

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18579

研究課題名（和文）睡眠時無呼吸症候群による低酸素ストレスと夜間頻尿発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Sleep apnea syndrome induces clock gene abnormalities and causes nocturia in the mice bladder

研究代表者

井原 達矢（IHARA, Tatsuya）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90622407

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）：SAS負荷により、睡眠期のマウス排尿回数は増加した。さらに膀胱容量もSAS負荷後低下した。SASによりマウスは夜間頻尿様の病態を呈する事がわかった。低酸素刺激後の膀胱上皮培養細胞における時計遺伝子Per2発現リズムは10%の低酸素刺激ではコントロールと同じような概日リズムが観察できた。しかし5%、1%と酸素濃度を下げるに従い、概日リズムは変化し、1%の低酸素刺激においては時計遺伝子の概日リズムが消失した。これらの結果より、SAS負荷は膀胱の概日リズム異常を介し夜間頻尿を引き起こす可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SSASの慢性的な低酸素ストレスが膀胱の時計遺伝子異常を介し夜間頻尿を惹起させる。いままで言われてこなかった新しい病態の一つであり、夜間頻尿に対する新規の治療戦略、新規治療薬の創生に結び付く可能性がある。

研究成果の概要（英文）：SAS loading increased the frequency of mouse voiding during sleep. In addition, bladder capacity also decreased after SAS loading. These results indicated that SAS could induces nocturia-like pathology in mice. As for the clock gene Per2 expression rhythm in cultured cells of bladder epithelium after hypoxic stimulation, a circadian rhythm similar to that of control was observed with 10% hypoxic stimulation. However, the circadian rhythm changed as the oxygen concentration was lowered to 5% and 1%. The circadian Per2 expression disappeared completely with 1% hypoxic stimulation. From these results, SAS loading may cause nocturia through abnormal circadian rhythm of the bladder.

研究分野：泌尿器科

キーワード：夜間頻尿 睡眠時無呼吸症候群 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群(SAS)と夜間頻尿

本邦における中年男性の4%(女性では0.5~2%)が睡眠時無呼吸症候群(SAS)に罹患し、現代社会における生活リズムの乱れ・不健康な食生活・肥満・運動不足などにより今後もSASが増加すると予想される。SASによる夜間の低酸素血症や交感神経刺激は、高血圧・耐糖能障害・高脂血症などのメタボリック症候群、虚血性心疾患、不整脈および心不全との関連が指摘され、死亡率が高率になる。また、胸腔内圧の低下による静脈還流の増加がADH分泌を増大させ夜間頻尿を引き起と報告されている(Hyperten Res 2006, 29: 315-322.)。

夜間頻尿と概日リズム

60歳以上の高齢者の60-90%が夜間頻尿を有し、これらは夜間高血圧の誘発、脳血管障害、転倒による骨折などにつながり、高齢者のQOLに影響を与えている。さらに夜間排尿回数の増加と死亡率増加の因果関係も報告されている。夜間頻尿の要因は多岐にわたり前立腺肥大や過活動膀胱などの器質的疾患の他、睡眠障害、高血圧・糖代謝異常、ホルモン分泌障害など、時計遺伝子異常によるリズム障害により発症する疾患と共通しているものが多い(図1)

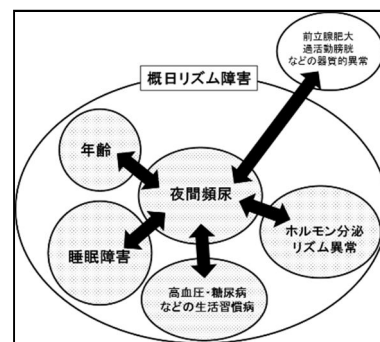


図1 時計遺伝子異常による概日リズム障害と疾患の関係

時計遺伝子と疾患

生体の概日リズムを制御する時計遺伝子の異常は高血圧・糖代謝異常などの生活習慣病から発症まで様々な疾患を引き起こしている事が分かってきた。尿路にも時計遺伝子によって制御される尿産生の概日リズム(Am Soc Nephrol 22: 598-604, 2011)、膀胱平滑筋における昼夜の膀胱容量の変化(Nat commun 3: 809 2012)など時計遺伝子異常と尿路疾患の関連が報告されている。我々は時計遺伝子 *Clock* の変異(*Clock* 変異マウス)が夜間頻尿を有する事を報告し(Neurouro Urodyn 36: 1034, 2017)、膀胱上皮細胞に時計遺伝子が存在し、尿意伝達に關与する伸展刺激受容体等の発現を概日リズムをもって制御し、*Clock* 変異マウスでの時計遺伝子制御の消失と伸展刺激受容体類の睡眠期の過剰発現を報告した(Plos One 12: e0168234, 2017. Neurouro Urodyn DOI: 10.1002/nau.23400, 2017)。さらに、膀胱上皮細胞に伸展刺激を加えた際の反応を調べたところ、WT マウスでは遺伝子発現リズムに相関し伸展刺激に対する ATP 放出に概日リズムを呈し、*Clock* 変異マウスではそのリズムが消失していることを報告した。これらの結果は、膀胱尿路上皮の尿意応答に概日リズムが存在する事、時計遺伝子異常による尿路知覚の概日リズム障害が夜間頻尿を生じさせているという新しい概念を示している(Sci Rep 8: 5699, 2018, Neurouro Urodyn 37: 2535-2543, 2018)。

