

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11175

研究課題名（和文）難治性夜間頻尿・夜尿症において時間遺伝子および伸展受容体の遺伝子多型が与える影響

研究課題名（英文）Effect of polymorphism in clock genes and mechano-sensors on refractory nocturia and nocturnal enuresis

研究代表者

三井 貴彦（MITSUI, Takahiko）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90421966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：排尿日誌、症状質問票をもとに年齢などの背景を一致させた夜間頻尿の男性患者（夜間頻尿群）と夜間頻尿を認めない男性（健常群）の血液を採取し、時計遺伝子(CLOCK、PER2、DBP)について測定し解析を行った。PER2およびDBPにおいて健常群に比べて夜間頻尿群で変異があると考えられた部分を同定した。現在、夜間排尿回数、夜間多尿指数など夜間頻尿に関連するパラメータに関連する変異部分を解析している。一方、CLOCKについては、さらに多数の変異した部分を認め、現在解析を行っている。このように夜間頻尿に関連した遺伝子多型の候補部分を確認することができた。今後は、より多くの症例で検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、夜間頻尿に関連した遺伝子多型の候補部分を確認することができた。今後、さらに夜間頻尿の病態と時計遺伝子の多型の関連性を明らかにすることで、難治性夜間頻尿における時計遺伝子の異常をターゲットした新規治療法の開発に寄与することができると考えている。今後は、今回のデータで得られた変異がみられる部分を中心に、より多くの症例で検討する予定である。伸展受容体についても現在測定を行っており、時計遺伝子多型との関連性を明らかにしたい。

研究成果の概要（英文）：Using bladder diary and questionnaires regarding lower urinary tract symptoms, male participants were divided into Normal group who did not have nocturia and Nocturia group. Blood samples were collected and analyzed for polymorphisms of clock genes such as CLOCK, PER2 and DBP. We identified several polymorphisms of PER2 and DBP related to nocturia. Now, we also analyze our data of polymorphisms including parameters of nocturia such as night-time frequency, nocturnal polyuria index and so on. Further, we also analyze polymorphisms of CLOCK, which would show more variances of gene related to nocturia. Thus, our study shows several polymorphisms of clock genes related to nocturia. We will investigate to confirm our data in more patients with nocturia.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：時計遺伝子 遺伝子多型 夜間頻尿

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

夜間頻尿は、一般的に夜間の排尿回数が2回以上になるとQOLを著しく低下させることから治療の対象となる。夜間頻尿の原因は夜間の膀胱容量の減少と夜間尿量の増加であり、前立腺肥大症や過活動膀胱などの膀胱蓄尿機能障害や夜間多尿、睡眠障害など、さまざまな因子が関与している<sup>1</sup>。このように夜間頻尿は患者のQOLに影響を与えることから治療が行われ、ある一定の効果が得られるが、実際の日常診療の中には治療に苦慮する症例が少なからずいることから、新たな治療が待ち望まれている。

我々の研究室ではマウスを用いた実験により、時計遺伝子の一つであるClock遺伝子の変異マウスが夜間頻尿・夜間多尿を呈することを見出し、特許を取得している(特願2015-175724)<sup>2</sup>。さらに、このマウスを用い膀胱上皮機能の日内変動を解析したところ、メカノセンサーやコネクシンなどの膀胱上皮の伸展受容体機能の日内変動の異常により夜間頻尿が発症する可能性を見出している。一方、ヒトにおいて時計遺伝子の多型が様々な疾病を発症させる事が報告されているが、夜間頻尿や夜尿症と時計遺伝子の多型の間に関連性が推察されるものの、明らかになっていないのが現状である。

日常診療において、従来の夜間頻尿に対する治療は対症療法が主であり、既存の治療法に反応しない難治性の患者が少なくない。そのため、新たな治療法、特に変異時計遺伝子産物をターゲットにした夜間頻尿に対する新たな創薬につながる可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、夜間頻尿時計遺伝子多型との関連性を検討し、難治性の夜間頻尿および夜尿症の病態解明の端緒とすることである。夜間頻尿の病態と時計遺伝子の多型の関連性を明らかにすることで、難治性夜間頻尿における時計遺伝子の異常をターゲットとした治療法の開発に寄与することができると考えている。

### 3. 研究の方法

山梨大学医学部附属病院泌尿器科に通院中の男性患者を対象とした。排尿日誌、症状質問票、血液検体の採取を行った。血液検体は、血液中の白血球からDNAを採取し、時計遺伝子に関連した一塩基多型(single nucleotide polymorphism : SNP)についてタカラバイオ株式会社で解析をおこなった。

