

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09689

研究課題名(和文)先天性腎尿路異常の新規原因遺伝子CBWD1の細胞内での役割

研究課題名(英文) Intracellular role of CBWD1, a novel causative gene of congenital anomalies of the kidney and urinary tract

研究代表者

神田 祥一郎 (Kanda, Shoichiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60632651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：小児末期腎不全の最大原因は先天性腎尿路異常(CAKUT)である。CAKUTの一部は単一遺伝子の異常によって発症し約40種類の原因遺伝子が明らかとなってきた。しかしこれらの遺伝子異常が同定される例は15%程度で、新規原因遺伝子が存在している可能性が考えられていた。CAKUTの新規原因遺伝子の同定を目的に本研究を行った。まずCAKUTを有する患者に対する全ゲノム解析によりCBWD1遺伝子が部分欠失していることを見出した。次にCbwd1ノックアウトマウスを作成し、Cbwd1ノックアウトマウスがCAKUTを呈することを明らかにした。以上より、CBWD1がCAKUTの新規原因遺伝子であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前述の通りCAKUTは小児末期腎不全の最大の原因である。そのためその病因を明らかにすることは大変有意義である。

また近年、さまざまな臓器の再生医療研究が活性化し、中には臨床応用されているものもある。腎臓においても、透析や移植に代わる治療法の開発のため、再生医療研究が行われている。臓器再生医療の実現のためには、まず発生をより深く理解することが必要であり、本研究の成果-腎臓発生に関わる遺伝子の発見-は、腎臓発生の理解を深めるもので、再生医療研究実現の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) is the leading cause of end-stage renal disease in children. Part of CAKUT is caused by a single gene abnormality, and about 40 kinds of causative genes have been revealed. However, there were not many cases where the causative gene became clear. Therefore, it was thought that a novel causative gene might exist. This study was conducted to identify a novel causative gene of CAKUT. First, we found that CBWD1 gene was partially deleted by whole genome analysis of DNA of patients with CAKUT. Next, we created Cbwd1 knockout mice and revealed that these mice exhibit CAKUT. From the above, it was proved that CBWD1 is a novel causative gene of CAKUT.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：先天性腎尿路異常 腎臓発生 CBWD1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性腎尿路異常(CAKUT, congenital anomalies of the kidney and urinary tract)は小児腎不全の最大の原疾患であり、その発症機序を明らかにすることは重要な課題である。これまでCAKUTの原因遺伝子同定には、変異マウスの解析に基づいてヒトでの探索が行われていた。しかし高速シーケンサーの発展に伴い、ヒト患者のゲノム配列から変異遺伝子候補を抽出し、マウスを使って検証するという流れが生まれつつある。

私たちは研究開始当初、CAKUTの新規原因遺伝子候補として、*CBWD1*(*Cobalamin Synthetase W Domain-containing protein 1*)を挙げていた。CAKUTを有する兄妹を含む家族を対象に、家族歴よりホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性変異がCAKUT発症に関係している可能性を考えエクソーム解析を行ったところ、既知の原因遺伝子を含め患者特異的に認められる遺伝子変異はなかった。しかし9番染色体177574-179736の周辺領域においてホモ接合性欠失を患者のみに認めた。この領域は*CBWD1*遺伝子の開始コドンを含む第1エクソン全体を含んでいた。データベース(Genomic Variants)によると同領域のヘテロ接合性欠失は2538人中4名(0.16%)であった。

2. 研究の目的

CAKUT兄妹例から原因遺伝子候補として見いだした*CBWD1*の腎臓発生における役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会において承認を受けている(承認番号362)。ヒト試料を扱う際は、全ての参加者より書面により同意を得ている。また本研究における動物実験は東京大学動物実験委員会において承認されている(承認番号P16-009)。

(1) 対象

CAKUTを有する長男、長女と明らかな疾患を有さない両親と次男の5名。長男、長女は共に片側の腎臓を欠損し、対側腎は低形成腎であった。乳児期より腎機能が低下し、長男は10歳時に長女は11歳児に腎移植を受けている。

(2) 原因遺伝子候補の抽出

患者を含む家族5名から血液を採取しDNAを抽出した。その後、全ゲノム解析を行った。PCRにて遺伝子欠失の確認を行った。

(3) 発生期の腎臓における発現解析

E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E16.5のマウス胎仔腎のパラフィン切片を作成し、抗*CBWD1*抗体、抗*Six2*抗体(後腎間葉マーカー)、抗cytokeratin 8抗体(尿管芽マーカー)を用いて免疫染色を行った。

