

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861263

研究課題名(和文)メタボロミクス解析を用いた新規過活動膀胱マーカーの探求

研究課題名(英文)Search of a novel biomarker of over active bladder using metabolomics analysis

研究代表者

宮本 達也 (MIYAMOTO, Tatsuya)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80456459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コントロール群としてIPSS(国際前立腺症状スコア)における尿意切迫感スコア0 or 1かつ夜間排尿回数0 or 1の患者26名、過活動膀胱患者としてIPSSにおける尿意切迫感スコア2以上かつ夜間排尿回数2回以上の患者32名を選定した。それぞれの患者から血液サンプルを回収し、このサンプルにおいてメタボロミクス解析を行った。過活動膀胱患者群において高く検出された物質としては、Tetradecanoic acid, Erucic acidを検出した。これらの物質が過活動膀胱の発症に関与しており、新規の診断バイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Control group (n=26): Urgency score of International Prostate Symptom Score (IPSS) is 0 or 1 and nocturnal score is 0 or 1 Over active bladder (OAB) group (n=32): Urgency score of IPSS is 2 and nocturnal score is 2
We collected the blood samples of all patients and analyzed them using metabolomics. Tetradecanoic acid and Erucic acid are higher level in OAB Group than in control group. These metabolites may be involved with onset of OAB and become a novel biomarker of OAB.

研究分野：排尿生理学

キーワード：過活動膀胱 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 過活動膀胱 (overactive bladder : OAB) は尿意切迫感を主症状とし、頻尿、夜間頻尿を伴う症状症候群と定義されている。蓄尿期における排尿筋過活動の存在が示唆されており、現状における OAB 治療薬は主に抗コリン薬と β 3 受容体作動薬が用いられている。抗コリン薬は神経伝達物質である Ach とムスカリン受容体の結合を遮断することにより膀胱の収縮を抑制すると考えられており、過活動膀胱治療薬として最も頻用されている。また β 3 受容体作動薬はアドレナリン受容体に結合し、膀胱の弛緩作用を増強すると考えられており、抗コリン薬に次いで多く使用されている薬剤である。しかし実際の臨床において、抗コリン薬/ β 3 受容体作動薬が著効する患者がいる一方で、無効な患者を経験することも少なくない。その一因として、尿意知覚に関わる情報伝達物質の過剰な放出が過活動膀胱の発症メカニズムのひとつである可能性が示唆されている。抗コリン薬は膀胱の収縮を抑制し OAB 症状を改善すると考えられてきたが、近年は膀胱伸展刺激により膀胱上皮から放出される Ach の作用を抑制することが抗コリン薬の作用の一つとされている。

(2) 新たな尿意伝達メカニズムの解明

近年、膀胱 (尿路) 上皮は、尿中侵害性物質などの膀胱壁内への侵入を阻止する防御機構としての働き以外に、伸展刺激や侵害刺激を感知して、種々の情報伝達物質を放出し、求心性伝達を担う役割を果たしていると考えられている。尿意伝達を担う情報伝達物質には、Ach 以外にもいくつか注目されている物質があるが、我々は ATP に着目して研究を行ってきた。伸展刺激による膀胱上皮からの ATP 放出には、伸展刺激活性化チャネルである Piezo1 や VNUT を介した開口放出が重要であることが分かった。また同時に、Piezo1 や VNUT を発現抑制 (Knockdown/Knockout) することや、これらの分子に対する阻害剤を使用することにより、排尿間隔が変化することも分かった。つまり我々の研究からも尿意知覚を制御することは新しい過活動膀胱治療薬に為り得ることが明らかとなった。

(3) 新しい OAB 治療ターゲット分子/バイオマーカーの探求

これまで述べてきたように、膀胱伸展刺激により様々な情報伝達物質が放出され尿意を伝達すると考えられているが、ヒトにおいて実際の治療ターゲットと成り得る情報伝達物質、分子は、いまだ明らかにされていない。OAB 治療のターゲットと成り得る物質には、膀胱上皮から放出される神経情報伝達物質、また情報伝達物質の受け手である受容体や、

