

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462436

研究課題名(和文)neuromodulation：神経可塑への作用は過活動膀胱の新治療となり得るか

研究課題名(英文)A preliminary study of neuronal plasticity on neuromodulation in rats

## 研究代表者

松田 陽介 (MATSUTA, Yosuke)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：90345687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では雌性Sprague-Dawleyラットで一側中大脳動脈塞栓術による脳梗塞モデルと胸髄離断による脊髄損傷モデルを作製し、左側脛骨神経に設置したカフ電極から5ヘルツ、200μ秒幅のパルス波による電気刺激を1日1回30分間、連続して行った。それぞれのモデルで刺激開始時期をかえて比較を行った。覚醒下での膀胱内圧測定を実施したが、脳梗塞モデル、脊髄損傷モデルとも有意な蓄尿機能の改善を認めなかった。このため、中枢神経での神経可塑性に関わる遺伝子の発現、神経伝達物質の評価は行われなかった。

研究成果の概要(英文)：Female Sprague-Dawley rats were used in this study. The effect of unilateral electrical stimulation (ES) on neurogenic storage dysfunction model was investigated. We used two models of neurogenic storage dysfunction. Cerebral infarction (CI) model was made by an unilateral embolization of middle cerebral artery, and spinal cord injury (SCI) model was made by a transection of spinal cord at the level of T7/8. Stimulation was set as 5 Hz and 200 μsec bipolar pulse wave according to the previous study. Peripheral somatic nerve was stimulated via a cuff electrode implanted around the left tibial nerve. Cystometric study revealed no significant changes in spite of the initiation of ES. Therefore, we did not investigate neurotransmitters and gene expression concerning neuronal plasticity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Neuromodulation 脛骨神経 神経可塑性 神経伝達物質 過活動膀胱

## 1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱 (overactive bladder; OAB) では病的な排尿反射亢進により蓄尿障害をきたすが、従来の行動療法、薬物療法 (抗コリン薬、 $\alpha$ アドレナリン受容体作動薬) では十分な治療効果が得られているとは言い難い。このような難治性 OAB に対して末梢体性神経電気刺激による神経変調療法 (neuromodulation therapy) の有効性が報告されているが、その作用機序に関しては十分に理解されていない。研究代表者は動物実験モデルによる末梢体性神経電氣的刺激と神経伝達物質についての研究から、求心性刺激の modulation が作用の本質と考えている。その作用の場として、脊髄後角での膀胱求心性神経線維から二次ニューロンへの侵害刺激伝達の遮断、あるいは更に上位中枢での求心性知覚に対する処理の変化を推測している。これまでの実験結果から、陰部神経電気刺激による排尿反射抑制作用は複数の神経伝達物質を介する複雑な機構からなると考えられる一方で、脛骨神経電気刺激の作用は内因性オピオイド受容体を介したシンプルな機構からなると考えられ、神経変調療法の作用機序に関する研究をこれまでとは異なった視点から始めるために適すると考えた。また、実際の臨床での治療でも後脛骨神経電気刺激は治療効果の持続がみられ、治療頻度の減少が可能であることが知られており、排尿反射回路のシグナル伝達の変容が推測されている。

神経細胞の活動に依存して神経の性質が変化することを「可塑性」と呼ぶ。可塑性を獲得した回路では永続的な活動の変化を生じ、いったん完成した可塑性を完全に取り崩すことは困難である。しかしながら完成までの経過において、神経系のシグナル抑制がその後の可塑性を恒久的に遮断できる可能性がある。ラット脳梗塞モデルでは橋背外側被蓋においてグルタミン酸 NMDA 受容体や COX-2 を介した神経可塑性により排尿反射の亢進が持続し、これらの阻害薬により長期間の抑制効果が得られることが知られている。

我々は中枢神経系におけるシグナル抑制のストラテジーとしての神経変調療法に注目し、脛骨神経電気刺激のような末梢神経刺激がこのような可塑的变化 (排尿反射の亢進) の構築を抑制し得るのではないかと仮定した。可塑性の発現部位や時期を明らかにすることも、OAB 発生の病理の理解や新たな治療手段の開発に有用であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は末梢神経の電氣的刺激が排尿反射経路、特に脊髄より中枢において作用する部位を明らかにすることを目的とし、神経可塑性関連遺伝子や長期増強に関わるタンパク質の定量を通じて神経可塑性の発現や遮断が生じる時期についても明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は福井大学の animal care and use committee の承認を得た上で実施され、すべての実験に雌性 Sprague-Dawley ラットを使用した。

実験モデル作成はハロセン麻酔下に行った。

脳梗塞モデル：左外頸動脈、左翼突口蓋動脈を結紮し、左内頸動脈から先端を鈍化させた 4-0 ナイロン糸を挿入し左中大脳動脈塞栓を作製した。左側脛骨神経にカフ電極を設置し、1回 30分、5ヘルツ、200 $\mu$ 秒幅の刺激条件で電気刺激を脳梗塞作成前1時間、作成後 0.5、1、3時間の時点で行う群を作製した。左中大脳動脈塞栓後5時間の時点で実験動物をボールマンケージ内に拘束し、膀胱頂部より挿入したポリエチレンカテーテル (PE-50) より生理食塩水を 0.04 ml/分 で注入し、覚醒下で膀胱内圧測定を行った。

