

## 膀胱尿管逆流症におけるウロプラキンIIIの意義と 尿中mRNA定量による検査法の確立

その他（別言語等） の研究課題名	Significance and development of Urine uroplakin III mRNA measurement in vesicoureteral reflux
研究代表者	上仁 数義, 吉貴 達寛, 成田 充弘, 影山 進, 坂野 祐司
発行年	2008-03
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/3815">http://hdl.handle.net/10422/3815</a>

# 膀胱尿管逆流症におけるウロプラキンⅢの意義 と尿中 mRNA 定量による検査法の確立

課題番号 17591673

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)）  
研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 上仁数義  
(滋賀医科大学医学部泌尿器科助手)

滋賀医科大学附属図書館



2006017494

## はしがき

われわれは、今回の助成金によって、下記の研究を実施することができた。

ウロプラキン (UP) III 遺伝子ノックアウトマウスに膀胱尿管逆流症 (VUR) が単独発生するとの報告をきっかけに UP III 遺伝子発現の異常に着目して、VUR との関係に関する研究を開始した。まず手術で得られた VUR20 例と対照 11 例の尿路上皮組織での UP III mRNA 発現量を定量的に解析した結果、VUR 組織で UP III mRNA が過剰発現していること示された。さらにこの実験過程で、完全型 UP III の全 6 エクソンのうち、エクソン 4 (83 塩基) を欠損した UP III 新規選択的スプライシングバリエント (UP III delta4) を発見し、この UP III delta4 も VUR 組織で過剰発現していることを見出した。UP III delta4 からは膜貫通部分とその下流のフレームシフトの結果、全長 212 アミノ酸残基 (完全型 UP III 蛋白質は 287 アミノ酸残基) の変異 UP III 蛋白質が生じると推定される。次に、VUR 患者尿 21 例と対照患者尿 38 例を対象に、尿中剥離細胞での UP III mRNA について定量的解析を行った結果、尿でも VUR 患者における UP III mRNA の過剰発現を定量的に解析することができた。ROC 解析から得られた VUR 診断能は、感度 77.8%、特異度 76.3% であった。現時点で、非侵襲的な VUR スクリーニング法は皆無なので、われわれが開発した方法の臨床的意義は非常に高い。

## 研究組織

研究代表者：上仁数義 (滋賀医科大学医学部泌尿器科)  
研究分担者：吉貴達寛 (滋賀医科大学医学部泌尿器科)  
研究分担者：成田充弘 (滋賀医科大学医学部泌尿器科)  
研究分担者：影山 進 (滋賀医科大学医学部泌尿器科)

## 交付決定額

	直接経費	間接経費
平成 17 年度	2,100 千円	0 円
平成 18 年度	1,300 千円	0 円
計	3,400 千円	

## 研究発表

- (1) Iwaki, Johnin K, Kageyama S, Kim CJ, Isono T, Yoshiki T: Up-regulation of urinary UPIII mRNA levels in vesicoureteral reflux patients: Potential application as a screening test for vesicoureteral reflux. Int J Urol. 14: 918-23, 2007.
- (2) Yu Zeng, Xiu-Xian Wu, Yukio Homma, Naoki Yoshimura, Hideaki Iwaki, Susumu Kageyama, Tatsuhiro Yoshiki, Yoshiyuki Kakehi : Uroplakin III-Delta4 Messenger RNA as a Promising Marker to Identify Nonulcerative Interstitial Cystitis. J Urol 178:1322-1327, 2007.

## 緒 言

ウロプラキン (UP) は尿路上皮細胞に特異的に発現する膜蛋白質群で、4 種類の構成蛋白質が分離同定されている (分子量 27kDa の Ia、28kDa の Ib、15kDa の II、47kDa の III)。これら 4 種類のファミリーが尿路上皮最上層でプラークを形成しており、尿路上皮表面の安定化や透過物質からのバリアーとして機能していることなどが考えられているが、その詳しい生理機能は解明されていない。われわれの研究グループは、世界に先駆けてヒト UP III 遺伝子のクローニングに成功するとともに (Japanese Journal of Cancer Research, 89:879, 1998)、UPIa についても世界で唯一の特異的ポリクローナル抗体を作成して尿路移行上皮癌 (膀胱癌、尿管癌、腎盂癌) の組織診断マーカーとしての有用性を報告した (Japanese Journal of Cancer Research, 93:523, 2002)。以後も UP との関連に興味を持たれる膀胱尿管逆流症 (VUR) について、臨床応用に向けた研究を続けている。

