

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

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 ㊞

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

頻尿や排尿困難など下部尿路症状 (Lower Urinary Tract Symptom; LUTS) の有病率は、高齢化社会の影響を受け増加傾向にある。従来の薬物治療に抵抗を示す難治症例の原因の多くは排尿を制御する中枢神経の障害が想定される。しかしながら、中枢神経を標的とした研究は末梢臓器における研究と比べ複雑で、その生理学的メカニズムさえ詳細は未解明である。

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以下の成果を挙げている。

①光遺伝学 (optogenetics) にてマウスの ACC の興奮性細胞を刺激すると排尿惹起、抑制性細胞を刺激すると排尿抑制した。

細胞の種類別で異なる役割があることを示した。

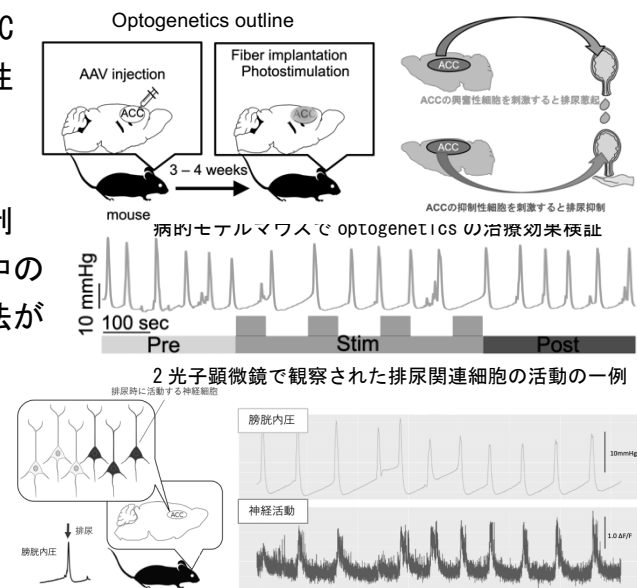
②頻尿モデルマウスを作成し、その ACC 抑制性細胞のみを optogenetics で刺激し、刺激中のみ排尿間隔を遅延した。Optogenetics の手法が治療応用しうることを示した。

③ACC を対象として、2 光子顕微鏡下で排尿時の神経活動を個々の細胞を区別しながら観察し、排尿に関連する細胞とそうでない細胞が混在していることを示した。

④排尿関連細胞は、その細胞の場所や種類、投射経路で機能が異なることを示した。

特に③④から大脳皮質領域では、全体の神経細胞のうち一部の細胞が排尿時に活動するものであることが分かった。つまり、非選択的に操作をしてしまうと、意図しない神経活動を惹起する可能性が高い。排尿関連細胞を限定して“操作”することが今後の課題である。すでに興奮性細胞・抑制性細胞に分けて光遺伝学 (optogenetics) での操作を行い、ACC では興奮性細胞を刺激すると排尿惹起、抑制性細胞を刺激すると排尿抑制となることも確認してきた(①)が、より排尿に限定した操作を目指す。

基礎研究レベルでは、さらに排尿関連細胞のみを操作すべく、TRAP (targeted



recombination in active populations)という手法を用いる (Casey J. G. et al. Neuron, 2013)。

また、ヒトレベルでの検証も行う。これまで functional MRI や PET で神経活動を確認する研究は多々行われてきたが、ACC のように細胞の種類で異なる活動・役割をするのであれば、排尿時と蓄尿時で神経伝達物質の量が異なる可能性がある。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。MRS を用いて神経伝達物質の定量を行い、ヒトでも ACC は排尿蓄尿で異なる神経細胞の活動があるか検証する。

これら成果は、これまでブラックボックスとされ治療対象としては敬遠されていた脳の排尿中枢のメカニズムを解明し、今後の新規治療開発の基盤となるものと考ええる。その結果、難治性の LUTS で低下した QOL を改善することを将来的な展望としている。

