する以前(胎生10.5日)から間葉に発現し、侵入時(胎生11.5日)には後腎の尿管芽には発現しないが、それを取り囲む後腎間葉に非常に強く発現していた。つまり、Sall1は腎臓前駆細胞集団である後腎間葉に発現していたのである。Sall1は腎臓のほかに、中枢神経系、耳胞、心臓、肢芽、肛門などに発現しており、

Xsal-3 との一部類似性が認められた。さらに、中枢神経系では脳室周囲の神経幹細胞が存在する領域に、肢芽では progress zone という未分化細胞が増殖する部分で発現が認められ、腎臓に限らずほかの未分化細胞でも何らかの役割をもつ可能性が示唆された¹⁾。この Sall 1 の機能の重要性を直接的に証明するには Sall 1 ノックアウトマウス、すなわち Sall 1 だけを欠失したマウスを作成するのが最も効果的である。Sall 1 だけをもたないマウスが症状を呈した場合、それが Sall 1 の生体内での機能であるという証明になる。逆に何も起こらなければ、この遺伝子はたいして重要ではないのかもしれない。

10.2.3 ノックアウトマウスの作製方法

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

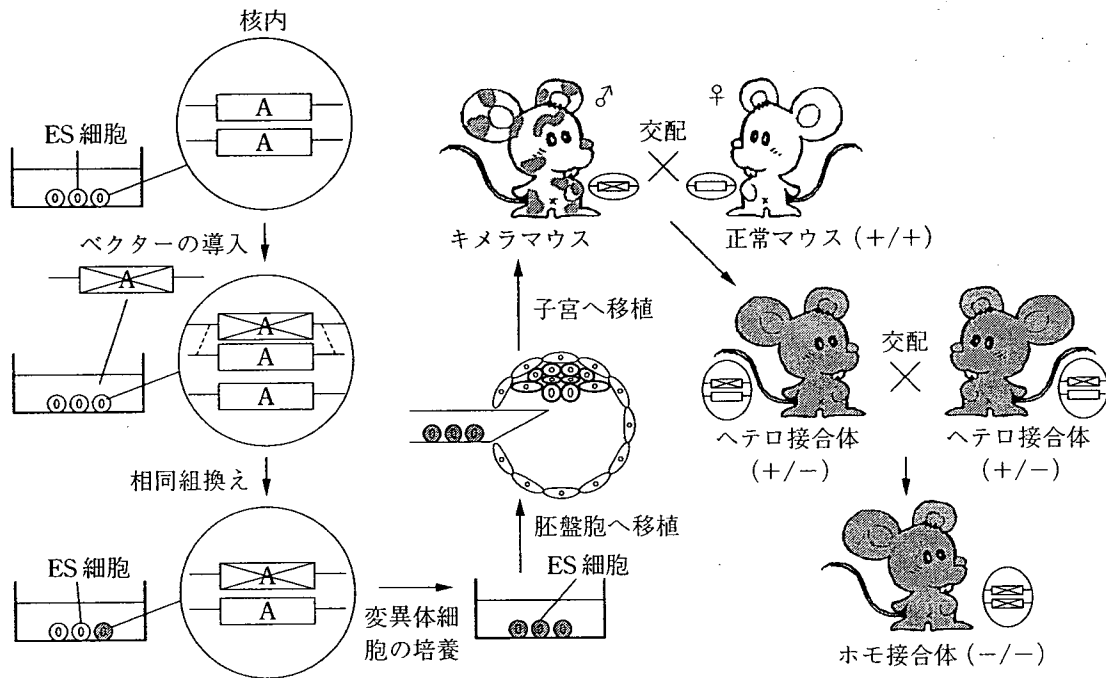
一方、ES 細胞は遺伝子操作が比較的容易で、相同組換えという方法を使って遺伝子のエ



