

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04972

研究課題名(和文) 複雑系ネットワークと動的恒常性破綻による下部尿路機能障害発症機序の研究

研究課題名(英文) Studies on lower urinary tract dysfunction pathogenesis by complex systems network and dynamic homeostasis collapse

研究代表者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・その他部局等・理事

研究者番号：80197318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：夜間頻尿の病態解明と時計遺伝子の研究：Clock遺伝子変異マウスは、夜間頻尿/夜間多尿モデルとなり得る。野生型マウスの初代培養膀胱上皮細胞では、機械センサー遺伝子もClock遺伝子と同様の遺伝子発現の日内変動を示した。Clock遺伝子の異常が、最大膀胱尿意知覚の日内変動の異常を引き起こし、夜間頻尿を惹起し得る。

下部尿路機能障害のバイオマーカー・標的因子の探索：尿中剥離細胞の解析と早朝空腹時に採取した血漿を用いたメタボロミクス解析によって、下部尿路機能症状の発症機序の解明と、非侵襲的な新しいバイオマーカーの発見が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that ClockD19/D19 mice showed the phenotype of NOC/NP. The ClockD19/D19 mouse may be used as an animal model of NOC and NP. The gene expression of mechanosensor, Cx26 and VNUT was maintained at a higher level in spite of the sleep phase. We demonstrated that the time-dependent gene expressions, including clock genes, mechano-sensors, and ARMM, were reproducible in UCs. These findings demonstrated that UCs have the potential to progress research into the circadian functions of the lower urinary tract regulated by clock genes. The expressions of Cxs and TRP channels on urothelial cells in voided urine could be related to LUTS. Male lower urinary tract symptoms may develop due to abnormal metabolic processes in some pathways. Potential new treatments for lower urinary tract symptoms can be developed by identifying changes in the amino acid profiles.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：Lower urinary tract Clock genes Mechanosensor Metabolomics Biomarker

## 1. 研究開始当初の背景

わが国は超高齢化社会を迎え、65歳以上の人口が全体の25%であり(総務省、平成25年9月発表)、人口の高齢化とともに前立腺肥大症、尿失禁、過活動膀胱などの頻度も増加している。過活動膀胱(OAB: Overactive bladder syndrome)は、2002年に国際尿禁制学会によって定義された症状症候群であり、尿意切迫感を必須症状とする蓄尿障害である。日本では約13%がOAB症状を有しているとされ、生活の質を悪化させる疾患である。この尿意切迫感を引き起こすメカニズムは不明であり、尿意を伝達する求心性伝達機構の異常であることが想定されている。

1) 下部尿路機能障害に対する薬物療法: 下部尿路機能は、末梢臓器である膀胱、尿道、前立腺の平滑筋、上皮、間質、血管および外尿道括約筋、さらに大脳から末梢神経系末端のシナプスに至るまで、多くの臓器・組織によって制御されており、下部尿路機能障害研究の対象は多岐にわたる。過去20年間に開発された下部尿路機能障害治療薬には、交感神経系1受容体遮断薬(タムスロシン、ナフトピジル、シロドシン)、抗コリン薬(ソリフェナシン、フェソテロジン)、交感神経系3受容体活性薬(ミラベグロン)、PDE(Phosphodiesterase)5阻害薬(タダラフィル)などがあり、そのほとんどが自律神経系のシナプス後受容体を標的とするものである。研究代表者(武田正之)らは、これらの開発のいくつかに関与しているが、過活動膀胱の必須症状である「尿意切迫感」に対する根本的な治療方法は、ない。

2) 膀胱の機械的受容体: 尿意を伝達するセンサー機構の本体は不明である。機械シグナル伝達は生理的に重要な役割を持ち、陽イオンチャンネルに属すると考えられている。脊髄損傷などで発症する下部尿路機能障害においては、バニロイド受容体(VR1, VRL1)を多く発現する無髄C繊維の役割が重要視されていた。最近、尿路上皮がATPなどの伝達物質を産生し、膀胱知覚の伝達に影響することが判明した(Urology, 2004)。

A) TRPチャンネルファミリー: 近年、知覚神経路における機械的刺激の伝達を担うメカノセンサーの基礎的研究が精力的に行なわれており、その候補分子としてTRP(Transient Receptor Potential)チャンネルファミリーが注目されている(Gillespie & Walker, 2001; Kung, 2005)。TRPV4は30度程度の温度と機械的刺激に対して反応性を有する。われわれは、TRPV4が膀胱上皮細胞に発現しており、マウス膀胱上皮細胞は伸展刺激によって細胞内カルシウム濃度を上昇させ、さらにATPの放出を行うことを証明し、機械的受容体候補であることを示した。Mochizuki T, et al., J Biol Chem, 284:21257, 2009)。TRPV4はヒト膀胱上皮細胞にも発現し、mRNAの発現程度と国際前立腺指数による下部尿路症状との相関を認め(J Urol, 2010)。

過活動膀胱に対する新たな標的分子のひとつと考えられている。

B) Piezo: 近年新たな機械的受容体候補として、Piezo1・2の存在が明らかとなった。我々はすでにマウス、ヒト膀胱上皮にPiezo1が発現し、機械的受容体候補であることを示した。(Miyamoto, T, et al., J Biol Chem, 2014, 289, 23:16565-16575.)

