

腎臓発生学の進展と再生医学への応用

Advances in kidney development and application for regenerative medicine

谷川 俊祐 西中村隆一

Shunsuke TANIGAWA and Ryuichi NISHINAKAMURA

要 旨

腎臓は 100 万個ものネフロンが集まった複雑な臓器である。腎臓には糸球体と尿細管という三次元構造が必須であり、これが血管系と接続して尿が流れなければ機能しない。さらに、最終的に哺乳類成体で機能する腎臓は、発生学的には前腎、中腎が形成された後に後腎として出現するうえに、後腎と前・中腎との細胞系譜の関係性は未解明である。これらを考慮すると、腎臓を試験管内で作ることはきわめて困難であり、夢物語とさえ考えられてきた。実際、文部科学省の作成したヒト iPS (induced pluripotent stem : 人工多能性幹) 細胞研究のロードマップでも、腎臓の再生はすべての臓器のなかで最後に位置づけられている。しかし、発生期の腎臓にはネフロン前駆細胞が存在し、ここから糸球体と尿細管が形成されていくので、この道筋をたどれば理論的には腎臓組織を作ることが可能はずである。最近、マウス胚性幹 (embryonic stem : ES) 細胞およびヒト iPS 細胞から、ネフロン前駆細胞を経由して三次元の腎臓組織 (糸球体と尿細管) が誘導された。この成功は、これまで蓄積されてきた腎臓発生学の知識と、それを基に解かれたネフロン前駆細胞の起源同定によるものである。これに加えて、ネフロン前駆細胞を維持する転写因子ネットワークがある程度解かれ、それ以外の腎臓構成組織の発生機構も解析されつつある。これらの知見を中心に、腎臓発生学の最近の進歩と多能性幹細胞を用いた再生医学への応用を紹介する。

解き明かされるネフロン前駆細胞の維持機構

腎臓の起源である後腎間葉と尿管芽は中間中胚葉に由来し、前腎、中腎、後腎の 3 段階を経て形成される。後腎の形成には後腎間葉と尿管芽の相互作用が重要であり、まず、後腎間葉から分泌される Gdnf が尿管芽に発現する受容体 Ret に作用し、尿管芽が発芽する。尿管芽の先端を包む後腎間葉は cap mesenchyme と呼ばれ、ここには糸球体ポドサイトや尿細管上皮に分化するネフロン前駆細胞が存在する。この細胞群は尿管芽の先端で自己複製によって維持されつつ、尿管芽から分泌される Wnt9b によって間葉上皮転換 (mesenchymal-to-epithelial transition : MET) を介してネフロンに分化する。少し分化段階が進んだ後腎間葉は Wnt4 を分泌し、これが自身に作用することによってさらに MET による分化が促進される。管腔を形成した初期ネフロン上皮は、C 字体、S 字体へと変形して、近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管となり尿管芽とつながる。一方反対側の端は、ポドサイトおよびボウマン嚢へと分化し、毛細血管を取り込んだ糸球体を形成する。この間、尿管芽は分岐を重ね、集合管と尿管になる。糸球体から尿細管、集合管に至る腎臓の最小機能単位をネフロンと呼び、最終的にヒトでは 50~100 万個のネフロンが形成される。

このネフロン形成においては、ネフロン前駆細胞が未分化の状態を維持したまま増殖する自己複製の過程と尿細管へ分化する過程が重要で、これまでに Six2, Osr1, Sall1 などの転写因子が正常な腎発生に必須な因子として同定されてきた。全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) によって、Wnt4, Fgf8 などの分化促進因子のエンハンサーには TCF 結合部位が存在し、ここに Wnt シグナルの下流因子である β -catenin がリクルートされ、分化が促進されることが明らかになった¹⁾。興味深いことに、Wnt4 の

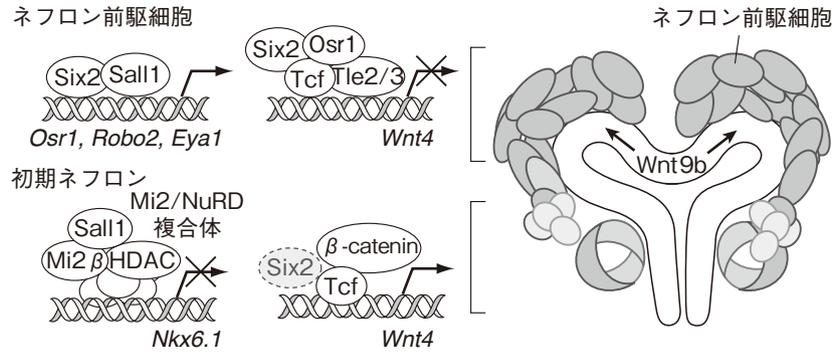


図1 Six2, Osr1, Sall1によるネフロン前駆細胞の維持機構

Sall1はSix2とともにOsr1, Robo2, Eya1の発現を促進しネフロン前駆細胞の未分化を保つ。一方で、Six2は分化に必要なWnt4の上流に結合し分化を抑制する。Osr1はSix2と結合し、Tcf/ β -cateninの転写抑制因子Grouchoファミリー(Tle2, Tle3)をリクルートしてWntによる分化に拮抗する。分化状態においてはSall1はMi2/NuRD転写抑制複合体との結合によってSix2とは異なる標的遺伝子の転写を抑制する。この間、Wnt4の制御領域に β -cateninが結合し分化を促進する。