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

図 10.6 ES 細胞の樹立と分化

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



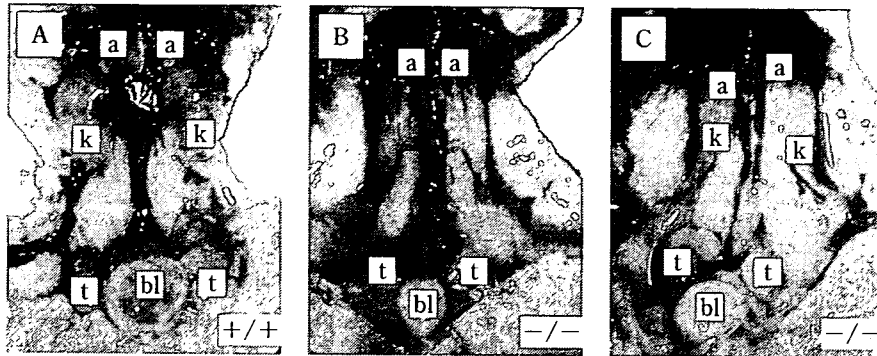
ES 細胞は細胞内にベクターを導入することで、相同組換えを起こし、好きなところを欠失させることができる。このように目的の遺伝子を欠失させた変異体 ES 細胞のみを培養し、胚盤胞へと移植し、それを仮親のマウスの子宮へ移植するとキメラマウスが生まれる。このとき、ES 細胞と胚盤胞の毛色が異なるように設定すれば、毛色の混じったマウスが生まれる。キメラマウスのオスと正常なメスとを交配させることで、ES 細胞由来の精子 (目的遺伝子を欠失している) と正常なメスの卵子から子孫ができると、二つある遺伝子座の一方が欠失したヘテロ接合体ができることになる。このヘテロ接合体どうしを交配すると、ホモ接合体、すなわ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

図 10.7 ノックアウトマウスの作製法

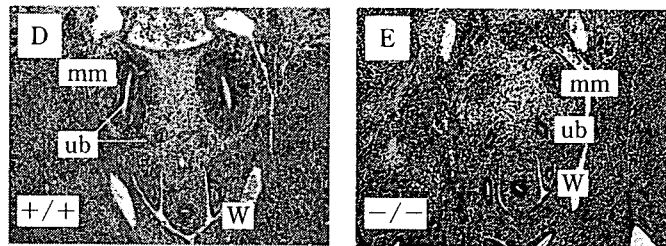
10.2.4 Sall1 は腎臓発生に必須である

この技術を利用して Sall1 を欠失するマウスを作製した。ヘテロ接合体どうしを交配して生まれたマウスの 4 分の 1 が生直後に死亡し、これらはすべてホモ接合体、つまり Sall1 ノックアウトマウスであった。開腹してみると、腎臓が完全に欠損しているか非常に小さい

痕跡的な腎臓が認められるのみであった (図 10.8, 口絵 21 参照)。Sall 1 は腎臓以外でも発現しているにもかかわらず, ほかの臓器には明らかな異常は認められなかった。これによって, Sall 1 は腎臓の発生にきわめて重要であることが証明された。



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



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

図 10.8 Sall 1 ノックアウトマウスにおける腎臓異常 (口絵 21 参照)

10.2.5 そのほかの Sall ファミリーの機能

ヒトとマウスでは Sall 1 以外にも Sall 2, 3, 4 と, 合計四つの Sall 関連遺伝子が知られている (図 10.5 参照, ヒトは SALL 1, 2, 3, 4 と大文字で記載される)。ヒトでの SALL 1 の変異は Townes-Brocks 症候群という遺伝病を起こすことが報告されている²⁾。これは, 多指症, 外耳や内耳の異常を主体とし, 時に腎臓や心臓の形成障害を伴うもので, 常染色体優性遺伝の形態をとる。つまり, ヘテロの状態でも症状を呈するわけで, マウスの Sall 1 ヘテロ欠失体がまったく正常であることと一致しない。また, Sall 1 ホモ欠失体でも指や耳の異常は認められなかった。Townes-Brocks 症候群では, Sall 1 遺伝子の変異によ

ってC端を欠いた Sall 1 の N 端のみの欠損型タンパクが発現していると考えられ、Sall 1 の N 端タンパクが Sall 1 を含むすべての Sall と相互作用し、Sall タンパクの機能を阻害するドミナントネガティブ体（内在性のものに打ち勝って阻害効果を示すもの）としてはたらくことに起因することが示唆されている³⁾。

