

# 腎臓発生の分子機構と再生への展望

賀来 祐介, 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、後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等から明らかとなってきた。腎臓は自己修復能が低く、腎機能は多種類の細胞から成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、臓器移植にかわる将来的な根治療法として再生医療に期待が高まる中、腎臓構成細胞を分化誘導する試みも徐々に進んでいる。

## 1. はじめに

腎臓は尿を産生することで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様々な毒性成分が蓄積し、意識混濁、肺水腫による呼吸困難、高カリウム血症で死に至るため、人工透析を行う必要がある。加えて腎臓は内分泌器官としても重要な働きをしており、レニンを産生することで血圧の調節を行い、ビタミンDの活性化やエリスロポエチンの産生によって骨代謝と赤血球の維持に関与している。そのため、腎不全においては血圧と骨の異常および重度の貧血が見られる。腎不全にともなう貧血に対して、現在では週に数回のエリスロポエチンの投与による治療が行われているが、一生にわたり投与を行う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患者数は約30万人に達しており、現在も増加の一途をたどっている。人工透析導入原因の第1位は糖尿病であり導入患者数の約45%を占めている。腎臓は自然には再生せず、成体の腎臓には幹細胞が存在しないが、胎生期の腎臓には前駆細胞が確かに存在する。腎臓の発生を理解することでES細胞やiPS細胞から腎臓前駆細胞を誘導できる可

能性がある。本稿では腎臓発生について解説しながら再生医療に向けての展望について考察する。

## 2. 慢性腎疾患に関する治療法

糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症などといった腎疾患により末期腎不全に陥った場合、死体および生体からの腎移植、血液または腹膜を介しての人工透析、の二つの治療法が行われている。腎移植は損なわれた腎機能を完全に補うことができる根本的な治療である。しかし、慢性的なドナー不足によって一般的な治療法にはなりえていない。人工透析は患者に厳しい食事制限や定期的な通院を強いる一方、腎臓の濾過機能の代償にしかすぎないため長期合併症を引き起こす。これらに代わる新しい治療として再生療法が注目されているが、腎臓においては前腎、中腎という胎生期の腎臓を経て最終的な腎臓となる後腎が形成されるという発生過程、後腎においても多数の細胞種を含む構造上の複雑さなどの理由によりほかの臓器に比べ大きく立ち遅れている。

## 3. 腎臓発生の概要

腎臓は前腎、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(図1A)。マウスでは胎生8.5日目ごろに胚性中胚葉より分化した沿軸中胚葉、側板中胚葉そしてその間に存在する中間中胚葉の構造が明らかとなる。泌尿生殖器系はこの中間中胚葉から発生する。胎生9.0日目ごろに中間中胚葉から前尿管が形成され総排泄腔へ向かって伸長を始めると共に、隣接する間葉組織では数

熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野 (〒860-0811 熊本市中央区本荘 2-2-1)

From kidney development toward regeneration  
Yusuke Kaku and Ryuichi Nishinakamura (Department of Kidney Development, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan)

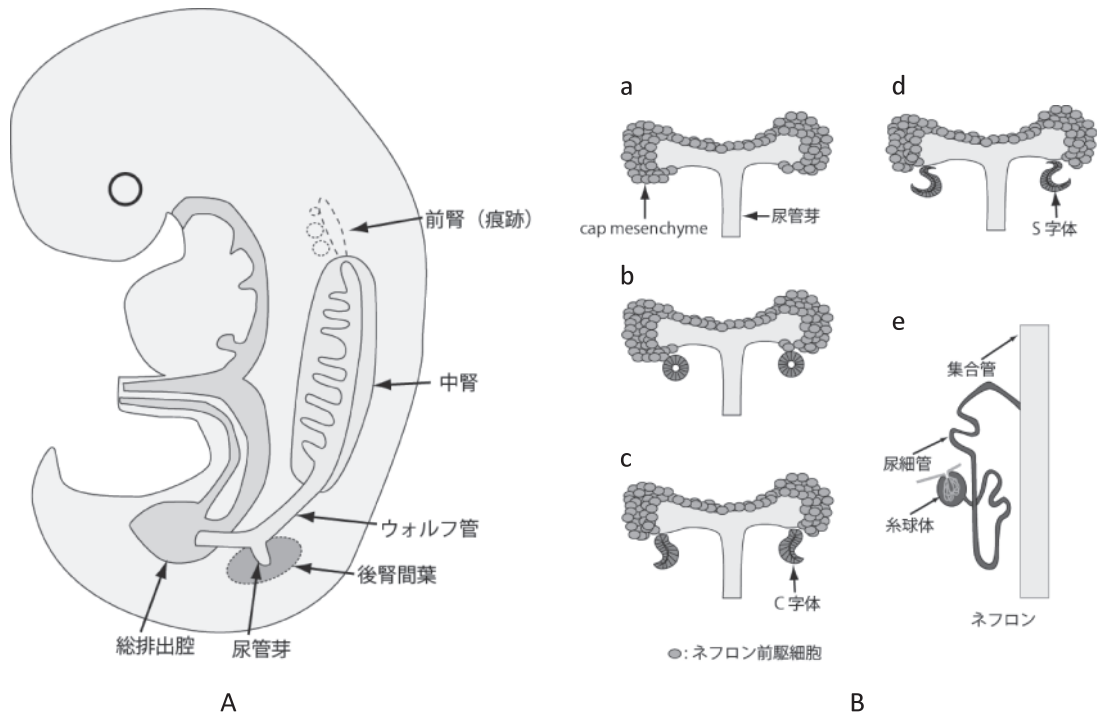


図1 腎臓発生の概略図

(A) 胎生10.5日のマウス胎仔。前腎は退縮し痕跡しか示さない。中腎では中腎形成が行われており、ウォルフ管から中腎間葉に管が伸びネフロンを形成している。後腎では後腎間葉の誘導によりウォルフ管から尿管芽が伸長している。