場合は60 kb, Fgf8は121 kb上流と、予想以上に離れた位置に重要なエンハンサーが存在していた。ネフロン前駆細胞に発現するSix2はこれらのエンハンサーに結合してWntシグナルによる分化を抑制するのである(図1)。このSix2による分化抑制機構には転写因子Osr1がかかわっていることも報告された²⁾。Osr1はSix2によって正の発現制御を受け、Six2と相互作用する。さらにOsr1はTcf/ β -cateninの転写抑制因子であるGrouchoファミリー(Tle2, Tle3)をリクルートすることで、Wntシグナルによる分化に拮抗するとしている(図1)。実際にSix2陽性のネフロン前駆細胞でOsr1をノックアウトした結果、早熟なネフロン前駆細胞の分化およびWnt4発現の上昇、ネフロン前駆細胞の減少が起こった。しかし、Osr1がどのような遺伝子をターゲットとし、さらにSix2が結合する遺伝子制御領域とどの程度重複しているかなどの情報が不足しているため、Osr1のChIP-seqなど更なる詳細な解析が必要である。

Sall1は後腎間葉が尿管芽を引き寄せる際に必須であり、それ以降の過程でもネフロン前駆細胞に高発現している。しかし、ネフロン前駆細胞でのSall1の機能や直接のターゲットは不明であった。熊本大学の神田らは、Sall1をネフロン前駆細胞でノックアウトすると、ネフロン前駆細胞が早熟に分化して枯渇し、分化初期のネフロンも細胞死を起こすことを見出した³⁾。これは、Sall1がSix2陽性のネフロン前駆細胞の自己複製と維持に必須であることを示している。さらに、マウス胎仔の腎臓でマイクロアレイとChIP-seq解析を行うことによって、Sall1が、ネフロン前駆細胞

においては下流遺伝子の転写を促進して未分化状態を維持し、分化初期のネフロンでは異常な転写を抑制して正常な状態を保つことが判明した。さらにSix2陽性のネフロン前駆細胞では、Osr1, Robo2, Eya1といった腎臓発生に重要な遺伝子の制御領域にSall1がSix2とともに直接結合していた(図1)。一方、Six2が消失した分化初期のネフロンにおいては、Sall1はMi2/NuRD複合体と結合して転写を抑制するが、この標的遺伝子群はWnt4, Fgf8などのSix2の標的とは異なることも明らかにされた。このように、Sall1はネフロン前駆細胞では活性化因子、分化初期ネフロンでは抑制因子として働き、この2つの未熟な細胞集団を維持していることになる。

これに加え、エピゲノム修飾機構がネフロン前駆細胞の維持と自己複製に関与するという新しい知見が報告されている。Wilms腫瘍は小児期にみられる腎芽腫で、Six2やCited1陽性の未発達な腎組織を維持しており、発生期腎臓に由来する癌幹細胞のモデルとして研究されている。京都大学の西原らは、生後4週目のマウスにiPS誘導因子を発現させ生体でのリプログラミングを誘発したところ、Six2を高発現する腎芽腫様の腫瘍が形成されることを見出した⁴⁾。ゲノムの状態を調べた結果、iPS誘導因子の発現による遺伝子変異は起こっておらず、DNAのメチル化状態、いわゆるエピゲノムの状態が変化していた。さらに腎腫瘍からiPS細胞を誘導し、子宮着床前の受精卵(胚盤胞)に注入してキメラマウスを作製したところ、腫瘍由来のiPS細胞から腫瘍が再度出現することはなかった。これは、遺伝子

配列の異常ではなくエピゲノム変化によって Wilms 腫瘍が形成されうることをさらに証明したものである。通常、生後4週目の正常マウスにはネフロン前駆細胞は存在しないことから、エピゲノムの状態を制御することでネフロン前駆細胞を生体内で誘導し制御しうることを示す興味深い結果でもある。

Lin28 は mRNA 結合蛋白質で、let-7 microRNA のプロセッシングを制御する一方で、iPS 細胞誘導に使用されるなどリプログラミング因子としても働き、癌化や組織修復機能など多彩な機能を持っていることが知られている。Urbachらは、Wt1-Cre マウスを用いて Lin28 を発生初期胚に過剰発現した結果、Wilms 腫瘍を誘発し、Six2 陽性の細胞が増大したマウスの胎児の腎臓を得た⁵⁾。しかし、ネフロン前駆細胞、間質、尿管芽それぞれに特異的な Cre マウス (Six2-Cre, Foxd1-Cre および Cdh16-Cre) を用いて、あるいは胎生 18 日以降において、Lin28 を過剰発現させた場合には Wilms 腫瘍は発症しなかった。この表現型の誘導には初期の腎臓系系譜すべてで Lin28 の過剰発現が必要であることを示している。実際に Lin28 がどのようなメカニズムでネフロン前駆細胞を増大させて Wilms 腫瘍の表現型に寄与しているかは今後の解析が待たれる。

