

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390240

研究課題名（和文） CNV解析による先天性腎尿路奇形の新規原因遺伝子同定と遺伝子診断システムの確立

研究課題名（英文） Identification of novel genes for congenital anomalies of Kidney and urinary tract (CAKUT) by CNV analyses and development of comprehensive gene testing for CAKUT

研究代表者

飯島 一誠 (IIJIMA KAZUMOTO)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00240854

研究成果の概要（和文）：本研究は、小児期腎不全の主要な原因である先天性腎尿路奇形（Congenital anomalies of kidney and urinary tract: CAKUT）を対象に、遺伝子欠失、重複などが頻繁に起こる copy number variation (CNV)領域を、世界最高水準の解析技術を用いて網羅的・系統的に解析することにより、CAKUT の新規原因遺伝子の同定を行うとともに、包括的 CAKUT 遺伝子診断システムを確立することを目的とする。我々は、腎低形成、腎異形成、多嚢胞性異形成腎、腎無形成などの CAKUT 症例を対象として、全染色体の CNV 領域を中心とした 35 万個のプローブ（プローブ間隔：約 1kb）を持つ Agilent genome-wide CNV 400k array 等を用いて CNV を検出した。このうち、CAKUT 症例にのみ認められコントロールには認められず、さらに、複数のデータベースでも検出されていない 4 つの CNV を発見し、これらの CNV 領域内あるいは近傍に存在する 8 つの遺伝子を同定した。このうちの一つの遺伝子は、CAKUT 特有の CNV により 3 エクソンのヘテロの欠失が生じることが明らかになった。今後、これらの遺伝子が新規 CAKUT 原因遺伝子であるか否かの検討を進める予定である。これと平行して、我々は、*HNF1B*, *PAX2*, *EYAL*, *SIX1*, *SALL1* などの比較的頻度の高い CAKUT 原因遺伝子の簡便で検出頻度の高い包括的遺伝子診断システムを構築した。

研究成果の概要（英文）：Copy number variation (CNV) of human genome is associated with several diseases including congenital anomalies. To identify new genes responsible for congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT), we utilized Agilent genome-wide CNV 400k array. We identified 4 CNV regions, which were not detected in healthy controls and CNV databases. We found 8 genes within or around these CNV regions. Of these genes, we identified a gene in which a CAKUT-specific heterozygous deletion resulted in deletion of 3 exons. We will analyze whether these genes are responsible for CAKUT. We developed comprehensive gene testing systems for known CAKUT genes (*HNF1B*, *PAX2*, *EYAL*, *SIX1*, *SALL1*) using multiplex ligation-dependent probe amplification and mRNA level analysis as well as direct sequencing of genomic DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：小児科学・腎臓学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：先天性腎尿路奇形、CNV解析、原因遺伝子

1. 研究開始当初の背景

先天性腎尿路奇形 (CAKUT) は 500 人に 1 人程度の高頻度で生じる先天奇形であり、小児期腎不全の原因として最も頻度が高く、その発症機序の解明や診断・治療法の開発が強く望まれている。CAKUT の発症機序として、胎児期の尿路再開通時の異常や異常血管による尿路閉塞、尿管芽と後腎組織の発生・分化異常などがあげられるが、後者の原因として、尿管芽と後腎組織の発生・分化に関わる遺伝子異常が重要と考えられている。

CAKUT の原因遺伝子として、*HNF1B* (Renal cyst and diabetes 症候群の原因遺伝子)、*PAX2* (Renal coloboma 症候群の原因遺伝子)、*EYAI*, *SIX1* (Branchio-oto-renal (BOR) 症候群の原因遺伝子)、*SALL1* (Townes-Brocks 症候群の原因遺伝子) などの主に転写因子および転写調節因子をコードする遺伝子が同定され、我々は、わが国の CAKUT 症例を対象に、これらの遺伝子変異解析研究を行ってきた (*J Am Soc Nephrol* 12:1769-1772,2001, *Pediatr Nephrol* 21:475-481,2006, *Am J Med Genet A* 143:1087-1090,2007, etc)。

