

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659756

研究課題名（和文） 住民検診コホートによる夜尿症原因遺伝子の探索研究

研究課題名（英文） Search study of the enuresis genes by inhabitants examination cohort

## 研究代表者

吉村 耕治 (YOSHIMURA KOUJI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40397542

## 研究成果の概要(和文)：

夜尿症は遺伝的要因が示唆されてきたものの原因遺伝子が解明されていない。そこで一般人口における夜尿症罹患歴を参照として遺伝子解析を行うことで、夜尿症の原因遺伝子の解明を目指した。しかし遺伝子解析が難航したため、夜尿症における膀胱の生理学的機序に着目した動物モデルを製作し夜尿症に関与する遺伝子の抽出を試みた。その結果、膀胱の平滑筋自発収縮を内在性に弛緩する因子として PTHrP を抽出した。

## 研究成果の概要(英文)：

Enuresis is considered to be related to genetic background, but no responsible gene was investigated. Then, we aimed to elucidate the responsible gene with reference to previous enuresis history in general populations. But, the genetic analysis had been significantly delayed, so we established an animal experimental model which reflects physiological mechanism of enuresis, and aimed to investigate the responsible gene of enuresis from this approach. As a result, we picked up the candidate gene “PTHrP” as a potent endogenous relaxant of bladder contraction.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

## 研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード: 夜尿症、住民検診コホート、PTHrP

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 泌尿器科日常臨床で高頻度に見られる疾患として夜間頻尿が挙げられる。これは下部尿路症状の内でも最も生活の質を低下させる要因の一つであるが、具体的な機序は解明されていない。遺伝学的アプローチも検討されたが、複数の病態の総和であるため遺伝子解析の観点から解明することが困難と考えられてきた。そこで解析対象症例を絞り込むため、夜尿症の罹患歴に注目することとした。夜尿症の原因として、①尿量産生日内リズムの異常、②睡眠障害、③夜間機能的膀胱容量低下の三因子が考えられるが、これらは高齢者の夜間頻尿ともオーバーラップする。夜尿症は遺伝的要因の強い関与が

報告されているが、具体的な原因遺伝子の特定には至っていない。夜尿症原因遺伝子の解明を進めることにより夜間頻尿の機序解明にも繋がると考えた。

(2) 従来の夜尿症遺伝子研究においては、夜尿症患者家系の解析に限られ一般人口におけるゲノム解析が行われておらず、時代背景的にも SNP などの詳細な解析が行われていなかった点を踏まえ、我々は一般コホートにおける夜尿症罹患歴を参照として SNP 解析を行うことで夜尿症原因遺伝子の同定を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

(1)夜尿症原因遺伝子の候補を抽出する。  
 (2)具体的な遺伝子異常が抽出された場合に、分子生物学的解析と共に生体内における機能解析を行うことで候補遺伝子の機能的意義を証明する。

## 3. 研究の方法

(1)ながはま0次予防コホート事業で得られた検診受診者の夜尿症の罹患歴及び家族歴を参照し、既知の夜尿症関連遺伝子座のSNPに対してチップ解析を進める予定であったが、解析が大幅に遅れており遺伝子の特定、機能解析には着手できない状況となった。そこで以下の如きアプローチへ切り替えて研究を進めることとした。  
 (2)夜尿症の原因として、排尿行動における日内リズムの消失が一因と考えられる為、その制御機構を解析することで夜尿症の原因を探索していく方針とした。

①排尿行動の日内リズムにおいては、膀胱の蓄尿・排尿周期に伴う膀胱壁の伸展と収縮の反復を認める。まずは、この現象を人為的に再現するモデルとして急性尿閉モデルを作製することとした。具体的には、ウレタン麻酔下に雌ラットに経尿道的にカテーテルを留置し、a)膀胱内の尿を継続して排出し空虚を維持する群(Empty 群)、b)膀胱内に一定速度で生理食塩液を持続注入し蓄尿と自然排尿を反復させる群(Store-Void cycle 群)、c)上記 b を 3 時間反復した後外尿道口を結紮して尿閉状態として膀胱の拡張を強制的に生じさせる群(Distention 群)を作成した(図 1)。

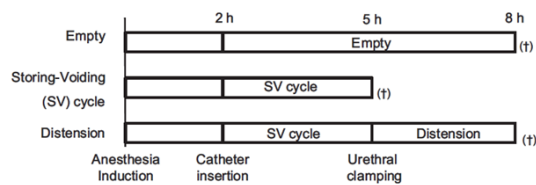


図 1 急性尿閉モデルの概要

②①の各群の全膀胱から mRNA を抽出し、各群における遺伝子発現変化を Affymetrix GeneChip array を用いたマイクロアレイにて網羅的に解析した。その結果、副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)の発現上昇を認めた。

③②の段階で抽出した PTHrP とその受容体である PTHR1 の発現をリアルタイム PCR とウェスタンブロッティングで mRNA、蛋白レベル共に評価した。尿路上皮と平滑筋層を剥離・分離した標本を用いることで、PTHrP は平滑筋優位に発現していることを確認した。

