

令和元年6月13日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05682

研究課題名(和文)尿路上皮特異的な時間生物学的アプローチによる夜間頻尿の病態解明

研究課題名(英文)A chronobiological approach to elucidate nocturia focusing on the urothelium

研究代表者

根来 宏光(Negoro, Hiromitsu)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：80708595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト不死化尿路上皮細胞およびマウス尿路上皮において、概日時計が存在する事、Cx43が概日リズムを呈し、ATP放出経路となりうるヘミチャネル機能も有していることが明らかとなった。また、マウスの尿路上皮特異的に主要時計遺伝子Bmal1および、Cx43をノックダウンさせたマウスを作製することに成功した。さらに、ヒト不死化尿路上皮細胞にP(Bmal1)::dLucを遺伝子導入させたレポーター細胞を作製し、尿路上皮の概日リズムに影響を与えうる、数種類の候補薬剤を同定した。これらの結果をもとに尿路上皮末梢時計が膀胱機能や日内排尿リズムに関連し得る病態へ与える影響についての研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱は夜間にしっかりと尿を溜め、日中はしっかり排尿するようにその機能の日内変動を有し、個体の生命活動をサポートしている。膀胱機能の昼夜差の形成メカニズムを解明することは、夜間頻尿や夜尿症など、排尿の昼夜差が乱れた疾患の機序解明に貢献すると考えられる。本研究から、尿路上皮でのCx43の発現や機能を制御すること、それに伴うATP放出を制御すること、概日時計に作用することをターゲットとした薬剤が夜間頻尿や夜尿症の新たな治療薬の候補となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that a functional circadian rhythm exists in the urothelium, and it coordinates connexin43 (Cx43) expression and function as hemichannels that provide a direct pathway of ATP release for mechanotransduction and signaling in the urothelium. In addition, we have generated conditional knockout C57BL/6 mice lacking a major clock gene Bmal1 or Cx43 in the urothelium only. Furthermore, we have generated P(Bmal1)-dLuc reporter cell lines derived from immortalized human urothelial cells and have identified a few candidate compounds that could modify the circadian rhythm of the urothelium. We presently progress the research to investigate the role of peripheral clock in the urothelium for the bladder function and diseases characterized as disorders of micturition rhythm including nocturnal enuresis and nocturia.

研究分野：排尿機能学、分子生物学、時間生物学

キーワード：排尿障害 時間生物学 尿路上皮 コネキシン43 Bmal1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、時計遺伝子の形成する概日時計の制御を受けている。我々はこれまで、膀胱の概日時計の存在とその日内排尿リズムへの関与を、ギャップジャンクション (GJ) 構成蛋白であるコネキシン 43 (Cx43) に着目し、主に筋原性メカニズムの面から明らかにした ()。

2) 一方、膀胱機能において、尿路上皮が ATP や PGE2、アセチルコリンなどを放出し、刺激情報を尿路上皮間、間質、筋層に伝達することで膀胱機能を調節していることが分かってきている。Cx43 は細胞の間の GJ だけでなく細胞外へヘミチャネルを形成し、ATP を放出する経路となることが星状膠細胞等で近年報告されており、尿路上皮においても Cx43、時計遺伝子の発現に概日リズムを認め、尿路上皮からのシグナルの経時的変化が日内排尿リズムに関与しているという仮説を得るに至った。

2. 研究の目的

尿路上皮で、Cx43 が GJ やヘミチャネルとして機能を有するのか、さらに尿路上皮はどのように日内排尿リズムと関連するのかを検討し、夜間排尿や夜尿症といった日内排尿リズムの破綻や未形成と考えられる病態のさらなる解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 尿路上皮の末梢時計の検証とシグナル伝達機能の日内変動の解析

尿路上皮の末梢時計の存在を、不死化尿路上皮細胞を用いて証明する。尿路上皮におけるシグナル伝達経路としての Cx43 ヘミチャネル機能を解析し、さらに ATP 放出の日内変動を検証する。