しかし、これらの遺伝子変異が検出されるのは 15%程度にすぎず、大半の CAKUT 症例では依然としてその原因遺伝子は不明である。また、新規原因遺伝子を含めた CAKUT 遺伝子診断システムの確立も臨床的に極めて重要な命題である。

既知の CAKUT 原因遺伝子は、腎尿路に異常を呈するノックアウトマウスのヒトホモログとして、あるいは大家系を用いた連鎖解析法により同定されてきた。しかし、候補遺伝子が不明なまま網羅的にノックアウトマウスを作成するのは非現実的アプローチであること、CAKUT 症例は大半が非家族性 (散發性) で家族性症例は極めてまれであることから、今後、新規原因遺伝子を効率よく同定するためには、主に非家族性 CAKUT 症例を対象とした網羅的・系統的な遺伝子解析が必要である。

ヒトゲノムには多様性のあることはよく知られているが、最近、SNP(一塩基多型)やマイクロサテライトなどの既知の多型に加

えて、遺伝子コピー数に想像以上の多様性があることが示され、copy number variation (CNV) と呼ばれ脚光をあびている。CNV 領域は複雑な構造多型を持つヒトゲノム上の領域で、タンデムリピートが多い故に、遺伝子の重複、欠失、逆位などが頻繁に起こり、そのために遺伝子コピー数の多様性が生じる領域である。

CAKUT の原因となる既知の遺伝子異常は、そのほとんどがヘテロの遺伝子変異であるが、最近、全欠失を含む遺伝子欠失が比較的高頻度で認められることが明らかとなった。また、monosomy や trisomy 等の染色体異常に高率に CAKUT が合併することはよく知られた事実であり (*Mol Genet Metab* 82:173-179,2004, etc)、遺伝子コピー数の異常が CAKUT 発症に大きく関与している可能性は極めて高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、小児期腎不全の主要な原因である CAKUT 症例を対象に、遺伝子欠失、重複などが頻繁に起こる CNV 領域を、世界最高水準の解析技術を用いて網羅的・系統的に解析することにより、CAKUT の新規原因遺伝子の同定を行うとともに、新規遺伝子を含めた CAKUT 遺伝子診断システムを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

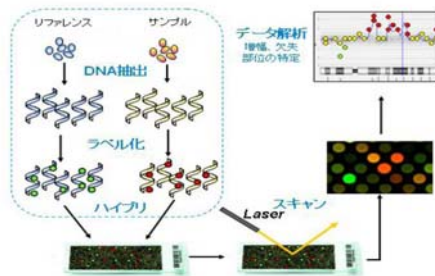
(1) CAKUT 症例およびゲノム DNA の収集
国立成育医療研究センター及び神戸大学小児科を中心とした施設から CAKUT 症例及びゲノム DNA n 収集を行った。

(2) CNV 解析チップを用いたコピー数異常遺伝子の同定と候補遺伝子のしぼり込み
一次スクリーニングとして、全染色体の CNV 領域を中心とした 35 万個のプロープ (プロープ間隔: 約 1kb) を持つ Agilent CNV 400k array を使い、健常コントロール及び CAKUT 症例の CNV を検出し、コントロールでは認められない領域を抽出した。その後、二次スクリーニングとして、抽出された CNV

領域を約 10 倍密度でプロット可能な Custom array を作成し、CAKUT 特有の CNV であることを確認した。(図 1 参照)

その作業中に、Welcome Trust Case-Control Consortium(WTCCC)論文データが発表されたため、我々の検出した CNV 領域を、WTCCC データ及び Database of Genomic Variants

図 1. array CGH 実験概要



(DGV)のデータベースとの比較することにより、真の rare CNV と考えられる領域を同定し、その領域内あるいはその近傍に存在する遺伝子新規 CAKUT 候補遺伝子として同定した。