その受容体に対して影響を与える神経成長因子などが考えられる。これら多種多様な神経情報伝達物質、神経成長因子物質の中から、治療のターゲットとなる物質を特定するために、我々はメタボロミクス解析を用いて研究を行いたいと考えている。近年新たな治療ターゲット分子の同定・バイオマーカーの取得には様々な分野でメタボロミクスが用いられている。メタボロミクスではアミノ酸、有機酸、糖、核酸、脂質などの分子量 1000 以下の内因性代謝物を質量分析装置などで一斉分析する手法であり、血液、組織、尿中の物質を 300 種以上を検出できる。また他の omics と比較し、最も生体の状況を反映していると想定されており、また代謝 Pathway 上での解釈が可能な点などがメリットとして挙げられる。現在、うつ病や統合失調症のバイオマーカー探索や解析、抗腫瘍活性を有する化合物のターゲット分子の検討、薬剤性肝障害のバイオマーカー探索などに利用され始めており、非常に有用なツールである。

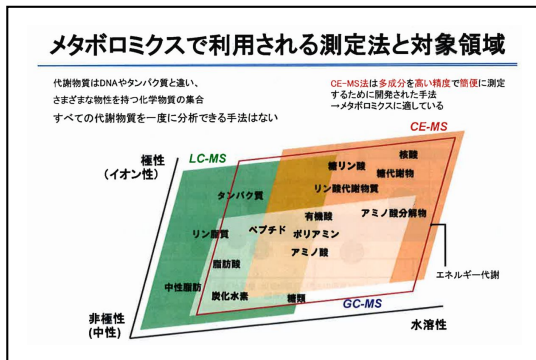
2. 研究の目的

現在、過活動膀胱治療薬としては、主に抗コリン薬と β 3 受容体作動薬が用いられている。しかし実際の臨床において、これらの薬剤が無効な患者を経験することも少なくない。その一因として、尿意知覚に関わる情報伝達物質の過剰な放出が過活動膀胱の発症メカニズムのひとつである可能性が示唆されている。そこで、我々は尿意伝達にかかわる情報伝達物質をメタボロミクス解析を用いて、過活動膀胱症状に関わる新たな治療ターゲット/バイオマーカーを探求したいと考えている。従来の過活動膀胱治療が、“hyperactivity の抑制”であるのに対し、“hypersensitivity の抑制”という新しい過活動膀胱治療のコンセプトとなり得ると考えている。

3. 研究の方法

山梨大学医学部附属病院外来受診患者において同意を得られた患者を対象に血液検体を採取する。対象患者は頻尿を主訴に受診した患者で、IPSS、排尿記録などにて頻尿、尿意切迫感を呈する患者。患者各群は以下の 2 群に振り分ける。コントロール群として IPSS (国際前立腺症状スコア) における尿意切迫感スコア 0 or 1 かつ夜間排尿回数 0 or 1 の患者 26 名、過活動膀胱患者として IPSS における尿意切迫感スコア 2 以上かつ夜間排尿回数 2 回以上の患者 32 名を選定した。上記患者の血液サンプルを採取し、メタボロミクス解析を行い新規 OAB 治療のターゲット分子/バイオマーカーの検索を行う。今回のメタボロミクス研究では LC - MS と CE - MS を用いて代謝産物の測定を行

った。各々の利点としては下図のように種々の物質の測定に優れていることが挙げられる。CE-TOFMS は、アミノ酸、有機酸、核酸、短鎖ペプチド、修飾糖、水溶性ビタミン、未知の物質などの検出に優れており、また LC-TOFMS では、タンパク質、リン脂質、脂肪酸、中性脂肪、炭化水素など測定に優れている。

