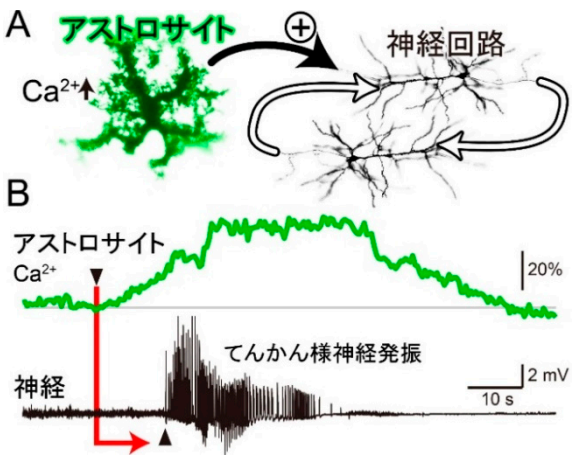
70　脳深部グリア直流刺激による拡張知能実現と脳病態制御	松井　広

【目的】本研究の目的は、脳内グリア細胞の機能操作法を確立すれば、生来の脳機能以上の性能を持つ拡張知能を実験動物に実装することができるかどうかを明らかにすることであった。学習や記憶は、神経細胞間のシナプス伝達の可塑性によって成立するが、可塑的変化が起こりやすい状態、起こりにくい状態を制御する機構を「メタ可塑性」と呼ぶ。近年、メタ可塑性を制御するのは、神経細胞とは異なるグリア細胞であることが示唆されてきた。脳深部直流電気刺激（DB-DCS）によって、グリア細胞の機能を効果的に賦活化し、ピンポイントに脳機能を一過性に増強させた拡張知能が実現できれば、最適化された適応行動を引き出す方法が編み出せる可能性がある。そこで、本研究では、まず、てんかん脳病態の解析と制御に取り組むことにした。てんかんでは、脳神経活動の発振現象や全身の痙攣発作などが生じる。これまで、当研究室では、繰り返しのてんかん様神経発振にともない、脳内で可塑的な変化が生じて、抗てんかん作用が発揮される場合があることを見出してきた。この抗てんかん作用はグリア細胞から放出された抑制性伝達物質のアデノシンによるものであった。そこで、グリア細胞の持つ抗てんかん作用を引き出すために、脳深部グリア直流刺激が使えるかどうかを調べることにした。てんかんのような極端環境では、グリア細胞機能が前面に引き出されるので、その機能を理解しやすいと考えた。てんかん病態下で発見されたグリア細胞機能を解析することで、他の脳病態の制御や拡張知能を実現するのに応用する方法が検討できる可能性がある。

【方法】本研究では、マウスの両側海馬近傍に留置したプラチナ製電極を使って脳深部を直流刺激することで、脳内グリア細胞活動を効果的に賦活化する技術を開発した。脳深部電気刺激（DBS）自体はパーキンソン病治療で既に実施されているが、「直流」の電流刺激をすることで、メタ可塑性制御を担うグリア細胞の効果的賦活化を試みた。

【結果】実験動物のマウスを用いて、脳の中の海馬に光ファイバーを埋め込み、グリア細胞の中でもアストロサイトの活動を光計測した。脳内に金属の銅を人工的に埋め込むと炎症反応が生じ、てんかん様の神経発振現象が、1 日に数回、散発的に生じるようになることが知られている。そこで、銅留置による神経過活動を調べたところ、神経発振に 20 秒程度も先立ち、アストロサイトの活動が始まることが示された。さらに、アストロサイトの活動を DB-DCS によって電気的に刺激すると、当初は、アストロサイトの持つ抗てんかん作用が引き出されることを期待したが、逆に、てんかん様神経発振が引き起こされることが示された。また、アストロサイトの代謝機能を薬で阻害する方法などを組み合わせることで、アストロサイトこそが、てんかん病態において、脳神経活動を強力に誘導していることが示された。てんかんは、異常な状態であるものの、ある意味、脳の可塑性機能が最大限に亢進した状態であるとも言える。したがって、てんかん病態時にアストロサイトによって引き起こされる神経活動の誘導作用を、DB-DCS 等によって制御することができれば、認知症等の神経可塑性が低下した病態を治療するのに適用できる可能性が示唆された。