生体臓器には内的・外的負荷に対する個体の動的恒常性維持のための複雑系ネットワークがあり、生物をその構成要素の時間空間横断的な相互作用として再構造化している。

下部尿路機能は、膀胱、尿道、前立腺(男性)、外尿道括約筋機能、さらには中枢/末梢神経系による複雑な調節のみならず、他の骨盤内臓器との相互関係も重要な要素である。また、高齢化に伴う下部尿路症状の発症頻度の増加と生活習慣病の関連が強く示唆されているが、酸化ストレスは生活習慣病発症とは関連が深い。生活の質を大きく損なう夜間頻尿の発症に、時計遺伝子異常の関連が示唆されている(Nat Com 2012)。下部尿路の求心性伝達機構において最も重要なものとして膀胱の機械的受容体があるが、その候補であるTRP(Transient Receptor Potential)チャンネル、Piezo1、小胞型トランスポーターの下部尿路における機能発現・調節機構について、自律神経系機構、酸化ストレスと時計遺伝子・概日リズムとの関係を調べることにより、複雑系ネットワークと動的恒常性破綻という新しい観点から、新規下部尿路機能障害治療法を探索する。

3) 夜間頻尿の原因と時計遺伝子・概日リズム: 夜間(頻)尿とは、「夜間1回またはそれ以上、排尿のために起きなければならない訴え」であり、多くの高齢者を悩ませる、代表的な下部尿路症状(LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms)として生活の質(QOL)の低下に強く関係している。下部尿路症状のうち7項目から構成されるIPSS(国際前立腺症状指数)に含まれる。夜間頻尿は非常に頻度の高い症状で、加齢と共に増加する。ほ乳類の生命現象において、多くの概日リズム(サ-カディアンリズム)が認められるが、時計遺伝子(Clock, Bmal1, Period(Per1, Per2, Per3), Cryptochrome(Cry1, Cry2)など)はこれらの重要な生理学的、行動学的、概日リズムを規定しており、夜間頻尿との関連が想定されている(Negoro, H., Nat Com 2012)。

4) 生活習慣病と下部尿路機能障害: われわれの最近の研究で、ラット腸骨動脈損傷・動脈硬化モデルを用いた過活動膀胱モデルに対して、交感神経系3受容体活性薬ミラベグロンが過活動を改善することを見出した。また、過活動膀胱のみならず、排尿筋収縮力も改善することを示した。その機序の可能性として、膀胱筋層におけるコラーゲンの含有率が減少することも示した(Sawada N, Eur Urol, 2013)。しかしながら、それ以上の作

用機序に関しては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

過活動膀胱を含めた下部尿路機能障害の原因の多くは不明であり、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常などの生活習慣病の重要性が強く示唆されている。そこで、TRPを中心とした膀胱の機械的受容体の研究と生活習慣病の発症に係る酸化ストレス、概日リズム・時計遺伝子研究との関連を中心として、複雑系ネットワークの観点から以下の問題点を解決することを目的とする。

- 1) 低酸素応答における下部尿路組織リモデリング
- 2) マクロファージによる下部尿路組織の代謝制御とその破綻
- 3) 老化シグナルと脂肪組織・下部尿路組織連関
- 4) 一酸化窒素由来ストレスの制御とシグナル機構
- 5) 生体時計ネットワークによる動的ホメオスタシスとその破綻
- 6) TRPチャンネルを介した酸素・活性酸素種のセンシング機構
- 7) 活性酸素シグナルと概日リズムの関連
- 8) ヒト夜間頻尿・過活動膀胱患者におけるオ・ミクス解析

## 3. 研究の方法

ラット、マウスおよびヒトにおいて、下部尿路の求心性神経伝達機構におけるTRPチャンネルファミリー、Piezoの発現とシグナル伝達機構、活性酸素種との関連、概日リズムとの関連を調べる。ラット・マウスの動脈硬化モデルにおいて、こうした機械的受容体の発現、シグナル伝達機構と活性酸素種の発現・消長、概日リズムの変化と過活動膀胱の発症との関連を調べる。機械的受容体の発現とシグナル伝達機構、活性酸素種の発現・消長、概日リズムの変化と過活動膀胱の発症に対する抗ムスカリン薬、交感神経系3受容体活性薬、PDE5阻害薬の影響を調べる。さらにラット・マウスの動脈硬化モデルに相当すると考えられる高齢ヒト夜間頻尿・過活動膀胱患者の試料を用いたオ・ミクス解析を行う。

## 4. 研究成果

夜間頻尿の病態解明と時計遺伝子の研究：Clock遺伝子変異マウス(D19/D19)は、夜間頻尿/夜間多尿モデルとなり得ることを証明した。(Neurourol Urodyn, 2016, 36(4):1034-1038.)

