

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学大学院総合研究部医学域	
職名・氏名	学部内講師	志村 寛史 印

1 研究テーマ

前帯状皮質における排尿蓄尿機能の役割：
TRAP を用いた基礎的研究と MRS を用いた臨床的研究

2 研究の目的

排尿や蓄尿に関わる中枢神経のメカニズムはその多くが未解明であった。これまで研究代表者らは大脳の前帯状皮質 (Anterior cingulate cortex; ACC) などをターゲットとしてそのメカニズムを遺伝子操作の技術を用いていくつの成果を挙げている。ACC の興奮性の細胞のみを刺激すると排尿誘発、抑制性の細胞のみを刺激すると排尿抑制することや、ACC には排尿に関連する細胞としない細胞が混在していることを示してきた。今後、中枢神経をターゲットとして排尿や蓄尿を制御するには、より細胞選択性の高い(排尿に関わる細胞のみ)操作や、実際にヒトでの神経生理の動態を確認していく必要がある。そこで、排尿時に活動する神経細胞のみを操作する基礎研究と、健常成人における ACC の蓄尿時排尿時の活動を観察することを目的とした。

3 研究の方法

1. TRAP を用いた基礎的研究

TRAP (targeted recombination in active populations) は遺伝子導入の手法の 1 つであり、特定の活動 (本研究では排尿) 時に活動依存的遺伝子である cFos が上昇することを利用し、そのような細胞のみに特定の遺伝子を導入させることができる。当初はこれによって、排尿関連細胞のみを光遺伝学や化学遺伝学の手法で選択的に操作しうるか検証予定であった。しかし、事情により本年度中にその検証が行えず、化学遺伝学的操作を TRAP を用いないレベルで実行できるかの予備実験に費やした。

1' ACC を対象とした化学遺伝学的操作での排尿制御

野生型マウスの両側 ACC に AAV (抑制性の DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs)) を注入し、4 週間タンパク質発現期間をとる。代謝ケージに移し、2-3 日観察。腹腔内に CNO 投与し、排尿間隔が延長するか確認。AAV が購入後入手に時間がかかったためさらにその予備実験を進めた。

1' -1. コントロールマウスでの代謝ケージでの排尿データ収集。

1' -2. DREADD が機能するのか確認する実験。その Positive control としてまず DREADD の発現していないマウス ACC にムシモール (抑制性神経伝達物質 GABA 作動薬) を注

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

入り、排尿間隔の延長がみられるか検証する。

2. MRS を用いたヒトの排尿前後の神経伝達物質測定～健常男性による pilot study～
magnetic resonance spectroscopy (MRS) は、非侵襲的に標的となる領域の特定の代謝物質を定量化することができ、精神神経学領域では診断や薬物の効果判定に用いられている。排尿前後の神経伝達物質(興奮性のグルタミン酸系神経伝達物質と抑制性である GABA)を測定し、健常人での動態を確認する。

①対象：20～60歳の下部尿路機能に明らかな異常を認めない男性

②MRI 撮像方法：1名に対し排尿前と排尿後の2種のフェーズで MRS および脳血流測定

ボクセルは ACC に 7.5mL ($2.5 \times 1.5 \times 2.0 \text{ cm}^3$) で配置する(右図)。



4 研究の成果

1. TRAP を用いた基礎的研究

1' -1. コントロールマウスでの代謝ケージでの排尿データ収集

WT マウスの ACC に色素を注入(後に ACC に注入されていることを確認)

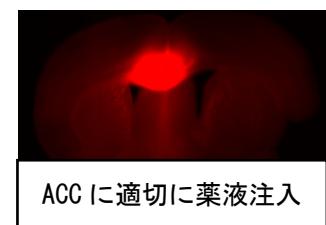
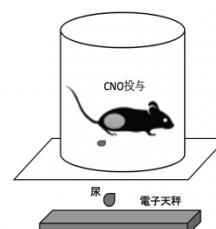
代謝ケージにて 2-3 日間の排尿状況を

確認(高性能電子天秤にて尿量測定)

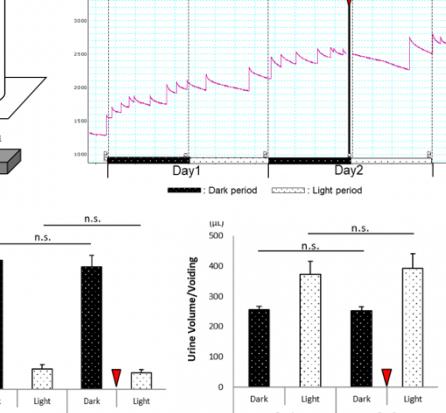
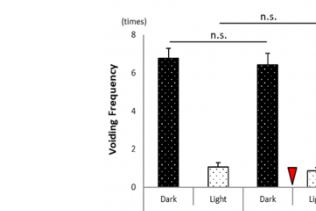
その途中で CNO 投与