“腎臓の起源”の同定による多能性幹細胞からの三次元腎臓組織の誘導

これまで心筋、神経、網膜、脳といった多くの器官組織が多能性幹細胞から誘導されているが、腎臓誘導の試みは、他の臓器に比べ大きく遅れをとっている。上述したように、胎児期の後腎間葉には Six2 陽性のネフロン前駆細胞が存在し、これは Wnt の刺激で MET を起こしてネフロン(糸球体と尿管)に分化する。よって、本当のネフロン前駆細胞が誘導できれば、Wnt の作用によって糸球体と尿管を作るはずである。これまでに多くの研究者がこの難題に挑んできたが、糸球体と尿管を形成する能力を持ったネフロン前駆細胞を誘導することはできなかった。それは、これまで信じられてきたネフロン前駆細胞の起源が間違っていたからである。熊本大学の太口らは、正しい起源を突き止め、マウス ES 細胞さらにヒト iPS 細胞から、ネフロン前駆細胞を経由して糸球体と尿管という三次元腎臓組織を誘導することに成功した⁶⁾。まず、後腎を構成するネフロン前駆細胞が中腎とは異なる細胞系譜であること、つまりマウス胎生 9.5 日において頭側の Osr1 陽性細胞が中腎に、尾側の Osr1 陽性細胞(後方中間中胚葉)が後腎の

ネフロン前駆細胞に発生することを見出した。次いで胎生 8.5 日の Osr1 陽性細胞からネフロン前駆細胞(10.5 日相当)への誘導を試みた。この時期の Osr1 陽性細胞は中間中胚葉と呼ばれ、これがすべての腎臓細胞の起源とされていたからである。しかしその過程で、予想外に Osr1 陰性の画分からネフロン前駆細胞が誘導される可能性に行き当たった。近年、下半身の少なくとも一部は、8.5 日の最尾部に存在する「体軸幹細胞」に由来するという報告がある。そこで体軸幹細胞を含む領域に発現する遺伝子 T(Brachyury)CreER-GFP マウスを用いて解析したところ、ネフロン前駆細胞がこの T 陽性細胞に由来することが判明した。この細胞と「体軸幹細胞」との異同に関しては今後の解析が必要だが、ネフロン前駆細胞は通説の Osr1 陽性の前方中間中胚葉ではなく、最尾部に位置する T 陽性(Osr1 陰性)の「体軸幹細胞」様の細胞から由来していたわけである(図 2A)。これが Osr1 陽性に転じてさらに Six2/Osr1/Sall1 陽性のネフロン前駆細胞に分化することになる。興味深いことに、腎臓を構成する別の細胞系譜である尿管芽は、この T 陽性細胞ではなく、通説の Osr1 陽性の前方中間中胚葉に由来する。つまり、腎臓は少なくとも 2 つの異なる起源の細胞から構成されていることになる。

この発見を基に、8.5 日の T 陽性細胞をマウス胚から単離し、3 つのステップで、5 種類の成長因子(アクチビン, Bmp, Wnt, Fgf9, レチノイン酸)のそれぞれ各組み合わせと濃度を最適化して処理することにより、ネフロン前駆細胞を誘導することに成功した(図 2B)。次に、マウス ES 細胞から 2 つのステップを追加することで、8.5 日相当の T 陽性細胞を経由して、ネフロン前駆細胞を誘導した。計 5 ステップで誘導されたネフロン前駆細胞を Wnt で刺激すると、数日で多数の糸球体と尿管が誘導された。このネフロン前駆細胞をマウスに移植すると、尿の産生は未確認であるものの血管が糸球体に取り込まれた。さらにヒト iPS からの誘導にも同様の方法で成功し、長年不可能であったヒト腎臓組織の試験管内誘導がついに実現した。マウスとヒトの腎臓発生は驚くほど類似していることになる。また、4 ステップ目で使用されたアクチビンとレチノイン酸は、20 年前に浅島誠らによって報告されたカエル前腎組織の試験管内誘導でも使用されている。この成功は、腎臓の正しい起源を同定し、その発生を忠実に試験管内で再現したことに基づくものである。

この報告と同時に、ヒト ES 細胞を用いた腎臓細胞の誘導法がいくつか発表された。高里らは、Wnt と Fgf9 の組み合わせによってヒト ES 細胞から後腎間葉と尿管芽の両