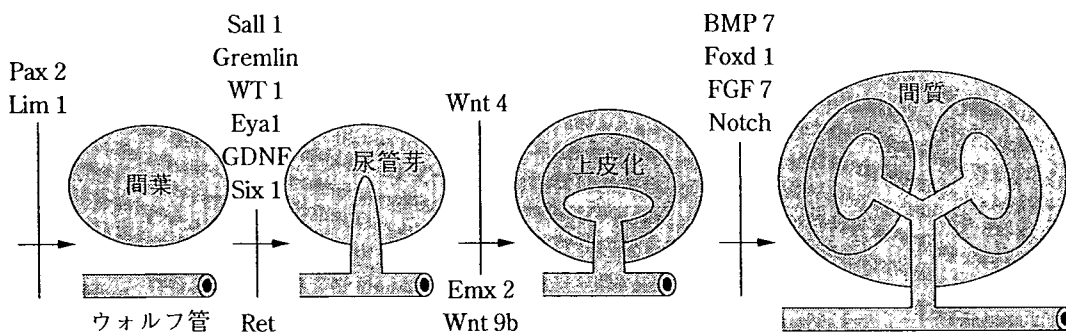
われわれが作製した Sall 2 欠失マウスは、外見上異常な表現型を示さず生存した⁴⁾。また、Sall 1 との二重欠失マウスを作成しても、Sall 1 の表現型をさらに重篤にすることはなかった。Sall 3 欠失体は周産期致死で咽頭や脊髄の発生に異常がみられるが、ほかの臓器では異常がみられない⁵⁾。しかし、Sall 1 と Sall 3 の二重欠失マウスを作製したところ、指の形成に異常が生じた。これは、Sall 1 と Sall 3 が一部の機能を補填し合っていることを示唆する。Sall 4 は眼の動きや手の異常を特徴とし、聴覚の欠失、心臓や腎臓の異常等の症状を示す遺伝病 Okihiro 症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

10.3 腎臓発生の分子機構

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

10.3.1 腎臓発生の開始シグナル

すでに述べたように、後腎の発生は後腎間葉とウォルフ管から伸びる尿管芽との相互作用で開始される。つまり後腎間葉から尿管芽へ、逆に尿管芽から後腎間葉へ、という2方向のシグナルが存在するわけである。まず前者について述べる（図 10.9, 10.10 (a)）。



縦線は各遺伝子のノックアウトによって発生が障害される時期を示す。

図 10.9 腎臓発生の過程ではたらく遺伝子

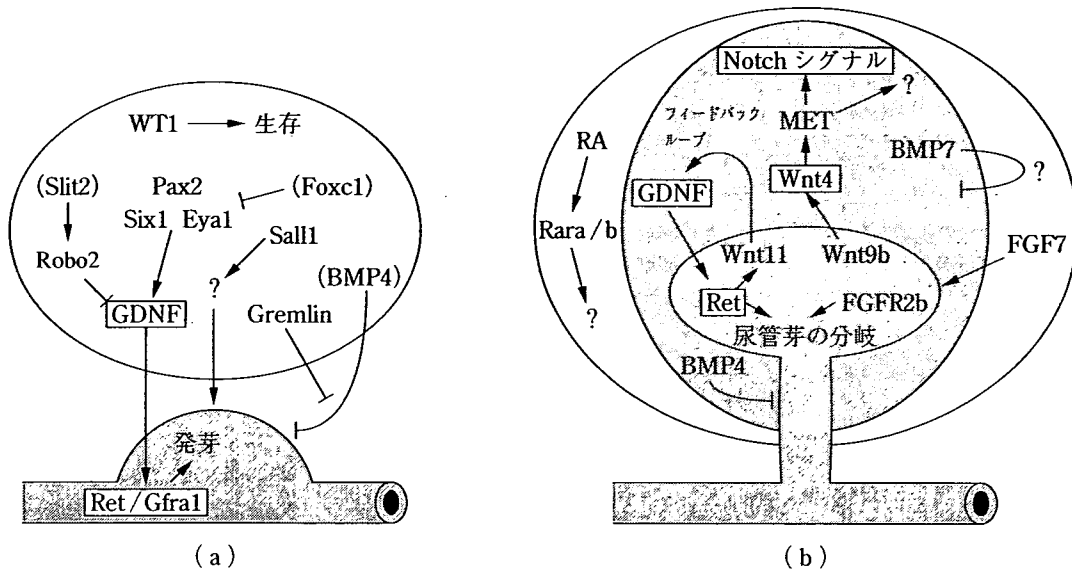


図 (a) は胎生 10.5 マウス後腎間葉における遺伝子カスケード。括弧付きの遺伝子は後腎管よりも前部の間葉で発現し、尿管芽の異所的な発芽を抑えている。図 (b) は尿管芽の間葉への侵入後の遺伝子カスケード。