2) 尿路上皮末梢時計の機能解析

尿路上皮機能の日内リズムが排尿行動や膀胱機能に関与するかを検討するため、マウスの尿路上皮特異的に末梢時計、Cx43 の機能を破綻させたノックダウンマウスを作製する。BAC システムを用いて尿路上皮特異的に Cre を導入した UPK2-CreERT2 マウスと、Bmal1-flox マウス、Cx43-flox マウスを交配し、目的マウスを得る。このマウスを用いて、尿路上皮末梢時計の破綻が排尿にどのような影響を与えるのかを検証し、さらに分子制御機構の検討を行う。

3) 尿路上皮末梢時計の調律因子の同定

尿路上皮末梢時計の日内リズムが何によって影響を受けるのかを明らかにするため、Per2:Luc マウスを用いた発光リズムを評価する実験系にてスクリーニングを行う。

4) ヒト尿中物質の日内変動の検討

成人ボランティアの昼中、夜間の尿を用いて、ATP や研究結果にて候補にあがった分子を測定して、尿中での日内変動を確認する。さらの夜間頻尿患者で病態に関与するかを検討する。

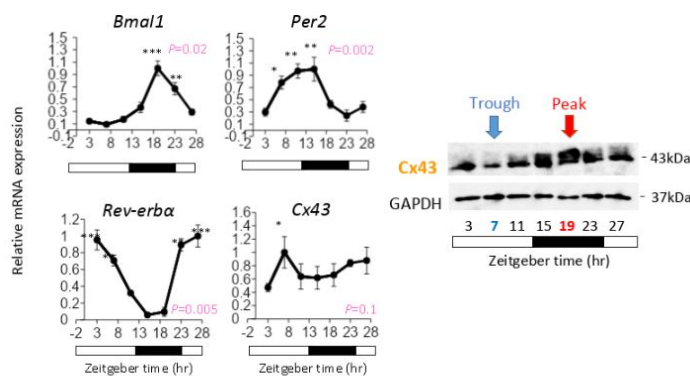
4. 研究成果

1) 尿路上皮の末梢時計の検証とシグナル伝達機能の日内変動の解析

不死化尿路上皮細胞において主要時計遺伝子である Bmal1、Per2、Rev-erb に加え、Cx43 の発現に概日リズムがあり、ATP 放出量に日内差があることを確認した。また Bmal1 の発現を抑制した場合、Cx43、ATP 放出量とも日内差が不明瞭化した。さらに Cx43 のノックダウン、または過剰発現させた場合、機械刺激による ATP 放出量は、Cx43 の変化に相関して有意に低下、および上昇することを確認した。

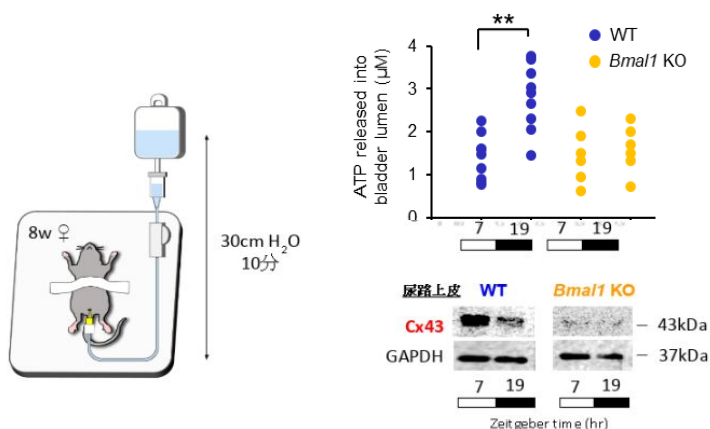
マウス尿路上皮においても概日リズムが存在し (図 1)、ATP 放出量にも日内差があることを確認した (図 2)。

図 1) マウス尿路上皮における概日リズム



*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. nadir by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test
P-values by Cosinor