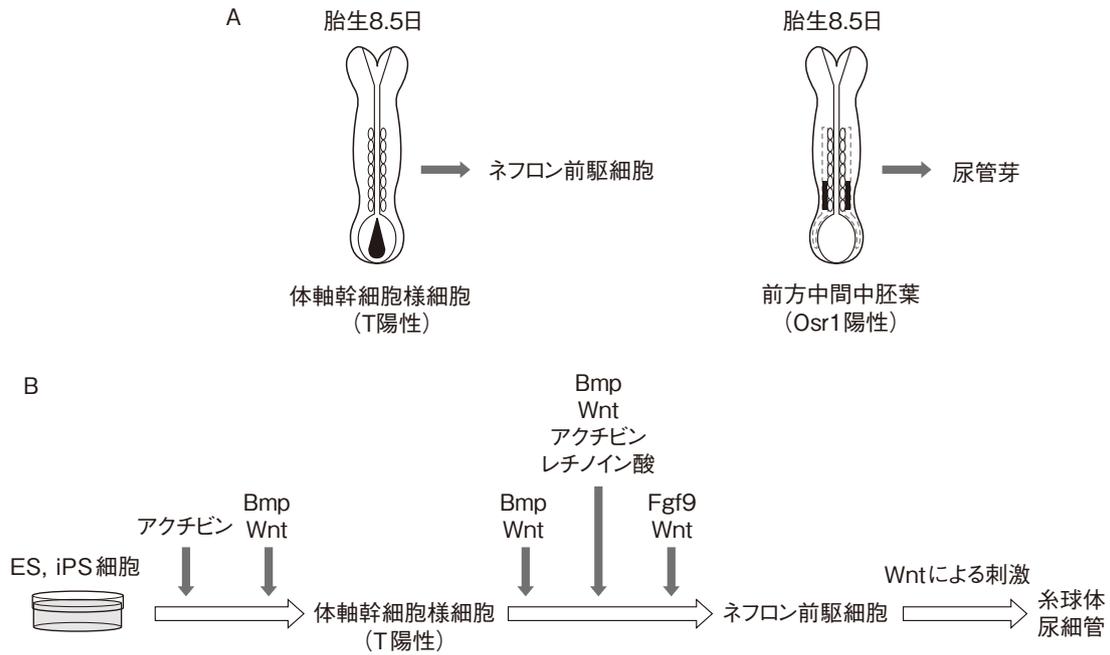


図 2 ネフロン前駆細胞の起源と誘導法

A：ネフロン前駆細胞は胎生 8.5 日の T 陽性細胞から発生する。

ネフロン前駆細胞は Osr1 陽性の前方中間中胚葉ではなく、最尾部に位置する T 陽性 (Osr1 陰性) の「体軸幹細胞」様の細胞に由来する。尿管芽は、Osr1 陽性の前方中間中胚葉に由来する。

B：ES および iPS 細胞からのネフロン前駆細胞の誘導法

多能性幹細胞から 2 つのステップを経て、8.5 日相当の T 陽性細胞を誘導し、さらに、3 つのステップで、5 種類の成長因子 (アクチビン, Bmp, Wnt, Fgf9, レチノイン酸) の各組み合わせと最適な濃度で処理することによってネフロン前駆細胞を誘導できる。

方の系譜の細胞を誘導したと報告している⁷⁾。しかし尿管様の管腔組織はみられるものの、糸球体構造は誘導されなかった。Lam らもヒト ES 細胞から後腎間葉を誘導したとしているが、それ自体では管腔構造を作らないため、マウス胚腎臓と再凝集することによって取り込まれることを示している⁸⁾。この 2 つの誘導法は、ネフロン前駆細胞が Osr1 陽性の前方中間中胚葉に由来するという従来の説に基づいている。今後、異なる方法で誘導された腎臓組織の分化能および機能を検証することが必要である。

iPS 細胞からネフロン前駆細胞の誘導が可能になったわけだが、この細胞を移植に適用すると仮定した場合、どのように単離・濃縮できるだろうか。Harari-Steinberg らは、細胞膜に発現する NCAM を使用することでヒトネフロン前駆細胞を単離できると報告している⁹⁾。ヒト胎児腎臓細胞を培養後、NCAM で単離してマウスに移植したところ、移植した細胞が尿管に分化し、慢性腎障害マウスの腎機能改善に寄与できることを示している。このアプローチは、ネフロン前駆細胞を増幅培養し、純化して移植するために有用である可能性がある。しかし、NCAM は発生期の

マウス腎臓においては、未分化な cap mesenchyme よりむしろ分化段階にある S 字体に発現しているため、Six2 陽性のネフロン前駆細胞を単離できる適切な細胞表面マーカーの同定が必要であろう。

尿管芽の発生と誘導

太口らの報告では尿管芽は誘導されていない。これは、尿管芽と後腎間葉が異なる系譜であることと一貫性がある。一方 Xia らは、ヒト iPS 細胞から 2 ステップで尿管芽系の細胞を誘導したと報告している¹⁰⁾。しかしそれ自身では管腔構造を形成しないため、やはりマウス胚の腎臓と再凝集することによって、低頻度で尿管芽の場所に取り込まれるとしている。高里らは、1 つのプロトコルで後腎間葉と同時に尿管芽を誘導したと報告しているが、本来の尿管芽が持つべき分岐能、Wnt 分泌による後腎間葉からの糸球体誘導能は確認されていない。やはり尿管芽の発生を解明し、それを忠実に再現することが必要だろう。

