

令和元年6月5日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16785

研究課題名(和文)難治性下部尿路機能障害に対する光遺伝学による新たな治療法の開発に関する研究

研究課題名(英文)Optogenetic Researches on Novel Treatment of Lower Urinary Tract Dysfunction

研究代表者

志村 寛史 (SHIMURA, Hiroshi)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：70755842

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)：光遺伝学(optogenetics)を始めとする実験手法により、排尿に関わる前帯状回(Anterior Cingulate Cortex: ACC)の機能について研究を行った。神経トレーサーWGA(Wheat Germ Agglutinin)により、ACCから膀胱への経路が存在することを示した。ACCの神経活動の排尿への関与をFiber photometryにより証明した。促進性および抑制性チャンネルロドプシンを用いて、ACCにおける排尿に関する神経細胞の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性過活動膀胱、難治性夜間頻尿、低活動膀胱、間質性膀胱炎などの発症頻度は加齢とともに増加している(日本排尿機能学会疫学調査、図)。過去20年間に、過活動膀胱に対する抗コリン薬、交感神経系3作動薬(以下3作動薬)、前立腺肥大症に対する交感神経系1受容体遮断薬(以下1遮断薬)、PDE5阻害薬、5還元酵素阻害薬などが開発され、いずれも臨床的なエビデンスは高く評価されている。難治性過活動膀胱に対しては、磁気刺激療法、ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法や仙髄神経電気刺激療法などの新規治療法があるが、これらに抵抗性の難治性過活動膀胱に対する有効な治療法は、存在しない。

研究成果の概要(英文)：Fiberphotometry and optogenetics as novel technologies revealed regulatory function of the mouse anterior cingulate cortex in micturition reflex. The anterior cingulate cortex (ACC) has been speculated to be involved in urination from previous imaging studies.(Block, et al 1997) But the details are not well understood. We investigated the relationship between neural activity in ACC and urination using fiber photometry and optogenetics, which are new technologies using light. In conclusion, under urethane anesthesia, normal ACC neuronal activities are related to urination. The activity balance of the excitatory and inhibitory neurons of ACC may control urination.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：光遺伝学 Optogenetics チャンネルロドプシン Fiber photometry 下部尿路機能障害 前帯状回

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性下部尿路機能障害：難治性過活動膀胱、難治性夜間頻尿、低活動膀胱、間質性膀胱炎などの発症頻度は加齢とともに増加している(日本排尿機能学会疫学調査)。過去20年間に、過活動膀胱に対する抗コリン薬、交感神経系3作動薬(以下3作動薬)前立腺肥大症に対する交感神経系1受容体遮断薬(以下1遮断薬)、PDE5阻害薬、5還元酵素阻害薬などが開発され、いずれも臨床的なエビデンスは高く評価されている。難治性過活動膀胱に対しては、磁気刺激療法、ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法や仙髄神経電気刺激療法などの新規治療法があるが、これらに抵抗性の難治性過活動膀胱に対する有効な治療法は、存在しない。また、難治性夜間頻尿、低活動膀胱、間質性膀胱炎に対する有効な治療法は開発されていない。難治性過活動膀胱、難治性夜間頻尿、低活動膀胱、間質性膀胱炎は、難治性下部尿路機能障害というアンメットニーズである。

(2) 光遺伝学研究：近年、光の特性を利用した生命機能の制御技術が飛躍的な進展を遂げている。例えば、光遺伝学は、光感受性タンパク質を遺伝子工学の手法により特定の細胞に発現させ、その機能を特定の波長の光照射によって高い時間精度で操作する技術として脳・神経科学分野で急速に浸透している。本技術は特定の神経活動と行動発現を直接つなげることを可能とし、神経細胞の機能解明の研究パラダイムに革命的な変化をもたらしている。そこで、文部科学省では、「生命科学分野における光操作技術の開発とそれをを用いた生命機能メカニズムの解明」を平成28年度戦略目標及び研究開発目標に決定した。

(http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/28/03/attach/1368513.htm)

