

氏 名 箱崎 敦志

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1773 号

学位授与の日付 平成27年3月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Control of lower urinary tract functions by parasympathetic
preganglionic neurons

論文審査委員 主 査 教授 南部 篤
教授 井本 敬二
教授 川口 泰雄
教授 西田 基宏
准教授 古江 秀昌
教授 河谷 正仁 秋田大学大学院

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Micturition - the periodic evacuation of urine from the bladder - generally occurs voluntarily in adults but involuntarily in early childhood. The neuronal circuits of micturition show developmental plasticity particularly in terms of cortical voluntary control; however the essential component of the neuronal circuit is a spino-bulbospinal micturition reflex circuit. This reflex is initiated by excitation of pelvic afferents (considered to be a group of small myelinated A δ afferents) which sense urinary bladder fullness by acting as stretch and tension receptors. This information is then relayed via the spinal cord to the pontine micturition center. The descending signals have to coordinate parasympathetic limbs of the autonomic outflow and the voluntary muscle of the urinary sphincter to produce a successful void. It is still unknown, however, how spinal parasympathetic outflow induces for micturition.

The urinary bladder is densely innervated by small, unmyelinated afferents: a group of slowly conducting C afferents that are associated with nociceptive signaling. In contrast to the role of A δ fibers in normal micturition, the urinary bladder C afferents are considered to be involved in pathological states of micturition such as hyper-activity and urinary bladder pain, or as a bladder volume sensor for urine storage. Recent studies have shown that the transient receptor potential vanilloid subfamily V member 1, TRPV1, is expressed on urinary bladder C afferents and urothelial cells. This capsaicin-activated cation channel has been proposed to play an important role in urinary bladder pain and urothelial signaling. However, relatively little is known about the role of synaptic inputs from urinary bladder C afferents on the spinal components of the micturition reflex circuit. The pontine micturition center, activated by urinary bladder afferent excitation through the spinal

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

dorsal horn, excites parasympathetic preganglionic (PG) neurons in the lumbosacral spinal parasympathetic nucleus (SPN) located in the intermediolateral grey matter of the spinal cord. PG neurons directly activate parasympathetic postganglionic neurons located near the urinary bladder to induce micturition. Therefore, PG neurons are the key spinal regulator for micturition.

To elucidate how spinal synaptic inputs from urinary bladder afferents control the parasympathetic outflows for micturition, I first identified the location of the SPN in the intermediolateral area of the sacral spinal cord in rats by c-fos expression in response to micturition. I then developed *in vivo* patch-clamp (or extracellular) recording technique from the SPN including PG neurons of urethane-anesthetized rats with simultaneous monitoring of intravesical pressure (IVP) and urethral perfusion pressure (UPP). Neuronal firing within the SPN, including PG neurons, induced micturition with an increase in IVP. Subthreshold oscillatory membrane depolarisations were essential for PG neuron excitation and were highly synchronized with urethra activity. Stable excitatory postsynaptic currents (EPSCs) could be also recorded from SPN neurons under voltage-clamp conditions. *In vivo* analysis in combination with spinal cord slice patch-clamp analysis revealed that SPN neurons showing tonic and phasic firing properties are likely to be PG neurons, which receive direct glutamatergic synaptic (monosynaptic) inputs mainly from C afferents, including capsaicin sensitive (TRPV1-expressing) afferents. Capsaicin also increased the frequency of miniature EPSCs (recorded in the presence of tetrodotoxin) in SPN neurons retrogradely labeled with DiI (a neurotracer) injected near the bladder. These results indicate the existence of a local spinal reflex circuit for micturition. Spinal application of capsaicin inhibited dorsal root stimulation evoked EPSCs in SPN neurons through one of the groups of C afferents, and decreased the inter-contraction interval of micturition with an increase in the IVP threshold for micturition,

