

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390439

研究課題名（和文）：日内排尿リズム形成の分子生物学的メカニズムに関する研究

研究課題名（英文）：Investigation on molecular biological mechanism of diurnal micturition rhythm

研究代表者

兼松 明弘 (KANEMATSU AKIHIRO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90437202

研究成果の概要（和文）：機能的膀胱容量をコントロールする分子であるコネクシン43(Cx43)は、概日時計の関連遺伝子の一つRev-erb α と非関連遺伝子であるSp-1との相互作用による制御を受けることで日内変動していることを見いだした。この結果、膀胱平滑筋細胞間のギャップジャンクション活性に日内リズムを生じることで、睡眠期に一回蓄尿量が多く活動期に少ない排尿リズムの形成に参与していた。これにより概日時計が排尿リズムを形成する一要素であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We discovered circadian oscillation of Connexin43 (Cx43), a molecule controlling functional bladder capacity, is regulated thorough interaction by Rev-erb α , a gene related with the circadian clock, and Sp-1, a molecule unrelated with the clock. As a result, circadian rhythm is generated in gap junction activity among bladder smooth muscle cells and contributes to micturition rhythm, with bladder capacity larger during sleep phase than during active phase. Thus, circadian clock is a regulator of micturition rhythm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：排尿学

キーワード：(1) 時計遺伝子 (2) コネクシン 43 (3) ギャップジャンクション
(6) Rev-erbalpha (7) Sp-1 (8) 日内排尿リズム

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類では、睡眠覚醒、体温調節、ホルモン分泌をはじめとする数多くの24時間周期の生理機能が、時計遺伝子に代表される生物時計システムにより制御されており、このシステムはほとんどすべての器官や組織に存在しているとされている。

(2) 健常な成人は、夜間よりも日中の排尿回数が多い日内排尿リズムを有している。その障害として、例えば小児期の夜尿症はこの形成過程の遅れによる夜間機能的膀胱容量不足によって説明可能である一方、中高齢者に多くみられる夜間頻尿は、いったん完成した日内排尿リズムの破綻と捉えうるが、下部尿路症状の中でも最も生活上苦痛を伴う症状である。その発症機序は、夜間尿産生量、膀胱容量、就床時間と複雑に絡み合っており原因として尿産生、膀胱容量の日内変動リズムの消失が示唆されている。このように排尿リズムの形成とその障害は重要な臨床的問題であるが、それを制御するメカニズムにはなお未知の領域が多い。

(3) 我々は本研究開始時までに膀胱の機能再生を目指した基礎研究を継続してきた。その過程で尿路閉塞時に膀胱尿路上皮が産生するbFGFの特異な機能に着目し、bFGFがConnexin43 (Cx43)の産生を通じて筋層のギャップジャンクションを増加させ頻尿症状を誘導することを見出していた。興味深いことに、Cx43の転写機序の解析へと研究を発展させる過程で意

外にもCx43がラットの膀胱において劇的な日内変動をしていることを見いだした

2. 研究の目的

以上の背景から、我々は日内排尿リズムの形成に、尿路固有の末梢生物時計が関与しているという仮説を得た。そこで、膀胱におけるCx43の概日時計支配遺伝子としての機能とともに、概日時計の排尿行動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 濾紙を使用した自動巻き取り型マウス排尿解析装置automated Voided Stain on Paper法 (aVSOP法) を開発した。

(2) 自由行動下の雌Cx43^{-/-}マウスとその同腹雌野生型 (WT) マウスの排尿行動解析を行った。

(3) 雌野生型マウスおよびラット膀胱におけるCx43とPer2, Bmal1などの時計遺伝子の概日発現リズムをReal-time RT-PCR法にて、Cx43タンパクの発現リズムをウエスタンブロッティング法にて検討し、排尿行動解析と比較対照した。

(4) 時計遺伝子Cry1, 2のダブルノックアウト (Cry-null) マウスは体内時計の機能がほぼ完全に破綻していることが知られているが、このマウスの10週令雌の排尿行動解析を行った。

(5) In-silico解析からCx43の転写リズム形成の候補となった時計遺伝子Rev-erbaによるCx43の転写制御機構をRev-erbaのsiRNA法、Cx43のプロモーターレポーター

アッセイ法、ウエスタンブロッティング法、共免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法にて解析した。

