

# 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—

神田祥一郎\*1,2 大村谷昌樹\*3 赤川浩之\*4 堀田 茂\*5 吉田賢弘\*1 金子直人\*2  
菅原典子\*2 石塚喜世伸\*2 三浦健一郎\*2 張田 豊\*1 山本俊至\*4,6 岡 明\*1  
荒木喜美\*7 古川 徹\*8 服部元史\*2

\*1 東京大学医学部小児科 \*2 東京女子医科大学腎臓小児科 \*3 兵庫医科大学遺伝学講座 \*4 東京女子医科大学統合医科学研究所  
\*5 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター病理検査室 \*6 東京女子医科大学大学院先端生命医学専攻遺伝子医学分野 \*7 熊本  
大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野 \*8 東北大学大学院医学系研究科病態病理学分野

key words : 先天性腎尿路異常, 小児末期腎不全, CBWD1

## 要 旨

先天性腎尿路異常 (congenital anomalies of the kidney and urinary tract; CAKUT) は小児末期腎不全の原因疾患として最も多い。これまで約 40 の原因遺伝子が同定されているが、CAKUT を有する患者の原因遺伝子が同定される頻度は 15% 程度であり、未知の原因遺伝子の存在が示唆されている。

我々は、CAKUT の新規原因遺伝子を同定するために、CAKUT を有する兄妹を含む家族に対してまずエクソーム解析、全ゲノム解析を行い、*Cobalamin Synthetase W Domain-Containing Protein 1 (CBWD1)* 遺伝子が患者特異的にホモ接合性に欠失していることを見出した。次にノックアウトマウスを作製し、*Cbwd1* が発生期の腎において尿管芽に発現すること、ノックアウトマウスが水腎症や重複尿管などの尿路系の異常を伴う CAKUT を発症することを明らかにした。以上の結果より *CBWD1* の欠失が CAKUT 発症に関わっていることが示唆された。

## 1 目 的

先天性腎尿路異常 (congenital anomalies of the kidney and urinary tract; CAKUT) は、腎欠損、低形成腎、水腎症、重複尿管など様々な腎尿路の形態異常を含有する疾患概念であり、小児末期腎不全の原因疾患の中で最も多い<sup>1-4)</sup>。CAKUT の発症は腎臓の発生異常に

起因している。

腎臓はヒトでは胎生 4 週より後腎間葉と尿管芽の相互作用によって発生する。後腎間葉は糸球体、尿細管に分化し、尿管芽は集合管、尿管に分化する。その後、尿細管と集合管が融合しネフロンとして機能する。

CAKUT の発症メカニズム—腎臓の発生異常—には遺伝的要因、環境的要因が考えられている。原因遺伝子はこれまでに約 40 種類が知られている<sup>5)</sup>。しかし、CAKUT を有する患者から既存の原因遺伝子の異常が認められる頻度は 15% 程度であり、未知の原因遺伝子の関与が示唆されている<sup>6,7)</sup>。

我々は、CAKUT の新規原因遺伝子を同定することを目的に研究を行った。

## 2 方 法

本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会において承認を受けている (承認番号 362)。ヒト試料を扱うさいは、すべての参加者より書面により同意を得ている。また本研究における動物実験は東京大学動物実験委員会において承認されている (承認番号 P16-009)。

### ① 対象

CAKUT を有する長男、長女と、明らかな疾患を有さない両親と次男の 5 名。長男、長女は共に片側の腎臓を欠損し、対側腎は低形成腎であった。乳児期より腎機能が低下し、長男は 10 歳時に、長女は 11 歳児に腎移植を受けている (図 1a)。

Search for a novel causative gene of congenital anomalies of the kidney and urinary tract—Elucidation of the role of CBWD1 in the kidney development—

Shoichiro Kanda, Masaki Ohmuraya, Hiroyuki Akagawa, Shigeru Horita, Yasuhiro Yoshida, Naoto Kaneko, Noriko Sugawara, Kiyonobu Ishizuka, Kenichiro Miura, Yutaka Harita, Toshiyuki Yamamoto, Akira Oka, Kimi Araki, Toru Furukawa, Motoshi Hattori