④②の段階で抽出された PTHrP の機能を ex vivo で解析した。具体的には、ラットの膀胱平滑筋片を灌流液内にて収縮力を測定し(organ bath study)、PTHrP ペプチドの灌流液内への投与による筋片の収縮力変化を評価した。

⑤抽出された遺伝子の機能を in vivo で解析した。具体的には、麻酔下にラットの膀胱内圧を測定(cystometrogram)した状態で、PTHrP ペプチドを静脈内投与することで生じる膀胱内圧の変化を測定した。

## 4. 研究成果

(1) ①ラットを用いて膀胱の蓄尿・排尿周期を人為的に生じさせるモデルを作成した。過去に膀胱伸展時に発現すると報告されている遺伝子群(COX-2, HB-EGF, THBD)が発現上昇することを確認し、モデルの妥当性を示した(図 2)。

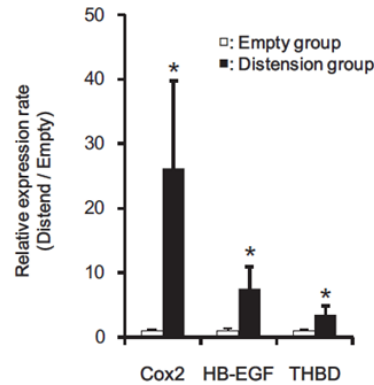


図 2 急性尿閉モデルの遺伝子発現

②膀胱の蓄尿・排尿周期に伴う遺伝子の発現変化をマイクロアレイにて網羅的に解析した結果、膀胱壁伸展に伴い副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)の発現の上昇を認めた(表 1)。

Fold change	Gene description	Gene symbol	P value
20.277	activating transcription factor 3	Atf3	0.023
18.166	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Arc	0.002
16.859	interleukin 6	Il6	0.049
12.006	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Cxcl2	0.021
10.632	hyaluronan synthase 1	Has1	0.023
10.556	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	Tnfrsf12a	0.001
9.701	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Cyr61	7 × 10 <sup>-5</sup>
9.282	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	Serpine1	0.012
8.859	OTU domain containing 1	Otu1	0.026
8.686	neuronal pentraxin 2	Nptx2	0.0006
8.599	regulator of calcineurin 1	Rcan1	0.006
8.526	xin actin-binding repeat containing 1	Xbp1	0.045
8.226	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	0.006
7.866	apolipoprotein L domain containing 1	Apol1	0.009
7.815	connective tissue growth factor	Ctgf	0.003
7.683	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	Ccr4l	0.035
7.251	suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	0.047
7.057	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	Gfpt2	0.014
6.874	FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	0.001
6.645	tribbles homolog 1 (Drosophila)	Trib1	0.012
6.582	fos-like antigen 1	Fosl1	0.038
<b>6.167</b>	<b>parathyroid hormone-like hormone (=parathyroid hormone-related peptide)</b>	<b>Pthlh (=Pthrp)</b>	<b>0.002</b>
5.869	epiregulin	Ereg	0.075
5.834	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11	Mllt11	0.009
5.733	similar to RIKEN cDNA 633040G115	RGD1307396	0.024
5.713	BTG family, member 2	Btg2	0.006
5.567	major facilitator superfamily domain containing 2	Mfsd2	0.002
5.476	nucleoporin 62 C-terminal like	Nup62cl	0.001
5.435	similar to 130001406Rik protein	RGD1311307	0.012
5.337	poliovirus receptor	PVR	0.002

表 1 急性尿閉モデルのマイクロアレイ結果

(2)①で抽出した遺伝子 PTHrP とその受容体である PTH1R の発現解析・機能解析を行った。  
 ①PTHrP は膀胱拡張に伴い蛋白レベルでも発現が上昇することを確認した(図 3A)。またその受容体である PTH1R の発現部位は筋層優位であった(図 3B)。