野生型マウスの初代培養膀胱上皮細胞では、Cx26、VNUTなどの機械センサー遺伝子もClock遺伝子と同様の遺伝子発現の日内変動を示した。(PLoS One, 2017, Vol.12, No.1:e0168234)(Neurourol Urodyn 2018 37:942-951.)

最大膀胱容量知覚(SBF)にも日内変動がある。その理由として、clock遺伝子で制御さ

れるPiezo1とTRPV4の発現に日内変動があるためである。clock遺伝子の異常が、最大膀胱尿意知覚の日内変動の異常を引き起こし、その結果夜間頻尿を惹起する可能性を示した。(Sci Rep 2018 Apr 9;8(1):5699. Epub 2018 Apr 9.)

下部尿路機能障害のバイオマーカー・標的因子の探索：

外来での随時排尿の尿中剥離細胞におけるCx、TRPチャンネルの遺伝子発現は、下部尿路症状と相関した。尿中剥離細胞の解析によって、下部尿路機能症状の発症機序の解明と、非侵襲的な新しいバイオマーカーの発見が可能となるかもしれない。

(Neurourol Urodyn. 2018 37:1137-1143.) 58名の男性外来患者(32名はIPSS8以上、26名は7以下)から、早朝空腹時に採取した血漿を用いてメタボロミクス解析を行った。グルタミン酸の増加、アルギニン、アスパラギン酸、イノシン1リン酸の減少が男性下部尿路症状と相関した。また、シツルリンとグルタミンの減少も男性下部尿路症状と相関した。(J Urol, 199, 5:1-7, 2018.)

過活動膀胱について同様の解析を行った結果、グルタミン酸の増加、アルギニン、アスパラギン酸、イノシン1リン酸の減少が男性の過活動膀胱と相関した。アスパラギンとヒドロキシプロリンの減少も過活動膀胱と相関した。

(Urology 2018 May 9. Epub 2018 May 9.)

## 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40件)

【抜粋】

1. Mitsui T, Kira S, Ihara T, Sawada N, Nakagomi H, Miyamoto T, Shimura H, Yokomichi H, Takeda M: Metabolomics approach for male lower urinary tract symptoms: An identification of possible biomarkers and potential targets for new treatments. J Urol, 199:1312-1318, 2018. (査読有)
2. Yoshida M, Takeda M, Gotoh M, Nagai S, Kurose T: Vibegron, a Novel Potent and Selective beta3-Adrenoreceptor Agonist, for the Treatment of Patients with Overactive Bladder: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase 3 Study. Eur Urol, 73:783-790, 2018. (査読有)
3. Huang Y, Zhang Z, Huang Y, Mao Z, Yang X, Nakamura Y, Sawada N, Mitsui T, Takeda M, Yao J: Induction of inactive TGF- $\beta$ 1 monomer formation by hydrogen sulfide contributes to its suppressive effects on Ang II- and TGF- $\beta$ 1-induced EMT in renal tubular epithelial cells. Biochem

- Biophys Res Commun 2018 Jun 10;501(2):534-540. Epub 2018 May 10. (査読有)
4. Shimura H, Mitsui T, Kira S, Ihara T, Sawada N, Nakagomi H, Miyamoto T, Tsuchiya S, Kanda M, Takeda M: Metabolomic Analysis of Overactive Bladder in Male Patients: Identification of Potential Metabolite Biomarkers. Urology 2018 May 9. Epub 2018 May 9. (査読有)
  5. Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Kanda M, Tsuchiya S, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Kamiyama M, Hirayama Y, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Nakao A, Takeda M, Koizumi S: The oscillation of intracellular Ca influx associated with the circadian expression of Piezo1 and TRPV4 in the bladder urothelium. Sci Rep 2018 Apr 9;8(1):5699. Epub 2018 Apr 9. (査読有)
  6. Mitsui T, Araki A, Goudarzi H, Miyashita C, Ito S, Sasaki S, Kitta T, Moriya K, Cho K, Morioka K, Kishi R, Shinohara N, Takeda M, Nonomura K: Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Am J Hum Biol 2018 Apr 6:e23127. Epub 2018 Apr 6. (査読有)
  7. Kira S, Mitsui T, Miyamoto T, Ihara T, Nakagomi H, Sawada N, Takeda M: Lack of Change in the Adaptation Ability of the Bladder for the Urine Production Rate in Aged Men with Nocturia. Urol Int 2018 Apr 26:1-5. Epub 2018 Apr 26. (査読有)
  8. Kon M, Mitsui T, Kitta T, Moriya K, Shinohara N, Takeda M, Nonomura K: Impact of posterior urethral diameter/external urethral sphincter diameter as a new tool to predict detrusor pressure in the voiding phase. Int Urol Nephrol 2018 Feb 14;50(2):211-215. Epub 2017 Dec 14. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 3 5 件)