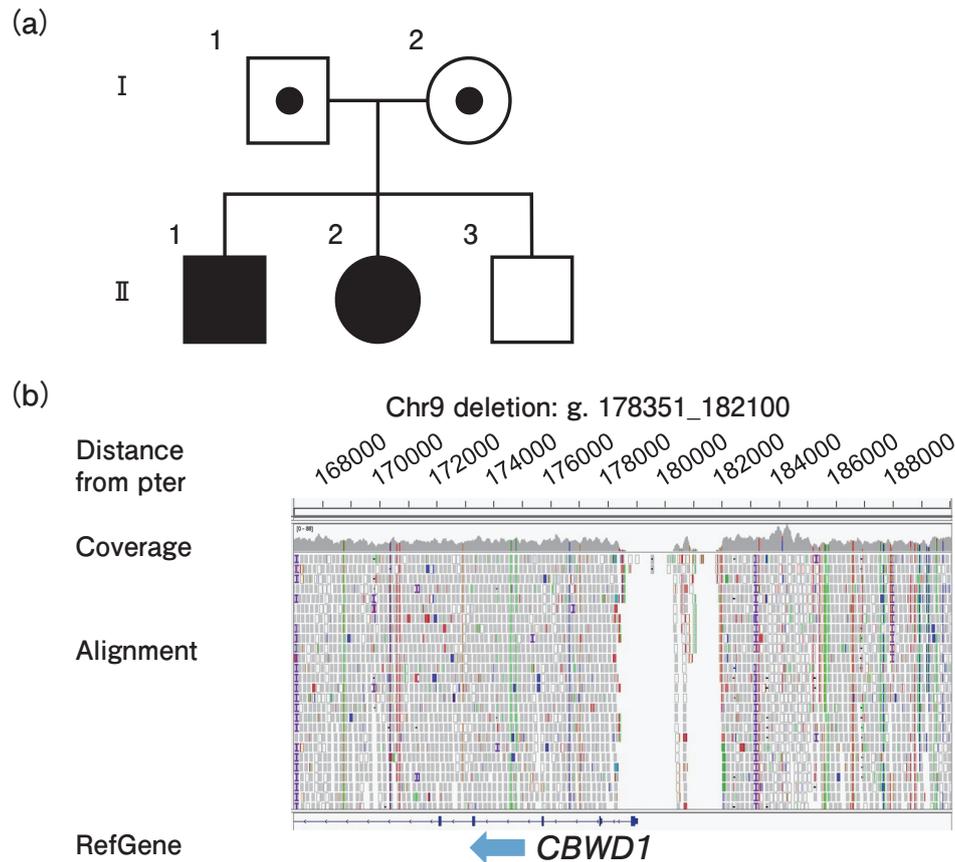


図1 原因遺伝子候補 *CBWD1* の抽出

(a) 長男、長女ともに片腎を欠損しており、対側腎は低形成であった。両親、次男は明らかな疾患を認めなかった。(b) 全ゲノムシーケンスにて患者特異的に9番染色体178351-182100の欠失を認めた。

## ② 原因遺伝子候補の抽出

患者を含む家族5名から血液を採取しDNAを抽出した。その後、エクソーム解析、全ゲノム解析、アレイCGH解析を行った。PCRにて遺伝子欠失の確認を行った。

## ③ 発生期の腎臓における発現解析

E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E16.5のマウス胎仔腎のパラフィン切片を作製し、抗*CBWD1*抗体、抗Six2抗体（後腎間葉マーカー）、抗cytokeratin 8抗体（尿管芽マーカー）を用いて免疫染色を行った。

## ④ ノックアウトマウスの解析

CRISPR-Cas9システムを用いて*Cbwd1*ノックアウトマウスを作製した。発生期、成体マウスの腎を用いてパラフィン切片を作製しHE染色にて形態学的評価を行った。