2. 研究の目的

難治性下部尿路機能障害に対する光遺伝学を用いた新たな治療法を開発するための準備を行う。

(1) 中枢神経系組織における光遺伝学を用いた治療法開発

(2) 末梢組織における光遺伝学を用いた治療法開発

野生型動物大脳のいくつかの領域にチャンネルロドプシン遺伝子を導入して発現させる。コンディショナルに光感受性蛋白質を発現する動物で、大脳内のニューロン特異的な刺激システムを作成する。ワイヤレスオプトジェネティクスによる光刺激と同時に尿流動態機能測定を行う。これらの実験によって、下部尿路機能を制御する脳内のニューロンが同定できる。また、脳内の特定のニューロン、末梢組織での特定の細胞の機能を解明し、制御することが可能になる。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系：通常マウス大脳の特定の領域にチャンネルロドプシン遺伝子を導入したのち、ワイヤレスオプトジェネティクスシステムによる光刺激と同時に尿流動態機能測定を行う。

(2) 中枢神経系：コンディショナルに光感受性蛋白質を発現するマウスで、ニューロン特異的な光刺激システムを作成し、下部尿路機能を制御するニューロンを同定する。

(3) 末梢組織：マウス下部尿路で、上記中枢神経系を実施する。

具体的な研究方法

平成29年度

(1) 中枢神経系

野生型マウス大脳のいくつかの領域にチャンネルロドプシン遺伝子を導入した後、ワイヤレスオプトジェネティクスによる光刺激と同時に尿流動態機能測定を行う。

実験手順の概略

遺伝子導入によって光応答性タンパク（チャンネルロドプシン）を目的細胞で発現させる。主にウイルスベクターを用いて行う。マウス脳の特定の領域（前帯状回など）に局所投与する。

チャンネルロドプシン 2 (ChR2): ChR2 は緑藻類、クラミドモナスがその眼点に持つ光受容蛋白質である。ChR2 は 7 回膜貫通型蛋白質であるが、1 つの蛋白質でありながら光を受容する能力と陽イオンを取り込むという 2 つの機能を持つ非常にユニークな蛋白質である。神経細胞内には Na⁺が細胞内に流入し、脱分極することによって興奮を起こすが、この ChR2 蛋白質を神経細胞に作らせ、光を照射することで神経細胞を興奮させる。

光感受性蛋白質の多様化: 現在は、さまざまな生物から ChR2 に類似した光感受性イオンチャンネルが得られ、それらを基にしてキメラや点変異体が作られて、吸収波長特性、光感度、キネテイクス、コンダクタンス、イオン選択性などにおいて多様な選択肢がある。

ChR のなかで非選択的のカチオンチャンネル ChR2 は青色光刺激で主に細胞内に Na⁺を流入し、細胞外に K⁺を排出する。光駆動性 Cl⁻-ポンプ NpHR/Halp は橙色刺激で細胞内に Cl⁻を取り込む。光駆動性 H⁺ポンプ Ach は M 緑色光刺激で細胞外に H⁺を排出する。これまでに様々なチャンネルロドプシンが開発され、それらは多くの活性化・抑制機能、光の至適波長、様々な機能を有している。これらを使い分け、組み合わせることによって、脳内の特定のニューロン、末梢組織での特定の細胞の機能を解明し、制御することが可能になる。

標的細胞に特異的に発現させるには、以下のような方法を用いる。

- ・ベクターを用いた標的細胞への導入法: 標的細胞特異的なプロモーターを組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV) やレンチウイルスをベクターとして導入する。
- ・コンディショナル発現法: Floxed コンストラクトや DIO/FLEX コンストラクトを組み込んだウイルスベクターをドライバー型トランスジェニック/ノックインマウスに接種する。
- ・目的細胞に光を当て、細胞応答を変化させる。

マウスの頭蓋内に LED 光源を埋め込み、光で脳機能の ON/OFF を行う。すでにバイオリサーチセンターでワイヤレスオプトジェネテイクスシステムが開発されている

1 円玉より小さなサイズであり、重量 1 グラムである。これをマウスに装着する。

- ・下部尿路機能との関連を調べる。

マウス・ラット用の無拘束尿流動態機能検査システム（山梨大学医学部泌尿器科学講座内に既存）を用いて行う（Sawada, N. et al., Eur Urol, 2013, 64:664-71）。

