

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K18121  
研究課題名（和文）老齢マウスの脳幹橋バリントン核の機能解析と加齢性下部尿路機能障害の発生機序解明

研究課題名（英文）Functional analysis of the Barrington's nucleus of the pons in aged mice and elucidation of the developmental mechanism of age-related lower urinary tract dysfunction.

研究代表者  
伊藤 悠城（ITO, Hiroki）  
横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：90766619  
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）：老齢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を注入し、バリントン核を光遺伝学的に刺激した。バリントン核への光遺伝学的刺激に対しては、老齢群の膀胱収縮の反応率が有意に高かった。次に、ジフテリアトキシンによるバリントン核CRH陽性ニューロンの細胞死を起こした上で、排尿行動を観察した。結果、老齢群では尿閉状態となり、若齢群では排尿パターンの変化のみで尿閉状態には至らなかった。老齢マウスの排尿は、バリントン核CRH陽性ニューロンにより強く依存している可能性が考えられ、これらの事象が加齢に伴う下部尿路症状の原因である可能性も考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
超高齢化社会を迎えた先進国を中心に、下部尿路症状に伴うQOL障害が個人のみならず、社会的経済的負担となっている。加齢に伴う下部尿路症状は、蓄尿および排尿症状の両者を認めることが特徴である。我々はこれまで橋のバリントン核が、膀胱機能の蓄尿および排尿両者のコントロールに関与することを見出してきた。加齢に伴う下部尿路症状の元凶がこのバリントン核の機能異常にあるのではないかという仮説立てている。今回、老齢マウスのバリントン核の一部が加齢に伴い異なる挙動を呈することが示唆された。このことは今後加齢に伴う下部尿路症状の治療標的としてバリントン核が重要なターゲットである可能性を示すものと思われた。

研究成果の概要（英文）：Cre-dependent adeno-associated virus was injected into the Barrington's nucleus of old CRH-ires-Cre knock-in mice, and the Barrington's nucleus was stimulated optogenetically. The response rate of bladder contraction in the old group was significantly higher in response to photogenetic stimulation of the Barrington nucleus. Next, after causing cell death of Barrington's nucleus CRH-positive neurons by diphtheria toxin, the urinary behavior was observed. The results showed that the old group developed urinary retention, while the young group showed only a change in urinary drainage pattern and did not develop urinary retention. It is possible that urinary drainage in old mice is more dependent on Barrington's nucleus CRH-positive neurons, and that these events may be the cause of age-related lower urinary tract symptoms.

研究分野：泌尿器科

キーワード：下部尿路症状 バリントン核 加齢 マウス 膀胱 光遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

排尿は尿の排出をする排尿期と尿を蓄える蓄尿期の2つの層に大別することができ、代表的な下部尿路機能障害には、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。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(蓄尿機能障害)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。これら下部尿路機能障害は年齢とともに発症頻度が増し、超高齢化社会である本邦において多くの国民にQOL障害をもたらしている。さらに近年では先進国を中心に過大な医療経済負担の一因となっており、高齢者におけるいわゆる”common disease”の一つとしてより強く問題視されるようになってきた。

高齢者の下部尿路機能障害の最大の問題点は、極めて高い治療抵抗性である。中でも高齢者に多く認められる、蓄尿期の排尿筋の不随収縮および排尿期の排尿筋収縮力の低下を特徴とする(Detrusor hyperactive impaired contractility: DHIC)を主体とした、尿排出機能障害に対する治療方法はここ数十年なんら進歩を見ていない。すなわち、過活動膀胱(蓄尿機能障害)に対する薬物療法は、近年抗コリン剤、 $\beta$ 3受容体刺激剤などをはじめとした治療選択肢が増加している一方で、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)が必要となっている。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を有する患者および泌尿器科医の長年の悲願である。尿排出(排尿)機能障害に対する有効な薬剤が皆無である理由として、排尿における加齢に伴う中枢神経の回路異常について全くと言っていいほど解明できていない点が挙げられる。