図 10.10 腎発生における遺伝子の機能模式図

GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) は、後腎間葉から分泌される TGF- 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させ伸長させる機能をもつ、腎臓発生において非常に重要な分子である⁷⁾。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。この GDNF-Ret/Gfra 1 シグナルが入らないマウスでは、尿管芽が発芽しない、あるいは発芽しても伸長しないという表現型を示す^{8),9)}。また Ret は犬の腎臓由来である MDCK 細胞において、細胞接着性を減少させ運動性を高めることが知られている¹⁰⁾。つまり後腎間葉より分泌された GDNF が Ret を介して発芽部位の細胞増殖を促進し、さらに接着性を弱めることで尿管芽の発芽を可能にさせるというカスケードが示唆される。

ノックアウトマウスの解析によって、この時期の後腎間葉に発現している Pax 2 (paired box gene 2), Eya 1 (eyes absent homolog 1), Six 1 (sine oculis-related homeobox 1 homolog), といった転写因子は GDNF の発現制御を介して尿管芽の形成に必須であることが知られている。Pax 2 と Six 1 は GDNF のプロモーター領域に結合し GDNF の発現を直接的に制御しており¹¹⁾, Eya 1 は脱リン酸化酵素活性をもち Six 1 と転写複合体を形成することで GDNF の発現を開始している¹²⁾。また逆に、後腎間葉よりも前部 (頭側) の間葉には、Foxc 1 (forkhead box c 1), BMP 4 (bone morphogenic protein 4), Slit 2 (slit

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

このように GDNF は尿管芽の発芽伸長に必須であるが、後腎間葉と尿管芽との相互作用の開始が GDNF によってすべて制御されているわけではない。BMP のアンタゴニストである *Gremlin* は、後腎間葉から分泌され、尿管芽の間葉への侵入に必須な役割をもつ。*Gremlin* のノックアウトマウスでは尿管芽の最初の発芽は起こるが、その後の伸長が起こらず、結果的に後腎間葉への侵入が阻害される¹⁵⁾。BMP は GDNF とは独立に尿管芽の発芽や伸長を抑制していると考えられており、BMP のアンタゴニストである *Gremlin* の欠失によって BMP シグナルがさらに増強し、尿管芽の伸長が抑制されたと思われる。

さて、われわれの作成した *Sall 1* ノックアウトマウスではどうだろうか。このマウスでは後腎間葉が形成されるが、小さく、尿管芽も形成される。しかし尿管芽は後腎間葉に侵入していないか、あるいは侵入しても、その後の分岐は著明に障害されていた (口絵 21, 図 10.8 参照)¹⁾。つまり *Sall 1* は、上述の遺伝子群と同様、尿管芽の伸長という、後腎発生の最も初期段階の重要なステップに必須であることが判明した (図 10.9, 10.10 (a) 参照)。後腎間葉に *Sall 1* が発現することによって、尿管芽を引き寄せる何らかの因子が分泌されると考えられる。その一番の候補は当然 GDNF であるが、*Sall 1* ノックアウトマウスの後腎間葉における GDNF の発現は失われていなかった。これは GDNF のほかに、*Sall 1* の支配するもう一つ以上の何らかの液性因子が存在するか、もしくは尿管芽の発芽伸長に必須である別の機構が存在することを意味している。

