

論文の内容の要旨

論文題目 先天性腎尿路異常の発症に関する研究 ―腎発生における CBWD1 の役割―
氏名 吉田 賢弘

先天性腎尿路異常 (congenital anomalies of the kidney and urinary tract ; CAKUT) は腎尿路の形態異常を先天的に有する疾患を包括した概念である。先天性疾患全体の 20-30%を占め、有病率は出生 1000 人につき 3-6 人程度である。

CAKUT は尿路感染症や慢性腎不全 (chronic kidney disease ; CKD) のリスクファクターである。小児の CKD や末期腎不全 (end-stage kidney disease ; ESKD) の原因として最多であり、本邦でも 39.8-62.2%の割合を占める。腎代替療法、特に透析の導入は小児にとって負担が大きく、末期腎不全の患児は健常児と比較して死亡率が 30 倍上昇することが分かっている。

CAKUT の原因は環境要因や遺伝子異常の影響が挙げられる。環境要因として母体糖尿病、肥満、内服薬の影響などが考えられている。遺伝子異常については単一遺伝子の異常や copy number variants、エピジェネティックな変化の影響が考えられる。

小児 CKD、ESKD への対策として CAKUT の病態理解が必須であり、そのために腎発生のメカニズムを考える必要がある。

ヒトやマウスの腎臓発生は多段階的に進行する。まず中間中胚葉から前腎、中腎、後腎が発生する。前腎、中腎は消退し、後腎が腎臓として機能する。マウスでは胎生 8.75 日 (Embryonic Day 8.75、以下 E8.75 と表記する) に中腎管が発生し、尿生殖洞へ向けて伸長し、E9.5 で到達する。後腎の形成は E10.5 に後腎間葉に向けて中腎管から尿管芽が出芽伸長して開始する。E11.5 に尿管芽は後腎間葉に侵入し、後腎間葉は尿管芽周囲に凝集し、キャップ状の構造 (cap mesenchyme ; CM) を形成する。CM は尿管芽の分岐を促進し、自らは上皮様の管へと変化する。これは間葉・上皮転換 (mesenchymal to epithelial transition ; MET) と呼ばれる。上皮化した後腎間葉は形態を変化させ、コンマ状の凝集体、S 字体と変化する。S 字体の上部は遠位尿細管に分化し、尿管芽へ結合する。下部は糸球体や近位尿細管へ分化する。尿管芽は糸球体側が集合管、対側が尿管へと分化し、ネフロンが形成される。

尿管芽の侵入や MET など腎臓発生に関わる主要なシグナル経路として、後腎間葉から分泌される glial-cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) とチロシンキナーゼ受容体 (RTK) である RET を介した GDNF-RET signal pathway が知られている。

GDNF-RET signal pathway に関わる遺伝子のうち、GDNF の発現を調節するものとして *Paired box gene 2 (PAX2)*、*Eyes absent homolog 1 (EYA1)* などがある。*PAX2* のホモ欠損マウス (*Pax2*^{-/-}) と *EYA1* のホモ欠損マウス (*Eya1*^{-/-}) では後腎間葉での GDNF の発現が低下し、低形成腎や腎無形性を認める。

RET の制御に関与する遺伝子として知られているものに *Sprouty 1 (Spry1)*、*Gata binding protein 3 (GATA3)* がある。*Spry1* は RTK アンタゴニストとして知られており、*Spry1* 欠損マウスでは

異所性に尿管芽が出芽し、重複尿管、水尿管を認める。GATA3 は転写因子であり、発生期の腎臓においては、中腎管と尿管芽に発現する。中腎管での *GATA3* ノックアウトマウス (*HoxB7/Cre ; Gata3^{fllox/flox}*) では *Ret* の発現が低下し、腎無形成や低形成、重複腎等を認める。

