

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13057

研究課題名(和文) コラーゲン遺伝子多型に着目した骨盤臓器脱高リスク発生群の選別化と早期リハビリ介入

研究課題名(英文) Screening for high risk patients of pelvic organ prolapse focused on polymorphisms of collagen and early intervention by pelvic floor rehabilitation

研究代表者

芦刈 明日香 (Ashikari, Asuka)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80768599

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)：骨盤臓器脱患者の発生要因として後天的要因は有名だが、遺伝子多型という先天的要因に着目した。TaqMan SNP Genotyping Assayを用いて骨盤臓器脱患者の末梢白血球由来DNAを抽出し、コラーゲンtype1、type3遺伝子多型、コラーゲンとエラスチンの架橋形成に関与するLysyl oxidase like-1、-4(LOXL-1、-4)の遺伝子多型を骨盤臓器脱患者と非骨盤臓器脱患者で比較検討した。その結果、LOXL-4の遺伝子多型(rs2862296)で骨盤臓器脱発症の高リスクとなる可能性が示唆された(オッズ比3.8～4.5倍)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨盤臓器脱は中高年女性において約10人に1人発生と言われ、よくある疾患である。しかし羞恥心やあまり知られていない疾患であることから医療機関の受診が遅れがちである。早期介入で発症の予防や症状の改善が十分期待でき、介入すべき女性のスクリーニングとして血液検査で遺伝子多型を調べ、「骨盤臓器脱が起こりやすい体質」を見抜き発症予防や早期治療介入につなげることが可能になると考える。それにより500万人いると推定される骨盤臓器脱の中高年女性の生活の質(QOL)の改善に寄与し、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Cause of pelvic organ prolapse (POP) is well known for acquired risk factor (e.g. parity, age and obesity), however we focused on genetic risk factor of POP that has been reported in European and American populations. Collagen and elastin are main structures of female pelvic tissues. So we investigated whether single nucleotide gene polymorphisms (SNP) of collagen type I alpha 1 (COL1A1), collagen type III alpha 1 (COL3A1) and lysyl oxidase-like (LOXL)-1/4 were associated with the onset of POP in Japanese women. We investigated each genotype of the SNPs by using TaqMan SNP genotyping assay. The polymorphism of LOXL-4, an enzyme which is essential for extracellular matrix remodeling, had relationship to the onset of POP in Japanese women(Odds ratio 3.8-4.5). The knowledge of acquired risk factors and this kind of genomic background in patients with POP would help to improve surgical indications or to prevent POP by earlier conservative interventions.

研究分野：泌尿器科

キーワード：骨盤臓器脱 遺伝子多型 コラーゲン エラスチン 女性骨盤底

1. 研究開始当初の背景

骨盤臓器脱は、膀胱、子宮、直腸といった骨盤内臓器が腔から脱出し、排尿・排便障害を始めとした症状を引き起こし、著明に生活の質を低下させる。加齢や多産、肥満がその発症リスクとなり、閉経した女性の3割に起こるとされる。しかし、未経産婦、痩せ型の低リスク女性にも骨盤臓器脱が発生している。

コラーゲンの中でも type3 は、主に腔壁、骨盤臓器に分布することが分かっている (Chung. Curr Opin Obstet Gynecol 2006)。Type3 の遺伝子多型が骨盤臓器脱の原因として示唆されている (Ward. Am J Obstet Gynecol 2014)。欧米の報告から、骨盤臓器脱の発症に、加齢や多産などの後天的要因だけでなく、先天的要因である遺伝子多型が関与していることが分かっていたが、人種差も大いに関与している可能性がある。そこで、日本人のデータがないことと、さらに骨盤底結合織を構成する二大要素であるコラーゲンとエラスチンに着目した。

2. 研究の目的

対象とする疾患は、膀胱、子宮、直腸といった女性の骨盤内臓器が腔から脱出する骨盤臓器脱である。靭帯・筋肉といった骨盤底を形成するコラーゲンとエラスチンといった腔壁や骨盤臓器を支持する靭帯に多く存在する細胞外マトリックスに関与する遺伝子多型に着目し、その遺伝子多型を骨盤臓器脱患者とコントロールで比較を行う。骨盤臓器脱発症にかかわる遺伝子多型を調べる事で、将来的には骨盤臓器脱発生高リスク女性の見極めと早期の骨盤底筋訓練といったリハビリテーション介入により予防や初期治療につなげる。