投与前後で尿回数や 1 回排尿量の有意な変化はなかった。

CNO 自体は尿回数や蓄尿量に変化を与えないことが確認できた。



ACC に適切に薬液注入



1' -2. DREADD が機能するのか確認する実験

WT マウスを使用し、麻酔下に膀胱瘻造設

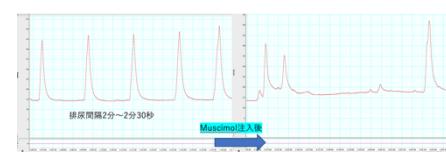
生食にて膀胱還流し膀胱内圧測定を実施

排尿や膀胱内圧が安定したところで、ACC にムシモールを注入

現時点で数匹のみの検討で統計学的解析に至ってい

ないが、ACC に抑制性の神経伝達物質を注入すると排尿間隔は延長したものと、変化が乏しいものがみられた。

非選択的に ACC 全ての神経細胞を抑制すると、排尿は抑制されるとも限らない。



留意事項

① 3枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

2. MRS を用いたヒトの排尿前後の神経伝達物質測定～健常男性による pilot study～ 報告時点までで、対象者 17 例の MRS の撮像を終えている。

右図は対象者の 1 例で、蓄尿期と排尿後の 2 期でそれぞれ ACC の GABA とグルタミン酸の定量を行うことができている。外れ値を除いたデータで排尿前後で t 検定を行った。

グルタミン酸: 6.27 から 1.13 (p=0.119)

GABA: 1.89 から 0.43 (p=0.057)

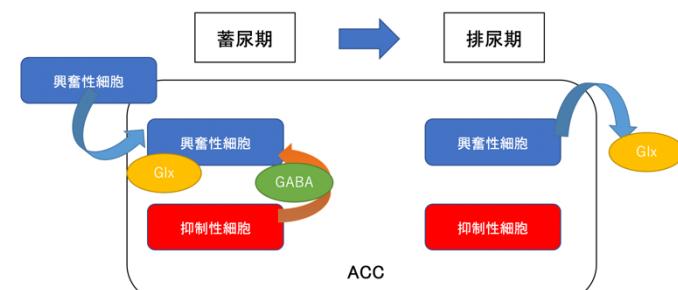
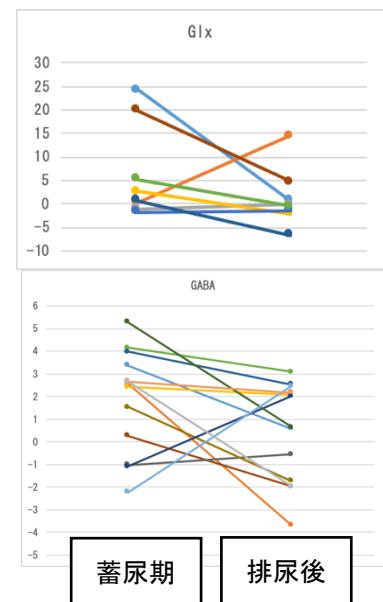
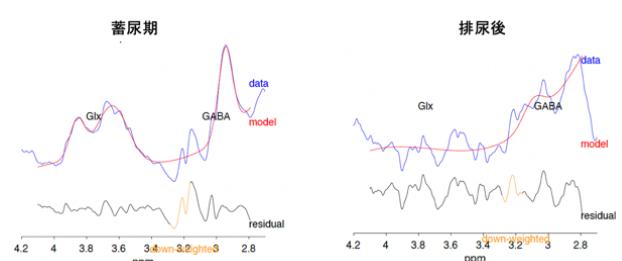
とどちらも有意差はなかったものの蓄尿期と比べて排尿後で低下する傾向が見られた。

一方で症例で多少の変化のばらつきが見られた。

＜解釈/仮説＞

もともと ACC は蓄尿期も排尿期も活動すると想定していた。ACC は大脳皮質であり、抑制性ニューロンはその領域内、興奮性ニューロンはその領域外に軸索を伸ばして神経伝達物質を放出する。

蓄尿期には他部位からの興奮性神経伝達物質が ACC に放出されているが、ACC の抑制性細胞から抑制性伝達物質を放出し下流に排尿命令を出さない状況としている。それが排尿時には抑制性細胞の活動が低下し ACC の興奮性細胞の活動が亢進することで、ACC より下流に興奮性の神経伝達物質を放出しているのではないか。排尿後にいずれの神経伝達物質も低下することも理解しやすい。



5 今後の展望

TRAP を用いた基礎研究は、今回の期間中に TRAP マウスの生育が進まず検証には至らなかった。今後実際に TRAP マウスを用いた検証を進めていく。排尿関連細胞のみを操作することが可能となれば、より副作用を回避した排尿・蓄尿の制御を行う新規治療の開発につなげることができる。

MRS を用いた臨床研究は、今回は有意差が出なかったが、症例を加えて行けばおそらく差が出るのではないかと考える。今後は過活動膀胱患者などでの神経伝達物質の動態も検証し、さらには患者に過活動膀胱治療薬を投与した場合での変化も確認していきたい。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

各種国内・国際学会で発表予定である。データがまとまり次第、論文投稿を行う。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。