(B) (a) 後腎間葉に侵入した尿管芽は伸長、分岐を行う。後腎間葉細胞は尿管芽周辺にて凝集する。(b) 凝集した後腎間葉細胞は上皮化し、同時に自己複製する。尿管芽はさらに分岐する。(c) 上皮化した後腎間葉はC字体、S字体へと形状を変更していく。S字体の上部は尿細管、下部は糸球体を形成する。(d) S字体下部へ血管前駆細胞が入り込み糸球体を形成していく。遠位尿細管は尿管芽由来の集合管とつながる。成熟した腎臓の構造。糸球体、尿細管、集合管を合わせてネフロンと呼ぶ。

個の前腎が生じる。この前腎はまもなく消失するが、総排泄腔へと伸びた前腎管の尾側部は中腎管（ウォルフ管）として残存する。胎生9.5日目になると中腎が形成される。しかし、中腎はいくつかの男性生殖器官の構成要素となる以外は退化する。最終的な機能臓器となる後腎の発生はヒトでは胎生35日目、マウスでは胎生10.5日目にウォルフ管の尾側から尿管芽が背側の後腎間葉に向かって伸長することで生じる。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周りにキャップ（帽子）状の構造（cap mesenchyme）を形成させる（図1B a）。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（図1B b）。これは間葉・上皮転換（mesenchyme-to-epithelial transition; MET）と呼ばれ、尿管芽の伸長・分岐と共に後腎形成の重要な要素である。上皮化した後腎間葉はまずコマ型の凝集体（C字体）を形成し（図1B c）、その後S字型に変化する（図1B d）。S字体の上部は遠位尿細管となり、尿管芽と合流する。S字体の中間部から下部の一部にかけてはヘンレのループと近位尿細管を形成し、下部には毛細血管内皮細胞が侵入して糸球体（ポドサイトおよび

ポーマン囊上皮）へと分化する。一方、尿管芽の腎臓側は集合管へ、反対側は腎臓と膀胱をつなぐ尿管へと分化する（図1B e）。この糸球体から集合管までをあわせた腎機能の最小単位をネフロンと呼び、ヒトでは最終的に約100万個のネフロンが形成される。それぞれのネフロンで生成された尿は尿管を経て膀胱に流れ込むことになる。

#### 4. Sallファミリーの腎臓および器官形成における役割

両生類であるカエルは最終的な腎臓として中腎を使用するが、オタマジャクシにおいては前腎がその機能を担っている。この前腎は、アフリカツメガエル受精卵の予定外胚葉領域である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ことにより、3日間で三次元立体構造にまで誘導することができる。我々はこの系を用いてSall1遺伝子を単離した。Sall (sal-like) 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、特徴的な二重ジンクフィンガーモチーフを持っている。このSall1のノックアウトマウスは、腎臓欠損を呈し、生後すぐに死亡するため、Sall1は腎臓発生において必須である。Sall1は尿管芽が後腎間葉に侵入

する以前の胎生 10.5 日目から間葉に発現しており、尿管芽の侵入に必要であることが示された<sup>1)</sup>。

ヒトとマウスには *Sall1* のほかに *Sall2*, 3, 4 の計四つの *Sall* 遺伝子が存在する。*Sall2* ノックアウトマウスに外見上の異常は見られず生存し、*Sall1* との二重欠失マウスを作製しても、*Sall1* の表現型が重篤になることはなかった<sup>2)</sup>。*Sall4* ヘテロマウスは約半数が致死となり、肛門形成不全、心室中隔欠損、および外脳症が見られた。よって *Sall4* の量の減少によってこれらの症状が引き起こされることになる<sup>3)</sup>。加えてこれらの症状は *Sall1/Sall4* ダブルヘテロマウスにおいて重症化あるいはその頻度の増大が見られた。*Sall1* と *Sall4* の発現は神経、肛門、心筋において重なっており、*Sall1* と *Sall4* が結合することが免疫沈降により確認され、*Sall1* と *Sall4* が二量体を形成し器官形成に関与していることが示唆された。*Sall3* 欠失マウスは周産期致死であり咽頭や脊髄の発生に異常が見られる<sup>4)</sup>ほか、*Sall1* と *Sall3* のダブルノックアウトは親指が消失し、第 2, 3 指が融合して一見 3 本指となる<sup>5)</sup>。*Sall4* のトラップ変異体の報告も考慮すると、四肢や指の形成には *Sall1* に加え *Sall3* および *Sall4* が重要である。これらのように *Sall* ファミリーは単独もしくは協調して多くの器官形成に関与している。さらに *Sall4* は胚性幹細胞 (ES 細胞) の維持に必須であり、Mi2/NuRD 複合体と結合して分化関連遺伝子を抑制している<sup>3,6)</sup>。また Oct3/4, Sox2 等と転写因子ネットワークを形成して幹細胞を維持する機構も提唱されている<sup>7,8)</sup>。

ヒトにおいては、*SALL1* はタウンズブロックス症候群という多指症や腎臓、心臓、肛門の形成異常、聴覚、眼球運動異常等を示す常染色体優性遺伝の遺伝病を、ヒト *SALL4* はオキヒロ症候群というタウンズブロックス症候群と類似した症状を示す常染色体優性遺伝の遺伝病を引き起こす<sup>9,10)</sup>。ヒト *SALL1* の変異であるタウンズブロックス症候群は腎臓、心臓、肛門、四肢の形成異常、聴覚、眼球運動異常などを示すが、*Sall1* 欠失マウスでは腎臓欠損のみが認められる。これは *Sall1* の欠損部位による違いと考えられている。ヒト *SALL1* の変異は N 末端寄りに集中しており、実際、*Sall1* の N 末端側の短いタンパク質を発現するマウスではヒトの症状をほぼ再現できる<sup>11)</sup>。上述のように *Sall1* と *Sall4* が二量体を形成すること、*Sall4* の減少によって肛門や心臓の症状が引き起こされることから、ヒト変異においては短い *SALL1* タンパク質が *SALL4* を含む他の *SALL* ファミリーの機能を抑制していると考えられる。タウンズブロックス症候群とオキヒロ症候群の症状が一部重複する理由もこのことに起因すると考えられる。つまりタウンズブロックス症候群は *SALL1* のドミナントネガティブ病であり、オキヒロ症候群は *SALL4* のハプロ不全病 (量の減少) であるということになる。