(1) コラーゲンやエラスチンに関与する蛋白の遺伝子多型を骨盤臓器脱患者とコントロールと比較する。

骨盤臓器脱の発生には、環境要因ばかりではなく遺伝的背景が示唆される。

遺伝的背景が判明すれば、低リスク、高リスク発生群を推測できる。

高リスク発生群が分かれば、骨盤底筋訓練など早期に理学的治療介入(リハビリテーション)が可能となる。手術が標準治療になっている骨盤臓器脱に予防という概念を導入できる。

(2) さらに、骨盤底脆弱性に起因する腹圧性尿失禁モデルとして出産擬似ラット(腔壁急性拡張)を作製し、骨盤底の形態変化をイメージングすると共に、私たちが独自に開発したラットにくしゃみを誘発する手法を用いて尿道機能評価を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒトを対象とした検討(担当: 芦刈明日香、宮里実・須田哲司・須川愛(研究協力者))

下記の遺伝子多型について、それぞれゲノタイプの頻度を骨盤臓器脱患者とコントロール(非骨盤臓器脱群)で比較する。

検討遺伝子(これまでの欧米の報告で骨盤臓器脱発症と関連が示唆されているもの): コラーゲン type3 (COL3A1)、コラーゲン type1 (COL1A1)、リシルオキシダーゼ(Lysyl oxidase: LOX、細胞外マトリックスの形成・修復に重要な酵素)ファミリーである LOXL-1、LOXL-4 (表1)

表1

gene	SNP	Genotype
COL1A1	rs1800012	CC, CA, AA
COL3A1	rs1800255	GG, GA, AA
	rs1801184	TT, TC, CC
LOXL-1	rs2165241	CC, CT, TT
LOXL-4	rs2862296	AA, AG, GG

骨盤臓器脱患者 (POP-Qstage3 以上) 52 人とコントロール群 28 人を比較した。

各被験者末梢血白血球から DNA を抽出。

各被験者 DNA を SNP サイト特異的な TaqMan プローブを用いた定量 PCR により増幅。

Taqman Genotyping Analysis によりアレル(対立遺伝子)識別解析を行い、各 SNP のゲノタイプの頻度を比較検討した。

(2) 動物モデルを用いた検討(担当: 芦刈明日香、宮里実)

出産擬似ラットを用いた実験: 腹圧性尿失禁モデル

(モデル作製) 麻酔下に腔壁をバルーン 4cc で 3 時間急性拡張、血流障害を利用して骨盤底筋群を損傷、腹圧性尿失禁モデル作成 (Miyazato et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2008)。作成後 3 日後のラットを用いた(急性腔拡張ラット、Vaginal Distension rat (VD rat))。

尿道機能評価

麻酔: ウレタン麻酔を使用した。

尿道収縮物質を静脈投与し、尿道機能を評価した。

尿道収縮薬物: トラマドール、[D-Ala2, NMe-Phe4, Gly-ol5]-enkephalin (DAMGO)

尿道マイクロチップ法: ラッド尿道内に挿入、留置した 3Fr マイクロチップカテーテルにより正常雌ラットと腹圧性尿失禁モデルラットで比較。また、上記薬剤投与による反応・変化を比較した。

立位リークポイント圧法（尿が漏れる膀胱内圧の測定）：ラットに膀胱瘻を作成し、立位に固定した状態で、膀胱瘻より生理食塩水をゆっくり注入する事で膀胱内圧を徐々に上昇させ、はじめに尿道から漏れが生じた時の膀胱内圧を測定する。正常雌ラットと腹圧性尿失禁モデルラットで比較。また、上記薬剤投与による反応・変化を比較した。

4. 研究成果

(1) ヒトを対象とした遺伝子多型の検討

骨盤臓器脱患者 52 人とコントロール群 28 人の背景に置いて、骨盤臓器脱群で有意に年齢と経産数が多くなっていた。BMI は同程度であった（表 2）。

ゲノタイプの頻度において、LOXL-4 の遺伝子多型 rs2862296 で骨盤臓器脱群とコントロール群に統計学的有意差を認めた（表 3）。また、同遺伝子多型のゲノタイプのオッズ比は、AA に対して AG が 3.8 倍（95%CI 1.3-11.8, $p < 0.05$ ）、GG が 4.5 倍（95%CI 1.2-19.3, $p < 0.05$ ）であった。