VUR は非常に人種差が大きい先天性疾患で、世界中の泌尿器科医にとってバイブル的教科書である米国の『Campbell's Urology』には、最も発生頻度が高い白人では全胎児の 10% 以上に認められると記載されている。VUR の程度、先天性腎低形成の合併、反復した尿路感染による腎癒痕化の有無など様々な因子によって予後は異なるが、早期に十分な治療が行われなかった場合には逆流性腎症と呼ばれる腎機能障害さらには腎不全へと進展することが多い。実際に、末期腎不全の基礎疾患として、小児期では 30-40%、成人では 15-20% に VUR が認められると報告されている。VUR の診断には尿道からのカテーテル挿入による排尿時膀胱造影を必須とし、このような重要な疾患でありながら、スクリーニングに利用できる簡便な検査方法は確立されていない。そのため VUR の疑いがある患者のほとんど全てが侵襲的なレントゲン検査を受けざるを得ないのが現状である。また、VUR の発生には様々な遺伝因子や環境因子の関与が考えられているが、責任遺伝子の同定には至っておらず、原因解明に向けて検索が進められている。最近、UP III 遺伝子ノックアウトマウスで両側 VUR が単独発生する、という遺伝子発現と疾患の関連を示す動物実験結果が報告されたが (Journal of Cell Biology, 151:961, 2000)、一方で家族性 VUR 患者を対象としたヒト UP III 遺伝子解析では遺伝子変異は検出されなかった、とも報告されている (Journal of Urology, 171:931-2, 2004)。

われわれは以上の情報を踏まえて、VUR 患者での UP III 遺伝子発現に異常があるのではないかと考え、疾患と UP III 遺伝子発現量の関連を利用した簡便かつ全く侵襲のない VUR 診断方法の確立を目的として研究を開始した。さらに、UP III 遺伝子発現量の異常が他の UP 遺伝子発現量とどのように関連しているかを検討するために、4 種類全ての UP 遺伝子発現量についても検討した。

まず始めに、VUR患者と対照者の尿路上皮組織を試料に用いて、UP遺伝子発現量を調べるために、それらの各メッセンジャーRNA (mRNA) 発現量を比較した。その結果、全ての種類のUPmRNAがVUR上皮組織において発現亢進していることが判明した。さらに、完全長 (RNA1059 残基) UPⅢmRNA (UPⅢ-F) の翻訳領域内にある83残基を欠損したUPⅢ新規選択的スプライシングバリエント (UPⅢ-A)を発見し、このUPⅢ-AでもVUR組織での過剰発現が見られることを見出した。さらに、尿を用いた非侵襲的VUR診断システム確立のために、尿中剥離細胞でも同様の解析が可能かどうかを検討した。

## 対 象

VUR組織におけるUPmRNA発現量を検討するため、滋賀医科大学附属病院泌尿器科での手術で得られたVUR患者の膀胱上皮組織20例、および対照となる患者（前立腺肥大症、前立腺癌などの尿路移行上皮に明らかな異常を有さない泌尿器科患者）の尿路上皮組織11例を用いた。標本は採取後、速やかに $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。また、尿中剥離細胞でのUPmRNA発現量の検討には、同病院泌尿器科で得られたVUR患者尿18検体、および対照患者の尿20検体（外来検査で尿路に明らかな異常がない泌尿器科患者12検体と健常人8検体）を用いた。尿の採取は原則的に自然排尿とし、必要に応じてカテーテル導尿にて行った。採取した尿は、遠心分離にて細胞を回収したのちバッファーで洗浄し、速やかに $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。検体の採取に当たっては、当該研究への臨床材料の使用につき文書で十分な説明を行い、患者本人または代理者からの同意を得た。

