

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18135

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いた前帯状皮質の神経活動と排尿機能の関わりを探求

研究課題名(英文) Investigating the association between neural activities of anterior cingulate cortex and lower urinary tract function using optogenetics.

研究代表者

志村 寛史 (Shimura, Hiroshi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

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)：前帯状皮質(Anterior cingulate cortex; ACC)と一次運動野(Primary motor cortex; M1)において、神経活動を反映するカルシウムセンサーを遺伝子導入で発現させたマウスを用い、膀胱内圧測定と同時に2光子顕微鏡で排尿時の神経活動を捕らえる研究を行った。高い空間識別能により、排尿に関わる役割を持つ神経細胞とそれ以外の細胞を識別することができた。遺伝子導入の手法により、ACCには活動パターンが異なる細胞群が、その局在や経路に依存して存在していることを明らかにした。おそらくそれらの細胞群は排尿において別の働きを担っていると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで排尿に関わる中枢神経の働きはほとんど未解明であった。特に大脳は1つの脳領域でも様々な役割を持つ神経細胞が共存している。今回の研究では2光子顕微鏡を用いることにより、個々の細胞単位で排尿に関連した活動を判別することができた。また、同じ領域内の排尿に関連する細胞であっても、細胞によって活動のパターンが異なる場合があり、それはその細胞の存在する場所や細胞の性質、細胞の投射する経路に依存していることが明らかとなった。今回の我々のような手法を用いれば、不明瞭であった排尿に関わる中枢神経の働きを明らかにし、難治性の下部尿路機能障害の治療に大きく貢献していくと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we expressed genetically-encoded calcium indicator in anterior cingulate cortex (ACC) or primary motor cortex (M1) of mice, and two-photon calcium imaging was performed during bladder perfusion under urethane anesthesia. Micturition-related neural activity was identified in both ACC and M1 with the advantage of two-photon calcium imaging for resolving spatial distribution.

We found that the activity of individual micturition-related neurons in ACC showed a considerable variability in their timing to micturition. In particular, the timing of the activity of layer 5 pyramidal neurons in ACC showed bimodal distribution, and it depended on the projection target. On the other hand, the pattern of neural activity in M1 was rather uniform. These results suggest that micturition-related neurons may control different aspects of voiding, e. g., initiation, maintenance and termination, depending on their location, cell-type, and projection pathway.

研究分野：泌尿器科

キーワード：大脳 カルシウムイメージング 2光子顕微鏡 排尿 前帯状皮質 一次運動野

1. 研究開始当初の背景

下部尿路機能障害の有病率は、高齢化社会の影響を受け増加傾向にある。近年は種々の治療薬や神経電気刺激療法などが開発されているが、治療効果が不十分であったり高齢者に対する副作用が懸念されたりする場面も少なくない。実臨床において患者の生活の質を改善できないことや、複数の投薬が必要になってしまうことは無視できない問題と考えている。治療が難渋する要因として、下部尿路機能障害のメカニズム、特に中枢神経に関する病態生理が不明瞭であり、中枢神経系を標的とした治療を開発できていないことが考えられる。例えば中枢神経の働きの解明においては、ラットの**前帯状皮質(Anterior cingulate cortex; ACC)**を電気刺激すると排尿間隔が延長するという報告(Kitta T et al, J Urol. 2016)があるが、電気刺激は局所選択性、細胞選択性が十分ではない。

これまでに当研究室では中枢神経の領域でACCを標的として、ウレタン麻酔下のマウスのACCに対し**光遺伝学(optogenetics)**の手法を用いて光刺激を行う実験を進めていた。光遺伝学では、光に反応を示すチャンネルを標的の細胞に遺伝子導入することで、電気刺激などよりも細胞選択性に優れている。本講座のこれまでの実験により、**大脳皮質5層の興奮性ニューロンにチャンネルロドプシン(ChR2)を持つThy1ChR2マウスのACC**に光刺激を与えると興奮性ニューロンの活性化により排尿が促進され、一方、ACCの抑制性ニューロン選択的にChR2を発現して光活性化すると排尿抑制が起きることを確認した。しかし、病的モデルでの観察がされていないことや、操作ではなく通常の排尿時にどのように神経細胞が活動しているかが、これまでの研究の課題であった。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では大脳を対象として、①病的モデルを対象としたoptogeneticsを用いた排尿制御、②排尿時の神経活動の観察を目的とした。

