

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09732

研究課題名(和文) 自然発症腎形成不全マウスを用いた腎尿路発生の遺伝学的機序の解明

研究課題名(英文) Exploration of genetic mechanisms for renal origin using failure of ureteral bud invasion mouse

研究代表者

賀本 敏行 (Kamoto, Toshiyuki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00281098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにddy(Wild type), FUBI-両腎あり、片腎、両腎なし、の4群のゲノムDNAを回収し、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスを行い、mutationやindel比較解析を行った結果、FUBIの原因候補ゲノム領域として35部位を同定している。ddyESおよびFUBIESのマイクロアレイによる遺伝子発現比較解析から、この内2番染色体のものは、37。両方でヒットした遺伝子は、2番染色体のGm14325であるが機能は未定。これはFUBI-両腎あり、片腎、両腎なしの全てで見られることから、ハプロ不全のような制御機構によってFUBI表現系が出現している可能性もある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、FUBIマウスにおける腎形成不全の原因解析を行うことで、ヒトにおける腎尿路発生のメカニズムに迫ることができると考える。最終的には、発生頻度の比較的高い疾患である腎盂尿管移行部狭窄症をはじめとする先天性尿路奇形の原因の一部が解明され、それらの発生に関わる遺伝子群を同定することが出来れば、その早期診断が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We have collected genomic DNA from four groups. Whole-genome sequencing was performed using next-generation sequencers, and mutation and indel comparative analysis was conducted. As a result, we have identified 35 genomic regions as potential candidate regions for the cause of FUBI. Successful establishment of embryonic stem (ES) cells has been achieved from fertilized eggs of ddy and FUBI. Gene expression comparative analysis using microarray technology was performed on ddyES and FUBIES, revealing a difference in the number of probes, with 432 probes showing differences, and 37 of them located on chromosome 2. Considering the observed frequency of alterations in the expression system of FUBI through FUBI breeding and in the mutation of Gm14325 across all FUBI groups (with both kidneys, one kidney, and no kidneys), it is possible that the appearance of the FUBI expression system is regulated by a mechanism similar to haploinsufficiency.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎発生 腎形成不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

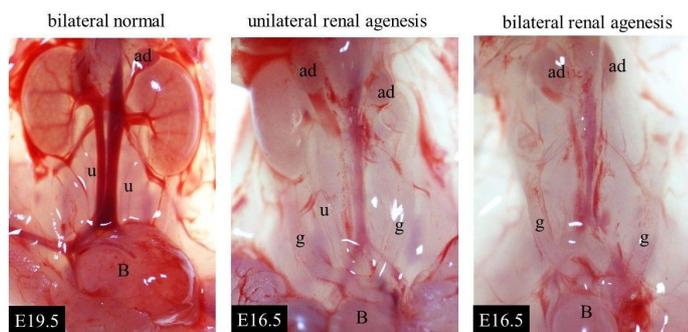
1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける先天性腎形成不全の頻度は3千例に1例程度と報告され、両側の腎を欠く Potter 症候群や、先天的片腎無形成(低形成)などが知られているが、その遺伝的要因に関しては不明である。腎尿管の発生過程には多くの遺伝子が関与し、それらの発現のタイミングや発現量を通じて調節を受けていると考えられている。

我々が所持している FUBI マウス(DDY/Stm ;RBRC00151)は、1990 年代に DDY 近交系マウスを継代中(45 世代以上の兄妹交配)に発見された自然発症の腎形成不全モデルマウスである。遺伝的に、一側ないし両側の腎形成不全が一定の確率で起こるが、腎形成の異常以外に明らかな他臓器の形態異常を伴わない(図 1)。

図1 FUBIマウス胎仔の表現型

これまでの観察から胎生期の腎発生過程における尿管芽が後腎に「侵入」できず、後腎組織がアポトーシスに至り無形成になることが判明している。また、正常腎をもつ近交系マウスとのバッククロス世代の連鎖解析からマウス染色体 2 番に原因遺伝子が存在する可能性が見出されている¹⁾。



Ad; adrenal gland, g; gonad, k; kidney, u; ureteric bud, B; bladder

2. 研究の目的

本研究を通して、FUBI マウスにおける腎形成不全の原因解析を行うことで、ヒトにおける腎尿路発生メカニズムに迫ることができると考える。同定した遺伝子異常による先天性腎尿路奇形の早期診断につなげ、将来的な腎尿路再生医療に応用することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