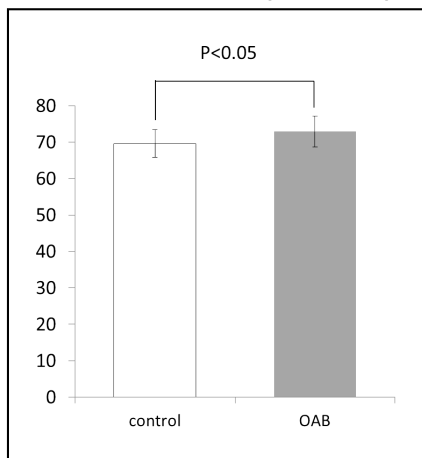


4. 研究成果

年齢

コントロール群 69.6 ± 3.74 歳 (64-77 歳)

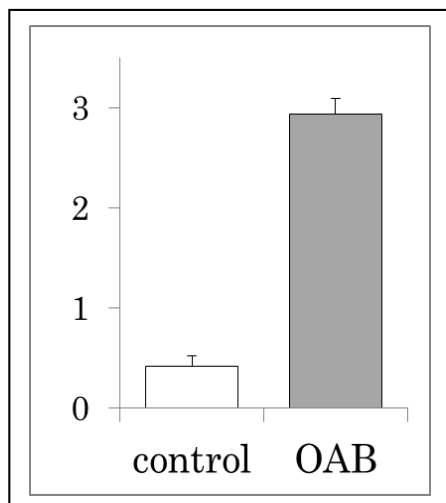
OAB 群 72.9 ± 4.23 歳 (65-79 歳)



結果

コントロール群と比較して、OAB 群では年齢が有意に高かった。

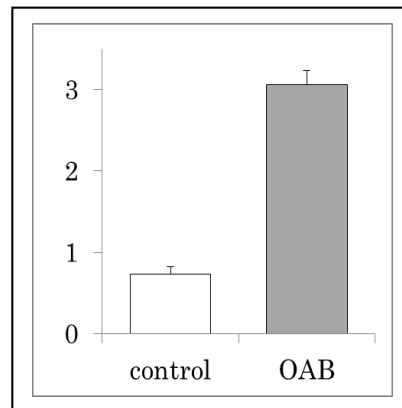
IPSS スコア 尿意切迫感



結果

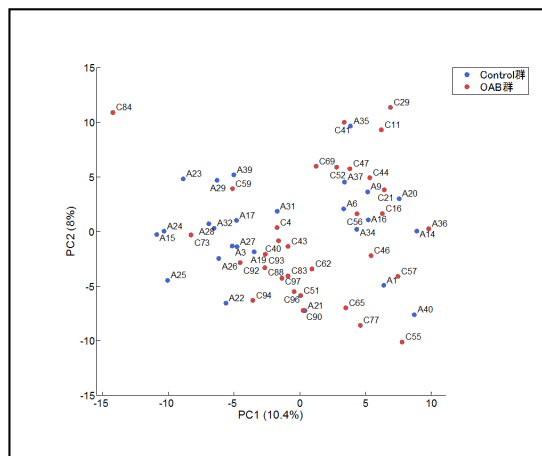
当然ながら、OAB 群では高値であった。

夜間排尿回数



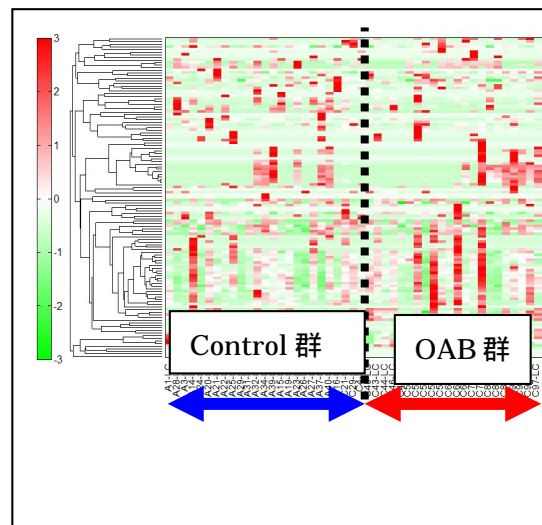
OAB 群では夜間排尿回数も高値であった。

メタボロミクス解析
主成分分析 (PCA-PLOT)



