

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15218

研究課題名（和文）心身機能連関による脳内環境変動と病態制御

研究課題名（英文）Brain Environmental Variability and Pathological Control by Psychosomatic Functional Linkage

研究代表者

生駒 葉子（YOKO, Ikoma）

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20838510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳神経細胞の活動は、末梢神経や神経細胞の周りにあるグリア細胞から様々な制御を受ける。これまで、末梢神経である迷走神経を刺激（VNS）し、中枢へ刺激を送り込む方法で、てんかんの治療ができることが示されてきたが、そのメカニズムは不明であった。VNSから中枢脳機能変化へと至る経路には、外部からの刺激に鋭敏に反応するグリア細胞が担う可能性がある。そこで、マウスを用いて、てんかん様症状が発展する過程でグリア細胞の反応がどのように変化していくかを明らかにし、また、VNSによって抗てんかん作用を誘導した時のグリア細胞の反応も調べた。グリア細胞を介した脳内環境の変化が抗てんかん作用を生む可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんの有病率は全人口の1%にも及ぶが、てんかん焦点の外科的切除以外の根本的な治療の方法は未だに見つかっていない。その中、首のあたりにある迷走神経を脳に向かって刺激する方法（迷走神経刺激法；VNS）で、難治性のてんかんが治療されることがあることが発見されて、大いに注目を浴びているが、治療のメカニズムは明らかではない。そこで、本研究では、実験動物のマウスを用いて、てんかん様症状が発展したり、VNSによって抗てんかん作用を誘導した時の脳の活動を調べることにした。研究の結果、VNSから中枢脳機能変化へと至る経路には、外部からの刺激に鋭敏に反応するグリア細胞が担う可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The activity of neurons in the brain is subject to various regulations from peripheral nerves and glial cells around the neurons. The vagus nerve is a peripheral nerve and stimulating these nerve fibers could send signals to the central brain and such vagus nerve stimulation (VNS) has been used to cure epilepsy in human patients. However, the mechanisms of the VNS therapy is still unknown. It is possible that VNS affects the glial cells in the brain, which are sensitive to external stimuli. In this study, I used mice to clarify how the response of glial cells changes during the development of epileptiform symptoms, and also examined the response of glial cells when antiepileptic effects are induced by the VNS. It was suggested that glial cell-mediated changes in the brain environment may produce antiepileptic effects.

研究分野：脳科学

キーワード：グリア細胞 迷走神経刺激 てんかん 脳内環境 心身機能連関 ファイバーフォトメトリー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳内環境は、末梢神経やグリア細胞から様々な制御を受ける(総説; Ikoma and Matsui, *Autonomic Nerv Sys* 2022)。体調や気分次第で思考そのものが変わるの、末梢/グリアからの影響によるものと考えられる。本研究では、過剰興奮が起きるてんかんをモデルとして、脳内環境次第で、てんかん脳/抗てんかん脳ができる仕組みを解明することを目的とした。特に、末梢神経である迷走神経を求心性に刺激し、中枢脳へ刺激を送り込む方法を活用した。

てんかんの有病率は全人口の1%にも及ぶが、てんかん焦点の外科的切除以外の根本的な治療の方法は未だに見つかっていない。その中、首のあたりにある迷走神経を脳に向かって刺激する方法(迷走神経刺激法; VNS)で、難治性のてんかんが治療されることがあることが発見されて、大いに注目を浴びているが、治療のメカニズムは明らかではない。そこで、本研究では、実験動物のマウスを用いて、てんかん様症状が発展したり、VNSによって抗てんかん作用を誘導したりした時の脳の活動を調べることにした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、VNSから中枢脳機能変化へと至る経路には、外部からの刺激に鋭敏に反応するグリア細胞が担う可能性を検証することであった。グリア細胞が放出したり、回収したりする伝達物質、代謝産物、イオンなどの局所濃度は刻々と変化し、神経細胞の活動状態を左右している可能性がある。本研究では、VNSと中枢神経刺激を組み合わせ、グリア細胞活動を的確に誘導し、病態制御の最適化を目指した。本研究成果は、てんかん治療のみならず、他の脳病態制御にも応用できる可能性がある。本研究の目的は、心身機能連関のメカニズムを明らかにすることで、心の成り立ちを全身性に理解することである。