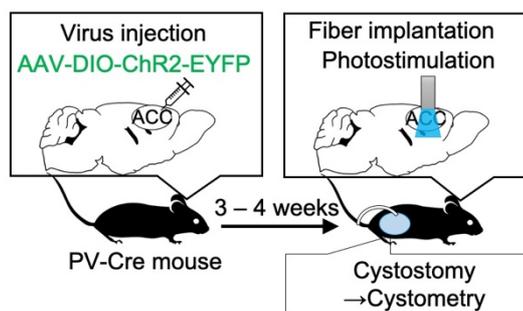
①により、これまで実現困難であった上位中枢を標的とした排尿制御を、optogeneticsの細胞の選択性や時間的特異性を持って実現可能にする礎となり得る。

また②においては、一つの脳領域でも他種の機能を持つ細胞が存在すると考えており、その中で排尿に関連した細胞とそうでない細胞を判別したいと考えていた。さらに、排尿に関連する細胞の中でも、神経細胞の場所や特性によって排尿における役割が異なる可能性について追究することを目的とした。このような神経細胞の観察はこれまでになく、排尿に関わる神経のメカニズムを解明するものと位置付けている。

3. 研究の方法

①病的モデルを対象としたoptogeneticsを用いた排尿制御

1). 遺伝子導入：PV-Cre マウス(抑制性ニューロンの1つであるPVニューロンにDNA組み換え酵素であるCreを発現している)のACC領域両側にCre依存的にChR2(興奮性opsin)を発現するウイルス(AAV-DIO-ChR2-EYFP)を注入。



2). 膀胱内圧測定:遺伝子導入後3-4週間後にウレタン麻酔下で膀胱瘻を造設。膀胱内に持続灌流し、膀胱内圧を測定。

3). 病的モデル作成：正常例では生食を膀胱内灌流するが、病的モデル(頻尿モデル)には0.1%酢酸(acetic acid; AA)を灌流する。AA灌流モデルでは膀胱からの求心性神経を賦活化し頻尿になるとされている。

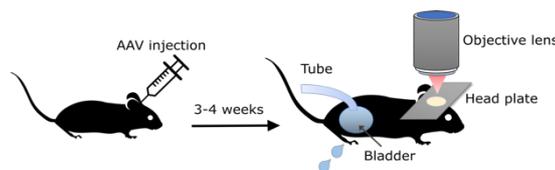
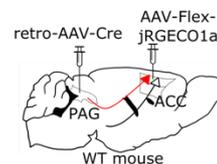
4). 光遺伝学的操作：麻酔下にマウスの両側ACCに光ファイバーを挿入する。膀胱内圧測定が定常化した後に、青色の光刺激を1pulse; 5ms, fr; 50Hz, power; 10.0 mW/mm²で、通常刺激(burst; 60s, interval;90s)、もしくは過剰刺激(burst; 120s, interval;60s)の2パターンで行う。

5). 評価方法：膀胱内圧測定における内圧のピークからピークの間を排尿間隔(Intercontraction interval; ICI)として計測。光刺激中とその前後(Pre、Stim、Post)各phaseで5cycle取得する。各phaseの5cycleの平均を算出し、基準となる(刺激前)ICIでnormalizeする。統計学的手法は以下の通りで各検証にてn=6で行う。

- ・ 同一2群間：A paired t-test
- ・ 異なる2群間：Student's t-test
- ・ 同一個体の3群間：A one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc testing

