

—— 研究助成報告 ——

迷走神経刺激による脳内局所環境変化の解明と 神経発振制御法の開拓

松 井 広

要旨：迷走神経の求心性連絡を刺激する方法は、難治性てんかんの緩和療法として用いられている。本研究では、迷走神経刺激によってもたらされる脳内環境の変化に、グリア細胞機能が関わる可能性を検証した。本研究では、まず、遺伝子改変マウスを用いて、グリア細胞のうちのアストロサイトの機能を光で操作するオプトジェネティクス法、ならびに、アストロサイトの活動を光計測するファイバーフォトメトリー法を開発した。これらの技術を用いて、てんかん病態にともなう脳内環境の変化が、アストロサイトによって影響を受けるかを明らかにすることに取り組んだ。引き続き、迷走神経刺激によるアストロサイト応答を解析したところ、アストロサイトの機能が賦活化され、易可塑性の状態遷移が生じる可能性が示唆された。そこで、迷走神経刺激によって易可塑性が生じているところに中枢神経刺激を加えることで、てんかん抑制の脳機能操作を実現することを目指した。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2024 ; 35 : 103-108

Key Words：グリア細胞, アストロサイト, 細胞内pH, アデノシン, 迷走神経刺激

【序論】

脳神経回路の動作は、細胞を取り巻く局所イオン濃度や伝達物質の低濃度の揺らぎに影響される。神経細胞のハードウェアとしての接続（ワイヤリング）に何ら変化がなくとも、眠くなったり、集中したり、心のムードが移ろうのは、まさに、このような脳内局所環境の変動ゆえであると考えられる。脳実質内にある神経細胞以外の細胞のことは、総称してグリア細胞と呼ばれるが、実は、脳細胞の半数以上は、グリア細胞であることが知られている。このグリア細胞は、伝達物質を放出したり、周囲の局所イオン環境を調整したりすることで、この脳内局所環境を強力に支配している¹⁾。

当研究室では、これまで、グリア細胞のうちのアストロサイトが脳機能に及ぼす影響を調べるため、マウスのアストロサイトに光感受性分子を遺伝子発現させ、脳に光照射することでア

ストロサイトの機能を光操作する技術（オプトジェネティクス法²⁾）を駆使し、神経活動や動物の行動にアストロサイトがどのように関わるのかを調べてきた^{3, 4)}。また、アストロサイトに蛍光センサータンパク質を遺伝子発現させ、生きているマウスの脳内に光ファイバーを刺入することで、アストロサイトの様々な活動を光計測する方法（ファイバーフォトメトリー法^{5, 6)}）も開発してきた。本研究報告では、主に、光操作・光計測の技術を用いて、てんかん病態におけるアストロサイトの役割を明らかにした研究業績に焦点を充てて紹介する。

なお、これらの研究を通して明らかになってきたことは、オプトジェネティクス技術を使って、アストロサイトの機能を光操作すれば、脳内局所環境を自在に支配することができ、動物の行動やてんかん等の脳病態に人為的に介入することが可能であるということであった。しかし、オプトジェネティクスでは、生来の脳細胞

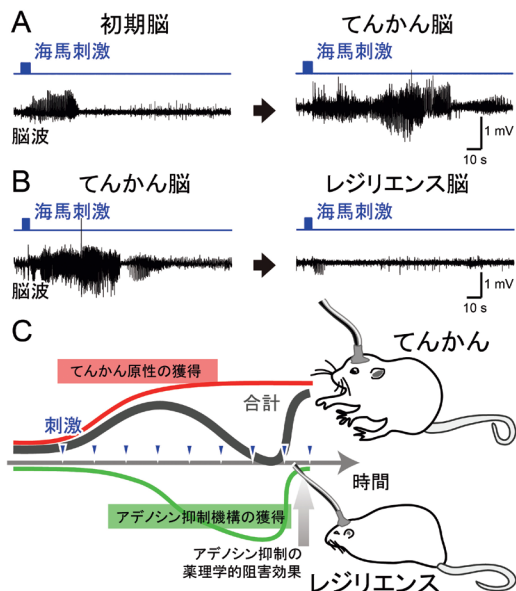


Fig. 1 てんかんレジリエンス機構の解明

A) 神経細胞に光感受性分子ChR2を遺伝子発現させたラットの海馬に光ファイバーを留置して連発光照射でてんかん様神経発振を引き起こすことができた。このような神経刺激を繰り返し送ると、次第に同じ刺激に対して、より激しいてんかん様発作を引き起こすようになった。B) さらに数日の神経刺激を繰り返すと、今度は、てんかん様神経発振が完全に封じ込められるようになった。C) このようないてんかんレジリエンスはアデノシン受容体阻害剤で解除されることからアデノシン抑制機構の獲得によるものと考えられた。