その一端として、尿管芽の発生に関する Costantini らの

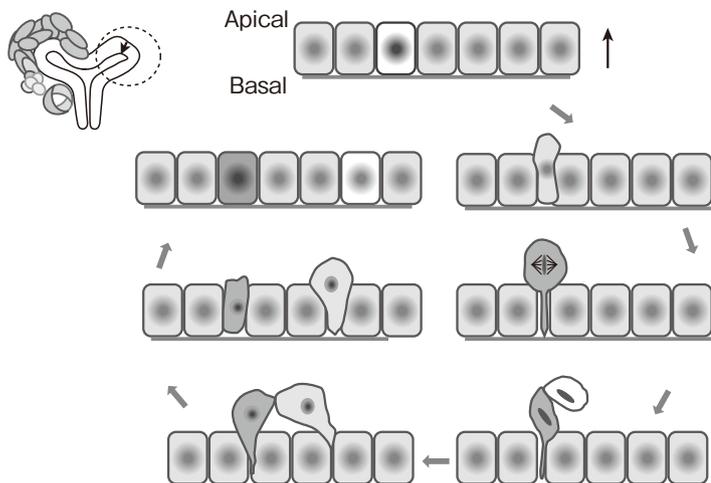


図3 発生期尿管芽の先端における“Mitosis-associated cell dispersal”

尿管芽の先端では“Mitosis-associated cell dispersal”と名づけられた特異な細胞分裂が起こっている。尿管芽先端の上皮細胞が分裂時に内腔側に飛び出し、2つに分裂した細胞の一方は元の場所に戻り、もう一方は1~3細胞離れた細胞間に入り込む。

グループによる新たな知見を紹介する。尿管芽の先端では彼らが“Mitosis-associated cell dispersal”と名づけた特異な細胞分裂が起こっている¹¹⁾。尿管芽先端の上皮細胞が分裂時に内腔側に飛び出すのである。そして2つに分裂した細胞の一方は元の場所に戻り、もう一方は1~3細胞離れた細胞間に入り込む(図3)。尿管芽中のある特定の細胞がこういった分裂を行うのかどうかは明らかではないが、このような細胞のダイナミックな動きが尿管芽の形状変化に寄与している可能性がある。また、腎発生の動態を定量的に評価する実験系がLittleらのグループによって確立された¹²⁾。OPT(optical projection tomography)という光投射型断層撮影イメージング法で、生体の三次元画像を二次元画像から再構築する技術によって、腎発生期における尿管芽の分岐やネフロン前駆細胞の数を可視化および定量化することが可能となった。今後、これらの解析法が簡便化されることによって、さまざまな遺伝子改変マウスの表現型を数値で評価することがスタンダードとなることを期待したい。

Costantiniらのグループは、胎児期のネフロン前駆細胞数が尿管芽の分岐数およびネフロンの数を決定することを報告している¹³⁾。まず細胞系譜追跡実験により、Gdnf陽性の細胞も糸球体、近位尿細管、遠位尿細管に寄与するネフロン前駆細胞であることが示された。次いでGdnf陽性ネフロン前駆細胞の40%を胎児期に除去すると、尿管芽の分岐が減少して、尿管芽1つ当たりのネフロン前駆細胞数は最終的には回復する。成体まで待つと腎臓のサイズも回復

する。しかし、尿管芽の分岐数の減少は回復しないため、腎臓全体のネフロン数は減少する。つまり、胎児期のネフロン前駆細胞数が尿管芽の分岐制御を介して成体のネフロン数を決定するのであり、これは補償が効かないことになる。ネフロン数が少ないことは、高血圧、蛋白尿、慢性腎臓疾患などとの相関が示唆されているため、重要な知見である。

先天性腎尿路奇形症候群(CAKUT)は腎尿路発生異常を呈する小児疾患である。重複尿管形成もその一つだが、そのメカニズムは明らかでなかった。最近、Wnt5aとそのレセプターであるRor2の欠損によって二重尿管が形成されることが報告された。大阪大学の西田らは、Wnt5aおよびRor2のノックアウトマウスでそれぞれ二重尿管を認め、それが尿管芽の発芽に必要なGDNFを発現する後腎間葉の位置異常によるものであるとしている¹⁴⁾。一方Perantoniらのグループは、Wnt5aおよびRor2を初期中胚葉特異的にノックアウトすると二重尿管が形成されることを報告し、それが初期中胚葉の伸長障害によるものであるとしている¹⁵⁾。T-CreERマウスを使ったタモキシフェン誘導型のノックアウトによってこの表現型は胎生7.5日に遺伝子欠損を起こした場合にのみ起こり、それ以降のノックアウトでは起こらないことが示された。これは、尿管芽系と後腎間葉系譜の細胞が胎生8.5日ではすでに分かれているという太口らの知見と一致している。

腎臓発生における間質の役割

腎発生期の間質は、線維芽細胞、ペリサイト、血管平滑筋、メサンギウム細胞などから成り、腎臓外縁部に存在するFoxd1陽性の前駆細胞から形成される¹⁶⁾。しかし、このFoxd1陽性の間質前駆細胞がどのような機構でそれぞれの系譜に分化していくのかは明らかでなかった。Kopanらのグループは、NotchシグナルがFoxd1陽性の間質からのメサンギウム細胞形成に必要であるが、血管平滑筋形成には寄与しないことを示した¹⁷⁾。間質特異的なNotchシグナルのノックアウトでは、メサンギウムへの分化決定が起こらない。一方、血管内皮は間質前駆細胞由来ではないため、糸球体内の血管内皮は形成されるが、メサンギウムが存在しないため、糸球体内に血管瘤ができてしまう。血管平滑筋は正常に形成されるが、メサンギウム欠損を補償することはできなかった。太口らがヒトiPSからネフロン前駆細胞を経て誘導した糸球体にはメサンギウム細胞が含まれていないことから、間質がネフロン前駆細胞とは異なる系譜