## 方 法

### (1) mRNAの採取とcDNAの合成

#### ① 組織検体

保存した組織検体から、TriZOL Reagent (Life Technologies, Inc.) を用いて、プロトコールに従い総RNAを抽出し、分光光度計で濃度測定を行った。抽出した各 $5\mu\text{g}$ ずつの総RNAから、ランダムプライマー (Takara Biochemical) を用いて、Superscript II (Invitrogen) による逆転写反応からcDNAを合成し、以下の実験のサンプルとした。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する特異的プライマーを用いたreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法でcDNA合成の良否を確認した後、各サンプルを使用するまで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### ② 尿検体

採取した尿を遠心分離 ( $1,500\text{rpm}\times 10$  分間) して剥離上皮を回収し、PBS バッファーで計2回洗浄した後、速やかに $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。TriZOL Reagent (Life

Technologies, Inc.) を用いて、常法に従い総 RNA を抽出し、これを全量用いて組織検体の時と同様に cDNA を合成し、以下の実験のサンプルとして使用するまで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## (2) 全長 UP Ia、UPIb、UP II、UPIII に対する RT-PCR とダイレクトシーケンシング

合成した cDNA から LA taq (Takara Biochemical) を用いて RT-PCR を行った。反応液  $20\mu\text{l}$  中にそれぞれ  $2\mu\text{l}$  の cDNA を使用し、独自に設計したセンスおよびアンチセンスプライマーとして UP Ia、UPIb、UP II、UPIII それぞれについて UPK1A-S1 と UPK1A-AI、UPK1B-SI と UPK1B-AI、UPK2-SI と UPK2-AI、UPK3-S1 と UPK3-A2 を用いて (最終濃度  $0.2\text{pmol}/\mu\text{l}$ )、変性反応  $94^{\circ}\text{C}\times 30\text{sec}$ 、アニーリング反応  $62^{\circ}\text{C}\times 30\text{sec}$ 、伸長反応  $72^{\circ}\text{C}\times 1\text{min}$ 、30 サイクルの増幅で行った。PCR 産物をエチジウムブロマイド加 2% アガロースゲルで電気泳動し、可視化したバンドを切り出し QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて ABI PRISM 310 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) でダイレクトシーケンシングを行い、Genbank に登録された塩基配列と比較した。同様に GAPDH に対してはアニーリング反応を  $55^{\circ}\text{C}$  で 23 サイクルとした。

## (3) UPIII-F (完全型) および UPIII-A (不完全型) 特異的 RT-PCR

UPIII-F を特異的に検出するため、エクソン 4 の配列内にアンチセンスプライマー、UPK3-A4 を設計した。UPIII-A のみを増幅させるセンスプライマーとして UPK3-AL1 を、5' 側をエクソン 3 内に置き、3' 側はエクソン 4 をまたいでエクソン 5 先頭の 4 残基を付加するように設計した。UPIII-F 特異的 PCR はセンスプライマー UPK3-SF とアンチセンスプライマー UPK3-A4 を用いて (最終濃度  $0.2\text{pmol}/\mu\text{l}$ ) アニーリング反応を  $62^{\circ}\text{C}$  で行い、UPIII-A 特異的 PCR ではセンスプライマー UPK3-AL1 とアンチセンスプライマー UPK3-A2 を用いて (最終濃度  $0.2\text{pmol}/\mu\text{l}$ ) アニーリング反応を  $67^{\circ}\text{C}$  とした。RT-PCR で使用した全てのプライマーを Table1 に要約した。

## (4) UPIII-F および UPIII-A のサブクローニング

RT-PCR で増幅された UPIII-F および UPIII-A の PCR 産物を、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いて pCR4-TOPO プラスミドベクターでサブクローニングし、Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD) を用いてそれぞれのプラスミドを精製した。