(4) ノックアウトマウスの解析

CRISPR-Cas9システムを用いて*Cbwd1*ノックアウトマウスを作製した。発生期、成体マウスの腎を用いてパラフィン切片を作成しHE染色にて形態学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 原因遺伝子候補*CBWD1*の欠失部位の同定

欠失部位を明らかにするためにlong-range PCRやprimer walkingを行ったが、同領域に繰り返し配列が多くこれらの方法では断端配列を同定することはできなかった。そこで全ゲノム解析を行い、欠失領域が9番染色体178351-182100であることを明らかにした。またCollectHsMetrics、EXCAVATOR2を用いて両親にヘテロ接合性欠失を認めることを証明した。

(2) *Cbwd1*の発生期腎臓における発現

*CBWD1*がCAKUTの発症に関わっていることを証明するためにマウス胎仔腎を用いて*Cbwd1*の発現部位を調べた。後腎間葉マーカーである*Six2*、尿管芽マーカーであるcytokeratin 8と共にE11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E16.5のマウス胎仔腎連続切片を用いて免疫染色にて評価を行ったところ、*Cbwd1*はE11.5とE12.5の胎仔腎には発現を認めなかったが、E13.5から尿管芽に発現を認めた。E16.5では尿管芽由来の細胞に発現しており、腎盂の上皮細胞において強く発現していた。

(3) *Cbwd1*ノックアウトマウスの解析

*Cbwd1*が尿管芽に発現していることが分かったので、尿路の発生に関わっている可能性を考え、CRISPR-Cas9システムを用いて*Cbwd1*ノックアウトマウスを作製した。*Cbwd1*^{-/-}マウス同士を交配すると、胎生致死ではなく、メンデルの法則に従って、*wild type*、*Cbwd1*^{+/-}、*Cbwd1*^{-/-}マウスが出生した。P0マウスの腎臓を解析したところ、*Cbwd1*^{-/-}マウスでは29%の頻度、*Cbwd1*^{+/-}では4%の頻度で水腎症や重複尿管などの尿路系の異常を伴うCAKUTを認めた。オフターゲット効果の可能性を否定するために別ラインでも解析を行い同様の結果を得た。

