

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09154

研究課題名(和文)フラボノイド系化合物による膀胱時計調律機構の解明と夜間頻尿患者の時間治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the bladder clock function using flavonoids and its application for timed therapy in nocturia patients

研究代表者

伊東 晴喜 (ITO, Haruki)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・臨床研究企画運営部・研究員

研究者番号：10817448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：夜間頻尿は生体の日内変動の異常と捉えられノビレチン・タンゲレチン混合物(NoT)はフラボノイドで概日リズムを調節するとされる。そこで平均年齢73.5歳の夜間頻尿患者にNoTを50mg(ノビレチン30mgタンゲレチン15mg含)を6週間投与した。夜間膀胱容量には影響がなく夜間排尿回数が-0.5回と有意に低下し高齢者に対し明らかな有害事象はなかった。NoTは夜間頻尿を改善させる新しいオプションとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

夜間頻尿は下部尿路症状の中で最も困窮度が高い症状と言われその病因が多因子であり治療が臨床的に困難なことが多い。また実臨床において高齢者が多いため、安全かつ夜間頻尿を改善させるノビレチン・タンゲレチン混合物が期待される。

基礎研究からは、ノビレチンは尿路上皮細胞株の時計遺伝子発現を増強させコネキシン43のタンパク発現に影響を与えた。排尿機能に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nocturia can be considered a circadian rhythm disorder. Nobiletin and tangeretin (NoT) are flavonoids derived from the peel of Citrus depressa, and they have been found to modulate circadian rhythms. Nocturia patients with an average age of 73.5 years received NoT50mg (30 mg of nobiletin + 15 mg of tangeretin) once daily for 6 weeks. NoT showed little change in nocturnal bladder capacity but resulted in decreased nighttime frequency (-0.5 voids) with a tendency toward reduced nocturnal polyuria index (nocturnal urine volume). No adverse events directly related to NoT were observed. Our study provides potential evidence of a novel and safe therapeutic option for nocturia.

研究分野：夜間頻尿

キーワード：夜間頻尿 時計遺伝子 ノビレチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)夜間頻尿は高齢になるにつれて頻度が増加する。下部尿路症状の中で最も困窮度が高く、その病因が多岐にわたり複雑に絡み合っている。生活指導を主体に、限られた適応例には薬物治療が行われているが、広く適応のある安全で有効な治療法が望まれている。

### 2. 研究の目的

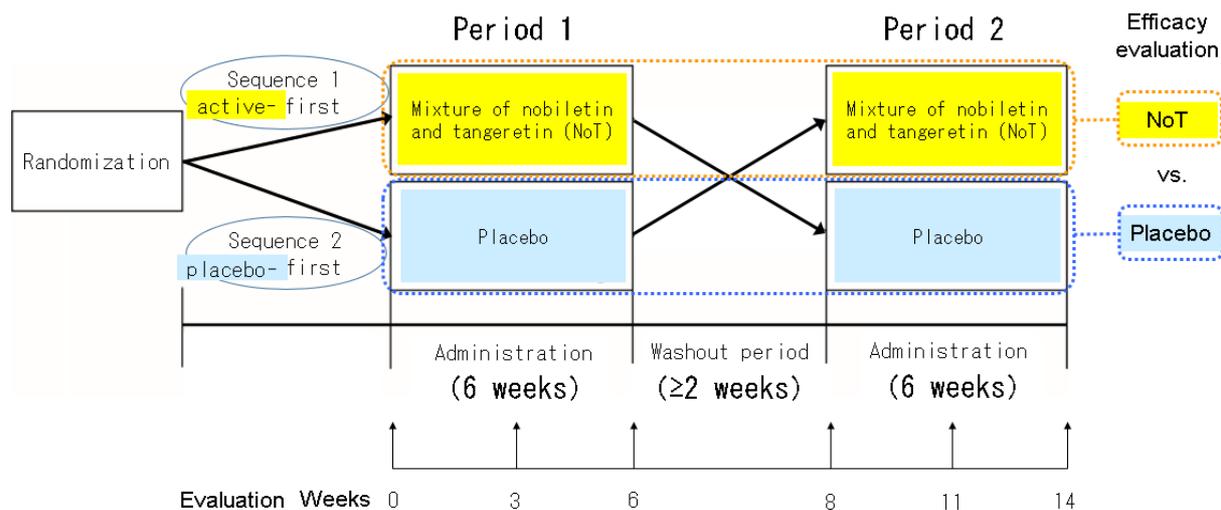
(1)近年、夜間頻尿を膀胱容量・尿産生・睡眠覚醒の概日リズムの崩れと捉えうるエビデンスが蓄積されてきている。そこで本研究において、概日リズムを調節するといわれているノビレチン・タンゲレチン混合物(NoT)の夜間頻尿への効果と安全性を、高齢者が多い実臨床の患者集団で検証することを目的とした。

