

10.5.4 胎児腎臓からの腎臓前駆細胞単離

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

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

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

つまり、ポジティブコントロールとして腎臓に分化することが自明であり、前駆細胞の存在が示唆される後腎間葉をまず利用するのが成功の可能性が高いと考えられる。この点でSall1は後腎間葉に発現しているので、間葉を効率よく集めるのに非常によい道具となる。

われわれはSall1遺伝子座に蛍光タンパク質を発現するEGFP遺伝子を導入したマウスを作成し、EGFPによる蛍光を指標としてSall1を発現する細胞をソートし、そのなかの一細胞から増殖し、多分化能を有する前駆細胞を単離する実験系の確立を行っている⁵¹⁾。いったん、この系が開発されれば、後腎間充織のみならず、骨髄、成体腎、ES細胞を含むさまざまな細胞から、腎臓前駆細胞を単離していくことができるはずである。そして、これを*in vitro*で未分化なまま増幅し、必要に応じて移植して腎機能を回復させることが究極の目標となる。

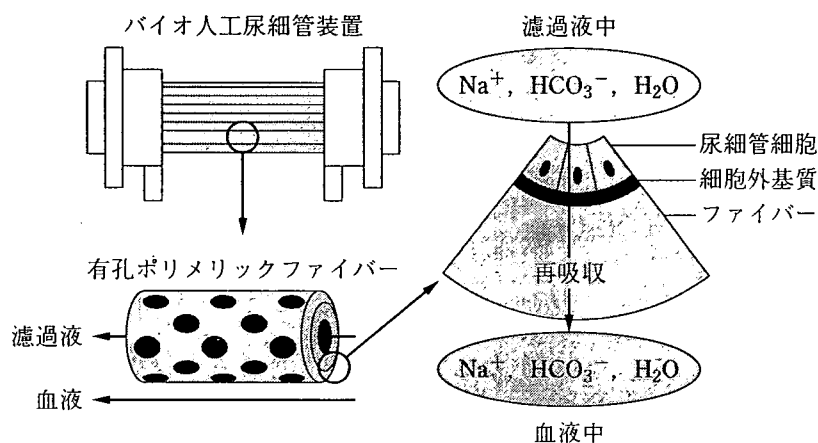
10.5.5 細胞工学を用いた移植可能なバイオ人工腎臓

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

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

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

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

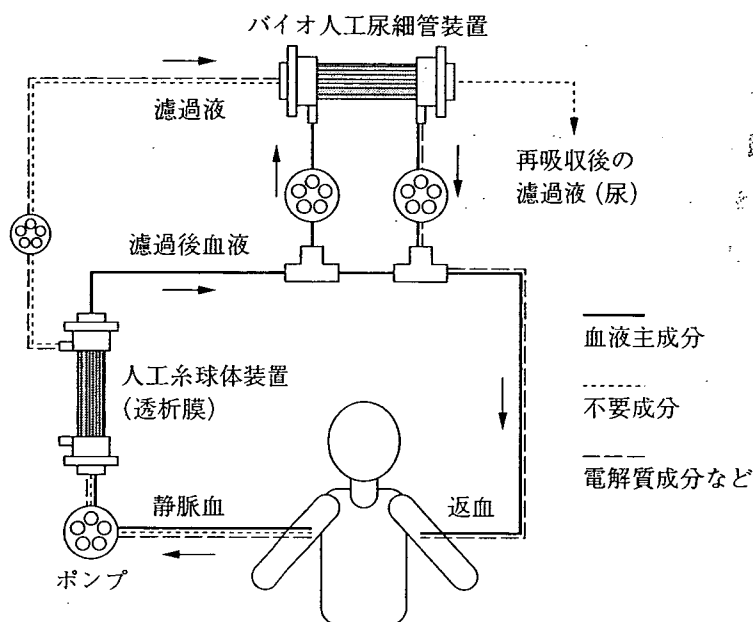


有孔ポリメリックファイバーの内側に細胞外基質を裏打ちし、尿細管細胞を付着させる。ファイバー内腔を通る濾過液より電解質や水が、ファイバー外を流れる血液へ向かって再吸収される。

図 10.15 バイオ人工尿細管の概念

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

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



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

図 10.16 体外式バイオ人工腎臓の概略図

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

10.5.6 ブタからの腎臓移植

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

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

護の面からも問題が少ないことによる。

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

10.6 お わ り に

腎臓再生が困難なものであることは間違いない。しかし、腎臓発生の機構を突きつめることで得られるヒントも、また多いはずである。尿管芽と後腎間葉との相互作用から腎臓発生は開始するので、この過程における GDNF やそれ以外の機構の解明は、その一つになるだろう。また、同じ間葉細胞が糸球体から尿管までさまざまな分化系をもつようになる機構は、まだ十分に明らかになったとはいえない。尿管芽や間質が、分泌する因子の濃度勾配によるものなのか、間葉細胞自身のプログラムによるものなのか、どのような機構で間葉の分化制御が行われているのか、非常に興味深い問題である。なぜなら、*in vivo* での間葉の分化制御機構の解明は、*in vitro* における間葉細胞の分化制御につながるからである。腎臓の再生医療とからめて、将来的に重要な課題になると思われる。腎臓は、ほかの臓器に先駆けて、腎移植や人工透析などの代替医療が進み確立されてきたが、それ以降の再生医療が遅れ気味である。腎臓内科学、発生生物学、分子生物学、組織工学など、さまざまな分野の知識を集学的に結晶化した研究が進められることを期待したい。