## (5) 定量的 PCR

LightCycler FastStart DNA Master SYBER GREEN I (Roche Diagnostics) によるリアルタイム PCR を行った。推奨されているプロトコールに従い  $20 \mu\text{l}$  の反応液中に  $2 \mu\text{l}$  ずつの cDNA サンプルを使用し、UP Ia、UPIb、UP II リアルタイム PCR ではセンスおよびアンチセンスプライマーとしてそれぞれ UPK1A-S2 と UPK1A-AI、UPK1b-S2 と UPK1b-AI、UPK2-SI と UPK2-AI を用いて(最終濃度  $0.2 \text{pmol}/\mu\text{l}$ ) アニーリング反応を  $62^\circ\text{C}$  で行った。UP III-F および UP III-A のリアルタイム PCR は特異的 RT-PCR と同じ条件で行った。45 回転の増幅反応の後、アニーリング反応より  $7^\circ\text{C}$  高い条件で融解曲線を検証した。定量化コントロール用 DNA は、ダイレクトシーケンシングのための RT-PCR で得られたそれぞれのウロプラキン DNA を精製したのち分光光度計で濃度を測定し、これを段階的に希釈して調整した。GAPDH についても同様の手順で定量的 PCR を行った。リアルタイム PCR で使用したプライマーも Table1 に記した。

## (6) データの解析

定量的 PCR で得られた結果を元に、VUR サンプルと対照患者サンプル間で全てのウロプラキン mRNA 発現量の比較を行い、Mann-Whitney U 検定で統計学的解析を行った ( $p < 0.005$ : 有意差あり)。尿における UP III mRNA 定量の診断能を検討するため、ROC 曲線を描いて至適カットオフ値を設定し、感度、特異度を求めた。

## 結果

(1) UPIa、UPIb、UP II、UP IIIダイレクトシーケンシングによるプライマー特異性の検証と UP III-A (不完全型) の検出

VUR 組織から得られた cDNA を対象とし、全長 UP Ia、UPIb、UP II、UP III に対する RT-PCR を行った。PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、予測される分子量の位置に相当するバンドを切り出して精製した後、ダイレクトシーケンシングを行った。シーケンス結果とデータベースに登録された塩基配列との比較から、全てのプライマーが鑄型特異的であることを確認した。UP III PCR 産物のアガロースゲル電気泳動では、予測されたバンドよりもやや下方(低分子量域)にもバンドを認めた。ダイレクトシーケンシングの結果、この PCR 産物は UP III の全 6 つのエクソンのうち 4 番目のエクソン (83 残基) を完全に欠損した UP III のスプライシングバリエント (UP III-A) であることが確認された。

(2) UP III-F (完全型) および UP III-A (不完全型) 特異的プライマーの設計と



## 特異性の検証

UPⅢ-F または UPⅢ-A のみを RT-PCR にて検出するため、それぞれの特異的プライマーの設計と特異性の検証を行った。完全長の UPⅢ-F および UPⅢ-A DNA をプラスミドベクターでサブクローニングし、このプラスミドを鋳型としてそれぞれの特異的プライマーを用いた PCR を行った。その結果、UPⅢ-A 特異的プライマーは UPⅢ-A プラスミドには反応したが、UPⅢ-F プラスミドを鋳型とした PCR ではバンドは検出されず、UPⅢ-F 特異的プライマーは UPⅢ-F プラスミドにのみ反応した。以上から、UPⅢ-F および UPⅢ-A それぞれに対するプライマーの特異性が証明された。

### (3) VUR および正常尿路上皮組織における UPmRNA 発現量の比較

VUR 患者の膀胱上皮組織と正常尿路上皮組織での UPⅢ mRNA 発現量を定量して比較検討するため、VUR20 例、正常 11 例を対象に定量的 PCR を行った。UPⅢ-F および UPⅢ-A それぞれの発現量をコピー数として算出し、同様に定量した各サンプルの GAPDH 発現量で標準化した。その結果、VUR 組織での GAPDH 1ng あたりの UPⅢ-F および UPⅢ-A mRNA 発現量の平均±SD はそれぞれ  $5969.60 \pm 17642.50$ 、 $12.51 \pm 26.35$  であったのに対し、正常組織ではそれぞれ  $131.19 \pm 165.42$ 、 $1.37 \pm 2.04$  と、UPⅢ-F、UPⅢ-A 共に VUR 組織において過剰発現が認められた。20 例の VUR 組織のうち 4 例は、UPⅢ-F が 7000 コピー以上、UPⅢ-A が 13 コピー以上と異常高値を示したが、これらの特別な 4 例を除外した比較でも UPⅢ-F、UPⅢ-A いずれも VUR 組織において有意に発現が亢進していた（それぞれ  $p < 0.0001$ 、 $p = 0.023$ ）（Table 2、Figure 1）。他の UP についても同様の比較を行ったところ、全ての UPmRNA が VUR 組織において過剰発現していることが明らかとなった（Table 3、Figure 2）。