## 5. 尿管芽の伸長とキネシン Kif26b

前述のように、後腎の発生は尿管芽がウォルフ管から後腎間葉へと伸長することによって開始される。*Sall1* 欠失マウスの解析から *Sall1* はこの過程において必須であることが示されている。我々は *Sall1* 遺伝子座に GFP (緑色蛍光タンパク質) をノックインしたマウスを作製し、マイクロアレイによって後腎間葉で発現する新規遺伝子の探索を行った。これによって単離されたのがキネシンファミリーに属する Kif26b である<sup>12)</sup>。キネシンはモータードメインを持ち微小管に沿って物質の輸送を行い、オルガネラ輸送、鞭毛内輸送、および細胞シグナル伝達を含む多くのプロセスに関与している。Kif26b は後腎間葉にのみ発現しており、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイなどにより *Sall1* の直接の下流標的であることが示された。この Kif26b の欠失マウスは、*Sall1* の欠失と同様に生後 24 時間以内に死亡し、腎臓の欠失もしくは低形成が見られた。胎生 11.5 日目においては、尿管芽は形成されているものの後腎間葉へは伸長しきれておらず、後腎間葉での Gdnf (Glial-cell-line-derived neurotrophic factor) の発現が減少していた。また Kif26b/Gdnf 二重ヘテロマウスはそれぞれの遺伝子のヘテロよりも腎臓の症状が重く、Kif26b と Gdnf に遺伝学的関連があることが示された。GDNF は TGF- $\beta$  (transforming growth factor) の一種であり、後腎間葉から分泌されて、尿管芽を引き寄せる重要な液性因子である。Gdnf は、尿管芽の細胞表面に存在する受容体である Ret とその共受容体 Gfr $\alpha$ 1 (Gdnf-family receptor- $\alpha$ 1) にシグナルを伝える。実際、Gdnf-Ret/Gfr $\alpha$ 1 系のシグナル伝達を欠失したマウスでは尿管芽の発芽あるいは伸長が起らない<sup>13)</sup>。Gdnf の発現は Pax2 (paired box gene 2), Eyal (eyes absent homolog 1), Six1/4 (sine oculis-related homeobox 1/4 homolog), Hox11 といった転写因子によって制御されており、特に Hox11/Eyal/Pax2 が複合体を形成し Gdnf の発現を直接的に制御している<sup>14)</sup> (図 2)。しかし、Kif26b のノックアウトマウスにおいてはこれらの転写因子の発現の異常は観察されなかった。Gdnf の発現維持に関与している他の経路としては、Nephronectin (Npnt) と Integrin $\alpha$ 8 (Itga8) がある。Nephronectin は尿管芽細胞から産生される細胞外基質であり、間葉細胞表面に発現する Integrin $\alpha$ 8 はその受容体である。Nephronectin と Integrin $\alpha$ 8 をそれぞれ欠失させると、Gdnf の発現が維持されず腎臓形成が障害される<sup>15)</sup>。Kif26b のノックアウトマウスでは後腎間葉での Integrin $\alpha$ 8 の発現が見られず、これが Gdnf の維持不全、ひいては腎臓無形成につながっていくと考えられた<sup>11)</sup>。また、尿管芽に接する後腎間葉細胞同士は N-cadherin によって側面で結合しているが、Kif26b 欠失マウスではこれも見られなかった。我々は Kif26b が細胞骨格を介し

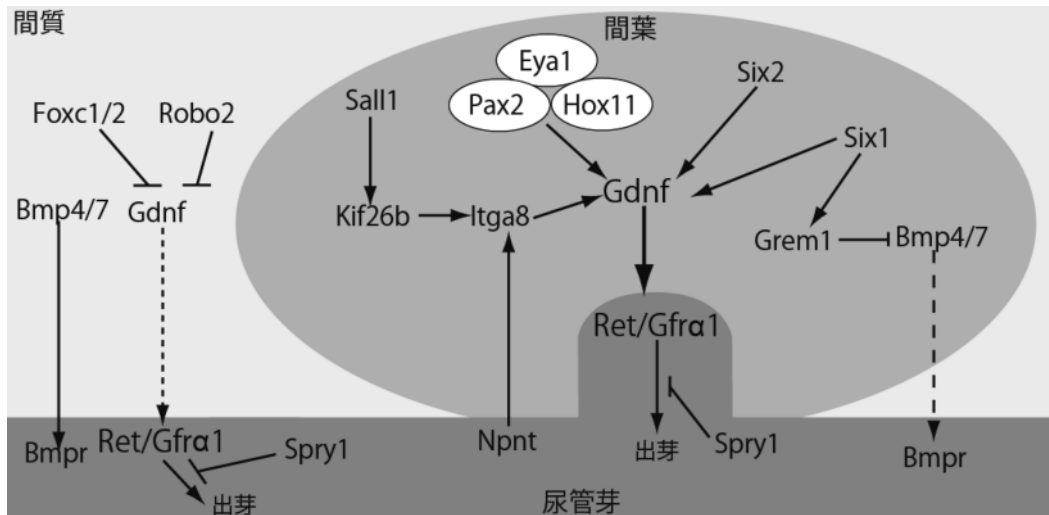


図2 尿管芽出芽の分子機構

尿管芽の出芽に関わる遺伝子の関係を示した。後腎間葉，間質，尿管芽がそれぞれ相互作用している。矢印で示した遺伝子は促進的に働き，T字で示した遺伝子は抑制的に働く。Itga8, Integrin $\alpha$ 8; Npnt, Nephronectin, Grem1, Gremlin1; Spry1, Sprouty1

て後腎間葉の形を制御するという仮説を立てたが，実際に Kif26b を培養細胞に過剰発現するだけで，形態が変化し N-cadherin 依存性の凝集が起こった。さらに Kif26b が非筋肉型ミオシン重鎖タイプ II との相互作用によりこの凝集を制御することも判明した。よって Kif26b はアクトミオシンと相互作用して，これらが裏打ちをする N-cadherin や Integrin $\alpha$ 8 の局在や発現を間接的に制御しているのではないかと考えられる。以上から Sall1 による Kif26b の発現によって Integrin $\alpha$ 8 の局在が制御され，最終的に Gdnf の発現が維持されるという経路が示された<sup>12)</sup>。