3 研究の方法

1. TRAP を用いた基礎的研究

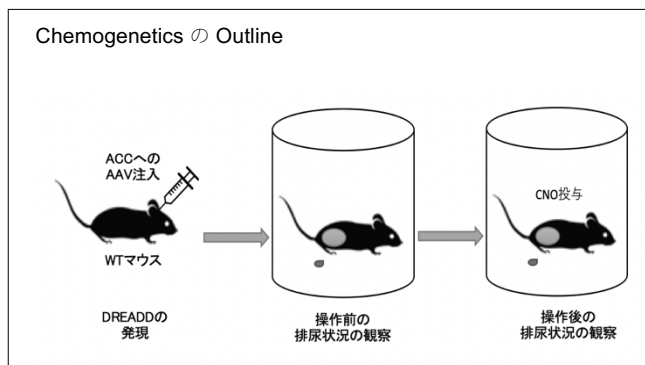
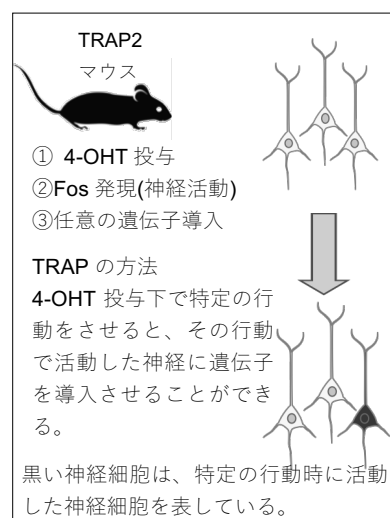
TRAP は遺伝子導入の手法の 1 つであり、特定の活動(本研究では排尿)時に活動依存的遺伝子である cFos が上昇することを利用し、そのような細胞のみに特定の遺伝子を導入させることができる。当初はこれによって、排尿関連細胞のみを光遺伝学や化学遺伝学の手法で選択的に操作しうるか検証予定であった。しかし、事情により本年度中にその検証が行えず、化学遺伝学的操作を TRAP を用いないレベルで実行できるかの予備実験に費やした。

もともと光遺伝学的操作については、興奮性細胞・抑制性細胞それぞれを選択して操作できることを示していたが、化学遺伝学的操作に至っては、そのような細胞選択的に操作が可能か、当講座では未確認であった。TRAP マウスが使用できない 2024 年度中は、化学遺伝学的操作を ACC で行う実験を行った。

1' . ACC を対象とした化学遺伝学的操作での排尿制御

DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) は人工的に合成されたりガンドである

CNO (Clozapine N-oxide) にのみ活性化される人工受容体である。WT (野生型) マウスの ACC に AAV-DIO-hM3D (Gq)-mCherry (Cre 依存的に興奮性の DREADD を発現するアデノ随伴ウイルス)、もしくは AAV-DIO-hM4D (Gi)-mCherry (Cre 依存的に抑制性の DREADD を発現するアデノ随伴ウイルス) を注入する。その 4 週間後に代謝ケージ内で自由行動下の排尿の記録をとる。その際に腹腔内に CNO を投与し、排尿量・排尿間隔の変化を検証する。まずは抑制性の AAV-DIO-hM4D (Gi) にて、抑制性細胞のみを



活動させることで、排尿活動がどのように変化するか観察することとした。

しかし、AAV を購入後、入手までに時間がかかったため、2024 年度中は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

DREADD を発現していないマウス (WT マウスの ACC に AAV ではなく色素を注入) で代謝ケージ下に CNO を投与して排尿の記録を行った。

1' -2. DREADD が機能するのか確認する実験

当講座では DREADD を用いた実験の下地がなく、そもそも DREADD がうまく機能することの検証が必要であった。

Negative control としては、DREADD 発現後に CNO 投与群の対照として生理食塩水投与群を設定する。これは AAV が使用可能となったら実施する。

