

所属機関名

山梨大学大学院総合研究部医学域

職名・氏名

臨床助教・志村 寛史 ㊞

## 1 研究テーマ

排尿・蓄尿における前帯状皮質のニューロン活動の解明

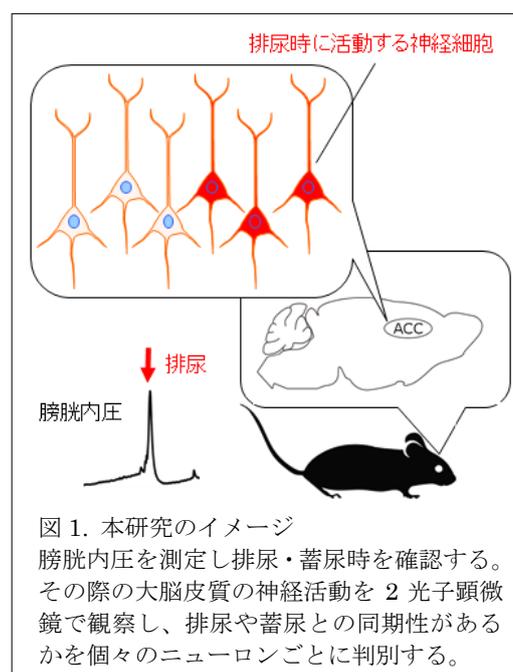
## 2 研究の目的

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。近年は種々の治療薬や神経電気刺激療法などが開発されているが、治療効果が不十分であったり高齢者に対する副作用が懸念されたりする場面も少なくない。実臨床において患者のQOLを改善できないことや、複数の投薬が必要になってしまうことは無視できない問題と考えている。これまでのLUTSの治療は末梢の臓器に作用する薬剤が中心であり、そのような薬物治療に抵抗を示す難治性症例の原因の多くは排尿を制御する中枢神経の障害も想定される。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。中枢神経系の研究は、これまでは薬物投与や電気生理学的手法を用い1つの脳領域を対象にしていたが、今後はその中の個々のニューロンの働きまで明らかにする研究が期待される。

近年は中枢神経の活動を *in vivo* でリアルタイムに観察する手法にカルシウムイメージングが盛んに適用されている。カルシウムセンサーを遺伝子導入させ、場所、細胞の種類、経路を限定することが可能となっている。その中でも2光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングでは、1mmの深さまでは脳表から観察可能であり、さらに領域単位ではなく個々のニューロン単位で観察でき、空間分解能が高い。今回の我々の研究が遂行されれば、排尿・蓄尿に関わるニューロンがどこでどれだけ活動しているか把握することができ、複雑な排尿中枢の全容解明に繋がる。中枢神経が原因とされる難治性下部尿路機能障害の病態解明や治療法開発の端緒となる。

## 3 研究の方法

本研究のイメージ：図1のようにマウス的大脑中枢の領域1つにおいて、神経細胞は多数存在するが、排尿や蓄尿に関わって活動する細胞の他に、別の行動・生理現象に関わる細胞も存在する。これらを1つ1つ区別しながら観察するために2光子顕微鏡の



高い空間分解能が有用である。排尿・蓄尿の区別のために膀胱内圧を測定する。

① 対象脳領域：大脳皮質においてこれまで下部尿路機能への関与が強く示唆されてきた前帯状皮質 (Anterior cingulate cortex; ACC) と一次運動野 (M1) を対象とする。ACC においては投射先と想定される中脳水道灰白質 (periaqueductal gray; PAG) へ投射しているニューロンに限定しての観察も行う。

② マウス：WT (野生型) マウス 10 週齢程度

③ ウイルス注入：カルシウムセンサーを発現させるウイルスを標的領域に注入 (観察 1ヶ月前)。ACC、M1 の全細胞に発現させる場合は AAV-jRGECO1a (図 2) を、ACC-PAG の経路を限定する場合には図 3 のように 2 種類をそれぞれの領域に注入する。

④ 観察：標的領域上の骨を除去し、頭部固定下に 2 光子顕微鏡で神経活動 (カルシウムの動態) を観察

⑤ 膀胱内圧測定：麻酔下で、膀胱に挿入したカテーテルで膀胱内圧を計測しながら、蓄尿・排尿のサイクルを繰り返す。

⑥ 解析：④ (神経活動データ) を取得後に個々の細胞の ROI をとりそれぞれの活動データと⑤ (膀胱内圧データ) との相関をみる。解析ソフトに suite2p を使い、neuropil を除外する際には FISSA のプログラムを用いた。Pearson の相関係数を用いて両者の相関を定量化した。

