

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23781

研究課題名（和文）脳幹橋部バリントン核を標的とした、青色LEDを用いた新規排尿障害治療法の創成

研究課題名（英文）Optogenetic investigation of neural circuit of mice micturition

研究代表者

伊藤 悠城（ITO, Hiroki）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90766619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、マウスの脳内の神経活動を測定し、排尿（尿の排出）に関わることが知られている脳幹内のバリントン核という神経核がどのようにマウス排尿を制御しているかを調べました。その結果、バリントン核は排尿を制御するだけでなく、蓄尿（尿をためる）をもコントロールしていることが判明いたしました。おしっここの障害は排尿障害と蓄尿障害に大別されますが、この両方の病態においてバリントン核の障害が寄与している可能性が示唆されました。今後病態におけるバリントン核の機能障害について研究を進めてまいります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で排尿におけるバリントン核の神経活動動態が明らかになりました。バリントン核が尿排出および蓄尿をも制御しており、かつバリントン核の神経活動自体は、それよりもさらに上位の中枢神経（ほかの脳の部位）よりコントロールされている可能性が示唆されました。今後、これらの排尿における神経ネットワークの詳細が明らかになることで、全国で多くの方々を悩ませているおしっこトラブルを治療する新しい治療薬の創薬もしくは新しい概念の新規治療方法構築につながるものと考えております。

研究成果の概要（英文）：Bladder function is controlled by several region of the brain and Barrington's nucleus is believed to be main controller of voiding function in micturition cycle. Our team recorded the neural activity of Barrington's nucleus and analyzed those activity associated with mice micturition. Barrington's nucleus neural activity facilitated voiding and also small contraction of the bladder during micturition cycle indicating that Barrington's nucleus seemingly control the voiding but also storage function. Furthermore investigation of Barrington's nucleus will uncover the pathological etiology of bladder dysfunction associated with Barrington's nucleus.

研究分野：泌尿器ニューロサイエンス

キーワード：光遺伝学 膀胱機能 排尿 蓄尿 バリントン核

1. 研究開始当初の背景

代表的な下部尿路機能障害として、排尿筋低活動(膀胱収縮不全)による尿排出機能障害と過活動膀胱による蓄尿機能障害とがある。これら下部尿路機能障害は加齢に伴い増加することが明らかになっており、本邦を含めた先進国の多くが高齢化社会に突入している現代において、世界的にも重大な健康問題となっている。本邦における疫学的調査では、40歳以上の年代層で810万人(12.4%)が過活動膀胱を呈し、また2,500万人もの人が尿勢低下といった尿排出機能障害を有しているとされている。これらの病態には排尿機能を司る中枢神経系の異常が関与していると考えられているが、中枢神経を標的とした排尿障害基礎研究は極めて稀であり、その発症機序はほとんど明らかとなっていない。

過活動膀胱(畜尿機能障害)に対する薬物療法は、抗コリン剤をはじめとして治療選択肢が複数ある一方で、尿排出機能障害に対する有効な薬物療法は、驚くべきことに皆無であり、重篤な症状の場合はあくまで対処療法であるカテーテル管理(間欠的自己導尿や永久尿道カテーテル留置)が必要である。そのためカテーテルフリーの生活の奪還は、重篤な尿排出機能障害患者および泌尿器科医の長年の悲願である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、『バリントン核副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン陽性ニューロン(BarrCRH)からの脊髄下降路における、排尿に必要な脊髄内神経応答機構の詳細解明』である。私はこれまで、標的神経細胞の選択的操作を可能とする、光遺伝学および薬理遺伝学を用いて、マウスの排尿中枢機能解析を続けてきた。光遺伝学では、青色LED照射により開口する光駆動性陽イオンチャンネルである、チャンネルロドプシン2(Channelrhodopsin-2; ChR2)を標的神経細胞に発現させ、他方で、薬理遺伝学ではクロザピンNオキシド(clozapine N-oxide; CNO)をリガンドとする、Gタンパク質共役受容体の一種であるヒトM4ムスカリン受容体(hm4Di)を標的神経細胞に発現させる。その後、青色LEDならびにCNOを用いて、それぞれの受容体を操作し、選択的に神経活動を興奮もしくは抑制することが可能である。

3. 研究の方法

(1) アデノウイルスを用いた、マウス BarrCRH に対する選択的 ChR2 の導入

今実験では、CRH陽性ニューロンにのみ cre(causes recombination; DNA組み換え酵素)を有した CRH-cre ノックインマウスを用いる。同マウスのバリントン核に対して、ステレオタクシス下に cre 依存性アデノウイルス(AAV2-EF1alpha-DIO-ChR2-mcherry)を、麻酔下に注入する。この cre 依存性アデノウイルスは、光駆動性チャンネル ChR2 を有しており、cre を発現している神経細胞にのみ導入されることから、BarrCRH における ChR2 の選択的発現が得られる。

(2) マルチチャンネル神経活動測定プローブを用いたバリントン核の神経活動測定

BarrCRH における十分な ChR2 導入を待ち(注入後3週間以上経過したのち)、ウレタン麻酔下でバリントン核にマルチチャンネル神経活動測定プローブを挿入する。青色LED(473nm)照射により BarrCRH を同定、神経活動を記録し、排尿との関係を明らかとする。さらに、実験結果をもとに、排尿支配の神経回路シミュレーターを作成した。

