

研究終了報告書

「末梢光変調による精神機能調節の解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：佐々木 拓哉

1. 研究のねらい

脳は神経投射を介して末梢臓器機能を支配するが、生命システムには「末梢臓器が脳の精神機能に影響を及ぼす潜在的な仕組み」も同等に存在する。実際に、内臓機能に異変が生じると認知機能や覚醒レベルにも影響を及ぼすことが知られている。また正常時でも、恒常的な内臓活動が無意識の精神状態を制御している可能性がある。このような末梢中枢連関の詳細な実態はほとんど明らかではない。

各脳領域と各末梢臓器は独自の周期的な活動をしており、迷走神経をはじめとした末梢神経系を通じて相互に影響を及ぼしている。本研究では、こうした生体電気信号を網羅的に捉える大規模計測法を確立する(目標 1)。次に、光操作法にて特定の生体リズムを高い時空間解像度をもって変調させる技術を開発する。従来の主流は電極を用いた電気刺激だが、これは電気ノイズが含まれ、標的部位での空間選択性がないなどの問題がある。数十ミリ秒単位の時間解像度と細胞種・部位選択的な空間解像度の両者を併せた活動変調を実現するには、光刺激が最も適切である。しかし、現状では末梢臓器の光操作は未成熟の段階にある。本研究では、新しい末梢光操作法を構築し、初めて検証できる末梢中枢連関の因果的実証に挑む。具体的には以下の技術的課題に取り組み、「局所から全身」へと新たな光生命科学研究を発展させることを目指す(目標 2)。(1)末梢臓器・自律神経への光感受性遺伝子の発現。(2)生体に埋め込むための小型 LED およびそれを無線制御できる光刺激装置の開発。(3)ミリ秒単位の時間解像度を有する末梢光変調法の開発。(4)光変調と大規模計測法との融合。これらの技術をもって、以下の生命現象を明らかにすることを目指す(目標 3)。(1)多様な精神状態(外界刺激受容や情動興奮)における末梢臓器や自律神経活動を記述する。(2)末梢活動の光操作による精神状態の遷移や情動行動の表出を検証する。(3)それらの生命現象に関わる具体的な脳部位や自律神経投射を同定する。以上、本研究にて開発する新たな光変調技術によって、精神機能発現における末梢活動の位置づけを理解し、末梢臓器を起点とする精神機能調節を提唱する研究を目指す。本課題は、生理学、神経科学、心理学など様々な分野に波及が期待される。

2. 研究成果

(1)概要

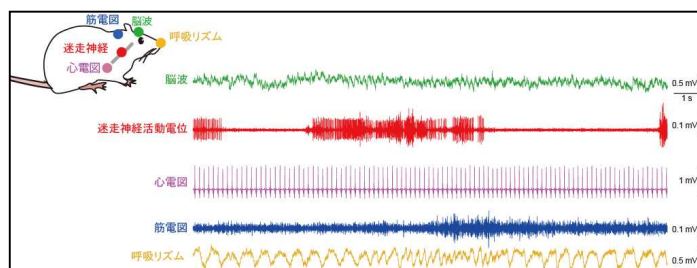
本研究では、実験動物から表出した生理活動を捉えるために、1つの動物個体から、多数の脳領域、心電図や筋電図、呼吸リズム、迷走神経の活動電位を同時に計測する技術を確立した。特に迷走神経計測では、神経束全体を巻き付けるようなカフ型電極の活用が効果的であった。この技術を用いて、新奇環境では迷走神経の発火頻度が増加すること、こうした増加は常に一定ではなく動物の移動速度と単純に相関するだけではないことを見出した。次に、求心性または遠心性迷走神経を選択的に光操作するために、複数のバイジェニックマウスを活用した。VgluT2-Cre::LSL-ChR2 マウスにおいては求心性迷走神経、