図 2) マウス膀胱拡張時の膀胱内 ATP の日内差



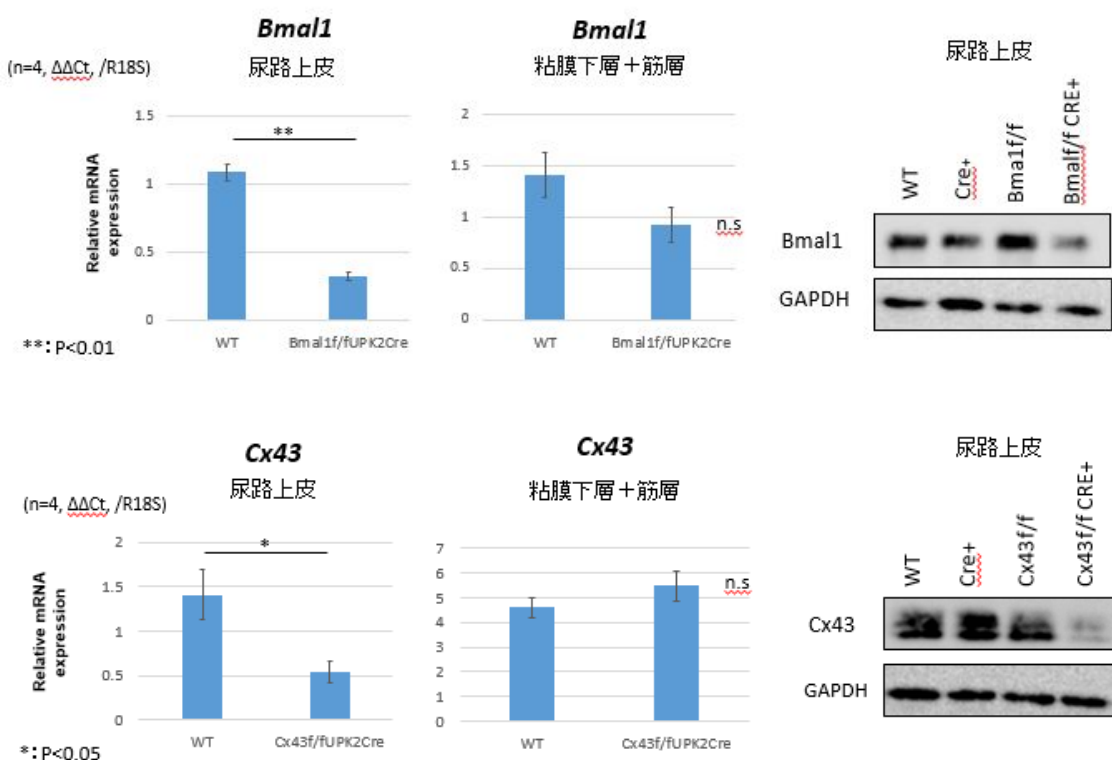
さらに、尿路上皮における転写制御機構の解明のため、不死化尿路上皮細胞にレポーターアッセイを行い、Sp-1 と時計遺伝子 Rev-erb による転写制御機構を明らかにした。以上より、尿路上皮に概日時計が存在する事、Cx43 が概日リズムを呈し、ATP 放出経路となりうるヘミチャネル機能も有していることが明らかとなり、国際学会で発表し、論文発表した。

また、2 光子励起顕微鏡を用いた in vivo imaging の手法で、マウスの生体内での尿路上皮の観察を行った。その結果マウスの尿路上皮に進展刺激が加わることで放出された ATP は、尿路上皮細胞で細胞外シグナルキナーゼ (ERK) 活性を上昇させることを in vivo imaging で確認することに初めて成功し、論文発表した。

2) 尿路上皮末梢時計の機能解析

マウスの尿路上皮特異的に主要時計遺伝子 *Bmal1* および、Cx43 をノックダウンさせたマウスを作製するため、UPK2-CreERT2 マウスと *Bmal1*-flox、Cx43-flox マウスを交配させ、目的マウスの作成をおこなったが、尿路上皮での遺伝子の組み換えを DNA レベルでは確認されたが、mRNA、タンパクレベルでのノックダウン効率は不十分な結果であった。そのため CreERT2 ではなく、外因性のタモキシフェンを必要としない Cre マウスを入手して、交配を行い目的マウスを作製した。遺伝子型の確認は、mRNA、タンパク、免疫染色にて評価を行い、尿路上皮特異的に *Bmal1* および Cx43 がノックダウンされていることを確認した。(図 3)