2. 研究の目的

近年では SAS などの慢性的な睡眠時のストレスにより膀胱の概日リズム障害が惹起され、夜間頻尿が発症している可能性も報告されている(Urol 2015, doi:10.1016, Sci Rep, 5:11417, 2015, Sci Rep 9: 10069, 2019.)。生体が低酸素ストレスに晒されると低酸素誘導性因子(HIF)の活性化を介し数百に及ぶ様々な遺伝子発現を誘導し、環境への適応を図る(図2)。時計遺伝子がHIFの活性を増強させる場合など(FEBS 2017, In press. Nature Med, 18: 774-782, 2012)が報告され、慢性的な低酸素ストレスが時計遺伝子異常を介して膀胱機能の概日リズム障害を誘発し、SASにともなう夜間頻尿の原因の一つであると考えている(図3)。

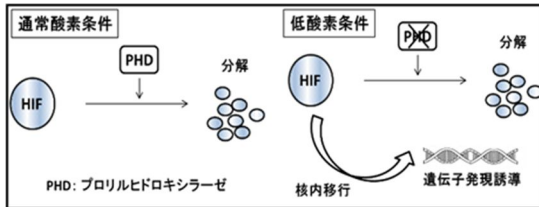


図2 通常状態ではHIFはPHDによる水酸化を経て分解されるが、低酸素状態においてPHDは活性を消失し、HIFは転写因子として作用する。

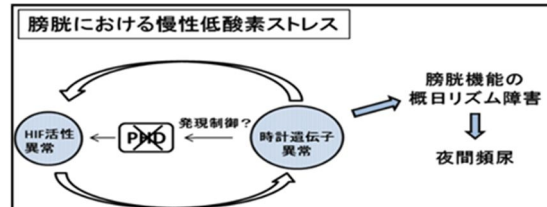


図3 慢性的な低酸素ストレスが時計遺伝子異常、HIF活性の異常を引き起こし、膀胱機能の概日リズム障害を介して夜間頻尿を発症させる。

今回我々は睡眠時無呼吸症候群(SAS)に注目し、SASの慢性的な低酸素ストレスが膀胱の時計遺伝子異常を引き起こし夜間頻尿の発症に関与している仮定し研究を行った。この研究結果は夜間頻尿に対する新規の治療戦略、新規治療薬の創生に結びつくものと考えている。

3. 研究の方法

睡眠時無呼吸症候群のモデルマウス作成

密閉可能なアクリルケースを作成し(図4)、その中にマウス排尿代謝ケージをセットした。アクリルケース内は酸素濃度モニタリング装置を介し、室素(室素ボンベから供給)と空気(エアポンプから供給)を任意の時間で切り替え可能となっている。図5の如く、空気と室素をマウスの睡眠期である明期の10時から18時の8時間にわたり90秒毎で切り替え、20%と10%酸素濃度の交互置換によるマウスSASモデル作成環境を用意した(SAS負荷)。ケージ内にマウスを投入し、5日間連続でSAS負荷を行い、マウス排尿パターン変化を測定した。

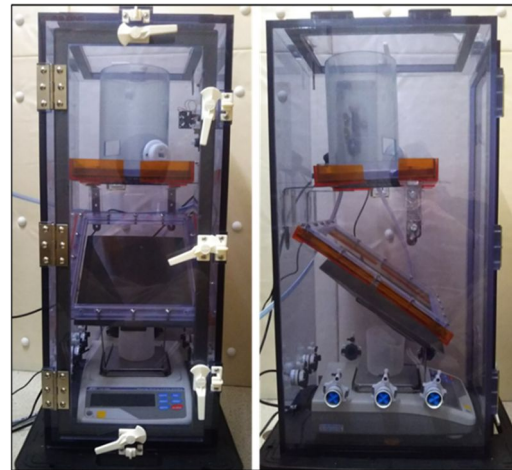


図4 低酸素下マウス飼育ケージ

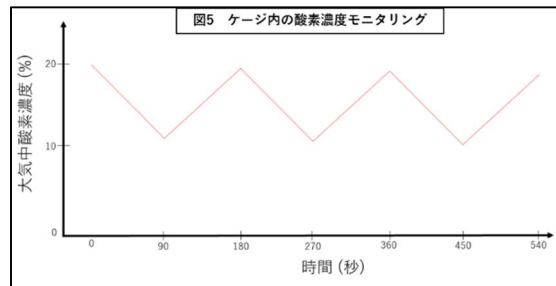


図5 ケージ内の酸素濃度モニタリング

マウス膀胱上皮と平滑筋培養細胞の低酸素刺激後における時計委遺伝子発現リズムの測定

時計遺伝子Period2luciferase knock-in mice (Per2::luc)マウスの膀胱から初代膀胱上皮培養細胞を作成し、10%、5%、1%の低酸素刺激を図6の装置を用い24時間負荷した。その後、ルミノメーターを用い、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応で得られる生物発光を4日間モニタリングし、低酸素刺激による時計遺伝子発現リズムの変化を測定した。4日目には培養組織の生存度確認のため、FSKの添加を行っている。

