

令和 5 年 4 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17054

研究課題名（和文）光遺伝学と逆行性トレーサーを用いた排便中枢の同定および役割の解明

研究課題名（英文）Identification and role of defecation centers using optogenetics and retrograde tracer

研究代表者

田中 義将（Tanaka, Yoshimasa）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50869112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまで脳排便中枢の局在や役割については逆行性トレーサーを用いて排便中枢候補が複数箇所想定されてはいたものの、同部の機能的役割については技術的限界のために電気刺激や薬理的刺激に寄るものしかなく、ほとんど詳細には解明されていなかった。本研究においては逆行性トレーサーと近年新しく生み出された技術である光遺伝学的手法を駆使することで排便中枢候補の神経操作をより特異的に行うことが可能となり、排便を引き起こす機序の一端を解明することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

排便は直腸平滑筋および肛門括約筋の協調運動により行われる。しかし、それらの障害により起こる便秘は、生活の質に影響を及ぼすとともに近年、循環器疾患と脳血管疾患のリスク要因となり、生存率とも相関することが報告されている。直腸平滑筋や肛門括約筋の収縮・弛緩には神経系の関与が報告されているが、排便中枢の局在や役割など未だ不明な部分が多い。本研究にて脳排便中枢の局在や役割の解明を行うことは慢性便秘症の新規治療法の開発の糸口にも繋がる重要な研究であると考えられる。

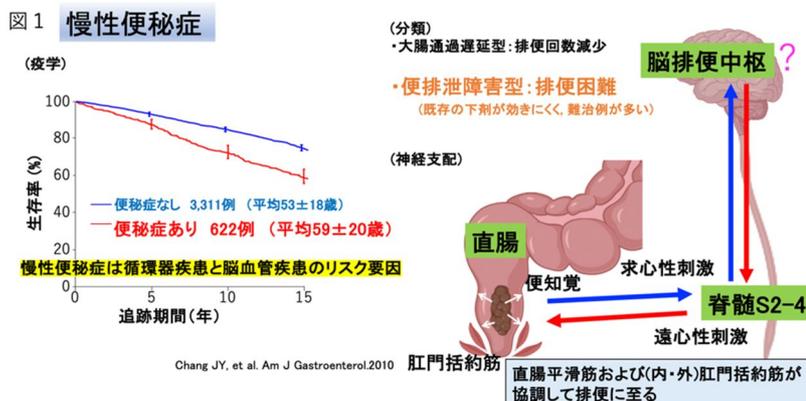
研究成果の概要（英文）：Although the localization and role of the defecation center in the brain have been studied using retrograde tracers, the functional role of the defecation center has not been elucidated in detail due to the technical limitations of electrical and pharmacological stimulation. In this study, by using retrograde tracers and newly developed optogenetics, we were able to specifically manipulate the defecation center candidates and elucidate part of the mechanism that causes defecation.

研究分野：消化器内科

キーワード：排便中枢

### 1. 研究開始当初の背景

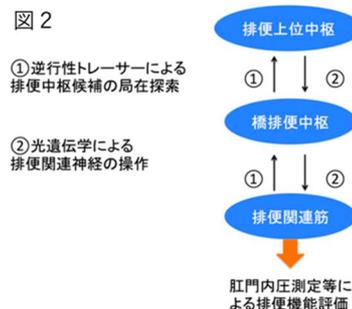
(1) 慢性便秘症は循環器疾患と脳血管疾患のリスク要因であることが知られ、便秘症患者は有意に生存率が下がることが報告されており、近年排便の詳細な機序を追求する必要性が増してきている。慢性便秘症は本邦では細かく分類されるが国際的には大腸通過遅延型と便排泄障害型に大別される。約 1/4 を占めると考えられている便排泄障害型の病態を考慮する際に不可欠な直腸平滑筋及び肛門括約筋の協調運動を司る脳排便中枢の詳細に関してはまだ分かっていないのが現状である (図 1)。