(2)基礎研究ではノビレチン・タンゲレチン混合物が膀胱尿路上皮末梢時計へ与える影響の解析と、その他の調律因子の探索を行うこととした。尿路上皮末梢時計の調律因子は未だ不明であり、ノビレチン・タンゲレチンが尿路上皮の概日リズムに与える影響を検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1)ノビレチンはポリフェノールの1つで、フラボノイド系化合物である。シークワーサー(果皮)に多く含有されている。抗糖尿・抗肥満・抗炎症、美白効果・筋肉量改善や認知機能改善効果などが報告されている。また概日時計の周期の延長・振幅の増加など、概日時計機構調節作用が認められている。このノビレチンを用いた本研究は特定臨床研究であり、ランダム化プラセボ対照2重盲検化クロスオーバー比較試験のデザインとし(図1)、40例、50歳以上の男女で排尿日誌で夜間排尿回数が2回以上の夜間頻尿患者を対象に行い、全日多尿患者は除外した。実食品先行群はNoT50mg(ノビレチン30mgタンゲレチン15mg含)を毎夕6週間投与し、その後2週間以上のウォッシュアウト期間を設け、その後偽食品を毎夕6週間投与した。偽食品先行群の患者はその逆とした。主要評価項目は排尿日誌による夜間膀胱容量の変化、副次評価項目は夜間排尿回数、夜間多尿指数の変化等とした。

(図1)



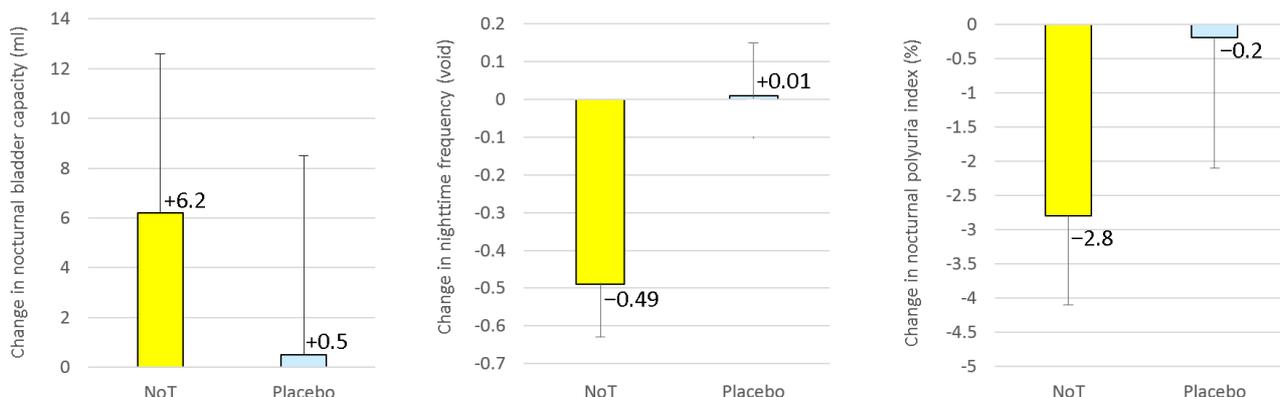
(2) *in vitro*での基礎研究では、2種類のヒト不死化尿路上皮細胞株(TRT-HU1、TERT-NHUC)にP(Bmal1)-dLucを遺伝子導入し、レポーター細胞を作製した。血清刺激後の培養液中にノビレチンを混和させ、発光リズムを測定した。*per1-Luc*ラットの膀胱の発光リズムに与える影響を *ex vivo*にて測定した。さらにTRT-HU1におけるmRNAレベルでの時計遺伝子発現への影響をqPCRにて評価した。