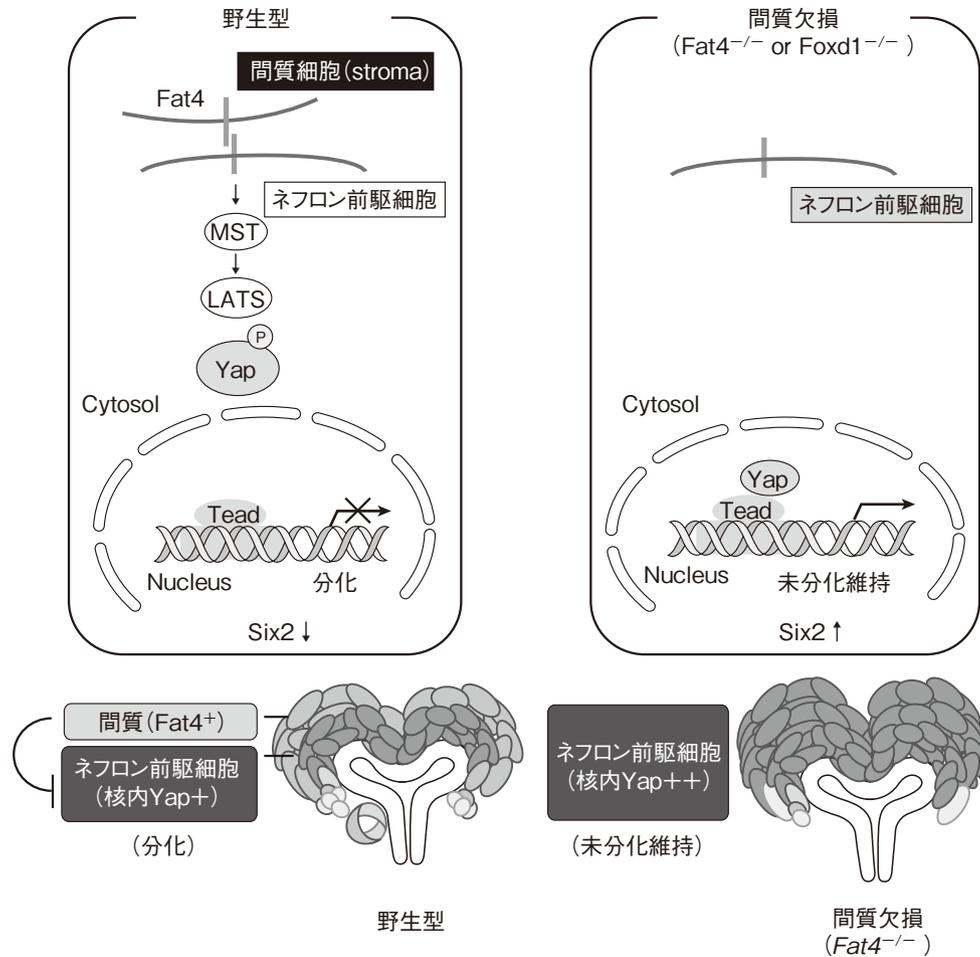


図 4 間質細胞によるネフロン前駆細胞の分化制御

間質細胞に発現する Fat4 はネフロン前駆細胞の Hippo 経路に作用し, Yap の核内局在を抑制することでネフロン前駆細胞の分化を誘導する。それに対し Yap の核内移行は未分化維持に働く。これにより Fat4 ノックアウトマウスはネフロン前駆細胞の増大を引き起こす。

から発生するという点でも一貫性がある。

これまで腎臓の発生には後腎間葉(ネフロン前駆細胞)と尿管芽の相互作用が必要とされてきたが, それらの間を埋める間質がネフロン前駆細胞の増殖や分化, さらに尿管芽の正しい分岐の制御に必須の機能を有していることが明らかになってきた。ネフロン前駆細胞の分化が間質からの Hippo シグナルによって制御されることが Carroll らのグループによって報告された¹⁸⁾。ショウジョウバエにおいて Hippo 経路を活性化するカドヘリン様分子 Fat4 は, 発生期腎臓の間質に発現する。Hippo 経路は, 細胞密度が高くなると増殖が抑制される, いわゆる contact inhibition の現象を説明できる分子機構であり, Fat4 のノックアウトマウス胎仔においてネフロン前駆細胞の増大を引き起こす(図 4)。Fat4 欠損によって間質からネフロン前駆細胞に作用するはずの Hippo 経路が遮断され, 下流の転写調節因子 Yap が核

内に局在することによって前駆細胞が過剰に増殖したことになる。それとは反対に, ネフロン前駆細胞における Yap および類似因子 Taz のノックアウトによって前駆細胞は枯渇した。このように, 間質細胞からネフロン前駆細胞へのシグナルによる分化制御が明らかとなった。

