

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08584

研究課題名（和文）腎臓発生におけるCBWD1の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of CBWD1 in the kidney development

研究代表者

神田 祥一郎（Kanda, Shoichiro）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60632651

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：CBWD1は申請者が見出したCAKUTの新規原因遺伝子である（Kanda S, et al. Journal of the American Society of Nephrology, 2020）。本研究では、CBWD1がどのように腎臓発生に関わっているか明らかにするために解析を行った。CBWD1は尿管芽に発現しているため、Retの発現変化を評価したが、Cbwd1ノックアウトマウスにおいて発現量の変化は認められなかった。次にCBWD1ノックアウトマウス胎仔腎を用いて、RNA-seq解析を行った。Cbwd1ノックアウトにより発現量に変化があった遺伝子は65個確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CBWD1の腎臓発生における役割を明らかにすることを目的に研究を行った。CBWD1ノックアウトにより発生期腎臓で発現量が変動する遺伝子群を見出した点は新規性がある。しかし、これらの遺伝子群の腎臓発生への関わりは明らかにできなかったため、この点は今後の課題である。

一方、CBWD1に関する申請者が執筆した論文（Kanda S, et al. Journal of the American Society of Nephrology, 2020）が他の論文から引用されたり、CBWD1に関する他の研究報告がされたりするようになったことはCBWD1に関係する研究の先駆けとして社会的意義があったと言える。

研究成果の概要（英文）：CBWD1 is a novel causative gene for CAKUT discovered by the applicant (Kanda S, et al. Journal of the American Society of Nephrology, 2020). In this study, we analyzed how CBWD1 is involved in kidney development. Since CBWD1 is expressed in ureteric buds, we evaluated changes in Ret expression, but no changes in expression levels were observed in Cbwd1-knockout mice. Next, RNA-seq analysis was performed using CBWD1 knockout mouse embryonic kidney. Sixty-five genes whose expression level was changed by Cbwd1 knockout were confirmed.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：CBWD1 尿管芽 腎臓発生 先天性腎尿路異常 CAKUT

## 1. 研究開始当初の背景

先天性腎尿路異常 (congenital anomalies of the kidney and urinary tract; CAKUT) は先天性に腎尿路の形態異常を認める疾患の総称である。小児末期腎不全の原因疾患の 40% を占め最も多く、小児腎臓病領域において重要な疾患概念である (Vivante A, et al. Nature Reviews Nephrology, 2016)。末期腎不全に至った場合、維持透析 (腹膜、血液) 腎移植が行われるが、これらの治療は成長期にある小児患者にとっては負担が大きい。新たな腎代替療法として期待される腎再生医療を実現するためにも CAKUT の発症機序の解明、腎臓発生メカニズムの詳細を明らかにすることが望まれる。

腎臓はヒトでは胎生 4 週に発生が始まる。前腎、中腎、後腎の順に形成され、前腎、中腎は消退し、後腎が腎臓として機能する。中腎管が尾側に伸長し、下端から尿管芽が後腎間葉に向かって出芽し後腎の形成が始まる。後腎間葉と尿管芽は相互作用し、後腎間葉は糸球体、尿細管に分化し、尿管芽は分岐を繰り返し集合管、尿管へ分化する。尿管芽の分岐形態形成において GDNF-RET シグナルが中心的な役割を果たしている。後腎間葉から分泌される GDNF は尿管芽に発現する受容体 RET チロシンキナーゼと結合し、下流にシグナルが伝わり尿管芽の分岐、分化が行われる。

CAKUT は胎内環境の影響や遺伝子異常などによって腎臓発生が障害を受け発症する。環境要因としては感染症や薬物の影響などが挙げられる。遺伝子異常としては単一遺伝子異常、エピジェネティックな変化、コピー数多型が知られている (Nicolaou N, et al. Nature Reviews Nephrology, 2015)。CAKUT の原因遺伝子は約 40 種類知られているが、これらの遺伝子異常が CAKUT 患者から見つかる頻度は 10-15% であり、未知の原因遺伝子の存在が示唆される (van der Ven AT, et al. Journal of the American Society of Nephrology, 2018)。

*CBWD1* (Cobalamin Synthetase W Domain-Containing Protein 1) は、申請者が発見した CAKUT の新規原因遺伝子である (Kanda S, et al. Journal of the American Society of Nephrology, 2020)。CAKUT の兄妹を含む 5 名の家族 (他の 3 名は健康) に対し全ゲノムシーケンスを施行し、患者特異的に *CBWD1* 遺伝子の開始コドンを含むエクソン 1 がホモ接合性に欠失していることを見出した。両親はヘテロ接合性欠失だった。*Cbwd1* ノックアウトマウスを 2 種類のライン (*C57BL/6N-Cbwd1em1*, *C57BL/6N-Cbwd1em2*) 作成し解析したところ、*Cbwd1* は尿管芽の細胞核内に発現し、ノックアウトマウスが重複尿管、水腎症など、尿路の異常を呈することが分かった。以上より *Cbwd1* は尿管芽に発現し尿路の発生に寄与し、その遺伝子異常が CAKUT を呈することが分かった。

