

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21385

研究課題名(和文)先天性腎尿路奇形の新規原因遺伝子の同定-CBWD1の腎臓発生における役割-

研究課題名(英文) Identification of a novel gene for congenital anomalies of the kidney and urinary tract - the role 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・助教

研究者番号：60632651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児腎不全の原疾患の中で最も多いものは先天性腎尿路異常である。申請者はその病態を解明するために新規原因遺伝子の探索を行っている。これまでに患者さんの遺伝子解析を行いその候補としてCBWD1を挙げている。本研究ではCBWD1が先天性腎尿路異常の新規原因遺伝子であることの証明、すなわち腎臓発生における役割を明らかにすることを目的とする。腎臓は胎生期に後腎間葉と尿管芽の相互作用により発生する。そこでマウス胎仔を使用し免疫染色を行ったところ、E13.5より尿管芽に発現することを見出した。次にノックアウトマウスを作成した。現在ヘテロマウスまで作成できており現在ホモマウスを解析中である。

研究成果の概要(英文)：Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) is the most frequent cause of pediatric chronic kidney diseases. Better understanding of the pathogenesis requires identification of novel candidate genes. So far we had focused on a gene, CBWD1, as a candidate of a new CAKUT-causing gene. The principal aim of this study was to determine whether CBWD1 plays important roles in the kidney development. Kidney develops through the reciprocal interaction between two kinds of precursors, metanephric mesenchyme and ureteric bud. To reveal the localization of Cbwd1 in the developmental kidney, we created cross sections of the kidneys at several developmental stages and performed immunohistochemistry using anti-Cbwd1 antibody. Then we found that the expression of Cbwd1 was increasing in ureteric bud cells from E13.5. Next we generated knockout mice for Cbwd1 and at now we are investigating the phenotype of Cbwd1(-/-) mice.

研究分野：腎臓発生の基礎と臨床

キーワード：腎臓発生 先天性腎尿路異常

1. 研究開始当初の背景

腎臓はヒトでは胎生 4-5 週、マウスでは胎生 10.5 日頃から、後腎間葉と尿管芽の双方向的相互作用により発生する。遺伝子異常や劣悪な胎内環境、胎内感染症などの要因によって、発生段階に障害を受けると CAKUT が生じる。CAKUT は無形成腎、低形成腎、嚢胞腎などの腎実質異常と重複尿管、水腎症などの尿路異常に分けられるが、いずれも進行すると末期腎不全にいたる。CAKUT は小児慢性腎不全患者の約 40% を占め、小児腎臓病学において解明すべき課題の 1 つである。

申請者は東京女子医科大学腎臓小児科において、常染色体劣性遺伝形式をとる CAKUT 家系に対しエクソーム解析を既に施行している。対象は共に「片側無形成腎、対側低形成腎」と特徴的な臨床症状(共に末期腎不全に至り当科で腎移植を施行)を呈する長男、長女の 2 人と健康コントロールとしての両親、次男の計 5 人である。CAKUT 発症に関わる既知の遺伝子の異常は認められなかった。そこでエクソーム解析で検出された SNP 変異あるいは欠失を、頻度が 1% 以下あるいはこれまで報告のないもの、ホモ接合体変異/欠失あるいは複合ヘテロ接合体変異/欠失の条件で絞ったところ、これまでに報告のないホモ欠失を CBWD1 エクソン 1 に認め、原因遺伝子候補として考えた。さらに、エクソン 1 を挟む形で PCR を施行したところ、患児 2 人のみで CBWD1 のエクソン 1 が検出されなかった。つまり他の家族と異なり、患児 2 人に特異的に CBWD1 が発現していなかった。

2. 研究の目的

CBWD1 が腎臓発生にどのように寄与しているのか、その変異が実際に CAKUT を引き起こすか検証する。

3. 研究の方法

1) Cbwd1 の発現解析: マウス胎仔腎切片を作成し、抗 Cbwd1 抗体を使用し免疫組織染色を行う。

2) Cbwd1 のノックアウトマウス作成: 表現型解析を行う。

4. 研究成果

1) Cbwd1 の発現解析: E11.5, 12.5, 13.5, 14.5, 16.5, P0 マウスの胎仔腎臓の切片を作成し免疫染色を行った。Cbwd1 は E13.5 より尿管芽に発現が始まり徐々に増強してくることが分かった。

2) ノックアウトマウス作成: 兵庫医科大学遺伝学教室の大村谷昌樹先生に依頼し CRISPR/Cas システムを用いて Cbwd1 ノックアウトマウスを作成した。申請者は 2016 年 3 月より東京大学大学院医学系研究科小児科学に異動した。そこで東京大学第二種使用等拡散防止措置(承認番号 31-2)および動物実験計画書(医-P16-009)をそれぞれ申請し、承認を受け、また動物実験講習会、ガイダンスを受講し、動物実験の許可を得た。そのうえで、2016 年 7 月より Cbwd1 ノックアウトマウスの飼育を始めている。現在はホモマウス