②排尿時の神経活動の観察

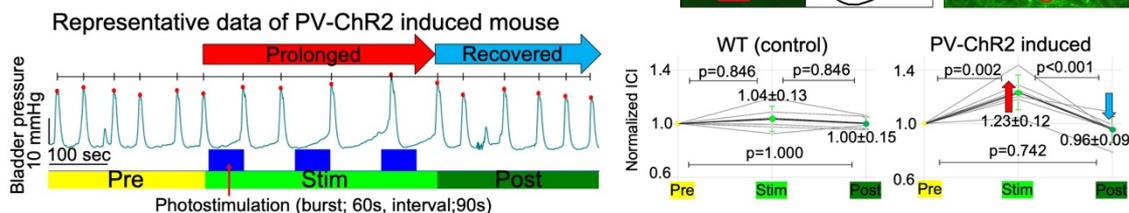
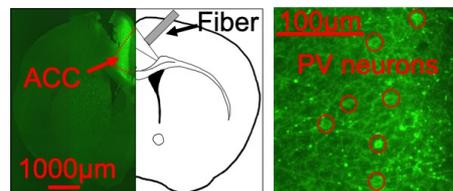
- 対象脳領域・対象神経：対象とした脳領域はこれまでに我々が研究してきた ACC と、大脳皮質の中でも ACC 同様に排尿に関与が先行論文で示唆されている一次運動野(Primary motor cortex; M1)とした。また、神経の種類としては a)種を選択しない全神経細胞(non-selectively labeled)、b)興奮性神経である V 層の錐体細胞(layer 5 pyramidal)、c)他領域に軸索を伸ばす錐体細胞のうち特定の領域(これまでに排尿に関わる経路の存在が示唆されている ACC からの中脳水道灰白質または M1 からの橋排尿中枢)に投射する細胞(ACC to PAG or M1 to PMC)の 3 パターンとした。
- calcium indicator の発現：in vivo で脳の神経活動を観察するために対象領域に calcium indicator を発現させる。深部の観察を可能にするため赤色の calcium indicator である jRGECO1a とした。a(non-selectively labeled)の場合は WT マウスの対象領域に神経細胞に依存して jRGECO1a を発現するウイルスを注入。b(layer 5 pyramidal)では V 層の錐体細胞に Cre を発現している Rbp4Cre マウスに Cre 依存的に jRGECO1a を発現するウイルスを注入。c(ACC to PAG or M1 to PMC)では、WT マウスで投射先には逆行性に Cre を発現させるウイルス、投射元には Cre 依存的に jRGECO1a を発現するウイルスを注入。
- 膀胱内圧測定:遺伝子導入後 3-4 週間後にウレタン麻酔下で膀胱瘻を造設。膀胱内に持続灌流し、膀胱内圧を測定。
- 2 光子顕微鏡カルシウムイメージング：対象領域上を開頭し、膀胱内圧測定と同時に 2 光子顕微鏡で神経活動をカルシウムの動体として観察する。
- 排尿関連細胞の選出:2 光子顕微鏡の高い空間識別能により、排尿に関与しない神経細胞と、排尿に関わる役割を持つ神経細胞とを識別することができた。排尿関連細胞の定義を①排尿時の活動が平均して shuffle data の 95%信頼区間以上になるもの、②排尿時に活動のピークが来るタイミングが shuffle data の標準偏差の 5%以下になるもの、の 2 通りで検証した。



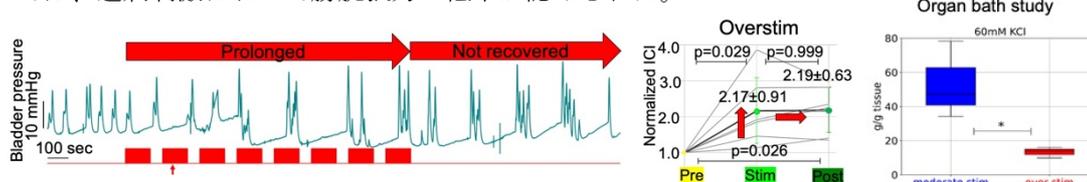
4. 研究成果

- 病的モデルを対象とした optogenetics を用いた排尿制御

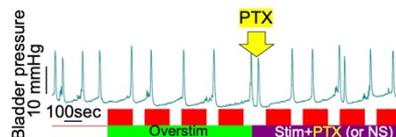
- 遺伝子発現の確認:上記実験後脳標本にて ACC 領域の PV ニューロンに蛍光色素が確認された。光ファイバーの挿入位置も適切であった。
- 生食灌流(非病的モデル)での検証:WT(野生型)マウスでは光刺激での変化なし。遺伝子導入マウスでは刺激中のみ ICI 延長。

