

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870536

研究課題名(和文)腎臓発生に関わる新規遺伝子の同定 - 腎臓再生医療の実現に向けて -

研究課題名(英文)Identify a new gene which is important for the kidney development - Toward the achievement of regenerative medicine of kidney -

研究代表者

神田 祥一郎(Kanda, Shoichiro)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60632651

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)：先天性腎尿路奇形(CAKUT)は小児末期腎不全の最も頻度の高い原疾患である。その病態の理解のためには原因遺伝子を見出すことが必須である。

Six2-GFP-Cre tgマウスはヘテロでは無症状、ホモでは低形成腎を呈する。BACベクターの挿入部位を次世代シーケンサーを用いてChr1: 118764600-118764900と同定したが有意な遺伝子は同領域に認めなかった。

東京女子医科大学腎臓小児科に通院中の低形成腎を呈する兄妹を対象にエクソーム解析を施行し、遺伝子CBWD1のエクソン1をホモで欠損していることを見出した。PCRでも同部位の欠損を確認し、CAKUTの新規原因遺伝子同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract (CAKUT) is a leading cause of end-stage renal failure in children. To understand the pathophysiology of CAKUT, finding out genes which are important for the kidney development is necessary.

1) Six2-GFP-Cre transgenic mice show no renal phenotype (+/-), and hypoplastic kidneys (-/-). We identified the insertion site of the BAC vector as Chr1: 118764600-118764900. However there is no gene in this region.

2) We performed exome sequencing in siblings of hypoplastic kidneys, and we found out that both alleles of exon 1 of Cobalamin Synthase W Domain-Containing Protein 1(CBWD1) are deleted in these siblings specifically. Other family members showed no deletion of this region. We also confirmed the deletion by PCR. We succeeded in finding out a new gene which is important for the kidney development.

研究分野：腎臓発生の基礎と臨床

キーワード：腎臓発生 先天性腎尿路奇形 新規原因遺伝子

1. 研究開始当初の背景

申請者は小児科医として小児腎臓病に興味を持ち、臨床および基礎研究の両面からその病態解析と新規治療法の探索を行ってきた。平成 22 年から 23 年にかけては学術振興会特別研究員(DC2, PD)として、TRPC6 Ca²⁺チャネル変異による家族性ネフローゼ症候群発症メカニズムを分子レベルで明らかにした(Kanda et al., Mol Biol Cell, 2011)。この成果はネフローゼ症候群発症機序の解明および、新規治療法開発の端緒となりうると考えられている(特願 2010-174155)。しかし一旦障害を受けた腎臓は再生しないため、各種薬物治療にも関わらず維持透析療法に移行せざるを得ない患者が多数存在する。したがって新規治療薬開発のみならず透析に代わる根本的治療として腎再生医療の実現も急務である。

腎臓は尿管芽と後腎間葉の相互作用によって発生する。後腎間葉は尿管芽からのシグナルによってその周囲に凝集、上皮化し腎臓の機能単位であるネフロンに分化する。後腎間葉の中でも尿管芽近傍に存在する細胞集団は、様々なネフロン構成細胞に分化する多分化能および自己複製能を有することからネフロン前駆細胞として捉えられている。一般的に「腎臓は再生しない」と考えられているが、それはこのネフロン前駆細胞が周産期に消失することによる可能性がある。つまり腎臓再生医療の実現にはネフロン前駆細胞の自己複製法の開発が必要である。

そこで申請者は平成 23 年より熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野において腎再生医療の実現を目指し、ネフロン前駆細胞の自己複製法の開発研究も行っている(平成 24 - 25 年度、研究活動スタート支援、課題番号 24890171)。既に FACS ソーティングにより Six2 (ネフロン前駆細胞に特異的に発現する転写因子)-GFP-Cre トランスジェニック (tg) マウスからネフロン前駆細胞を単離培養する方法を開発し、得られたネフロン前駆細胞の未分化性を LIF 添加によって保ち、Wnt シグナルを組み合わせることで未分化性を維持したまま増殖させることを可能にした。

さらにこの研究を進めて行く中で、Six2-GFP-Cre tg マウスがヘテロの状態では無症状である一方でホモでは低形成腎を呈することを見出した。つまり tg マウスを作製する際使用した挿入ベクターによって腎臓発生に関わる遺伝子が不活化されている可能性が高い。そこで本研究ではベクターの挿入位置を同定し腎臓発生に重要な新規遺伝子を同定することを第一の目的とする。さらにその遺伝子のヒト疾患との関与を腎臓発生異常を伴う患者様を対象に解析する。

研究協力者の西中村隆一教授は転写因子

Sal11 のノックアウトマウスが腎臓欠損を呈することを発見し(Nishinakamura et al., Development 2001)、腎臓発生に関連した遺伝子の改変マウスを多数所有している。また申請者の出身である東京大学小児科学教室には低形成腎をはじめとする腎臓発生異常を基礎に有する患者様が多数通院している。