年齢と尿路上皮採取部位による UPmRNA 発現量の相違についても検証した。成人 VUR 患者と小児 VUR 患者間での発現量の差はなくほぼ同等に過剰発現しており、膀胱正常組織と上部尿路正常組織間での発現量も差を認めなかった（データ非提示）。

### (4) VUR 患者および健常者の尿剥離細胞中 UPⅢmRNA 発現の比較検討

VUR 組織において mRNA の過剰発現が確認された UPⅢ-F（完全長）および UPⅢ-A（バリエント）について、尿を検体としても同様に検出可能かどうかを検討した。VUR 患者尿 18 検体および対照となる尿 20 検体を対象として、UPⅢ-F および UPⅢ-A に対してリアルタイム PCR での定量を行った。VUR18 検体中には白血球 5-10 個/1 視野の軽度膿尿を認めた 3 検体も含まれるが、組織の場合と同様に GAPDH mRNA 発現量で各サンプルの検出結果を標準化して、それぞれのコピ

一数を算出した。その結果、GAPDH 1ng あたりの UPⅢ-F (完全長) mRNA 発現量の中央値は VUR および対照尿でそれぞれ 198.6、63.9、平均±SD は VUR および対照尿でそれぞれ  $438.54 \pm 763.20$ 、 $70.8 \pm 57.1$  ( $p=0.004$ ) と、VUR 尿で統計学的に有意に発現亢進していた。UPⅢ-A (バリエント) mRNA については中央値がそれぞれ 2.37、2.48、平均±SD はそれぞれ  $13.45 \pm 29.56$ 、 $2.43 \pm 2.54$  ( $p=0.276$ ) で、VUR 患者尿での過剰発現は見られなかった (Table 4, Figure 3、4、5)。UPⅢ-F mRNA 発現量の定量値を元に VUR を検出するためのカットオフ値を設定した。ROC 曲線から得られる至適カットオフ値は 95 で、この設定での感度は 67%、特異度は 80%であった (陽性検体数: VUR 12/18, 対照 4/20)。また、VUR 検体のうち 3 例の膿尿検体の定量値は、全てカットオフ値以下であった。これらの症例では、尿路上皮ではない白血球由来の GAPDH mRNA が混入したために偽陰性となっている可能性があるため、この 3 例を除けば感度が 80% (陽性検体数: VUR 12/15) であった。

## 考 察

Sun らが報告した UPⅢノックアウトマウスのデータを見て、当初われわれは VUR 症例における当該遺伝子の構造異常に起因する機能的発現低下を予測した。しかし、われわれ自身の検討でも、独立した他のグループによっても、予想と期待に反して患者 UPⅢ遺伝子に変異は発見されなかった。そこで次に、遺伝子の構造変化ではなく、遺伝子発現の量的変化が疾患の原因として関与しているのではないかと推測し、われわれは半定量的 RT-PCR 法による検討を試みた。しかし、この方法では非 VUR 群と VUR 群それぞれの膀胱上皮組織における UPⅢ遺伝子発現量の差を検出することはできなかったので、より精密な定量系を実験に組み込んで研究を継続した。その結果、ノックアウトマウスの実験に基づく仮説とは逆に、上述したような UPⅢ遺伝子の発現亢進が VUR 群で起きていることが判明した。現在のところ、この現象が生じる機構を適切に説明することは容易ではないが、あえて一つ提唱するとすれば以下のようなことが考えられる。すなわち、われわれの実験でスプライシングバリエントを発見できたのは、ウロプラキンファミリーの中で UPⅢだけであった。Sun らが全ての UP のノックアウトマウスを作製して検討したかどうかは不明であるが、機能異常につながり得るバリエント分子が存在するのは UPⅢだけなのである。全ての種類の完全長 UP が膜蛋白質であるのに対して、このバリエントは一部のエクソンが欠失することによってフレームシフトを起こし、膜貫通部分を持たない蛋白質になる。本来、UP は Ia と II、Ib と III の組み合わせのヘテロダイマーで 6 量体を形成しているとされている。膜貫通配列のない UPⅢバリエントが依然として UP Ib との結合能を保持しているとするならば、不完全な機能のヘテロダイマーを形成してウ