4. 研究成果

我々は、若齢マウスの橋バリントン核神経活動を基に、神経回路シミュレーターの構築を行った。CRH(Corticotropin releasing hormone; 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン)陽性ニューロンに DNA 組み換え酵素 Cre(cause recombination)を有する CRH-ires-Cre ノックインマウスのバリントン核に、Cre 依存性アデノ随伴ウイルス(AAV-EF1a-DIO-ChR2-mcherry)を注入した。光遺伝学的に同定したバリントン核 CRH 陽性ニューロン(BarrCRH)の神経活動をマルチチャンネルプローブで測定した。BarrCRH 神経活動マルチチャンネルレコーディングから明らかになった点として、

(1) BarrCRH 発火に伴う膀胱収縮は膀胱容量依存性で、排尿サイクル後期において増大(BarrCRH 発火に対する Spinal gate の存在)

(2) BarrCRH の発火が膀胱収縮を惹起する(畜尿期および排尿期いずれにおいても)

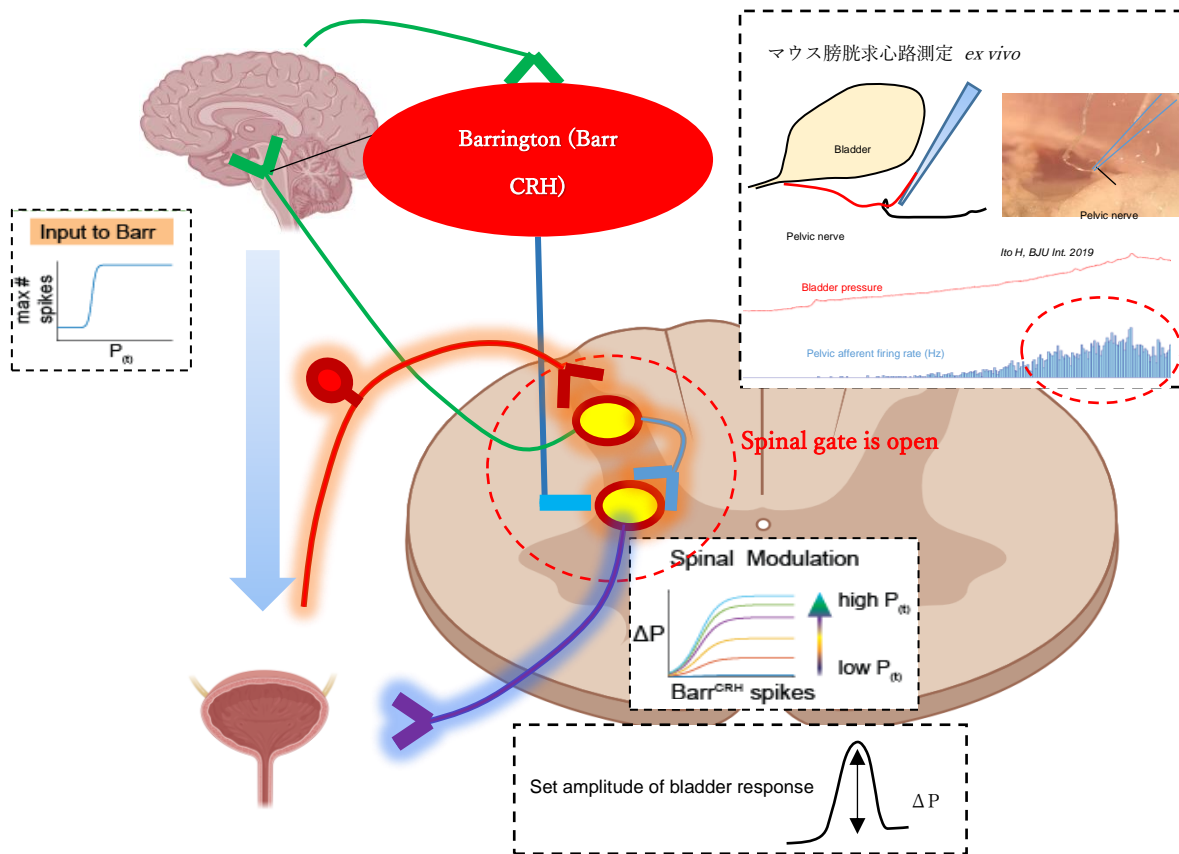
(3) BarrCRH 発火頻度は、膀胱充満時に上昇し、やがて排尿を引き起こす

(4) BarrCRH の神経活動の内因的な興奮性は、排尿サイクルを通して一定であり、外からの drive が BarrCRH の神経活動を制御している。

以上4点に着目した。この測定結果に基づき神経回路シミュレーター-NEURON(Hines ML., et al. 米 Yale 大学)および数理言語 MATLAB を用いて排尿支配の人工副交感神経数理モデルを構築した。NEURON を用いた副交感神経活動の数理モデル化ののち、ex-vivo モデル別実験系からのマウス膀胱求心路測定結果(Ito H, et al. BJU Int. 2019)を MATLAB を用いて数理化し、最終的に

膀胱-求心路-副交感神経活動を MATLAB で統合しモデルを作成した(図1)。以上の結果は、eLife 誌(Ito H, et al. Elife.2020 Apr 29;9:e56605.)に報告した。

図1 : 排尿支配の神経回路モデル



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Hiroki, Sales Anna C, Fry Christopher H, Kanai Anthony J, Drake Marcus J, Pickering Anthony E	4. 巻 9
2. 論文標題 Probabilistic, spinally-gated control of bladder pressure and autonomous micturition by Barrington's nucleus CRH neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e56605.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.56605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤悠城
2. 発表標題 神経回路シミュレーターNEURONを用いた排尿支配の人工副交感神経数理モデルの開発
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------