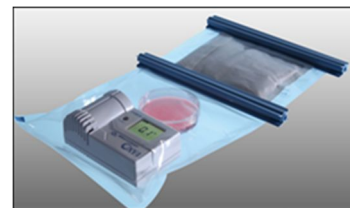


図6 低酸素培養キット

4. 研究成果

SAS負荷により、睡眠期のマウス排尿回数は増加した(図7)。さらに膀胱容量もSAS負荷後低下した(図8)。SASによりマウスは夜間頻尿様の病態を呈する事がわかった。

低酸素刺激後の膀胱上皮培養細胞における時計遺伝子Per2発現リズムは10%の低酸素刺激ではコントロールと同じような概日リズムが観察できた。しかし5%、1%と酸素濃度を下げると、概日リズムは変化し、1%の低酸素刺激においては時計遺伝子の概日リズムが消失した(図9)。

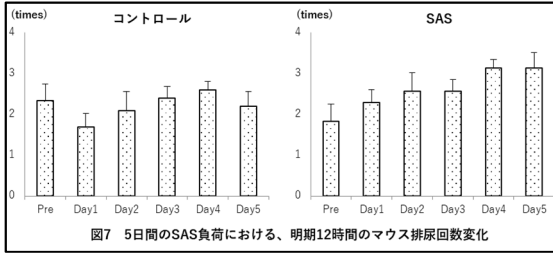


図7 5日間のSAS負荷における、明期12時間のマウス排尿回数変化

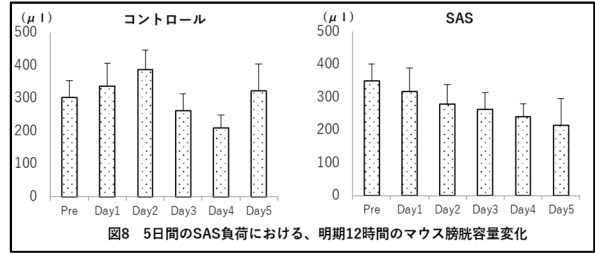


図8 5日間のSAS負荷における、明期12時間のマウス膀胱容量変化

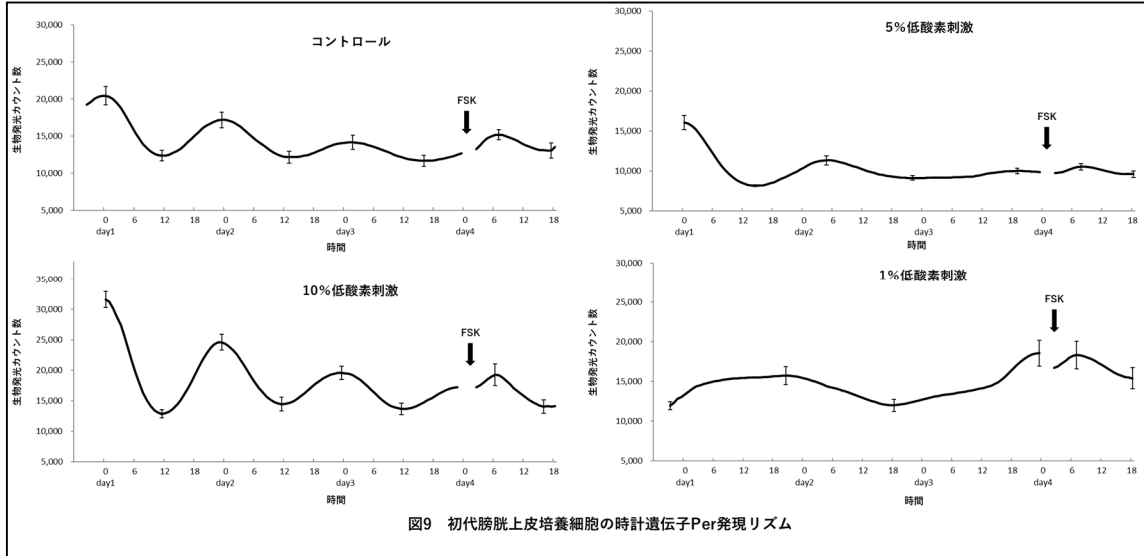


図9 初代膀胱上皮培養細胞の時計遺伝子Per発現リズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------