FUBI マウスと ddY マウスより樹立した ES 細胞において、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、多数の発現に差を認める遺伝子を同定している。それらの発現に差がある遺伝子群から、Mouse Genome Informatics (MGI) のデータベースを用いて、腎形成不全に関与する遺伝子群を用いたパスウェイ解析を行う。

(2) 次世代シーケンサーを用いた腎無形成に関与する遺伝子の同定

Illumina 社の次世代シーケンサーを用いると、全てのエクソンの遺伝子変異を同時に評価できる。我々は、すでに ddY マウスと腎欠損の無い FUBI マウスの DNA を採取し、FUBI マウス特異的遺伝子変異を多数同定している。その中で、腎発生に直接関与する遺伝子を抽出するために、同じ母体(同一腹)からの、両腎、片腎、無腎の胎仔組織における全エクソンシーケンスを行う。それにより、ヘテロでの遺伝子変異や、エピゲノムレベルでの違いを探索し、本モデルにおける腎形成不全に関与している遺伝子群を同定する。

4. 研究成果

(1) ddy および FUBI の受精卵から樹立した ES 細胞である、ddyES および FUBIES のマイクロアレイによる遺伝子発現比較解析から、差のあるプローブ数は 432 あり、この内 2 番染色体のものは 37 であった(図 2)