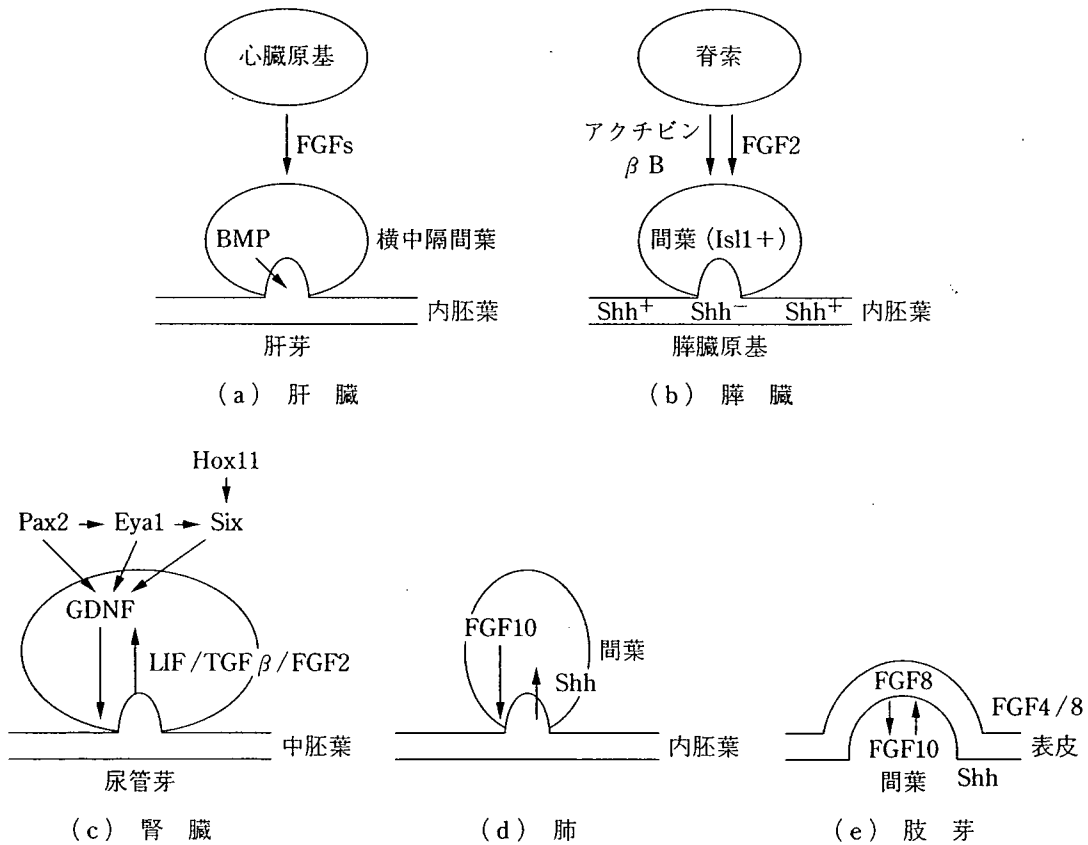
10.3.2 尿管芽の分岐

GDNF-Ret/Gfra 1 シグナルは尿管芽の発芽だけでなく、尿管芽が後腎間葉に侵入した後の分岐 (枝分かれ) にも重要なシグナルである (図 10.10 (b) 参照)¹⁶⁾。実際に前述の *Foxc 1*, *BMP 4*, *Slit 2*, *Robo 2* 等の GDNF シグナルを抑制する因子のノックアウトマウスでは腎肥大や集合管の多重形成など尿管芽の異常増殖・分岐が原因の表現型がみられる。

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

結合して、そのシグナル伝達に影響している。つまり Glypican 3 は尿管芽の増殖因子に対する応答性を低下させ、その増殖能を抑制するはたらきをもつと考えられている。また、間質 (stroma) も尿管芽の分岐の制御をしている。間質は枝分かれした尿管芽や凝集した間葉の周辺に発生する組織である。間質ではレチノイン酸受容体 Rara/Rarb (retinoic acid receptor 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¹⁸⁾。しかし、どんな因子が間質から尿管芽へとシグナルを伝えているのかは依然不明である。FGF 7, 10 はその候補因子の一つであり、尿管芽周囲の間質に発現し、尿管芽に発現するレセプター FGFR 2b を介して尿管芽の成長・分岐を制御している¹⁹⁾。

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



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

図 10.11 さまざまな臓器における上皮-間葉相互作用の共通性

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

10.3.3 間葉の上皮化

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

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

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

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

Wnt 4 を発現した後腎間葉は、Wnt の受容体である Frizzled を介して自立的に上皮化を進行させ、C 字体・S 字体から尿細管、糸球体へと転換していく。Frizzled には Wnt への結合能をもつ分泌型のホモログである sFrp (secreted Frizzled-related proteins) が存在するが、sFrp 1 は間質に発現して Wnt シグナルを抑制し、逆に sFrp 2 は上皮化の進行した部分に発現して Wnt シグナルを亢進することで上皮化の促進をしている²⁶⁾。上皮化の進行過程では Wnt ばかりでなく BMP シグナルもかかわっている。BMP 7 は間葉に発現し、そのノックアウトマウスでは間葉が S 字体を形成した辺りでアポトーシスが進行し発生が停止する²⁷⁾。また *in vitro* の実験系では、BMP 7 は間質の増殖を促進しつつ間葉の分化を抑制した。これは BMP 7 が間葉細胞のアポトーシスを抑制して生存させる機能をもつだけでなく、間質の増殖も制御することで間質から分泌される何らかの間葉上皮化制御因子の分泌量を制御し、結果的に間葉の上皮化を抑制する機能をもつためと考えられている²⁸⁾。