ロプラキンファミリー全体が機能不全状態に陥り、何らかのフィードバック機構が働いて、それぞれの UP の転写が亢進する結果となることが考えられる。果たして、この説明が正しいか否かは今後の研究の発展を待たなければならないが、ノックアウトと発現亢進という一見逆のように思える現象が、最終的にはウロプラキンファミリー全体の機能阻害という同じ結果になっているとすれば、辻妻は合っていることになる。もっとも、全症例で UPⅢの発現亢進が確認されたわけではないので、試料採取や保存を含めた実験手技の問題とともに、UP 遺伝子の異常が VUR 発生に關与する重要性の程度がどれほどかという本質的疑問は残ったままである。

VUR の診断法として確立されているものは、今のところ排尿時膀胱造影法しかない。低年齢の患児では、一人の検査に 30 分以上必要な場合もあり、スクリーニング検査としては現実的ではない。臨床症状が現れる前に VUR を発見しようとする目的で、新生児・乳児期の定期健康診断で腎の超音波スクリーニング検査が実施されることもあるが、この方法には、VUR は排尿時に出現する現象なので非排尿時のスクリーニングでは発見が困難な場合が少なくないことや、既に形態的变化が進行して拡張した腎盂尿管しか検出できない、という本質的弱点がある。それに加えて、大量の被験者を短時間で検査することは困難である。確定診断のための排尿時膀胱造影法の意義が揺らぐことはないが、スクリーニング法としては、患者にも医師にも負担が少ない検査方法の開発が必須である。そのような観点から、われわれが示した方法は今後多数症例で検討に値するものと思われる。

さらに、この研究で特筆すべき事は、尿中剥離細胞を対象にした世界初の定量的 RT-PCR 測定系を構築したという点である。抗体の反応性に左右される蛋白質検出系とは異なり、核酸の検出系は実験機器の改良や実験方法の変更などの工夫で飛躍的に感度が向上する可能性があり、一旦 cDNA の状態になればサンプルも長期間に渡って比較的安定に保存できる。これまでも尿剥離細胞中の RNA 発現についての研究報告には、膀胱癌でのテロメラーゼ発現を定性的に調べた報告がいくつかみられるが、サンプルの取り扱いの難しさや定量性の問題などから、臨床応用は容易ではないかのような印象が持たれていた。しかし、リアルタイム PCR などの正確かつダイナミックレンジの広い定量的 PCR 法の開発によって、mRNA 測定系が今後一挙に臨床検査の現場に登場する可能性がある。現実には、近い将来 C 型肝炎ウイルス (HCV) mRNA 定量測定系およびエイズウイルス (HIV) mRNA 定量測定系が臨床応用されるはずである。全世界で数千万人あるいはそれ以上の患者がそれぞれ存在する上記の二大ウイルス感染症が、この技術を用いた臨床応用第一弾に選ばれた事は当然である。

今回われわれが示した VUR も、先述したように白人では十人に一人以上が罹患しているという信じられないような高頻度の先天性疾患である。世界中には、腎機能障害の危険性に曝されている多数の VUR 患者が潜在している。腎機能喪失という不幸な事態を避けるために、全出産例において VUR の有無を調べる価値は十分にあると思われる。なぜなら、早期診断によって適切な治療管理を実施すれば、最終的には腎不全になって血液透析を年余に渡って受ける患者を多数救えることになり、また医療資源を地球規模でも節約できるからである。さながら前立腺癌の診断と治療や経過観察に革命的变化を起こした PSA (前立腺特異抗原) 検査のように、われわれが開発した無侵襲な検査方法は非常に多くの無症候性 VUR を検出するはずである。尿路感染を一度も起こしたことがない VUR も珍しくはないとされており、そういう症例も洩れなく診断することによって、初めて VUR という疾患の全体像が見えてくるとと思われる。尿中ウロプラキン mRNA 定量測定法が当該分野の新しい 1 ページを切り開く、と言っても過言ではない。