上記より、コラーゲンやエラスチンの形成・修復に関与する酵素である LOXL-4 の遺伝子多型（rs2862296）が骨盤臓器脱発症に関連があることが示唆された。LOXL-1 ノックアウトマウスで骨盤臓器脱を生じる事が報告されている（Liu et al. BJU Int. 2007）が、LOXL-4 と骨盤臓器脱発症に関する報告は初めてである。過去の欧米からのシステマティックレビューで関連が示唆されたコラーゲン type1, type3 や LOXL-1 の遺伝子多型では統計学的関連は無かったが、人種差による差もあると思われ日本人独自のデータがやはり重要であると考えられた。

(2) 動物モデルを用いた検討

出産擬似ラットと正常雌性ラットで骨盤底機能評価のため尿道機能を調べる実験を行った。

尿道マイクロチップカテーテルによる尿道内圧測定において、安静時尿道収縮圧に関する尿道平滑筋の機能は正常ラットと出産擬似ラット（Vaginal Distention rat: VD rat）間では有意な差は無かったが、腹圧時（くしゃみ時）の尿道反射圧（横紋筋である外尿道括約筋の収縮反射の強さ）は出産擬似ラットで著明に低下を認めていた。また、薬剤トラマドール（ μ オピオイド受容体刺激作用とセロトニン・ノルアドレナリン再吸収阻害作用を併せ持つ）と選択的 μ オピオイド受容体刺激薬である DAMGO を各々静脈投与すると正常ラットでは安静時、腹圧時ともに尿道収縮力が増強した（図 1、図 2）が、出産擬似ラットでは薬剤の効果の一部減弱していた（図 1 VD rats）。

表 2

	POP group n=52	Control group n=28	P-value
Age (years)	69.9±7.2	62.8±11.0	0.0035*
BMI (kg/m ²)	24.6±3.2	24.5±4.6	NS
Parity (range)	3.3±0.94 (1-5)	2.58±1.5 (0-6)	0.0022*
POP-Q stage (n)	≤ I	0	28
	II	0	-
	III	31	-
	IV	21	-

表 3

SNP ID (gene)	Genotype	POP group n, (%)	Control group n, (%)	P-value
rs1800255 (COL3A1)	GG	21 (40.4)	7 (25.9)	NS
	AG	25 (48.1)	15 (55.6)	
	AA	6 (11.5)	5 (18.5)	
rs1800012 (COL1A1)	CC	52 (100)	28 (100)	-
	CA	0	0	
	AA	0	0	
rs2165241 (LOXL-1)	CC	42 (80.8)	19 (67.9)	NS
	CT	8 (15.4)	8 (28.6)	
	TT	2 (3.9)	1 (3.6)	
rs2862296 (LOXL-4)	AA	11 (21.2)	14 (51.9)	0.0204*
	AG	27 (51.9)	9 (33.3)	
	GG	14 (26.9)	4 (14.8)	