PCA-PLOT からは control 群と OAB 群の検体には検体間に明らかな差は認められなかった。

階層的クラスタリング解析



結果

明らかな偏りや傾向はみられなかった。

測定物質

(1) CE-TOFMS

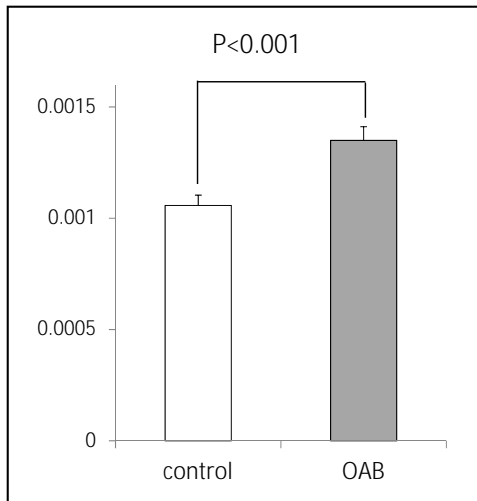
CE-TOFMSにて測定検出し得た物質一覧を下
記に示す。

物質名が判明しており、その物質の測定、定
量可能な物質は 114 種類であった。

2-Hydroxybutyric acid	GDP	Putrescine
2-Oxoglutaric acid	GMP	Pyruvic acid
2-Oxoisovaleric acid	GTP	Ribose 5-phosphate
2-Phosphoglyceric acid	Gln	Ribulose 5-phosphate
3-Hydroxybutyric acid	Glu	S-
3-Phosphoglyceric acid	Gluconic acid	Adenosylmethionine
6-Phosphogluconic acid	Glucose 1-phosphate	Sarcosine
ADP	Glucose 6-phosphate	Sedoheptulose 7-phosphate
AMP	Glutathione (GSH)	Ser
ATP	Glutathione	Spermidine
Acetyl CoA_divalent	Gly	Spermine
Adenine	Glyceroldehyde 3-	Succinic acid
Adenosine	Glycerol 3-phosphate	Thr
Ala	Glycolic acid	Thymidine
Anthranilic acid	Glyoxylic acid	Thymine
Arg	Guanine	Trp
Asn	Guanosine	Tyr
Asp	His	Tyramine
Betaine	Homoserine	UDP
Betaine aldehyde_+H2O	Hydroxyproline	UMP
CDP	Hypoxanthine	UTP
CMP	IMP	Uracil
CTP	Ile	Uridine
Carnosine	Inosine	Val
Choline	Isocitric acid	cAMP
Citric acid	Lactic acid	cGMP
Citrulline	Leu	cis-Aconitic acid
CoA_divalent	Lys	dATP
Creatine	Malic acid	dCTP
Creatinine	Malonyl CoA_divalent	dTDP
Cys	Met	dTMP
Cytidine	N,N-Dimethylglycine	dTTP
Cytosine	NAD ⁺	β-Ala
Dihydroxyacetone phosphate	NADP ⁺	Tetradecanoic acid
Erythrose 4-phosphate	Ornithine	
Fructose 1,6-diphosphate	PRPP	
Fructose 6-phosphate	Phe	
Fumaric acid	Phosphoenolpyruvic acid	
GABA	Pro	