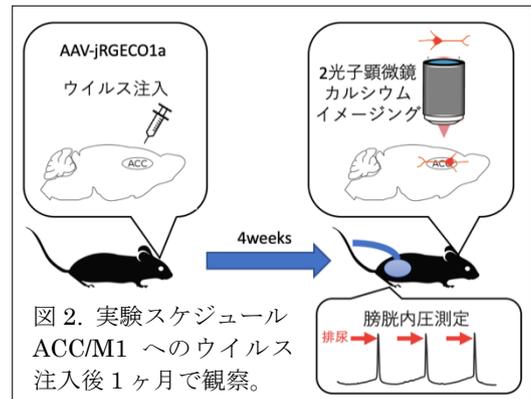


図 2. 実験スケジュール  
ACC/M1 へのウイルス注入後 1ヶ月で観察。

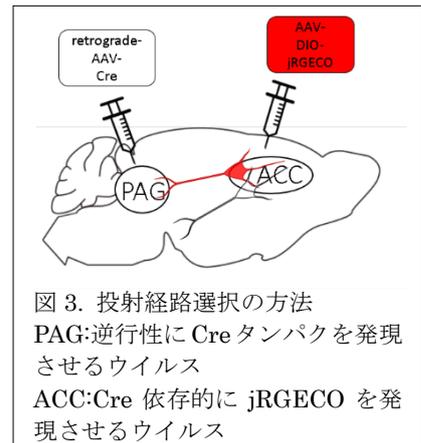


図 3. 投射経路選択の方法  
PAG:逆行性に Cre タンパクを発現させるウイルス  
ACC:Cre 依存的に jRGECO を発現させるウイルス

## 4 研究の成果

### I. ACC における神経活動

同領域の 1mm の深さまで神経活動を捉えることができた。脳標本を確認すると、ACC のみにカルシウムセンサーを発現させていた (図 4)。

図 5A は開頭術後の ACC 領域であり、16 倍レンズ・zoom2 の設定で 2 光子顕微鏡で観察すると図 5B のような 500×500 μm の平面視野に数百個の神経細胞が認められた。膀胱内圧測定と同時に in vivo の神経細胞の活動をリアルタイムで捉えることに成功した。

膀胱内圧測定は 30 分間連続測定を 1 セッションとし、生食の膀胱への灌流速度は 1 回の排尿サイクルが 3 分程度になるように調整した。

図 6 は ACC の神経活動の中でも排尿に強く関連した細胞の 1 例で、膀胱内圧のピークが出現

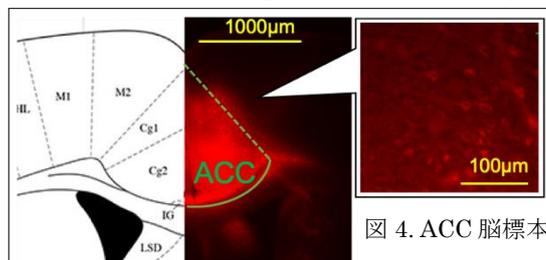


図 4. ACC 脳標本

左図は冠状断で ACC のみに赤色カルシウムセンサーが発現していることを示し、拡大した右図では神経細胞であることを示している。

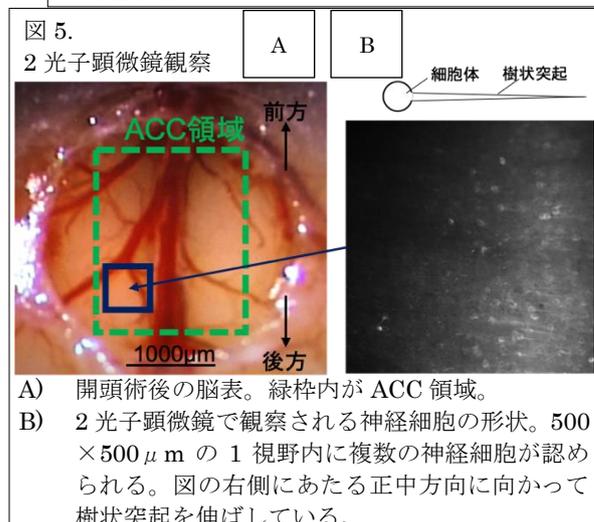
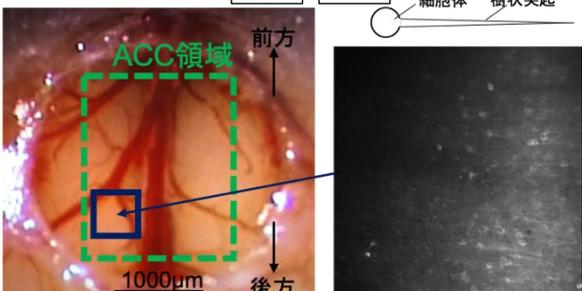


図 5.

2 光子顕微鏡観察



A) 開頭術後の脳表。緑枠内が ACC 領域。

B) 2 光子顕微鏡で観察される神経細胞の形状。500×500 μm の 1 視野内に複数の神経細胞が認められる。図の右側にあたる正中方向に向かって樹状突起を伸ばしている。