引用・参考文献

- 1) Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Scully, S., Lacey, D. L., Katsuki, M., Asashima, M. and Yokota, T. : Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development, *Development*, 128, 16, pp.3105-3115 (2001)
- 2) Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U. and Engel, W. : Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome, *Nat.*

- Genet., 18, 1, pp.81-83 (1998)
- 3) Kiefer, S. M., Ohlemiller, K. K., Yang, J., McDill, B. W., Kohlhase, J. and Rauchman, M. : Expression of a truncated Sall1 transcriptional repressor is responsible for Townes-Brocks syndrome birth defects, *Hum. Mol. Genet.*, 12, 17, pp.2221-2227 (2003)
 - 4) Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M. and Nishinakamura, R. : Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development, *Mol. Cell. Biol.*, 23, 1, pp.62-69 (2003)
 - 5) Parrish, M., Ott, T., Lance-Jones, C., Schuetz, G., Schwaeger-Nickolenko, A. and Monaghan, A. P. : Loss of the Sall3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality, *Mol. Cell. Biol.*, 24, 16, pp.7102-7112 (2004)
 - 6) Kohlhase, J., Heinrich, M., Schubert, L., Liebers, M., Kispert, A., Laccone, F., Turnpenny, P., Winter, R. M. and Reardon, W. : Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 23, pp.2979-2987 (2002)
 - 7) Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J., Sariola, H., and Westphal, H. : Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF, *Nature*, 382, 6586, pp.73-76 (1996)
 - 8) Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. : Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret, *Nature*, 367, 6461, pp.380-383 (1994)
 - 9) Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R. O., Snider, W. D., Johnson Jr, E. M., and Milbrandt, J. : GFR alpha 1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys, *Neuron*, 21, 2, pp.317-324 (1998)
 - 10) Tang, M. J., Worley, D., Sanicola, M. and Dressler, G. R. : The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells, *J. Cell. Biol.*, 142, 5, pp.1337-1345 (1998)
 - 11) Brophy, P. D., Ostrom, L., Lang, K. M. and Dressler, G. R. : Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene, *Development*, 128, 23, pp.4747-4756 (2001)
 - 12) Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Kronen, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aggarwal, A. K., Maas, R., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G. : Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis, *Nature*, 426, 6964, pp.247-254 (2003)
 - 13) Kume, T., Deng, K. and Hogan, B. L. : Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract, *Development*, 127, 7, pp.1387-1395 (2000)
 - 14) Grieshammer, U., Le, M., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M. and Martin, G. R. : SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site, *Dev. Cell.*, 6, 5, pp.709-717 (2004)
 - 15) Michos, O., Panman, L., Vintersten, K., Beier, K., Zeller, R. and Zuniga, A. : Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling

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

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

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

- a bioartificial renal tubule assist device : In vitro transport and metabolic characteristics, *Kidney. Int.*, **55**, 6, pp.2502-2514 (1999)
- 55) Humes, H. D., Buffington, D. A., MacKay, S. M., Funke, A. J. and Weitzel, W. F. : Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 5, pp.451-455 (1999)
- 56) Humes, H. D., Weitzel, W. F. and Fissell, W. H. : Renal cell therapy in the treatment of patients with acute and chronic renal failure, *Blood. Purif.*, **22**, 1, pp.60-72 (2004)
- 57) Sandrin, M. S., Vaughan, H. A., Dabkowski, P. L. and McKenzie, L. F. : Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 23, pp.11391-11395 (1993)
- 58) Phelps, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J., Wells, K. D., Chen, S. H., Ball, S., Specht, S. M., Polejaeva, I. A., Monahan, J. A., Jobst, P. M., Sharma, S. B., Lamborn, A. E., Garst, A. S., Moore, M., Demetris, A. J., Rudert, W. A., Bottino, R., Bertera, S., Trucco, M., Starzl, T. E., Dai, Y. and Ayares, D. L. : Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs, *Science*, **299**, 5605, pp.411-414 (2003)
- 59) Kolber-Simonds, D., Lai, L., Watt, S. R., Denaro, M., Arn, S., Augenstein, M. L., Betthausen, J., Carter, D. B., Greenstein, J. L., Hao, Y., Im, G. S., Liu, Z., Mell, G. D., Murphy, C. N., Park, K. W., Rieke, A., Ryan, D. J., Sachs, D. H., Forsberg, E. J., Prather, R. S. and Hawley, R. J. : Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 19, pp.7335-7340 (2004)
- 60) Yamada, K., Yazawa, K., Shimizu, A., Iwanaga, T., Hisashi, Y., Nuhn, M., O'Malley, P., Nobori, S., Vagefi, P. A., Patience, C., Fishman, J., Cooper, D. K. C., Hawley, R. J., Greenstein, J., Schuurman, H-J., Awwad, M., Sykes, M. and Sachs, D. H. : Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha 1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue, *Nat. Med.*, **11**, 1, pp.32-34 (2005)