図 1 トラマドール

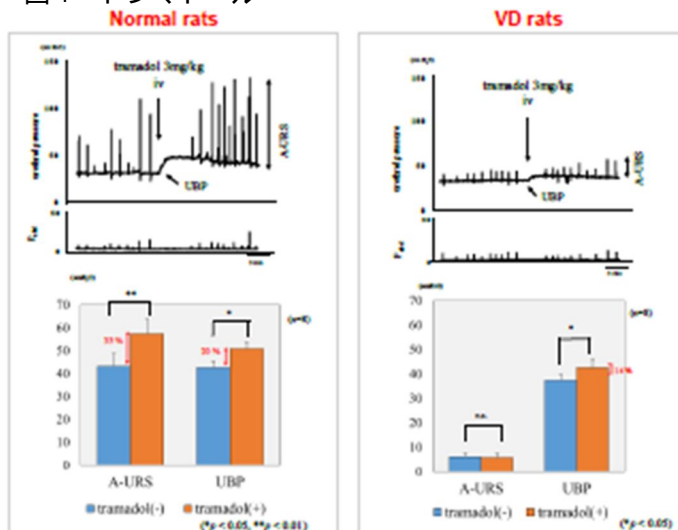


図 2 DAMGO

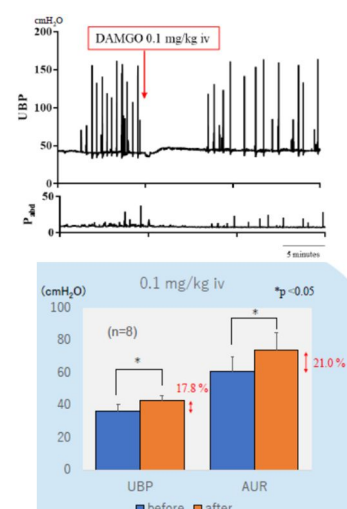
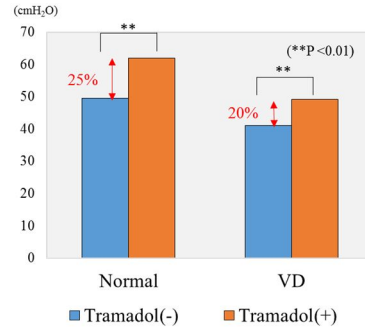
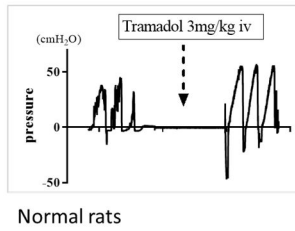
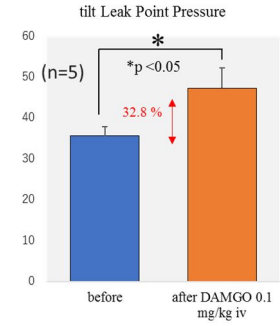


図3 立位尿漏出圧

a ترامadol



b DAMGO



立位尿漏出圧測定

正常ラットと比べて出産擬似ラットでは尿漏出圧が低くなっていたが、両者とも薬剤による尿道収縮圧の増強が見られた。(図3a,b)

まとめ：

上記結果より、遺伝子多型の解析により骨盤臓器脱発症高リスク患者を早期に知る事で発症や骨盤底リハビリテーションなど治療早期介入することで進行を抑制することにつながる事を考えている。動物実験からは骨盤底障害による尿道機能低下について評価でき、今後新たな薬物療法における腹圧性尿失禁の治療ターゲットの研究を進展させていく。骨盤臓器脱については、全ゲノム解析によりより詳細なゲノム情報から正確な骨盤臓器脱発症高リスク患者を抽出できるよう、さらなる研究を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ashikari Asuka, Miyazato Minoru, Kimura Ryu, Oshiro Takuma, Saito Seiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 The effect of tramadol on sneeze-induced urethral continence reflex through μ -opioid receptors in the spinal cord in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nau.23518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Asuka Ashikari
2. 発表標題 Role of spinal μ -opioid receptors by tramadol on sneeze-induced urethral continence reflex in rats
3. 学会等名 第70回西日本泌尿器科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦刈明日香
2. 発表標題 当院における骨盤臓器脱手術前後の排尿症状の変化 —TVMとLSCの比較—
3. 学会等名 第25回日本排尿機能学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦刈明日香
2. 発表標題 当院における骨盤臓器脱手術前後の排尿症状の変化—TVMとLSCの比較—
3. 学会等名 第13回日本骨盤臓器脱手術学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦刈明日香
2. 発表標題 "ワークショップ POP手術後再発の検証 POP再発の患者背景における危険因子"
3. 学会等名 第13回日本骨盤臓器脱手術学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Ashikari
2. 発表標題 A POTENTIAL NEW TARGET FOR STRESS URINARY INCONTINENCE: A μ -OPIOID RECEPTOR IN THE SPINAL CORD BY TRAMADOL IN RATS
3. 学会等名 American Urological Association（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮里実
2. 発表標題 骨盤臓器脱に対する腹腔鏡下仙骨脛固定術初期導入の検討
3. 学会等名 第31回日本泌尿器内視鏡学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芦刈明日香
2. 発表標題 腹圧性尿失禁薬物治療の新たなターゲットの可能性：tramadolによるラット脊髄内オピオイドu受容体と尿道機能の関連
3. 学会等名 第24回日本排尿機能学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asuka Ashikari
2. 発表標題 Are collagen type1A1, type3A1 and LOXL1/4 polymorphisms a risk factor for pelvic organ prolapse in Japanese women?
3. 学会等名 International continence society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Ashikari
2. 発表標題 A POTENTIAL NEW TARGET FOR STRESS URINARY INCONTINENCE: A m-OPIOID RECEPTOR IN THE SPINAL CORD ACTIVATED BY A SELECTIVE AGONIST D-ALA2-ME-PHE4-GLY(OL)5-ENKEPHALIN IN RATS
3. 学会等名 American Urological Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 脊髄オピオイド受容体を介した新規腹圧性尿失禁薬剤	発明者 宮里実、芦刈明日香	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-235701	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脊髄オピオイド受容体を介した新規腹圧性尿失禁薬剤	発明者 宮里実、芦刈明日香	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-235701	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	宮里 実 (Miyazato Minoru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	須田 哲司 (Suda Tetsuji)		
研究協力者	須川 愛 (Sugawa Ai)		