また, 間質細胞からのシグナル伝達や, 細胞外マトリクスの発現によるネフロン前駆細胞の分化制御が報告されている。最も未分化なネフロン前駆細胞は, 尿管芽の先端に位置する Six2 と Cited1 が共局在する二重陽性の集団で, ネフロン前駆細胞が尿管芽へと分化する間に, Six2/Cited1 二重陽性の細胞から Six2 単独陽性へと遷移する¹⁹⁾。これには Bmp7 の働きが必要であるが, 間質の Foxd1 が Bmp7 の働きを抑制する Decorin というプロテオグリカンの発現を抑制し, 正しいネフロン前駆細胞の分化に寄与していることが Oxburgh らのグループによって示された²⁰⁾。一方, レチ

ノイン酸は間質から分泌され尿管芽の正しい分岐に必要である。

Mendelsohn らのグループは、過敏性腸症候群および脂質蛋白症の原因遺伝子である Extracellular matrix (Ecm1) が Foxd1 陽性の間質細胞においてレチノイン酸シグナルによって抑制されており、尿管芽の正常な分岐および Ret の発現調節に重要な働きを持つことを見出した²¹⁾。Ecm1 の *in vivo* における機能証明は行われておらず、今後の解析が待たれるところであるが、尿管芽の正常な分岐に必要なレチノイン酸シグナルの下流因子が同定されたことは意義深い。これらの知見は腎発生学の新たな知見となるだけでなく、多能性幹細胞から誘導した腎臓前駆細胞による三次元構造を持った腎臓形成の試みや、再生医療の基盤構築に有用である。

機能する腎臓構築への展望

肝臓の領域では、ヒト iPS 細胞から血管網を持つ機能的なヒト肝臓の作製に成功している。横浜市立大学の武部らは、ヒト iPS 細胞から誘導した肝臓細胞とヒト臍帯静脈血管内皮、および間葉系幹細胞の3つを共培養することにより立体的な構造を持つ肝臓の原基(肝芽)を形成できることを報告した²²⁾。誘導された肝芽はマウスに移植されると血流のある血管網を形成し、アルブミンや薬物代謝酵素といった肝臓に特徴的な酵素の発現と機能を持つまで成熟することが示された。さらに、肝不全モデルマウスにヒト iPS から誘導した肝芽を移植することにより生存率の改善が得られた。これは、誘導された胚性の肝細胞が成体の肝機能を維持できることを示唆する知見であり、自己組織化による器官構築の可能性を示唆している。腎臓の構築においてもネフロン前駆細胞と尿管芽に加えて、間質と血管系の細胞が必要であると考えられ、それぞれの誘導の成功が待たれる。

動物の体内で腎臓を作ろうとする試みもみられる。東京大学の中内らのグループは、腎臓を欠損する Sall1 ノックアウトマウスの胚盤胞に、正常なマウス ES 細胞を注入することによって、ES 細胞由来の腎臓を作製した²³⁾。しかし後腎間葉は ES 細胞由来であるが、尿管芽や血管は宿主由来であり、解決策が必要である。一方遺伝子工学は大型動物に及んで、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り、臓器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つつある。つまり、腎臓がないブタ胎児の腎臓領域に、ヒト iPS 細胞から誘導した腎臓細胞

を移植し、さらに分化させるといった方法が考えられる。実際、腎臓を欠損する Pdx1 遺伝子ノックアウトマウスの胚盤胞にラット 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腎臓作製が成功している²⁴⁾。さらに腎臓を欠損するブタを作製し、ブタ胚の細胞を使って腎臓を再構築する技術も報告されている²⁵⁾。しかし、ヒト iPS 細胞をブタ胚盤胞に注入するとブタ-ヒトキメラの生命体を作出してしまう可能性があるという倫理的問題も抱えており、議論が必要である。

おわりに

三次元構造を持った腎臓を作るためには、ネフロン前駆細胞、尿管芽細胞、間質細胞、そして血管系の細胞が必要である。これらの細胞を多能性幹細胞から正しく誘導するにはそれぞれの系譜の分化過程を明らかにし、その情報を基に試みることが重要である。正しい発生を理解せず、それぞれの組織の遺伝子マーカー発現だけを目印に誘導を試みる方法では成功は難しい。目的の因子を発現する1種類の細胞を誘導できれば、再生医療の目的をある程度満たせる臓器もあるかもしれない。しかし、腎臓には三次元構造が必須であり、そのためには本当に正しい細胞を作って組み合わせねばならない。幹細胞から腎臓を作るのは錬金術ではない。その意味で、腎臓の再生を視野に入れた発生学の重要性が今後一層増すだろう。また STAP 細胞問題に象徴されるように、発生再生学における研究倫理の重要性もいま一度強調しておきたい。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文献