脳内アストロサイトによる神経回路ハイパードライブ機能



70. 脳深部グリア直流刺激による拡張知能実現と脳病態制御

松井　広

東北大学 大学院生命科学研究科 超回路脳機能分野

Key words：てんかん，アストロサイト，神経発振，細胞内カルシウム，ファイバーフォトメトリー

緒　言

本研究の目的は、脳内グリア細胞の機能操作法を確立すれば、生来の脳機能以上の性能を持つ拡張知能を実験動物に実装することができるかどうかを明らかにすることであった。学習や記憶は、神経細胞間のシナプス伝達の可塑性によって成立するが、可塑的変化が起こりやすい状態、起こりにくい状態を制御する機構を「メタ可塑性」と呼ぶ。近年、メタ可塑性を制御するのは、神経細胞とは異なるグリア細胞であることが示唆されてきた。これまで、当研究室では、実験マウスにおいて脳深部直流電気刺激（deep brain direct current stimulation：DB-DCS）をすると、グリア細胞の機能を効果的に賦活化でき、老齢マウスの記憶力が増強する可能性が示唆されてきた。したがって、ピンポイントに脳機能を増強させた拡張知能により、最適化された適応行動を引き出す方法を編み出せる可能性がある。なお、ヒトの認知症等の脳病態治療にあたっても、侵襲的手術を選択する潜在的ニーズは存在する。本手法の将来的な臨床応用を見据え、まずは、グリア機能が脳内神経活動にもたらす効果の基礎原理を解明することが肝要であると思われた。

そこで、本研究では、まず、てんかん脳病態の解析と制御に取り組むことにした。てんかんのような極端環境では、グリア細胞機能が前面に引き出されるので、その機能を理解しやすいと考えた［1，2］。てんかん病態下で発見されたグリア細胞機能を解析することで、他の脳病態の制御や拡張知能を実現するのに応用する方法が検討できる可能性がある。脳内で過剰な神経活動が起こると、けいれん発作が生じることがあり、このような発作が繰り返し生じる慢性の神経疾患を「てんかん」と呼ぶ。日本人の 1%はてんかんの有病者で、そのうちの 65%の患者は薬で発作を抑えることが可能である。しかし根本的な治癒は、外科的に脳の責任部位を切除する方法だけであり、多くの患者は発作を抑えるために一生、抗てんかん薬を飲み続ける必要がある。生涯有病率 1%というのは極めて高い数字で、例えば、日本の小学校の 3 クラスに 1 名は、潜在的にてんかん患者がいても不思議ではない。このように世界中に多くのてんかん患者がいて、てんかんの基礎・臨床研究も進んでいるにもかかわらず、てんかんの発作は、どういったきっかけで起きて、どのような機序を通してより発展していくのか、明らかにされていないメカニズムは多く残されている。

てんかんのメカニズムがなかなか明らかにならない大きな理由は、てんかんの適切な動物モデルを作るのが困難だからである。神経を刺激する薬を脳内に投与したり、神経を直接電気刺激したりする方法で、実験動物のマウスに、てんかん様のけいれん発作を引き起こすことは可能である。しかし、ヒトのてんかん患者では、多くの場合、明確なきっかけがなく、突然、けいれん発作が始まる。これまで、けいれん発作が慢性的に繰り返されるてんかんの動物モデルを作ることは困難であった。また、たとえ、そのような動物モデルができたとしても、自発的な自然な発作が起きるのは、せいぜい、1 日に数回程度であるため、発作の瞬間を捉えるためには、1 日 24 時間、マウスを自由に行動させた状態で連続的に記録を取る仕組みを作り出すことが必要であった。さらに、脳神経細胞の活動は電極を使えば記録できるが、電気的な活動をともなわないグリア細胞の活動を記録するには、人工的にグリア細胞に蛍光センサータンパク質を遺伝子発現させて、蛍光の変化を観測することが必要であった。