ChAT-Cre::LSL-ChR2 マウスにおいては遠心性迷走神経を光操作することが可能となり、両方向の迷走神経をそれぞれ選択的に活性化できるようになった。このような線維種選択的な活性化は、計測点を増やした新たなカフ型電極を用いることで、活性化された線維の伝播方向に沿った電気信号としても確認できた。この電極は、光刺激のみならず自発的に発生する迷走神経の集合活動パターン解析にも有用であると考えている。併行して、末梢部位に慢性的に埋め込む光照射装置の開発に取り組み、カフ型に LED を配置する光照射装置を開発した。また、これらの装置を肋骨下に設置する手術法を確立した。迷走神経活動が脳の精神変調にどのような影響を及ぼすか調べたところ、特定の情動行動や社会性行動時には迷走神経の活動頻度が一過的に増大し、特に前頭前皮質や扁桃体の脳波の特定周波数帯のパワー変動と強く相関することが明らかになった。一方で、他個体から物理的に強い攻撃を受けるような社会的敗北ストレスを負荷して同様の検討を行ったところ、動物の不安様行動の増加と社会相互作用が低下しており、同時に迷走神経の活動頻度が減少し、上記の脳波パワー変動が観察されなくなった。このようなストレス負荷動物において迷走神経を光刺激したところ、同脳領域の脳波パワーの回復や行動パターンの回復が観察された。以上の結果より、ストレス負荷による脳機能・精神活動の低下に迷走神経活動が関与しており、ストレス誘発性精神変調の改善戦略の1つとして、迷走神経刺激が有用であることが示唆された。

(2) 詳細

研究目標 1 「迷走神経を含む全身の電気信号を網羅的に捉える計測法の確立」

本研究者はこれまで、齧歯動物の脳に多数の電極を慢性的に埋め込み、脳波電気信号を計測する技術を扱ってきた。ここでは、すべての電極からの信号を頭部に設置した電子基板に集約させる。本技術を末梢臓器にまで応用し、心電図や筋電図、呼吸リズムなどの電気信号を同時に集約させるアイデアを着想した。実際に、このアイデアは早期に実現された。さらに本研究では、末梢臓器と脳を繋ぐ迷走神経に着目するため、迷走神経に電極を付着させ、迷走神経を伝播する活動電位を集約させる技術の確立に取り組んだ。このために、まずは麻酔下の動物を用いて、迷走神経の活動電位を記録できる実験系の確立に取り組み、電極設置の手術を繰り返し検討したところ、迷走神経全体を巻き付けるようなカフ型電極が最も適していることがわかった。この電気信号を集約させて、自由行動動物における迷走神経の活動電位信号を計測する方法を確立した。以上を以て、当初目標とした迷走神経を含む生体から表出する生理活動を計測する技術は確立された。



迷走神経については、自由行動中にどのような活動を生じているか、その実態は解明されていない。そこで、休憩箱と新奇フィールドの中をラットに探索させ、迷走神経の活動頻度の変化を調べた。その結果、新奇環境では迷走神経の発火頻度が増加すること、こうした増加は常に一定ではなく動物の移動速度と単純に相関するだけではないことを見出した (Shikano et al., Eur J Neurosci, 2018)。

研究目標 2 「末梢臓器・迷走神経の光操作法の開発」

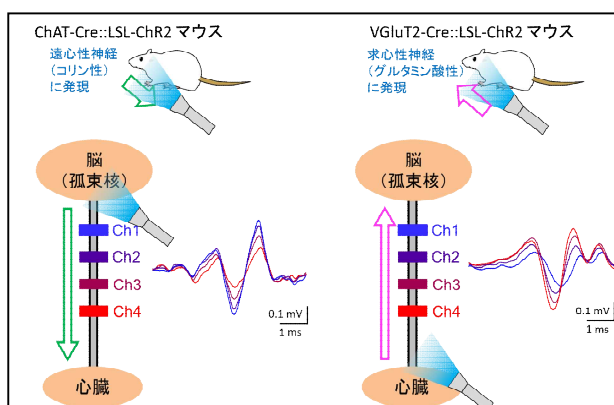
心臓の光操作

はじめに、心臓に光感受性分子 ChR2 を発現させて、光刺激により心拍数を変動させる実験系の確立を目指した。開胸の後、心臓に直接ウイルスベクターを注入する手術を行い、数週間後に心臓に光を照射した。10 匹程度のマウスの検討をしたが、光刺激タイミングで心拍数が変動した成功例は 1 匹のみであり、また大量(通常の脳への適用の 10 倍以上)のウイルスベクターを必要とすることがわかった。このことから、本研究の目的達成のために、心臓での光操作は効率が良くなく、迷走神経の光操作を検討すべきとの結論に至った。

方向選択的な迷走神経の光操作

迷走神経は、末梢から脳に伝わる求心性迷走神経と、脳から末梢に伝わる遠心性迷走神経の 2 つに大別される。これらは、従来の研究では電気刺激により、区別されずに刺激されてきたことがほとんどであった。しかし、両者を分離しなければ、正確な生理的意義を知ることはできない。

