

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16290

研究課題名（和文）排尿における前帯状皮質の役割：光遺伝学を用いた前帯状皮質の新たな機能解明

研究課題名（英文）Role of anterior cingulate cortex against micturition reflex: New functional insights into the anterior cingulate cortex using optogenetics

研究代表者

望月 孝規 (Mochizuki, Takanori)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：30790430

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）：ACCのLUT機能に対する貢献についてはまだ議論の余地があり、その基礎的なメカニズムはほとんどわかっていない。本研究の目的は、LUT機能においてACCがどのように排尿反射を制御しているのか、その神経機構を明らかにすることである。我々はオプトジェネティクスを用いてACCの第5層錐体細胞とパルバルブミン（PV）陽性介在細胞を選択的に活性化すると、それぞれ排尿が誘発・抑制されることが明らかになった。これらの結果は、ACCが排尿の開始に重要な役割を果たしていること、そしてACCにおける興奮と抑制のバランスが排尿反射を制御している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで排尿を光で制御するという概念は存在していなかった。本研究は、光遺伝学を利用し脳の局所における機能選択的な刺激を光によってきわめて鋭敏に行うことで1. 大脳の排尿経路を明らかにできる可能性を示唆したこと、2. 排尿障害を光によって治療するという新たな可能性を示したこと以上2点において社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The contribution of the anterior cingulate cortex (ACC) to lower urinary tract (LUT) function is still controversial and its underlying mechanisms remain largely unclear. The purpose of this study is to elucidate the neuronal mechanisms of how ACC controls micturition reflex in LUT function. I first examined the neuronal pathways between ACC and the bladder by using a transsynaptic neuro tracer and found the descending pathway from a subset of neurons in ACC to the bladder. Next, electrical stimulation and pharmacological manipulation of ACC revealed that activation of ACC neurons could induce contraction of the bladder. Furthermore, selective activation of layer 5 pyramidal neurons and parvalbumin (PV) positive interneurons in ACC by using optogenetics induced and suppressed micturition, respectively. These results suggest that ACC plays a crucial role in the initiation of micturition and that the balance of excitation and inhibition in ACC may regulate micturition reflex.

研究分野：泌尿器科学、神経生理学

キーワード：光遺伝学 前帯状皮質 排尿反射

1. 研究開始当初の背景

下部尿路の機能は脳によって制御されていることが知られており、Barrington によるネコの病変研究で初めて明らかにされた。脳幹に同定された領域は Barrington's nucleus または Pontine micturition center (PMC) と名づけられた。薬理学的研究により、グルタミン酸、カルバコール、アセチルコリン、ノルアドレナリン、ナロキソン、ピクスクリンなどを PMC に投与すると膀胱収縮が誘発されることが示されている。一方、フェンタニルやロイシンエンケファリンなどのオピオイドを塗布すると、逆の効果があることが示されている。最近では、オプトジェネティクスにより PMC のコルチコトロピン放出ホルモン corticotropin releasing hormone (CRH) 陽性ニューロンを直接活性化すると、排尿が誘発されることが示されている。これらの研究は、PMC が排尿反射のオン・オフスイッチとして働き、排尿を促進するために重要な役割を担っていることを示唆しています。PMC は中脳水道周囲灰白質 periaqueductal gray matter (PAG) と相互に結合していることから、PMC と PAG の協調作用は下部尿路機能 Lower urinary tract (LUT) 機能の調節に重要であると推定される。特に、背外側および腹側 PAG は排尿に関与している。これらの部位を電気刺激すると膀胱の収縮が誘発される。PAG にグルタミン酸を局所投与すると膀胱収縮が誘発され、GABA やオピオイドを投与すると反射収縮の頻度が減少する。したがって、PAG は排尿反射において PMC と同様の役割を担っていると考えられ、両領域の機能が分子レベルで詳細に研究されている。また PAG の投射経路について、げっ歯類レベルでは PAG は前帯状皮質 anterior cingulate cortex (ACC) 扁桃核、島皮質と相互接続していることが知られており、したがって、これらの脳領域も LUT 機能に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、LUT に対するこれらの領域の機能は、依然として不明である。