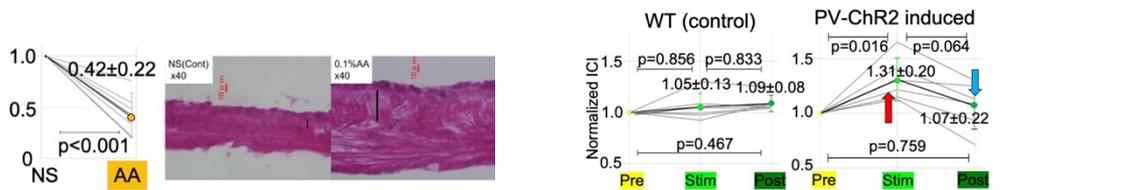


- 過剰刺激(overstimulation)での検証: 刺激時間を長くすると ICI 延長効果強くなるが、刺激終了後も ICI 戻らず。2)の通常刺激と 3)の過剰刺激を受けた膀胱組織の organ bath study では、過剰刺激において膀胱張力の低下が認められた。



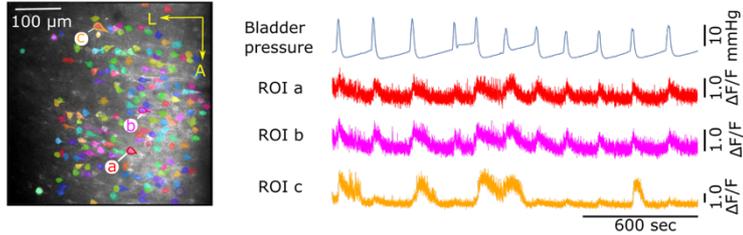
- 拮抗薬投与下での検証：抑制性ニューロンの主な神経伝達物質である GABA の受容体アンタゴニストのピクロトキシン(PTX)を光刺激中の ACC に投与したところ、ICI 延長効果を打ち消した。
- 頻尿モデルに対する治療効果の検証:0.1%酢酸(AA)灌流で確かに ICI 短縮した。WT マウスでは光刺激での変化なし。遺伝子導入マウスでは刺激中のみ ICI 延長。





②排尿時の神経活動の観察

1). 観察される神経活動の例：
右図のように1FOV(Field of view)あたりに100以上の神経が観察され、膀胱内圧の変化に同期するような神経活動を持つ神経とそうでない神経が存在することが示された。

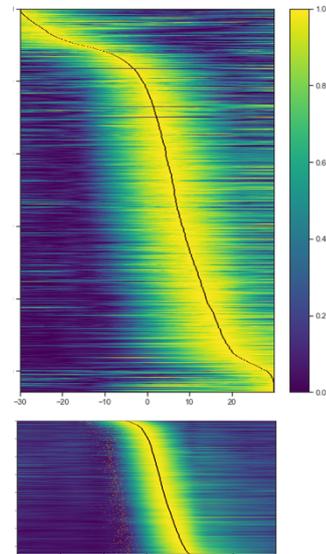


2). 排尿関連細胞の全細胞に対する割合や、対象領域内におけるマッピング：

①排尿時の活動が平均して shuffle data の 95%信頼区間以上になるもの

- ACC; a(non-selectively labeled): 11185/26945 (排尿関連細胞数/全細胞数) = 41.51%
- b(layer 5 pyramidal): 7940/17686 = 44.89%
- c(ACC-PAG): 1028/3718 = 27.65%
- M1; a(non-selectively labeled): 9713/23821 = 40.78%
- b(layer 5 pyramidal): 10051/20848 = 48.21%
- c(M1-PMC): 1699/4961 = 34.25%

右図は排尿時点を0secとし、前後30sec計60secの神経活動の強さをmax=1、min=0でnormalizeしたものをcolor plotで示し、抽出された排尿関連細胞を縦に並べたものである(ACC; non-selectively labeled, n=11185)

