

2023年2月27日

報道機関 各位

東北大学大学院生命科学研究科

東北大学大学院医学系研究科

夢見るグリアの酸性化 てんかん病態時に酸性化が増強する

【発表のポイント】

- ・ マウス脳内環境を光ファイバーで読み出したところ、レム睡眠^{注1}時に生じる様々な環境変化のうち、視床下部^{注2}グリア細胞^{注3}が酸性化することを新たに発見しました。
- ・ グリア細胞や血管は、神経細胞と協調して、睡眠等の脳機能変化を担うことが示唆されました。
- ・ てんかん^{注4}発作が生じやすい状態では、レム睡眠時の酸性化が強化されました。
- ・ レム睡眠時の脳内環境を計測しててんかんの程度を診断し、グリア機能を操作することで、てんかんを制御する新たな治療戦略が開拓されることが期待されます。

【研究概要】

私たちは、目を閉じて寝ている間でも、レム睡眠と呼ばれる特定の時期に夢を見ると言われており、レム睡眠時には脳内で特有の情報処理が行われていることが示唆されています。東北大学大学院生命科学研究科の生駒葉子助教、松井広教授(大学院医学系研究科兼任)らのグループは、レム睡眠時の視床下部の脳内環境の変化を調べました。蛍光センサータンパク質^{注5}をグリア細胞のうちのアストロサイト^{注6}に遺伝子発現させたマウスに細い光ファイバーを刺し入れ、光信号解析の新手法^{注7}を使ったところ、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ました。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ました。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します。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ようになったことが分かりました。したがって、レム睡眠はてんかん発症度のバイオマーカーとして使える可能性があります。また、アストロサイトの pH を安定化するなどの方法で、てんかんの発症を予防する新たな治療戦略に結び付くことが期待されます。

本研究成果は、2023年3月3日付で Brain 誌にオンライン掲載されました。

【研究内容】

レム睡眠と呼ばれる特定の時期に、過去の経験を記憶として整理し、夢を見ると考えられています。たくさんの神経細胞の電氣的活動が合わさったものが脳波^{注8}であり、レム睡眠時には特有の周波数の脳波が計測されます。したがって、レム睡眠時には脳内で特有の情報処理が行われていることが示唆されています。それでは、電氣的には記録されない脳内の環境も、脳内情報処理のモードの変化と連動するのでしょうか。脳の半分を占めるグリア細胞は、従来、脳内情報処理には関わらず、単に神経細胞の間隙を埋める「ノリ」のような存在であると考えられてきました。しかし、グリア細胞は、神経細胞とは異なり、脳波では観測されない別の信号を使って、脳内情報処理に関わる可能性があります。

東北大学大学院生命科学研究所の生駒葉子(いこま ようこ)助教、高橋佑輔(たかはし ゆうすけ)大学院生、佐々木大地(ささき だいち)大学院生、松井広(まつい こう)教授(大学院医学系研究科兼任)らのグループは、光ファイバーを用いて動物の生体脳の情報を読み取る新手法(改良型ファイバーフォトメトリー法)を開発し、レム睡眠時の視床下部の脳内環境の変化を調べました。

視床下部は、睡眠や代謝を制御していることが知られています。今回、蛍光センサータンパク質をグリア細胞のうちのアストロサイトに遺伝子発現させたマウスの視床下部に細い光ファイバーを刺し入れ、光信号解析の新手法を使いました。すると、レム睡眠にともない、視床下部のアストロサイト細胞内カルシウム濃度は低下し、細胞内 pH は酸性化し、局所血流量は増加する等の脳内環境の変化が生じることが示されました。これまでも、レム睡眠時の蛍光変化は調べられてきましたが、細胞内外の pH が変動する可能性、局所血流量の変化が蛍光測定値に影響する可能性について検討されてこなかったため、誤った結論が出されていた可能性があります。

今回、開発された新手法では、生理的な状態での脳内活動の変化にともない、細胞内が酸性化することを新たに発見しました。細胞内の pH は、細胞内の炭酸水素イオンによって強く緩衝されています。したがって、脳梗塞や心停止時などでは強く酸性化しますが、生理的な状態では、pH はほとんど変動しないとこれまでは考えられてきました。また、一般的に、細胞の代謝・呼吸活動にともない二酸化炭素(CO₂)が発生すると酸性化が生じますが、局所血流量が増大すれば、CO₂の除去が進むため、酸性化が解消され、相対的にはアルカリ化すると考えられます。しかし、レム睡眠時、局

所血流量が増大したにも関わらず、アストロサイトが酸性化したということは、アストロサイトの代謝が大きく亢進したか、神経活動の活発化により、興奮性伝達物質のグルタミン酸が多く放出され、アストロサイトのグルタミン酸トランスポーター等に働きかけることで細胞内が酸性化するなどのメカニズムが働いたことが予想されます。