図 2

ProbelD	GeneSymbol	ddy_ES7_P8_signal	FUBI_ES2_P9_flag	ddy_ES7_P8_flag	FUBI_ES2_P9_flag	compare1_Score	compare1_ratio	Primary Accession	RefSeq Accession	Genbank Accession	UniGene ID	Ensembl ID	TGFR ID	GO	GenomicCoordinates	Cytob and
A_XX_P00000	ExpA	3.3887055	31.60286	A	P	2.046627313	9.32938769	XM_0064	XM_0064	XM_0064					chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpB	3.431857	31.76261	A	P	2.039502774	9.255764781	XM_0111	XM_0111	XM_0111	Mm.2945		TC166	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpC	9.4625885	81.1794	A	P	3.456282286	8.578984492	ENSMUS	XR_8786	XR_8786	Mm.4288	ENSMUS			chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpD	12.70988	108.05254	A	P	3.441638151	8.501460281	NM_145	NM_145	NM_145	Mm.2998	ENSMUS		GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpE	154.88065	154.88065	P	P	3.015660596	6.528466991	NM_009	NM_009	NM_009	Mm.2998	ENSMUS		GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpF	163.3799	1047.64815	P	P	4.714034309	6.412344176	ENSMUS	XM_0111	XM_0111	Mm.2894	ENSMUS	TC164		chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpG	110.55906	602.6815	P	P	3.534490986	5.451217657	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4604	ENSMUS	TC168	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpH	130.8468	622.6666	P	P	3.96769975	4.758745342	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4666	ENSMUS	TC165	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpI	229.09735	939.9236	P	P	3.580138166	4.102725763	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4520	ENSMUS		GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpJ	15.06232	61.086975	A	P	2.247639573	4.05561527	ENSMUS	XM_0064	XM_0064					chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpK	124.1563	494.3413	P	P	2.878297672	3.988437257	NM_015	NM_015	NM_015	Mm.4403	ENSMUS	TC151	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpL	396.85853	1580.416	P	P	3.504500596	3.98231513	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.3993	ENSMUS	TC166	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpM	49.121635	190.8315	P	P	2.824147981	3.884876796	NM_178	NM_178	NM_178	Mm.6018	ENSMUS	TC158	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpN	528.8104	1925.32	P	P	3.614750309	3.640851239	ENSMUS	XM_0111	XM_0111		ENSMUS	TC161		chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpO	49.505965	177.42265	P	P	2.654920697	3.583864086	NM_008	NM_008	NM_008	Mm.2293	ENSMUS	TC172	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpP	866.30305	3020.309	P	P	3.525594863	3.5270372	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4558	ENSMUS	TC168	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpQ	108.47125	344.3366	P	P	2.400384919	3.17454031	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4253	ENSMUS	TC166	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpR	136.3692	410.47795	P	P	2.288798952	3.010548923	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4848	ENSMUS	TC164	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpS	631.7134	1808.2065	P	P	2.93042729	2.862384271	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.3993	ENSMUS	TC151	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpT	214.0945	6083.1825	P	P	4.06820167	2.837180218	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4828	ENSMUS	TC166	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpU	110.039055	297.7947	P	P	2.06558116	2.706252632	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4828	ENSMUS	TC1584923		chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpV	130.63545	350.48805	P	P	2.047410174	2.682947469	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4440	ENSMUS	TC167	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpW	1934.3535	5114.707	P	P	3.794314078	2.644142862	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.4558	ENSMUS	TC164	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpX	4670.1365	11640.97	P	P	3.564602923	2.492460204	NM_026	NM_026	NM_026	Mm.2728	ENSMUS	TC157	GO:0004	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpY	437.4907	1085.2767	P	P	2.302672378	2.486885189	ENSMUS	XM_0064	XM_0064		ENSMUS	TC162	GO:0006	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpZ	1056.9324	2528.244	P	P	2.409881236	2.3702245	ENSMUS	XM_0064	XM_0064	Mm.4918	ENSMUS			chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpAA	578.0237	1360.965	P	P	2.391129629	2.354514183	ENSMUS				ENSMUS			chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpBB	185.2694	415.44265	P	P	2.046219799	2.24237057	NM_009	NM_009	NM_009	Mm.2523	ENSMUS	TC171	GO:0000	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpCC	186.39055	417.41985	P	P	2.042856415	2.239490414	NR_0378	NR_0378	NR_0378	Mm.3303	TC159	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g	
A_XX_P00000	ExpDD	5580.9555	10981.635	P	P	2.64475503	1.967880004	NM_001	NM_001	NM_001	Mm.3308	ENSMUS	NP056		chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpEE	2278.9555	4176.6515	P	P	2.368388453	1.832696239	NM_178	NM_178	NM_178	Mm.1274	ENSMUS	TC174	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpFF	489.19057	211.1125	P	P	-2.137995747	0.431584798	NM_033	NM_033	NM_033	Mm.2458	ENSMUS	TC168	GO:0003	chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpGG	2965.4795	1277.276	P	P	-2.3773993	0.43071483	NR_0284	NR_0284	NR_0284	Mm.4844	ENSMUS			chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpHH	1249.4475	521.24395	P	P	-2.22974615	0.417179593	ENSMUS				ENSMUS			chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpII	3790.465	1566.645	P	P	-2.493118918	0.413312087	ENSMUS				ENSMUS			chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpJJ	27.8924	3.2826095	P	A	-2.075678635	0.117955413	XR_3752	XR_3752	XR_3752					chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g
A_XX_P00000	ExpKK	71.067245	4.628302	P	A	-2.639867141	0.065125671	XR_3751	XR_3751	XR_3751					chr2:xxxxxxxx-xxxxxx	mm12g

(2) これまでに ddy(Wild type), FUBI-両腎あり、片腎、両腎なし、の 4 群のゲノム DNA を回収し、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスを行い、mutation や indel 比較解析を行った結果、FUBI の原因候補ゲノム領域として 35 部位を同定している。(図 3)