そこで申請者は西中村教授および東京大学小児科と研究協力し、これまでの研究課題であるネフロン前駆細胞自己複製法の開発をさらに発展させ、腎臓発生における重要な新規遺伝子の同定とその臨床的意義の解明を行い、腎臓発生メカニズムの包括的理解を目指す。

2. 研究の目的

申請者は腎再生医療の実現を目指し、ネフロン前駆細胞の自己複製法の開発研究を行っている(平成 24 - 25 年度、研究活動スタート支援、課題番号 24890171)。本研究はその研究過程で発見した低形成腎を呈する遺伝子改変マウスを用いて、腎臓発生に重要な新規遺伝子を同定・解析することを第 1 の目的とする。さらに低形成腎や腎欠損を呈する患者様を対象として、その新規腎臓発生関連遺伝子の病態への関与を解析する。

3. 研究の方法

ヘテロでは無症状だがホモでは低形成腎を呈する Six2-GFP-Cre tg マウスは BAC ベクターを用いて作製された(Kobayashi et al., Cell Stem Cell 2008)。何らかの腎臓発生に重要な遺伝子が染色体にランダムに組み込まれたベクターによって不活化されていると考えられる。このベクターの染色体における integration site は不明であるため、申請者はこのベクターをプローブとして FISH 解析を行ったところ 1 番染色体 E2 領域に組み込まれていることが分かった。この領域には 45 個の遺伝子が存在するが、既知の腎臓発生に関わる遺伝子は 1 つも存在していない。つまりベクターの挿入部位を同定することで腎臓発生に重要な新規遺伝子を発見できる。

(1) gene X の同定：詳細な挿入部位を同定するため全ゲノムシーケンス解析を行う。

(2) gene X の発現解析および機能解析
gene X の発現分布：X に対するプローブと抗体を作製する。これを用いて、マウス胎仔 (E9.5-18.5) に対して in situ hybridization、免疫染色を行う。

gene X のノックアウトマウス作製：gene X が本当に腎臓発生に必須であることを確認するためにこのノックアウトマウスを作成する。低形成腎を呈することを確認した後、ノックアウトマウス胎仔の各ステージ (E9.5-18.5) の切片を作製する。次にその表現型を腎臓発生に重要なマーカーと共に発

疫染色することで時間空間的な gene X の役割を解析する。

(3) gene X の臨床的意義の解明

東京大学小児科に通院する低形成腎や腎欠損を有する患者様の検体を使用し、倫理委員会の承認および患者様の同意を得たうえで、gene X に限定してその遺伝子変異を認めるかシーケンズによって解析する。

4. 研究成果

(1) 腎臓発生に関わる新規遺伝子 (geneX) の同定

同定方法として、コスト、精度の点から全ゲノムシーケンズを選択した。Six2-GFP-Cre tg マウス尾から genomic DNA を採取精製し、TruSeq DNA sample prep kit (illumine) を用いてシーケンズライブラリを作製し、HiSeq2000 シーケンサーを用いて解析する。断片化した DNA のうち片方が Transgene (BAC construct) でもう片方がマウス遺伝子である read pair を抽出し、ベクターの挿入位置を同定する。理化学研究所横浜研究所オミックス基盤研究領域 (<http://www.osc.riken.jp/genas/>) と共同で行った。

その結果、Chr1: 118764600-118764900 領域に BAC ベクターが挿入されていることが分かった。この領域に遺伝子は存在しないため、近傍遺伝子が候補として考えられた。

(2) 腎臓発生学の臨床応用

申請者は 2013 年 4 月より東京女子医科大学腎臓小児科に異動し、腎臓発生学を臨床応用すべく研究を行っている。

Six2-GFP-Cre tg マウスと同様に低形成腎を呈する家系を選択し、エクソーム解析を行った。エクソーム解析は東京女子医科大学統合医科学研究所にて施行した。

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東京女子医科大学腎臓小児科で腎移植を施行) 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。現在、CAKUT を引き起こす遺伝子は 23 種類が明らかとなっている (Hwang D.Y. et al, *Kidney International*, 2014) が、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 が発現していないことが明らかとなった。

以上より CBWD1 を CAKUT の新規原因遺伝子

として挙げた。

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 6 件)

