

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860862

研究課題名(和文) 腎尿路奇形疾患のゲノム情報を基盤とした新しいヒトネフロン分化誘導系の構築

研究課題名(英文) Genome-wide approaches for CAKUT to understand molecular mechanisms of human renal development

研究代表者

庄野 朱美 (Shono, Akemi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・技術補佐員

研究者番号：10535066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：2年間において、下記の成果を得た。1) 本邦CAKUT症例の収集・疫学調査を実施し、187家系206症例を収集した(syndromic CAKUT：105家系115症例、non-syndromic CAKUT：82家系91症例)。2) 臨床表現型分類をもとに、44家系62症例について、網羅的遺伝子解析(シークエンス・次世代シークエンシング(NGS)・マイクロアレイ解析)を行い、責任遺伝子・領域を同定した。3) カスタム疾患パネルを用いたNGS解析により、臨床表現型から候補遺伝子の同定が困難であった症例についても、既報遺伝子やマウスのCAKUTで報告されている遺伝子など、候補遺伝子を絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：This study was approved by the ethics committee of Kobe University and the informed consents were obtained from all participants. Here we report three major results from 2013 to 2014 as shown in below.

1) Two hundred six cases including 115 cases from 105 families of syndromic CAKUT and 91 cases from 82 families of non-syndromic CAKUT, together with some indistinguishable cases from CAKUT, were collected and classified by the clinical phenotypes. 2) Responsible genes and genetic regions for 62 cases from 44 families were identified using the Sanger sequencing in combination with the next generation sequencing (NGS) and the DNA microarray. 3) Further NGS approach using a CAKUT-specific panel we originally developed was helpful to identify responsible/candidate genes which were unpredictable from the clinical phenotypes.

研究分野：腎臓発生・再生

キーワード：腎尿路奇形 CAKUT 腎発生 腎系譜 網羅的遺伝子解析 次世代シーケンサー解析 腎再生 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

山中らの iPS 細胞の発見 (Takahashi et al., 2006) により、難治性疾患の再生治療に期待が集まっている。これまで困難とされてきたネフロン再生についても例外ではない。ヒト腎臓の器官再生を実現するためには、その発生過程のより詳細な理解が必要である。

(2) 未解決の問題

現在、腎発生に関する知見の多くがマウス等動物データを基盤としたものであり、ヒトげっ歯類間の臓器形態、大きさ、発達速度の種差についての情報は未だ不足している。したがって、今後ヒトとマウスの発生制御の情報を相互に補完し、ヒト腎再生に向けた応用的展開が大切である。

(3) 先天性腎尿路奇形 (CAKUT: congenital anomalies of the kidney and urinary tract)

ヒト CAKUT は、500 人に 1 人の頻度で発生する腎尿路奇形を伴う先天性疾患の総称で、小児において慢性腎不全の原因の 30-50%、末期腎不全に至る原因の 30% を占める。

その臨床表現型は腎尿路のみの症状でも多岐に渡っているが (腎異常 (腎低形成、腎異形成)、尿路異常 (水腎症、巨大尿管)、膀胱異常 (膀胱尿管逆流 (VUR: Vesicoureteral Reflux) など)、腎尿路以外の症状 (神経、眼、耳、四肢異常など) を伴う家族性の症例も少なくない。ヒトで単一遺伝子に起因する CAKUT の 10% は PAX2 変異とされ、その他 HNF1B、EYA1 等が報告されている (図)。

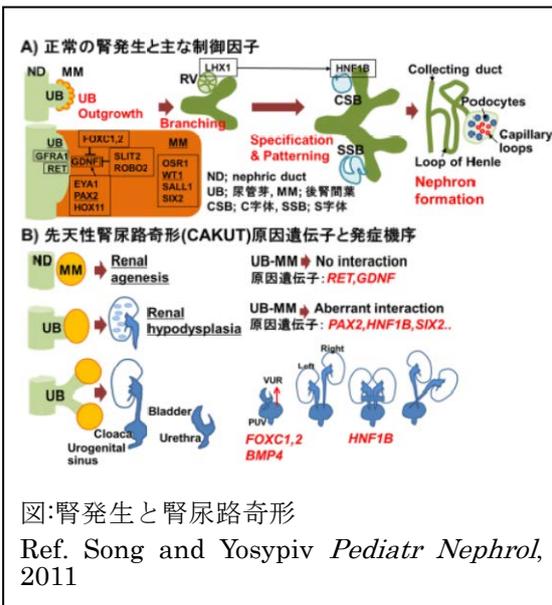


図:腎発生と腎尿路奇形

Ref. Song and Yosypiv *Pediatr Nephrol*, 2011

マウスでの尿細管形成には Wnt, Shh によるシグナル調節が、糸球体形成では Pax2, Sall1 などの腎発生必須因子が報告されている。多くの共通点も存在する一方、ヒト腎臓は胎生期が長く倫理的にも局在解析が困難であるため、転写因子、形態形成因子、エピジェネ