図 3

Chrom	Pos	Ref Allele	Alt Allele	ddy	FUBI Bil Normal	Bil Normal-1	Bil Normal-2	Rt Abnormal-1	Rt Abnormal-2	Bil Abnormal-1	Bil Abnormal-2	Gene	Unique Effect	Annotation Impact
chr2	71xxxxxx	GCCCGGC	G	--	GCCCGGC/G	-	GCCCGGC/G	GCCCGGC/G	GCCCGGC/G	GCCCGGC/G	GCCCGGC/G	indelA	splice region variant&	LOW
chr2	85xxxxxx	G	T	--	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	indelB	synonymous variant	LOW
chr2	86xxxxxx	A	T	--	-	-	-	-	-	G/A	G/A	indelC	missense variant	MODERATE
chr2	86xxxxxx	A	T	--	A/T	-	-	A/T	A/T	A/T	A/T	indelC	missense variant	MODERATE
chr2	98xxxxxx	A	C	--	-	-	-	A/G	A/G	A/G	A/G	indelD	missense variant	MODERATE
chr2	175xxxxxx	A	G	--	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	indelE	stop lost&splice rs	HIGH
chr2	175xxxxxx	T	C	--	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	indelE	missense variant	MODERATE
chr2	175xxxxxx	T	C	--	-	-	-	-	-	T/C	T/C	indelF	missense variant,intron	MODERATE
chr2	177xxxxxx	GT	G	--	GT/G	GT/G	GT/G	GT/G	GT/G	GT/G	GT/G	indelG	splice donor variant&in	HIGH
chr2	177xxxxxx	A	AG	--	A/AG	A/AG	A/AG	A/AG	A/AG	A/AG	A/AG	indelH	frameshift variant	HIGH
chr2	177xxxxxx	T	C	--	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	indelI	synonymous variant	LOW
chr2	177xxxxxx	G	C	--	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	indelJ	missense variant,intron	MODERATE
chr2	177xxxxxx	G	C	--	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	indelJ	synonymous variant,int	LOW
chr2	177xxxxxx	C	A	--	C/A	C/A	C/A	C/A	C/A	C/A	C/A	indelJ	missense variant,synon	MODERATE
chr2	177xxxxxx	A	C	--	-	-	-	-	-	A/C	A/C	indelK	missense variant	MODERATE
chr2	177xxxxxx	C	G	--	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	G/C	G/C	indelL	missense variant	MODERATE
chr2	178xxxxxx	G	C	--	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	indelM	missense variant	MODERATE
chr2	178xxxxxx	G	T	--	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	indelM	missense variant	MODERATE
chr2	180xxxxxx	GATCCTGGG	GATCCTGGG	--	GATCCTGGG	GATCCTGGG	GATCCTGGG	GATCCTGGG	GATCCTGGG	GATCCTGGG	GATCCTGGG	indelN	splice acceptor variant	HIGH
chr2	181xxxxxx	G	GGAA	--	G/GGAA	G/GGAA	G/GGAA	G/GGAA	G/GGAA	G/GGAA	G/GGAA	indelO	disruptive.inframe.inse	MODERATE
chr4	144xxxxxx	A	T	--	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	indelP	missense variant,3_prime	MODERATE
chr4	146xxxxxx	A	T	--	-	-	-	-	-	A/T	A/T	indelQ	missense variant,intron	MODERATE
chr4	146xxxxxx	G	A	--	-	-	-	G/A	G/A	G/A	G/A	indelQ	synonymous variant,int	LOW
chr4	147xxxxxx	C	A	--	C/A	-	-	C/A	C/A	C/A	C/A	indelR	missense variant,intron	MODERATE
chr4	147xxxxxx	C	G	--	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	indelS	missense variant,intron	MODERATE
chr4	147xxxxxx	C	A	--	-	-	-	C/A	C/A	C/A	C/A	indelT	missense variant	MODERATE
chr4	147xxxxxx	G	A	--	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	indelU	5_prime UTR premature	LOW
chr4	147xxxxxx	A	T	--	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	indelU	missense variant	MODERATE
chr4	147xxxxxx	T	G	--	T/G	-	-	T/G	T/G	T/G	T/G	indelV	splice region variant&	LOW
chr4	147xxxxxx	A	C	--	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	indelW	missense variant	MODERATE
chr4	156xxxxxx	A	T	--	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	A/T	indelX	missense variant	MODERATE
chr4	156xxxxxx	C	T	--	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	indelY	missense variant	MODERATE
chr12	882xxxxxx	G	A	--	C/A	C/A	C/A	C/A	C/A	C/A	C/A	indelZ	missense variant	MODERATE
chr12	882xxxxxx	G	A	--	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	indelZ	synonymous variant	LOW
chr12	103xxxxxx	C	T	--	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	indelAA	synonymous variant	LOW