する排尿時に同期して、神経活動も上昇している。

図 6. 2 光子顕微鏡による ACC の神経細胞の活動の 1 例

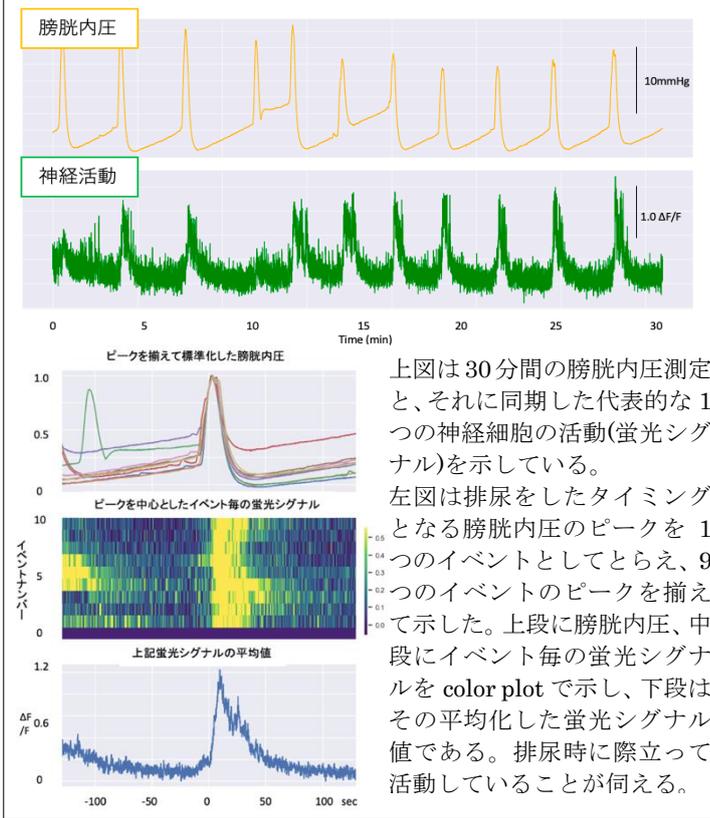


図 6 の下段のように各サイクルを膀胱内圧のピークで揃えて示すと、その時間的なズレがほとんどないことが分かる。

神経細胞の活動パターンにはいくつか種類があり、排尿時に上昇するパターン(図 7A)以外に、蓄尿時に上昇し排尿時に低下する活動パターン(図 7B)や、蓄尿や排尿とは無関係な活動パターン(図 7C)などが確認された。膀胱内圧と神経活動の相関を Pearson の相関係数( $r$ )にて解析すると、排尿時に上昇するパターンは相関係数が高くなった。

観察する位置(平面)ごとで、このようなパターンをとる細胞が多い場所や少ない場所があることが分かった。一般的には  $r \geq 0.4$  では正の相関があるとされ、図 8A のスライス上では相関の高い細胞はほとんどなく、図 8B では相関の高い細胞が多く存在することを示す。3 個体で ACC の全細胞数は 13,719 個であり、このうち  $r \geq 0.4$  を満たす細胞は 5.88%であった(図 8C)。

図 7. 活動パターンの種類の例

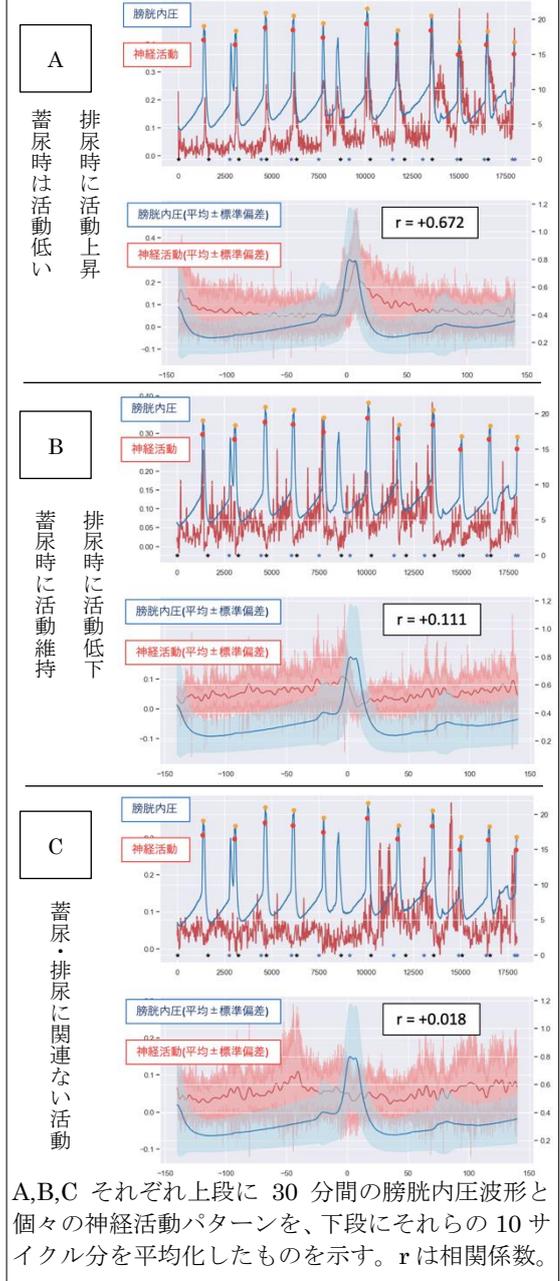
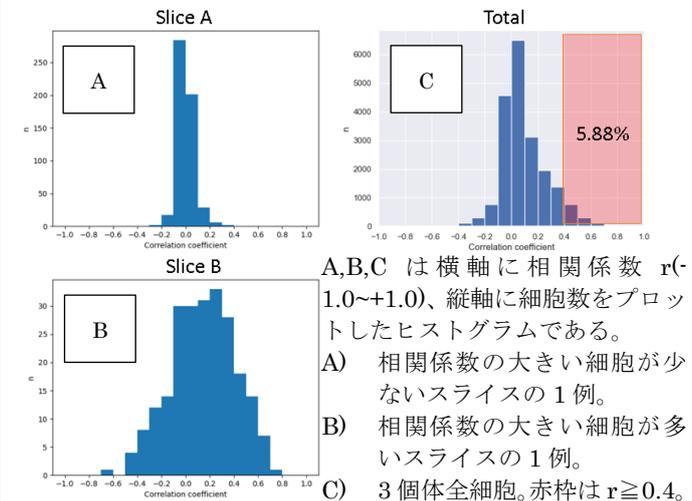