## 結 論

従来から知られていた 4 種類の UP ファミリーと今回発見した UPⅢ新規スプライシングバリエント (UPⅢ-A mRNA) の全てが、正常組織と比較して VUR 組織で過剰発現していることが判明した。また定量的 PCR 法によって、尿を対象としても mRNA の定量が可能であり、UPⅢ-F mRNA 発現量については組織での結果を反映して VUR 患者の尿剥離細胞中でも統計学的に有意に過剰発現していることが明らかになった。これらのことから、尿剥離細胞中の UP mRNA 発現量の定量、特に UPⅢ-F 発現量の評価が、VUR 患者の尿を用いた簡便なスクリーニング法として有用であることが示唆された。

## キーワード

- (1) 膀胱尿管逆流症、(2) ウロプラキンⅢ、(3) スクリーニング検査
- (4) 定量的 PCR

# ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER : 14202

2. RESEARCH INSTITUTION : The Department of Urology, Faculty of Medicine, Shiga University of Medical Science

3. CATEGORY : Grant-in-Aid for Scientific Research (C)

4. TERM OF PROJECT ( 2005 ~ 2006 )

5. PROJECT NUMBER : 17591673

6. TITLE OF PROJECT : Significance and development of urine uroplakin III mRNA measurement in vesicoureteral reflux

7. HEAD INVESTIGATOR

REGISTERED NUMBER	NAME	INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION
90324590	Kazuyoshi, Johnin	Shiga University of Medical Science, Faculty of Medicine, The Department of Urology, Assistant

8. INVESTIGATORS

(1)	REGISTERED NUMBER	NAME	INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION
(2)	80230704	Tatsuhiro, Yoshiki	Faculty of Medicine, The Department of Urology, Associate Professor
(3)	80191724	Yoshihiko, Wakabayashi	Faculty of Medicine, The Department of Urology, Assistant Professor
(4)	10204968	Chol-Jang, Kim	Faculty of Medicine, The Department of Urology, Assistant Professor
(5)	00263046	Mitsuhiro, Narita	Faculty of Medicine, The Department of Urology, Assistant
(5)	50378452	Susumu, Kageyama	Faculty of Medicine, The Department of Urology, Assistant

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

**Aim:** Vesicoureteral reflux (VUR) is the most common congenital urinary tract anomaly. This disease can pose a major threat to the kidneys as twenty percent of patients with endstage renal disease are reported to have VUR. Although genetic studies for *uroplakin III* (*UPIII*) have been reported recently, no study has focused on *UPIII* gene expression in VUR patients. We describe here the

up-regulation of *UPIII* mRNA in exfoliated urinary cells from primary VUR patients.

**Methods:** A real-time RT-PCR for *UPIII* mRNA was performed on exfoliated urothelial cells from 18 primary VUR and 38 control samples. *UPIII* mRNA copies were calculated for each sample. The statistical differences were assessed by the Mann-Whitney U test. Receiver operator characteristic curves were constructed for analysis of the diagnostic values.

**Results:** *UPIII* mRNA was found to be up-regulated to a greater extent in VUR than in control exfoliated urinary cells (mean  $\pm$  SE: 497.0 $\pm$ 178.5 copies vs. 69.0 $\pm$ 10.0 copies, respectively,  $p < 0.001$ ). In evaluating the measurement of urinary *UPIII* mRNA as a screening test for VUR, the sensitivity was 77.8% and the specificity was 76.3% by the best diagnostic cutoff point.

**Conclusions:** This is the first report demonstrating up-regulation of *UPIII* in mRNA levels in VUR patients. We submit that the quantitative measurement of urinary *UPIII* mRNA has a potential of developing into the first non-invasive screening test for VUR.

10. KEY WORDS

- (1) vesicoureteral reflux                      (2) uroplakin III                                      (3) screening  
(4) quantitative PCR
- 

11. REFERENCES

AUTHORS , TITLE OF ARTICLE	JOURNAL, VOLUME-NUMBER, PAGES CONCERNED, YEAR
Iwaki H, et al. : Up-regulation of urinary <i>UPIII</i> mRNA levels in vesicoureteral reflux patients: Potential application as a screening test for vesicoureteral reflux	Int J Urol 14: 918-923, 2007
Zeng Y, et al. : Uroplakin III-delta4 messenger RNA as a promising marker to identify nonulcerative interstitial cystitis	J Urol 178: 1322-1327, 2007