そこで、本研究では、マウスを用いて自発的なてんかん様神経発振が生じるマウスのモデルを作製し、脳内に留置した光ファイバーでグリア細胞活動を記録するファイバーフォトメトリー法［3，4］を開発して、てんかん

様神経発振にともなうグリア細胞活動を記録することにした。また、グリア細胞活動を制御する方法として、DB-DCS を用いることにした。本研究成果の一部は、公刊学術誌に掲載された［5］。

方　法

1. 自発性てんかん様神経発振が発生するマウスモデルの作製

本研究では、海馬へ「銅」を留置することによって、てんかん様の神経過活動がおきるマウスのモデルを作り出し、グリア細胞のうちの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するマウスを用いて、自由行動下で 1 日 24 時間、1 週間程度に渡って連続的に記録をする実験を行った。脳に金属の銅を埋め込むと、その周辺に炎症反応が起こり、その炎症部分から神経細胞の過活動が広がることが知られていた。そこで、マウスの海馬に銅を留置したところ、1 日に数回程度の頻度で、てんかん様の神経発振が観察されるようになった。ただ、神経発振が観察されるのは、海馬に留置した電極からだけであり、脳全体に神経発振が伝播するまでには至らず、マウスの行動としてもけいれん発作は見られなかった。したがって、このような銅留置後の急性期の反応は、急性症候性発作と呼ばれるものであり、半年以上経過した後に観察される慢性疾患としてのてんかんとは区別されるものであった。ここでは、てんかん発症のごく初期段階として生じる急性期の反応に的を絞って解析することにした。

2. ファイバーフォトメトリー法

実験には、細胞の中のカルシウムイオン濃度に応じて、蛍光が変化するセンサータンパク質を、アストロサイトに遺伝子発現させたマウスを用いた。このマウスに銅を留置する場所からわずかに離れた位置に、光ファイバーと神経活動記録用の電極を埋め込んだ。光ファイバーを介して脳内に励起光を送り込むと、蛍光センサータンパク質から発生する蛍光が、同じ光ファイバーを介して戻ってくる。蛍光をいくつかの波長に分けて記録することで、アストロサイト細胞内のカルシウム濃度の変化を調べた。このような方法で生体内の細胞の活動を記録する方法をファイバーフォトメトリー法と呼び、当研究室ではこの方法を自由行動下のマウスから記録する手法を開発してきた［6，7］。

アストロサイトでは、電気的な活動はほとんど起きない。その代わり、細胞内のカルシウム濃度の変化を信号として、アストロサイトのさまざまな機能は制御される。カルシウム濃度変化が引き金となって、アストロサイトから伝達物質が放出されたり、細胞外イオン濃度が調節されたりすると考えられる。このような脳内局所の化学環境の変化が神経細胞の機能に影響を与えると考えられたため、アストロサイトのカルシウム濃度動態と神経活動の間の連関を調べることにした。

3. 脳深部直流刺激法（DB-DCS）

数十秒に渡り安定的に電流を流すには、分極などの問題の少ない素材を電極に用いる必要があった。また、多くの金属は脳内で炎症反応を引き起こしてしまうため、脳内に安全に留置できる電極素材としてもプラチナは最適であった。一方、銅は強い炎症反応を引き起こすことが知られているため、銅を海馬に留置することで、自発性のてんかん様神経発振が生じるマウスモデルを使用することにした。このようなてんかんモデルを用いて、てんかん発作にともない海馬のアストロサイトがどのように反応するのか、また、アストロサイト機能を DB-DCS を用いて操作すると、海馬の神経回路にどのような影響が及んで、てんかん病態はどのように左右されるのかを調べることにした。