最近の興味深い報告に、Fraser 症候群の原因遺伝子 Fras 1 (Fraser 1) とその結合タンパク、Grip 1 についての報告がある。Fraser 症候群では 45% の割合で先天性の腎臓欠失がみられる。Fras 1 は尿管芽の上皮細胞の基底側 (間葉側) に発現している細胞外マトリックスタンパクである。そのノックアウトマウスの尿管芽は後腎間葉に侵入するが、後腎間葉に尿管芽からの誘導がかからず後腎間葉はアポトーシスを起こす。尿管芽の成長もそこで止まってしまう²⁹⁾。Grip 1 のノックアウトマウスも同様の表現型を示している。Grip 1 は PDZ ドメインをもつタンパク質で、後腎での発現位置は Fras 1 と共局在する。*in vitro* の実験で Grip 1 は Fras 1 とその PDZ ドメインどうし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³⁰⁾。このように、Fras 1/Grip 1 は尿管芽の後腎間葉と直接接触する基底側に発現することによって、間葉細胞の生存、上皮への分化を促進している。

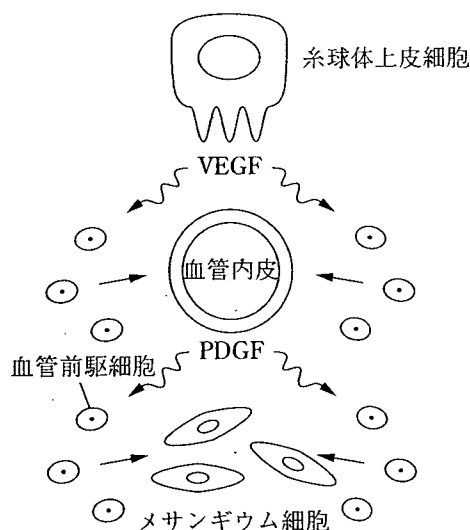
10.3.4 糸球体形成

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

胞) という3層構造になっており、血液はこの障壁で濾過され原尿としてボウマン嚢に放出される。

糸球体上皮(足細胞)は後腎間葉由来の組織であるが、毛細血管とメサンギウム細胞は血管前駆細胞由来の組織である。この血管前駆細胞が、発生過程の腎臓内部で発生した内在性のものか、それとも外部の血管前駆細胞が入り込んだ外来性のものかは不明であるが、いずれにせよ糸球体形成過程では、糸球体上皮細胞が血管前駆細胞の分化を誘導するという機構がわかっている。

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



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

図 10.12 糸球体上皮細胞からの誘導過程

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

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

Notch シグナルは進化的によく保存された細胞内シグナル伝達経路で、多くの生物種で細胞運命の決定や組織発生に重要な役割をもつ。Notch シグナルは Notch の細胞内ドメイン NICD (Notch intracellular domain) が 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タンパク Presenilin の欠如したマウス腎臓では、MET は開始されるものの C 字体・S 字体のほぼ完全な欠失が生じ、最終的に近位尿細管と糸球体上皮細胞（足細胞）が形成されないことが報告された³⁴⁾。また、Notch 2 活性の非常に低下したマウスの糸球体では、糸球体上皮の形成異常と、血管内皮とメサンギウム細胞の欠失が生じる³⁵⁾ (C 字体・S 字体は形成される。前述の Presenilin の欠損は Notch 1~4 のシグナル伝達を阻害するので、よりシビアな表現型になったと考えられる)。ただし、糸球体の数そのものも大きく減少しており、Notch 2 シグナルが糸球体形成の複数の段階で必須であることは間違いない。