(2) 脳排便中枢の局在についての既報において、経時的に逆行性感染する仮性狂犬病ウイルス (PRV) をラットの遠位結腸領域に注入したところ PRV 標識ニューロンが橋バリントン核 (Bar) 青斑核 (LC) に確認されたと報告されている (Valentino RJ, et al. J Comp Neurol. 2000)。しかし、それらの機能的役割までは解明されていない。また、別の既報ではバリントン核をグルタミン酸で刺激したところ刺激に応じて腸管内圧や神経放電量が上昇したとされているが、薬剤投与によるものであり特異性には問題が残っていた (Pavcovich LA, et al. Brain Res. 1998)。

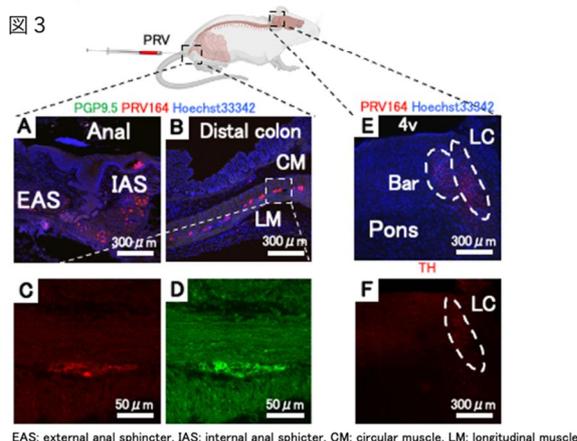
### 2. 研究の目的

これまでの研究においては排便中枢の局在やその中でもいずれの神経が腸管運動に対してどのような役割を持っているかについては未だ不明な点も多い。そこで、本研究の目的は逆行性トレーサーを用いて排便中枢の同定を行い、その結果を元に光遺伝学による排便関連神経を操作し、肛門内圧測定等により排便関連筋の評価を行うことで排便中枢の役割を解明することである (図 2)。



### 3. 研究の方法

(1) 肛門への PRV 注射による排便中枢候補の同定  
図 3 のように継時的に逆行性感染を起こす PRV を肛門に注射することにより筋層間神経層への感染が認められた。継時的に中枢神経への感染状況を観察することで排便中枢候補の同定を行う。



(2) 排便中枢への ChR2 発現および光照射による肛門内圧の測定および排便状況の確認  
(1) の実験より得られた排便中枢候補に対して光遺伝学的手法を用いることで排便に対する機能的意義を解明する。その際に排便中枢候補に特異的に発現する遺伝子改変マウスを用意する。また、評価方法として内圧測定プローブを挿入し、遠位結腸内圧を測定するとともに肛門よりビーズを挿入しその排泄時間を測定する。

(3) (1) の実験より得られた排便中枢候補に対して PRV 投与による排便上位中枢の特定および光遺伝学的手法を用いた排便に対する機能的意義の解明  
(2) の実験に引き続き、さらなる排便上位中枢の同定および機能的役割の解明を行う。遺伝子改変マウスに対して (1) の実験より得られた排便中枢候補に対して PRV 注射を行い、(1) の結果と合わせることで排便上位中枢を同定する。上位中枢候補部位への光遺伝学および同時に肛門内圧測定、排便状況の確認を行うことで上位中枢の局在、役割を明確にする。

### 4. 研究成果

(1) 肛門への PRV 注射による排便中枢候補の同定

PRV は図 4 のように感染が多領域において確認されたが特に LPGi, vIPAG, PVH に多数確認された。また、既報においては Bar, LC が排便中枢として機能するとして報告が散見されるが今回の実験においても同様に多数確認された。そこで、まずは Bar, LC に対して光遺伝学的手法を用いて排便に対する機能的意義の解明することとした。Bar, LC における構成ニューロンは両者はいずれも VGLuT2 陽性ニューロンで占められており、また、Bar は 40% が CRH 陽性ニューロン、LC はそのほぼ全てが TH 陽性ニューロンであることが報告されている (Hou XH, et al. Cell. 2016, Verstegen AMJ, et al. J Comp Neurol. 2017, Aghajanian GK, et al. Brain Res. 1977)。そこで今回、Bar に対しては CRH と VGLuT2 を、LC に対しては TH と VGLuT2 をターゲットとして遺伝子改変マウスを用意した。また、評価方法として内圧測定プローブを挿入し、遠位結腸内圧を測定するとともに肛門よりビーズを挿入しその排泄時間を測定することとした。