求心性または遠心性迷走神経特異的に ChR2 を発現するマウスを得るために VgluT2-Cre::LSL-ChR2 (小房型グルタミン酸トランスポータープロモーター下で発現) または ChAT-Cre::LSL-ChR2 (コリンアセチルトランスフェラーゼプロモーター下で発現) バイジェニックマウスを繁殖させ、安定に供給できる実験環境を整えた。VgluT2-Cre::LSL-ChR2 マウスにおいて、迷走神経直下または求心性迷走神経の細胞体が存在する結節性神経節に光刺激を行ったところ、迷走神経の発火が誘導された。また、ChAT-Cre::LSL-ChR2 マウスにおいても、迷走神経直下または遠心性迷走神経の起始部である脳の擬核に光刺激を行ったところ、迷走神経の発火が誘導された。それぞれのマウスを使い分けることで、両方向の迷走神経をそれぞれ選択的に活性化できるようになった。加えて、このような活動を効率的に計測できるカフ型電極の開発を試みた。そのために、カフ型電極の計測点を数百マイクロメートル間隔に配置し、4 つに増やした。この電極を用いて迷走神経光刺激応答を記録したところ、前述の方向選択的な光刺激に対して、活性化された線維の伝播方向に沿った電気信号を確認できた。



迷走神経の無線光刺激

併行して、末梢部位に慢性的に埋め込む光照射装置の開発に取り組んだ。まずは 1 ミリメートル四方程度の青色 LED (最大出力 30 mW) を赤外線無線操作する装置を作成した。照射部位での発熱が懸念されていたが、長期間の点灯ではなく一定間隔の点滅を繰り返すことで放熱を促進し、ほぼ解消することができた。しかし、この形状では、標的とする迷走神経線維に効率的に光を照射することは容易ではなかった。そこで、上述の計測法からヒントを得て、カフ型電極と同じように、カフ型に LED を配置する光照射装置を開発した。最大出力は 20

mW であり、同様に無線操作ができることを確認した。この装置により、さらに効率的に迷走神経直下の光刺激が可能となった。また、これらの装置を肋骨下に設置するような手術法が完成し、問題なく実行できるようになった。

研究目標 3 「末梢活動の光操作による精神機能変動の解析」

迷走神経活動が脳の精神変調にどのような影響を及ぼすか調べるために、情動や社会性行動に関わる大脳新皮質および辺縁系の神経活動計測と迷走神経の計測・操作を組み合わせた計測を行った。

はじめに、一般的な不安様行動を測定する高架式十字迷路試験や社会相互作用試験を用いて、こうした生理活動を測定し解析を行ったところ、オープンな環境や他個体と社会相互作用する期間には、迷走神経の活動頻度が一過的に増大し、これらが特に前頭前皮質や扁桃体の脳波の特定周波数帯のパワー変動と強く相関することが明らかになった。また、上述にて確立した求心性迷走神経の光操作技術を用いて迷走神経を活性化させたところ、同様の脳波パワー変動が観察された。次に、他個体から物理的に強い攻撃を受けるような社会的敗北ストレスを負荷して同様の検討を行ったところ、動物の不安様行動の増加と社会相互作用が低下しており、同時に迷走神経の活動頻度が減少し、上記の脳波パワー変動が観察されなくなった。以上の結果をまとめると、社会的敗北ストレスにより、正常な迷走神経活動と前頭前皮質・扁桃体の脳波が減弱しており、迷走神経を活性化させることで脳活動と動物行動が回復できる可能性が示唆された。この可能性を検証するため、社会的敗北ストレスを負荷した動物において迷走神経を光刺激したところ、予想通りの結果が観察された。以上の結果より、ストレス負荷による脳機能・精神活動の低下に、迷走神経活動が関与しており、ストレス誘発性精神変調の改善戦略の1つとして、迷走神経刺激が有用であることが示唆された。

3. 今後の展開

より強力な ChR2 分子の発現方法として、遺伝子改変動物だけでなく、ウイルスベクターを活用した検討も進めている。特に、特定の臓器(心臓や腸など)に由来する迷走神経枝のみを標的とすることができれば、各臓器との神経連絡の意義をより詳細に追究できる有用なツールになると期待される。

また、脳で活用されているオプトタグ法の原理を迷走神経にも応用できないか検討を進めている。すなわち、多点電極で計測された多数の活動電位波形において、光刺激に応答した1つ1つの線維ユニットの活動を分離できないか検討している。解析行程が相当複雑であり、今のところ成功には至っていないが、今後も電極形状(記録点のサイズなど)の改善やイメージング法との併用など検討を繰り返す予定である。