これとは逆に，尿管芽の発芽や伸長の抑制に働く遺伝子として Slit2, Robo2, Foxc1/2, Sprouty1 (Spry1), Bmp4 などが知られている。初期の腎臓発生では Gdnf の受容体である Ret, Gfra1 はウォルフ管の全域で発現しており，Gdnf の発現によって異所性に尿管芽の発芽が起きうため，Gdnf の発現は厳密に制御されている。主にウォルフ管から分泌される Slit2 と，その受容体で後腎間葉に強く発現している Robo2 の変異マウスにおいては，ウォルフ管から複数の尿管芽の伸長が見られる<sup>16)</sup>。加えて後腎間葉で発現する転写因子 Foxc1/2 のノックアウトマウスにおいても重複腎や異所性のウォルフ管が形成される。これは Slit2, Robo2, Foxc1/2 のいずれの変異マウスでも，本来の後腎領域よりも Gdnf の発現が頭側に拡大することによって考えられる。Robo2 による Gdnf 抑制機構は不明であるが，Foxc1/2 は Eya1 の発現を抑制し Gdnf の発現も抑制するという調節機構が推察されている<sup>17)</sup>。受容型のチロシンキナーゼ阻害因子である Sprouty1 の遺伝子変異体でも上記の遺伝子同様に異所性に尿管形成が複数見られる。Sprouty1 はウォルフ管全体に発現が見られるが，特に尿管

芽を形成する尾側で強く発現しており，Ret 下流の細胞内シグナルを阻害することにより，尿管芽形成を阻害する<sup>18)</sup>。

Bmp4/7 はウォルフ管や尿管芽を包む間葉組織で広く発現が観察され，Bmp4 のヘテロマウスにおいて尿管芽の形成異常が見られる<sup>19)</sup>。また，胎生 10 日目の腎臓領域に Bmp4 を加えて器官培養すると尿管芽の発芽や分岐が抑制される。また Bmp4 の阻害因子である Gremlin1 (Grem1) を欠損したマウスでは尿管芽の形成は見られるが後腎間葉に尿管芽が侵入することができず腎臓を欠失したマウスが観察され<sup>20)</sup>，Bmp4 のヘテロもしくは Bmp7 をノックアウトすることで症状が回復する<sup>21,22)</sup>。これらのことより Bmp4/7 は尿管芽の発芽を抑制し，Gremlin1 はその Bmp4/7 活性を抑制することによって，尿管芽の伸長を促進することになる。また，Gremlin1 のノックアウトマウスにおいても Gdnf および Ret が発現していることから，Bmp による尿管芽の発芽・分岐の抑制は正に制御する遺伝子群の抑制によるものではなく別の機構によるものと考えられる。

## 6. 胎生期に存在するネフロン前駆細胞

糸球体上皮細胞 (ポドサイト，足細胞) や尿細管などネフロン構成細胞のほとんどが後腎間葉から発生するため，この中にネフロン前駆細胞が存在するのではないかと我々は仮定した。実際，後腎間葉を個々の細胞に解離し，分化誘導因子である Wnt4 を発現するフィーダー上で培養すると，1 個の間葉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した<sup>23)</sup>。さらに Sall1 遺伝子座に GFP をノックインしたマウスの GFP 強陽

性画分からのみ Wnt4 依存性のコロニーの形成が観察された。さらにこの Sall1-GFP 高発現細胞を再凝集させ器官培養を行うと三次元構造を再構成し、糸球体や尿細管様の構造が見られた。よって Sall1 を高発現している間葉細胞はポドサイトや尿細管上皮への分化能を持った多能性のネフロン前駆細胞であると言える。また McMahon らは転写因子 Six2 の制御下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを作製して細胞系譜解析を行い、Six2 を発現する後腎間葉中にネフロン前駆細胞が存在していることを *in vivo* で示している<sup>24)</sup>。これは間葉細胞の中にネフロン前駆細胞が存在しているという我々の主張を裏付ける結果となっている。また、Six2 のノックアウトマウスでは、後腎間葉で Wnt4 の発現領域の拡大が起こることによって間葉細胞の早熟な上皮化が起こり、前駆細胞が減少して腎臓の低形成を示す<sup>25)</sup>。よって Six2 は Wnt4 のシグナルを抑制することによりネフロン前駆細胞を未分化の状態で保っていると考えられる。前駆細胞で Sall1 が高発現している理由は不明であるが、おそらく ES 細胞における Sall4 と類似の機構が働いていると予測され、現在解析中である。また最近、尿管芽由来の FGF9 と後腎間葉由来の FGF20 が協調して、前駆細胞を維持しているという機構も報告された<sup>26)</sup>。しかし、ネフロン前駆細胞の自己複製は一過性にしか行われず、生後すぐに前駆細胞は失われてしまう。これが成体の腎臓が再生できない原因の一つとなっていると考えられる。ES 細胞の自己複製機構はかなり明らかになっており、腎臓前駆細胞にも類似の機構が存在してもよいが、少なくとも ES 細胞とは異なる転写因子ネットワークが存在するはずである。この解明が急務であり、応用にも有意義であろう。

## 7. 後腎間葉の上皮化と領域化

後腎間葉中のネフロン前駆細胞は、尿管芽からの Wnt9b の刺激を受けて Wnt4 を分泌し、これがネフロン前駆細胞

自身に働いて、上皮への転換が起きる (図 3)<sup>27,28)</sup>。これら Wnt の下流では、 $\beta$  カテニン経路が必須であることが示されているが、 $\beta$  カテニンを後腎間葉で活性化するだけでは完全な上皮化は起こらない<sup>29)</sup>。最近、Wnt4 の刺激によって後腎間葉内の  $Ca^{2+}$  濃度が上昇すること、 $Ca^{2+}$  を増加させると間葉の上皮化が起こることから、Wnt の下流で  $Ca^{2+}$  経路が働くことが示唆されている<sup>30)</sup>。