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

10.4 尿の流れが発生を制御する

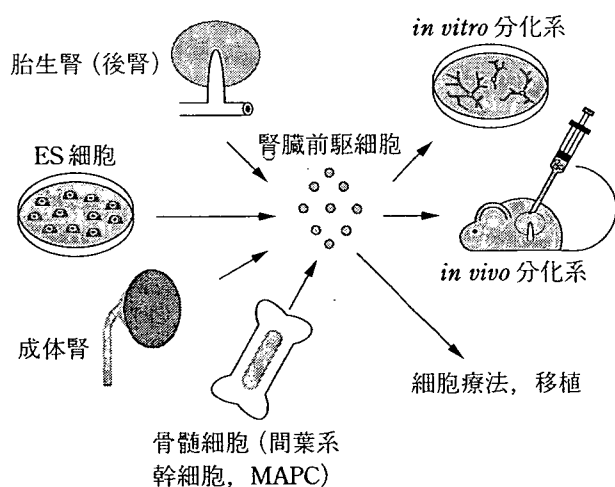
これまでは、遺伝子のカスケードによって腎臓が発生することを述べてきたが、後期の腎臓発生、特に尿細管の増殖が適切にコントロールされ管が正しい太さに維持されるためには、さらに機械的刺激が必要なことが明らかになってきた。Pkd 1, 2 をはじめとする一群の遺伝子群の異常によって尿細管が異常に拡大し、腎嚢胞を呈することが知られている³⁶⁾。特に pkd 1 の異常は常染色体優性遺伝する腎嚢胞症 (polycystic kidney disease, PKD) を呈し、透析に至る疾患のなかで遺伝性のもものでは第 1 位を占めている。これらの遺伝子産物は尿細管に存在する繊毛 (cilia) に局在するこ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

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

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

10.5 腎臓は再生できるか

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



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

図 10.13 腎幹細胞研究および再生医療開発の展望

10.5.1 ES 細胞からの誘導

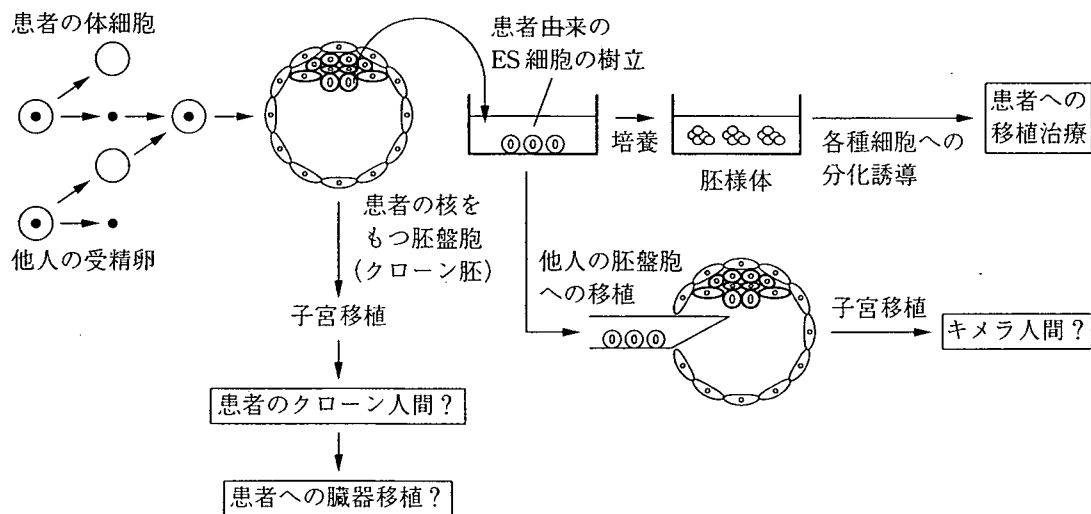
〔1〕 ヒト ES 細胞の樹立 ES 細胞は前述のとおり多分化能をもつ細胞だが、1998 年にヒトの ES 細胞が樹立され、この分野は新たな展開を迎えた⁴⁰⁾。つまりマウスの場合と同様に、ヒト ES 細胞から各種臓器細胞を試験管内で作ってヒトに移植するというのが夢物

語でなくなってきたわけである。

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

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

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



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

図 10.14 ES 細胞を使った医療の可能性

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

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

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

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

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

10.5.2 骨髄幹細胞からの誘導

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

骨髄中のもう一つの幹細胞である血液幹細胞にも、移植によって同様の多分化能があることが多く発表されている。しかし近年、ES細胞が骨髄細胞や神経細胞と融合すること、さらに骨髄細胞が肝臓、神経、心臓の細胞と融合することが判明し、移植により証明される分化能は単なるホストの細胞と融合したものである疑いが生じている^{42)~44)}。

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

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

10.5.3 成体腎からの腎臓前駆細胞単離

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

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