Positive control としては、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) を注入し、膀胱内圧測定を行い、排尿間隔が延長することを確認する。

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～

MRS は、通常の MRI で水分子を計測しているのに対し、水分子よりもごく微量な分子を測定する磁気を利用した画像検査方法である。今回は、ACC が蓄尿時も排尿時も活動をしているが、興奮性の神経伝達物質 (グルタミン酸系) と抑制性神経伝達物質である GABA がそれぞれ、蓄尿時排尿時でどのような動態をとるか、健常人でのデータを取得することとした。

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

排尿前：蓄尿量 200ml 以上であることを超音波

で、最大尿意に近いことを問診で MRS 前に確認

排尿後：残尿がないことを超音波で確認、排尿後

速やかに撮像

排尿前・排尿後それぞれ 40-50min ずつ①T1 (5-

10min)→②グルタミン酸 (5min)→③GABA (20-

30min)

グルタミン酸系神経伝達物質の測定は ^1H -MRS を使

用する。グルタミン酸は PRESS 法 (TE=35,

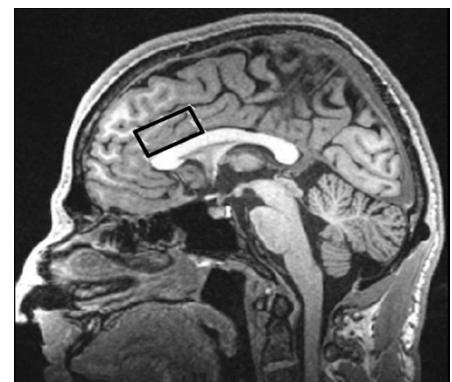
TR=2000) を使用し、ボクセルは ACC に 7.5mL ($2.5 \times 1.5 \times 2.0 \text{ cm}^3$) で配置する (右図)。GABA は HERMES 法 (TE=80, TR=2000) を使用し、ボクセルは ACC に 24mL

($2.0 \times 4.0 \times 3.0 \text{ cm}^3$) で配置する。

同時に脳血流も測定しておく：ASL、IVIM(DWI)、VSRAD (解析用)

③グルタミン酸と GABA を排尿前と排尿後でそれぞれ定量化 (画像解析)

④グルタミン酸と GABA それぞれの排尿前後での変化を比較検討 (統計解析)



4 研究の成果

1. TRAP を用いた基礎的研究

TRAP マウスを購入したものの、その後施設内の管理基準を満たし、さらに生育するまでに時間がかかり 2024 年度中に実験を行うことができなかった。以下は TRAP での実験を行うまでの予備実験の成果である。

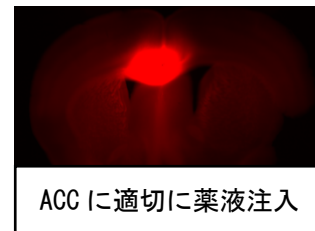
1' -1. コントロールマウスでの代謝ケージでの排尿データ収集 WT マウスの ACC に色素を注入（後に ACC に注入されていることを確認）

