

令和 5 年 8 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18086

研究課題名(和文)膀胱時計に着目した睡眠障害による下部尿路症状悪化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation into the mechanism of lower urinary tract dysfunction due to sleep disorder focusing on bladder clock

研究代表者

根来 宏光 (Negoro, Hiromitsu)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80708595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的な睡眠障害が日中の排尿に与える影響について、膀胱容量の日内リズムに着目して解析を行った。睡眠障害モデルマウスでは活動期の1回排尿量が減少し、4時間のリズムの前方へのシフトを認め、グルココルチコイドの日内リズムも同様に前方にシフトした。膀胱のRNAseqによる変動遺伝子の網羅的解析では筋肉に関連する遺伝子群が顕著に減弱していた。また、細胞実験から膀胱時計調律因子としてグルココルチコイドの存在を明らかとした。以上の結果より睡眠障害は膀胱平滑筋の機能低下により活動期1回排尿量を低下させ、グルココルチコイドによる膀胱時計機構の破綻も相まって排尿障害を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠障害と排尿障害の関連が疫学調査から見出されたが、その機序は不明であった。睡眠障害モデルマウスの結果から、グルココルチコイドによる膀胱時計機能障害とともに、膀胱平滑筋の機能低下が介在することが考えられ、睡眠障害に起因する排尿障害の予防や新たな治療ターゲットに繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of chronic sleep disorder on voiding function at the active phase, focusing on the diurnal rhythm of bladder capacity. In the mouse model of chronic sleep disorder, the urine voided volume per micturition (UVVM) during the active phase was decreased, the diurnal rhythm of UVVM was shifted 4-hour forward, and the diurnal rhythm of glucocorticoid was similarly shifted. Comprehensive analysis of variable genes by RNA-seq of the bladder confirmed a significant alteration of muscle-related gene clusters. Cellular experiments in vitro also revealed the presence of glucocorticoid as a bladder clock entrainer. These results suggest that the chronic sleep disorder may cause a decrease in the voided volume per micturition at the active phase due to decreased activity of bladder smooth muscle, which, together with impairment of the bladder clock modulated by glucocorticoid, may lead to dysuria.

研究分野：泌尿器

キーワード：膀胱 概日時計 排尿 睡眠 日内リズム

## 1. 研究開始当初の背景

下部尿路症状は年齢とともにその頻度は男女とも増加し、わが国では60歳以上の高齢者では約78%に認められる。大規模住民コホート研究において下部尿路症状悪化に関わる因子を縦断的に解析し、睡眠障害が排尿障害の強いリスク因子となることを見出した。睡眠障害と夜間頻尿は密接な関連があることは周知であるが、「睡眠障害が排尿症状を悪化させるメカニズムは何か全く不明であった。我々は膀胱の末梢時計が下部尿路機能に関わることを明らかにしてきており、睡眠障害が膀胱時計遺伝子を変動させ、その結果として排尿障害を引き起こすという仮説の着想に至った。

## 2. 研究の目的

睡眠障害がどのようなシグナルを介して膀胱に関与するか、さらに膀胱のどのような反応で排尿障害が出現するのかを検討し、睡眠障害が排尿障害を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 睡眠障害と排尿機能の解析

回転かごでマウスを飼育し、強いストレスを与えることなく慢性的な睡眠障害を引き起こすモデルとして確立された MELQUEST 社製装置を用いた。排尿機能は、我々が開発した自由行動下の排尿測定が可能な排尿行動測定装置 (aVSOP) を使用し、複数日にわたって継時的に測定した。

### 2) 睡眠障害と膀胱時計遺伝子の解析

上記慢性睡眠障害マウスの膀胱を4時間ごとに犠牲死させて採取し、膀胱時計の変動を時計遺伝子に着目し、コントロール群と比較・検討した。さらに RNA-seq の技術を用いて2群で変動のある遺伝子を網羅的に解析した。