ヒト脳障害患者を対象としたレトロスペクティブな観察研究やヒトの脳画像研究により、いくつかの脳領域が LUT 機能に関与していると推測されていることが示されている。脳卒中や脳幹部の脳出血の患者では、高率に排尿障害を示した。この結果は動物実験と一致した。一方、前頭葉の病変では頻尿や尿意切迫感などの蓄尿障害が多く、前頭葉は排尿反射を抑制する作用があると考えられている。さらに、近年の fMRI や PET を用いた脳機能イメージング研究により、排尿時に PMC、PAG、ACC、視床核、島皮質、前頭前野など複数の脳領域が活性化することが示されているが PMC、PAG 以外についてはその作用は十分には明らかになっていない。これらの脳領域のうち ACC は最も謎に包まれた領域である。なぜならばヒトの脳画像研究では、ACC は蓄尿期に活性化すると報告されているが、その一方で過活動膀胱の患者では排尿期に活性化することも報告されている。したがって、ACC が貯留期と排尿期のどちらに活性化されるかはまだ議論のあるところである。

2. 研究の目的

ACC が排尿に対してどのように関与しているのかをマウスを使用して明らかにすることが本研究の目的である。さらに ACC と関連する領域について同定し特に排尿に関与していることが知られている PAG との相互関連の有無について明らかにすることも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウス大脳における経路の同定

野生型マウスの PAG に逆行性神経トレーサーの一つである CTB を投与し、数日後に大脳を摘出し、スライスを作成した。蛍光色素の発現を調べた。

野生型マウスの ACC に対する刺激実験

-1: 電気刺激実験

ウレタン麻酔下にマウスへ膀胱瘻を作成し、そこから生理食塩水を注入し、排尿時に出現する圧変化を測定した。この最中に ACC へ向けて電気刺激針を注入し ACC を刺激した場合に排尿圧にもたらす影響を調べた。

-2: 薬剤投与実験

同様に膀胱内圧測定時に ACC へ GABA 受容体作動薬であるムシモール、GABA 受容体拮抗薬であるピクロトキシンを投与し排尿圧の変化を測定した。

光遺伝学を用いた実験

-1 Thy1ChR2 を使用した刺激実験

大脳皮質 5 層興奮性ニューロンに興奮性オプシンである ChR2 を発現している Thy1ChR2 マウスを使用して、上記実験と同様にウレタン麻酔下に ACC へ光プローブを刺入して青色光刺激を行った。その時に出現してくる排尿圧波形変化を測定した。

-2 CaMKII α -ChR2 を使用した刺激実験

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は興奮性神経細胞に豊富に存在し、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合蛋白、イオンチャネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによって、それらタンパク機能を調節し、シナプス伝達の可塑性、さらには、

学習・記憶をはじめとする高次脳機能に重要な役割を果たすと考えられている。この CaMK 依存性に ChR2 を発現するアデノ随伴ウイルスを野生型マウスの ACC に投与し、ACC の興奮性ニューロンだけに ChR2 を発現させたマウスを使用して、ウレタン麻酔下に膀胱内圧測定を行った。この途中で ACC に対し光刺激を行い排尿圧の変化を測定した。

-3 PV-Cre マウスを使用した実験

パルプアルブミン parvalbumin(PV)ニューロンは介在ニューロン的一种である。これを活性化することで興奮性ニューロンの活動を抑制することが知られている。PV-ニューロンに Cre を発現するマウス (PV-Cre マウス) を使用した。PV-Cre マウスの ACC に AAV - DIO-ChR2 を投与し ACC の PV ニューロンにのみ ChR2 を発現しているマウスを策定した。このマウスに対してウレタン麻酔下に膀胱内圧測定を行い、実験途中で ACC に光刺激を行い排尿圧の変化を確認した。

ACC 内における排尿領野の探索

マウス ACC の右側領域 (Bregma から外側 0.2mm-1.2mm、前方 0.0mm-1.0mm の領域) の 9 か所に光プローブを刺入し光刺激時の排尿圧変化を測定した。浅い層と深い層を探索した。

PAG との関連

Thy1ChR2 マウスを使用した。ウレタン麻酔下に Thy1ChR2 マウスに膀胱瘻を作成し、かつ光プローブを ACC に刺入した。光刺激を行っている最中に PAG の活動を抑制するためムシモールを投与して、投与前後における光刺激に対する排尿圧の変化を測定した。