### 4. 研究成果

(1)計40人の患者(平均年齢73.5歳、男性27人、女性13人)を割付し36人の患者が試験を完了し4人が脱落となり、その理由は糖尿病教育入院、尿路感染症、原発不明癌、コンプライアンス不良が各1人で明らかにNoTに直接関連すると思われる有害事象はなかった。

主要評価項目の夜間膀胱容量は、NoTで $6.2 \pm 38.6$  ml、偽食品で $0.5 \pm 47.9$  mlの増加で有意差はなかった(差 $5.7$  ml,  $P=0.61$ ) (図2)。副次評価項目の夜間排尿回数は、NoTで $-0.49 \pm 0.86$ 回と減少、偽食品で $0.01 \pm 0.82$ 回と増加し、NoTが偽食品より有意に減少した(差 $-0.50$ 回,  $P=0.040$ )。夜間多尿指数はNoTで $-2.8 \pm 8.1\%$ 、偽食品で $-0.2 \pm 11.6\%$ であり有意差はなかったが減少傾向を認め(差 $-2.6\%$ ,  $P=0.30$ )。その夜間多尿指数におけるNoTの前後差(実食品摂取期間での変化量)は $42.7\%$ から $39.9\%$ と有意に減少していた(差 $-2.8\%$ ,  $P=0.048$ )。

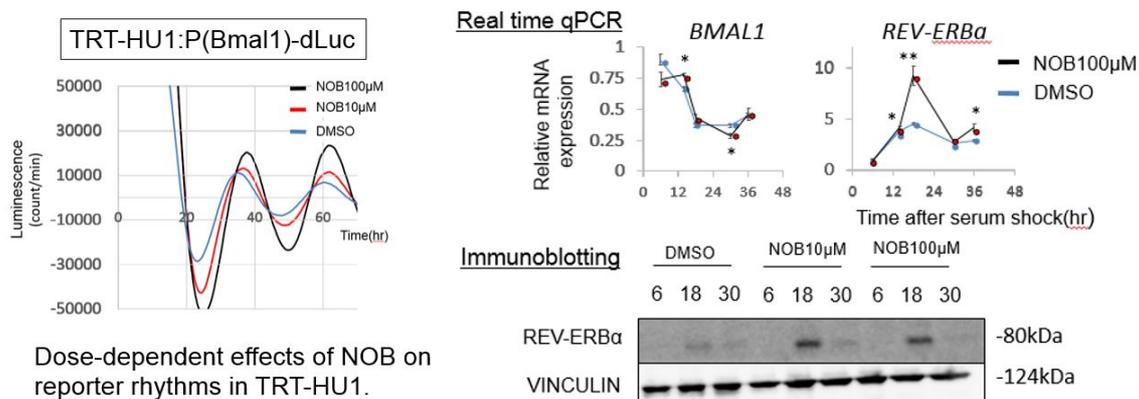
(図2)



NoT 摂取により夜間膀胱容量には影響がなかったが、夜間排尿回数が偽食品摂取より有意に低下した。NoT の夜間頻尿の改善には夜間多尿指数の低下が寄与すると考えられた。

夜間頻尿患者において NoT は夜間多尿指数の低下に寄与し、偽食品より夜間排尿回数を有意に低下させ、高齢者に対しても明らかな有害事象は認めなかった。この研究結果は夜間頻尿を改善させる新しいオプションとして、NoT を使用した大規模かつ長期間の研究を行うための根拠となりうる。シークワサーの皮が原料であり、エコノミカル/エコロジカルな機能性表示食品として、一般に広く使用でき得る状況である。

(2) TRT-HU1: P(Bmal1)-dLuc、TERT-NHUC: P(Bmal1)-dLuc のいずれにおいても発光概日リズムを確認することが出来た。ノビレチンの混和により、濃度依存性に概日リズムの振幅は増大し周期は延長した。per1-Luc ラットの膀胱においても同様の結果であった。mRNA ではノビレチンの混和による TRT-HU1 の Rev-erba の遺伝子発現・蛋白発現が増強することを確認した。また、時計制御遺伝子であるギャップジャンクション構成蛋白コネキシン 43 (Cx43) の発現もフラボノイド系化合物投与により、タンパク発現が低下することが確認された。



Dose-dependent effects of NOB on reporter rhythms in TRT-HU1.