## 2. 研究の目的

これまで私は、マウスのバリントン核に高発現している副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(Corticotropin-releasing hormone: CRH)陽性ニューロン(BarrCRH)が膀胱収縮を興奮性にコントロールしており、脊髄内投射したBarrCRHの神経軸索を脊髄レベルで光遺伝学的に刺激することで、膀胱収縮が起こることを突き止めた。さらに蓄尿期においてもBarrCRHが膀胱収縮を引き起こすことを明らかにし、BarrCRHが排尿および膀胱収縮において中心的神経核であることを突き止めた。

今回我々は老齢マウスを用いて、排尿を支配している神経核であるバリントン核の機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

バリントン核 CRH 陽性ニューロンに遺伝子組み換えタンパク質 Cre を発現させた雄性 CRH-Cre-ires ノックインマウス(2 - 3 か月齢)を購入(Jackson Laboratory)した。同マウスを若齢群(4 - 6 か月齢)および老齢群(22-24 か月齢)に分け、老齢群に関しては実験に用いる 22-24 か月齢になるまで大学動物実験センターにおいて長期飼育した。神経興奮を可能と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)ならびに神経細胞死を引き起こすジフテリアトキシンを組み入れた Cre 依存性アデノ随伴ウイルス (pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA および AAV5-mCherry-FLEX-DTA) をそれぞれ別の個体のバリントン核に直接注入し、下記機能実験に用いた。

研究その 1 : 老齢マウスにおけるバリントン核 CRH 陽性ニューロンの光遺伝学的的操作  
バリントン核 CRH 陽性ニューロンに ChR2 を発現させた老齢マウス頭部をウレタン麻酔下に固定し、optical fiber をバリントン核近傍に挿入した。膀胱内圧は経膀胱頂部カテーテルより測定した。

バリントン核近傍に留置した optical fiber からの青色 LED (473nm) 照射より、バリントン核 CRH 陽性ニューロンに発現している ChR2 を活性化させた。それに伴う、膀胱内圧の変化を記録し、加齢性変化の有無を検討した。

研究その 2 : 老齢マウスにおけるバリントン核 CRH 陽性ニューロンの神経細胞死実験  
無麻酔マウスの排尿行動を測定するために、排尿スポットを正確にとらえることを可能にした voiding spot assay (VSA) 測定系を樹立した。若齢および 24 ヶ月齢老齢 CRH-ires-Cre ノックインマウスの橋排尿中枢であるバリントン核に、Cre 依存性アデノ随伴ウイルス (AAV5-mCherry-FLEX-DTA) を注入し、バリントン核 CRH 陽性ニューロンの細胞死を起こした上で、VSA の変化を検討した。

さらに、同様のマウスに対してウレタン麻酔下の膀胱内圧測定を行い、詳細な内圧パラメーターの評価を行った。

研究その 3 : 免疫染色法および in situ hybridization 法によるバリントン核に CRH 陽性ニューロンの定量化

若齢および老齢マウスの CRH 陽性ニューロンの定量化を免疫染色法および in situ hybridization 法を用いて検討した。

### 4. 研究成果

若齢および 24 ヶ月齢老齢 CRH-ires-Cre ノックインマウスの橋排尿中枢であるバリントン

核に、Cre 依存性アデノ随伴ウイルス( pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA ) を注入し、ウレタン麻酔下でバリントン核を光遺伝学的に刺激した。膀胱内圧測定の結果、バリントン核への光遺伝学的刺激に対しては、老齢群の反応率が有意に高かった( 図 1 , unpublished data )。この結果は、当初我々が想定していたものと反対のものであった。

次に、若齢および 24 ヶ月齢老齢 CRH-ires-Cre ノックインマウスの橋排尿中枢であるバリントン核に、Cre 依存性アデノ随伴ウイルス( AAV5-mCherry-FLEX-DTA ) を注入し、バリントン核 CRH 陽性ニューロンの細胞死を起こした上で、VSA の変化を検討した。結果、老齢群では尿閉状態となり、若齢群では排尿パターンの変化のみで尿閉状態には至らなかった。尿閉状態の有無は、ウレタン麻酔下膀胱内圧測定でも行ったが、再現性を認めた( 図 2 , unpublished data )。