### 3. 研究の方法

本研究では、脳神経細胞の過剰興奮が引き起こされるてんかんをモデルとして、てんかん時の脳内環境や抗てんかん状態時の脳内環境が変化する仕組みを解明することを目的とした。

本研究者は、これまで、神経細胞に光感受性分子 channelrhodopsin-2 (ChR2) を遺伝子発現させたラットを用いて、海馬に連発光刺激をすることを繰り返すと、てんかん様神経発振が増悪化し、続いて、抗てんかん作用が現れることを示してきた(Shimoda, **Ikoma** et al., *Neurobio Dis* 2022)。このような中枢刺激性の抗てんかん作用と迷走神経刺激(VNS)による抗てんかん作用との作用機序を比較する実験を実施することにした。そこで、マウスやラットの小動物においてVNSをするため、頸部迷走神経にカフ電極を留置して、迷走神経の活動を記録して制御する技術を確立することにした。さらに、本研究では、てんかんの発展や抗てんかん作用の獲得にともなう脳内環境の変化を、光ファイバーフォトメトリーシステムを用いて検証する方法を確立することにした。この研究には、グリア細胞特異的に蛍光Ca<sup>2+</sup>センサーYCnano、蛍光pHセンサーを発現する遺伝子改変マウス(MIc1-tTA::tet0-YCnano、MIc1-tTA::tet0-E2GFP)を用いた。これらの研究を実施する上で、動物を自由行動下で24時間、脳波記録・ビデオ行動解析・光刺激・光計測できる装置を稼働し、週に渡る記録を実施した。

### 4. 研究成果

これまで、てんかんと抗てんかん作用をオプトジェネティクスで検討する研究を行い、抗てん

かん作用は、脳内の抑制性アデノシンが増えることが実現されることが示された (Shimoda, [Ikoma et al., Neurobiol Dis 2022](#))。そこで、引き続いて、抗てんかん作用の獲得時の迷走神経の活動を記録することを試みた。頸部迷走神経に巻きつけたカフ電極を使えば、自然な迷走神経活動を記録することも可能であるが、筋電等の様々なアーティファクトが混ざり合うため、その中から正確な波形を導き出すのは困難であることが判明した。そこで、波形解析の有効なプロトコルを検討したところ、迷走神経活動は数十  $\mu\text{V}$  程度の振幅しかない高速な現象であるため、25 kHz もの高速サンプリングが必要であったが、テンプレートマッチング法を使えば、ノイズの中からスパイクを取り出すことが可能であることが示された。てんかん発症時と抗てんかん獲得時とで、海馬神経細胞 ChR2 連発光刺激に対する迷走神経活動が異なる可能性が示唆されたので、上記の精緻な迷走神経活動記録法を適用することで、さらなる解析を現在試みている。

また、迷走神経活動を記録するカフ電極を用いて迷走神経を刺激することができたが、適切な強さの刺激を決めるのが困難であった。本研究者は、これまで、心拍や体温等の身体反応を記録する技術も修得してきた (Miyata, [Ikoma et al., IBRO Neuro Rep 2022](#))。そこで、この技術を適用したところ、迷走神経を刺激すると遠心性にもその効果は伝わり、心拍数の低下が観察されることが示された。適切な刺激の強さを決めるのに、心拍数の低下がひとつの指標となることが示された。ヒト臨床で使われている迷走神経刺激 VNS のプロトコルを模したスケジュールで刺激してみたところ、明確な抗てんかん作用は見られなかった。もっともヒトの場合は数ヶ月以上の VNS によって初めて効果が現れるとされているが、ここでラットに用いたのは数日程度の期間ではあった。続いて、VNS と中枢海馬の刺激とを組み合わせた刺激を数日間だけ実施したところ、効果的な抗てんかん作用が獲得されることが示された。短期間での効率的な抗てんかん作用の獲得プロトコルだと考えられたが、上記の ChR2 光刺激誘導性の抗てんかん作用とは異なり、抑制性アデノシンの作用向上によるものではないことが示唆された。引き続き、抗てんかん作用を最大限引き出す刺激プロトコルを探索しつつ、その作用機序を明らかにすることに取り組んでいる。