このように多くの CAKUT の原因遺伝子が GDNF-RET signal pathway を制御することで腎臓発生に関与していることが知られている。

当研究室では2019年に *Cobalamin Synthetase W Domain-Containing Protein1* (*CBWD1*) が CAKUT の原因遺伝子であることを同定した。片側低形成腎、片側腎無形成を呈する CAKUT により ESKD に進展し、腎移植を受けた兄妹例を含む家族5名にエクソーム解析を実施した。腎外病変は認めていなかった。エクソーム解析では既知の CAKUT 原因遺伝子の変異は同定されなかったが、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。同部位は *CBWD1* の Exon1 を含む領域であった。欠失部位の配列の詳細を同定するために全ゲノムシーケンスを実施し、欠失領域を9番染色体178351-182100と同定した。次に *Cbwd1* の発現部位を同定するためマウス胎仔腎を用いて免疫染色を行ったところ、*Cbwd1* は E13.5 から尿管芽に発現を強く認めた。*CBWD1* の遺伝子異常が CAKUT の原因であるかを調べるために CRISPR Cas9 を用いて *Cbwd1* ノックアウトマウス (C57BL/6N-*Cbwd1^{sm1}*、以下と *Cbwd1^{+/-}* と表記する) を作製した。P0 マウスの腎臓を解析すると *Cbwd1^{+/-}* の4%、*Cbwd1^{-/-}* の29%で重複腎盂、重複尿管、水尿管を認めた。以上により *CBWD1* が CAKUT の新規原因遺伝子であると同定した。

CBWD1 が CAKUT の原因遺伝子であることは明らかとなったが、ノックアウトマウスが重複腎盂や重複尿管、水腎症といった表現型を呈する機序は不明である。そこで、腎臓発生における *CBWD1* の分子メカニズムの解析を GDNF-RET signal pathway との関連に注目して行うこととした。

Cbwd1 の発現部位を同定するために、E12.5、*Adlut* の野生型マウスと *Cbwd1^{-/-}* から各種臓器を採取し、mRNA を抽出して逆転写し、cDNA を作成した。qPCR を施行したところ、各種臓器で *Cbwd1* の発現が低下したため、*Cbwd1* は各種臓器に発現していることが分かった。発生期の腎臓における *Cbwd1* の詳細な発現部位を同定するため、P0 マウスの胎仔腎で連続切片を作成し、抗 *CBWD1* 抗体と尿管芽のマーカーとして抗 *GATA3* 抗体で免疫染色を行い、*Cbwd1* と *Gata3* が共に尿管芽の細胞核内に発現することを確認した。

培養細胞内での HA-*CBWD1* と Flag-*GATA3* の局在を検討するため HCT116 細胞に強制発現させ、免疫染色を行った。Flag-*GATA3* は細胞核に発現している一方で HA-*CBWD1* は細胞質主体に発現し、一部が細胞核に発現していた。Flag-*GATA3* を強制発現させても HA-*CBWD1* の局在は変化しなかった。

Cbwd1 と *Gata3* が共に尿管芽の核に発現し、*Cbwd1* ノックアウトマウスが *Gata3* ノックアウトマウスと同様に水腎症、重複尿管、重複腎盂といった表現型を認めることから、*CBWD1* と *GATA3* が相互作用をする可能性を考慮し、免疫沈降による結合実験を行った。HA-*CBWD1* ベクターと Flag-*GATA3* ベクターを HCT116 細胞に共発現させ、Flag ビーズを用いて免疫沈降を行っ

たところ HA-CBWD1 と Flag-GATA3 が生化学的に結合していることが分かった。そこで、結合が直接的であるかどうかを評価するため、GST 融合 CBWD1 タンパクと His 融合 GATA3 タンパクを作成し、Pull-down Assay を行った。すると、CBWD1 と GATA3 が直接結合することが示された。

次に CBWD1 の結合部位を解析した。CBWD1 はモチーフ解析で DNA-binding domain と COBWD domain を有するため、それぞれを削除したベクターを作成した (Δ Head、 Δ Nuc、 Δ Cobw)。変異ベクターと野生型ベクターを HCT116 細胞に共発現させて Flag ビーズを用いて免疫沈降を行ったところ、 Δ Head と Δ Cobw では結合に変化は認めなかったことから、DNA-binding domain が GATA3 との結合に関与している可能性が考えられた。

GATA3 は *Ret* のプロモーター領域にある GATA エlement 配列 (5'-A/T GATAA/G-3') に結合し、*Ret* の発現を促進することが知られている。そこで E14.5 の野生型マウスから胎仔腎を採取して抗 GATA3 抗体、抗 CBWD1 抗体で ChIP を行い、ChIP 産物に対して、マウスの *Ret* プロモーター領域の GATA エlement 配列を含むプライマーを用いて qPCR を行った。すると、GATA3、CBWD1 とともに GATA エlement 配列を含む領域に *in vivo* で結合することが明らかとなった。

