

特集：腎構成細胞の細胞学的特性—新しい知見を含めて

腎臓における幹細胞の細胞特性

阪口 雅司 西中村 隆一

はじめに

幹細胞とは自己複製能および多分化能を持つ細胞と定義される。腎臓においてこの2つの特徴を有する厳密な意味での幹細胞を証明した論文はほとんどない。よって前駆細胞と表記したほうが正確であろう。本稿では、胎生腎における前駆細胞の存在とその特性を中心に概説し、後半で成体腎における幹細胞について述べる。

後腎間葉における腎臓前駆細胞

哺乳類における腎臓は、後腎間葉と尿管芽の相互作用から始まる。尿管芽の周りに間葉細胞が凝集し、それが上皮化してC字体、S字体といわれる状態を経て、糸球体、近位および遠位尿細管が発生する。尿管芽は分岐を重ね、集合管、尿管となる。つまり、腎臓としての機能を司るそのかなりの部分が後腎間葉から発生することになり、尿細管には10種を超える細胞が存在するため、後腎間葉は多能性をもった前駆細胞集団とも言える。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、発生を進ませた場合、ネフロン各部分の上皮にLacZ発色が見られることが報告されている。これは後腎間葉に前駆細胞が存在することを示唆している¹⁾。しかしこれまで、胎生腎から多分化能を有する腎臓前駆細胞を単離し、単一細胞レベルで解析することは成功していなかった。

腎臓前駆細胞と Sall1 高発現細胞

Wnt4 のノックアウトマウスでは間葉が凝集するところで発生が止まり、それ以降の上皮構造を作らない²⁾。また

Wnt4 の発現する細胞上で後腎間葉を培養すると管腔形成が起こる³⁾。よって、後腎間葉が上皮化するにあたって、Wnt4 は必要十分であると言える。さらに、尿管芽から分泌される液性因子 Wnt9b が Wnt4 の上流であることも証明されている⁴⁾。そこでわれわれは、この Wnt4 を用いて多分化能を有する腎臓前駆細胞を同定することを試みた。

Wnt4 を発現するフィーダー上で培養すると、1個の細胞からコロニーが形成され、このコロニーは糸球体、近位尿細管、遠位尿細管などのマーカーを発現した。これは最初にまかれた1個の細胞が多系統に分化したことを示している。

Sall1 はわれわれが単離したジンクフィンガー型の核内因子で、そのノックアウトマウスは腎臓を欠損する。Sall1 は後腎間葉に発現するので、この遺伝子座に GFP を導入したマウスを作製した^{5,6)}。このマウスの後腎間葉中の GFP が高発現する分画のみからコロニーが形成され、さらに細胞群を再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を再構築できることを示した⁷⁾。つまり、多系統に分化する前駆細胞は間葉中の Sall1 が高発現する集団内に存在するということである。次にわれわれは、Sall1 の腎臓前駆細胞での役割を解析するために、Sall1 ノックアウトマウスからコロニー形成を行った。コロニー形成数や上皮への分化においては、顕著な異常はみられなかった。しかし、Sall1 ノックアウトマウスからのコロニーの大きさが野生型に比べ小さいことから、Sall1 は腎臓前駆細胞の増殖あるいは生存に必須であると考えられる。Sall ファミリー遺伝子の一つである Sall4 は、ES 細胞の増殖に関わっていることがわかっており、Sall ファミリー遺伝子は、おそらく共通して幹細胞や前駆細胞の増殖に関わる役割を担っていると考えられる⁸⁾。またコロニーアッセイは、腎臓前駆細胞の同定や腎臓発生の分子メカニズムの解析に有用であろう。

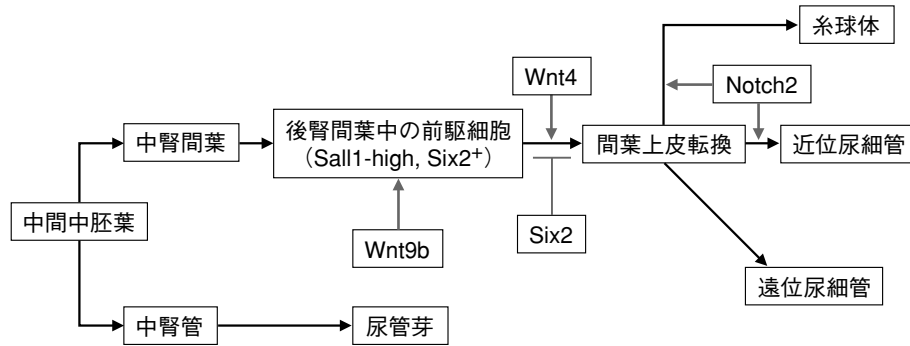


図 腎臓前駆細胞からみた腎臓発生

腎臓前駆細胞と Six2 遺伝子

Six ホメオボックス遺伝子は Six ドメインとホメオドメインを有し、それらは DNA に特異的に結合するうえで重要であると考えられている。Six ファミリー遺伝子では 6 個がマウスやヒトで同定されているが、このなかで Six2 は尿管芽先端周囲を取り囲む未分化な後腎間葉の領域に発現する。これは、尿管芽の幹部分周囲に発現を認める Wnt4 と相反した発現パターンを示している。実際 Six2 のノックアウトマウスでは、Wnt4 や Wnt のアゴニストである sFRP2 が異所性に上昇し、そこに上皮化が生じる⁹⁾。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。Sall1-GFP が高発現する細胞分画において Six2 の発現が確認できることから、Sall1 が高発現し Six2 が発現する間葉細胞は恐らく前駆細胞集団群であり、Six2 はネフロン形成のための前駆細胞を維持する役割を担っていると考えられる(図)。

