

機関番号：13401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390422

研究課題名 (和文) メタボリック症候群候補遺伝子の変異・多型は下部尿路症 (LUTS) の原因か

研究課題名 (英文) Does polymorphism of metabolic syndrome-related genes induce lower urinary tract symptoms?

研究代表者

横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：90242552

研究成果の概要 (和文)：メタボリック症候群候補遺伝子の変異が下部尿路症状 (lower urinary tract symptoms: LUTS) の発生と関連しているのか、ヒトあるいは病態モデルを用いて検討して以下の結果を得た。

- (1) 過活動膀胱患者の血液サンプルを用いて、特に cyclooxygenase-2 (COX-2) 遺伝子多型 (JAMA 291:2221, 2004) について検討した。COX-2 のプロモーター領域には -765 番目のグアニンがシトシンに変異している一塩基多型 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) が存在するが、その頻度は低く、これが直接過活動膀胱発生に関与しているとは考えにくかった。しかし、ヒトの症状スコアと尿中パラメーター (PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、NGF、substance P) を用いて解析した結果、脳血管障害患者では、その phenotype としての尿中 PGE<sub>2</sub> 量は下部尿路症状、特に過活動膀胱 (overactive bladder; OAB) 症状と有意に関連し、他のメディエーターである PGF<sub>2α</sub>、NGF、substance P よりも強い相関があった。脊髄疾患患者でも OAB 症状と尿中 PGE<sub>2</sub> 量とは有意の相関を示した。
- (2) 福井県住民健康診査を受けた男女を対象に、夜間頻尿と下部尿路症状とメタボリック症候群のリスク因子との相関を検討した。その結果、夜間頻尿は肥満・高血圧・心疾患・不眠が独立したリスクで、メタボリック症候群の危険因子の数が多いほどオッズ比が大きかった。
- (3) なぜ上位脳血管障害患者で尿中 PGE<sub>2</sub> 量が上昇するのか、動物モデルを用いた検討を行った。ラットに脳梗塞を起こさずに排尿反射のみを亢進させても尿中 PGE<sub>2</sub> 量や ATP 量に変化はみられなかった。しかし脳梗塞を作成すると膀胱壁の ATP 量増加が認められ、知覚 C 線維をレジニフェラトキシンにて脱感作すると ATP 増加はみられなかった。したがって脳梗塞により膀胱の知覚 C 線維の upregulation が生じていると考えられた。PGE<sub>2</sub> 量は遅れて増加するものと推測される。
- (4) メタボリック症候群の病態モデルを用いて、排尿筋過活動の発生について実験を行った。その結果、高フルクトース食にて 11 ヶ月飼育したラットでは、高血圧・インスリン抵抗性が獲得され、排尿回数の増加とともに膀胱壁 COX-2 発現の上昇・尿中 PGE<sub>2</sub> の増加がみられた。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the relationship between polymorphism of metabolic syndrome-related gene and occurrence of lower urinary tract symptoms, using human blood samples and animal pathological models.

Organ ischemia is thought to be caused by matrix digestion by metalloproteinases (MMPs) leading to rupture of atherosclerotic plaques. Production of macrophage MMP-2 and MMP-9 is induced by cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis. The -765G->C polymorphism of the COX-2 gene has been reported to associate with a decrease risk of myocardial infarction and stroke. Detection of this genotype may be useful to predicting genetic risk of bladder storage dysfunction

because bladder ischemia is known as one of the important risks for lower urinary tract symptoms (LUTS). Using blood samples of patients with overactive bladder (OAB), the -765G-> C variant was genotyped. As the prevalence of the variant was low in these patients, the significant relationship was not found. Next, to investigate the association between the urinary levels of PGE2, PGF2 $\alpha$ , nerve growth factor (NGF) and substance P, and OAB symptoms, urine samples from 114 patients in the chronic phase of a brain disease and 27 healthy controls were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. As a result, the urinary PGE2 level was putatively elevated in patients with suprapontine brain diseases and associated with the presence of OAB. We collected data on 28,238 individuals (9,286 males and 18,952 females) who participated in a multiphasic health screening in Fukui, Japan. The overall prevalence of nocturia (defined as two or more voids/night) was 5.8%. In the multivariate analysis, a significant association was found between nocturia and the followings: age, male gender, BMI<18.5, BMI>27.0, high blood pressure and impaired glucose tolerance. The number of components of MetS was correlated with nocturia.