ティクス制御の包括的理解が情報不足のため、遅れている。

2. 研究の目的

(1) 概要

本研究では、CAKUT の疾患機序に関わるヒト腎特異的な発生制御因子群とその相互作用の情報を活用し、新たな腎系譜分化誘導法の構築を目指す。

(2) 研究開始当初の腎発生・再生研究の動向

① マウスによる系譜追跡技術を用いた腎前駆細胞特性解析 (Kobayashi et al., 2008) : Six2 発現細胞群がほとんどすべてのネフロン構成細胞への多分可能をもつ腎前駆細胞であることが明らかになった。

② マウス腎系譜特異的遺伝子発現プロファイルの作成 (GUDMAP) : 1) 腎系譜レポーターマウスやレーザーマイクロディセクション法を用いた目的細胞の単離とその網羅的遺伝子発現解析、2) in situ hybridization 法を用いたマウス腎発生における経時的発現解析を行い、腎系譜関連遺伝子の発現プロファイルを世界の研究者が協力して完成させた。

③ マウス腎前駆細胞の長期培養系の構築 (Lusis et al., 2010) : FGF2, EGF, IGF-1, thrombin を添加した浮遊培養法 (nephrosphere) を開発し、それにより腎前駆細胞群を長期培養できる可能性を示した。

④ マウスモデルを用いたネフロン発生制御因子探索 (Fujimura et al., 2010)

⑤ レポーターヒト iPS 細胞を用いた high-throughput 腎分化誘導因子探索 (低分子化合物)

⑥ 胚盤胞補完法によるミニブタを用いた人工腎臓開発

(3) 本研究の位置づけ

マウスを用いた腎系譜関連遺伝子プロファイルは整備されつつあるが、ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) の腎系譜分化に必須である、ヒト特異的な腎発生に関わる因子群の情報は未だ不足している。そこで、本研究では「腎発生異常モデルである CAKUT 患者」から「ヒト特異的な新規腎発生必須因子群」の理解を深め、それをもとに「腎系譜分化培養法の構築」の情報基盤を整備することを目的とする。

(4) 学術的な特色・独創的な点

① 遺伝学と発生・再生学の境界領域での研究であり、これまで不足していたヒト腎発生に関わる情報を蓄積し、ヒト-マウス間種差に関する知見のギャップを埋めることが期待できる。

② ヒト腎発生関与因子の包括的理解により、ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) から腎系譜への分化誘導法の確立を目指した情報基盤を整備することが期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 本邦ヒト CAKUT 症例の収集・疫学調査

本研究は、神戸大学医学倫理委員会に承認された研究計画書をもとに、解析対象となる検体提供者にインフォームドコンセントを行い、同意を得て、実施された。

厚生労働省難治性疾患克服事業研究班 (代表: 神戸大学小児科飯島教授) において、同班分担研究者森貞助教 (神戸大学小児科 (研究期間当時)) の協力のもと、CAKUT 症例を収集した。本研究期間において、可能な限り効率的に多くの症例を収集できるよう、日本小児腎臓病学会のホームページに研究班の情報を紹介したり、森貞助教の学会発表の際に症例収集の告知を積極的に行うよう努めた。

#### (2) 収集症例の臨床表現型分類

収集した症例について、調査書の臨床所見と担当医師からの情報をもとに、主として下記の項目に着目し、臨床表現型分類を行った。

##### ① 家族歴の有無

② 腎外症状の有無 (腎外症状有り: syndromic CAKUT、腎外症状無し: non-syndromic CAKUT)

##### ③ 臨床所見と表現型による細グループ分類 (腎低形成、腎異形成、嚢胞腎、VUR など)

#### (3) 網羅的遺伝子解析

収集した症例について、下記のように、臨床表現型分類に基づき、その解析方法を選択し、実施した。

① 臨床表現型からターゲット候補遺伝子が予測可能な症例:

候補遺伝子 (*PAX2*, *HNF1B*, *EYA1*, *SALL1* など) のシーケンス解析 (サンガーシーケンス法)

② ターゲット候補遺伝子および染色体のコピー数異常が疑われる症例:

1) MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法 (MRC-Holland 社)

2) DNA マイクロアレイ (CGH/SNP アレイ (Agilent 社))

③ 臨床表現型からターゲット候補遺伝子の予測が難しい症例:

1) 既知疾患関連遺伝子 4,813 遺伝子をターゲットとした TruSightOne シーケンスパネル (イルミナ社) を用いて、次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ社) でランを行い、ソフトウェア VariantStudio (イルミナ社) に

て、解析を実施した。候補となった遺伝子については、サンガーシーケンス法にて変異を確認した。

2) 1) に未搭載の遺伝子や、過去に CAKUT 関連遺伝子として報告された遺伝子、およびその関連が予想される遺伝子 (91 遺伝子) について、カスタムパネル (Agilent 社) を作製し、次世代シーケンサー MiSeq にてランを行い、ソフトウェア SureCall (Agilent 社) にて解析を実施した。候補となった遺伝子については、サンガーシーケンス法にて変異を確認した。