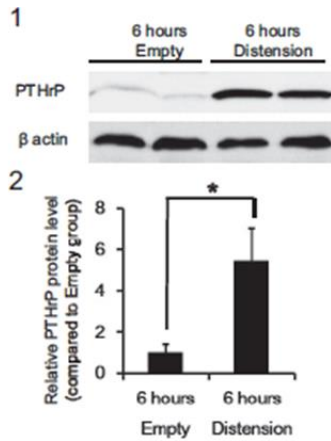


図 3A PTHrP は膀胱伸展に伴い発現が亢進する

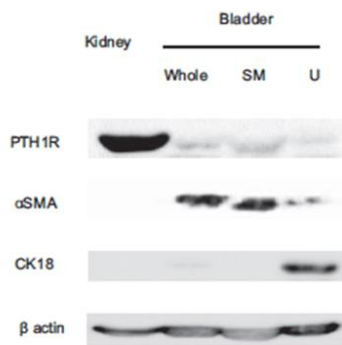


図 3B PTH1R は膀胱平滑筋優位に発現する

②organ bath study において、PTHrP 投与により、膀胱平滑筋片の自発性収縮が抑制された(図 4A)。

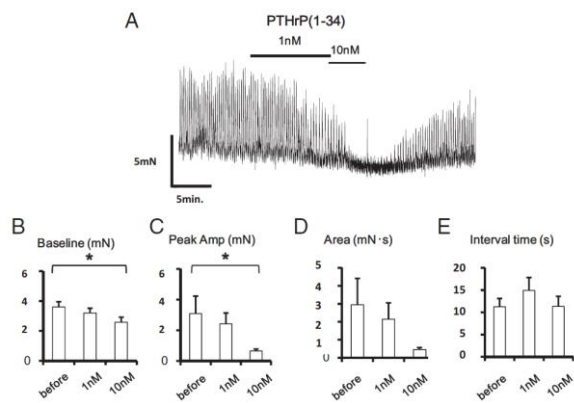


図 4A PTHrP 投与により膀胱平滑筋片の自発収縮が抑制される

カルバコール刺激に伴う平滑筋収縮も PTHrP 投与により抑制された(図 4B)。

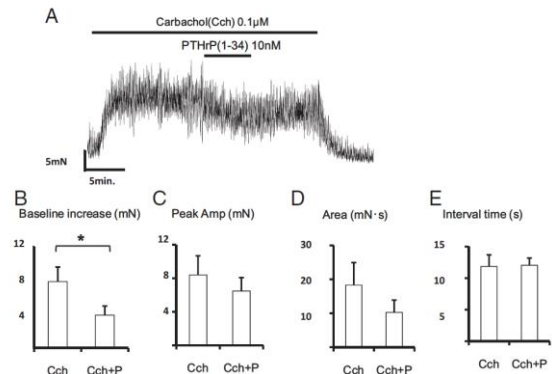


図 4B カルバコール刺激に伴う膀胱平滑筋片の収縮が PTHrP 投与により抑制される

③in vivo の膀胱機能検査においても PTHrP の静脈内投与により最大膀胱内圧を有意に低下させた(図 5)。

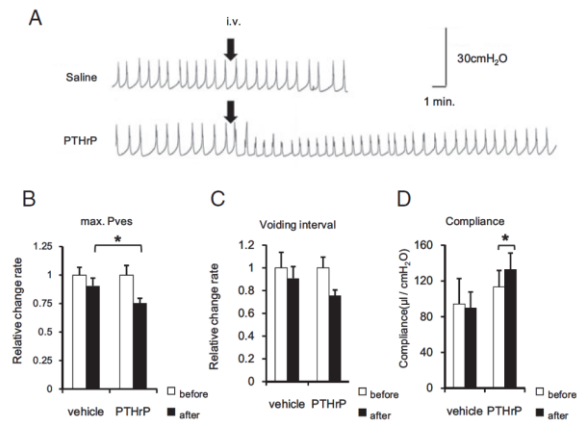


図 5 膀胱機能検査において PTHrP の静脈内投与により最大膀胱内圧を有意に低下する

以上①～③の実験により PTHrP が膀胱平滑筋の自発性収縮の内在性の弛緩因子であることを解明した。これが、夜尿症において夜間の蓄尿不良を生じる機序の原因の一つと考えた。高齢者の夜間多尿にも関与している可能性も考えられ、今後の遺伝子解析において、この知見が参考になると期待される。

## 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)Nishikawa N, Kanematsu A, Negoro H, Imamura M, Sugino Y, Okinami T, Yoshimura K, Hashitani H, Ogawa O. “PTHrP is endogenous relaxant for spontaneous smooth muscle contraction in urinary bladder of female rat.” *Endocrinology*, 査読有, 2013, in press.  
doi: 10.1210/en.2012-2142

[学会発表] (計4件)

① Nobuyuki Nishikawa, Akihiro Kanematsu, Takeshi Okinami, Hiromitsu Negoro, Yoshio Sugino, Masaaki Imamura, Koji Yoshimura, and Osamu Ogawa. “PTHrP signalling system is activated by acute bladder distension“, The 7th Pan-Pacific Continence Society Meeting, 2012.8.28, Nagoya.

②西川 信之、兼松 明弘、根来 宏光、今村正明、杉野 善雄、沖波 武、吉村 耕治、小川 修, “PTHrP シグナル経路は膀胱の急性伸展で活性化される”, 第5回排尿障害モデル動物研究会, 2012.11.30, 静岡.

③西川 信之, “PTHrP シグナル経路は膀胱の急性伸展で活性化される”, 第 22 回泌尿器科分子細胞研究会, 2013.3.9, 高知.

④Nobuyuki Nishikawa, Akihiro Kanematsu, Hiromitsu Negoro, Masaaki Imamura, Yoshio Sugino, Takeshi Okinami, Koji Yoshimura, Hikaru Hashitani, and Osamu Ogawa. “Parathyroid hormone related peptide is endogenous relaxant of spontaneous detrusor smooth muscle contraction”, The 28th Annual Congress of the European Association of Urology (EAU), 2013.3.17, Milan, Italy.

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/medic/research/overview/overview.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉村 耕治 (YOSHIMURA KOUJI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号:40397542

### (2)研究分担者

今村 正明 (IMAMURA MASA AKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号:20594237

(H23→H24年6月:研究分担者)

清水 洋祐 (SHIMIZU YOUSUKE )

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号:00542094