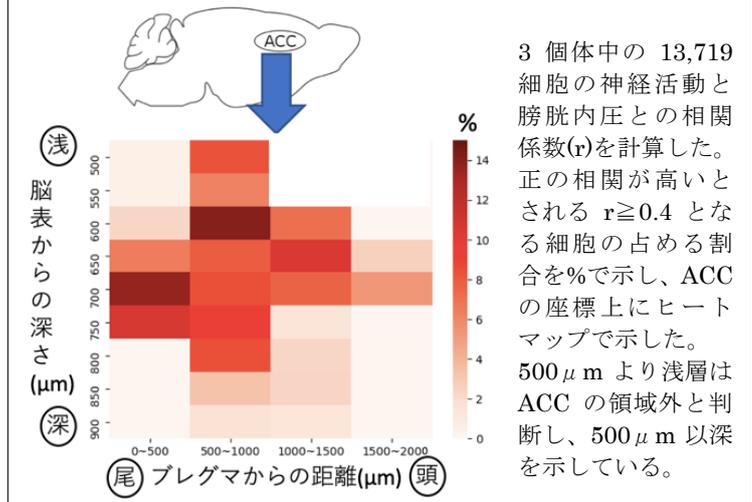
図 8. 相関係数のヒストグラム



相関係数が 0.4 以上となるニューロンの分布は図 9 のように表される。マッピングによると、ブレグマから 0-1500  $\mu\text{m}$ 、深さ 600-800  $\mu\text{m}$  に相関の高い細胞が多く認められる。

以上から、ACC には確かに排尿・蓄尿に関与する細胞が存在することが示された。さらに、そのような細胞には活動するタイミングからパターンがあり、特に排尿時に活動が上昇するパターンは特定のスポットに存在していることまで明らかとなった。また、そのような細胞の占める割合も明らかとなった。

図 9. ACC における相関係数の高い( $r \geq 0.4$ )細胞のマッピング



3 個体中の 13,719 細胞の神経活動と膀胱内圧との相関係数( $r$ )を計算した。正の相関が高いとされる  $r \geq 0.4$  となる細胞の占める割合を%で示し、ACC の座標上にヒートマップで示した。500  $\mu\text{m}$  より浅層は ACC の領域外と判断し、500  $\mu\text{m}$  以深を示している。

## II. PAG に投射する ACC のニューロン に限定した神経活動

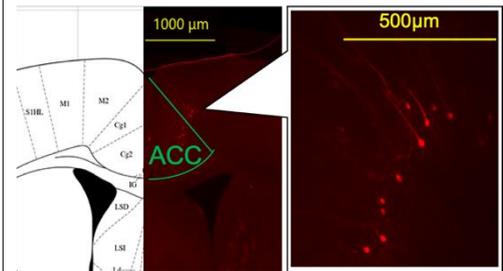
これまでのいくつかの研究により、ACC は PAG を経由して排尿を制御していると想定されている。4-I の結果では、ウイルス注入により ACC に存在する全ての細胞にカルシウムセンサーが発現しており、どの細胞がどこに投射しているのか判別のつかないものであった。図 3 のウイルス注入の方法により、図 10 のように経路が限定された細胞のみにカルシウムセンサーを発現させることに成功した。図 4 と比較すると余分な細胞の neuropil などがカットされ鮮明な細胞像が確認された。

図 7 と同様に膀胱内圧と神経活動の変化の同一性を確認すると、図 11 のように排尿時のみに神経活動が上昇する細胞(図 11A)や、蓄尿時は活動が漸増し排尿時に低下する細胞(図 11B)など排尿・蓄尿に関連するものが確認された。