Using rat animal models with cerebral infarction (CI), we investigated the underlying mechanism of increase in the urinary PGE2 level in patients with suprapontine brain diseases. The ATP amount in the bladder of CI rats was 2.24 times larger than that of sham operated (SO) rats 6 hours after CI. Compared with SO rats, the mRNA expression of P2X3, ASIC2, TRPV1, M2 and M3 in the bladder wall increased after CI, meaning upregulation of C fiber afferent nerves of the bladder. These changes were not found in rats pretreated with resiniferatoxin.

As an animal model of metabolic syndrome, rats were fed with fructose-rich diet for 11 months. Rats revealed hypertension, glucose intolerance, and frequent voiding. The expression of COX-2 in the bladder wall was found to increase in these rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：メタボリック症候群、遺伝子多型、下部尿路症状、COX-2

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 頻尿、尿意切迫感、尿失禁などの蓄尿症状、尿勢低下、尿線途絶、腹圧排尿、排尿遅延などの排尿症状、残尿感などの排尿後症状を併せて下部尿路症状 (LUTS; Lower Urinary Tract Symptoms) と呼ぶ。一方、メタボリック症候群は、肥満(内臓脂肪蓄積)とインスリン抵抗性という共通の病態を基盤として、高血圧、脂質異常、高血糖が重積し、粥状動脈硬化症に基づく虚血性心疾患や脳血管障害の発症が増大する疾患である。メタボリック症候群は複数の遺伝因子の存在を背景として、そこに過食や運動不足などの環境因子の負荷が加わ

り発症にいたるいわゆる複合遺伝形質 (complex trait)あるいは多因子遺伝性疾患 (multifactorial disease)と考えられている。

われわれは、平成 17 年度福井県前立腺検診受診者 (3,624 人) や平成 17 年度福井県住民健康診査を受けた女性 18,952 人に下部尿路症状の調査を行い、下部尿路症状と基礎疾患、血圧、肥満度 (BMI) などとの相関について解析した。その結果、下部尿路症状には心疾患・呼吸器疾患・糖尿病、蓄尿症状には高血圧・呼吸器疾患、夜間頻尿には肥満・高血圧・心疾患・不眠が独立した危険因子になることが解明された (2006 日泌総会、東京; 2007NBS、福島)。

また、4, 915 名の下部尿路症を有する症例に対しタムロシン投与を行った全国調査の結果を再解析した。高血圧合併例には蓄尿症状が強く、また  $\alpha_1$  ブロッカーの効果も有意に高いことが判明した (2007NBS、福島)。基礎実験では自然発生高血圧ラットに種々のストレスを負荷して交感神経系を亢進させると排尿間隔の短縮がみられ、これが CRF 受容体遮断剤で拮抗されること (2006NBS、東京)、尿道刺激によって誘発される排尿間隔の短縮が  $\alpha_1$  ブロッカーで抑制されること (J Urol 177: 771, 2007) を報告した。以上の結果は、メタボリック症候群を構成する病態と下部尿路症状を構成する病態の間には共通の発症リスクが存在し、特に高血圧の発症因子と下部尿路症状との間には強い相関関係が存在することを示唆する。

このようにわれわれがこれまでに行った検診受診者対象の疫学調査の結果、メタボリック症候群と下部尿路症状との間には多くの共通するリスクが存在することが解明され、メタボリック症候群の 1 つの症候として下部尿路症が存在する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) メタボリック症候群候補遺伝子の変異・多型が phenotype としての下部尿路症の多彩な症状を反映している可能性を追求するため、ヒトゲノム DNA サンプルを集め塩基配列を決定して多型の解析を行う。

