

高齢女性における下部尿路機能障害克服を目指した、加齢に伴う脳幹バリントン核の機能障害の解明

横浜市立大学大学院医学部医学研究科 泌尿器科 伊藤 悠城

要約

【緒言】高齢女性における下部尿路機能障害は、潜在性脳梗塞などが原因である場合が多く、加齢に伴う下部尿路症状には排尿機能を司る中枢神経系の異常が強く関与していると考えられている。現在我々は、光遺伝学を用いた選択特異的神経操作により老齢雌性マウスの排尿における中枢神経機能解析を行い、高齢女性の加齢に伴う下部尿路機能障害の発生機序を明らかとし、その先に新たな創薬ターゲット探索ならびに新規治療方法確立を目指している。【方法】バリントン核CRH(Corticotropin Releasing Hormone)陽性ニューロンに遺伝子組み換えタンパク質Creを発現させた雌性CRH-Cre-iresノックインマウス(2-3か月齢)を若齢群(4-6か月齢)および老齢群(12か月齢)に分ける。神経興奮を可能とするチャンネルロドプシンChR2を組み入れたCre依存性アデノ随伴ウイルスを、ステレオタキシス下でバリントン核に直接注入した。3-4週間後、ウレタン麻酔下にバリントン核近傍に留置したoptical fiberより青色LEDを照射し、ChR2を介してバリントン核CRH陽性ニューロンを刺激する。それに伴う、膀胱内圧および外尿道括約筋の変化を記録し、加齢性変化の有無を検討した。【結果】12か月齢の老齢雌性マウスにおけるバリントン核CRH陽性ニューロンの青色LEDによる光遺伝学的刺激では、コントロールの若齢群と比較して、光刺激に対する膀胱収縮の反応発現速度はほぼ同等であった。しかしながら、光遺伝学的刺激に伴う膀胱収縮力は、老齢群において軽度増大していた(unpublished data)。【考察】バリントン核刺激に伴う膀胱収縮反応は、加齢に伴い増強している可能性が出てきた。今後、老齢マウスのバリントン核神経活動のマルチチャンネルレコーディングを行うべくその実験基盤構築を行っている最中である。

緒言

排尿は尿の排出をする排尿期と尿を蓄える畜尿期の2つの層に大別することができ、代表的な下部尿路機能障害には、各層の機能異常である、排尿筋低活動(膀胱収縮不全)による尿排出機能障害と過活動膀胱による蓄尿機能障害とがある。本邦における疫学的調査では、40歳以上の年代層で810万人(12.4%)が過活動膀胱(畜尿機能障害)を呈し、また2,500万人の人が尿勢低下といった尿排出機能障害を有している。これら下部尿路機能障害は年齢とともに発症頻度が増し、超高齢化社会である本邦において多くの高齢女性のQOL障害をもたらしている。我々は、老齢動物モデルを用いて加齢に伴う下部尿路機能障害の発症機序解明に取り組んできており、これまでin vitroの摘出膀胱収縮実験などから、その病態に大きな性差があることを突き止めている。つまり、加齢に伴う下部尿路機能障害は性別に応じて成因が異なることが予想され、その治療戦略もまた異にするべきと考えている。

高齢女性における下部尿路機能障害は、潜在性脳梗塞などが原因である場合が多く、加齢に伴う下部尿路症状(頻尿や尿勢低下、尿閉など)には排尿機能を司る中枢神経系の異常が強く関与していると考えられている。今回我々は、高齢女性における上位中枢神経機能異常を介した下部尿路機能障害の発症機序解明を目的として今研究計画を立案した。残念ながら、中枢神経を標的とした排尿障害基礎研究は極めて稀であり、加齢に伴う中枢神経機構の異常による下部尿路機能障害の発症機序にはこれまで研究報告がない。今回我々は、光遺伝学を用いた選択特異的神経操作により老齢雌性マウスの排尿における中枢神経機能解析を行い、高齢女性の加齢に伴う下部尿路機能障害の発生機序を明らかとし、その先に新たな創薬ターゲット探索ならびに新規治療方法確立を目指している。

方法

実験その1：トランスジェニックマウスを用いた、バリントン核CRH陽性ニューロンにおける選択的アデノ随伴ウイルス導入

バリントン核CRH陽性ニューロンに遺伝子組み換えタンパク質Creを発現させた雌性CRH-Creiresノックインマウス(2-3か月齢)を購入(Jackson Laboratory)する。同マウスを若齢群(4-6か月齢)および老齢群(12か月齢)に分け、老齢群に関しては実験に用いる12か月齢になるまで大学動物実験センターにおいて長期飼育する。神経興奮を可能とするChR2ならびに神経抑制を可能とするhM4Diを組み入れたCre依存性アデノ随伴ウイルス(AAV2-EF1a-DIO-ChR2-mCherry および AAV2-hSyn-DIO-hM4Di-mcherry)を、ステレオタキシス下でバリントン核に直接注入し、下記機能実験を遂行した。

実験その2：老齢雌性マウスにおけるバリントン核CRH陽性ニューロンの光遺伝学的刺激

バリントン核CRH陽性ニューロンにChR2を発現させた雌性の若齢および老齢マウス頭部を、ウレタン麻酔下に固定し、optical fiberをバリントン核近傍に挿入する。膀胱内圧は経膀胱頂部カテーテルより測定し、外尿道括約筋電図は経皮的ワイヤ電極を用いて測定する。