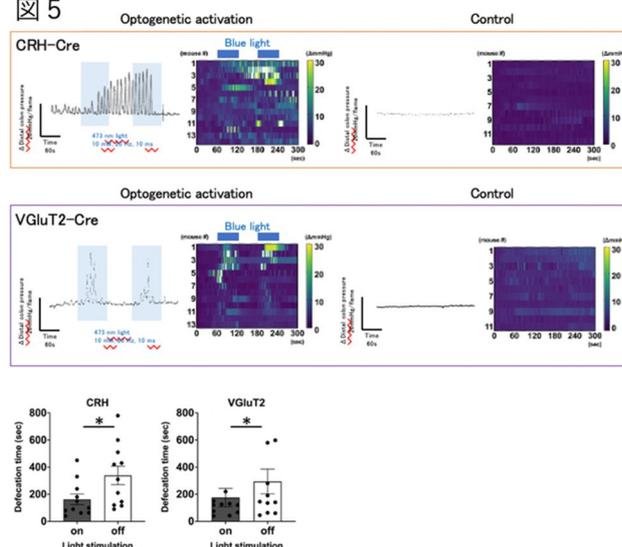
図 4 Number of PRV+ cells (n=4)



(2) 排便中枢への ChR2 発現および光照射による肛門内圧の測定および排便状況の確認 (図 5)

まず、CRH-cre マウスのバリントン核に AAV を用いてチャンネルロドプシンを発現させた。この AAV が感染した神経細胞は肛門から注射した PRV 感染細胞と同一であった。このマウスに光刺激を行うと遠位結腸内圧の上昇が確認された。ただし、この内圧上昇のタイミングと光刺激のタイミングはこの緑の矢印のように個体によりばらつきが存在するとともに光刺激終了後も内圧上昇が複数回にわたって繰り返される傾向が認められた。

図 5



次に VGLuT2-cre マウスの Bar, LC に AAV を用いてチャンネルロドプシンを発現させた。この AAV が感染した神経細胞は肛門から注射した PRV 感染細胞と同一であった。このマウスに光刺激を行うと遠位結腸内圧の上昇が確認された。CRH-cre マウスとは異なり、この内圧上昇のタイミングと光刺激のタイミングはほぼ一致する傾向にあり光刺激しない状況では内圧上昇も認められない傾向であった。

ビーズ排出時間の結果も合わせると、CRH/VGLuT2

cre マウスに対する光刺激は遠位結腸内圧上昇・排便時間短縮を認め、CRH/VGLuT2 活性化が排便に関与することが示唆された。一方、同様に TH cre マウスに対する光刺激をしたところ遠位結腸内圧不変・排便時間不変であり、TH 活性化は排便に影響しないことが示唆された。以上より排便中枢として機能するのは LC ではなく、Bar であり、その CRH と VGLuT2 発現ニューロンが排便に関与すると考えられた。

さらに CRH-cre マウスと VGLuT2-cre マウスに対する光刺激への反応を光刺激後の内圧上昇までの時間や内圧上昇回数等にて比較した。CRH-cre マウスへの光刺激した際の方が内圧上昇までかかる時間が有意に長く、刺激後の収縮回数も増加した。

以上より Bar-CRH の刺激では遅延型かつ持続性の腸管収縮が認められ、排便開始後の持続的な蠕動に関与していることが示唆される一方で、Bar-VGLuT2 の刺激では即時型かつ非持続性の腸管収縮が認められ、排便開始時の蠕動に関与していることが示唆された。

(3)(1) の実験より得られた排便中枢候補に対して PRV 投与による排便上位中枢の特定および光遺伝学的手法を用いた排便に対する機能的意義の解明

Cre 依存的に感染を引き起こす PRV を用いて排便上位中枢候補が挙げられている。同排便上位中枢に対して現在、光遺伝学的手法を用いて局在および機能的役割の解明を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佛坂孝太, 田中義将, 伊原栄吉, 小川佳宏
2. 発表標題 光遺伝学的手法を用いた排便中枢の同定及び役割の解明
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中義将, 佛坂孝太, 伊原栄吉
2. 発表標題 光遺伝学的手法による排便中枢の局在および役割の検討
3. 学会等名 第24回日本神経消化器病学会
4. 発表年 2022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
---------	---------