本研究では、迷走神経活動が精神機能に及ぼす影響の一端を解明できたが、この影響は一義的ではなく、生体の状態や各神経種によっても複雑である。また、両者を繋ぐ詳細な神経メカニズム(神経調節因子の関与や他の脳領域の関与など)は未解明である。今後も、本研究で確立した技術を用いて、1つ1つの生理現象を地道に調べていく予定である。

4. 自己評価

当初目標とした迷走神経の計測・光操作法の確立は、ほぼ予定通り達成できたと考えている。

また、末梢臓器が精神機能に及ぼす影響という研究対象は、本研究期間だけでは全貌を明かすことが到底不可能であるが、本研究において迷走神経活動と相関する脳領域を見出し、本光操作法を用いて因果関係およびストレス応答への関与を示唆できたことは、この壮大な研究対象に挑む第一歩になったと考えている。他にも、類似の技術を用いて、神経科学分野の論文を複数発表することができた。

迷走神経は多数の臓器と関わるため、本研究課題を応用させて、他の研究者と多くの共同研究を開始することができた。特に、迷走神経刺激は、ヒトの抵抗性うつ病をはじめとした疾患の治療にも適用されており、他の疾患への応用も期待されている。本研究で開発された計測法および光操作法はそのような基礎研究を推進する重要なツールの1つであり、正確な生理学的エビデンスに基づいた治療法およびメカニズムの提案に貢献できると期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 23件 (Corresponding author, first author)、3件 (co-author)

1. H. Igata, Y. Ikegaya, T. Sasaki. Prioritized experience replays on a hippocampal predictive map for learning. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, in press

ラットの海馬に多数の電極を埋め込み、新しい行動戦略を学習する際の神経活動を記録した。海馬の神経細胞が、学習した空間情報や将来の行動を効率的に行うための情報を優先順位付けて再生(リプレイ)することを示した。この成果は、神経科学研究のみならず、機械学習を効率的に進めるための計算アルゴリズムとしても重要な機能と考えられる。

2. Y. Shikano, Y. Nishimura, T. Okonogi, Y. Ikegaya, T. Sasaki. Vagus nerve spiking activity associated with locomotion and cortical arousal states in a freely moving rat. European Journal of Neuroscience, 2019, 49: 1298-1312.

マウスやラットの頸部迷走神経にカフ型電極を装着し、脳波や心電図と同時に迷走神経スパイクを自由行動条件にて計測した。同計測技術は、本研究で開発した世界初の方法である。迷走神経の活動頻度は運動中に上昇することを見出し、さらに静止時には末梢臓器の活動状態に応じて活動期と非活動期に分類されることを見出した。このような状態遷移は、脳波レベルの覚醒状態ともよく一致したことから、迷走神経が脳活動に及ぼす可能性が示唆された。

3. T. Sasaki, VC. Piatti, E. Hwaun, S. Ahmadi, JE. Lisman, S. Leutgeb, JK. Leutgeb. Dentate network activity is necessary for spatial working memory by supporting CA3 sharp-wave ripple generation and prospective firing of CA3 neurons. Nature Neuroscience, 2018, 21: 258-269.

複数の報酬の場所を覚えるような迷路課題をラットに解かせて、海馬-歯状回が作業記憶に必要な脳領域であることを示した。また、海馬の神経細胞は、保持すべき空間作業記憶に対応して、様々な同期活動を生じることを見出した。また、これらの同期活動には動物の行動を予測する情報が含まれることを示した。この成果は、動物が一連の特定の作業を実行する際に、1つ1つの作業行程を予測(あるいはタグ付け)し、効率的な行動をとるために重要な

脳メカニズムであると考えられる。

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- ・ 「自由行動中の動物からの中枢末梢活動信号と迷走神経の同時計測・操作」、第72回日本自律神経学会総会、日本・北九州、2019年11月3日

受賞

- ・ 日本薬学会奨励賞、「脳の情報処理と末梢機能制御メカニズムの解明」、2019年3月20日
- ・ 文部科学大臣表彰若手科学者賞、「脳機能を実現する神経回路動態の研究」、2020年4月13日

プレスリリース

- ・ 「新しい学習に必要な脳の情報リプレイを解明」、2020年12月22日
- ・ 「作業記憶(ワーキングメモリ)の脳メカニズムを解明」、2018年1月16日