【抜粋】

1. Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Imai Y, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Nakao A, Takeda M: Restraint stress induces nocturia in mice, 32nd Annual EAU Congress(European Association of Urology 2017)
2. Mitsui T, Tsuchiya S, Sawada N, Ihara T, Kira S, Nakagomi H, Takeda M: Increased mRNA expression of transient receptor potential channels in the urothelium of

- patients with interstitial cystitis: Possible biomarker, 32nd Annual EAU Congress(European Association of Urology 2017)
3. Kira S, Mitsui T, Miyamoto T, Ihara T, Nakagomi H, Sawada N, Takeda M: Disruption of adaptation in bladder capacity for urine production rate during night time in aged men with nocturia: Analysis of the frequency volume chart, 32nd Annual EAU Congress(European Association of Urology 2017)
  4. Mitsui T, Araki A, Miyashita C, Ito S, Kitta T, Moriya K, Cho K, Morioka K, Takeda M, Shinohara N, Kishi R, Nonomura K: Effects of sex hormones during the prenatal period on behavioral sexual dimorphism in school-aged children, 32nd Annual EAU Congress(European Association of Urology 2017).
  5. Shimura H, Ihara T, Mochiduki T, Imai Y, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Mitsui T, Takeda M: Development of new and non-invasive diagnostic markers on urothelial cells in voided urine for the lower urinary tract symptoms/lower urinary tract dysfunction, 32nd Annual EAU Congress(European Association of Urology 2017).
  6. Nakagomi H, Miyamoto T, Ihara T, Kira S, Sawada N, Mitsui T, Koizumi S, Takeda M: ATP related to vnut maintains the normal bladder storage function, AUA 2017.
  7. Sawada N, Kira S, Ihara T, Mochizuki T, Imai Y, Nakagomi H, Mitsui T, Andersson KE, Takeda M: The ameliorative potential of tamsulosin on bladder function in a rat model of chronic pelvic ischemia, AUA2017.

〔図書〕(計 6 件)

【抜粋】

1. 谷口珠美、武田正之編：下部尿路機能障害の治療とケア：病態の理解と実践に役立つ (泌尿器 Care & Cure Uro-Lo 別冊) メディカ出版、2017。
2. 武田正之、三井貴彦：排尿障害治療薬、治療薬 UP-TO-DATE 2017、メディカルレビュー社 2017
3. 座光寺秀典、武田正之：腹腔鏡下手術中に発生した下大動脈損傷への対処、「泌尿器科領域におけるトラブルシューティング」、泌尿器外科泌尿器外科 Vol.29 特別号、2017。
4. Fry C, Chess-Williams R, HAashitani H, Kanai A, McCloskey K, Takeda M, Vahabi B, Mitsui T: Cell Biology, Incontinence 6th ed. Health Publication Ltd., London, 148-255, (2017).

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

1 ) 名称 : 「睡眠期頻尿及至多尿モデル、及び評価対象薬剤の睡眠期頻尿及至多尿治療効果の評価方法」

発明者 : 井原達矢、武田正之、中尾篤人、中村勇規

権利者 : 山梨大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2015 - 175724

(山梨大学整理番号 P15-029)

出願年月日 : 2015 年 9 月 7 日

国内外の別 : 国内

2 ) 名称 : 「難治性夜間頻尿・夜間多尿症バイオマーカー、これを用いた検査方法及び難治性夜間頻尿・夜間多尿症の予防剤又は改善剤のスクリーニング方法」

発明者 : 井原達矢、武田正之、三井貴彦、吉良 聡、中込宙史、橋本由佳

権利者 : 権利者 : 山梨大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2017 - 190024

(山梨大学整理番号 P17-038)

出願年月日 : 2017 年 9 月 29 日

国内外の別 : 国内

取得状況（計 0 件）

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・その他・理事

研究者番号 : 80197318

(2) 研究分担者

富永 真琴 (TOMINAGA, Makoto)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・自然科学研究機構・  
教授

研究者番号 : 90260041

小泉 修一 (KOIZUMI, Shuuichi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号 : 10280752

(3) 連携研究者

芳山 充晴 (YOSHIYAMA, Mitsuharu)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号 : 20422694

澤田 智史 (SAWADA, Norifumi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号 : 70402055

吉良 聡 (KIRA, Satoru)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号 : 10530115

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