Wnt の刺激により間葉の上皮化が起こった後、上皮には領域化が進行する。つまり近位-遠位軸が確立し、ポドサイト、近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管が形成される。この過程には Notch2 が必須でありこれを欠失するとポドサイトおよび近位尿細管が形成されない<sup>31)</sup>。Notch は一回膜貫通型受容体でありリガンドである Jagged の結合により活性化され細胞内ドメインの Notch intracellular domain (NICD) が  $\gamma$ -secretase によって切断される。NICD は核内に移行することで標的遺伝子の転写を促進する。またこの NICD の切断に必要な細胞膜タンパク質 Presenilin の欠失マウスにおいては哺乳類が持つ Notch1~4 のすべてのシグナルが阻害され、マウス腎臓においては S 字体のほぼ完全な欠失を示し、近位尿細管、糸球体上皮の形成は行われない<sup>32)</sup>。そこで我々は Six2 陽性のネフロン前駆細胞で Notch2 を活性化できるマウスを作製した<sup>33)</sup>。Notch2 が近位-遠位軸を決定するのであれば、ポドサイトや近位尿細管などの近位ネフロンが過剰に形成されるはずである。しかし実際にはそれは起こらず、むしろ顕著な腎臓低形成が観察された。ネフロン前駆細胞が Six2 の低下に伴い枯渇し、Wnt4 が上昇して早熟な上皮化が起こるといふ Six2 欠失マウスと同じ現象が生じるためであった。よって Notch2 は、近位-遠位軸の決定ではなく、決定後の維持に関わることが示唆された<sup>33)</sup>。腎臓の再生を視野に入れた場合、Notch2 を活性化するだけでは前駆細胞を近位ネフロンに誘導するのは困難であるということでもあり、近位-遠位軸決定機構の解明が必須である。

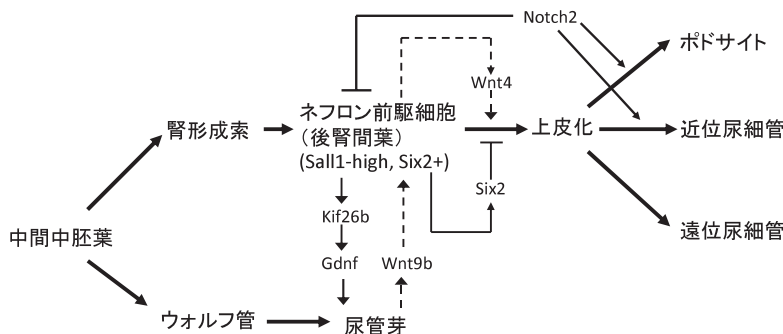


図 3 腎臓発生の系統図

腎臓は中間中胚葉から発生し、後腎は腎形成索の後端から形成される後腎間葉とウォルフ管（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。後腎間葉中に Sall1 強陽性、Six2 陽性のネフロン前駆細胞が存在する。

## 8. 糸球体の形成機構

糸球体は血液を濾過することで原尿を生成する装置であり、腎臓の重要な機能の一つを担っている。糖尿病や慢性腎炎などではこの糸球体が主に傷害される。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嚢上皮の二層の上皮から構成されている。糸球体は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、ポドサイトという三層構造になっており、血液はこの構造によって濾過され原尿としてボウマン嚢に放出される。ポドサイトは後腎間葉に、毛細血管は血管内皮細胞に由来する細胞である(図4A)。しかし、この血管内皮細胞が腎臓内部で発生した内在性のものかそれとも外部の細胞が侵入したものかは不明である。この糸球体の発生過程はポドサイトが血管前駆細胞の分化を誘導する。ポドサイトから誘導を受けた血管内皮はPDGF-B (platelet-derived growth factor, B polypeptide)を分泌し、その受容体PDGFR- $\beta$ を発現する細胞が分化することでメサンギウム細胞が形成される(図4B)<sup>34</sup>。

ポドサイトは基底膜に向かい多数の足突起を出している。この多数の足突起同士の間には、ネフリン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ふるいを形成している(図4C)。これによって血液に含まれる大切なタンパク質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ネフローゼ症候群が引き起こされる<sup>35</sup>。基底膜も細かい分子ふるいを形成しており、糸球体は二重のメッシュをもつことになる。このようにポドサイトは血管からのタンパク質の漏出を防いでいる重要な細胞である。

## 9. 腎臓の起源

今まで述べてきたように、腎臓発生は間葉と尿管芽の相互作用から始まり、これら二つが腎臓の管腔構造(糸球体や尿管、集合管)を形成するが、血管内皮は間葉細胞の間に別系統の細胞として存在する。また間葉の外側にはFoxd1陽性の間質細胞が存在し、ここから管腔構造や血管の隙間を埋める間質が派生する<sup>36,37</sup>。糸球体のメサンギウム細胞も間質に由来する。よって腎臓には間葉、尿管芽、血管、間質という少なくとも四つの細胞集団が存在することになり、間質と尿管芽の相互作用も報告されている。しかし発生を遡ると、これらはOsr1陽性の中間中胚葉から派生することが明らかになっている。

マウスでは胎生7.5日目に原始線条が出現し中胚葉の形成が行われ、胎生8.5日目に中胚葉は神経管に隣接する沿軸中胚葉、神経管から最も遠位には側板中胚葉が形成されこれらの間に中間中胚葉が生じる。中胚葉から中間中胚葉