アプリケーションノート[次世代シーケンサーで測定を行うDNAの断片化を評価するTaqMan<sup>TM</sup> Assay]を参考に、定量的PCR法にてゲノムDNAの品質検定を行った。RN あせ P の遺伝子領域を対象として、サイズの異なるアンプリコン(87bp : Short および 268bp : Long)の定量的PCRを行い、それぞれのDNA定量値の比率を計算した。87bpのアンプリコン検出にはTaqMan<sup>TM</sup> RNase P Detection Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いた。268bpのアンプリコン検出にはTaqMan<sup>TM</sup> MGB 遺伝子発現検出キット Fragmented DNA QC Assay (Thermo Fisher Scientific社)を用いた。各サンプルに対してカスタムパネルを用いてmultiplex PCR法により増幅を行った。増幅したPCR産物の両末端にあるプライマー配列を酵素処理にて部分的に消化し、リン酸化処理後、バーコード付きアダプターを連結した。その後、Agencourt<sup>TM</sup> AMPure<sup>TM</sup> XP (Becman Coutler Science社)による精製を実施し、生成物を鋳型としPCR増幅を実施した。追加PCRを行ったDNAライブラリーに対して追加精製を実施し、シーケンスライブラリーとした。

### 4. 研究成果

(1) 排尿日誌、症状質問票をもとに年齢などの背景を一致させた夜間頻尿の男性患者(夜間頻尿群)と夜間頻尿を認めない男性(健常群)の血液を採取し、時計遺伝子(CLOCK、PER2、DBP)について測定し解析を行った。夜間排尿回数は夜間頻尿群で有意に多く(2.5回 vs 0.4回)、夜間

表 排尿日誌の結果

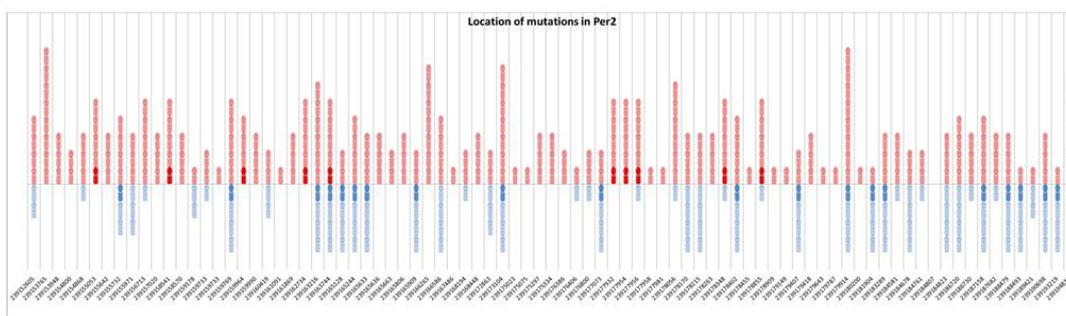
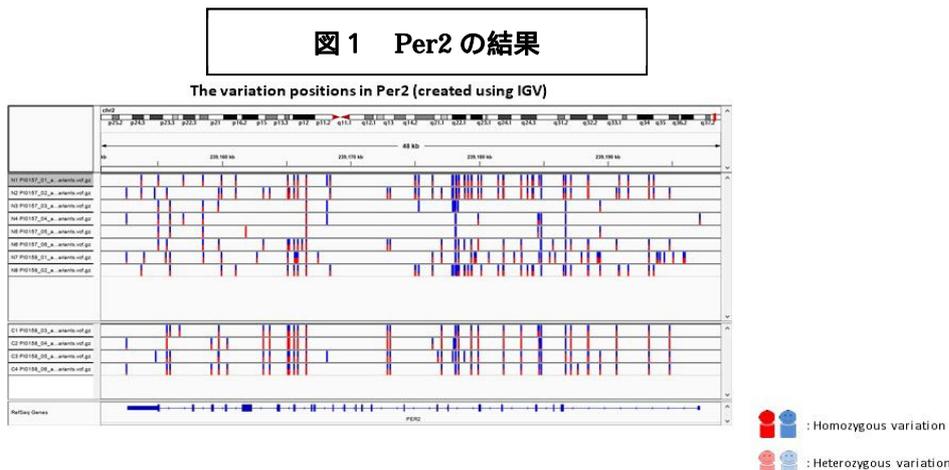
	健常群(N=4)	夜間頻尿群(N=8)
1日尿量	1594.17 (150.61)	1397.75 (399.28)
夜間尿量	365.83 (74.65)	560.46 (252.55)
排尿回数/日	7.25 (3.40)	9.99 (2.34)
夜間排尿回数	0.42 (0.50)	2.52 (0.48)
最大1回排尿量	438.33 (253.92)	247.96 (108.51)
夜間多尿指数	0.24 (0.04)	0.39 (0.09)
夜間頻尿指数	0.97 (0.34)	2.28 (0.51)
夜間膀胱容量指数	0.44 (0.28)	1.24 (0.71)