なお、これまでの研究を通して、アストロサイト酸性化は、アストロサイトからのグルタミン酸放出にもつながることが示されています。今回の研究成果により、レム睡眠時特有の脳内情報処理や学習・記憶につながる神経回路の可塑性には、アストロサイトを介したフィードバック回路が大きな役割を担うことが示唆されました。また、レム睡眠時には、脳波は特徴的な周波数に変化しますが、光ファイバーで計測された脳内環境の変化は、脳波に現れる神経細胞の電氣的活動の変化に 20 秒近く先行することが示されました。したがって、神経活動の結果としてアストロサイト活動や血流の変化が生じるだけでなく、アストロサイトや血流などの末梢機能が中枢神経機能の動作に影響を与えていることが示唆されました。

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ますが、このような刺激を繰り返すと、数日に渡って、てんかん様発作症状は悪化することが知られています。そこで、健常時のレム睡眠とてんかん発作の生じやすい病態脳でのレム睡眠を比較して調べてみることにしました。すると、てんかん病態時のレム睡眠では、アストロサイトのカルシウムや局所血流量の変動はほとんどなくなる一方、アストロサイトはより強く酸性化するようになることが明らかになりました。

これまで、脳の電氣的特性を脳波として調べることで、脳の病気を診断し、心の状態を推測する研究が広く行われてきました。今回は、マウスの脳深部に光ファイバーを刺し入れる方法で、脳内アストロサイトの酸性化や局所血流量変化が計測されました。一方、ヒトに対して機能的 MRI 技術を活用すれば、アストロサイト細胞内に限局した解析は無理ですが、非侵襲的に脳内 pH 変動や局所血流量変動を記録することはできます。したがって、ヒトにおいてもレム睡眠にともなう脳の酸性度や血流変動を計測することで、てんかん病態の発展度のバイオマーカーとして使える可能性があり、てんかんの診断に応用できる可能性があります。本研究は、実験動物のマウスを用いた基礎生物学的な研究ですが、アストロサイトの pH を安定化するなどの方法が開発されれば、今後の臨床医学との連携次第で、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ます。

結論：細胞内の pH は生来の炭酸水素イオンなどで強く緩衝されているため、生理的な条件で pH が変動するとは考えられてきませんでした。したがって、これまでの脳細胞活動の光計測技術を用いた多くの研究では、誤った解釈がされていた可能性があります。今回、レム睡眠という生理的な脳状態変化に応じて、アストロサイト内が酸性化することが示されました。また、これらの光で計測される脳内環境変動は、脳波で記録される脳神経活動の変化に先立って生じることが示されました。したがって、アストロサイト等を含めた脳内環境変動が神経細胞に働きかけ、睡眠等の脳機能に影響を与える可能性が挙げられました。また、てんかんの生じやすい病態脳では、レム睡眠にともなうアストロサイトの酸性化が強くなることが示されました。てんかん病態時には、アストロサイトと神経細胞の間の協調関係が変化する可能性があり、レム睡眠時のアストロサイトの反応を指標として、てんかんの発症度を診断することができるかもしれません。今後、アストロサイト pH が変動する理由を明らかにし、pH を制御する技術が開発されれば、てんかん診断や治療の新戦略として発展することが期待されます。

支援：本研究は、文部科学省研究費補助金 JSPS KAKENHI (JP20H05046、JP22H02713、JP22K15218)、学術変革領域(A)「グリアデコーディング」(JP20H05896)、てんかん治療研究振興財団、光科学技術研究振興財団、ノバルティス科学振興財団、武田科学振興財団の支援を受けて行われました。