以上の結果より、CBWD1 が尿路の発生に関わり、*CBWD1* 遺伝子の部分欠失が CAKUT 発症に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanda S, Ohmuraya M, Akagawa H, Horita S, Yoshida Y, Kaneko N, Sugawara N, Ishizuka K, Miura K, Harita Y, Yamamoto T, Oka A, Araki K, Furukawa T, Hattori M	4. 巻 31
2. 論文標題 Deletion in the Cobalamin Synthetase W Domain-Containing Protein 1 Gene Is associated with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol	6. 最初と最後の頁 139-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2019040398.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagano C, Morisada N, Nozu K, Kamei K, Tanaka R, Kanda S, Shiona S, Araki Y, Ohara S, Matsumura C, Kasahara K, Mori Y, Seo A, Miura K, Washiyama M, Sugimoto K, Harada R, Tazoe S, Kourakata H, Enseki M, Aotani D, Yamada T, Sakakibara N, Yamamura T, Minamikawa S, Ishikura K, Ito S, Hattori M, Iijima K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Clinical characteristics of HNF1B-related disorders in a Japanese population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 1119-1129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-019-01747-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 神田祥一郎 服部元史	4. 巻 27
2. 論文標題 IFT140遺伝子変異と骨格異常を伴う織毛病	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 発達腎研究会誌	6. 最初と最後の頁 12-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Unzaki A, Morisada N, Nozu K, Ye MJ, Ito S, Matsunaga T, Ishikura K, Ina S, Nagatani K, Okamoto T, Inaba Y, Ito N, Igarashi T, Kanda S, Ito K, Omune K, Iwaki T, Ueno K, Yahata M, Ohtsuka Y, Nishi E, Takahashi N, Ishikawa T, Goto S, Okamoto N, Iijima K	4. 巻 63
2. 論文標題 Clinically diverse phenotypes and genotypes of patients with branchio-oto-renal syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 647-656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0429-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Udagawa T, Harita Y, Miura K, Mitsui J, Ode KL, Morishita S, Urae S, Kanda S, Kajiho Y, Tsurumi H, Ueda HR, Tsuji S, Saito A, Oka A	4. 巻 8
2. 論文標題 Amnionless-mediated glycosylation is crucial for cell surface targeting of cubilin in renal and intestinal cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20731-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎	4. 巻 34
2. 論文標題 腹部 尿路感染症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児放射線学会誌	6. 最初と最後の頁 13-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎 服部元史	4. 巻 26
2. 論文標題 先天性腎尿路異常の遺伝子解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 発達腎研究会誌	6. 最初と最後の頁 24-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎 服部元史	4. 巻 85
2. 論文標題 CAKUTの腎外合併症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 557-561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎	4. 巻 50
2. 論文標題 アシドーシス・アルカローシス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児疾患の診断治療基準	6. 最初と最後の頁 124-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanda S, Horita S, Yanagihara T, Shimizu A, Hattori M.	4. 巻 32(4)
2. 論文標題 M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) glomerular staining in pediatric idiopathic membranous nephropathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatr Nephrol.	6. 最初と最後の頁 713-717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00467-016-3552-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Udagawa T, Jo T, Yanagihara T, Shimizu A, Mitsui J, Tsuji S, Morishita S, Onai R, Miura K, Kanda S, Kajiho Y, Tsurumi H, Oka A, Hattori M, Harita Y	4. 巻 32(5)
2. 論文標題 Altered expression of Crb2 in podocytes expands a variation of CRB2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatr Nephrol	6. 最初と最後の頁 801-801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00467-016-3549-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎、服部元史	4. 巻 25
2. 論文標題 先天性腎尿路生殖器症候群	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 発達腎研究会誌	6. 最初と最後の頁 21-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎	4. 巻 49
2. 論文標題 膜性腎症	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 552-555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎	4. 巻 49