### 3) 膀胱末梢時計の調律因子の同定

時計遺伝子 *Bmal1* のプロモーターの下流に *Luciferase* 遺伝子を組み込んだ *Bmal1-Luc* を導入したヒト不死化尿路上皮細胞株を作成し使用した。その発光リズムから、膀胱時計機構に作用する物質をスリーニングし、候補物質の投与濃度やタイミングにより時計遺伝子がどのように変化するかを比較・検討した。

### 4) 膀胱末梢時計調律因子と睡眠障害モデルマウス

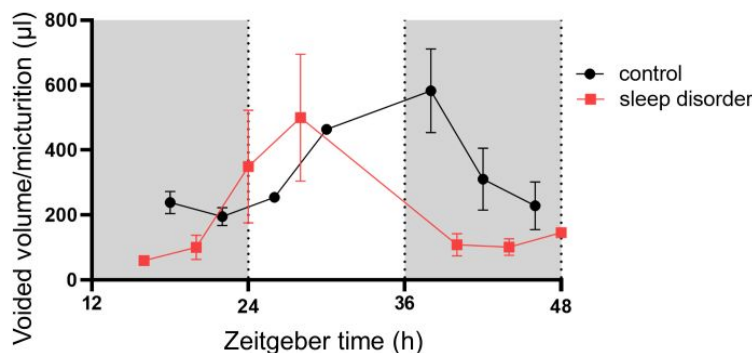
3) で同定した調律因子が睡眠障害モデルマウスにおいてどのように変化し、その変化が排尿の変化に関連しているかについても観察・検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 睡眠障害と排尿機能の解析

睡眠障害モデルとコントロールのマウスの1回排尿量の変化を測定し、4時間ごとの平均の変化をコントロールと比較した。夜行性のマウスにおける、夜間(活動期)に1回排尿量が減少し、昼間(非活動期)に1回排尿量が増加するという日内リズムは保たれていた。一方、コントロールマウスに比べて睡眠障害マウスでは1回の排尿量がやや低下する傾向を認めた。(図1)

図1) 慢性睡眠障害モデルマウスの一回排尿量



### 2) 睡眠障害と膀胱時計遺伝子の解析

膀胱において、主要時計遺伝子である *Bmal1*、*Per2*、*Rev-erb* はコントロールと比較し有意な変動を認めなかった。一方で RNA-seq を用いて遺伝子変化について網羅的に解析したところ、慢性睡眠障害モデルの膀胱においてコントロールと比較して *actinin* や *myosin* に関連する遺伝子の著明な発現低下を認めた。発現変動の大きかった 365 遺伝子に関して Metascape を用いて Enrichment 解析したところ筋肉に関連した Gene ontology (GO) を上位に複数認めた。(図2)