## 2. 研究の目的

申請者は CAKUT の新規原因遺伝子として *CBWD1* を見出したが、腎臓発生における *CBWD1* の役割は分かっていない。そこで、腎臓発生における *CBWD1* の分子機構を明らかにするために研究を行う。

## 3. 研究の方法

*Gata3* は尿管芽に発現し、*Ret* の発現を制御していることが知られている。

申請者は予備実験において、*Cbwd1* と *Gata3* が *in vivo* (マウス胎仔腎) で共局在していること、*Cbwd1* が *Gata3* と生化学的に結合することを見出した。また、マウス胎仔腎を用いて抗 *Gata3* 抗体と抗 *Cbwd1* 抗体によるクロマチン免疫沈降を行い *Cbwd1* が *Gata3* と共に *Ret* 遺伝子プロモーターに結合することやルシフェラーゼアッセイによって *Cbwd1* が *Gata3* の転写活性を増強することを明らかにしていた。以上より、*CBWD1* が尿管芽において遺伝子発現を制御している可能性が考えられ、以下の実験を行った。

(1) *Cbwd1* ノックアウトマウスにおける *Ret* の発現変化の解析: *Cbwd1* ノックアウトマウスと Wild Type マウスの胎仔腎を用いて、免疫染色法より *Ret* の発現分布や発現量の変化を解析する。

(2) *Cbwd1* が発現制御を行う遺伝子群の解析: *Cbwd1* ノックアウトマウスと Wild Type マウスの胎仔腎を用いて RNA-seq 解析を行い、*Cbwd1* のノックアウトにより発現量が変化する遺伝子群を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) *Cbwd1* ノックアウトマウス (*C57BL/6N-Cbwd1em1*) 胎仔の腎臓と wild type マウス胎仔の腎臓の切片を用いて *Ret* の発現変化を免疫染色法にて評価したが、両者ともに *Ret* は尿管芽に一

致して発現していた。Ret の発現量の明らかな差は認められなかった。

(2) CBWD1 ノックアウトマウスと wild type マウス胎仔の腎臓を用いて、RNA-seq 解析を行った。CBWD1 の発現は wild type マウスでは発現が確認され、ノックアウトマウスではその発現が消失していたことから実験はうまくいっていると評価した。