3 個体の全 7,191 細胞において相関係数を算出し

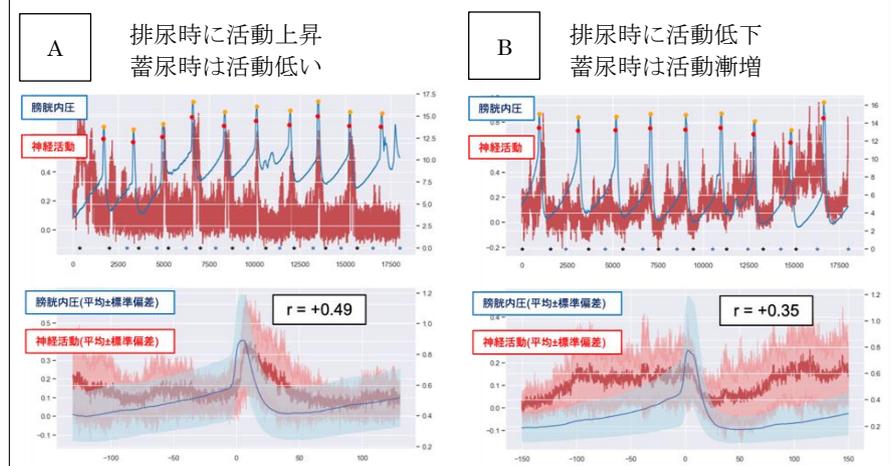
図 12 のようにヒストグラムを作成すると、ACC の全体の細胞(図 8C)と比べ、相関係数の高い細胞の割合は小さいことが分かる。正の相関があると判定する  $r \geq 0.4$  を満たす細胞

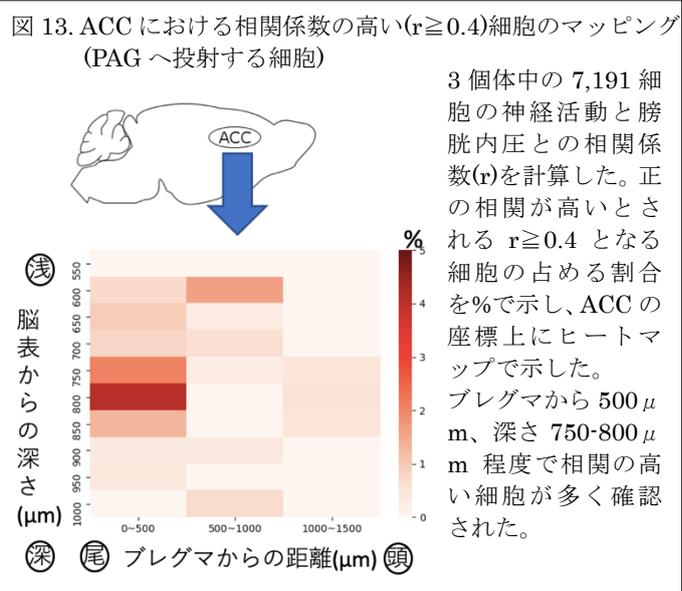
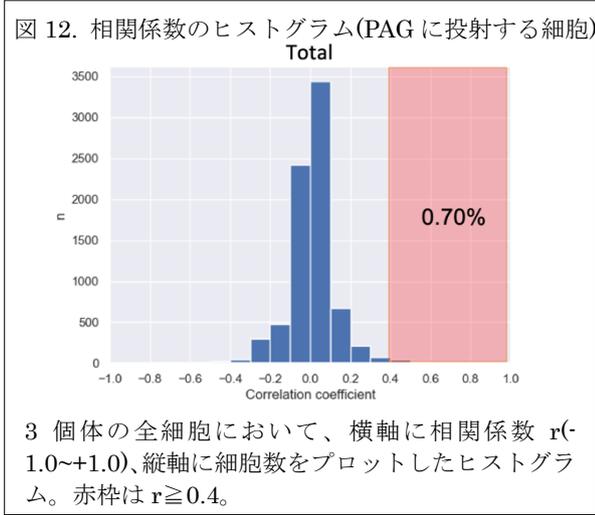
図 10. PAG に投射する ACC の神経細胞



左図は ACC のみに赤色カルシウムセンサーが発現していることを示し、拡大した右図では神経細胞であることを示している。図 4 よりも細胞数が少なく、細胞とバックグラウンドとのコントラストが鮮明となっている。

図 11. PAG に投射する ACC の神経活動の例





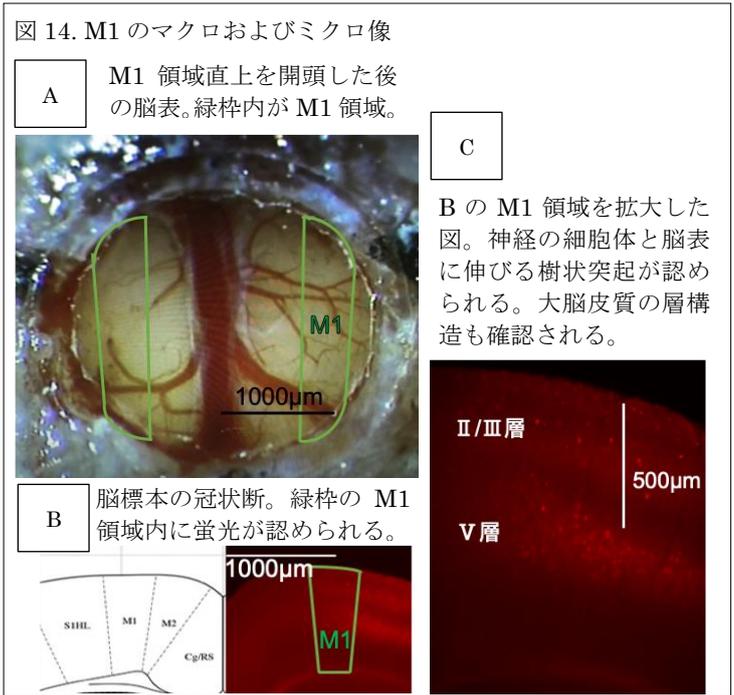
はわずかに 0.70% であった。図 13 のようにヒートマップにしても、相関の高い細胞が少ないことが分かるが、その中でもブレグマから  $500 \mu\text{m}$ 、深さ  $750\text{--}800 \mu\text{m}$  程度で相関の高い細胞が多く確認された。図 9 の局在とスポットが異なり、ACC の排尿に関与する細胞の中でも PAG に投射するものと、それ以外に投射するものとの局在が異なる可能性が示唆された。