結　果

1. てんかん様神経発振にアストロサイト活動が先行する

マウス海馬への銅留置の翌日には、時折、これまでにない大きなカルシウム濃度上昇イベントが、アストロサイトで観察されるようになった。なお、このような初期のカルシウム・イベントが起きても、海馬電極で記録される神経活動には全く変化は起きなかった。ところが、2 日目以降になると、アストロサイトでのカルシウム・イベントとともに、海馬でてんかん様の神経発振現象が見られるようになった。詳しく解析したところ、アストロサイトのカルシウム上昇のほうが、神経発振現象よりも、20 秒程度、早くに始まることが明らかになった。したがって、アストロサイトの初期のカルシウム・イベントには、後に、てんかん様神経発振が起きるように、神経回路を可塑的に変化させる役割があることが示唆された。このようにてんかんにともなう神経回路の可塑的な変化のことを、「てんかん原生の獲得」と呼ぶ。また、銅留置後 2 日目以降に発生する個々のてんかん様神経発振イベントにおいては、必ず、アストロサイトのカルシウム・イベントが先行するので、アストロサイトからの作用が引き金となって、神経細胞に過活動が生じるようになることが示唆された（図 1）。

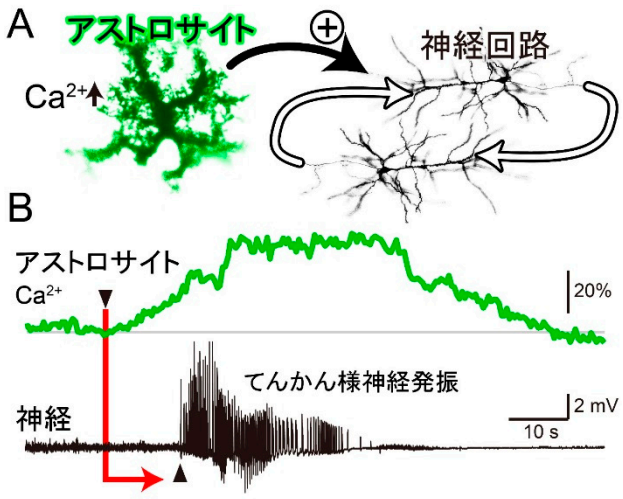


図 1. てんかん様神経発振に先行するアストロサイト Ca^{2+} 上昇

A） てんかん病態においては、神経細胞が過活動を引き起こし、神経回路が発振すると考えられている。ところが、これまで、何がきっかけとなってんかん発作イベントが発生するのかが明らかではなかった。今回の研究を通して、アストロサイトから神経細胞に向かう興奮性の作用がてんかん様神経発振を引き起こすことが示唆された。

B） 海馬に留置した光ファイバーを使って、海馬のアストロサイトの細胞内カルシウム（Ca^{2+}）濃度の変化をファイバーフォトメトリー法で計測した。また、同時に、光ファイバーに沿わせた電極で、近傍の神経活動を局所フィールド電位として記録した。銅留置モデルによって自発的に発生するてんかん発作イベントを解析したところ、神経細胞でてんかん様神経発振が始まるより、20 秒程度先だって、アストロサイトの Ca^{2+} 濃度上昇が始まることが示された。

2. アストロサイトからの作用によって神経活動が左右される

本当に、アストロサイトからの作用で、神経細胞の活動に影響が及ぶようなことがあるか。これを調べるために、アストロサイトだけを特異的に活性化させる方法を用いることにした。脳内にごく微弱な直流電流を流すと、アストロサイトにカルシウム上昇を引き起こすことができることが知られている。海馬に留置したプラチナ製の

電極に微弱直流電流を流したところ（DB-DCS)、アストロサイトで大きなカルシウム・イベントが発生し、少しの遅延があって、てんかん様神経発振イベントが続くことが示された（図 2)。また、フルオロクエン酸は、アストロサイトに特異的に取り込まれて、アストロサイトの代謝機能を阻害する作用があることが知られている。そこで、フルオロクエン酸を投与したところ、微弱直流電流によるアストロサイトのカルシウム・イベントは変わらずに生じたが、てんかん様神経発振イベントは強く抑制された。また、銅留置によって生じる自発的なてんかん様神経発振イベントについては、フルオロクエン酸を投与しても、イベントの発生頻度自体は変わらないものの、個々のイベントにおける神経発振の強度は低下することが示された（図 2)。したがって、アストロサイトの作用には、てんかん様神経発振の程度を左右する力もあることが示唆された。