を作成し表現型解析を行っているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

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. Altered expression of Crb2 in podocytes expands a variation of CRB2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 32(5):801-809, 2017

Kanda S, Horita S, Yanagihara T, Shimizu A, Hattori M. M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) glomerular staining in pediatric idiopathic membranous nephropathy. *Pediatr Nephrol.* , 32(4):713-717, 2017

Kanda S, Morisada N, Kaneko N, Yabuuchi T, Nawashiro Y, Tada N, Nishiyama K, Miyai T, Sugawara N, Ishizuka K, Chikamoto H, Akioka Y, Iijima K, Hattori M. New-onset diabetes after renal transplantation in a patient with a novel HNF1B mutation. *Pediatr Transplant*, 20(3), 467-71, 2016

神田祥一郎, 多発奇形を伴う嚢胞性腎疾患, 『腎と透析診療指針 2016』東京医学社, 431-34, 2016

神田祥一郎, 服部元史, 浮腫, 『小児科診療ガイドライン-最新の診療指針-』総合医学社, 36-9, 2016

神田祥一郎 巣状分節性糸球体硬化症 『小児疾患診療のための病態生理 2』東京医学社, 515-9, 2016

Ezaki J, Hashimoto K, Asano T, Kanda S, Akioka Y, Hattori M, Yamamoto T, Shibata N. Gonadal tumor in Frasier syndrome: a review and classification. *Cancer Prev Res (Phila).* 8(4), 271-6, 2015

Nishiyama K, Fukushima K, Jo T, Miyai T, Kanda S, Sugawara N, Ishizuka K, Chikamoto H, Akioka Y, Hattori M. SPECT/CT to diagnose pleuroperitoneal communication-associated hydrothorax in peritoneal dialysis. *Kidney International*, 87(4), 866, 2015

[学会発表](計 21 件)

【講演】

神田祥一郎: 腎臓の仕組みと発生 - 先天

性腎尿路奇形の原因解明に向けて -、東京女子医科大学第34回公開健康講座、「本当に腎臓ってできるの？」 - 腎臓再生医療の夢と実現 -、京王プラザホテル(東京都、新宿区) 10月8日、2016

神田祥一郎、服部元史:肝・胆・脾の異常、ワークショップ「腎発生にかかわる遺伝子の異常と新たな腎外病変 ~ Expanding Clinical Spectrum in Renal Dysplasia ~」、第59回日本腎臓学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 6月17日-19日、2016

神田祥一郎:若手小児科医による研究活性化の取組 大学病院から - 腎臓発生の包括的理解に向けて -、総合シンポジウム「小児科における研究活性化を目指して」、第119回日本小児科学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸術文化の館(北海道、札幌市) 5月13-15日、2016

(2015年)

神田祥一郎:Sal11による腎臓発生機序の解明、森田賞受賞講演、第50回小児腎臓病学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市) 6月18日-20日、2015

【国際学会発表】

(2016年)

Kanda S, Morisada N, Ishizuka K, Chikamoto H, Akioka Y, Miura K, Iijima K, Hattori M, Genital organ anomalies in female pediatric patients with end-stage renal disease, 17th Congress of the International Pediatric Nephrology Association, Iguacu (Brazil), September 20-24, 2016

Kanda S, Morisada N, Kaneko N, Yabuuchi T, Nawashiro Y, Tada N, Nishiyama K, Miyai T, Sugawara N, Ishizuka K, Akioka Y, Iijima K, Hattori M: NODAT in a pediatric patient with a novel mutation of HNF1B. Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting 2016, KFC hall (Japan, Tokyo, Sumida-ku) April 8-9, 2016

(2015年)

Kanda S, Morisada N, Takizawa K, Tomii Y, Kaneko N, Yabuuchi T, Hama H, Nakano E, Tada N, Ishizuka K, Chikamoto H, Akioka Y, Iijima K, Hattori M, Genital organ anomalies in female pediatric patients with end-stage renal disease, Kidney Week 2015, San Diego (USA), November 3-8, 2015

【国内学会発表】

(2016年)

神田祥一郎 堀田茂 柳原剛 秋岡祐子 新田孝作 清水章 服部元史、小児膜性腎症

症例における原因抗原の検討、第46回日本腎臓学会東部学術大会、京王プラザホテル(東京都、新宿区) 10月7-8日、2016

神田祥一郎 滝澤慶一 富井祐治 笹田洋平 金子直人 藪内智朗 佐藤泰征 石塚喜世伸 近本裕子 三浦健一郎 秋岡祐子 服部元史、織毛病患者の診療における問題点、第24回嚢胞性腎疾患研究会、京王プラザホテル(東京都、新宿区) 10月6日、2016

神田祥一郎 森貞直哉 滝澤慶一 富井祐治 藪内智朗 金子直人 濱浩隆 中野栄治 多田憲正 石塚喜世伸 近本裕子 秋岡祐子 飯島一誠 服部元史、家族歴と腎外症状により原因遺伝子を同定できた先天性腎尿路異常(congenital anomalies of the kidney and urinary tract: CAKUT)の1例、第22回東京小児医学研究会、東京大学医学部附属病院(東京都、文京区) 9月17日、2016