- (6) cDNAマイクロアレイ法(Agilent社 44k)を用いてマウスの膀胱にて日内変動する遺伝子を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) マウス 排尿解析装置 automated Voided Stain on Paper 法 (aVSOP 法) により、経時的にマウスの排尿行動記録が可能となった。

(2) *Cx43*^{+/-}マウスは、同腹野生型マウスと比較し膀胱の *Cx43* mRNA の発現量が約 40%に低下する一方、一回排尿量が有意に増大していたが、体重、総尿量に有意な差はなかった。

(3) WT マウスやラットでは一回排尿量は覚醒期に減少し、睡眠期に増大する有意な日内変動を示した。膀胱における *Cx43* の mRNA 発現は時計遺伝子群とともに明確な日内変動を示し、*Cx43* タンパクレベルは覚醒期中期で最高に、睡眠期中期で最低となった。(2) (3)より *Cx43* の発現量が一回排尿量と逆相関することが示された。

(4) *Cry*-null マウスでは膀胱の *Cx43*、*Per2*、*Bmal1* の mRNA の発現リズムと日内排尿リズムが消失しており、膀胱の体内時計の排尿リズムへの関与が示唆された。

(5) 従来 *Rev-erba*は恒常的に転写活性を抑制する因子であると考えられていたが、*Cx43* については別の転写因子である Sp-1 と結合することで転写活性を逆に増強しており、時計遺伝子の新しい作用メカニズムが明らかとなった。

(6) マイクロアレイにて184の有意に日内変動する遺伝子が膀胱に存在したが、ほとんどは転写因子で既知の膀胱機能関連遺伝子はわずかであり、*Cx43* はその最上位にあった。

(7) 時計遺伝子による膀胱での *Cx43* の日内変動が日内排尿リズムの形成に寄与していると考えられた。

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 2 件)

- (1) Negoro H, Kanematsu A, Doi M, Suadiciani SO, Matsuo M, Imamura M, Okinami T, Nishikawa N, Oura T, Matsui S, Seo K, Tainaka M, Urabe S, Kiyokage E, Todo T, Okamura H, Tabata Y, Ogawa O. Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. Nat Commun. 2012 May 1;3:809. (査読あり)
- (2) Negoro H, Kanematsu A, Imamura M, Kimura Y, Matsuoka R, Tanaka M, Tabata Y, Ogawa O. Regulation of connexin 43 by basic fibroblast growth factor in the bladder: transcriptional and behavioral implications. J Urol. 2011 Jun;185(6):2398-404. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 兼松 明弘、根来宏光、今村正明、小川 修 離乳直後のマウス排尿発達の Automated Voided Stain on Paper (aVSOP) 法による解析 第21回日本小児泌尿器科学会総会 2012年7月4-6日 岡山

(2) 根来宏光、兼松明弘、杉野善雄、沖波 武、西川信之、吉村耕治、岡村 均、田畑泰彦、小川 修 Automated voided stain on paper (aVSOP) 法は、マウスの日内排尿リズムの記録を可能とする 第17回日本排尿機能学会 2011年9月29-10月1日 甲府

(3) 根来宏光、兼松明弘、今村正明、沖波武、西川信之、吉村耕治、Silvia O Suadecani、大浦智紀、松尾雅弘、岡村均、田畑泰彦、小川修 時計遺伝子Rev-erbaによるコネキシン43の転写制御は日内排尿リズムの形成因子である 日本泌尿器科学会総会 2011年4月22日 名古屋

(4) Negoro H, Kanematsu A, Sugino Y, Matsuo M, Kimura Y, Nishikawa N, Okinami T, Imamura M, Yoshimura K, Okamura H, Tabata Y, Ogawa O Developmental analysis of micturition in infant mouse immediately after weaning measured by a new recording system, automated voided stain of paper (aVSOP) method. American Urological Association (AUA) 2011年5月14-19日 Washington DC, USA

[その他]

ホームページ等

京都大学 web ページ

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/120502_1.htm (和文)

http://www.kyoto-u.ac.jp/en/news_data/h/h1/news6/2012/120502_1.htm (英文)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼松 明弘 (KANEMATSU AKIHIRO)

兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90437202

(2) 研究分担者

小川 修 (OGAWA OSAMU)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90260611

吉村 耕治 (YOSHIMURA KOJI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40397542

大久保 和俊 (OKUBO KAZUTOSHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20511877

井上 貴博 (INOUE TAKAHIRO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80511881

西山 博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)

筑波大学・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：20324642

(3) 連携研究者

岡村 均 (OKAMURA HITOSHI)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60158813

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371