

氏名	千原 尉智露		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 10678 号		
学位授与年月	令和 5 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Coordination of bladder peripheral clock and diurnal micturition pattern by glucocorticoids (グルココルチコイドによる膀胱末梢時計と日内排尿パターンの調整)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	島野 仁
副査	筑波大学教授	博士（医学）	榎本 剛史
副査	筑波大学教授	博士（看護学）	岡山 久代
副査	筑波大学助教	博士（医学）	松本 孔貴

## 論文の内容の要旨

千原 尉智露氏の博士学位論文は、膀胱末梢時計の日内排尿パターンにおける糖質コルチコイドの効果を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

目的：

著者の研究領域の概説によれば、生物には約 24 時間のリズムを持った生理機能が数多く存在し、これを概日リズムと呼ぶ。ヒトの場合、視交叉上核（SCN）に存在する中枢時計が、転写-翻訳フィードバックループのメカニズムによりこのリズムを形成する。中枢時計は個体全体の概日リズムを形成するとともに、各臓器・器官に存在する末梢時計を自律神経系、ホルモン系、行動制御などによって調律している。末梢時計は各臓器の重要な機能の日内変動に関与していることが報告されている。膀胱においても末梢時計と膀胱機能の関連が明らかになりつつある一方で、膀胱の末梢時計がどのようなシグナルで調律されるかについては未だ明らかではなく、著者はこのメカニズムの解明を目的とした

対象と方法：

著者は *In vitro* では、ヒト尿路上皮細胞株（TRT-HU1）を用い、pBmal1-dLuc レンチウイルスレポーターを導入した pBmal1-dLuc TRT-HU1 細胞株（Bmal1-Luc）を作成した。ルシフェリンは 0.1 mM になるように培養液に添加した。血清ショックにより時計を同期させ、Bmal1-Luc の発光を 3-5 日間連続的に測定した。血清ショック後に尿路上皮細胞の Bmal1 発現に影響を与える可能性のある候補物質を添加し、発光の変化からその影響を検討した。*In vivo* では 8 週齢の雄の C57BL/6 マウスを使用した。すべてのマウスは 5 時に点灯、19 時に消灯する 14 時間明期の明暗（L/D）サイクルで飼育した。両側副腎摘出術（ADx）、非活動期のコルチコステロン投与（CORT）、その両方（ADx + CORT）を施行したモデルマウスを作成した。両側副腎摘出術はイソフルラン吸入麻酔下で行った。対照には、副腎を露出するのみの偽手術（sham）を行った。ADx マウスと sham マウスは術後 1 週間の回復期間を設け、その間は 1%NaCl 溶液を自由に摂取できるようにした。コルチコステロン投与はメチルセルロースを用いて 6 時（Zeitgeber

Time 1)に 10 mg/Kg/day を経口投与した。一回排尿量は、ろ紙自動巻取式マウス排尿連続測定装置 (aVSOP) を用いて測定した。暗期開始時点から 8 時間毎 (前後 4 時間) の数値を平均しグラフ化した。

結 果 :

著者は Bmal1-Luc を用いた発光実験において、ノルアドレナリン、カルバコール、ATP、プロスタグランジン E2 を培地に添加しても細胞発光の位相と振幅は変化しなかったが、デキサメタゾン添加時のみ、細胞発光の振幅が著しく低下したことを観察している。さらに生理的条件下における膀胱の Bmal1 発現の概日リズムを制御する分子を調べるために、生理的グルココルチコイド (GC) であるコルチゾールを用いてさらなる研究を行っている。その結果、発光の振幅は 25 nM で減少し、75 nM と 100 nM でさらに減少することが確認された。さらに Bmal1-Luc に 25 nM のコルチゾールを生理的ピークのタイミングと生理的ピークから 12 時間遅れたタイミング (非生理的タイミング) で投与した。生理的タイミングでのコルチゾール投与では、発光リズムの振幅は増幅したが、位相には影響がなかった。一方、非生理的タイミングで投与では、発光リズムの位相が反転した。著者はこれらの結果から、尿路上皮細胞における Bmal1 発現リズムを制御するためには、コルチゾールの上昇タイミングが重要であると考えられた。これらの変化は、コルチゾールと同時にグルココルチコイド受容体 (GR) 阻害剤であるミフェプリストン 10 nM を投与すると抑制することを見出した。次に、*in vivo* で GC の作用について検討した。マウスにはその主要な GC であるコルチコステロンを使用した。ADx では肝臓と膀胱の時計遺伝子に有意な変化はなかったが、CORT では膀胱時計遺伝子の日内リズムが変調し、Bmal1 と Rev-erb $\alpha$  のピークは 4 時間前方にシフトした。ADx+CORT では Bmal1 と Rev-erb $\alpha$  のピークは 8-12 時間前方にシフトしていた。どちらの群でも肝臓の時計遺伝子には有意なリズムの変化は見られないとしている。さらに、RNA-seq を用いて網羅的に解析したところ、ADx+CORT ではほとんどの時計遺伝子で 8-12 時間の前方シフトと、日内リズムの変調を認めた。また ADx+CORT でのみ、一回排尿量の正常な日内リズムが消失していることを観察している。

考 察 :

著者は尿路上皮細胞において GC は GR を介して、Bmal1 の発現を制御し、その作用は濃度・時刻依存的であることを示した。またマウスにおいては、非活動期の GC 投与は CORT 単独、ADx +CORT ともに膀胱時計の位相をシフトさせている。これらの結果から、GC のピークのタイミングは膀胱時計の概日リズム形成に重要な役割を果たしていることが示唆されたと結論している。一方で ADx 単独では膀胱時計の概日リズムが維持されていた。これは、GC は唯一の調節因子ではなく、中枢シグナルや他の因子も膀胱時計に関与している可能性を示唆しているとしている。申請は今後さらに詳細な検討を行っていく必要があるとしている。加えて膀胱時計の位相がほぼ反転した ADx+CORT では一回排尿量の正常な日内リズムが消失しており、GC は排尿の日内リズム形成にも重要な役割を果たしていると結論している。

結 論 :

著者は GC が GR を介して膀胱時計を調節し、一回排尿量の日内リズムを制御していることを初めて明らかにした。これらの成果は、夜尿症や夜間頻尿のメカニズム解明や、膀胱時計を調律させるという新たな治療的アプローチとなる可能性があるかと結んでいる。

## 審査の結果の要旨

(批評)

本論で著者は、マウスを用いて今まで測定の困難であった膀胱機能の日内リズムを、膀胱粘膜細胞の時計遺伝子発現パターンにより評価し、グルココルチコイドにより制御されることを見出し、それをマウス生体でも確認した。内分泌系による時計遺伝子の日周パターンの強度、周期への影響は興味深く、抹消時計への受容体を介した分子機序の解明や、臨床的にも夜尿症や排尿障害への理解、治療に大きく貢献が期待される優れた論文である。

令和 5 年 1 月 12 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。