PAG へ投射する経路を持つ細胞に限定すると、蓄尿や排尿に関連する細胞数は少ないが、確かに関連する細胞は存在し、ACC から PAG へ投射するニューロンが関与していることが明らかとなった。

### III. M1 における神経活動

先行論文では、大脳皮質の中で一次運動野 (M1) の一部は排尿時に活動が上昇すると、ファイバーフォトメトリーで示している (Yao J. et al. Nat Neurosci. 2018)。しかしながら、神経細胞の活動を集団での信号として計測するファイバーフォトメトリーでは個々の細胞の活動の違いまでは判別できないことや、投射先の橋排尿中枢で活動を観察しており全ての M1 の神経活動ではないことから、本研究で ACC において行なった 2 光子顕微鏡による個々の神経活動の網羅的な観察を M1 においても行うこととした。

M1 は本来頭尾軸方向に長いですが、先行論文ではブレグマより前方は排尿に関与しないという結果であったので、主にその後方  $1500 \mu\text{m}$  までを観察対象とした。M1 は図 14A, B にあるように正中から約  $1000 \mu\text{m}$  側方に位置している。図 14B ではカルシウムセンサーの発現が M1 領域にあることを示している。図 14C は図 14B の M1



部分の拡大図で、神経細胞にカルシウムセンサーが確かに発現していることを確認できる。また、V層の神経細胞が脳表から約 500-700  $\mu\text{m}$  であることが分かる。

最深部まで観察可能で、ACC と同様に排尿や蓄尿に連動して活動する細胞が見られた。その多くは図 15A のように排尿時に活動が上昇するタイプであったが、わずかに図 15B のような排尿時に活動が低下するものも認められた。

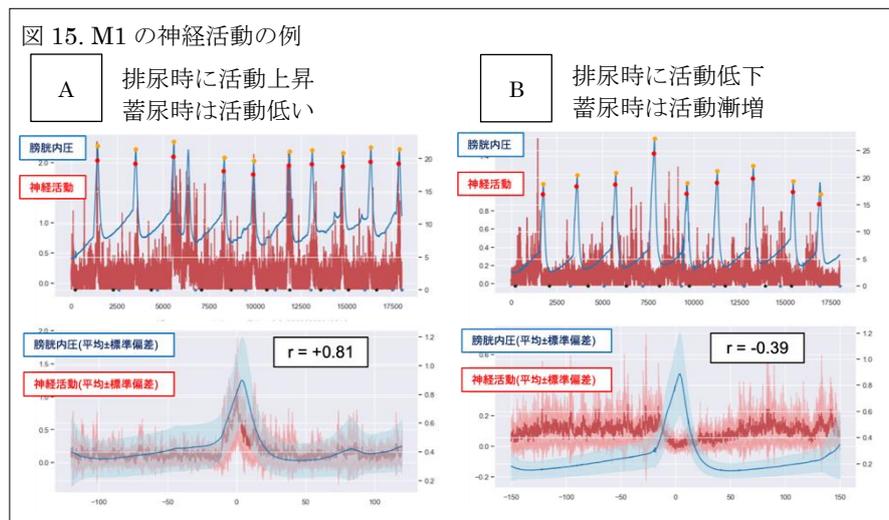
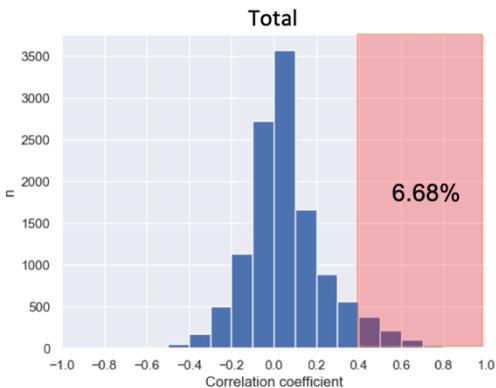
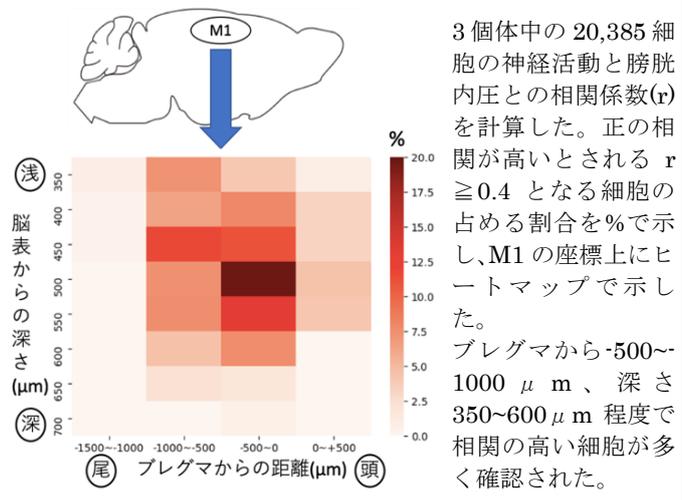