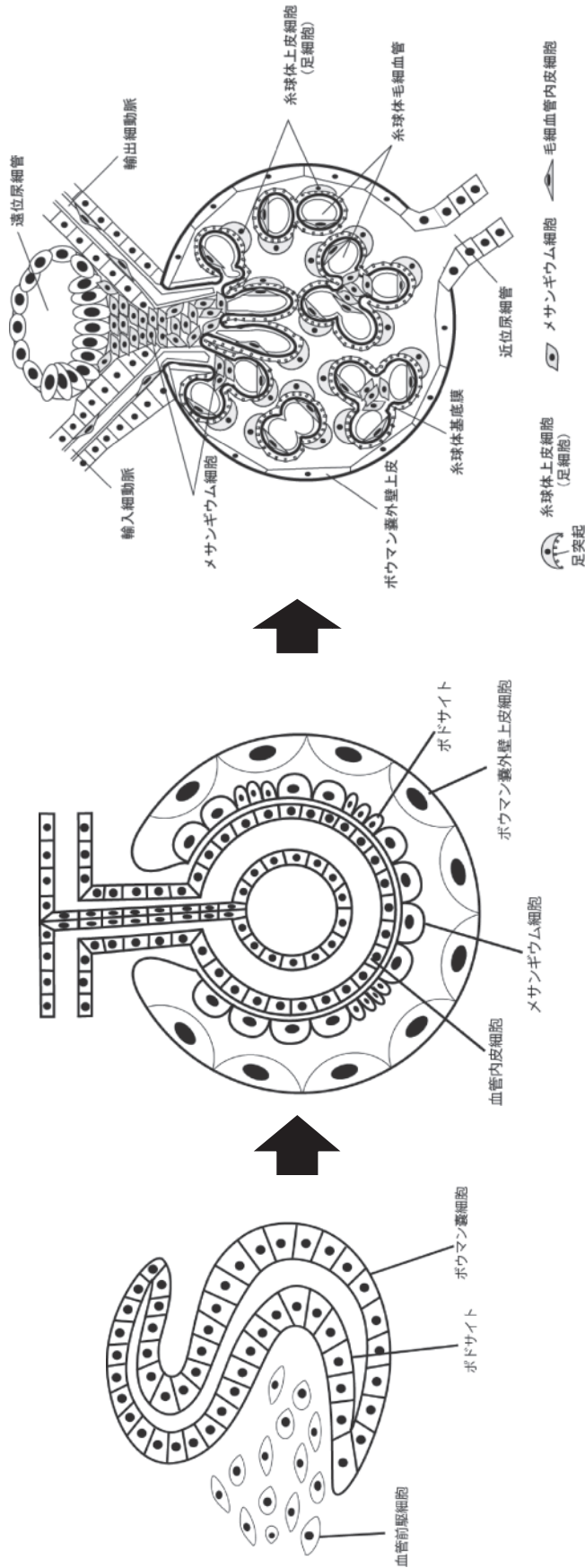
への分化にはBmpが関与していると考えられている。アフリカツメガエルの中胚葉を高濃度のBmp4で誘導すると血液が、中濃度では腎臓が、低濃度では筋や脊索が形成される<sup>38</sup>。また、ニワトリにおいて高濃度のBmp2は中胚葉から側板中胚葉を形成させ、低濃度では中間中胚葉を誘導することが示されている<sup>39</sup>。

中間中胚葉では前述したOsr1のほかにLim1, Pax2/8などの転写因子が発現している。この中でOsr1は最も早くに発現する転写因子で、胎生8.0日目以降の間葉に発現が見られる。また、Osr1CreERマウスの細胞系譜追跡により胎生7.5日目から9.5日目までのOsr1陽性細胞は後腎間葉および尿管芽へ寄与しており、胎生10.5日目から胎生11.5日目のOsr1陽性細胞は後腎間葉に分化していることが示されている<sup>40</sup>。加えてOsr1ノックアウトマウスにおいてはウォルフ管や中腎の形成に異常が見られるほか後腎間葉の欠失が見られる<sup>41</sup>。これらのことよりOsr1は腎臓系統の発生に必須の遺伝子である。またPax2/8のダブルノックアウトマウスでは前腎から後腎のすべての腎尿路系形成の欠損を生じる<sup>42</sup>。加えてニワトリでPax2を中間中胚葉で異所性に発現させると腎上皮に分化することが示されている<sup>42</sup>。よってPax2/8はOsr1と並んで腎臓形成の最も初期に働く遺伝子群に含まれる。Pax2/8の下流ではGata3がRet遺伝子の下流で働きウォルフ管形成に関与することが示唆されている<sup>43</sup>。さらにLim1のノックアウトマウスにおいてはウォルフ管の形成が途中までは進行するが、最終的には後腎の欠損が起こる<sup>44</sup>。しかし、このマウスにおいてはPax2の発現が見られることからLim1はPax2の下流で働いていると考えられる。

## 10. 腎臓誘導の試み

ES細胞/iPS細胞からネフロン前駆細胞を誘導するには、まず中間中胚葉の誘導を目指すことになる。我々はマウスES細胞のOsr1の遺伝子座にGFPをノックインし、アクチビンやレチノイン酸等を使用することによって、Osr1を発現する細胞群を誘導することに成功している(未発表)。また長船らはヒトiPS細胞のOSR1遺伝子座にGFPをノックインして、GFP陽性の細胞を誘導している(私信)。しかし、これら誘導された細胞は二次元であり、三次元構造をとった上で初めてその機能を示すことができる。よって三次元構造をもった組織を形作ることが重要である。これまでに述べてきたように腎臓は後腎間葉と尿管芽の相互作用によって構成されている。Sa11を高発現するネフロン前駆細胞を再凝集させて培養すると、三次元構造が再構築されるが、腎臓本来の構造には及びもつかない。これは尿管芽との相互作用が欠如するためであると考えられ、この過程に働く分子機構の解明が急務である。

また、辻らは、発生期の歯原基を間葉と上皮組織に分



系球体 概略図

C

B

A

S字体 概略図

図4 糸球体発生および構造

(A) 糸球体はS字体のポドサイトの分泌するVEGFによって刺激を受けた血管前駆細胞が糸球体内皮に分化し糸球体毛細血管を形成する。(B) さらに糸球体内皮の分泌するPDGF-BによってPDGFR-βを発現している前駆細胞が刺激を受けてメサンギウム細胞になる。この後、ポドサイトが足を伸ばし網目状の構造を形成する。(C) 原尿は血液が糸球体毛細血管を通る際に糸球体毛細血管とポドサイト(足細胞)の間から押し出されることのできる。濾過された原尿はポウマン嚢から近位尿管を通り様々な再吸収が行われ尿となる。

け、それぞれを単一の細胞にしたあと再凝集させ培養することによって歯原基の再構成を行っている<sup>45)</sup>。これは間葉と上皮の相互作用を利用しており、この手法の腎臓への応用が期待される。