(3) 候補遺伝子の発現パターンや発現時期の確認

ヒト胎児 cDNA ライブラリー等を用いて、胎児期の各臓器での候補遺伝子の発現パターンを検討し、特に腎での発現の有無を確認した。

(4) 包括的な CAKUT 遺伝子診断システムの開発

CAKUT の既知遺伝子に関して、簡便で検出頻度の高い遺伝子変異検出法の開発を行った。

4. 研究成果

(1) CAKUT 症例およびゲノム DNA の収集

Agilent genome-wide CNV 400k array を用いた CNV 候補領域の一次スクリーニングは、健常コントロール 34 例と CAKUT 症例 52 例を対象とした。二次スクリーニングは、さらに対象を増やし、健常コントロール 55 例と CAKUT 症例 69 例を対象とした。

(2) CNV 解析チップを用いたコピー数異常遺伝子の同定と候補遺伝子のしぼり込み

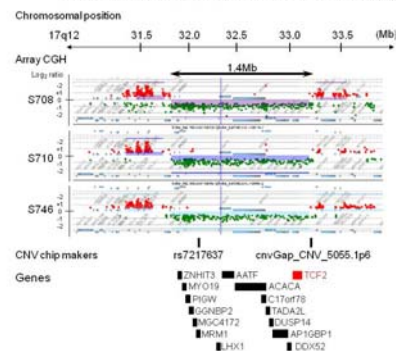
一次スクリーニング、二次スクリーニングともに、Reference DNA は、HAPMAP DNA NA19000 (Japanese Male)を用いた。一次スクリーニングで約 40 の CAKUT 特有の CNV 領域を同定した。

二次スクリーニングで、CAKUT 特有の CNV を複数確認したが、その作業中に WTCCC データが報告されたため、改めて、データの見直しを行い、WTCCC データで報告されている CNV 及び DGV データベースのサンプル数 100 以上の解析で頻度が 2.5% 以上と報告されている CNV を除いた CNV を、CAKUT 特有の rare CNV と定義したところ、4 つの CNV 領域が同定された。この 4 つの CNV 領域内あるいは近傍には計 8 個の遺伝子が存在していた。

なお、この解析過程で、多嚢胞性異形成腎 (MCDK)症例で、高頻度に *HNF1B* を含む 1.4MB のヘテロの欠失を認めることを明らかにした (Nakayama et al. *Pediatr Nephrol*, 25(6):1073-1079, 2010) (図 2)。

現在、我々は、8 つの候補遺伝子の中の一つの遺伝子 X に注目して解析中である。上記の CAKUT 症例特有の CNV により、2 例の CAKUT 患者でヘテロの 98 kB の欠失が生じ

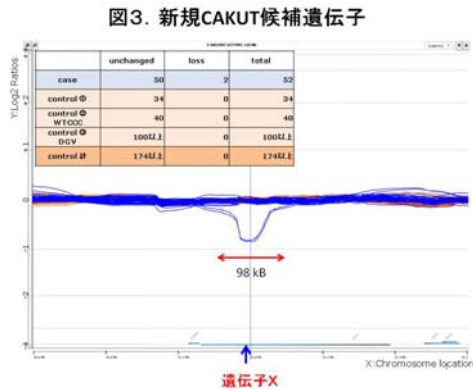
図 2. MCDK 症例における 1.4 MB ヘテロ欠失



るのだが、この欠失は遺伝子 X 内の欠失であった。遺伝子 X は蛋白をコードする遺伝子であり、この欠失により 3 つのエクソンが欠失し、それにより premature stop codon が生じることが予測され、蛋白の機能に何らかの影響が生じる変異であろうと考えられた (図 3)。

(3) 候補遺伝子の発現パターンや発現時期の確認

ヒト胎児 cDNA ライブラリー等を用いて、胎児期の各臓器での候補遺伝子の発現パ



ーンを検討したところ、我々が注目している遺伝子 X では胎生期の腎を含む複数の臓器で発現しており、胎児期の臓器形成に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