1. Park JS, Ma W, O'Brien LL, Chung E, Guo JJ, Cheng JG, Valerius MT, McMahon JA, Wong WH, McMahon AP. Six2 and Wnt regulate self-renewal and commitment of nephron progenitors through shared gene regulatory networks. *Dev Cell* 2012 ; 23 : 637-651.
2. Xu J, Liu H, Park JS, Lan Y, Jiang R. Osr1 acts downstream of and interacts synergistically with Six2 to maintain nephron progenitor cells during kidney organogenesis. *Development* 2014 ; 141 : 1442-1452.
3. Kanda S, Tanigawa S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Suzuki Y, Sato Y, Hino S, Sander M, Perantoni AO, Sugano S, Nakao M, Nishinakamura R. Sall1 maintains nephron progenitors and nascent nephrons by acting as both an activator and a repressor. *J Am Soc Nephrol* 2014 ; 25 : 2584-2595.
4. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsuru

- naga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* 2014 ; 156 : 663-677.
5. Urbach A, Yermalovich A, Zhang J, Spina CS, Zhu H, Perez-Atayde AR, Shukrun R, Charlton J, Sebire N, Mifsud W, Dekel B, Pritchard-Jones K, Daley GQ. Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. *Genes Dev* 2014 ; 28 : 971-982.
 6. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014 ; 14 : 53-67.
 7. Takasato M, Er PX, Becroft M, Vanslambrouck JM, Stanley EG, Elefanti AG, Little MH. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol* 2014 ; 16 : 118-266.
 8. Lam AQ, Freedman BS, Morizane R, Lerou PH, Valerius MT, Bonventre JV. Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers. *J Am Soc Nephrol* 2014 ; 25 : 1211-1225.
 9. Harari-Steinberg O, Metsuyanim S, Omer D, Gnatek Y, Gershon R, Pri-Chen S, Ozdemir DD, Lerenthal Y, Noiman T, Ben-Hur H, Vaknin Z, Schneider DF, Aronow BJ, Goldstein RS, Hohenstein P, Dekel B. Identification of human nephron progenitors capable of generation of kidney structures and functional repair of chronic renal disease. *EMBO Mol Med* 2013 ; 5 : 1556-1568.
 10. Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, Gallegos T, Suzuki K, Okamura D, Wu MZ, Dubova I, Esteban CR, Montserrat N, Campistol JM, Izpisua Belmonte JC. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol* 2013 ; 15 : 1507-1515.
 11. Packard A, Georgas K, Michos O, Riccio P, Cebrian C, Combes AN, Ju A, Ferrer-Vaquero A, Hadjantonakis AK, Zong H, Little MH, Costantini F. Luminal mitosis drives epithelial cell dispersal within the branching ureteric bud. *Dev Cell* 2013 ; 27 : 319-330.
 12. Short KM, Combes AN, Lefevre J, Ju AL, Georgas KM, Lamber-ton T, Cairncross O, Rumballe BA, McMahon AP, Hamilton NA, Smyth IM, Little MH. Global quantification of tissue dynamics in the developing mouse kidney. *Dev Cell* 2014 ; 29 : 188-202.
 13. Cebrian C, Asai N, D'Agati V, Costantini F. The number of fetal nephron progenitor cells limits ureteric branching and adult nephron endowment. *Cell Rep* 2014 ; 7 : 127-137.
 14. Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y. Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. *Mol Cell Biol* 2014 ; 34 : 3096-3105.
 15. Yun K, Ajima R, Sharma N, Costantini F, Mackem S, Lewandoski M, Yamaguchi TP, Perantoni AO. Non-canonical Wnt5a/Ror2 signaling regulates kidney morphogenesis by controlling intermediate mesoderm extension. *Hum Mol Genet* 2014 ; 23 : 6807-6814.
 16. Kobayashi A, Mugford JW, Krautzberger AM, Naiman N, Liao J, McMahon AP. Identification of a multipotent self-renewing stromal progenitor population during mammalian kidney organogenesis. *Stem Cell Reports* 2014 ; 3 : 650-662.
 17. Boyle SC, Liu Z, Kopan R. Notch signaling is required for the formation of mesangial cells from a stromal mesenchyme precursor during kidney development. *Development* 2014 ; 141 : 346-354.
 18. Das A, Tanigawa S, Karner CM, Xin M, Lum L, Chen C, Olson EN, Perantoni AO, Carroll TJ. Stromal-epithelial crosstalk regulates kidney progenitor cell differentiation. *Nat Cell Biol* 2013 ; 15 : 1035-1044.
 19. Brown AC, Muthukrishnan SD, Guay JA, Adams DC, Schafer DA, Fetting JL, Oxburgh L. Role for compartmentalization in nephron progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 4640-4645.
 20. Fetting JL, Guay JA, Karolak MJ, Iozzo RV, Adams DC, Maridas DE, Brown AC, Oxburgh L. FOXD1 promotes nephron progenitor differentiation by repressing decorin in the embryonic kidney. *Development* 2014 ; 141 : 17-27.
 21. Paroly SS, Wang F, Spraggon L, Merregaert J, Batourina E, Tycko B, Schmidt-Ott KM, Grimmond S, Little M, Mendelsohn C. Stromal protein Ecm1 regulates ureteric bud patterning and branching. *PLoS One* 2013 ; 8 : e84155.
 22. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013 ; 499(7459) : 481-484.
 23. Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 2012 ; 180 : 2417-2426.
 24. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010 ; 142 : 787-799.
 25. Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas *in vivo* in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110(12) : 4557-4562.