また血液を濾過して尿を生成するという腎臓の機能を考えたとき、血管と腎管との接続は極めて重要である。ネフロン前駆細胞に由来する糸球体足細胞（ポドサイト）は血管内皮増殖因子（VEGF）を分泌し、これが糸球体血管内皮を引き寄せることがノックアウトマウスの結果から明らかになっている<sup>46)</sup>。またES/iPS細胞から血管への誘導法は確立されている<sup>47)</sup>。よってポドサイトが誘導できれば血管を引き寄せて糸球体を作ることは理論的に可能であろう。腎動脈が腎門部を通して皮質部で糸球体に注ぎ、その後皮質/髄質で対交流系を形成するような *in vivo* の血管走行を模倣するのは現在の知識では困難である。しかし臨床的にはわずかな糸球体濾過量を確保するだけでも透析から離脱できるはずである。

## 11. ノックアウト動物のニッチとしての可能性

以上のような正攻法のアプローチには発生学的知識の進展が必須であるが、それを待たずに、動物の胎仔を使って *in vivo* で腎臓を作ろうとする試みも見られる。横尾らは *Gdnf* を発現するヒト間葉系幹細胞をラットの発生期腎臓領域に打ち込み、全胚培養ついで器官培養することによって、ヒトとラットの細胞が混じり合った腎臓を作り出している。それを体網に移植することによって少量の尿が形成されたとしている<sup>48)</sup>。今後ホストの細胞をどう除去するかが課題である。

中内らは、*Sall1* 欠失胚盤胞にマウスES細胞を注入することによって、ドナー由来の後腎間葉を作製している<sup>49)</sup>。*Sall1* が欠失した細胞は間葉形成には寄与しないので、すべてドナー由来となるわけである。しかし尿管芽や血管はホスト由来であり、今後これらすべてをドナー由来にしなければならない。また臨床応用を目指すにはヒトiPS由来の腎臓をブタ内部に作製する必要があり、種を超えたキメラ作製が可能にならなければならない。最近中内らは *Pdx1* 欠失マウス胚盤胞にラットiPS細胞を注入することによって、マウス体内でラット由来の膵臓を作製することに成功しており、大きな前進であろう<sup>50)</sup>。ヒト由来の細胞が全身臓器に大きく寄与した場合に倫理的取り扱いをどうするかといった課題も克服しなければならないが、ノックアウト動物を一種のニッチとして利用するという発想は興味深い。

## 12. おわりに

この10数年で腎臓発生のメカニズムがかなり解明されてきた。今後も腎臓の部位特異的ノックアウトマウスの作

製などから新たな分子機構の解明が期待される。本稿では主に順方向の分化誘導について述べたが、成体の腎臓に存在する細胞を前駆細胞へとリプログラミングすることも考えられる。実際、膵臓、神経、心筋での報告が相次いでおり、腎臓で実現する日も近いと期待される。さらに遺伝子工学は大型動物に及んでおり、ノックアウトラットやノックアウトブタが作製されつつある。腎臓形成機構の種による違いが明らかになるとともに、再生のニッチとしてブタを使うという構想も現実味を帯びている。未知のウイルスや倫理的問題など越えなければならない課題も多いが、今後の発展に期待したい。

## 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., & Yokota, T. (2001) *Development*, **128**, 3105-3115.
- 2) Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., & Nishinakamura, R. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 62-69.
- 3) Sakaki-Yumoto, M., Kobayashi, C., Sato, A., Fujimura, S., Matsumoto, Y., Takasato, M., Kodama, T., Aburatani, H., Asashima, M., Yoshida, N., & Nishinakamura, R. (2006) *Development*, **133**, 3005-3013.
- 4) Parrish, M., Ott, T., Lance-Jones, C., Schuetz, G., Schwaeger-Nickolenko, A., & Monaghan, A.-P. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7102-7112.
- 5) Kawakami, Y., Uchiyama, Y., Rodriguez, Esteban, C., Inenaga, T., Koyano-Nakagawa, N., Kawakami, H., Marti, M., Kmita, M., Monaghan-Nichols, P., Nishinakamura, R., & Izpisua Belmonte, J.-C. (2009) *Development*, **136**, 585-594.
- 6) Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H., & Nishinakamura, R. (2009) *Stem Cells*, **27**, 796-805.
- 7) Zhang, J., Tam, W.-L., Tong, G.-Q., Wu, Q., Chan, H.-Y., Soh, B.-S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L., Ng, H.-H., Lufkin, T., Robson, P., & Lim, B. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1114-1123.
- 8) Lim, C.-Y., Tam, W.-L., Zhang, J., Ang, H.-S., Jia, H., Lipovich, L., Ng, H.-H., Wei, C.-L., Sung, W.-K., Robson, P., Yang, H., & Lim, B. (2008) *Cell Stem Cell*, **3**, 543-554.
- 9) Kohlhasse, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U., & Engel, W. (1998) *Nat. Genet.*, **18**, 81-83.
- 10) Kohlhasse, J., Heinrich, M., Schubert, L., Liebers, M., Kispert, A., Laccone, F., Turmpenny, P., Winter, R.-M., & Reardon, W. (2002) *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2979-2987.
- 11) Kiefer, S.-M., Ohlemiller, K.-K., Yang, J., McDill, B.-W., Kohlhasse, J., & Rauchman, M. (2003) *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2221-2227.
- 12) Uchiyama, Y., Sakaguchi, M., Terabayashi, T., Inenaga, T., Inoue, S., Kobayashi, C., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakagata, N., Sato, Y., Sekiguchi, K., Miki, H., Araki, E., Fujimura, S., Tanaka, S.-S., & Nishinakamura, R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9240-9245.
- 13) Costantini, F. & Kopan, R. (2010) *Dev. Cell*, **18**, 698-712.
- 14) Gong, K.-Q., Yallowitz, A.-R., Sun, H., Dressler, G.-R., &