神田祥一郎 森貞直哉 滝澤慶一 富井祐治 笹田洋平 金子直人 藪内智朗 佐藤泰征 石塚喜世伸 近本裕子 三浦健一郎 飯島一誠 服部元史、女性先天性腎尿路異常(Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: CAKUT)患者の生殖器異常合併について、第25回発達腎研究会、聖路加国際大学 大村進・美枝子記念 聖路加臨床学術センター(東京都、中央区) 8月27日、2016

神田祥一郎、検尿異常を見たら:学校検尿と3歳児検尿について、“知っておきたい”小児診療トピックス 2016 夏、東京大学医学部附属病院(東京都、文京区) 7月17日、2016

神田祥一郎 森貞直哉 滝澤慶一 富井祐治 濱浩隆 金子直人 藪内智朗 中野栄治 多田憲正 石塚喜世伸 三浦健一郎 近本裕子 秋岡祐子 飯島一誠 服部元史、女性先天性腎尿路奇形(Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: CAKUT)患者の生殖器奇形合併について、第51回日本小児腎臓病学会学術総会、ウインクあいち(愛知県、名古屋市) 7月7-9日、2016

神田祥一郎 滝澤慶一 富井祐治 濱浩隆 金子直人 藪内智朗 中野栄治 多田憲正 石塚喜世伸 三浦健一郎 近本裕子 秋岡祐子 服部元史、織毛病患者の臨床的特徴 - 診断の問題点 -、第51回日本小児腎臓病学会学術集会、ウインクあいち(愛知県、名古屋市) 7月7-9日、2016

神田祥一郎 石塚喜世伸 近本裕子 秋岡祐子 服部元史、織毛病患者の臨床的特徴、

第 59 回日本腎臓学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 6月17日-19日、2016

(2015年)

神田祥一郎 森貞直哉 秋岡祐子 滝澤慶一 富井祐治 金子直人 藪内智朗 濱浩隆 中野栄治 多田憲正 石塚喜世伸 近本裕子 飯島一誠 服部元史、HNF1 α 変異が同定された NODAT(New-Onset Diabetes After Transplantation)の1例、第45回日本腎臓学会東部学術大会、東京ミッドタウン(東京都、港区) 10月2日-3日、2015

神田祥一郎 森貞直哉 滝澤慶一 富井祐治 藪内智朗 金子直人 濱浩隆 中野栄治 多田憲正 石塚喜世伸 近本裕子 秋岡祐子 飯島一誠 服部元史、家族歴と腎外症状により原因遺伝子を同定できた多嚢胞性異形成腎の1例、第23回嚢胞性腎疾患研究会、虎の門病院分院(神奈川県、川崎市) 9月5日、2015

神田祥一郎 森貞直哉 秋岡祐子 金子直人 苗代有鈴 藪内智朗 多田憲正 宮井貴之菅原典子 石塚喜世伸 近本裕子 飯島一誠 服部元史、肝酵素上昇を契機に診断した ADTKD(Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease)-HNF1Bの1例、第38回日本小児遺伝学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 7月25日-27日、2015

神田祥一郎 森貞直哉 秋岡祐子 金子直人 苗代有鈴 藪内智朗 多田憲正 宮井貴之菅原典子 石塚喜世伸 近本裕子 飯島一誠 服部元史肝酵素上昇を契機に ADTKD (Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease)-HNF1Bと診断した1例、第24回小児泌尿器科学会総会・学術集会、御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター(東京都、文京区) 7月1日-3日、2015

神田祥一郎 森貞直哉 秋岡祐子 金子直人 苗代有鈴 藪内智朗 多田憲正 宮井貴之菅原典子 石塚喜世伸 近本裕子 飯島一誠 服部元史、肝酵素上昇を契機に HNF1 β 変異が同定された CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract)の1例、第50回小児腎臓病学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市) 6月18日-20日、2015

④神田祥一郎 柳原剛 堀田茂 金子直人 苗代有鈴 藪内智朗 多田憲正 宮井貴之菅原典子 石塚喜世伸 近本裕子 秋岡祐子 新田孝作 清水章服部元史、小児膜性腎症における PLA2R の関与について(続報) 第50回小児腎臓病学会学術集会、神戸国際

会議場(兵庫県、神戸市) 6月18日-20日、2015

〔図書〕(計1件)

・神田祥一郎、服部元史、嚢胞性腎疾患の分類と嚢胞病、ネフロン嚢、常染色体優性尿管間質性腎疾患、Bardet-Biedl 症候群、Joubert 症候群および Joubert 症候群関連疾患、Meckel-Gruber 症候群、OFD 症候群1型、結節性硬化症、von Hippel-Lindau 病、多嚢胞性異形成腎、糸球体嚢胞性腎疾患、多房性腎嚢胞、『多発性嚢胞腎～進化する治療最前線～』、医薬ジャーナル社、278-333、2015
〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()