(2) 福井県住民健康診査を受けた男性、女性の下部尿路症状とメタボリック症候群のリスク因子 (肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症)、さらには睡眠障害や呼吸器疾患などの関係をより詳細に解析し、どの因子が一層下部尿路症状に関わっているのか、検討する。

(3) なぜ上位脳血管障害患者で尿中 PGE<sub>2</sub> 量が上昇するのか、動物モデルを用いた検討を行う。

(4) メタボリック症候群の病態モデルを用い、膀胱・尿道の薬理学的特性、遺伝子レベルでの変化を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 下部尿路症状を有する脳血管障害患者からゲノム DNA サンプルを集めメタボリック症候群候補遺伝子の塩基配列の決定を行う。下部尿路症の評価は質問票だけでなく、尿流動態検査を施行して排尿筋過活動 (膀胱不随意収縮) や尿流率の低下を確かめる必要がある。具体的には、患者から末梢血 5-10mL を採取し、末梢白血球からゲノム DNA を抽出し解析に用いる。メタボリック症候群候補遺伝子のプロモーター領

域の塩基配列を直接シーケンス法で決定し、遺伝子変異の有無を解析する。特にアラキドン酸カスケードの key enzyme である COX-2 の遺伝子多型に注目する。

(2) 福井県住民健康診査を受けた女性 18,952 人、男性 9,286 人を対象に、夜間 2 回以上トイレに行くか、などの下部尿路症状の調査を行い、下部尿路症状と基礎疾患、血圧、肥満度 (BMI) などとの相関について解析する。特に高血圧については収縮期血圧とともに拡張期血圧についても検討する。

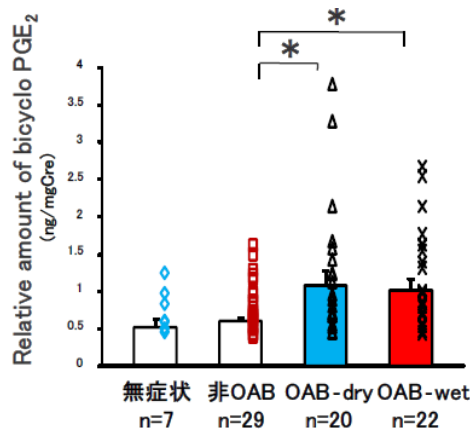
(3) 左中大脳動脈を塞栓した脳梗塞ラットの膀胱壁で起こっている変化を解析する。塞栓 6 時間後に膀胱を採取し、膀胱壁 ATP や prostaglandin E2 量の測定、P2X3、ASIC2、TRPV1、M2、M3 などの受容体の mRNA expression の変化を real-time RTPCR にて解析する。

(4) メタボリック症候群の病態モデルとして高フルクトース食にて飼育したラットでは、体重増加とともに脂質異常、高血圧・インスリン抵抗性が獲得されると報告されている。このモデルを用いて膀胱壁に起こる変化や、尿中の各種 mediator (prostaglandin E2; PGE<sub>2</sub>, ATP, nerve growth factor; NGF, substance P) の量を測定し、排尿パラメーターとの相関を求める。

