

氏名	望月 孝規
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工博4甲 第289号
学位授与年月日	令和2年12月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	先進医療科学専攻
学位論文題名	Regulation of micturition reflex by neural activity in the anterior cingulate cortex (前帯状皮質による排尿反射の制御)
論文審査委員	委員長 教授 大塚 稔久 委員 講師 篠崎 陽一 委員 講師 三枝 岳志

## 学位論文内容の要旨

### 【Introduction】

Previous studies have suggested that anterior cingulate cortex (ACC) might be involved in micturition. However, the mechanism has not been fully elucidated in comparison to pontine micturition center (PMC) and periaqueductal gray matter (PAG), which are the same cerebral regions found to be involved in micturition reflex. The purpose of this study is to clarify how ACC neuronal activity contributes to the micturition reflex.

### 【Materials & Methods】

1. Neuronal tracers cholera toxin subunit B (CTB) and wheat germ agglutinin (WGA) were injected into the PAG, ACC, and bladder of wild type (WT) mice to confirm the distribution of projection targets. 2. Under urethane anesthesia, WT mouse ACC was stimulated and inhibited nonselectively measuring the bladder pressure using electrical stimulation and drug administration. 3. Optogenetic selective stimulations for excitatory neurons in ACC were performed using thymus cell antigen1-channelrhodopsin-2 (Thy1ChR2) mouse and adeno-associated viruses-calcium/calmodulin-dependent kinase II-channelrhodopsin-2 (AAV-CaMK2-ChR2) with WT mouse. Furthermore, optogenetic selective stimulations for parvalbumin (PV) neurons that is one of the inhibitory neurons were performed using PV-Cre mouse with adeno-associated viruses- double-floxed inverted orientation- channelrhodopsin-2 (AAV-DIO-ChR2). 4. To map cortical regions inducing micturition reflex, Thy1ChR2 mice were used, and photostimulation at multiple sites over the cerebral cortex were performed and the changes of the bladder pressure were measured.

## 【Results】

1. The presence of fluorescence was confirmed in ACC, PAG, PMC, and the bladder. 2. Non-selective activation of ACC neural activity promoted the micturition reflex. On the other hand, non-selective inhibition suppressed bladder contraction. 3. While selective stimulation of ACC excitatory neurons promoted the micturition reflex, photostimulation of PV neurons suppressed it. 4. Although photostimulation of the ACC excitatory neurons had a higher effect on an increase of bladder pressure, this effect was attenuated as the photostimulation point moved laterally.

## 【Discussion】

The presence of a projection pathway from ACC to the bladder via PAG and PMC was confirmed. In fact, manipulation of ACC neural activity had a direct effect on the micturition reflex. Specifically, activation of ACC neural activity by nonselective stimulation facilitated the micturition reflex, while nonselective inhibition suppressed it.

Selective stimulation using optogenetics for ACC excitatory neurons induced micturition reflex. On the other hand, selective stimulation for ACC PV neurons suppressed bladder contraction. These results showed that selective stimulation of each of the neurons with different functions in the ACC could control the micturition reflex.

Compared to other cortical areas, ACC neural activity has a strong effect on the micturition reflex. It has been thought that micturition is controlled by the interaction between regions of the cerebrum, such as the PMC and PAG. However, it was found that selective activation of neurons with different functions in a single region, which is ACC, also controlled micturition reflex in this study.

## 【Conclusion】

ACC neuronal activities play a crucial role in the initiation of micturition. The neuronal balance of excitation and inhibition in ACC could regulate micturition reflex.

## 論文審査結果の要旨

蓄尿や排尿を司る中枢神経系の機能に関しては、橋排尿中枢 (Pontine micturition center :PMC) や中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal grey matter :PAG) などの領域が興奮性の出力を担っていることが明らかとなっているが、その他の脳領域に関して十分な解明は進んでいない。脳梗塞患者や脳出血患者などを対象としたヒト臨床研究において、PAG や PMC が障害されると排尿困難などの尿排出障害が生じ、一方内側前頭前野 (medial prefrontal cortex :mPFC) が障害されると、頻尿や尿意切迫感といった蓄尿障害が生じることから、蓄尿時には mPFC が PAG や PMC からの尿排出信号を抑制し、排尿時にこの抑制がなくなることで尿排出を成立させていると考えられてきた。しかし、前帯状皮質 (anterior cingulate cortex :ACC) もこれらの領域の一つであるが、ACC に関しては感情、情動な

ど排尿に直接関連のない機能を司ると考えられてきたことから、ACC が排尿に関してどのような機能をもっているのかに関しては明らかにはなっていなかった。

そこで、本研究では、ACC が排尿にどのように関わるかを解明する目的で、神経回路解析や光遺伝学を用いた研究を推進した。まず、ACC と膀胱との間に直接の神経経路が存在することを各種トレーサー実験にて証明した。次に、電気刺激実験および薬剤投与実験を行い、ACC を活性化すると、排尿間隔が短縮した。一方 ACC の神経活動を抑制した場合には、排尿間隔が延長し、排尿反射が抑制されることを明らかにした。これにより ACC 全体としての活動を活性化すると排尿反射を誘発し、一方 ACC 全体としての活動を抑制すると排尿反射を抑制することが明らかになった。さらに、これらの結果をさらに検証するために光遺伝学を用いて確認した。ここでは、Thy1-チャネルロドプシン (ChR2) トランスジェニックマウスの ACC へ光刺激を行うと排尿反射を誘発した。この反応は WT マウスでは確認されなかった。また、ACC の興奮性神経細胞に限局して ChR2 を発現させたマウスに対して光刺激したところ、Thy1-ChR2 トランスジェニックマウスに対して行った実験と同様に光刺激時に排尿反射を認めた。逆に、抑制性神経細胞であるパルブアルブミン神経細胞に Ch2 を限局させたマウスの光刺激では、排尿反射が抑制されることを見出した。これら一連の実験によって、ACC が一つの領域で排尿促進と排尿抑制の 2 つの機能を併せ持つ領域であることが明らかとなった。

現在投稿準備中ではあるものの、示されたデータは適切な作業仮説と綿密な実験に基づいており、最終的にはレベルの高いジャーナルの原著論文としてアクセプトされることが期待できる。プレゼンも大変わかりやすく、当該分野の中で本研究がどのような位置づけにあるかも理解でき、最終的に博士論文としてふさわしいと判断した。