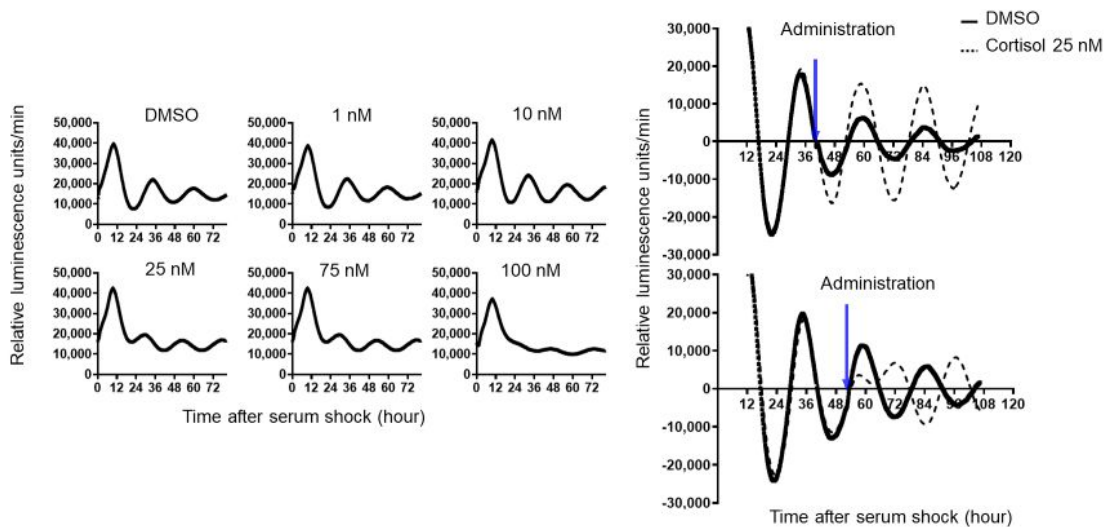
図 2 ) 発現変動遺伝子に対する GO 解析



3) 膀胱末梢時計の調律因子の同定

候補物質としてノルアドレナリン(NA)、カルバコール(Carb)、ATP、プロスタグランジン E2 (PGE2)、デキサメサゾン(DEX)添加した。NA、Carb、ATP、PGE2 では細胞発光のリズムと振幅は変化しなかったが、DEX のみ、細胞発光の振幅が著しく減少した。さらに生理的グルココルチコイドであるコルチゾールを用いて、投与濃度・タイミングとの関連について検討したところ、発光の振幅は 25nM で減少し、75nM と 100nM でさらに減少した。また生理的なタイミングでの投与では発光の振幅が増強したのに対し、非生理的なタイミングでの投与は発光のリズムが反転した。(図 3)

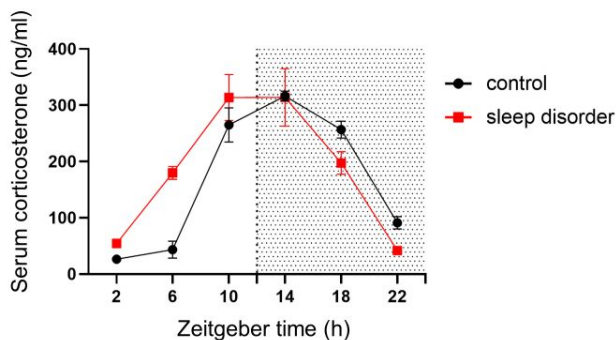
図 3 ) コルチゾール投与による細胞発光の変化



4) 膀胱末梢時計調律因子と睡眠障害モデルマウス

マウスの主要なグルココルチコイドはコルチコステロンのため、睡眠障害マウスの血清コルチコステロン濃度の変化を測定しコントロールと比較したところ、ピークが4時間前方にシフトしていた。(図 4) この変化が睡眠障害マウスの1回排尿量の減少や前方へのシフトに影響を与えているかに関して、今後コルチコステロンの投与実験などで検証している。

図 4 ) 睡眠障害マウスの血清コルチコステロン濃度



5) 膀胱時計の排尿への影響をみるため、膀胱機能の日内リズムに関わるとされるCx43の尿路上皮特異的ノックアウトマウスを解析し、活動期の膀胱容量への影響が示された。また膀胱の炎症による頻尿にも関連することが示された。

6) 人における解析：京都大学人間健康科学科の若村研究室との共同研究において、人ボランティアにおける排尿リズムへの日中光暴露の影響を検討し、日中の光暴露は尿産生を前方にシフトさせることを見出した。また尿勢には日内変動があり、夜間睡眠中や朝起床時に