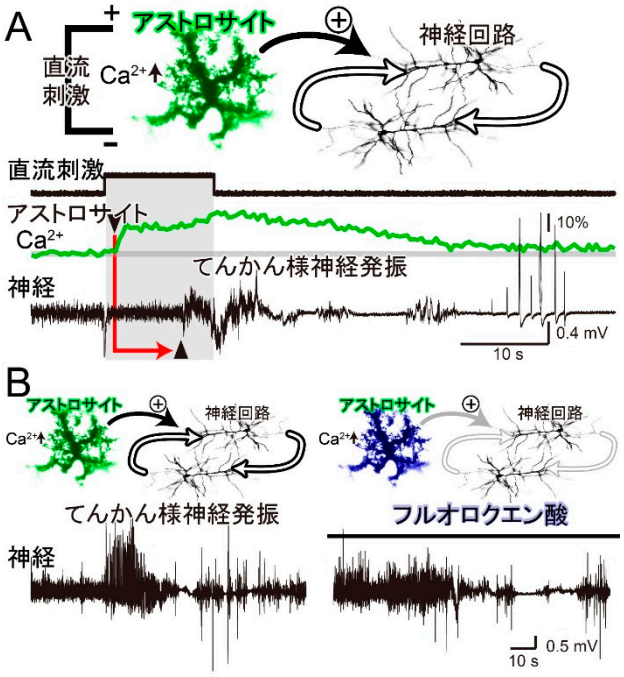


図 2. てんかん様神経発振はアストロサイトからの作用で引き起こされる

A) 海馬内で局所的に微弱な直流電流を流すと、アストロサイトに Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすことができることが示された。このようにして、アストロサイトを特異的に刺激した場合、少しの遅延の後、てんかん様神経発振が引き起こされることが示された。

B) 海馬への銅留置モデルでは、自発的にてんかん様神経発振が起きた。フルオロクエン酸は、アストロサイトに特異的に取り込まれて、アストロサイトの代謝機能を阻害することが知られている。脳内にフルオロクエン酸を投与しても、てんかん様神経発振イベント自体は生じたが、発振の程度・強度は抑えられることが示された。これらの実験により、アストロサイトからの作用がきっかけとなって、てんかん発作が生じ、アストロサイトによる興奮性信号の増幅作用により、より発展したてんかん発作が生じることが示唆された。

考　察

本研究により、脳内アストロサイトには神経活動に影響を与える力があることが示された。アストロサイトでのカルシウム・イベントは、脳神経回路に可塑的な変化を促して、てんかん原生の獲得に通じることが示された。また、個々のてんかん様神経発振イベントには、必ず、アストロサイトのカルシウム・イベントが 20 秒程度先行

することから、アストロサイトからの作用がてんかん発作の引き金となっている可能性が示唆された。さらに、アストロサイトの代謝機能をフルオロクエン酸で抑制すると、てんかん様神経発振の程度が抑制されたので、アストロサイトからの作用には、神経発振の程度を左右する力もあることが明らかになった。このように、アストロサイトはてんかん病態にとって鍵となる作用をもたらす存在であることから、アストロサイトの機能操作が、今後のてんかん治療のターゲットとなり得ることが期待される。

てんかんという極端な神経過興奮が引き起こされる病気に限らず、精神疾患も含め、さまざまな脳病態においてもアストロサイトが何らかの役割を果たすことが想像される。また、アストロサイトや他のグリア細胞、そして、血管からの作用次第で、健常時における脳情報処理の特性も左右される可能性がある［8〜10］。今回、てんかん脳病態におけるアストロサイトからの強力な作用が示されたことで、今後、脳機能におけるアストロサイトの役割を探る研究がますます加速することが予想される。