## 3 結果

### 3-1 原因遺伝子候補 *CBWD1* の抽出

家族歴よりホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性変

異がCAKUT発症に関係している可能性を考え、エクソーム解析を行ったところ、既知の原因遺伝子を含め患者特異的に認められる遺伝子変異はなかった。しかし、9番染色体177574-179736の周辺領域において、ホモ接合性欠失を患者のみに認めた。この領域は*CBWD1*遺伝子の開始コドンを含む第1エクソン全体を含んでいた。データベース（Genomic Variants）によると、同領域のヘテロ接合性欠失は2,538人中4名（0.16%）であった。アレイCGHを併せて行ったが、明らかな欠失は認められなかった。本欠失がアレイCGHの検出感度よりも小さい可能性と、我々が使用したアレイCGHのカバーする領域を外れている可能性が考えられた。

次に、欠失部位を明らかにするためにlong-range PCRやprimer walkingを行ったが、同領域に繰り返し配列が多く、これらの方法では断端配列を同定することはできなかった。そこで全ゲノム解析を行い、欠失領域が9番染色体178351-182100であることを明らかにした（図1b）。またCollectHsMetrics、EXCAVA-

TOR2 を用いて両親にヘテロ接合性欠失を認めることを証明した。

3-2 Cbwd1 の発生期腎臓における発現

CBWD1 が CAKUT の発症に関わっていることを証

明するために、マウス胎仔腎を用いて Cbwd1 の発現部位を調べた。後腎間葉マーカーである Six2, 尿管芽マーカーである cytokeratin 8 と共に、E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E16.5 のマウス胎仔腎連続切片を用いて免疫染色にて評価を行ったところ、Cbwd1 は E11.5