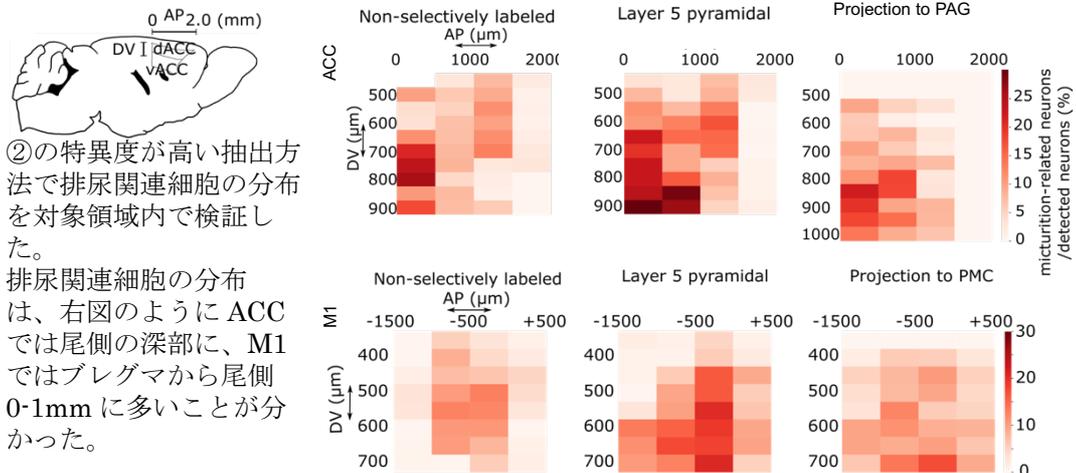


②排尿時に活動のピークが来るタイミングが shuffle data の標準偏差の5%以下になるもの

- ACC; a(non-selectively labeled): 1882/26945 = 6.98%
- b(layer 5 pyramidal): 1921/17686 = 10.86%
- c(ACC-PAG): 281/3718 = 7.56%
- M1; a(non-selectively labeled): 1537/23821 = 6.45%
- b(layer 5 pyramidal): 2040/20848 = 9.79%
- c(M1-PMC): 430/4961 = 8.67%

右図は排尿時点を0secとし、前後60sec計120secの神経活動の強さをmax=1、min=0でnormalizeしたものをcolor plotで示し、抽出された排尿関連細胞を縦に並べたものである(ACC; non-selectively labeled, n=1882)

以上のように、①は感度が高いが特異度が低く、②は特異度が高いが感度は低い抽出法である。いずれにしても、対象とした脳領域内では排尿関連細胞とそうではない細胞とが混在していることが示された。

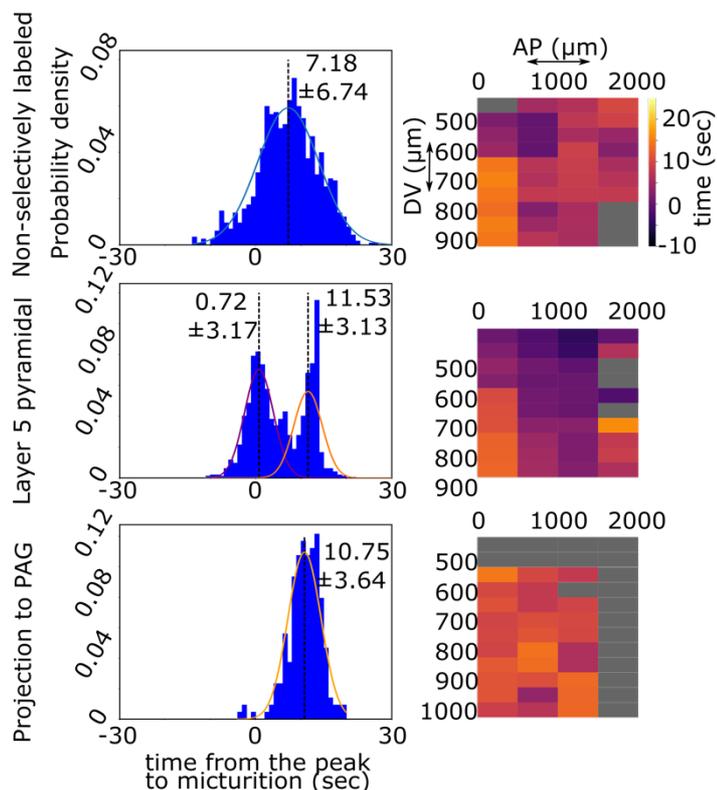
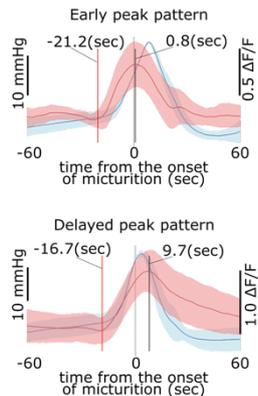