が光感受性分子を発現するように遺伝子を導入する必要がある、ヒト臨床応用は困難と言える。ヒトにも適用できる方法で、脳機能へアクセスするルートはないだろうか。近年、経頭蓋直流電気刺激 (transcranial direct current stimulation; tDCS) という方法で、マウスを用いて、頭蓋骨越しに脳内に微弱な直流電流を流すと、アストロサイトの活動を、比較的選択的に賦活化することができることが示された⁷⁾。実は、このtDCSは、その作用機序が不明ながらも、既にヒト臨床応用が試みられている。当研究室でも、マウスを使って、tDCSを試行しているが、アストロサイトを過剰に活性化すると、かえっ

て、てんかん様神経発振を誘発することがあることが示唆された。

tDCS以外の方法でも、脳内環境に介入する方法はないであろうか。迷走神経刺激法 (vagus nerve stimulation; VNS) を使えば、末梢を介して中枢に非侵襲的に刺激を与えることが可能となる⁸⁾。既に、VNSは、臨床において、てんかん緩和治療やうつ病の治療に用いられている。脳内のアストロサイトを含むグリア細胞には、神経細胞よりもはるかに鋭敏に、環境変化の影響を受けやすい性質があるため、VNSは、グリア細胞活動を介して脳内の局所環境を変化させている可能性がある。そこで、本稿では、VNSが神経細胞やグリア細胞に及ぼす細胞生理学的な反応や脳内局所環境の変化を、光計測法を使って解析した試みを紹介する。

【方法】

本研究では、マウスやラットを用いて、迷走神経を求心性に刺激し、中枢へ刺激を送り込むことで、脳内環境を変化させることを目指した。自律神経活動を電氣的に操作する技術と、光を使ってグリア細胞活動を計測する技術、グリア機能を光操作する技術を合わせることで、VNSの中枢作用にグリア細胞がどう関わっているか検証した。

【結果】

1. てんかんレジリエンス機構の解明

脳は環境に合わせて柔軟に変化することができるが、てんかんを含む多くの脳の病気は、脳の中での回路の組み換えが望ましくない方向へ進んでしまった結果であると言える。そこで、脳が柔軟であるゆえに生まれる脳の病気を、その柔軟性を人為的に誘導することで、内因性の自身の力で病気を克服できる可能性を検証することにした。

本研究では、神経細胞に光感受性分子チャネルロドプシン2 (ChR2) を遺伝子発現するラットを用いて、脳内に刺し入れた光ファイバーを介して海馬神経細胞を刺激する実験を行った。繰り返し刺激をすると、てんかん様の発作が起きることが示された。ところが、神経刺激を数

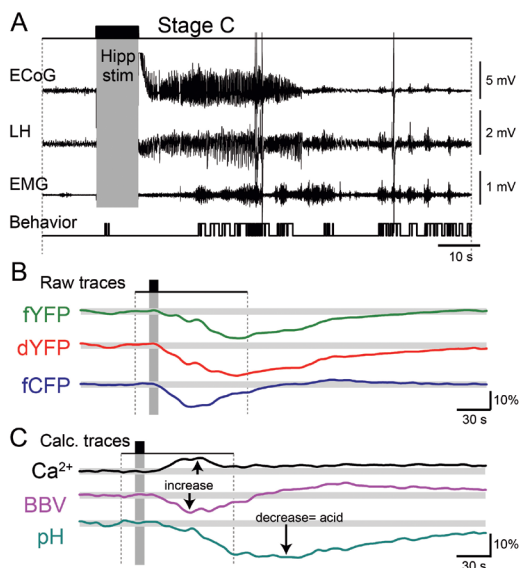


Fig. 2 てんかん様神経発振にともなう視床下部環境変化の光計測

A) キンドリング過程を経て、海馬神経刺激に対して激しい発作を引き起こすようになった。B) FRET型蛍光 Ca^{2+} センサーをアストロサイトに遺伝子発現するマウスを使用。視床下部に留置した光ファイバーを使って複数波長で光計測。C) 蛍光波形解析により、てんかん様神経発振に応じて、視床下部アストロサイトの Ca^{2+} 増加、局所脳血流量 (BBV) 増加、アストロサイト内pH酸性化が示された。

日に渡り繰り返すと、今度は、完全に発作が抑制されるようになった。このように、健常脳、てんかん脳、抗てんかん脳と、脳本来が持つ柔軟性を活性化することで、脳状態を変えることができることが示された⁹⁾。