バリントン核近傍に留置したoptical fiberより青色LED(470nm)を照射し、ChR2を介してバリントン核CRH陽性ニューロンを刺激する。それに伴う、膀胱内圧および外尿道括約筋の変化を記録し、加齢性変化の有無を検討した。

実験その3：老齢雌性マウスにおけるバリントン核CRH陽性ニューロンの薬理遺伝学的抑制

バリントン核CRH陽性ニューロンにhM4Diを発現させた雌性の若齢および老齢マウスの膀胱内圧および外尿道括約筋電図を、研究その2と同様の方法を用いてウレタン麻酔下で測定する。

hM4DiのアゴニストであるClozapine-N-oxide(CNO)5mg/kgを腹腔内に投与し、hM4Diを介してバリントン核CRH陽性ニューロンの神経活動を抑制する。それに伴う、膀胱内圧および外尿道括約筋の変化を記録し、加齢性変化の有無を検討する。次に、若齢および老齢マウス内における性差を解析する。これまで我々は、バリントン核CRH陽

性ニューロンを薬理遺伝学的に抑制することで、畜尿期における膀胱微小収縮が抑制されることを突き止めているが、加齢に伴う膀胱微小収縮抑制の減弱もしくは異常亢進などの表現型があるものと予想している。

以上、全ての実験は本学動物研究センターで行い、動物実験を行うにあたっては、本学の動物実験委員会(承認番号:F-A-20-064)および遺伝子組み換え実験安全委員会(承認番号:F-D-20-14_0612)に本実験申請を行い、当委員会の許可を受けた上で行われた。

結果

当初老齢群として18か月齢のマウスの使用を予定していたが、コロナウイルス感染拡大の影響もあり繁殖などに遅延が生じたため、まずは12か月齢を用いて初期実験を行っている。

実験その1

若齢群(3-4か月齢)および老齢群(12か月齢)の雌性CRH-Creiresノックインマウスのバリントン核に、ウイルス注入を行い、免疫染色の結果、バリントン核への選択的なウイルス導入を両群で確認した。

実験その2

Unpublished dataのため、詳細は割愛するが、12か月齢の老齢雌性マウスにおけるバリントン核CRH陽性ニューロンの青色LEDによる光遺伝学的刺激では、コントロールの若齢群と比較して、光刺激に対する膀胱収縮の反応発現速度はほぼ同等であった。しかしながら、光遺伝学的刺激に伴う膀胱収縮力は、老齢群において軽度増大していた。この膀胱収縮反応の差に統計学的な有意差がつくには、各群10匹程度の実験が必要であると思われる。現時点では、傾向はつかめているもののさらなる追加実験が必要な状況である。

実験その3

現在実験準備中であり、未達。

考察

同実験では、バリントン核刺激に伴う膀胱収縮反応が、加齢により増加している可能性が示された。

これまで我々は、老齢マウスの摘出膀胱等尺性収縮実験において、経壁電気刺激に伴う膀胱収縮反応が、加齢に伴い減弱することを突き止めている1)。つまり、排尿筋側の反応は加齢に伴い減弱している可能性があった。対して、バリントン核刺激に伴う膀胱収縮反応は、加齢に伴い増強している可能性が出てきた。この事象がバリントン核自体の加齢性変化に伴うものなのか、脊髄レベルでの排尿反射の変化に由来するものなのか、多くのことが不明なままである。また、過去の我々の報告では、27-30か月齢を老齢群として用いており、今回の12か月齢と大きな開きがあることも加味していかなければならない。これまでの結果よりバリントン核そのものの神経活

動に加齢に伴う変化があると考えられたため、今後、老齢マウスのバリントン核神経活動のマルチチャンネルレコーディングを行うべくその実験基盤構築を行っている最中である。

参考文献

1. Kamei J, Ito H (Equal contributor), Aizawa N, Hotta H, Kojima T, Fujita Y, Ito M, Homma Y, Igawa Y.: Age-related changes in function and gene expression of the male and female mouse bladder. *Sci Rep.* 2018 Feb 1;8(1):2089.

Aging-related change of Barrington's nucleus in the brain stem underlying lower urinary tract dysfunction in elderly women

Abstract

Introduction and Objective: The prevalence of lower urinary tract symptom (LUTS) in women increase with ageing, however, the etiology of LUTS in elderly women remained unclear. We aimed to investigate the aging-related changes of Barrington's nucleus in the mice brain stem.

Methods: Female mice were divided into two groups, adult mice (3-4 months-old) and aged mice (12 months-old). To target Barrington's nucleus in CRH (Corticotropin releasing hormone) -ires-CRE mice, stereotaxic injections of Cre-inducible vector (AAV-EF1a-DIO-hChR2-mCherry) allowed expression of Channelrhodopsin2 for opto-activation. Under urethane anaesthesia, bladder pressure and external urethral sphincter activity were recorded while 473nm LED was applied above Barrington's nucleus in adult and aged female mice.

Results: Immuno-histological analysis showed specific transduction of vectors into CRH positive neuron in Barrington's nucleus. Optogenetic stimulation applied to the Barrington's nucleus axons reliably induced bladder contractions and bladder contractile response seem to be bigger in aged female mice compared to adult mice.

Conclusions: The bladder contractile response to optogenetic stimulation on Barrington's nucleus was higher in aged female mice than adult female mice.