CBWD1 が *RET* の転写活性を調節するかどうかを調べるためにルシフェラーゼアッセイを行った。GATA エlement 配列を含む *Ret* のプロモーター領域を pGL3 ベクターに導入したレポーターベクター (pGL3-*Ret*) を作成し、Flag-GATA3 発現下に *Ret* のルシフェラーゼ活性が平均 2.19 倍 (SD 0.091) 亢進した ($P < 0.001$) が、GATA エlement 配列に点変異を導入した (Mut pGL3-*Ret*) レポーターベクターを用いたアッセイでは、Flag-GATA3 投与下でも *Ret* のルシフェラーゼ活性が平均 1.18 倍 (SD 0.090) と亢進しなかった ($P = 0.082$)。

次にこの pGL3-*Ret* と HA-CBWD1、Flag-GATA3 を共発現させて解析を行った。Flag-GATA3 単独で *Ret* のルシフェラーゼ活性は平均 1.46 倍 (SD 0.11) 亢進した ($P < 0.001$) が、HA-CBWD1 単独では *Ret* のルシフェラーゼ活性は亢進しなかった ($P = 0.57$)。HA-CBWD1 と Flag-GATA3 と共発現させると *Ret* のルシフェラーゼ活性が平均 1.75 倍 (SD 0.29) と更に増幅された ($P = 0.013$)。上記結果から *Cbwd1* 単独では *Ret* の転写活性を調節しないが、*Gata3* と共発現することにより *Gata3* の *Ret* 転写活性を正に調節することが明らかとなった。

ルシフェラーゼアッセイの結果から *Cbwd1* が *in vivo* においても *Ret* の発現を制御する可能性を考えた。*Ret* mRNA を評価するため qPCR を行った。E11.5、E12.5、E14.5 の野生型マウスと *Cbwd1*^{-/-} の腎臓を採取し、qPCR を行ったが、いずれも *Gata3*、*Ret* の mRNA は有意差を認めなかった。

次に蛋白質レベルでの *Ret* 発現の変化を評価するために E11.5、E14.5 の野生型マウスと *Cbwd1*^{-/-} の腎臓を抗 *Ret* 抗体で染色したが、いずれも *Ret* の発現に明らかな差は認められなかった。

今回の実験では CBWD1 と GATA3 の生化学的な結合を見出した。また ChIP Assay により GATA3 と CBWD1 が *Ret* のプロモーター領域に *in vivo* で結合することを、またルシフェラーゼ

アッセイにより *Cbwd1* 単独では *Ret* の転写活性を調節しなかったものの、*Gata3* と共発現させることで *Ret* の転写活性を増幅させることが分かった。以上より、CBWD1 は GATA3 の cofactor として *RET* の転写活性を正に制御している可能性が考えられた。

今回の実験では野生型マウスと *Cbwd1* ノックアウトマウスとの間で、E11.5 以降の *Ret* の発現の分布と量に明らかな差を認めなかった。この原因として 3 つのことが考えられた。第一に使用したマウスの問題である。CAKUT の所見を認めていたマウスは *Cbwd1*^{-/-} の 29%であったことから、今回の実験で CAKUT を認めないマウスを評価し、有意差が得られなかった可能性が考えられた。また、*Cbwd1* ノックアウトマウスは重複尿管を呈する。尿管芽の出芽は E10.5 で生じるため、それ以前での *Ret* の発現や機能に影響を生じている可能性があるため、より未分化な状態での胎仔腎や中腎管を用いた実験が必要とも考えられた。二つ目に実験手法の問題がある。中腎管での *Gata3* ノックアウトマウス (*GATA3*^{ND/-}) では異所性の尿管芽の出芽を認め、同部位で *Ret* の発現を認めることが知られている。今回施行した免疫染色は単一断面を評価していることから、異所性に出芽し、*Ret* が発現する尿管芽を評価できていない可能性が考えられた。そのため、whole mount 免疫染色により 3 次的に *Ret* の発現を評価する必要があると考えられた。3 つ目の問題として *Cbwd1*、*Gata3* 複合体が *Ret* 以外の遺伝子を調節し、複合的に GDNF-RET signal pathway を調節している可能性が考えられた。*Gata3* は *Ret* 以外にも腎発生に関与する転写因子である *LIM homeobox 1* (*Lim1*) を調節することが知られている。このため、抗 CBWD1 抗体、抗 GATA3 抗体を使用した ChIP-sequence を行い、*Cbwd1*、*Gata3* 複合体が制御する遺伝子を検索する必要があると考えられた。