(4) 包括的な CAKUT 遺伝子診断システムの開発

現在のところ、CAKUT 新規原因遺伝子の同定には至っていないが、既知の CAKUT 原因遺伝子に関する簡便で検出頻度の高い遺伝子変異検出法の開発を行った。

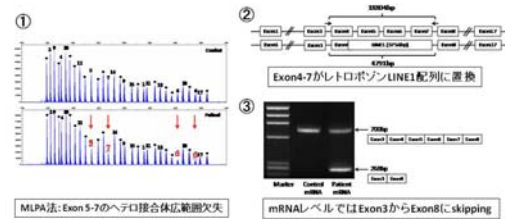
比較的検出頻度の高いと思われる *NHF1B*, *PAX2*, *EYAI*, *SIX1*, *SALL1* を対象として、ゲノム DNA の直接シーケンス法だけではなく、エクソンレベルでの広範囲欠失を検出できる Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法、スプライシング異常を検出可能な mRNA レベルでの解析法も加えた包括的な遺伝子診断システムを開発した。

図 4 に、MLPA 法及び mRNA レベルでの解析が遺伝子変異同定に有用であった *EYAI* 遺伝子変異症例を示す(Morisada et al. *Pediatr Nephrol* 25(7):1343-1348, 2010)。

今後、遺伝子 X を含めた新規 CAKUT 候補遺伝子の解析を進め、新規 CAKUT 原因遺伝子も含めた包括的 CAKUT 遺伝子診断システムを構築する予定である。

図4. 簡便で変異検出頻度の高いEYAI遺伝子診断法の開発

MLPA法を導入することによって直接シーケンス法では検出できないエクソンレベルの欠失を検出することに成功した。さらに mRNA レベルでエクソンスキッピングを証明した。



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 13 件)

- Lo YF, Nozu K, Iijima K, Morishita T, Huang CC, Yang SS, Sytwu HK, Fang YW, Tseng MH, Lin SH. Recurrent Deep Intronic Mutations in the *SLC12A3* Gene Responsible for Gitelman's Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 6(3):630-639, 2011
- Nozu K, Iijima K, Kanda K, Nakanishi K, Yoshikawa N, Satomura K, Kaito H, Hashimura Y, Ninchoji T, Komatsu H, Kamei K, Miyashita R, Kugo M, Ohashi H, Yamazaki H, Mabe H, Otsubo A, Igarashi T, Matsuo M. The Pharmacological Characteristics of Molecular-Based Inherited Salt-Losing Tubulopathies. *J Clin Endocrinol Metab*. 95(12):E511-518, 2010
- Iijima K, Nozu K, Kamei K, Nakayama M, Ito S, Matsuoka K, Ogata T, Kaito H, Nakanishi K, Matsuo M. Severe Alport syndrome in a young woman caused by a t(X;1)(q22.3;p36.32) balanced translocation. *Pediatr Nephrol*. 25(10):2165-2170, 2010
- Nakayama M, Nozu K, Goto Y, Kamei K, Ito S, Sato H, Emi M, Nakanishi K, Tuchiya S, Iijima K. *HNF1B* Alterations Associated with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. *Pediatr Nephrol*, 25(6):1073-1079, 2010
- Morisada N, Rendtorff ND, Nozu K, Morishita T, Miyakawa T, Matsumoto T, Hisano S, Iijima K, Tranebjærg L, Shirahata