◆ NOB could be applied to the treatment of nocturia as a compound that can ameliorate the disturbed day-night urination rhythm.

ヒト不死化尿路上皮レポーター細胞 (TRT-HU1: P(Bmal1)-dLuc, NHU-TERT: P(Bmal1)-dLuc), *per1*-Luc ラット膀胱において、ノビレチンによる発光リズムの振幅の増強、周期の延長効果を確認することが出来た。TRT-HU1 では、*Rev-erba* の mRNA、蛋白発現増強効果を確認できた。ノビレチンは日内排尿リズムを変化させ得る化合物として、夜間頻尿の治療に応用できる可能性が示唆された。一方で、*vivo* で m p フラボノイド系化合物の投与実験を行うにあたり、膀胱時計遺伝子が発現低下している評価モデルとして、*Cre-loxP* システムを用いて尿路上皮特異的 *Bmal1*KO マウスを作成した。マウスの排尿行動を測定したが、現時点ではコントロールと比べて大きな変化は確認できていないため、ノビレチン投与実験は施行していない。

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 1件）

1. 著者名 Ito Haruki, Negoro Hiromitsu, Kono Jin, Hayata Naoki, Miura Takayoshi, Manabe Yumi, Miyazaki Yu, Mishina Mutsuki, Woo Je Tae, Sakane Naoki, Okuno Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effectiveness and Safety of a Mixture of Nobiletin and Tangeretin in Nocturia Patients: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Crossover Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2757 ~ 2757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12082757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊東晴喜、根来宏光、河野仁、渡邊岳之、早田直生、三浦高慶、真鍋由美、宮崎有、三品睦輝、禹濟泰、奥野博
2. 発表標題 夜間頻尿患者に対するノビレチン・タンゲレチン混合物の効果と安全性に関する研究(NoT-nocturia study)：ランダム化プラセボ対照2重盲検化クロスオーバー比較試験
3. 学会等名 第29回日本排尿機能学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ito H, Negoro H, Kono J, Igarashi A, Hayata N, Miura T, Manabe Y, Miyazaki Y, Mishina M, Woo J, Okuno H
2. 発表標題 Efficacy and safety of a mixture of Nobiletin and Tangeretin in patients with nocturia (NoT-N octuria study): A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study
3. 学会等名 52th International Continence Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東晴喜
2. 発表標題 夜間頻尿におけるノビレチンの効果と安全性
3. 学会等名 ノビレチン研究会第6回学術研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野仁、根来宏光、上田政克、千菊敦士、小川修
2. 発表標題 フラボノイド系化合物ノピレチンの膀胱時計遺伝子発現に対する影響
3. 学会等名 第26回時間生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東 晴喜
2. 発表標題 実地医家のための夜間頻尿の治療
3. 学会等名 第23回内科-泌尿器科 病診連携の会 藤ノ森カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東晴喜
2. 発表標題 夜間頻尿における薬物療法の実際～難治性過活動膀胱にどう対応するか～
3. 学会等名 第25回内科-泌尿器科 病診連携の会 藤ノ森カンファレンス
4. 発表年 2021年

〔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
研究 分担者	後藤 崇之  (Goto Takayuki)  (90806605)	京都大学・医学研究科・講師    (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	根来 宏光  (Negoro Hiromitsu)  (80708595)	筑波大学・医学医療系・准教授    (12102)	
研究分担者	奥野 博  (Okuno Hiroshi)  (90263079)	独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・内分泌代謝高血圧研究部・研究室長    (84305)	
研究分担者	坂根 直樹  (Sakane Naoki)  (40335443)	独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・臨床研究企画運営部・研究室長    (84305)	

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