メタボロミクス解析の結果

Tetradecanoic acid m/z 値 227.202



control 群と比較して OAB 群では、
Tetradecanoic acid のみが有意に高値であ
った。

(2) LC-TOFMS

LC-TOFMSにて測定検出し得た物質一覧を
下に示す。

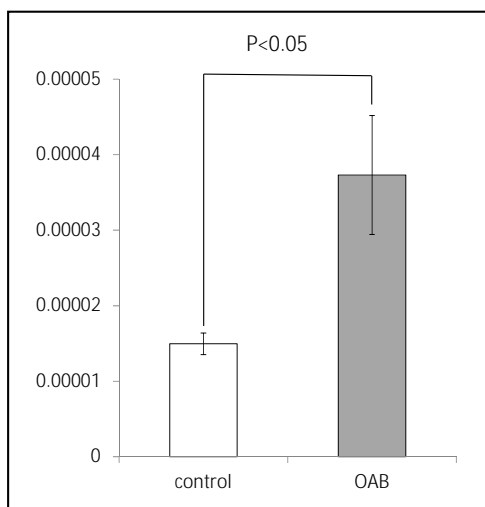
物質名が判明しており、その物質の測定、定
量可能な物質は 87 種類であった。

1,2-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine-1	Linoleyl ethanolamide-1
1,2-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine-2	Linoleyl ethanolamide-2
18-Hydroxycorticosterone	Myristic acid
Cortisol	
19-Hydroxyandrostenedione	
11β-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione	N-Methylphenylethanolamine
21-Deoxycortisol	
Corticosterone	Naringenin
3-Hydroxytetradecanoic acid	Naringenin 7-neohesperidoside
4-Androsten-3,17-dione	Nervonic acid
Arachidic acid	Oleic acid
Arachidonic acid	Oleoyl ethanolamine
Astaxanthin-1	Palmitic acid
Astaxanthin-2	Palmitoleic acid
Behenic acid	Palmitoylcarnitine
Campesterol	Palmitoylethanolamide
Chenodeoxycholic acid	Pentadecanoic acid
Cholesterol	Pregnenolone sulfate
Cholesterol sulfate	Prostaglandin B2
Cholic acid	Ricinoleic acid-1
Cortisone	Ricinoleic acid-2
Daidzein	Serotonin
Dehydroisoandrosterone 3-sulfate-1	Sitosterol
Dehydroisoandrosterone 3-sulfate-2	Sphingomyelin(d18:1/18:0)
Deoxycholic acid	Sphingosine
Desmosterol	Stearic acid
7-Dehydrocholesterol-1	
Desmosterol	Stearidonic acid
7-Dehydrocholesterol-2	
Diosgenin	Stearoyl ethanolamide
Ergosterol	Stigmasterol
Etiocolan-3α-ol-17-one sulfate-1	Taurochenodeoxycholic acid
Etiocolan-3α-ol-17-one sulfate-2	Taurocholic acid
Etiocolan-3α-ol-17-one sulfate-3	Taurodeoxycholic acid
FA(18:3)	Tauroursodeoxycholic acid
Linolenic acid	
Erucic acid	Testosterone
Galangin	Tricosanoic acid
Glycochenodeoxycholic acid	Trilaurin-1
Glycocholic acid	Trilaurin-2
Glycodeoxycholic acid	Ursodeoxycholic acid
Glycolithocholic acid	cis-11,14-Eicosadienoic acid
Glycooursodeoxycholic acid	cis-11-Eicosenoic acid
Heptadecanoic acid	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid-1
	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid-2
	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid
Indole-3-carboxaldehyde-1	FA(20:5)
	Abietic acid
Indole-3-carboxaldehyde-2	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid
Lathosterol-1	α-Tocopherol
Lathosterol-2	γ-Tocopherol
Linoleic acid	

メタボロミクス解析の結果

Erucic acid m/z 値 337.313

control 群と比較して OAB 群では、
Erucic acid のみが有意に高値であ
った。



上記結果より、過活動膀胱患者群において高く検出された物質としては、Tetradecanoic acid, Erucic acid を検出した。これらの物質が過活動膀胱の発症に関与しており、新規の診断バイオマーカーとなる可能性がある。

Future Work としては尿のメタボローム解析や、患者個人の症状の増悪、改善に伴う個人の時系列解析、他の臨床パラメータとの相関解析などを検討している。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 達也 (MIYAMOTO, Tatsuya)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80456459

(2) 研究協力者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：80197318

吉良 聡 (KIRA, Satoru)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：10530115