図 3) マウス尿路上皮のノックダウンの確認

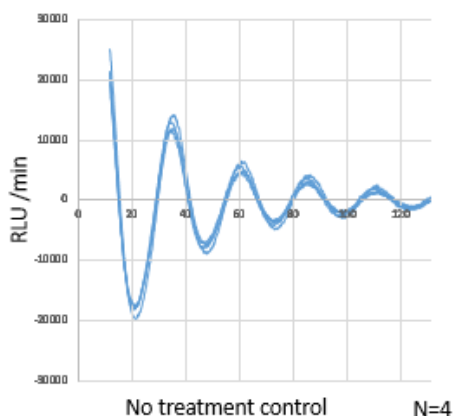


これらのマウスに対して、排尿行動解析、膀胱内拡張時の尿中 ATP 測定、DNA マイクロアレイでの遺伝子変異の網羅的解析を進めている。

3) 尿路上皮末梢時計の調律因子の同定

当初は Per2::Luc マウスを用いたレポーターアッセイでのスクリーニングを考えていたが、マウス尿路上皮の安定した培養は困難であった。そのためまずヒト不死化尿路上皮細胞に P(Bmal1)::dLuc を遺伝子導入させたレポーター細胞を作製し、再現性のある発光リズムを呈する事を確認した(図4)。

図4) ヒト不死化尿路上皮細胞に遺伝子導入し、レポーター細胞を作製



このレポーター細胞を用いて、臨床的に候補となりうる物質を加え、尿路上皮の概日リズムにどのような影響があるかを検討し、数種類の候補薬剤を同定した。

また、Per2::Luc マウスの代用として、per1-Luc ラットをナショナルバイオリソースプロジェクトから購入し、ラット尿路上皮の体外培養が概日発光リズムがあることを確認した。候補薬剤がラット尿路上皮を用いた発光リズムに影響を与えるか検証中である。

4) ヒト尿中物質の日内変動の検討

ATP 以外の候補となりうる物質の同定には至っていないが、マウスの尿路上皮末梢時計の破綻による排尿機能への影響と分子制御機構を検証し、順次、候補物質を検証することを予定している。

<引用文献>

Negoro, H. et al. Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nat. Commun.* **3**, 809 (2012)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Fukunaga A, Kawaguchi T, Funada S, Yoshino T, Tabara Y, Matsuda F, Yoshimura K, Ogawa O, Negoro H; Nagahama Study Group. Sleep disturbance worsens lower urinary tract symptoms (LUTS): The Nagahama study, *J Urol*, 査読有、2019, DOI: 10.1097/JU.000000000000212

Negoro H, Sengiku A, Biological clock and nocturia, *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 査読無し、267 巻、2018、457 - 461

Negoro H, Epidemiology, pathophysiology and diagnosis of nocturia, *Japanese Journal of Clinical Urology*, 査読無し、72 巻、2018、104-110

Sengiku A, Ueda M, Kono J, Sano T, Nishikawa N, Kunisue S, Tsujihana K, Liou LS, Kanematsu A, Shimba S, Doi M, Okamura H, Ogawa O, Negoro H. Circadian coordination of ATP release in the urothelium via connexin43 hemichannels. *Scientific reports*, 査読有、31 巻、2018

DOI: 1038/s41598-018-20379-0

根来 宏光、概日リズムと排尿機能、*腎臓内科・泌尿器科*、査読無し、6 巻、2017、154-158

Funada S, Kawaguchi T, Terada N, Negoro H, Tabara Y, Kosugi S, Yamada R, Nakayama T, Akamatsu S, Yoshimura K, Matsuda F, Ogawa O. Cross-sectional epidemiological analysis

of the Nagahama Study for correlates of overactive bladder: genetic and environmental considerations. J Urol, 査読有, 2017.