(1)で行った免疫染色による解析と同様に *Ret* 遺伝子の発現量に差は認められなかった。両者間に有意差があった遺伝子は 65 種類あった。その中でデータベース上で胎生期の腎臓に発現していることが知られているものは 5 つ (*Slc4a1*, *Pkdh111*, *Car2*, *Ren1*, *Spp1*, *Nkx2-2*) 確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shirai Y, Miura K, Kaneko N, Ishizuka K, Endo A, Hashimoto T, Kanda S, Harita Y, Hattori M	4. 巻 22
2. 論文標題 A novel de novo truncating TRIM8 variant associated with childhood-onset focal segmental glomerulosclerosis without epileptic encephalopathy: a case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrol	6. 最初と最後の頁 417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12882-021-02626-1	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 Toyohara M, Kajiho Y, Toyofuku E, Takahashi C, Owada K, Kanda S, Harita Y, Ohnishi H, Wada T, Imai K, Kanegane H, Morio T, Oka A	4. 巻 9
2. 論文標題 An infant with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency presenting with Pneumocystis pneumonia: A case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Case Rep	6. 最初と最後の頁 e05093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ccr3.5093	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 Ikeyama S, Kanda S, Sakamoto S, Sakoda A, Miura K, Yoneda R, Nogi A, Ariji S, Shimoda M, Ono M, Kanda S, Yokoyama S, Takahashi K, Yokoyama Y, Hattori M	4. 巻 11
2. 論文標題 A case of early onset cystinuria in a 4-month-old girl.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Rep	6. 最初と最後の頁 216-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13730-021-00655-1	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 Yabuuchi T, Miura K, Shimizu S, Kaneko N, Ishizuka K, Kanda S, Chikamoto H, Akioka Y, Fujieda M, Hattori M	4. 巻 7
2. 論文標題 Cancer After Pediatric Kidney Transplantation: A Long-term Single-center Experience in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant Direct	6. 最初と最後の頁 e687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TXD.0000000000001137	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 Ota H, Kanda S, Uchida K, Hayashi K, Maezawa M, Matsui H	4. 巻 56
2. 論文標題 Combination therapy of continuous nebulization and high-flow nasal cannula for severe congenital tracheal stenosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatr Pulmonol	6. 最初と最後の頁 455-4056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppul.25670	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 Miura K, Ando T, Kanda S, Hashimoto T, Kaneko N, Ishizuka K, Hamada R, Hataya H, Hotta K, Gotoh Y, Nishiyama K, Hamasaki Y, Shishido S, Fujita N, Hattori M	4. 巻 26
2. 論文標題 Response to steroid and immunosuppressive therapies may predict post-transplant recurrence of steroid-resistant nephrotic syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatr Transplant	6. 最初と最後の頁 e14103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/petr.14103	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 Nakamura M, Kanda S, Kajiho Y, Morisada N, Iijima K, Harita Y	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of 17q12 deletion syndrome that presented antenatally with markedly enlarged kidneys and clinically mimicked autosomal recessive polycystic kidney disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Rep	6. 最初と最後の頁 543-548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-021-00604-y	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 Nakamura M, Kanda S, Yoshioka Y, Takahashi C, Owada K, Kajiho Y, Harita Y, Oka A	4. 巻 9
2. 論文標題 Rituximab-induced serum sickness in a 6-year-old boy with steroid-dependent nephrotic syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CEN Case Rep	6. 最初と最後の頁 173-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-020-00449-x.	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 Kanda S, Ohmura 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 Yamamura T, Horinouchi T, Adachi T, Terakawa M, Takaoka Y, Omachi K, Takasato M, Takaishi K, Shoji T, Onishi Y, Kanazawa Y, Koizumi M, Tomono Y, Sugano A, Shono A, Minamikawa S, Nagano C, Sakakibara N, Ishiko S, Aoto Y, Kamura M, Harita Y, Miura K, Kanda S, Morisada N, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of an exon skipping therapy for X-linked Alport syndrome with truncating variants in COL4A5.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 2777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16605-x.	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 Urae S, Harita Y, Udagawa T, Ode KL, Nagahama M, Kajiho Y, Kanda S, Saito A, Ueda HR, Nangaku M, Oka A	4. 巻 133
2. 論文標題 A cellular model of albumin endocytosis uncovers a link between membrane and nuclear proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Sci	6. 最初と最後の頁 jcs242859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.242859	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 Nakano E, Yoshida A, Miyama Y, Yabuuchi T, Kajiho Y, Kanda S, Miura K, Oka A, Harita Y	4. 巻 65
2. 論文標題 Incomplete cryptic splicing by an intronic mutation of OCRL in patients with partial phenotypes of Lowe syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 831-839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0773-3	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 Takizawa K, Miura K, Kaneko N, Yabuuchi T, Ishizuka K, Kanda S, Harita Y, Akioka Y, Horita S, Taneda S, Honda K, Hattori M	4. 巻 24
2. 論文標題 Renal hypoplasia can be the cause of membranous nephropathy-like lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 813-820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-020-01902-y	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 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	4. 巻 73
2. 論文標題 学校検尿を契機に診断されたPKHD1遺伝子変異を有する多発性嚢胞腎の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児科臨床	6. 最初と最後の頁 1316-1320
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 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 吉田賢弘, 神田祥一郎	4. 巻 28
2. 論文標題 CBWD1欠失によるCAKUT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 発達腎研究会誌	6. 最初と最後の頁 41-43
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, 大村谷昌樹, 赤川浩之, 堀田茂, 吉田賢弘, 金子直人, 菅原典子, 石塚喜世伸, 三浦健一郎, 張田豊, 山本俊至, 岡明, 荒木喜美, 古川徹, 服部元史	4. 巻 35
2. 論文標題 先天性腎尿路異常の新規原因遺伝子の探索 CBWD1の腎発生における役割の解明.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本透析医会雑誌	6. 最初と最後の頁 189-193
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 275
2. 論文標題 先天性腎尿路異常発症の理解のために - 新規原因遺伝子CBWD1の発見.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 902-903
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 83
2. 論文標題 序文 小児科医の将来を考える - あなたは10年後のあなたと向き合えますか	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 987
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 83
2. 論文標題 どんな小児科医になりたい? 大学病院では?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 991-995
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 89
2. 論文標題 発生の障害による奇形 (異形成や低形成)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 295-300
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

先天性腎尿路異常の新規原因遺伝子を発見  
<https://www.h.u-tokyo.ac.jp/participants/research/saishinkenkyu/20200110>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------