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）

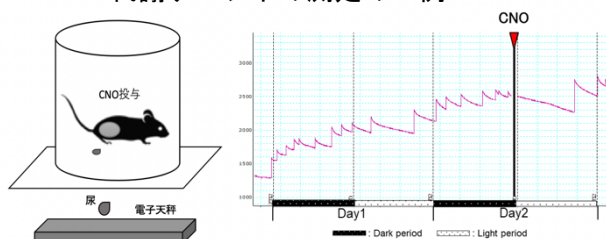
その途中で CNO 投与

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。

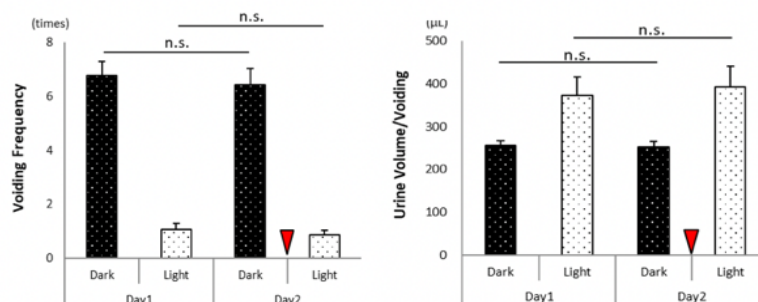
CNO 自体は尿回数や蓄尿量に変化を与えないことが確認できた。



代謝ケージ下の測定の一例



尿回数や 1 回排尿量の変化はなし



1' -2. DREADD が機能するのか確認する実験

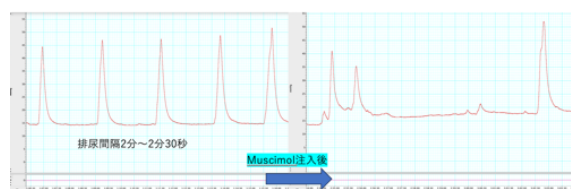
WT マウスを使用し、麻酔下に膀胱瘻造設

生食にて膀胱還流し膀胱内圧測定を実施

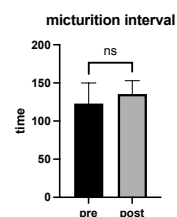
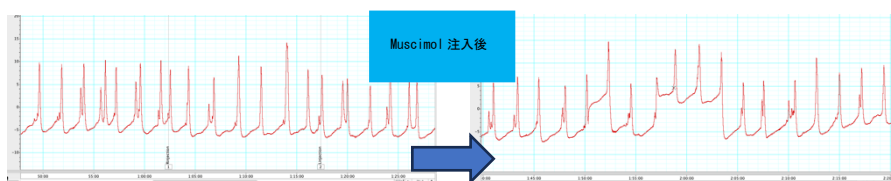
排尿や膀胱内圧が安定したところで、ACC にムシモールを注入

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。

排尿間隔が延長した一例



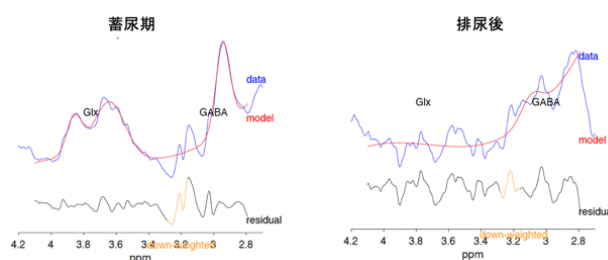
排尿間隔の変化が乏しい一例



本検証は Positive control 目的ではあったが、遺伝子導入の手法を用いない非選択的な抑制方法である。つまり、興奮性細胞、抑制性細胞、もしくは排尿関連・非関連細胞を一緒に抑制している。そのような 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という結果と解釈している。

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～ 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ます。外れ値を除いたデータで排尿前後でも検定を行った。

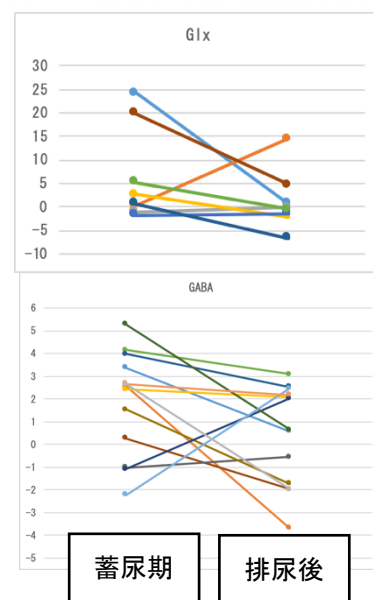


グルタミン酸系 (Glx) : 6.27 から 1.13 ($p=0.119$)