2. 論文標題 近位尿細管機能検査 - 尿細管リン再吸収閾値、重碳酸イオン負荷試験、ブドウ糖再吸収閾値	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児臨床検査のポイント2017	6. 最初と最後の頁 253-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三浦健一郎、神田祥一郎、服部元史	4. 巻 3
2. 論文標題 血尿・蛋白尿を認める7歳男児	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ	6. 最初と最後の頁 148-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神田祥一郎	4. 巻 2
2. 論文標題 腎の発生・分化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児腎臓病学第2版	6. 最初と最後の頁 2-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神田祥一郎
2. 発表標題 臨床腎臓発生学への誘い
3. 学会等名 第85回関東小児腎臓研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊原美環子 梶保祐子 豊福悦史 平松拓馬 高橋千恵 大和田啓峰 神田祥一郎 張田豊 今井耕輔 金兼弘和 森尾知宏 岡明
2. 発表標題 低酸素血症を契機に見つかったNEMO異常症の一例
3. 学会等名 第122回日本小児科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤綾美 梶保祐子 数井真理子 高橋千恵 神田祥一郎 三谷友一 樋渡光輝 朝海廣子 岡明
2. 発表標題 Jacobsen症候群にLAHPS (lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome) を合併した1例
3. 学会等名 第653回日本小児科学会東京地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生形有史 寺田有美子 梶保祐子 原理沙 柿本優 豊福悦史 高橋千恵 大和田啓峰 神田祥一郎 垣内五月 岡明
2. 発表標題 母体の乳房から感染したと考えられる表在型新生児ヘルペスの一例
3. 学会等名 第656回日本小児科学会東京地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野英治 吉田彩水音 滝澤ひろみ 滝澤慶一 浦江聖也 吉田賢弘 梶保祐子 神田祥一郎 深山雄大 藪内智朗 三浦健一郎 張田豊
2. 発表標題 不完全な選択的スプライシングは非典型Lowe症候群の原因となる
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村美沙子 神田祥一郎 吉岡祐也 高橋千恵 大和田啓峰 梶保祐子 張田豊 岡明
2. 発表標題 ステロイド依存性ネフローゼ症候群に対するRituximab治療後にRituximab-induced serum sicknessをきたした小児例
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森口駿 神田祥一郎 森貞直哉 梶保祐子 張田豊 飯島一誠 岡明
2. 発表標題 学校検尿を契機に診断されたARPKDの16歳女児例
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋瑛梨 神田祥一郎 梶保祐子 張田豊 岡明
2. 発表標題 当院におけるJoubert症候群患者のまとめ 腎病変合併時の対応
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋瑛梨 神田祥一郎 梶保祐子 張田豊 森貴幸 佐藤敦志 岡明
2. 発表標題 二次性遺尿を契機に診断された小児欠神てんかんの一例
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田祥一郎 三浦健一郎 服部元史
2. 発表標題 CAKUTの腎移植 遺伝子検査の臨床的意義、シンポジウム「長期生着を考慮した小児移植の展望（再移植、再々移植への取り組み）小児移植腎のグラフトロス時、あなたならどうする？」
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田祥一郎
2. 発表標題 ANCA関連血管炎、シンポジウム「小児期血管炎の急性期治療と長期管理～現状と今後の展望～」
3. 学会等名 第38回日本川崎病学会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田祥一郎 笠原諭 谷口洋平 長澤武 久富隆太郎 伴英樹 藪内智朗 金子直人 高木陽子 石塚喜世伸 三浦健一郎 服部元史
2. 発表標題 長引く腰背部痛を認めADHDと診断されたADPKDの1女児例
3. 学会等名 第53回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田祥一郎 堀田茂 森貞直哉 野木歩美 下田麻伊 小野真由美 神田祥子 横山晶一郎 高橋寛 横山美貴 飯田貴也 谷口洋平 長澤武 伴英樹 白井陽子 金子直人 藪内智朗 高木陽子 石塚喜世伸 三浦健一郎 飯島一誠 服部元史
2. 発表標題 IFT140遺伝子異常によるネフロン癆の1例
3. 学会等名 第27回発達腎研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田祥一郎
2. 発表標題 将来の小児科医への提言2016 学術研究、特別企画『将来を創る：子供たち、次世代の小児科医、今ここからPart2』
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神田祥一郎、三浦健一郎、服部元史
2. 発表標題 ANCA関連血管炎、シンポジウム「小児領域におけるアフェレシス療法のエビデンス」
3. 学会等名 第38回日本アフェレシス学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shoichiro Kanda, Naoya Morisada, Kiyonobu Ishizuka, Hiroko Chikamoto, Yuko Akioka, Kenichiro Miura, Kazumoto Iijima, Motoshi Hattori
2. 発表標題 Genital organ anomalies in female pediatric patients with congenital anomalies of the kidney and urinary tract.
3. 学会等名 The 13th Congress of Asian Society for Pediatric Research
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米田立 神田祥一郎 坂本信一 近井隼人 下田麻伊 神田祥子 黒澤照喜 安藤和秀 横山晶一郎 高橋寛 横山美貴
2. 発表標題 血尿を契機に診断されたシスチン尿症の4ヵ月女児
3. 学会等名 第52回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森貞直哉 庄野朱美 野津寛大 忍頂寺毅史 叶明娟 井藤奈央子 神田祥一郎 亀井宏一 石倉健司 伊藤秀一 山本勝輔 塚口裕康 里村憲一 田中亮二郎 飯島一誠
2. 発表標題 NGSターゲット遺伝子シーケンスパネルによるCAKUTおよびNPHの包括的原因遺伝子解析
3. 学会等名 第52回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神田祥一郎 堀田茂 金子直人 菅原典子 張田豊 三浦健一郎 岡明 大村谷昌樹 古川徹 服部元史
2. 発表標題 CAKUTの新規原因遺伝子の同定 - 遺伝子Xの同定とマウスを用いた解析 -
3. 学会等名 第26回発達腎研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藪内智朗 三浦健一郎 神田祥一郎 谷口洋平 長澤武 久富隆太郎 伴英樹 白井陽子 高木陽子 金子直人 石塚喜世伸 近本裕子 秋岡祐子 服部元史
2. 発表標題 当院における小児腎移植後悪性腫瘍の検討
3. 学会等名 第39回日本小児腎不全学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野雄太 北岡寛己 田中裕之 岡田慶太 小川晃太郎 岡本陽子 神田祥一郎 安戸裕貴 張田豊 高橋千恵 岡明 北中幸子
2. 発表標題 著明な成長障害・退行・多発骨折を呈したCYP27B1新規変異を伴うビタミンD依存性くる病1型の1例
3. 学会等名 第51回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----