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

suggesting that capsaicin-sensitive C afferent spinal synaptic inputs play an important role in setting the threshold for the normal micturition reflex. Furthermore, frequent urination induced by inflammation could be inhibited by spinal blockade of afferent signaling through capsaicin-sensitive afferents. In summary, I present newly developed *in vivo* approaches which allow a detailed characterization of the subthreshold integrative mechanisms of spinal PG neuronal excitation during the micturition cycle. In addition, this work proposes capsaicin treatment for the blockage of spinal synaptic inputs from TRPV1-expressing C afferents as an attractive target for the treatment of pathological urinary bladder function and also for its anti-nociceptive action on urinary bladder pain.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

膀胱と尿道からなる下部尿路は蓄尿・排尿を担い、特に排尿は膀胱内圧の上昇に伴う膀胱の収縮と尿道括約筋の弛緩など下部尿路機能の協調が必要である。従って、排尿時における下部尿路の個々の活動は副交感・体性神経を介し、脊髄を含む排尿中枢から精巧な制御を受けていると推測されてきた。しかし、その詳細は未だ不明であった。本研究において出願者は、*in vivo*パッチクランプ法を応用し、排尿の神経制御機構をラットを用いて詳細に検討した。

脊髄副交感節前ニューロンからの*in vivo*パッチクランプ記録を行うに先立ち出願者はまず、排尿に伴う脊髄c-fosタンパク質の発現を免疫染色し、節前ニューロンが位置する副交感神経核の同定を試みた。外尿道口よりカテーテルを挿入して膀胱内圧を測定し、生理食塩水注入による排尿と酢酸添加による頻尿を観察した。脊髄でのc-fos発現は、腰仙部の後角表層やV層で認められ、排尿頻度に依存して発現の増加が見られた。後角表層とV層は、それぞれ膀胱からの感覚入力に伴う活動と副交感節前ニューロンの活動によるものと示唆された。次いで、麻酔下に腰仙部脊髄を露出し、脊髄V層、副交感神経核へガラス電極あるいはタングステン電極を刺入して、ホールセルパッチクランプ法および細胞外記録法により副交感節前ニューロンの神経活動を記録した。また、膀胱内圧や尿道内圧も同時記録した。副交感節前ニューロンの活動電位発生に伴って膀胱内圧が上昇し、排尿が観察された。この節前ニューロン発火時には、活動電位閾値下の脱分極性の膜電位オシレーションが見出され、その頻度や持続時間は尿道内圧のオシレーションと強い相関が認められた。

次いで、出願者は腰仙部脊髄スライスを作製し、V層の副交感神経核ニューロンや、膀胱近傍に注入した逆行性の神経トレーサーで同定した節前ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。後根刺激を行うと予想に反し、記録細胞に潜時の異なる2種の単シナプス性の興奮性シナプス後電流 (EPSC) が誘起され、これらの入力は伝導速度からA δ 線維とC線維を介することが明らかにされた。また、節前ニューロンに誘起された微小EPSCはカプサイシン投与によってその頻度が著明に増大したことから、カプサイシン感受性C線維の入力も確認された。また一方で、カプサイシン投与によりC線維の誘発EPSCが抑制されることを利用し、カプサイシン感受性C線維入力の生理的役割を検討した。カプサイシンは、膀胱収縮の閾値圧を上昇させ、排尿間隔を延長させた。この作用はカプサイシン前投与によりC線維伝導を阻害した動物では認められなかった。更に、プロスタグランジンE2誘発の膀胱炎様頻尿モデルを用い、カプサイシン投与による影響を同様に検討した結果、炎症に伴う頻尿が有意に改善された。

出願者は排尿の神経制御機構の詳細を解明するために、*in vivo*パッチクランプ法を応用し、排尿を指令する脊髄副交感節前ニューロンの活動と膀胱や尿道活動の同時記録に世界で初めて成功した。副交感節前ニューロンと膀胱や尿道活動との関連を解析し、副交感節前ニューロンが膀胱から一次求心性線維を介した単シナプス性入力を受けることを新たに見出した。更に、その生理的役割やこのシナプス入力遮断により病態時の頻尿が抑制されることを明らかにした。これらの研究は、今後の当該分野の発展や新規治療法や治療薬の

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

開発に大いに資するものと考えられる。以上の結果から、本研究は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全員一致で判断した。