②の特異度が高い抽出方法で排尿関連細胞の分布を対象領域内で検証した。
排尿関連細胞の分布は、右図のようにACCでは尾側の深部に、M1ではブレグマから尾側0-1mmに多いことが分かった。

3). 活動のピークの latency の検証

本検証では、ピークのタイミングが排尿のタイミングから毎回ほぼ同じ latency を持つ細胞に注目するため、②の特異度が高い抽出法で検証した。

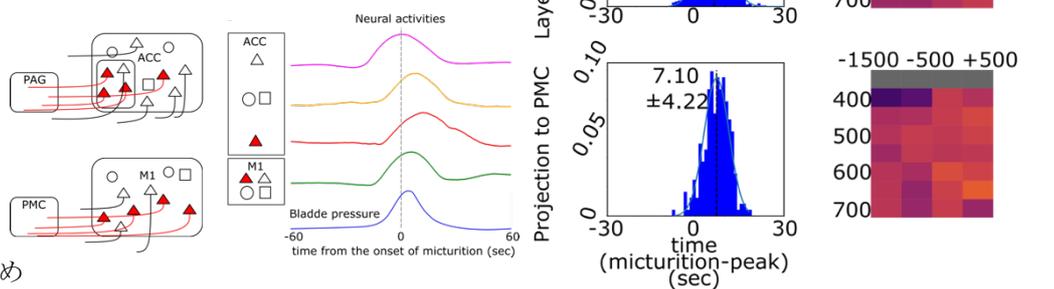
下図は膀胱内圧の平均と、ある 2 つの神経細胞の活動の平均である。右図は ACC の a,b,c3 パターンにおけるピークの latency のヒストグラムと、マッピングである。b(layer 5 pyramidal)ではヒストグラムが 2 峰性となっており、大きく分けて下図のようなピークが早い群と遅い群に分けられることが分かった。



また、ピークが遅い群は c(PAG へ投射する経路)のヒストグラムと類似していた。さらに、a,b でのマッピングでピークが遅い群は主に ACC の尾側の深部に局在することが分かった。

右図は M1 での a,b,c3 パターンにおけるピークの latency のヒストグラムと、マッピングである。ACC でのものと異なり、いずれのパターンでもヒストグラムの性状は同一であった。マッピングでもピークの latency による細胞の偏在で明らかなものはない。

以上より、下図のように ACC では細胞の種類や経路によって、排尿における活動のタイミングが異なることが示された。一方で、M1 に存在する排尿関連細胞は、その種類や経路で活動のタイミングによらず一定であった。



まとめ

①病的モデルを対象とした optogenetics を用い

た排尿制御においては、光遺伝学的手法による中枢神経制御で LUTD の治療を初めて報告した。時間的特異性に極めて優れた効果を示した (光照射時のみ ICI 延長)。過剰な刺激は膀胱の過進展を引き起こし、末梢組織に影響することが示唆された。治療時は至適刺激強度の探索が肝要である。細胞種を選択できることはメカニズム解明や治療時の副作用軽減に寄与する。光遺伝学的手法の時間的・細胞種特異性という利点を活かし、将来的に治療に適応させることが今後の展望である。