図 16. 相関係数のヒストグラム(M1)



3 個体の全細胞において、横軸に相関係数  $r$  (-1.0~+1.0)、縦軸に細胞数をプロットしたヒストグラム。赤枠は  $r \geq 0.4$ 。

図 17. M1 における相関係数の高い( $r \geq 0.4$ )細胞のマッピング



ACC と同様に特に排尿時に活動が上昇する細胞を相関係数が高いもの ( $r \geq 0.4$ ) とした場合、3 個体の全細胞中では 6.68% を占め ACC よりも若干多い結果となった (図 16)。ヒートマップでは 20% 近くがそのような相関の高い細胞となる箇所もあり、その近辺がホットスポットと考えられた (図 17)。同部位は先行論文で対象とした位置にほぼ一致する。

先行論文では、M1 の一部は排尿時に活動が上昇する領域であることしか分からなかったが、本研究により確かに M1 のその領域では一定の確率で排尿時に活動が上昇する細胞が存在することを領域単位ではなく細胞単位で示すことができた。また、非常に少ない割合ではあるが、排尿時には活動が低下する細胞もあることが初めて示された。

#### IV. その他興味深いデータ

##### 神経活動は毎回の排尿時に上昇するとは限らない

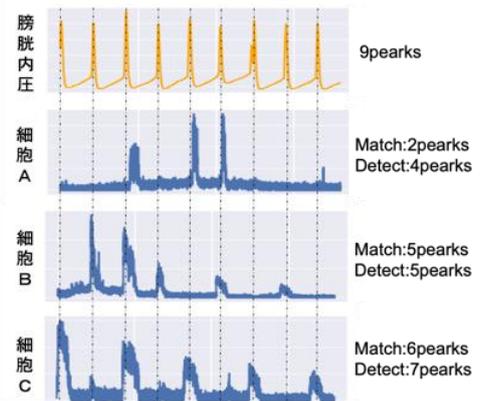
図 18 に 1 つの測定時における膀胱内圧とその際の 3 つの神経細胞の活動を示す。膀胱内圧上昇に伴い活動が上昇するパターン (図 7A など) の細胞の多くは、膀胱内圧が上昇する度にほぼ毎回活動が上昇していたが、一部の細胞は図 18 のように毎回上昇せず一定の確率で上昇する細胞も確認された。排尿時に起きる神経活動が確率的なものな

のか、一定の時間は不応期があるのか、排尿のタイプのようなものがあるのか、それによって活動する細胞が異なるのか、今後の課題である。また、図 18 の細胞 A のように 9 個中 2 個のピークの一一致程度のものは、排尿に関わらない活動が偶然一致した可能性もある。

### タイムラグ

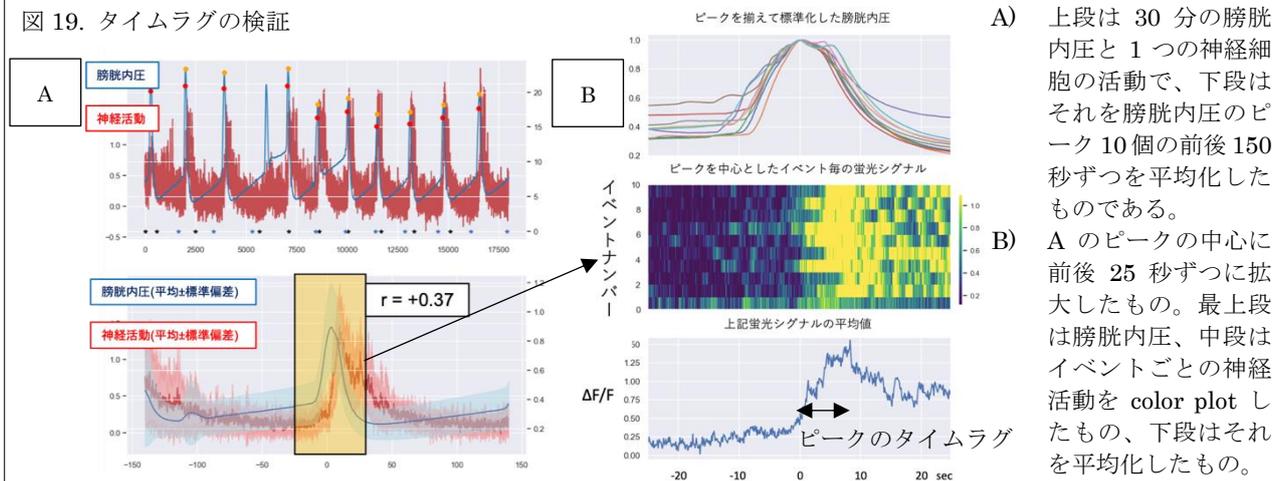
図 6 は排尿時にちょうど一致して神経活動が上昇している例であるが、図 19A のような神経細胞の活動パターンも一見すると同じように上昇しているように見える。しかしながら、ピーク時をさらに拡大して図 19B のように示すと、膀胱内圧の上昇のピークよりさらに秒程度遅れて神経活動の