DOI: 10.1016/j.juro.2017.09.146

Obayashi K, Saeki K, Negoro H, Kurumatani N. Nocturia increases the incidence of depressive symptoms: a longitudinal study of the HEIJO-KYO cohort. BJU Int. 査読有, 120 巻, 2017, 280-285,

Okumura Y, Asai K, Kobayashi T, Miyata H, Tanaka Y, Okada Y, Sakai K, Kamba T, Tsuji H, Shide K, Nagashima K, Yanagita M, Inagaki N, Ogawa O, Negoro H. Dietary Sodium Restriction Reduces Nocturnal Urine Volume and Nocturnal Polyuria Index in Renal Allograft Recipients With Nocturnal Polyuria. Urology. 査読有, 106 巻, 2017, 60-64

Sano T, Kobayashi T, Negoro. Intravital imaging of mouse urothelium reveals activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced intravesical release of ATP. Physiological reports. 査読有, 21 巻

DOI: 10.14814/phy2.13033

〔学会発表〕(計 19 件)

根来宏光、福永有伸、川口喬久、船田哲、吉村耕治、兼松明弘、松田文彦、西山博之、小川修、就学時夜尿の既往は夜間頻尿の悪化因子となる：ながはまコホート研究から 第 107 回日本泌尿器科学会総会、2019

Hiromitsu Negoro, Medical history of nocturnal enuresis at school age is a risk factor for nocturia in adults: The Nagahama study, EAU2019 (34th Annual European Association Of Urology Congress) (国際学会) 2019

根来宏光、体内時計から夜間頻尿を考える - 疫学・基礎の視点から -、第 219 回宮崎県泌尿器科医会 (招待講演) 2019

根来宏光、夜間頻尿 - その深淵に迫る Circadian rhythm から夜間頻尿に迫る、第 106 回日本泌尿器科学会総会 (シンポジウム) (招待講演) 2018

Hiromitsu Negoro, Insomnia induces lower urinary tract symptoms: The natural history and risk factors for LUTS from the Nagahama longitudinal study, AUA 2018 Oral presentation (国際学会) 2018

根来宏光、夜間頻尿と睡眠障害の関係からみえてくるもの、第 25 回日本排尿機能学会ランチョンセミナー (招待講演) 2018

根来宏光、夜尿の既往があると夜間頻尿になりやすい：ながはまコホート研究から、第 25 回日本時間生物学会学術大会 2018

根来宏光、Abyss of Nocturia - looking into the depth from circadian rhythm, 131th WPI-IIIS セミナー (招待講演) 2018

根来宏光、概日時計の破綻と夜間頻尿 - 疫学・基礎からのアプローチ -、第 4 回アカシア研究会 (招待講演) 2018

千菊 敦士、根来 宏光、上田 政克、尿路上皮のコネキシン 43 は時計遺伝子の制御下に細胞間情報伝達機能を有する、第 27 回泌尿器科分子・細胞研究会、2018

Atsushi Sengiku, Hiromitsu Negoro, Takeshi Sano. The circadian rhythm coordinates the ATP release in the urothelium via the connexin43 hemichannel. AUA 2017 Annual Meeting (国際学会) 2017

Atsushi Sengiku, Hiromitsu Negoro, Jin Kono. Circadian rhythm in urothelium coordinates its ATP release via connexin43 hemichannel. 第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017

千菊 敦士、根来 宏光、上田 政克、尿路上皮のコネキシン 43 は時計遺伝子の制御下に細胞間情報伝達機能を有する、第 24 回日本排尿機能学会、2017

Atsushi Sengiku, Hiromitsu Negoro, Masakatsu Ueda. Mechanically-induced ATP release had oscillations in correlation with the Cx43 expression in urothelial cells. 15th Urological Association of Asia Congress (国際学会) 2017

根来 宏光、日内排尿リズムを構成する膀胱時計、第 24 回日本排尿機能学会 (シンポジウム) 2017

根来 宏光、日内排尿リズムを司る膀胱時計 第 87 回日本衛生学会学術総会 (シンポジウム) 2017

根来宏光、体内時計と膀胱機能、第 104 回泌尿器科学会総会 (招待講演) 2016

根来宏光、千菊敦士, Sylvia. O Suadicani, 小川修、ギャップ結合ファミリーの尿路上皮における役割、第 22 回日本排尿機能学会ワークショップ (招待講演) 2015

根来宏光 兼松明弘 小川修、概日時計と夜間頻尿、第 30 回日本睡眠学会 (シンポジウム 睡眠障害と夜間頻尿の密接な 関係) (招待講演) 2015

根来宏光、膀胱の体内時計 第 103 回日本泌尿器科学会総会 若手フロンティア (招待講演) 2015

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。