脊髄損傷モデル：第 7、8 胸椎で椎体後面を切除し、直視下に胸髄をマイクロ剪刀で離断し作製した。切断部に止血材を充填し閉創した。手術後より排尿反射が回復するまでの間、1日2回のクレーデ排尿を連日実施した。脊髄損傷作成時に左側脛骨神経にカフ電極を設置し、1回 30分、5ヘルツ、200 $\mu$ 秒幅の刺激条件での電気刺激を脊髄損傷作成前1週間、作製直後、1週間後から1日1回30分間、連日行う群を作製した。脊髄損傷作成時の4週後に、実験動物をボールマンケージ内に拘束し、膀胱頂部より挿入したポリエチレンカテーテル (PE-50) より生理食塩水を 0.04 ml/分 で注入し、覚醒下で膀胱内圧測定を行った。

本研究では病態動物モデルにおける末梢神経電氣的刺激が作用する部位と神経可塑性の構築抑制が生じていることを明らかにすることを目標にしており、脳梗塞モデル、脊髄損傷モデルにおいて下記の項目を調べることとした。

(1) 末梢神経電気刺激後の膀胱内圧測定パラメータの変化を調べる：電気刺激を開始するタイミングを変え、疾患作成後の排尿反射亢進に伴う膀胱容量、膀胱内圧、non-voiding contraction (NVC) 等に及ぼす作用を調べる。

(2) 神経可塑性関連因子の発現量を定量し、可塑性発現の部位、時期を調べる：排尿反射に関わる中脳水道周囲灰白質、橋背外側被蓋、腰仙髄 (L6-S1) の組織を切採し、神経可塑性関連遺伝子 (c-fos, zif 268, c-jun)、長期増強関連タンパク質の brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、tissue plasminogen activator (tPA) の転写、発現量の変化を調べる。

(3) 末梢神経電気刺激後の神経可塑性関連因子の発現量を定量し、可塑性阻害を検証する：疾患作成前と後に電気刺激の時期を変え、

中脳水道周囲灰白質、橋背外側被蓋、腰仙髄(L6-S1)組織中のc-fos, zif 268, c-jun, BDNF, tPA 転写、発現量の変化を調べ、電気刺激の可塑性へ及ぼす作用、可塑性が完成する時期を明らかにする。

(4) 電気刺激後の中枢神経における神経伝達物質の変化を定量的に調べる：末梢体性神経電気刺激後の腰仙髄(L6-S1)におけるエンケファリン、グリシン、ガンマアミノ酪酸(gamma-aminobutyric acid; GABA)などの神経伝達物質量をELISA法で定量する。

数値は平均値±標準誤差で表示した。統計学的計算にはGraphPad社PRISM® Version 6.01を使用した。

#### 4. 研究成果

脳梗塞モデル：当初は、過去の実験手法をもとにmotor thresholdの2倍以上の刺激強度で脛骨神経電気刺激を試みたが、ラットの体動が大きく、安定した膀胱内圧測定が困難であったため、motor thresholdとほぼ同じ強度に変更して刺激を行った。中大脳動脈塞栓後のラットの平均膀胱容量は $0.32 \pm 0.02$  ml ( $0.24 \sim 0.51$  ml)、平均最大排尿収縮圧は $27.9 \pm 1.0$  cmH<sub>2</sub>O ( $20.3 \sim 34.2$  cmH<sub>2</sub>O)であった。中大脳動脈塞栓作成前、作成後0.5時間、1時間、3時間で脛骨神経電気刺激を開始した群(n=4ずつ)で比較を行ったが、膀胱容量(それぞれ $0.29 \pm 0.02$ ,  $0.34 \pm 0.06$ ,  $0.31 \pm 0.03$ ,  $0.33 \pm 0.03$  ml)、最大排尿収縮圧(それぞれ $28.9 \pm 1.2$ ,  $28.6 \pm 2.0$ ,  $27.5 \pm 2.7$ ,  $26.7 \pm 2.4$  cmH<sub>2</sub>O)に有意差を認めなかった。どの群でも膀胱内圧測定時に残尿を認めなかった。研究計画では、ラット中大脳動脈塞栓モデルの排尿中枢での神経可塑性に関わる遺伝子の発現、中枢神経系での神経伝達物質を評価する予定であったが、脊髄損傷ラットにおける膀胱内圧測定上の脛骨神経電気刺激の作用を示すことができず、脛骨神経電気刺激が不随意収縮や排尿反射の回復に影響するという仮説も裏付けることができなかった。このため中枢神経系での神経可塑性についての評価を実施しなかった。