コンディショナルに光感受性蛋白質を発現するマウスで、ニューロン

特異的な光刺激システムを作成する。これにより、下部尿路機能を制御するニューロンが同定できる。

具体的方法: ドライバー型トランスジェニック/ノックインマウスとレポーター型トランスジェニック/ノックインマウスを交配して、コンディショナルに光感受性蛋白質を発現するマウスを作成する。Cre-loxP システムとともに tTA-tetO システムなどを用いる。tTA マウスと tetO-ChR2 マウスの二重構成。細胞種特異的プロモーターの制御下で tTA 転写誘導蛋白質を制御するマウスと、tetO プロモーター-ChR2 を持つマウスの 2 種類を交配させ、得られるダブルトランスジェニックマウスを実験に用いる。tTA 転写誘導蛋白質を発現する細胞では、マウスと tTA が tet プロモーターへ結合し、転写を開始する。すなわち ChR2 が発現する。一方、マウス tTA 蛋白質を発現しない細胞では tet プロモーターが活性化しないので、ChR2 は発現しない。

(2) 末梢組織

マウス下部尿路組織で、上記中枢神経系 を実施した。

研究体制： 武田 正之（研究の発案） 喜多村 和郎（研究の指導）

三井 貴彦（尿流動態機能検査
の指導・実施）

望月 孝則（光遺伝学研究の実施）

志村 寛史（光遺伝学研究の実施）

平成30年度 平成29年度と同様の研究計画内容を実施した。

4. 研究成果

前帯状回による排尿制御機構の解明：

光遺伝学を用いた新たな機能探索これまでの研究により、前帯状回（Anterior Cingulate Cortex: ACC）は排尿と関連がある大脳領野の一つといわれている。

しかしその機序は十分に解明されていない。

今回我々は、光で標的細胞だけを操作する事が可能な、極めて刺激選択性に優れた光遺伝学（optogenetics）を始めとする光を利用した実験を用いて、排尿に関わる ACC の機能について研究を行った。

(1) ACC は膀胱への神経経路を有しているのか？

神経節跳躍能力のある神経トレーサーWGA（Wheat Germ Agglutinin）を ACC に注入した。

組織学的解析によって、ACC から膀胱への経路が存在することを示した。

(2) ACC の神経活動は排尿に関与しているのか？

Fiber photometry を用いた ACC の神経活動観察；ACC へ光ファイバーを刺入し、蛍光の変化と排尿との関連を調べた。ウレタン麻酔下に CMG を施行し、同時に ACC の神経活動を測定した。

ACC の神経活動に一致して、膀胱内圧の上昇を認めた。

(3) ACC のどの神経細胞が排尿に関与しているか？

光遺伝学を利用し、大脳皮質全域 層の興奮性ニューロンに ChR2 を発現している Thy1-ChR2 マウスに対し、光刺激を行った。

Wild Type マウスの ACC にウイルス注入（AAV-CaMK α -ChR2-EYFP）を行い、ACC の興奮性ニューロンだけに ChR2 を発現させ光刺激をすると、実験 2 と同様に排尿圧をコントロールできた。

抑制性ニューロン的一种である PV ニューロンに Cre が存在する PV-Cre マウスの ACC に AAV-EF1a-DIO-ChR2 を注入して Cre 依存性に ChR2 を発現させ（ACC の PV ニューロン局所に ChR2 を発現している）光刺激を行った。光刺激により排尿間隔が延長した。

ACC は膀胱への神経経路を有しているのか？ WGA により膀胱との神経連絡路を確認した。

ACC の神経活動は排尿に関与しているのか？ Fiber photometry で排尿と ACC の神経活動が関与している可能性を示した。

ACC のどの神経細胞が排尿に関与しているか？ 光遺伝学を用いて ACC 興奮性ニューロンの活性化が排尿を誘導し、抑制性ニューロン的一种である PV ニューロンの活性化が排尿を抑制する事を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 志村寛史、渡邊 望、中村健三、塚本拓司、桑原勝孝 「FMD を用いた血管内皮機能と LUTS との関連について」第 106 回日本泌尿器科学会総会、2018 年
2. 志村寛史、渡邊 望、中村健三、塚本拓司、桑原勝孝 「FMD を用いたタダラフィルの血管内皮機能改善効果と LUTS との関与の検討」第 25 回日本排尿機能学会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

・研究協力者氏名：武田 正之

ローマ字氏名：MASAYUKI TAKEDA

・研究協力者氏名：三井 貴彦

ローマ字氏名：TAKAHIKO MITSUI

・研究協力者氏名：喜多村 和郎

ローマ字氏名：KAZUO KITAMURA

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。