: 平均 (標準偏差)

尿量 (560mL vs 366mL)、夜間多尿指数 (0.39 vs 0.24) も夜間頻尿群で高かった。一方、最大一回排尿量は、夜間頻尿群で低かった (248mL vs 483mL)。(表)

(2) PER2 において健常群に比べて夜間頻尿群で変異があると考えられた部分は、239153765 (SNP)、239155053 (SNP)、239158541 (SNP)、239162734 (SNP)、239166265 (SNP)、239177932 (SNP)、239177954 (SNP) であった。(図1)

図1 Per2の結果



(3) DBP において変異があると考えられた position は、49134388 (SNP)、49135043 (SNP)、49135790 (SNP)、49136651 (SNP) であった。(図2)

現在、夜間排尿回数、夜間多尿指数など夜間頻尿に関連するパラメータに関連する変異部分を解析している。

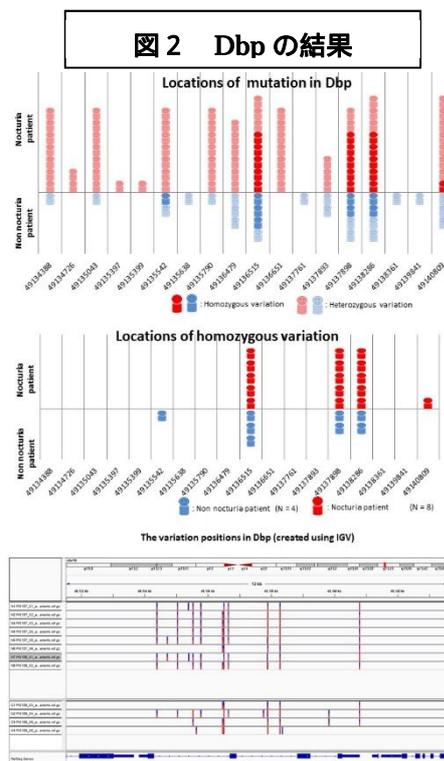
(4) CLOCK については、さらに多数の変異した部分を認め、現在解析を行っている。

このように夜間頻尿に関連した遺伝子多型の候補部分を確認することができた。今後は、今回のデータで得られた変異がみられる部分を中心に、より多くの症例で検討する予定である。伸展受容体についても現在測定を行っており、時計遺伝子多型との関連性を明らかにしたい。

引用文献

1. 日本排尿機能学会 / 日本泌尿器科学会: 夜間頻尿診療ガイドライン [第2版]. RichHill Medical, 2020
2. Ihara, T., Mitsui, T., Nakamura, Y. et al.: The Clock mutant mouse is a novel experimental model for nocturia and nocturnal polyuria. Neurourology and urodynamics, 2016

図2 Dbpの結果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8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 Shimura H, Mitsui T, Kira S, Ihara T, Sawada N, Nakagomi H, Miyamoto T, Tsuchiya A, Kanda M, Takeda M	4. 巻 118
2. 論文標題 Metabolomic analysis of overactive bladder in male patients: identification of potential metabolite biomarkers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Urology	6. 最初と最後の頁 158-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.urology.2018.05.001.	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 -

1. 著者名 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	4. 巻 37
2. 論文標題 The time-dependent variation of ATP release in mouse primary cultured urothelial cells is regulated by the Clock gene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurourology and urodynamics	6. 最初と最後の頁 2535-2543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nau.23793	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 -

1. 著者名 Kira Satoru, Mitsui Takahiko, Miyamoto Tatsuya, Ihara Tatsuya, Nakagomi Hiroshi, Hashimoto Yuka, Takamatsu Hajime, Tanahashi Masayuki, Takeda Masahiro, Sawada Norifumi, Andersson Karl-Erik, Takeda Masayuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Liquid chromatography mass spectrometry identification of serum biomarkers for nocturia in aged men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 2199-2205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00345-019-02647-4	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 -