- A, Matsuo M, Kusuhara K. Branchio-oto-renal syndrome caused by partial EYA1 deletion due to LINE-1 insertion. *Pediatr Nephrol* 25(7):1343-1348, 2010
6. Kanda K, Nozu K, Yokoyama N, Morioka I, Miwa A, Hashimura Y, Kaito H, Iijima K, Matsuo M. Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1 with a novel splice site mutation in MR gene. *BMC Nephrol* 14;10:37, 2009
 7. Nozu K, Iijima K, Nozu Y, Ikegami E, Imai T, Fu XJ, Kaito H, Nakanishi K, Yoshikawa N, Matsuo M. A deep intronic mutation in the SLC12A3 gene leads to Gitelman syndrome. *Pediatr Res* 66(5):590-593, 2009
 8. Nozu K, Iijima K, Kawai K, Nozu Y, Nishida A, Takeshima Y, Fu XJ, Hashimura Y, Kaito H, Nakanishi K, Yoshikawa N, Matsuo M. In vivo and in vitro splicing assay of SLC12A1 in an antenatal salt-losing tubulopathy patient with an intronic mutation. *Hum Genet* 126(4):533-538, 2009
 9. Hashimura Y, Nozu K, Kanegane H, Miyawaki T, Hayakawa A, Yoshikawa N, Nakanishi K, Takemoto M, Iijima K, Matsuo M. Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Pediatr Nephrol* 24(6):1181-1186, 2009
 10. Yamazaki H, Nozu K, Narita I, Nagata M, Nozu Y, Fu XJ, Matsuo M, Iijima K, Gejyo F. Atypical phenotype of type I Bartter syndrome accompanied by focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 24(2):415-418, 2009
 11. Kitamura A, Tsukaguchi H, Maruyama K, Shono A, Iijima K, Kagami S, Doi T. Steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 74(9):1209-1215, 2008
 12. Nozu K, Przybyslaw Krol R, Ohtsuka Y, Nakanishi K, Yoshikawa N, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, Hashimura Y, Hamasaki Y, Iijima K, Matsuo M. Detection of large deletion mutations in the COL4A5 gene of female Alport syndrome patients. *Pediatr Nephrol.* 23(11):2085-2090, 2008.
 13. Krol RP, Nozu K, Nakanishi K, Iijima K, Takeshima Y, Fu XJ, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, Matsuo M, Yoshikawa N. Somatic mosaicism for a mutation of the COL4A5 gene is a cause of mild phenotype male Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 23(8):2525-3250, 2008.
- [学会発表] (計 5 件)
1. 飯島一誠, 野津寛大, 中山真紀子. 「CAKUTに対する治療戦略」CAKUTと遺伝子変異. 第 32 回日本小児腎不全学会学術集会, 2010
 2. Iijima K, Oka M, Hashimura Y, Ohtsuka Y, Kaito H, Sado Y, Yan K, Nakanishi K, Yoshikawa N, Nagasako H, Nozu K, Matsuo M. Clinical and Immunohistochemical Analyses of Japanese Families with Genetically-Defined Autosomal-Recessive Alport Syndrome. American Society of Nephrology 2010 Annual Meeting, 2010
 3. Nozu K, Iijima K, Kaito H, Hashimura Y, Ninchoji T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Matsuo M. A Deep Intronic Mutation in the SLC12A3 Gene leads to Gitelman Syndrome. American Society of Nephrology 2009 Annual Meeting, 2009
 4. Nakayama M, Nozu K, Goto Y, Kamei K, Sato H, Emi M, Iijima K. TCF2 Mutation in Patients with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT). American Society of Nephrology 2008 Annual Meeting, 2008
 5. Hashimura Y, Nozu K, Kanda K, Takeshima Y, Hayakawa A, Iijima K, Matsuo M. The First Case of Minimal Change Nephrotic Syndrome Associated with Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked (IPEX) Syndrome. American Society of Nephrology 2008 Annual Meeting, 2008

〔図書〕（計 1 件）

1. 中山真紀子, 野津寛大, 飯島一誠（御手洗哲也, 東原英二, 秋澤忠男, 五十嵐隆, 金井好克編）中外医学社, Annual Review 腎臓 2010 小児科領域 TCF2 遺伝子異常と先天性腎尿路奇形. 2010, p212-218

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 一誠 (IIJIMA KAZUMOTO)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00240854

(2) 研究分担者

長田 道夫 (NAGATA MICHIO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：10192238

(3) 連携研究者

中山 真紀子 (NAKAYAMA MAKIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生
研究者番号：80469999

森貞 直哉 (MORISADA NAOYA)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00389446

野津 寛大 (NOZU KANDAI)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70362796

橋村 裕也 (HASHIMURA YUYA)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80457077