## 4. 研究成果

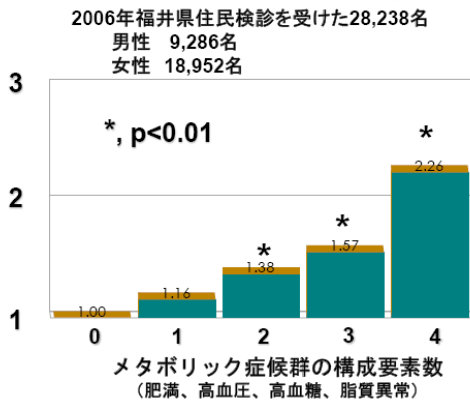
(1) メタボリック症候群候補遺伝子の 1 つとして COX-2 遺伝子が挙げられる。下部尿路症の発症に COX-2 遺伝子を含め、アラキドン酸カスケードがどのように関わっているのか、ヒトの下部尿路症状スコアと尿中パラメーターを用いて解明した。その結果、COX-2 遺伝子も下部尿路症状成立の候補遺伝子と考えられた。上位脳障害患者でも COX-2 の SNP は存在するが、その頻度は低い。しかし、その phenotype としての尿中 PGE<sub>2</sub> 量は下部尿路症状、特に過活動膀胱 (overactive bladder; OAB) 症状と有意に関連し、他のメディエーターである PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、NGF、substance P よりも強い相関があった。正常コントロール群 (年齢、性別が同等で症状なし)、上位脳障害患者で無症状の 2 群と比べても OAB 患者では有意に高い値を示した。正常コントロール群と上位脳障害で無症状患者群との間にも軽度であるが有意な差がみられたことより、腎組織の虚血が脳障害患者で強くみられ、これが尿中に反映されている可能性もある。しかし、OAB 患者ではさらに PGE<sub>2</sub> 量が高くなることから尿中 PGE<sub>2</sub> 量が OAB の良いバイオマーカーになる可能性がある。バイオマーカーとしての有用性を検証するためには、PGE<sub>2</sub> が治療に反応し

て症状の改善とともに低下しなければならぬ。



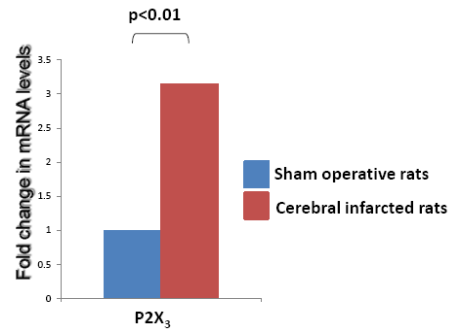
(2) 蓄尿症状には高血圧・呼吸器疾患・不眠が危険因子になり、特に夜間頻尿は肥満・高血圧・心疾患・不眠が独立したリスクで、メタボリック症候群の危険因子の数が多いほどオッズ比が大きかった (AUA2009、ICS2010)。夜間頻尿については、高血圧との相関が高かったが、中でも拡張期血圧が高いほど夜間頻尿の相対リスクは高くなり、その背景に不眠があるものと推測された。

#### メタボリック症候群の構成因子数の増加に伴い夜間頻尿 (2回以上) のリスクは増大する



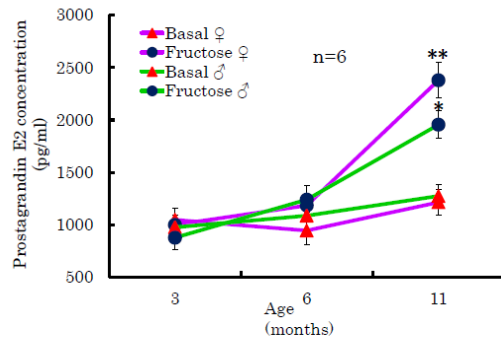
(3) なぜ上位脳障害患者で尿中 PGE<sub>2</sub> 量が増加するのか、動物モデルを用いた検討を行った。ラットに脳障害を起こさずに排尿反射のみを亢進させても尿中 PGE<sub>2</sub> 量や ATP 量に変化はみられなかった。しかし脳梗塞を作成すると膀胱壁の ATP 量が 2.24 倍に増加するのが認められ、知覚 C 線維をレジニフェラトキシンにて脱感作すると ATP 増加はみられなかった。PGE<sub>2</sub> 量は遅れて増加するものと考えられた。また、偽手術ラットに比べると P2X<sub>3</sub>、ASIC2、TRPV1、M2、M3 受容体の mRNA expression は脳梗塞ラットの膀胱壁で増