脊髄損傷モデル：脊髄損傷後のラットの平均膀胱容量は $1.02 \pm 0.05$  ml ( $0.8 \sim 1.24$  ml)、平均のnon-voiding contraction (NVC)数は $5.6 \pm 0.7$ 回(2~9回)、平均最大排尿収縮圧は $54.9 \pm 1.8$  cmH<sub>2</sub>O ( $46.1 \sim 63.9$  cmH<sub>2</sub>O)であった。脊髄損傷作成前1週間、脊髄損傷作成直後、脊髄損傷作成後1週間に脛骨神経電気刺激を開始した群(n=3ずつ)で比較を行ったが、膀胱容量(それぞれ $1.16 \pm 0.06$ ,  $0.96 \pm 0.08$ ,  $0.93 \pm 0.05$  ml)、NVC数(それぞれ $6.3 \pm 0.3$ ,  $3.3 \pm 0.9$ ,  $7.0 \pm 1.2$ 回)、最大排尿収縮圧( $58.7 \pm 2.8$ ,  $49.1 \pm 2.0$ ,  $56.8 \pm 1.5$  cmH<sub>2</sub>O)に有意差を認めなかった。研究計画では、ラット胸髄離断(脊髄損傷)モデルの排尿中枢での神経可塑性に関わる遺伝子の発現、中枢神経系での神経伝達物質を

評価する予定であったが、脊髄損傷ラットにおける膀胱内圧測定上の脛骨神経電気刺激の作用を示すことができず、脛骨神経電気刺激が不随意収縮や排尿反射の回復に影響するという仮説も裏付けることができなかった。このため中枢神経系での神経可塑性についての評価を実施しなかった。

今回の研究結果では脛骨神経電気刺激が病的な神経可塑性の抑制により蓄尿機能障害を改善させることを示せなかった。脛骨神経電気刺激は作用機構がシンプルである反面、より近位に存在する仙骨神経や陰部神経の電気刺激より作用が弱い可能性が考えられる。この他、排尿反射回路が保たれている急性期実験では5 Hz、200 μ秒のパルス波が有効であったが、病的モデルでは異なる刺激条件が必要であった可能性も考えられる。ヒトにおける臨床研究では脳卒中後や多発性硬化症に伴う神経因性排尿筋過活動にも脛骨神経電気刺激の有用性が示唆されているが、本研究において同様の効果は実証できなかった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Y.Matsuta : Editorial comment to differences in neurotransmitter systems of ventrolateral periaqueductal gray between the micturition reflex and nociceptive regulation: An in vivo microdialysis study. Int J Urol. 2016, 23:598 査読有.

[学会発表](計8件)

松田 陽介 : 脳内アセチルコリンと膀胱機能, 第23回日本排尿機能学会, 20161207, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

松田 陽介, 品川 友親, 岡田 昌裕, 青木 芳隆, 伊藤 秀明, 横山 修 : 難治性過活動膀胱に対する経皮的末梢神経刺激の効果についての検討, 第452回日本泌尿器科学会北陸地方会, 20160618, ホテル金沢(石川県金沢市)

Y.Matsuta, N.Hashimoto, Y.Aoki, H.Akino, O.Yokoyama : Low-frequency transcutaneous electrical stimulation of foot can be a novel home-based treatment for refractory OAB, AUA Annual Meeting 2016, 20160509, San Diego (USA)

Y.Matsuta, B.Shen, J.Roppolo, W.deGroat, O.Yokoyama, C.Tai : Hippocampal Microstimulation Inhibits Micturition Reflex in Urethane-Anesthetized Rats, ICS2014, 20141022, Rio de Janeiro (Brasil)

Y.Matsuta, B.Shen, J.Roppolo, W.deGroat,  
O.Yokoyama, C.Tai : Microstimulation of  
hippocampus inhibits micturition reflex  
in urethane-anesthetized rats, The 34th  
Congress of the SIU, 20141013, Glasgow  
(UK)

松田 陽介, 横井 聡始, 橋本 儀一,  
青木 芳隆, 秋野 裕信, 横山 修 : 難治  
性過活動膀胱患者が自宅で実施できる  
neuromodulation therapy の開発, 第 21 回  
日本排尿機能学会, 20140918, 岡山コンベン  
ションセンター (岡山県岡山市)

Y.Matsuta, B.Shen, J.Roppolo, W.deGroat,  
O.Yokoyama, C.Tai : Microstimulation of  
hippocampus inhibits micturition reflex  
in urethane-anesthetized rats, AUA  
annual meeting 2014, 20140516, Orlando  
(USA)

松田 陽介, 横山 修 : 中枢作用に注目し  
た蓄尿障害治療法の開発, 第 102 回日本泌  
尿器科学会総会, 20140425, 神戸国際会議  
場、他 (兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/search/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 陽介 (MATSUTA, Yosuke)

福井大学・学術研究院医学系部門 (附属病  
院部)・講師

研究者番号 : 90345687

### (2) 研究分担者

横山 修 (YOKOYAMA, Osamu)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号 : 90242552