このようなてんかん発作に対するレジリエンスは、どのようなメカニズムで実現されているのかを調べるために、てんかんレジリエンスを獲得した脳の組織化学解析を行ったところ、グリア細胞のうちのアストロサイトが適度に活性化していることが明らかになった。また、生きているラット脳内にチューブを刺し込んで、脳内の微量な物質を解析したところ、レジリエンス脳では、抑制性伝達物質のアデノシンが増えていることが示された。そこで、てんかんレジ

リエンスを獲得したラットに対して、アデノシン受容体に対する阻害薬を投与したところ、ラットは再びてんかん様発作を起こすようになった。したがって、一度、てんかん脳が出来上がってしまうと、過興奮しやすい回路は消えるわけではないが、アデノシンによる抑制作用が亢進すれば、神経細胞の過興奮は局所に封じ込められることで、てんかんレジリエンスが実現されることが示された (Fig. 1)。

2. 脳内環境を光ファイバーで読み出す技術開発

上記のように、てんかんの発展や抑制にアストロサイトが大きな役割を果たすことが示唆されたため、脳内アストロサイトの活動や脳内局所環境の情報を光ファイバーで読み出す技術を新たに開発した。しかし、光ファイバーを伝わる蛍光には、複数の信号が混じり合っているため、従来のファイバーフォトメトリー法では、脳内環境の変化を反映した正しい情報を引き出せていないことが明らかになった。そこで、蛍光センサータンパク質をアストロサイトに発現するマウスに対して、光信号解析の新技术を使うことで、脳内で生じる素過程を分離し、脳内アストロサイト内の Ca^{2+} 、pH、脳血流量の変化を調べることに成功した¹⁰⁾。

この新開発のファイバーフォトメトリー法を使い、発作を繰り返すごとに、どうして、てんかんが増悪化していくのかを解き明かすことに取り組んだ。脳と身体の代謝機能を調節するのは、視床下部という脳内でもっとも奥深い領野のひとつである。脳神経活動に必要なエネルギー供給を支える視床下部のアストロサイトが、てんかんにおける過剰神経興奮の度合いを左右する可能性がある。そこで、側頭葉てんかんの発振源として知られる海馬を電気刺激して痙攣発作を誘導して、視床下部のアストロサイトの活動や局所血流を光計測した。すると、視床下部アストロサイトの Ca^{2+} は上昇、pHはアルカリ化、血流はあまり変化しないことが示された。ところが、海馬電気刺激を数日にわたり繰り返すと、次第に痙攣発作は増悪化するとともに、アストロサイトの一過性のアルカリ化に

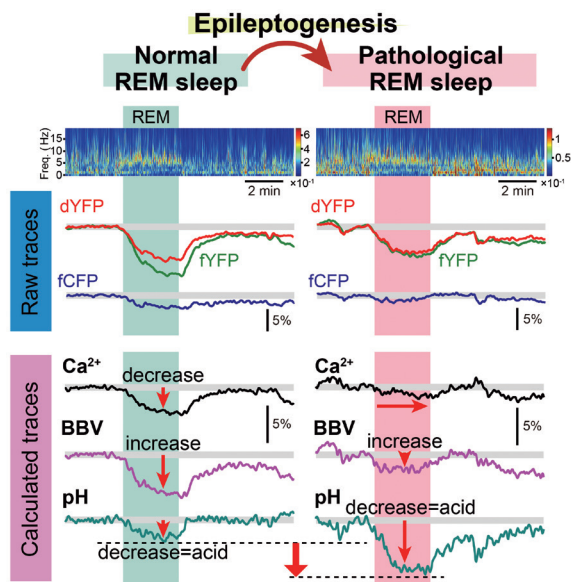


Fig. 3 健常・病態時におけるレム睡眠時の脳内環境変化

健常時においては、レム睡眠時に視床下部アストロサイトの Ca^{2+} 低下、局所脳血流量(BBV)増加、アストロサイトpH酸性化が見られた。海馬電気刺激を繰り返してキンドリングした後のレム睡眠時応答を調べると、アストロサイトpH酸性化のみが大きく亢進していた。

続く酸性化と局所血流量の増加反応が現れるようになった (Fig. 2)。アストロサイトの酸性化は、アストロサイトからの興奮性神経伝達物質グルタミン酸の放出につながることが示唆されている^{3, 4)}。グリア細胞を介した過剰興奮のフィードバック回路が働くようになり、過度な痙攣発作が生まれる可能性が考えられた。