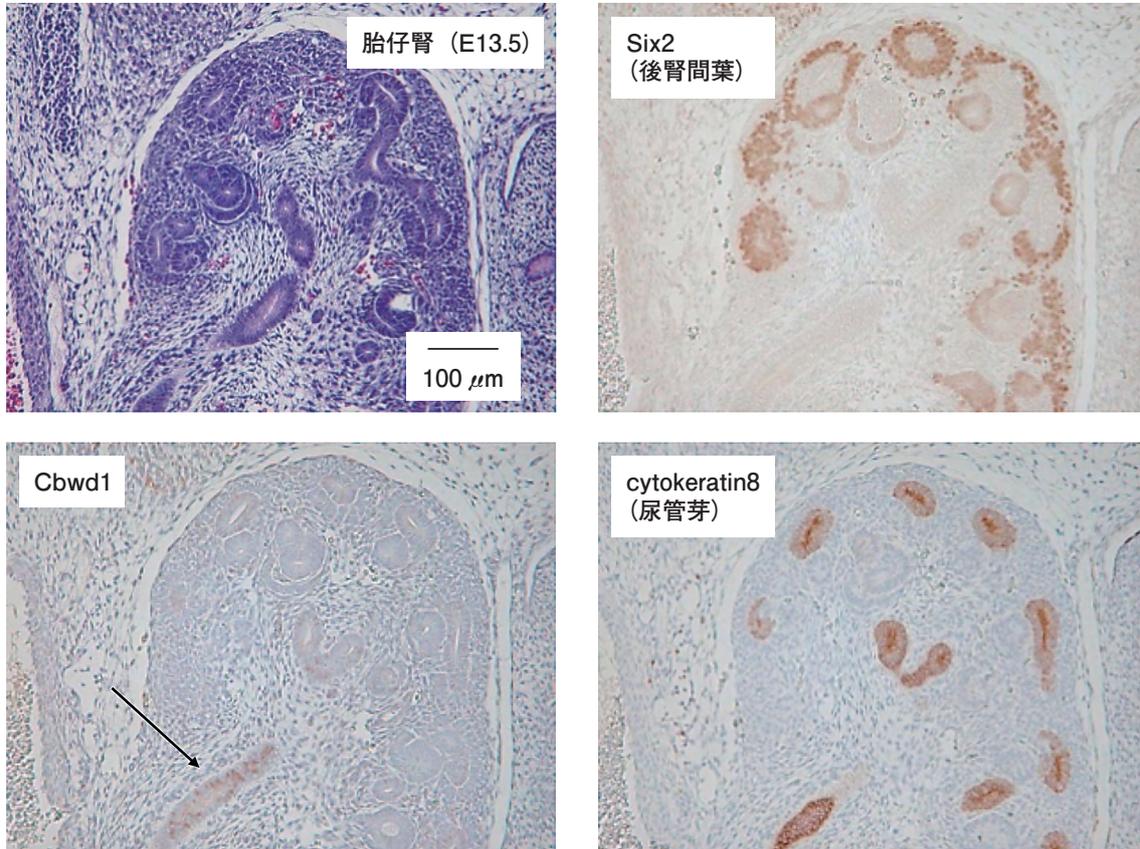


図2 胎仔腎における Cbwd1 の発現  
マウス胎仔 (E13.5) 腎の免疫染色。Cbwd1 は尿管芽に発現していた。

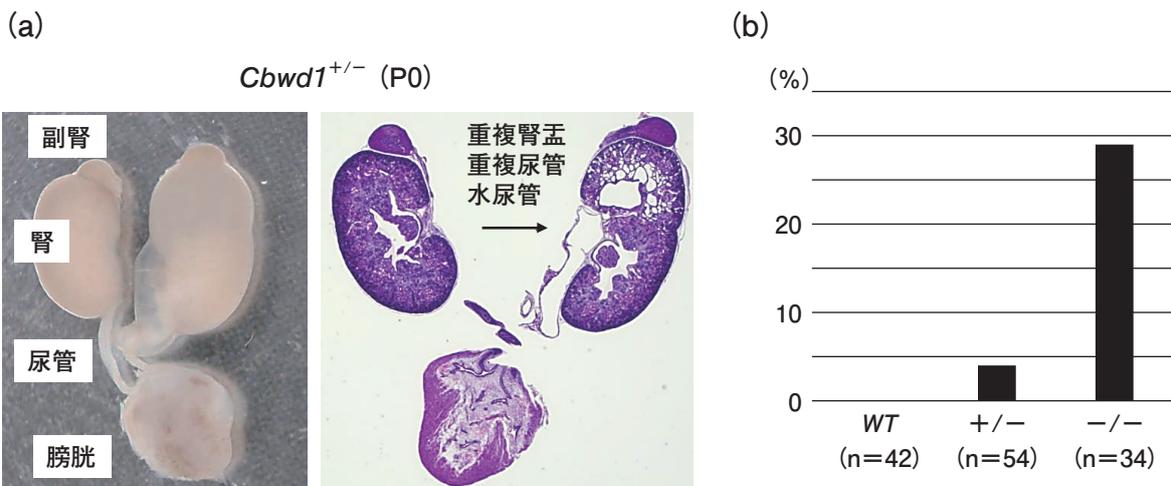


図3 Cbwd1 ノックアウトマウスの表現型  
(a) Cbwd1<sup>+/-</sup>マウス (P0) の腎尿路の摘出した状態 (左) と HE 染色 (右)。左腎が重複腎盂, 重複尿管, 水尿管を呈していた。(b) Cbwd1 ノックアウトマウスが CAKUT を呈する頻度。Cbwd1<sup>-/-</sup>マウスでは 29%, Cbwd1<sup>+/-</sup>では 4% に水腎症や重複尿管などの CAKUT を認めた。

と E12.5 の胎仔腎には発現を認めなかったが、E13.5 から尿管芽に発現を認めた (図 2)。E16.5 では尿管芽由来の細胞に発現しており、腎盂の上皮細胞において強く発現していた。

### 3-3 *Cbwd1* ノックアウトマウスの解析

*Cbwd1* が尿管芽に発現していることがわかったので、尿路の発生に関わっている可能性を考え、CRISPR-Cas9 システムを用いて *Cbwd1* ノックアウトマウスを作製した。*Cbwd1*<sup>+/-</sup> マウス同士を交配すると、胎生致死ではなく、メンデルの法則に従って、wild type, *Cbwd1*<sup>+/-</sup>, *Cbwd1*<sup>-/-</sup> マウスが出生した。P0 マウスの腎臓を解析したところ、*Cbwd1*<sup>-/-</sup> マウスでは 29% の頻度、*Cbwd1*<sup>+/-</sup> では 4% の頻度で水腎症や重複尿管などの尿路系の異常を伴う CAKUT を認めた (図 3a, b)。オフターゲット効果の可能性を否定するために別ラインでも解析を行い同様の結果を得た。