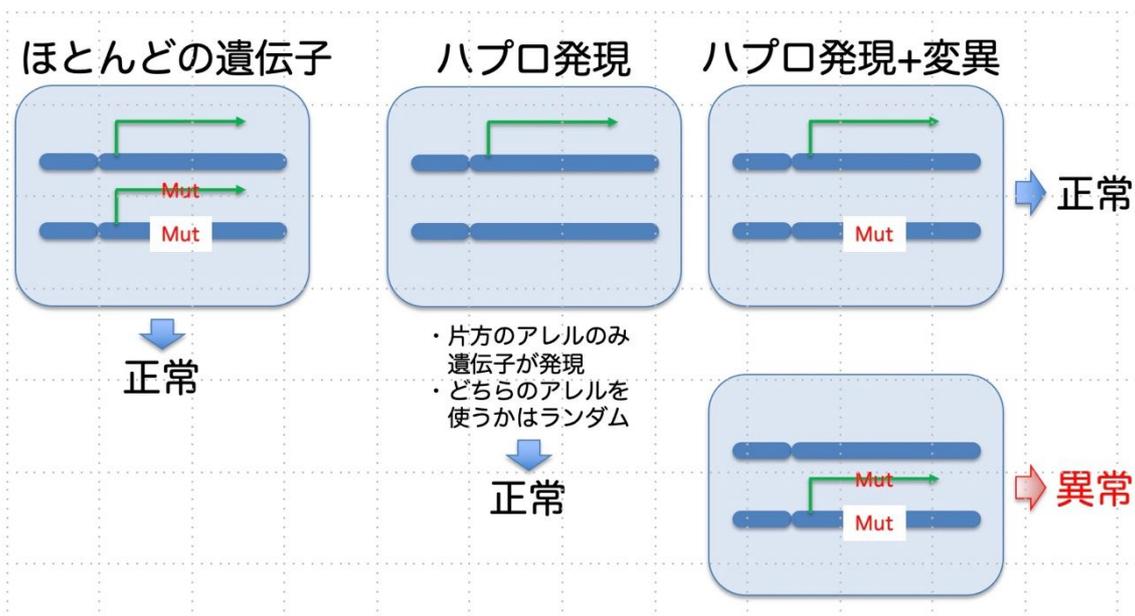
<考察>

バッククロスの連鎖解析の結果 (図 4) の染色体 2 番のマイクロサテライトマーカーと ES 細胞、全ゲノム解析の結果から 遺伝子 Q(ExpQ, 特許申請の可能性があるため非公開) が候補として残ったが、この遺伝子については詳細は解明されていない。

図 4

Table 2. Genome-Wide Screening of the Loci Affecting FUBI Phenotype Using 39 Backcross Mice with Renal Agenesis

同腹であっても両腎、片腎、無腎と明らかに異なる表現型が生じる機序として、ハプロ不全の可能性が考えられる。ハプロ不全とは、「通常二倍体生物が持つ一对の遺伝子のうちの1つに突然変異がおこっても、ほとんどの遺伝子ではもう一方の野生型遺伝子から作られるタンパク質で不足分をまかなえるため、突然変異は潜性になる。しかし例外的に野生型遺伝子1つから作られるタンパク質で量が不足する場合には、全体として機能が不全になって突然変異に起因する表現型がみられる。」現象である。今回の FUBI マウスの次世代シーケンサーによる解析から FUBI の原因候補ゲノム領域として同定した 35 部位の近傍に *Fbn1* 遺伝子座を見出している。*Fbn1* はハプロ不全優性遺伝病であるマルファン症候群の原因遺伝子の一つとされているが、近年 *Fbn1* 遺伝子の DNA メチル化異常が正常 mRNA 量の不足を引き起こすことで発症に至ることが示唆されている²⁾³⁾。これらのことから FUBI マウスにおける腎形成不全の原因にハプロ不全の機構が関与していることは十分に考えられる。



今後、解析子を増やし validation を予定している。

- 1) Kamba T, Higashi S, Kamoto T, et al. Failure of ureteric bud invasion: a new model of renal agenesis in mice. *Am J Pathol.* 159(6):2347-53, 2001
- 2) Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet.* 366:1965-76, 2005.
- 3) Sakai LY, Keene DR, Renard M, et al. FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene.* 591:279-29

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	向井 尚一郎 (Mukai Syoichiro) (10315369)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	
研究分担者	藤井 将人 (Fujii Masato) (10794373)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究分担者	寺田 直樹 (Terada Naoki) (60636637)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	
研究分担者	永井 崇敬 (Nagai Takahiro) (60739994)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究分担者	西野 光一郎 (Nishino Koichiro) (90508144)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------