また、生理的な条件でも、アストロサイトの活動や脳内環境に変動が見られるかどうかを調べるため、ノンレム睡眠からレム睡眠に移行する際の視床下部の蛍光信号を解析することにした。すると、レム睡眠にともない、視床下部アストロサイトが酸性化することが示された¹¹⁾。このような脳内環境変化は、レム睡眠時に特有の脳波変化に20秒近く先行するため、アストロサイトが神経機能に影響を与えることが示された。また、海馬を電氣的に刺激すると、てんかん様の発作が生じ、このような刺激を繰り返す

と、てんかん様発作症状は悪化する。てんかん発作が生じやすい病態脳でのレム睡眠を調べると、アストロサイトがより強く酸性化することになったことが分かった (Fig. 3)。したがって、レム睡眠はてんかん発展度のバイオマーカーとして使える可能性がある。また、アストロサイトのpHを安定化するなどの方法で、てんかんの発展を予防する新たな治療戦略に結び付くことが期待される。

3. 迷走神経刺激による脳内環境応答の解析

これらの研究成果を踏まえ、VNSのアストロサイトへの作用に注目し、これを最適化することで、神経活動の異常発振を局所に封じ込める脳内環境を人為的に引き出す方法を編み出すことに挑戦した。まずは、上記で確立したオプトジェネティクス・てんかん動物モデルに対して、慢性VNSを2日間にわたり実施したが、てんかん波抑制作用は生じなかった。ところが、VNSを施行中に、神経細胞への低頻度光刺激を重ねると、てんかん波が強く抑制されることが示された。さらに、上記ファイバー・フォトリ法を用いて、VNSによって惹起される脳内アストロサイト活動を光計測したところ、細胞内 Ca^{2+} 、pH、局所血流量に特有の応答が見られることが示された。

本研究を通して、慢性VNSがアストロサイトに働きかけ、脳内環境に変化が起き、神経信号伝達の可塑性が起きやすい状態 (易可塑性) が生まれた可能性が示唆された。しかし、易可塑性だけでは、神経信号伝達の真の可塑性は生じない。易可塑性の状態遷移が起きている中、適切な神経刺激が重なることで真の可塑性が生じる。この現象を利用することで、望ましい方向に神経活動のモードをシフトさせることができるようになることが期待される。

【考察】

VNSの臨床応用を進めるにあたっては、VNSが脳内のどの細胞にどのように作用しているのか、その作用機序を明らかにする必要がある。本研究で示した通り、VNSが易可塑性の状態遷移を引き起こすのであれば、その状態遷移が起

きている間に、脳神経回路を望ましい方向に導く別の刺激が必要となる。このようにVNSの持つ性質を良く理解することが、この方法の効果的な運用につながると考えられる。

【文献】

- 1) Onodera M, Meyer J, Furukawa K, Hiraoka Y, Aida T, Tanaka K, et al. Exacerbation of epilepsy by astrocyte alkalization and gap junction uncoupling. *Journal of Neuroscience* 2021 ; **41** ; 2106-2118.
- 2) Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, et al. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep* 2012 ; **2** ; 397-406.
- 3) Beppu K, Kubo N, Matsui K. Glial amplification of synaptic signals. *J Physiol* 2021 ; **599** ; 2085-2102.
- 4) Kanaya T, Ito R, Morizawa YM, Sasaki D, Yamao H, Ishikane H, et al. Glial modulation of the parallel memory formation. *Glia* 2023 ; **71** ; 2401-2417.
- 5) Asano Y, Sasaki D, Ikoma Y, Matsui K. Glial tone of aggression. *Neurosci Res*, available online, Nov 24, 2023.
- 6) Tan W, Ikoma Y, Takahashi Y, Konno A, Hirai H, Hirase H, Matsui K. Anxiety control by astrocytes in the lateral habenula. *Neurosci Res*, available online, Feb 2, 2024.
- 7) Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, et al. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nat Commun* 2016 ; **7** ; 11100.
- 8) Ikoma Y, Matsui K. Control of the central brain environment by vagus nerve stimulation. *Autonomic Nerv Sys* 2022 ; **59** ; 366-370.
- 9) Shimoda Y, Beppu K, Ikoma Y, Morizawa YM, Zuguchi S, Hino U, et al. Optogenetic stimulus-triggered acquisition of seizure resistance. *Neurobiol Dis* 2022 ; **163** ; 105602.
- 10) Ikoma Y, Sasaki D, Matsui K. Local brain environment changes associated with epileptogenesis. *Brain* 2023 ; **146** ; 576-586.
- 12) Ikoma Y, Takahashi Y, Sasaki D, Matsui K. Properties of REM sleep alterations with epilepsy. *Brain* 2023 ; **146** ; 2431-2442.