【用語説明】

- 注1. レム睡眠:** 急速眼球運動のことをレム(REM; Rapid Eye Movement)と呼びます。目を閉じて寝ている間に、まぶたの奥で眼球が急速に動く時期があります。レムが発生している時に起こすと、夢を見ていたと報告するヒトが多いため、レム睡眠中に過去の経験を記憶するものと忘れるものにと選り分けて、その過程で夢を見るという仮説が生まれました。このような機能を本当にレム睡眠が担っているかどうかは議論が分かれるものの、他の睡眠とは異なる特有の情報処理がレム睡眠中に行われていることは間違いありません。このことを反映し、レム睡眠中の脳波の周波数においては、シータ波(6-9 Hz)が亢進し、デルタ波(1-4 Hz)が低下することが知られています。身体を支える筋肉は完全に弛緩することが知られており、筋電図はほぼ平坦になり、脳波と筋電図を合わせることで、レム睡眠が生じている時間帯を特定できます。
- 注2. 視床下部:** 間脳に位置し、内臓の働きや内分泌の働きを支配し、生命現象を司る自律神経系の中核である脳の領域。体温調節やストレス応答、摂食行動や睡眠覚醒など多様な生理機能を管理し、脳内エネルギー代謝と深く関わります。従来、てんかん研究において視床下部はあまり注目されてきませんでした。当研究グループでは、視床下部のアストロサイトこそが、海馬で始まった神経発振を増幅するとともに、てんかんの増悪化・可塑性を導く可能性を挙げてきました。今回、レム睡眠にともない、視床下部のアストロサイトが酸性化し、てんかん病態時には、レム睡眠時アストロサイト酸性化が強化されることが示されました。
- 注3. グリア細胞:** 脳を構成する細胞の種類で、神経細胞とは異なるものは総じてグリア細胞と呼ばれます。従来、グリア細胞は、脳の隙間を埋めるノリのような存在と考えられてきましたが、グリア細胞には脳内のエネルギー代謝やイオン環境を制御する機能があることが示されてきました。さらに、神経細胞とは異なる方法で、脳内情報処理に関わることも次々と明らかにされてきており、脳と心の機能におけるグリア細胞の役割に大きな注目が集まっています。
- 注4. てんかん:** 脳内で過剰な神経活動が発振すると痙攣発作を起こすことがあり、このような発作が繰り返し生じる慢性の神経疾患のことをてんかんと呼びます。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す。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薬を飲み続ける必要があります。また、てんかんによる痙攣発作が繰り返されると、次第にてんかんが増悪化することも知られています。
- 注5. 蛍光センサータンパク質:** 細胞内の小分子を検出するために、オワンクラゲ由来の緑

色蛍光タンパク質 (GFP) 等を人工的に改変して作製された蛍光タンパク質。今回、細胞内の Ca^{2+} や pH に応じて蛍光が変化するように設計されたセンサータンパク質を、人工的にアストロサイトに遺伝子発現させました。なお、当研究グループでは、脳内を張り巡らされた血管が収縮したり拡張したりすると、脳細胞に発現させた蛍光センサータンパク質から発せられる蛍光が影響を受けることを示してきました。したがって、蛍光センサータンパク質がセンス (検出) するように設計された少分子とは、直接の関係ない血流動態に、計測される蛍光値が変化することになります。また、例えば、 Ca^{2+} をセンスするように設計された蛍光センサータンパク質は、pH にも影響を受けることも明らかになっています。これらの影響を考慮に入れて初めて、脳内環境変動を正しく評価することができるようになります。

注6. アストロサイト: グリア細胞は、大きく分けて、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに分類されます。今回、アストロサイトに、蛍光センサータンパク質を特異的に遺伝子発現させました。アストロサイトは、神経細胞同士をつなぐシナプス結合部位とともに、脳内を張り巡らされた血管を取り囲む構造をしていることが知られています。本研究では、他のグリア細胞については検討せず、本リリースで、グリア細胞と表記されている箇所は、アストロサイトのことを意味します。

注7. 光信号解析の新技术: 脳深部に光ファイバーを刺し入れて、蛍光信号を計測する方法をファイバーフォトメリー法と呼びます。本研究では、細胞内の Ca^{2+} や pH に応じて、蛍光特性が変化する蛍光センサータンパク質を、脳内アストロサイトに人工的に遺伝子発現させたマウスを用いました。当研究室では、細胞内 Ca^{2+} をセンス (検出) するように設計された蛍光センサータンパク質でも pH の影響を受け、局所血流量の変動はあらゆる蛍光に影響を与えることを示してきました。本研究では、これらの影響を選り分ける工夫が施された新技术が用いられています。

注8. 脳波: 多くの脳神経細胞の電気的な活動が頭皮に置いた電極まで伝わって記録されるものを一般的には脳波 (EEG) と呼びます。脳実質表面まで届く電極で記録される電気信号の変化を記録したものは、正確には、脳皮質電位 (ECoG) と呼ばれます。今回の記録の多くは、マウス頭蓋骨に留置したネジ電極で記録した ECoG になります。EEG や ECoG で記録されるものは、たくさんの神経細胞からの集合的な電位であり、それぞれの細胞から電極までの距離が異なることもあり、個々の神経活動そのものを推測することはできません。したがって、脳波を解析するだけでは、脳内情報処理の詳細を理解することはできませんが、睡眠や覚醒、てんかん等の脳病態等に相関するいくつかの脳状態を高精度に測定し、診断をすることは可能です。