てんかんの発症や抗てんかん作用の獲得時の脳内環境変動を調べるため、脳細胞内カルシウム、pH、局所脳血流量等の脳内環境の変化を、ファイバーフォトメトリー法で光計測する方法を開発した (Moriya, [Ikoma et al. Neural Reg Res 2022](#); [Ikoma et al. Brain 2023a](#); [Ikoma et al. Brain 2023b](#))。本研究では、マウスを用いて、海馬電気刺激を繰り返す(キンドリングする)ことでてんかん様症状を誘導し、てんかん発症に伴う脳内環境の変化を明らかにした。実験には、アストロサイト特異的にカルシウムセンサーや pH センサーを発現している遺伝子改変マウスを使用し、脳内代謝制御に主要な役割を果たす視床下部に光ファイバーを留置した。海馬電気刺激によっててんかんを誘導し、てんかん発症時の視床下部での脳内環境変化をファイバーフォトメトリー法で検討した。今回用いた FRET 型  $\text{Ca}^{2+}$  センサーでは、本来、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇すると CFP 蛍光が減少し、YFP 蛍光が上昇し、鏡像応答波形が得られることが期待される。しかし、生体脳では血流の変化や細胞内 pH の変化に、それぞれの蛍光が影響されることが明らかになった。そこで、アストロサイトのカルシウム、pH、局所血流量の変化の全ての要素を分離して算出するマルチプレキシング法を新たに開発した。この新方式を用い、てんかん発症に伴う脳内環境変化を検討したところ、視床下部アストロサイトのカルシウム増加、pH の酸性化、局所血流量の増加がみられた。以上の結果から、てんかんの増悪化には、グリア細胞から神経細胞への作用があることが示唆された ([Ikoma et al. Brain 2023a](#))。なお、これまで、脳梗塞などの病態時でもない限り、脳細胞内の pH は比較的安定に保たれ、酸性化やアルカリ化等の pH 変動はあまり起きないと考えられてきた。ところが、本研究を通して、生理学的状況下においても、REM 睡眠中に

アストロサイトが酸性化することが明らかになった。さらに、てんかん誘導前に比べ、てんかん病態時には、REM 睡眠中のグリア細胞の酸性化が強化されることが示され、研究成果を *Brain* 誌で論文発表した ([Ikoma et al., Brain 2023b](#))。

なお、これらの研究技術は、自由行動下での生体内 *in vivo* マウスの脳内環境を調べる研究に発展的に応用され、所属研究室からの研究成果に共著者として参画した ([Araki, Ikoma et al., Glia 2024](#); [Tan, Ikoma et al., Neurosci Res 2024](#); [Asano, Ikoma et al., Neurosci Res 2024](#))。上記の研究はいずれも深部の脳内環境変化を探る研究であったため、ファイバーフォトメトリー法を活用したが、脳表面であれば、蛍光マクロ実体顕微鏡を用いて頭蓋骨越しに局所血流量を含め、脳内環境を計測できることも示してきた ([Sasaki, Ikoma et al., eLife 2024](#))。現在、この技術を用いて、VNS から始まった中枢の反応が、全脳にどのように広がるのかを明らかにすることに取り組んでいる。