1. Kanda S, Tanigawa S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Suzuki Y, Sato Y, Hino S, Sander M, Perantoni AO, Sugano S, Nakao M, Nishinakamura R. Sall1 Maintains Nephron Progenitors and Nascent Nephrons by Acting as Both an Activator and a Repressor. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Nov;25(11):2584-95, 査読有
2. Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Hayashi K, Matsunaga A, Kajiho Y, Kanda S, Miura K, Sekine T, Oka A, Ishizuka K, Horita S, Hattori M, Hattori S, Igarashi T. Epithelial protein lost in neoplasm modulates platelet-derived growth factor-mediated adhesion and motility of mesangial cells. *Kidney International*, 86(3), 548-57, 2014, 査読有
3. 神田祥一郎, 西中村隆一, Sall1 による腎臓発生メカニズムの解明、*発達腎研究会誌*, 22(1), 6-10, 2014, 査読無
4. 神田祥一郎, 秋岡祐子, 徐東博, 浅野達雄, 西山慶, 石塚喜世伸, 菅原典子, 近本裕子, 山崎雄一郎, 橋本雪司, 鈴木万里, 家後理枝, 田邊一成, 服部元史, 生体腎移植と膀胱拡大術を施行した症例における下部尿路管理の重要性について-本邦初の手術から 18 年が経過して-, *日本小児腎不全学会雑誌*, 34(1), 284-286, 2014, 査読無
5. 神田祥一郎, 服部元史, 腎臓の発生と発達, *Fetal and Neonatal Medicine*, 6(2), 5-6, 2014, 査読無
6. 神田祥一郎, Liddle 症候群, *小児内科*, 45(9), 1626-1628, 2013, 査読無

[学会発表](計 10 件)

1. Shoichiro Kanda, Shigeru Horita, Yuko Akioka, Naoto Kaneko, Tomoo Yabuuchi, Yuri Nawashiro, Norimasa Tada, Shinichiro Ohara, Takayuki Miyai, Noriko Sugawara, Kiyonobu Ishizuka, Motoshi Hattori, Antiphospholipase A2 receptor (PLA2R) expression in glomeruli in pediatric idiopathic membranous glomerulopathy (iMN) patients, *American Society of Nephrology*, フィラデルフィア(米国), 2014 年 11 月 13 日
2. 神田祥一郎 金子直人 苗代有鈴 藪内智朗 多田憲正 大原信一郎 宮井貴之 菅原典子 石塚喜世伸 近本裕子 秋岡

- 祐子 服部元史、生殖器奇形を伴う末期腎不全女性患者のまとめ、第 44 回日本腎臓学会東部学術大会、ベルサール新宿グランド（東京都、新宿区）、2014 年 10 月 25 日
3. 神田祥一郎 堀田茂 秋岡祐子 新田孝作 服部元史、小児膜性腎症における PLA2R の関与について、第 57 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）、2014 年 7 月 4 日
 4. 神田祥一郎 堀田茂 鍋木陽一郎 徐東博 浅野達雄 西山慶 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 服部元史、小児膜性腎症における PLA2R の関与について、第 49 回小児腎臓病学会学術集会、秋田ビューホテル（秋田県、秋田市）、2014 年 6 月 7 日
 5. 神田祥一郎 鍋木陽一郎 徐東博 浅野達雄 西山慶 宮井貴之 菅原典子 石塚喜世伸 近本裕子、秋岡祐子 服部元史、アシクロビル予防投与により急性腎傷害を呈した難治性巣状分節性糸球体硬化症の 1 例、第 49 回小児腎臓病学会学術集会、秋田ビューホテル（秋田県、秋田市）、2014 年 6 月 6 日
 6. 神田祥一郎、発生から考える逆流性腎症、第 22 回逆流性腎症フォーラム、東京女子医科大学弥生記念講堂（東京都、新宿区）、2014 年 1 月 25 日
 7. 神田祥一郎 徐東博 浅野達雄 西山慶 石塚喜世伸 菅原典子 近本裕子 秋岡祐子 山崎雄一郎 橋本雪司 鈴木万里 家後理枝 田邊一成 服部元史、生体腎移植と膀胱拡大術を施行した症例における下部尿路管理の重要性について - 本邦初の手術から 18 年が経過して -、第 35 回日本小児腎不全学会、ホテル華の湯（福島県、郡山市）、2013 年 10 月 25 日
 8. 神田祥一郎 大森智子 太口敦博 工藤邦子 鈴木穰 日野信次朗 菅野純夫 中尾光善 西中村隆一、Sall1 による腎臓発生機序の解明、第 22 回発達腎研究会、高槻市立生涯学習センター（大阪府、高槻市）、2013 年 9 月 14 日
 9. 神田祥一郎 大森智子 太口敦博 工藤邦子 鈴木穰 日野信次朗 菅野純夫 中尾光善 西中村隆一、Sall1 による腎臓発生メカニズムの解明、第 4 回分子腎臓フォーラム、メルパルク京都（京都府、京都市）、2013 年 9 月 7 日
 10. Shoichiro Kanda Ryuichi Nishinakamura, Sall1 is essential for the maintenance of nephron progenitors, Pediatric Academic Societies 2013, ワシントン（米国）、2013 年 5 月 6 日

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpre>

[ss/np70.html](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田祥一郎 (Kanda Shoichiro)

東京女子医科大学医学部・助教

研究者番号：60632651