1. 著者名 Kira S, Mitsui T, Miyamoto T, Ihara T, Nakagomi H, Hashimoto Y, Takamatsu H, Tanahashi M, Sawada N, Takeda M	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolomics analysis in blood identifies possible targets and potential biomarkers for new treatment in nocturia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ther Adv Urol	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） なし	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 -

1. 著者名 Shimura Hiroshi, Mitsui Takahiko, Tsuchiya Sachiko, Miyamoto Tatsuya, Ihara Tatsuya, Kira Satoru, Nakagomi Hiroshi, Sawada Norifumi, Imai Yuki, Mochizuki Takanori, Takeda Masayuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Development of novel and non-invasive diagnostic markers for lower urinary tract symptoms using urothelial cells in voided urine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 1137-1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nau.23436	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 -

1. 著者名 Ihara Tatsuya, Mitsui Takahiko, Nakamura Yuki, Kanda Mie, Tsuchiya Sachiko, Kira Satoru, Nakagomi Hiroshi, Sawada Norifumi, Kamiyama Manabu, Hirayama Yuri, Shigetomi Eiji, Shinozaki Youichi, Yoshiyama Mitsuharu, Nakao Atsuhito, Takeda Masayuki, Koizumi Schuichi	4. 巻 8
2. 論文標題 The oscillation of intracellular Ca <sup>2+</sup> influx associated with the circadian expression of Piezo1 and TRPV4 in the bladder urothelium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23115-w	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 -

1. 著者名 Ihara Tatsuya, Mitsui Takahiko, Nakamura Yuki, Kanda Mie, Tsuchiya Sachiko, Kira Satoru, Nakagomi Hiroshi, Sawada Norifumi, Hirayama Yuri, Shibata Keisuke, Shigetomi Eiji, Shinozaki Yoichi, Yoshiyama Mitsuharu, Nakao Atsuhito, Takeda Masayuki, Koizumi Schuichi	4. 巻 37
2. 論文標題 The Circadian expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26, and VNUT, associated with the expression levels of the clock genes in mouse primary cultured urothelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 942-951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nau.23400	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 -

1. 著者名 Mitsui Takahiko, Kira Satoru, Ihara Tatsuya, Sawada Norifumi, Nakagomi Hiroshi, Miyamoto Tatsuya, Shimura Hiroshi, Yokomichi Hiroshi, Takeda Masayuki	4. 巻 199
2. 論文標題 Metabolomics Approach to Male Lower Urinary Tract Symptoms: Identification of Possible Biomarkers and Potential Targets for New Treatments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1312-1318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.juro.2017.11.070	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 -

1. 著者名 Kira S, Mitsui T, Miyamoto T, Ihara T, Nakagomi H, Hashimoto Y, Takamatsu H, Tanahashi M, Takeda M, Tsuchiya S, Sawada N, Takeda M	4. 巻 -
2. 論文標題 Urinary metabolites identified using metabolomic analysis as potential biomarkers of nocturia in elderly men.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World J urology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00345-019-03042-9	査読の有無 無
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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Mitsui T, Kira S, Ihara T, Sawada N, Nakagomi H, Shimura H, Miyamoto T, Tsuchiya S, Kanda M, Takeda M
2. 発表標題 Metabolism of fatty acids and bile acids in plasma are associated with overactive bladder: metabolomics analysis for possible biomarkers and potential targets for new treatments
3. 学会等名 International continence society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ihara T, Mitsui T, Takeda M
2. 発表標題 The dysfunction of clock genes induces nocturia associated with disrupted gene expression rhythm of mechano-sensory channels in the mouse bladder urothelium
3. 学会等名 WCP2018 Kyoto 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsui T, Takeda M
2. 発表標題 The Role of the Central Nervous System in Regulating Lower Urinary Tract Function
3. 学会等名 WCP2018 Kyoto 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉良 聡、三井貴彦、宮本達也、橋本由佳、中込宙史、井原達矢、澤田智史、武田正之
2. 発表標題 夜間頻尿における新規標的分子の網羅的探索：尿を用いたメタボロミクス解析
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 井原達矢、中村勇規、三井貴彦、今井佑樹、望月孝規、吉良 聡、中込宙史、澤田智史、繁富英二、篠崎陽一、中尾篤人、小泉修一、武田正之
2. 発表標題 慢性ストレスにより誘発された夜間頻尿は膀胱の時計遺伝子異常を伴う
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018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
研究協力者	武田 正之  (TAKEDA Masayuki)  (80197318)	山梨大学・その他部局等・理事   (13501)	
研究協力者	井原 達矢  (IHARA Tatsuya)  (90622407)	山梨大学・大学院総合研究部・助教   (13501)	