②排尿時の神経活動の観察

2 光子顕微鏡カルシウムイメージングにより、排尿時の神経活動を個々の神経細胞レベルで観察した初めての報告である。ACC、M1 とともに排尿時に同期した神経活動が観察された。活動のタイミングから、排尿において複数の役割をその局在や経路別で有している可能性があることが分かった。この観察方法により今後排尿に関わる中枢神経の解明が飛躍的に進むと予想される。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimura Hiroshi, Kuwahara Yoshitaka, Aikawa Junki, Watanabe Nozomu, Nakamura Kenzo, Tsukamoto Takuji, Terada Shigehiko, Mitsui Takahiko, Takeda Masayuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Cine magnetic resonance imaging provides novel predictors of early continence recovery after radical prostatectomy: Assessment of the dynamics of pelvic floor muscles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 256 ~ 264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nau.24544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Hiroshi Shimura, Yoshitaka Kuwahara, Nozomu Watanabe, Kenzo Nakamura, Takuji Tsukamoto, Shigehiko Terada, Takahiko Mitsui, Masayuki Takeda
2. 発表標題 Bladder elevation in pelvic floor muscle training evaluated by cine MRI (magnetic resonance imaging) is associated with early recovery of continence
3. 学会等名 AUA 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Shimura, Yoshitaka Kuwahara, Nozomu Watanabe, Kenzo Nakamura, Takuji Tsukamoto, Shigehiko Terada, Takahiko Mitsui, Masayuki Takeda
2. 発表標題 Bladder elevation in pelvic floor muscle training evaluated by cine MRI (magnetic resonance imaging) is associated with early recovery of continence after radical prostatectomy."
3. 学会等名 EAU2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志村 寛史、真仁田 聡、望月 孝規、井原 達矢、吉良 聡、中込 宙史、澤田 智史、喜多村 和郎、三井 貴彦、武田 正之
2. 発表標題 光遺伝学的手法による頻尿モデルマウスの排尿間隔の延長
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Shimura, Yoshitaka Kuwahara, Nozomu Watanabe, Kenzo Nakamura, Takuji Tsukamoto, Shigehiko Terada, Takahiko Mitsui, Masayuki Takeda
2. 発表標題 Bladder elevation in pelvic floor muscle training evaluated by cine MRI (magnetic resonance imaging) is associated with early recovery of continence after radical prostatectomy.
3. 学会等名 ICS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志村 寛史、望月 孝規、真仁田 聡、井原 達矢、吉良 聡、中込 宙史、澤田 智史、三井 貴彦、武田 正之
2. 発表標題 光遺伝学を用いた中枢神経における排尿制御の解明
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志村 寛史、三井 貴彦、望月 孝規、井原 達矢、吉良 聡、中込 宙史、澤田 智史、武田 正之
2. 発表標題 シンポジウム 神経因性膀胱の病態解明と新規治療の開発に向けて～基礎研究の現在と今後～
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志村 寛史、真仁田 聡、望月 孝規、井原 達矢、吉良 聡、中込 宙史、澤田 智史、喜多村 和郎、三井 貴彦、武田 正之
2. 発表標題 頻尿モデルマウスへの光遺伝学的治療の可能性
3. 学会等名 第86回日本泌尿器科学会東部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志村 寛史、真仁田 聡、望月 孝規、井原 達矢、吉良 聡、中込 宙史、澤田 智史、喜多村 和郎、三井 貴彦、武田 正之
2. 発表標題 頻尿モデルマウスへの光遺伝学的治療の可能性
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimura H., Manita S., Mochizuki T., Matsuda Y., Ihara T., Kira S., Mitsui T., Kitamura K., Takeda M.
2. 発表標題 Therapeutic potential of cell-type selective optogenetics for a mouse model with urinary frequency.
3. 学会等名 EAU2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimura H., Manita S., Mochizuki T., Matsuda Y., Ihara T., Kira S., Mitsui T., Kitamura K., Takeda M.
2. 発表標題 Therapeutic potential of cell-type selective optogenetics for a mouse model with urinary frequency.
3. 学会等名 AUA2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimura H., Manita S., Mochizuki T., Matsuda Y., Ihara T., Kira S., Mitsui T., Kitamura K., Takeda M.
2. 発表標題 Therapeutic potential of cell-type selective optogenetics for a mouse model with urinary frequency.
3. 学会等名 ICS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Shimura, Yoshitaka Kuwahara, Nozomu Watanabe, Kenzo Nakamura, Takuji Tsukamoto, Shigehiko Terada, Takahiko Mitsui, Masayuki Takeda
2. 発表標題 Bladder elevation in pelvic floor muscle training evaluated by cine MRI (magnetic resonance imaging) is associated with early recovery of continence after radical prostatectomy.
3. 学会等名 PPCS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 志村 寛史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 3
3. 書名 排尿障害プラクティス	

〔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
研究協力者	武田 正之 (TAKEDA MASAYUKI)		
研究協力者	三井 貴彦 (MITSUI TAKAHIKO)		
研究協力者	喜多村 一郎 (KITAMURA KAZUO)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	眞仁田 聡 (MANITA SATOSHI)		

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