今後は、末梢から中枢への刺激を送り込むことで脳内環境変化を誘導し、抗てんかん時の脳内環境とグリア細胞機能変化を光計測することに取り組むことを予定している。なお、中枢から末梢向きの迷走神経刺激については、オプトジェネティクスを用いた方法を適用した研究に共著者として参加した ([Kawana, Ikoma et al., Nat Biomed Eng 2023](#))。また、本研究では、主に生体内 *in vivo* マウスの視床下部の脳内環境変化に注目してきたが、急性脳スライス標本を用いて視床下部での神経活動を精緻に記録するパッチクランプ技術も身につける機会もあった ([Sato, Ikoma et al., J Neuroendocrinol 2023](#))。今後は、これらの研究技術を統合し、中枢 末梢同時刺激などによって、効果的に脳内環境変化を誘導し、てんかん治療の最適化を図る。本研究により、病態制御のメカニズムが明らかになるだけでなく、末梢神経やグリア細胞を介した心身機能連関の基本メカニズムが解明されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Ikoma Yoko, Takahashi Yusuke, Sasaki Daichi, Matsui Ko	4. 巻 146
2. 論文標題 Properties of REM sleep alterations with epilepsy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 2431 ~ 2442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awac499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikoma Yoko, Sasaki Daichi, Matsui Ko	4. 巻 146
2. 論文標題 Local brain environment changes associated with epileptogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 576 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awac355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 生駒 葉子, 松井 広	4. 巻 59
2. 論文標題 迷走神経刺激による中枢脳内環境制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 366 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32272/ans.59.4_366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyata Kohei, Ikoma Yoko, Murata Koshi, Kusumoto-Yoshida Ikue, Kobayashi Kenta, Kuwaki Tomoyuki, Ootsuka Youichirou	4. 巻 12
2. 論文標題 Multifaceted roles of orexin neurons in mediating methamphetamine-induced changes in body temperature and heart rate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IBRO Neuroscience Reports	6. 最初と最後の頁 108 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibneur.2022.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimoda Yoshiteru, Beppu Kaoru, Ikoma Yoko, Morizawa Yosuke M., Zuguchi Satoshi, Hino Utaro, Yano Ryutaro, Sugiura Yuki, Moritoh Satoru, Fukazawa Yugo, Suematsu Makoto, Mushiake Hajime, Nakasato Nobukazu, Iwasaki Masaki, Tanaka Kenji F., Tominaga Teiji, Matsui Ko	4. 巻 163
2. 論文標題 Optogenetic stimulus-triggered acquisition of seizure resistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105602 ~ 105602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriya Shunpei, Yamashita Akira, Masukawa Daiki, Sakaguchi Junichi, Ikoma Yoko, Sameshima Yoshimune, Kambe Yuki, Yamanaka Akihiro, Kuwaki Tomoyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Involvement of A5/A7 noradrenergic neurons and B2 serotonergic neurons in nociceptive processing: a fiber photometry study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 881 ~ 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.322465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Takayuki, Sugaya Takuma, Talukder Ashraf Hossain, Tsushima Yuki, Sasaki Shotaro, Uchida Katsuya, Sato Tatsuya, Ikoma Yoko, Sakimura Kenji, Fukuda Atsuo, Matsui Ko, Itoi Keiichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Dual action of serotonin on local excitatory and inhibitory neural circuits regulating the corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e13351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.13351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawana Yohei, Imai Junta, Morizawa Yosuke M, Ikoma Yoko, ..., Matsui Ko, Katagiri Hideki	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Optogenetic stimulation of vagal nerves for enhanced glucose-stimulated insulin secretion and cell proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-023-01113-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asano Yuki, Sasaki Daichi, Ikoma Yoko, Matsui Ko	4. 巻 202
2. 論文標題 Glial tone of aggression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 39 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2023.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tan Wanqin, Ikoma Yoko, Takahashi Yusuke, Konno Ayumu, Hirai Hirokazu, Hirase Hajime, Matsui Ko	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Anxiety control by astrocytes in the lateral habenula	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2024.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ikoma Y, Sasaki D, Matsui K
2. 発表標題 Brain environmental changes associated with epilepsy development and sudden death.
3. 学会等名 Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takahashi Y, Sasaki D, Ikoma Y, Matsui K
2. 発表標題 Brain environmental changes precede neuronal activity shifts to REM sleep.
3. 学会等名 Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生駒葉子
2. 発表標題 こころとからだをつなぐ 末梢神経とグリア細胞
3. 学会等名 WPJ-WEBシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生駒葉子
2. 発表標題 神経回路動作と行動変容につながる脳内環境シフトの光計測
3. 学会等名 第33回神経行動薬理若手研究者の集い (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ikoma Y
2. 発表標題 Optical measurements of brain environment shifts dependent on brain states
3. 学会等名 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takahashi Y, Ikoma Y, Matsui K
2. 発表標題 Cortical wide energy dynamics in REM sleep
3. 学会等名 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2024年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 超回路脳機能分野 メンバーページ  
<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/member-YokoIkoma.html>  
researchmap 生駒葉子  
<https://researchmap.jp/neko22>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------