腎臓前駆細胞と Wnt シグナル

上述の通り、Wnt9b や Wnt4 によって、間葉の前駆細胞は上皮に転換して管構造を形成し、S 字体と呼ばれる構造を経て、最終的には糸球体や尿管へと分化していく。尿管芽からの液性因子 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(図)。また、Wnt の下流で働く β -カテニンも重要な役割を果たしていることがわかっている。 β -カテニンの欠失マウスでは、Six2 陽性の前駆細胞領域の上皮化が障害される。逆に 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¹⁰⁾。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。

ネフロン形成における Notch2

未分化間葉細胞は Wnt4 によって上皮に転換して管構造を形成する。その後糸球体や尿管への運命決定に Notch が働いている。Notch2 を腎臓特異的に欠失させると、Wnt4 の作用によって上皮化は正常に進むものの、糸球体と近位尿管というネフロンの近位部が欠損する¹¹⁾。ただ詳細な解析から、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ことがわかっている(図)。これらの更なる解析が進めば、腎臓前駆細胞を誘導し腎臓再生を行う糸口になると考える。

内皮細胞の起源

形成された糸球体上皮細胞は vascular endothelial growth factor (VEGF) を分泌し、血管前駆細胞から血管内皮への分化を誘導する¹²⁾。また、血管内皮細胞は PDGF-B (platelet-derived growth factor, B polypeptide) を分泌し、血管前駆細胞からメサンギウムへの分化を促す。これらの過程で糸球体が形成されていく。つまり、血管内皮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間葉由来のものかについては議論の多いところである。胎生期の後腎間葉に VEGF を添加する、あるいは低酸素血症の状態ですら器官培養すると後腎間葉内で血管構築が促進されるため、血管内皮の前駆細胞は後腎間葉内にあるのではないかと考えられた¹³⁾。さらには後腎間葉を解離して培養すると血管内皮細胞が確認される¹⁴⁾。しかしこれらは、後腎間葉自体から血管内皮ができたというより、培養前の後腎間葉にすでに血管前駆細胞が混在していた可能性がある。実際に VEGF の受容体である Flk-1 陽性の内皮前駆細胞は、尿管芽が後腎間葉に侵入する胎生期 11.5 日目にはすでに

間葉を取り囲むように発現している¹⁵⁾。さらに内皮由来のマーカーとなる Flk1 や VE-cadherin は、後腎間葉の Sall 陰性分画に発現がみられるのに対して、Sall 高発現分画には発現がみられないことが確認された⁷⁾。このことから、少なくとも Sall1 高発現の細胞は糸球体足細胞や尿細管上皮など上皮の前駆細胞であり、内皮細胞の前駆細胞とは別物であると言える。

成体腎における幹細胞の存在について

上述の通り、胎生期の腎臓には後腎間葉に前駆細胞が存在するが、この間葉は成人になると消失してしまう。では、成体腎に幹細胞は存在するのだろうか。

腎尿細管は、傷害を受けて一過性の腎機能障害を呈しても、その後自然回復することが知られている。この急性尿細管傷害時の修復過程における機序として 1) 傷害されずに残った尿細管細胞による再生、2) 腎臓幹細胞による再生、3) 骨髄系幹細胞による再生¹⁶⁾、などがあげられる。ただ骨髄系細胞については、近年 *in vivo* の実験から、腎再生にはほとんど寄与していないのではないかと考えられている¹⁷⁾。傷害されずに残った尿細管細胞が、いったん脱分化を起こし分化増殖することで、傷害部の再生がなされているのではないかと報告¹⁸⁾があるが、残った分化した状態の尿細管細胞が傷害時に増殖することが可能で、傷害尿細管に再分布しているのではないかと¹⁹⁾など議論もあり、まだはっきりした見解はない。ただ、成体腎に幹細胞がわずかに存在し、それらが腎傷害時に寄与しているという可能性は否定されてはいない。

現在、成体に腎臓幹細胞は存在するのにかについて、4種類の方法を用いて研究がなされている。1) slow-cycling 細胞を識別して同定する方法、2) side population (SP) 細胞を識別する方法、3) 表面抗原マーカーで識別して同定する方法、4) 培養条件により選択同定する方法、である。ただ腎臓の幹細胞を確実に同定するマーカーがわかっていないため、幹細胞を単離することが困難となっている。