加していた。これは脳梗塞に伴い膀胱の知覚神経である C 線維の活動が upregulation していることを示唆しているものと推測された。



9週齢雌性S-Dラットに脳梗塞作成6時間後に膀胱を摘出。Real-Time PCR SYBR相対定量比較Ct法にてmRNA測定した。脳梗塞作成6時間後の膀胱壁にはP2X<sub>3</sub>のupregulationがみられる。

(4) これまでに高フルクトース食にて 11ヶ月飼育したラットでは、高血圧・インスリン抵抗性が獲得され、排尿回数の増加とともに膀胱壁 cyclooxygenase (COX)-2 発現の上昇・尿中 prostaglandin E<sub>2</sub> の増加がみられることを報告した (NBS 2009)。しかしこのモデルには体重増加や脂質異常が認められず、メタボリック症候群の病態モデルとは言い難い。現在は他の病態モデルを用いて排尿パラメータの変化を検討している。



尿中Prostaglandin E<sub>2</sub>濃度の変化:フルクトースで飼育したラットでは上昇がみられる

#### 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)

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Tanaka I, Nagase K, Tanase K, Aoki Y, Akino H, Yokoyama O. Modulation of Stretch-evoked Adenosine Triphosphate Release from the Bladder Epithelium by Prostaglandin E<sub>2</sub> *J Urol* 2011; 185: 341 査読有
- ② Tanaka I, Nagase K, Tanase K, Aoki Y, Akino H, Yokoyama O. Improvement of

- non-inflammatory detrusor overactivity through suppression of peripheral C-fiber by cyclooxygenase inhibitors. *J Urol* 183: 786-792, 2010 査読有
- ③ Yokoyama O, Aoki Y, Tsujimura A, Takao T, Namiki M, Okuyama. alpha(1)-Adrenoceptor blocker naftopidil improves sleep disturbance with reduction in nocturnal urine volume. *World J Urol* In press 査読有
- ④ Yokoyama O. Pharmacologic and Genetic Analysis of Mechanisms Underlying Detrusor overactivity in rats. *NeuroUrol Urodyn* 29: 107-111, 2010 査読有
- ⑤ Yokoyama O, Ito H, Namiki M. Influence of Urethral Sphincter Incompetence on Bladder Shape and Function in Myelodysplastic Children. *LUTS* 2: 27-30, 2010 査読有
- ⑥ Yokoyama O, Ito H, Aoki Y, Oyama N, Miwa Y, Akino H. Selective  $\alpha$ 1A-blocker improves bladder storage function in rats via suppression of C-fiber afferent activity. *World J Urol* 28:609-14, 2010 査読有
- ⑦ Yokoyama O, Matsuta Y, Yanai-Inamura H, Watanabe M, Ohtake A., Suzuki M, Sasamata M. Zolpidem increases bladder capacity and decreases urine excretion in rats. *NeuroUrol Urodyn* 29:107-111, 2010 査読有
- ⑧ Yamauchi H, Akino H, Ito H, Aoki Y, Nomura T, Yokoyama O. Urinary Prostaglandin E(2) was increased in patients with suprapontine brain diseases, and associated with overactive bladder syndrome. *Urology*. 2010 in press 査読有
- ⑨ Matsuta Y, Yusup A, Tanase K, Ishida H, Akino H, Yokoyama O. Melatonin increases bladder capacity via GABAergic system and decreases urine volume in rats. *J Urol* 184: 386-91, 2010 査読有
- ⑩ Yokoyama O, Ishiura Y, Nakamura Y. Animal model with detrusor overactivity caused by cerebral infarction as a useful tool for pharmacological therapeutic approaches. *LUTS* 1: S98-S100, 2009 査読有
- ⑪ Yamaguchi O, Nishizawa O, Takeda M, Yokoyama O, Homma Y, Kakizaki H, Obara K, Gotoh M, Igawa Y, Seki N, Yoshida M; Neurogenic Bladder Society Clinical guidelines for overactive bladder. *Int J Urol* 16:126-42, 2009 査読有
- ⑫ Homma Y, Araki I, Igawa Y, Ozono S, Gotoh M, Yamanishi T, Yokoyama O, Yoshida M. Clinical guideline for male lower urinary tract symptoms. *Int J Urol* 16:775-790, 2009 査読有
- ⑬ Yamaguchi O, Nishizawa O, Takeda M, Yokoyama O, Homma Y, Kakizaki H, Obara K, Gotoh M, Igawa Y, Seki N, Yoshida M. Neurogenic Bladder Society. Clinical guidelines for overactive bladder. *Int J Urol* 16:126-42, 2009 査読有
- ⑭ Akino H, Chapple CR, McKay N, Cross RL, Murakami S, Yokoyama O, Chess-Williams R, Sellers DJ. Spontaneous contractions of the pig urinary bladder: the effect of ATP-sensitive potassium channels and the role of the mucosa. *BJU Int* 102: 1168-74, 2008 査読有
- ⑮ Akino H, Maekawa M, Nakai M, Shioyama R, Ishida H, Oyama N, Miwa Y, Yokoyama O. Ultrasound-estimated bladder weight predicts risk of surgery for benign prostatic hyperplasia in men using alpha-adrenoceptor blocker for LUTS. *Urology* 72:817-820.. 2008 査読有
- ⑯ Miwa Y, Kaneda T, Yokoyama O. Association between lower urinary tract symptoms and serum levels of sex hormones in men. *Urology* 72:552-555, 2008 査読有
- ⑰ Shioyama R, Aoki Y, Ito H, Matsuta Y, Nagase K, Oyama N, Miwa Y, Akino H, Imamura Y, Yokoyama O. Long-lasting breaches in the bladder epithelium lead to storage dysfunction with increase in bladder PGE2 levels in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R714-718, 2008 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Yokoyama O: Epidemiology in men's health. 5<sup>th</sup> Japan-Asean Conference on Men's Health and Aging. 2010, 07,10, Kota Kinabalu, Malaysia
- ② 横山 修: 下部尿路症状とメタボリック症候群との関連について, 第 16 回日本排尿機能学会, ランチョンセミナー 1, 2009.09,12, 福岡
- ③ Yokoyama O: Understanding the Science, 30th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, Counting the Cost of OAB and Its Burden on Society, 2009.11, 05, Shanghai(CHN)
- ④ Aoki Y, Kusukawa N, Matsuta Y, Maegawa M, Tanase K, Ito H, Oyama N, Miwa Y, Akino H, Yokoyama O: Relationship between nocturia and metabolic syndrome, International Continence Society 39th Annual Meeting,