共同研究者・謝辞

本稿で紹介した研究は、超回路脳機能分野に所属する荒木峻大学院生、大西一ノ介学部学生、生駒葉子助教らによって実施されたものである。新型コロナ禍と重なり、対外交流が制限されるなか研究生活を過ごしたこともあり、研究室員のみで構成される論文業績を出すこととなった。全ての研究室メンバーの気配りと努力によって、相互支援、技術提供、議論が深まり、居心地良く優れた研究環境が構築されたことに、研究室主宰者として感謝申し上げる。

文　献

1） Onodera M, Meyer J, Furukawa K, Hiraoka Y, Aida T, Tanaka K, Tanaka KF, Rose CR, Matsui K. Exacerbation of epilepsy by astrocyte alkalization and gap junction uncoupling. J Neurosci. 2021 Mar 10;41(10):2106-2118. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2365-20.2020. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33478985; PMCID: PMC8018766.

2） Shimoda Y, Beppu K, Ikoma Y, Morizawa YM, Zuguchi S, Hino U, Yano R, Sugiura Y, Moritoh S, Fukazawa Y, Suematsu M, Mushiake H, Nakasato N, Iwasaki M, Tanaka KF, Tominaga T, Matsui K. Optogenetic stimulus-triggered acquisition of seizure resistance. Neurobiol Dis. 2022 Feb;163:105602. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105602. Epub 2021 Dec 24. PMID: 34954320.

3） Ikoma Y, Sasaki D, Matsui K. Local brain environment changes associated with epileptogenesis. Brain. 2023 Feb 13;146(2):576-586. doi: 10.1093/brain/awac355. Erratum in: Brain. 2023 Jul 3;146(7):e55. PMID: 36423658.

4） Ikoma Y, Takahashi Y, Sasaki D, Matsui K. Properties of REM sleep alterations with epilepsy. Brain. 2023 Jun 1;146(6):2431-2442. doi: 10.1093/brain/awac499. PMID: 36866512.

5） Araki S, Onishi I, Ikoma Y, Matsui K. Astrocyte switch to the hyperactive mode. Glia. 2024 Apr 9. doi: 10.1002/glia.24537. Epub ahead of print. PMID: 38591259.

6） Asano Y, Sasaki D, Ikoma Y, Matsui K. Glial tone of aggression. Neurosci Res. 2024 May;202:39-51. doi: 10.1016/j.neures.2023.11.008. Epub 2023 Nov 24. PMID: 38007191.

7） Tan W, Ikoma Y, Takahashi Y, Konno A, Hirai H, Hirase H, Matsui K. Anxiety control by astrocytes in the lateral habenula. Neurosci Res. 2024 Feb 2:S0168-0102(24)00010-5. doi: 10.1016/j.neures.2024.01.006. Epub ahead of print. PMID: 38311032.

8) Morizawa YM, Matsumoto M, Nakashima Y, Endo N, Aida T, Ishikane H, Beppu K, Moritoh S, Inada H, Osumi N, Shigetomi E, Koizumi S, Yang G, Hirai H, Tanaka K, Tanaka KF, Ohno N, Fukazawa Y, Matsui K. Synaptic pruning through glial synapse engulfment upon motor learning. Nat Neurosci. 2022 Nov;25(11):1458-1469. doi: 10.1038/s41593-022-01184-5. Epub 2022 Nov 1. PMID: 36319770.
9) Kanaya T, Ito R, Morizawa YM, Sasaki D, Yamao H, Ishikane H, Hiraoka Y, Tanaka K, Matsui K. Glial modulation of the parallel memory formation. Glia. 2023 Oct;71(10):2401-2417. doi: 10.1002/glia.24431. Epub 2023 Jun 26. PMID: 37364894.
10) Sasaki D, Imai K, Ikoma Y, Matsui K. Plastic vasomotion entrainment. Elife. 2024 Apr 17;13:RP93721. doi: 10.7554/eLife.93721. PMID: 38629828; PMCID: PMC11023696.