## 4 考察

我々は本研究において、まず CAKUT の患者特異的に *CBWD1* 遺伝子の開始コドンを含むエクソン 1 が欠失していることを同定した。次に *Cbwd1* がマウス発生期の腎臓において尿管芽に発現し、ノックアウトマウスが CAKUT を呈することを見出した。以上より、*CBWD1* の欠失が CAKUT 発症に関わっていることを明らかにした。

*CBWD1* に関する論文は検索しうる限り存在せず、その機能はこれまでわかっていない。今回の結果により、*CBWD1* が尿管芽の尿路系への発生に関わっている可能性が示唆された。患者では腎欠損を呈するのに対し、*Cbwd1* ノックアウトマウスは重複尿管などの表現型を呈していた。これらの表現型の差は種の違いが原因である可能性も考えられるが<sup>8)</sup>、両表現型は尿管芽が中腎管からの出芽するタイミングでの異常と捉えることもできる。例えば、尿管芽に発現する転写因子 *Gata3* のノックアウトマウスは腎欠損、重複尿管と様々な表現型を呈することが知られている<sup>9)</sup>。

*CBWD1* 遺伝子は 9 番染色体短腕のテロメアに近い領域に存在している。同領域の欠失では 9p 欠失症候群が知られている。この症候群は特徴的な顔貌、筋緊張低下、発達遅滞を特徴とする<sup>10-12)</sup>。一方、本研究における患者は CAKUT 以外の症状を認めなかった。9p

欠失症候群は 800 kbp から 12.4 Mbp と広い領域の欠失をヘテロ接合性に認めるのに対し、本患者は 3.7 kbp と小さい欠失をホモ接合性に認めていた。9p 欠失症候群との表現型の差は cytogenetic な違いによるものと考えられた。

## 5 結論

*CBWD1* が尿路の発生に関わり、*CBWD1* 遺伝子の部分欠失が CAKUT 発症に関与している可能性が考えられた。

本研究は平成 26 年度日本透析医会公募研究助成によるご支援のもと行いました。日本透析医会の関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

本研究内容は 2020 年 1 月、Journal of the American Society of Nephrology 誌に掲載された (JASN January 2020, 31(1) 139-147; DOI : <https://doi.org/10.1681/ASN.2019040398>)。

利益相反：申告すべきものはございません。

## 文 献

- 1) Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, et al. : Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol* 2012; 27(3) : 363-373.
- 2) Vivante A, Hildebrandt F : Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(3) : 133-146.
- 3) Hattori M, Sako M, Kaneko T, et al. : End-stage renal disease in Japanese children : a nationwide survey during 2006-2011. *Clin Exp Nephrol* 2015; 19(5) : 933-938.
- 4) Smith JM, Stablein DM, Munoz R, et al. : Contributions of the Transplant Registry : The 2006 Annual Report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS). *Pediatr Transplant* 2007; 11(4) : 366-373.
- 5) Nicolaou N, Renkema KY, Bongers EM, et al. : Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11(12) : 720-731.
- 6) Weber S, Moriniere V, Knüppel T, et al. : Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia : results of the ESCAPE study. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(10) : 2864-2870.
- 7) Hwang DY, Dworschak GC, Kohl S, et al. : Mutations in 12 known dominant disease-causing genes clarify many congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Kidney Int* 2014; 85(6) : 1429-1433.

- 8) Lindström NO, McMahon JA, Guo J, et al. : Conserved and Divergent Features of Human and Mouse Kidney Organogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29(3) : 785-805.
- 9) Grote D, Boualia SK, Souabni A, et al. : Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS Genet* 2008; 4(12) : e1000316.
- 10) Huret JL, Leonard C, Forestier B, et al. : Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *J Med Genet* 1998; 25(11) : 741-749.
- 11) Swinkels ME, Simons A, Smeets DF, et al. : Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome : Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *Am J Med Genet A* 2008; 146A(11) : 1430-1438.
- 12) Hauge X, Raca G, Cooper S, et al. : Detailed characterization of, and clinical correlations in, 10 patients with distal deletions of chromosome 9p. *Genet Med* 2008; 10(8) : 599-611.