- 2009.10.03, San Francisco(USA)
- ⑤ Yokoyama O: Erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms:possible pathophysiological relation to vascular function, 4th Japan and Korea Satellite Symposium, 2009.07.02 ,Toyama
  - ⑥ Aoki Y, Takahara N, Tanase K, Ito H, Oyama N, Miwa Y, Akino H, Yokoyama O: Is female nocturia associated with metabolic syndrome?, 2009 Annual Meeting of American Urological Association, 2009.04,28,Chicago(USA), 181 (4) , 547, 2009.04
  - ⑦ Yamauchi H, Ito H, Aoki Y, Akino H, Yokoyama O, Nomura T: What is the most valuable mediator secreted from the urothelium of the urinary bladder in patients with neurogenic overactive bladder?, 2009 Annual Meeting of American Urological Association, 2009.04, 27,Chicago(USA), 181 (4) , 339, 2009.04
  - ⑧ Yokoyama O: Hypertension as a risk for storage symptom, but not voiding symptom-clinical and experimental studies, 24th Annual EAU Congress, UROLOGY BEYOND EUROPE, 2009.03,17, Stockholm(SWE)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号：90242552

##### (2) 研究分担者

秋野 裕信 (AKINO HIRONOBU)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号：90159335

青木 芳隆 (AOKI YOSHITAKA)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号：30273006

横田 義史 (YOKOTA YOSHIFUMI)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号：50222386

楠川 直也 (KUSUKAWA NAOYA)  
福井大学・医学部・医員  
研究者番号：80372499