図 18. 排尿と一致する神経活動の頻度



最上段に膀胱内圧波形を示し、そのピークとなる時点を縦の点線で示している。下の 3 段は 3 つ細胞の神経活動であり、それぞれで出現したピーク数を”Detect”、そのピークが膀胱内圧でのピークを一致している数を”Match”として右に示した。膀胱内圧の上昇(排尿)時に毎回活動するとは限らない細胞の例である。

図 19. タイムラグの検証



ピークとなっている。このように細胞によって、ピークにタイムラグがあるものが存在することやその程度が様々であることが分かった。通常は膀胱内圧のピークの上昇途中で排尿していることから、図 19 で示した神経細胞の活動は、排尿のトリガーではないことが想定される。つまり排尿途中の何らかの活動もしくは排尿によって得られる何らかの信号、または蓄尿しはじめる際の活動に関わるものと考えられる。現在はそのタイムラグについて検証を重ねている。

## 5 成果のまとめと考察

- 排尿・蓄尿に関わる中枢神経の活動を in vivo で細胞単位でカルシウムイメージングした世界初の報告である。
- 脳表からの観察によって細胞への侵襲を極力避けており、データの信頼性が高い。
- ACC と M1 のような大脳皮質において排尿・蓄尿に関わる神経細胞は確かに存在し、そのような細胞の全体に占める割合や局在も明らかとなった(これまでではどこにどれだけ存在するか不明であった)。大脳皮質は高次の中枢領域であり、排尿・蓄尿に関わる細胞以外にも多種多様な意義のある細胞が同領域内に混在すると考えられる。今回

の研究は、個々の細胞についてそのような区別に成功しており、今後はそのような関連する細胞としない細胞との違いを検証する必要がある。

- 排尿・蓄尿に関わる神経細胞の中でも、排尿期・蓄尿期によって活動のパターンが細胞によって異なることが明らかとなった。またタイムラグも細胞によっては存在することも示された。このように時間とパターンとの関係が細胞ごとに異なることも、その違いを生み出す細胞の特徴を究明したい。
- 上述のように細胞の種類・特徴を区別する方法の1つとして今回は、投射経路を限定しての検証も行なった。ACC-PAG 経路の関与の強い細胞の数は少なく、他の投射経路の存在も示唆される。
- 排尿のたびに毎回再現性高く神経活動が上昇するとも限らないことが判明した。それも細胞ごとの特性なのか課題である。

## 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種類のウイルスの確保に難渋し、神経細胞の種類ごとの観察は十分には施行できなかった。興奮性細胞・抑制性細胞など細胞種を限定することは、遺伝子導入によるカルシウムイメージングの手法の長所の1つであり、上述5のまとめにあるように、細胞種を限定することが新たな知見を提供してくれるものと考えている。現在は興奮性細胞や抑制性細胞に限定してACCの神経活動を捉え、排尿に同期して上昇する細胞も確認はできているが、データ数が少ないため今回は正式なデータとして公表していない。近くまとまったデータとして公表したい。

同様に投射経路を限定した観察も、どのような細胞かを判別するために有効な手法と考えている。今回はACC-PAG経路のみの発表であるが、同手法を他領域に適用することで、多くの新たなデータを蓄積できる。本助成金の申請時はこのような手法は記載していなかったが、予定していたウイルスが確保困難となったことから、新たに計画した手法である。

本テーマはACCという領域に限定したものであったが、これも予定からターゲットをM1にも展開し、“大脳皮質”の神経活動について2つの領域の結果を得ることができた。

また、当初は脳表からの2光子顕微鏡では観察できない1mmより深部の観察をGRINレンズやプリズムを用いて行う予定であった。こちらもGRINレンズ下での観察を可能にすることまではできたが、データが不足していることから本発表では公表せず、今後まとまった結果として提示できるようにしていく。

このように、2光子顕微鏡で個々の神経細胞活動を観察する手法をベースに、あらゆる領域、経路、細胞種に適用していくことで、これまでブラックボックスであった排尿・蓄尿に関わる中枢神経のメカニズムが明らかとなると考えている。そのような成果を今後も蓄積していきたい。

## 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。ターゲットを中枢のある領域全体としてではなく、本研究のように” その中のどのようなニューロンのどのような活動が” という詳細なメカニズムを対象とすることで、今後は極力限定的な中枢神経をターゲットとした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  
てしまっているが、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られる。

## 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。