4. 研究成果

野生型マウス大脳における経路の同定

PAG に CTB を投与したところ ACC に蛍光色素を確認した。以上のことから ACC と PAG には経路が存在していることが明らかになった。

野生型マウスに対する刺激実験

-1: 電気刺激実験

電気刺激では排尿間隔の短縮を認めた。

-2, -3: 薬剤投与実験

ムシモールでは排尿間隔が延長し、一方ピクロトキシンでは排尿間隔が短縮した。コントロールとして使用した生理食塩水ではこの差は認めなかった。

光遺伝学を用いた実験

-1 Thy1ChR2 を使用した刺激実験

光刺激時に排尿圧の上昇を認めた。この現象は野生型マウスでは見られなかった。

-2 CaMK -ChR2 を使用した刺激実験

ACC に限局して ChR2 を発現させた野生型マウスに対する光刺激でも同様に、光刺激により排尿圧を上昇させたことを確認した。

-3 PV-Cre マウスを使用した実験

PV ニューロンに選択的に ChR2 を発現させ光刺激を行ったところ排尿間隔を延長した。

ACC 内における排尿領野の探索

ACC 内を 9 か所刺激し、その反応を確認した。内側で排尿圧上昇率が高い傾向だった。

PAG との関連

Thy1ChR2 マウスの ACC へ光刺激を行うと排尿圧が上昇したが、この効果は PAG へムシモールを投与すると低下した。

【考察】

これらの研究をまとめると ACC は PAG との間に経路が存在しており、ACC の非選択的な電気刺激では排尿を誘導することとなった。さらに GABA 受容体に着目し、ムシモールとピクロトキシンを使用したところ、ピクロトキシンでは電気刺激と同様に排尿反射を出現させ、一方ムシモールは排尿反射を抑制する方向へ作用した。さらにどのニューロンがこの作用を持つのかを調べるために光遺伝学を使用した。興奮性ニューロンに ChR2 を発現させたマウスに対し光刺激を行うと排尿反射が誘発された。この刺激は電気刺激と比較し鋭敏にかつ再現性の高い刺激実験であることが確認された。CaMk2 に着目し ACC の興奮性ニューロンに限定して活性化させたところ

Thy1ChR2 の実験結果と同様でありこのことから ACC の興奮性ニューロンの活性化が排尿の確立に重要な役割を担っていることが明らかになった。一方抑制性ニューロン的一种である PV ニューロンを選択的に興奮させた場合には排尿は抑制方向に作用した。以上のことから ACC 領域の神経活動が排尿に重要な役割を担うことが明らかになった。さらにこの遠心性刺激が PAG にムシモールを投与することで減弱することから ACC は PAG を経由して排尿を確立させていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takanori Mochizuki
2. 発表標題 Search for micturition area in cerebral cortex of Thy1ChR2 mice with using optogenetics
3. 学会等名 EAU 2020 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月 孝規
2. 発表標題 排尿に関与する ACC 興奮性ニューロン神経活動の重要性：他大脳皮質領野との比較
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 望月 孝規
2. 発表標題 中脳水道周囲灰白質 (PAG) からの排尿に関与する大脳内投射経路の探索
3. 学会等名 第27回 排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月 孝規, 真仁田 聡, 池添 貢司, 古谷 泰久, 志村 寛, 井原 達矢, 吉良 聡, 中込 宙史, 澤田 智史, 三井 貴彦, 喜多村 和郎, 武田 正之
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Mochizuki, Satoshi Manita, Takahiko Mitsui, Kazuo Kitamura, Masayuki Takeda
2. 発表標題 Fiberphotometry and optogenetics as novel technologies revealed regulatory function of the mouse anterior cingulate cortex
3. 学会等名 AUA 2019 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori M, Manita S, Mistui T, Kitamura K, Takeda M
2. 発表標題 Search for voiding function in mouse ACC using optogenetics
3. 学会等名 ICS 2019 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月 孝規, 真仁田 聡, 喜多村 和郎, 志村 寛史, 井原 達矢, 吉良 聡, 中込 宙史, 澤田 智史, 古谷 泰久, 三井 貴彦, 武田 正之
2. 発表標題 排尿に関わる前帯状回の機能：マウス大脳前帯状回周囲マッピングおよびC a M k 依存性アデノ随伴ウイルスを利用した光遺伝学の応用
3. 学会等名 第26回排尿機能学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mochizuki T., Manita S., Mitsui T., Kitamura K., Takeda M.
2. 発表標題 Search for micturition area in cerebral cortex of Thy1ChR2 mice with using optogenetics
3. 学会等名 EAU 2020 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 望月孝規	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ライフメディコム	5. 総ページ数 86
3. 書名 カレントセラピ	

〔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
---------	---------