免疫染色による CRH 陽性ニューロンの定量化は、困難を極めた。合計 2 種の CRH 抗体を用いたが、いずれもバリントン核 CRH 陽性ニューロンを選択的に再現性をもって染めることがなかった。対して、in situ hybridization 法では、CRH 陽性ニューロンの同定が可能であった。現在定量化作業中である( 図 3 , unpublished data )。

図 1

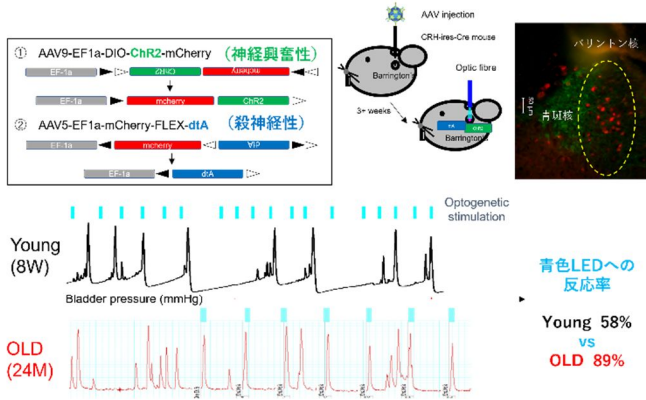


図 3

In situ Hybridization法による  
 バリントン核における  
 CRH陽性ニューロンの定量化

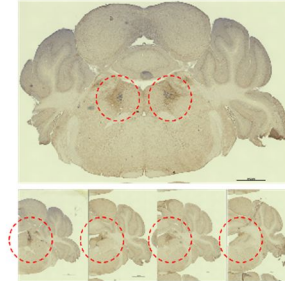
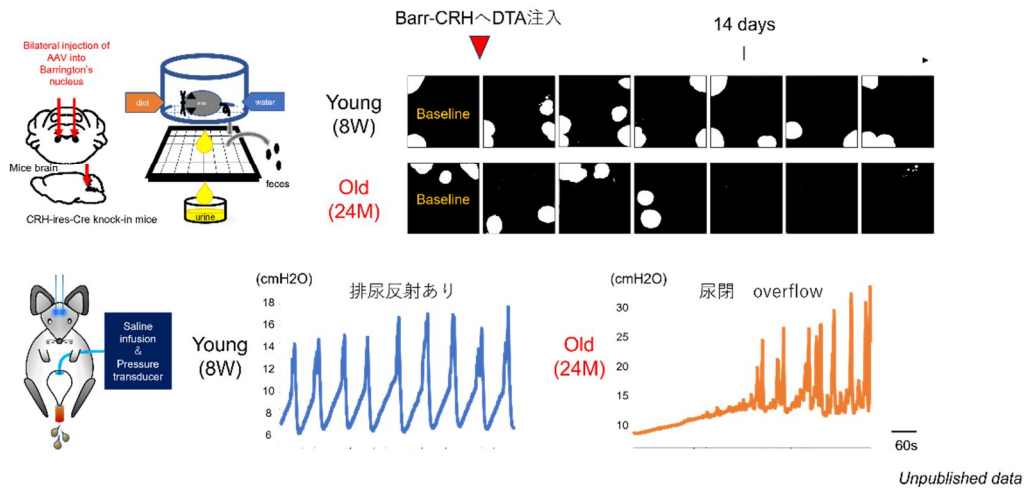


図 2



以上の結果から、老齢マウスの排尿は、バリントン核 CRH 陽性ニューロンにより強く依存している可能性が考えられた。これらの事象が加齢に伴う下部尿路症状の原因である可能性も考えられた。今後加齢に伴う下部尿路症状の治療標的としてバリントン核が重要なターゲットである可能性を示すものと思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------