- Wellik, D.-M. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 7661–7668.
- 15) Linton, J.-M., Martin, G.-R., & Reichardt, L.-F. (2007) *Development*, **134**, 2501–2509.
  - 16) Grieshammer, U., Le, Ma., Plump, A.-S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., & Martin, G.R. (2004) *Dev. Cell*, **6**, 709–717.
  - 17) Kume, T., Deng, K., & Hogan, B.-L. (2000) *Development*, **127**, 1387–1395.
  - 18) Basson, M.A., Akbulut, S., Watson-Johnson, J., Simon, R., Carroll, T.J., Shakya, R., Gross, I., Martin, G.-R., Lufkin, T., McMahon, A.-P., Wilson, P.-D., Costantini, F.-D., Mason, I.-J., & Licht, J.-D. (2005) *Dev. Cell*, **8**, 229–239.
  - 19) Miyazaki, Y., Oshima, K., Fogo, A., Hogan, B.-L., & Ichikawa, I. (2000) *J. Clin. Invest.*, **105**, 863–873.
  - 20) Michos, O., Panman, L., Vintersten, K., Beier, K., Zeller, R., & Zuniga, A. (2004) *Development*, **131**, 3401–3410.
  - 21) Michos, O., Gonçalves, A., Lopez-Rios, J., Tietze, E., Naillat, F., Beier, K., Galli, A., Vainio, S., & Zeller, R. (2007) *Development*, **134**, 2397–2405.
  - 22) Gonçalves, A. & Zeller, R. (2011) *PloS One*, **6**, e19370.
  - 23) Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M., & Nishinakamura, R. (2006) *Development*, **133**, 151–161.
  - 24) Kobayashi, A., Valerius, M.-T., Mugford, J.-W., Carroll, T.-J., Self, M., Oliver, G., & McMahon, A.-P. (2008) *Cell Stem Cell*, **3**, 169–181.
  - 25) Self, M., Lagutin, O.-V., Bowling, B., Hendrix, J., Cai, Y., Dressler, G.-R., & Oliver, G. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5214–5228.
  - 26) Barak, H., Huh, S.-H., Chen, S., Jeanpierre, C., Martinovic, J., Parisot, M., Bole-Feysot, C., Nitschké, P., Salomon, R., Antignac, C., Ornitz, D.M., & Kopan, R. (2012) *Dev. Cell*, **22**, 1191–1207.
  - 27) Carroll, T.-J., Park, J.-S., Hayashi, S., Majumdar, A., & McMahon, A.-P. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 283–292.
  - 28) Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., & McMahon, A.-P. (1994) *Nature*, **372**, 679–683.
  - 29) Park, J.S., Valerius, M.T., & McMahon, A.-P. (2007) *Development*, **134**, 2533–2539.
  - 30) Tanigawa, S., Wang, H., Yang, Y., Sharma, N., Tarasova, N., Ajima, R., Yamaguchi, T.-P., Rodriguez, L.-G., & Perantoni, A.-O. (2011) *Dev. Biol.*, **352**, 58–69.
  - 31) Cheng, H.-T., Kim, M., Valerius, M.-T., Surendran, K., Schuster-Gossler, K., Gossler, A., McMahon, A.-P., & Kopan, R. (2007) *Development*, **134**, 801–811.
  - 32) Wang, P., Pereira, F.-A., Beasley, D., & Zheng, H. (2003) *Development*, **130**, 5019–5029.
  - 33) Fujimura, S., Jiang, Q., Kobayashi, C., & Nishinakamura, R. (2010) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **21**, 803–810.
  - 34) Soriano, P. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 1888–1896.
  - 35) Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.-E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A., & Tryggvason, K. (1998) *Mol. Cell*, **1**, 575–582.
  - 36) Humphreys, B.-D., Valerius, M.T., Kobayashi, A., Mugford, J. W., Soeung, S., Duffield, J.-S., McMahon, A.-P., & Bonventre, J.-V. (2008) *Cell Stem Cell*, **2**, 284–291.
  - 37) Humphreys, B.-D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T.-E., Nowlin, B.-T., Bonventre, J.-V., Valerius, M.-T., McMahon, A.-P., & Duffield, J.-S. (2010) *Am. J. Pathol.*, **176**, 85–97.
  - 38) Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Blumenstock, C., & Niehrs, C. (1997) *Development*, **124**, 2325–2334.
  - 39) James, R.-G. & Schultheiss, T.-M. (2005) *Dev. Biol.*, **288**, 113–125.
  - 40) Mugford, J.W., Sipilä, P., McMahon, J.A., & McMahon, A.P. (2008) *Dev. Biol.*, **324**, 88–98.
  - 41) James, R.G., Kamei, C.N., Wang, Q., Jiang, R., & Schultheiss, T.-M. (2006) *Development*, **133**, 2995–3004.
  - 42) Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubüser, A., & Busslinger, M. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 2958–2970.
  - 43) Grote, D., Souabni, A., Busslinger, M., & Bouchard, M. (2006) *Development*, **133**, 53–61.
  - 44) Tsang, T.-E., Shawlot, W., Kinder, S.-J., Kobayashi, A., Kwan, K.-M., Schughart, K., Kania, A., Jessell, T.-M., Behringer, R.-R., & Tam, P.-P. (2000) *Dev. Biol.*, **223**, 77–90.
  - 45) Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y., & Tsuji, T. (2007) *Nat. Methods*, **4**, 227–230.
  - 46) Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H.-P., Kikkawa, Y., Miner, J.-H., & Quaggin, S.-E. (2003) *J. Clin. Invest.*, **111**, 707–716.
  - 47) Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., & Nishikawa, S. (2000) *Nature*, **408**, 92–96.
  - 48) Yokoo, T., Fukui, A., Ohashi, T., Miyazaki, Y., Utsunomiya, Y., Kawamura, T., Hosoya, T., Okabe, M., & Kobayashi, E. (2006) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**, 1026–1034.
  - 49) Usui, J., Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Knisely, A.-S., Nishinakamura, R., & Nakauchi, H. (2012) *Am. J. Pathol.*, **180**, 2417–2426.
  - 50) Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y.-S., Usui, J., Knisely, A.-S., Hirabayashi, M., & Nakauchi, H. (2010) *Cell*, **142**, 787–799.