#### (4) 候補遺伝子の機能解析

(3)-③-2) にて候補となった遺伝子について、疾患発症機序が明らかでないものにつき、*in vitro* アッセイ系にてその機能解析を行う (立ち上げ中)。

### 4. 研究成果

#### (1) 本邦 CAKUT 症例収集と臨床表現型分類

平成 26 年度までに、187 家系 206 症例を収集し、その内訳は下記のとおりであった (本研究報告書提出現在も症例収集は継続している)。

① 腎外症状を伴う syndromic CAKUT: 105 家系 115 症例

② 腎症状のみの non-syndromic CAKUT: 82 家系 91 症例

(2) 原因 (候補) 遺伝子・遺伝子領域の同定  
現在までに 44 家系 62 症例について、下記の方法により原因遺伝子・遺伝子領域の同定に成功している。

① サンガーおよび TruSightOne パネルを用いた次世代シーケンス解析: 原因遺伝子 (*PAX2*, *EYA1*, *HNF1B*, *UMOD*, *OFD1*, *SALL1*, *CHD7*)

② DNA マイクロアレイ解析: 責任遺伝子領域 (染色体微細欠失: 22q11.2, 16q, 1q21.1)

③ カスタムパネルを用いた次世代シーケンス解析: 臨床表現型から候補遺伝子の同定が困難であった症例についても、*PAX2*, *UPK3A*, *FRAS1*, *EP300* など、既報遺伝子やマウス CAKUT で報告されている遺伝子などが候補となる症例も見つかった。ただし、候補遺伝子として絞りこんでいるが *in vitro* アッセイ系による機能解析が必要な遺伝子については、現在解析検討段階で、今後報告していきたい。

#### (3) 今後の方針

① 症例の追加と *in vitro* 機能解析の実施: 本疾患は臨床表現型が多岐に渡るため、細分類によるグループで十分な統計解析処理を行うことが難点となっている。これを克服す

るため、さらに症例を追加して解析を進めることと、少ない症例数でも候補遺伝子の関与を証明するためのシステムティックな *in vitro* アッセイ系を立ち上げ中である。

② 複合遺伝子の関与：マウス CAKUT で報告されてきたように、最近ヒトにおいても、単一遺伝子のみならず、腎発生において同シグナル経路を担う遺伝子の複合変異がヒト CAKUT の発症に関与している可能性が報告されてきている (Hwang *et al.*, *Hum Genet*, 2015)。申請者らも、浸透率やジェノタイプ-フェノタイプ相関を考慮し、解析を検討中である。

③ microRNA の関与：miRNA による腎発生制御が明らかになってきているため (Marrone and Ho, *Pediatr Nephrol*, 2014)、患者由来疾患特異的細胞を解析することにより、その関与を検討する予定としており、それについては既に本学医学倫理委員会の追加承認を得ている。

上述の計画を含め、原因が不明である CAKUT 症例についてさらに解析を進め、ヒト腎発生関与因子の包括的理解を進めていきたい。

## 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 1 件)

- ① Matsunoshita N, Nozu K, Shono A, Fu XJ, Morisada N, Kamiyoshi N, Ohtsubo N, Ninchoji T, Minamikawa S, Yamamura T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Shima Y, Kaito H, Iijima K. Differential diagnosis of Bartter syndrome, Gitelman syndrome, and pseudo-Bartter/Gitelman syndrome based on clinical characteristics. *Genetics in Medicine*, 査読有、2015、in press

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① Morisada N, Taniguchi-Ikeda M, Nozu K, Shono A, Kamei K, Ito S, Tanaka R, Iijima K, The comprehensive genetic analysis of congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT) in Japan, The American Society of Human Genetics Annual Meeting, 2014 年 10 月 18 日~22 日、San Diego (USA)
- ② 森貞 直哉、庄野 朱美、忍頂寺 毅史、貝藤 裕史、野津 寛大、亀井 宏一、伊藤 秀一、田中 亮二郎、飯島 一誠、次世代シーケンサーによるヒト CAKUT の原因遺伝子解析、第 37 回日本腎臓学会学術集会、2014 年 7 月 4 日~6 日、パ

シフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

- ③ 森貞 直哉、庄野 朱美、忍頂寺 毅史、貝藤 裕史、池田 真理子、野津 寛大、亀井 宏一、伊藤 秀一、田中 亮二郎、飯島 一誠、次世代シーケンサーによるヒト CAKUT の原因遺伝子解析、第 37 回日本小児遺伝学会学術集会、2014 年 4 月 10 日、名古屋市立大学桜山キャンパス (愛知県・名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

腎・泌尿器系の希少難治性疾患群に関する小差 研 究 班 :

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/sgridk/>

神戸大学大学院医学研究科 内科系講座小児科学分野ホームページ :

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/pediat/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

庄野 朱美 (SHONO, Akemi)

神戸大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・技術補佐員

研究者番号 : 10535066