は低下することを示した。その変動にも日中の光照射の影響があることを見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kono Jin, Ueda Masakatsu, Sengiku Atsushi, Suadicaní Sylvia O., Ogawa Osamu, Negoro Hiromitsu	4. 巻 22
2. 論文標題 Urothelium-Specific Deletion of Connexin43 in the Mouse Urinary Bladder Alters Distension-Induced ATP Release and Voiding Behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1594 ~ 1594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22041594	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 該当する
1. 著者名 根来宏光	4. 巻 75
2. 論文標題 サーカディアンリズムと夜間頻尿	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床泌尿器科	6. 最初と最後の頁 36-41
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 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 -
1. 著者名 根来宏光	4. 巻 50
2. 論文標題 概日時計の破綻と夜間頻尿	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 350-354
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 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 -
1. 著者名 Nakamoto I, Uji S, Okata R, Endo H, Tohyama S, Nitta R, Hashimoto S, Matsushima Y, Wakimoto J, Hashimoto S, Nishiyama Y, Kanikowska D, Negoro H, Wakamura T	4. 巻 11
2. 論文標題 Diurnal rhythms of urine volume and electrolyte excretion in healthy young men under differing intensities of daytime light exposure.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92595-0	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 Kono J, Ueda M, Sengiku A, Suadicaní SO, Woo JT, Kobayashi T, Ogawa O, Negoro H	4. 巻 23
2. 論文標題 Flavonoid Nobiletin Attenuates Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Mice through Mechanisms That Involve Inhibition of IL-1 Induced Connexin 43 Upregulation and Gap Junction Communication in Urothelial Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 5037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23095037	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 Chihara I, Negoro H, Kono J, Nagumo Y, Tsuchiya H, Kojo K, Shiga M, Tanaka K, Kandori S, Mathis BJ, Nishiyama H	4. 巻 6
2. 論文標題 Glucocorticoids coordinate the bladder peripheral clock and diurnal micturition pattern in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04464-3	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9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 根来宏光
2. 発表標題 時間薬理学・時間治療の最新の知見 『腎泌尿器科疾患の時間治療』
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根来宏光
2. 発表標題 排尿障害研究の魅力
3. 学会等名 第109回泌尿器科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根来宏光
2. 発表標題 夜間頻尿と夜尿：概日リズムの視点から
3. 学会等名 第73回西日本泌尿器科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根来宏光
2. 発表標題 夜間頻尿診療の最適化
3. 学会等名 第86回日本泌尿器科学会東部総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根来宏光
2. 発表標題 概日リズムの破綻から夜尿と夜間頻尿を考える
3. 学会等名 第29回日本小児泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromitsu Negoro, Takashi Iizumi, Yutaro Mori, Yoshitaka Matsumoto, Haruki Tsuchiya, Ichiro Chihara, Akio Hoshi, Hideyuki Sakurai, Hiroyuki Nishiyama and Hitoshi Ishikawa
2. 発表標題 Worsening of lower urinary tract symptoms by proton beam therapy for prostate cancer is ameliorated by morning irradiation.
3. 学会等名 51st International Continence Society Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromitsu Negoro, Arinobu Fukunaga, Takahisa Kawaguchi, Satoshi Funada, Takayuki Yoshino, Shusuke Akamatsu, Koji Yoshimura, Yasuharu Tabara, Fumihiko Masuda, Hiroyuki Nishiyama, and Osamu Ogawa
2. 発表標題 Not a straightforward relation between estimated daily sodium intake and nocturia: the Nagahama Study
3. 学会等名 Annual meeting of American Urological Association 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ichiro Chihara, Hiromitsu Negoro H, Jin Kono, Haruki Tsuchiya, Yoshiyuki Nagumo, Hiroyuki Nishiyama
2. 発表標題 Control of bladder peripheral clock and diurnal micturition pattern by glucocorticoids
3. 学会等名 53rd International Continence Society Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ichiro Chihara, Hiromitsu Negoro, Jin Kono, Haruki Tsuchiya, Yoshiyuki Nagumo, Hiroyuki Nishiyama
2. 発表標題 Glucocorticoids control clock gene circadian rhythm in the bladder and modulate diurnal rhythm of volume voided per micturition
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 根来宏光	4. 発行年 2022年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 4
3. 書名 適正使用のための臨床時間薬理学 生体リズムと薬物治療効果 夜間頻尿	

〔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	林 悠  (Hayashi Yu)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・客員教授  (12102)	
研究協力者	大石 勝隆  (Oishi Katsutaka)	産業技術総合研究所・食健康機能研究グループ・研究グループ長  (82626)	
研究協力者	若村 智子  (Wakamura Tomoko)	京都大学・人間健康科学・教授  (14301)	
研究協力者	河野 仁  (Kono Jin)	京都大学・医学医療系 泌尿器科・助教  (14301)	
研究協力者	シルビア スアディカニ  (Sylvia Suadicani)	米国アルバート・アインシュタイン大学・Department of Urology・Associate Professor	

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		
米国	Albert Einstein College of Medicine		