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、症例で多少の変化のばらつきが見られた。



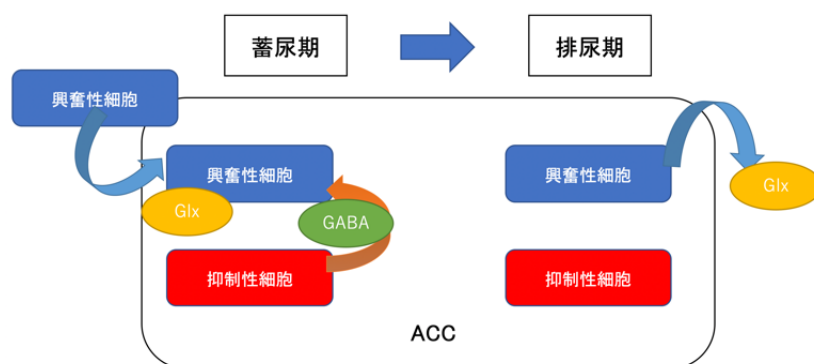
＜解釈/仮説＞

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。

蓄尿期には他部位由来の神経終末から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のではないか。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。このような仮説であれば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 成果のまとめと考察

1. TRAP を用いた基礎的研究

- 本助成金の期間中では TRAP を用いた研究までは実施できなかった。

- そのための予備実験を進めることができ、他年度にて TRAP を用いて本格的に研究が行える。

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～

- 排尿・蓄尿に関わる中枢神経の活動をヒトで脳内の神経伝達物質測定から定量化した世界初の報告である。
- ACC においては蓄尿時から排尿後にかけて、興奮性の神経伝達物質も抑制性の神経伝達物質も低下する傾向が見られた。
- 上記結果から、蓄尿期には他部位由来の神経終末から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という仮説を立てている。

6 当初の予定との差異と今後の課題

本年度はもともと予定していた TRAP マウスの育成に時間を要し、TRAP 技術を用いての排尿関連細胞のみの操作実験は進めることができなかった。現時点で TRAP マウスの育成が済んできており、次年度以降で実施していく。まずは排尿を行った後で、TRAP がうまく work し、排尿関連細胞に遺伝子導入が可能かどうかを検証していく。その後光遺伝学や化学遺伝学を用いて、排尿関連細胞を操作していく。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。その変化や、健常群と疾患群との比較をすることで、神経伝達物質の動態で病態生理を改名することができる。その病態生理から、神経伝達物質のコントロールによる治療法を検討しうる。

7 今後の実社会への貢献

これまで、LUTS の治療は末梢の臓器に作用する薬剤がメインで行われてきた。その要因として排尿における中枢神経の詳細な働きが不明であったこと、また中枢神経への薬物投与や神経変調療法などの治療はほかの中枢神経機能への副作用の懸念が強かったことが挙げられる。本研究が進むことで、ヒトおよび動物での中枢神経における排尿制御のメカニズムがより詳細に明らかになると考えている。さらに、排尿に関連する細胞のみを操作することができるようになると、他の機能を持つ細胞への影響を避けることができ、副作用の少ない治療の礎となり得る。

難治性の LUTS の場合の多くは、頻尿や排尿困難、さらには尿道カテーテルの留置を要し QOL の低下を余儀なくされる。有効な治療法の少ない現在では対症療法が主な治療となってしまうているが、中枢神経をターゲットとした新規治療法が開発されれば、多くの患者

の QOL 向上に寄与しうる。今後さらに高齢化社会が進むと、LUTS の有病率は高くなることが予想され、また頻尿により転倒・骨折のリスクが上昇したり、生産性が低下したりという報告もある。このような社会背景を踏まえても、LUTS を改善させる新規治療法の開発は需要があり、社会にも大きく貢献するものと考ええる。

8 研究の発信方法(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。

9 謝辞

本研究の実施にあたって、ご支援を賜りました山梨県若手研究者奨励事業に深く感謝を申し上げます。