Slow-cycling 細胞は、細胞分裂が遅く DNA 標識物質 BrdU が蓄積される細胞である。この細胞が腎乳頭部に存在し、培養条件から nestin や α -SMA などのマーカーの発現を認めることから、多分化能を有するとの報告がある²⁰⁾。この細胞を虚血モデルの腎被膜に移植すると、尿細管や間質に広がっていくことを確認しているが、腎機能回復に寄与するかについては検討されていない。別の報告では、slow-cycling 細胞は近位尿細管に存在し、虚血・再灌流障害

急性腎不全モデルを用いた解析で、初期にビメンチンなどの間葉系マーカーの発現を認め、その後 E-カドヘリンなどの上皮マーカーの発現を呈し、最終的には成熟した尿細管上皮へ分化したと報告されている²¹⁾。

Side population (SP) 細胞とは、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。Hishikawa らはマイクロアレイの解析から、腎臓 SP 細胞は転写因子 Musclin/MyoR の発現を認め、それらが間質に存在すると報告している。また急性腎不全モデルへの移植実験から、それらの細胞は機能回復作用を持ち、それは細胞から分泌される液性因子による可能性があるとして述べている²²⁾。Challen らの報告によると、腎臓の SP 細胞は転写因子 Musclin/MyoR の発現はなく、尿細管に存在すると述べている。この細胞も急性腎不全モデルへの移植実験から、機能回復作用を持ち液性因子の関連があると述べている²³⁾。ただ *in vitro* の実験では脂肪細胞や骨細胞への分化誘導は確認できているが、腎臓構成細胞への誘導には成功していない。

その他表面抗原マーカーとして CD133²⁴⁾、Oct4²⁵⁾、Scal²⁶⁾ などを用いた試みや、特殊な培養条件を用いた幹細胞の同定の報告²⁷⁾がなされている。これらも幹細胞の特性である自己複製能と多分化能を正確に評価できる *in vitro* の実験系が確立しておらず、移植や経静脈的投与による *in vivo* の実験系においても細胞融合の否定ができていない。それらの機能的アッセイ法の確立とともに更なる検証が待たれる。

おわりに

多系統の細胞が存在する腎臓を再生するにあたって、腎臓の前駆細胞の同定は必須条件である。さらに腎臓前駆細胞の誘導と増幅、腎臓前駆細胞から各系列の細胞への分化誘導という課題を克服する必要がある。近年の研究によって、これらの過程における分子機序が解明されつつあり、腎臓再生へのゴールに近づくことが期待される。

文 献

1. Herzlinger D, Koseki C, Mikawa T, al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development* 1992; 114: 565-572.
2. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 1994; 372: 679-683.
3. Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesen-

- chyme in the developing kidney. *Development* 1998 ; 125 : 4225-4234.
4. Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* 2005 ; 9 : 283-292.
 5. Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, Sato A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Scully S, Lacey DL, Katsuki M, Asashima M, Yokota T. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 2001 ; 128 : 3105-3115.
 6. Takasato M, Osafune K, Matsumoto Y, Kataoka Y, Yoshida N, Meguro H, Aburatani H, Asashima M, Nishinakamura R. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1-GFP knockin mice. *Mech Dev* 2004 ; 121 : 547-557.
 7. 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* 2006 ; 133 : 151-161.
 8. Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. 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* 2006 ; 133 : 3005-3013.
 9. Self M, Lagutin OV, Bowling B, Hendrix J, Cai Y, Dressler GR, Oliver G. Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *EMBO J* 2006 ; 25 : 5214-5228.
 10. Park JS, Valerius MT, McMahon AP. Wnt/ β -catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development* 2007 ; 134 : 2533-2539.
 11. Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP, Kopan R. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* 2007 ; 134 : 801-811.
 12. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003 ; 111 : 707-716.
 13. Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol* 1999 ; 10 : 2125-2134.
 14. Oliver JA, Barasch J, Yang J, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 ; 283 : F799-809.
 15. Robert B, St John PL, Abrahamson DR. Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am J Physiol* 1998 ; 275 : F164-172.
 16. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001 ; 195 : 229-235.
 17. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 1743-1755.
 18. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 2175-2188.
 19. Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in post-ischemic kidney. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 1756-1764.
 20. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 795-804.
 21. Maeshima A, Sakurai H, Nigam SK. Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 188-198.
 22. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Ichianagi T, Kohike H, Komori T, Takahashi I, Takase O, Imai N, Yoshikawa M, Inowa T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T. Musculin/MyoR is expressed in kidney side population cells and can regulate their function. *J Cell Biol* 2005 ; 169 : 921-928.
 23. Challen GA, Bertoncello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH. Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1896-1912..
 24. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005 ; 166 : 545-555.
 25. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzari E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 2443-2456.
 26. Dekel B, Zangi L, Shezen E, Reich-Zeliger S, Eventov-Friedman S, Katchman H, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Margalit R, Reisner Y. Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin-multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 3300-3314.
 27. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 3028-3040.