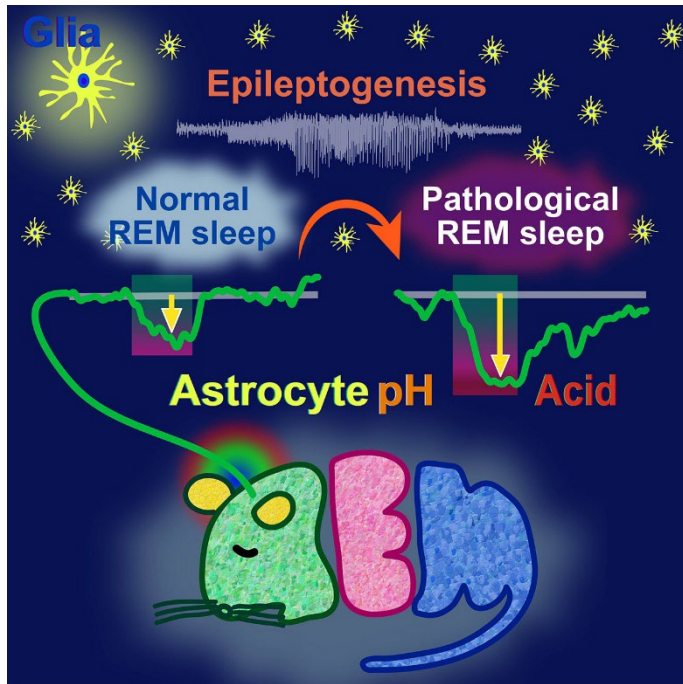


図1. レム睡眠時の視床下部アストロサイトの酸性化はてんかん病態時に強化された

実験動物のマウス脳深部の視床下部に光ファイバーを刺し入れ、蛍光波形を解析すると、レム睡眠にともない、アストロサイト内が酸性化することが明らかになりました。海馬に電気刺激を連日繰り返すとてんかん発作の生じやすい脳に変化します。このようなてんかん病態脳に変化した後、自発的に生じるレム睡眠を解析

しました。その結果、レム睡眠にともなって、アストロサイトはより強く酸性化することが明らかになりました。レム睡眠時の脳内環境変動を解析することで、てんかんの発展度を診断し、アストロサイト酸性度を制御することでてんかん病態を治療する新戦略が開拓されることが期待されます。

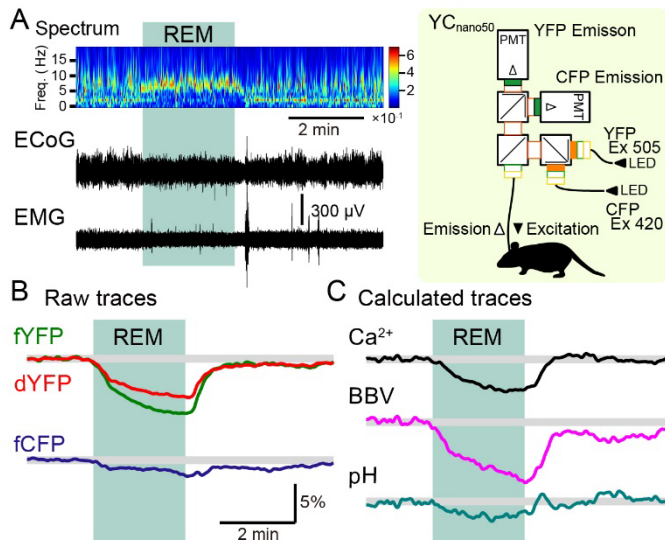


図2. レム睡眠時の蛍光変化から脳内環境変動を推定

(A) 実験動物のマウスから脳皮質電位 (ECoG) と筋電図 (EMG) を記録して、レム睡眠の時期を特定(左)。同時に、脳深部の視床下部に光ファイバーを刺し入れ、3つの異なる蛍光波形 (fCFP, fYFP, dYFP) を計測しました (右; ファイバーフォトメトリー法)。

(B) 脳内アストロサイトに FRET 型カルシウム (Ca^{2+}) センサータンパク質を遺伝子発現させたマウスの視床下部から記録される蛍光波形。FRET 型センサーでは、 Ca^{2+} 濃度が上昇すると紫色で励起した時の CFP 青色蛍光 (fCFP) が減り、YFP 黄色蛍光 (fYFP) が増えると考えられています。

(C) 計算された Ca^{2+} 、BBV、pH の波形。REM 睡眠時には、 Ca^{2+} 濃度が上昇し、BBV と pH が減少する傾向が見られます。

一方、緑色で励起した時の YFP 黄色蛍光 (dYFP) の蛍光は、 Ca^{2+} 濃度のいかんに関わらず一定であると考えられます。今回、レム睡眠にともない、fYFP と fCFP は鏡像反応を示さず、dYFP の蛍光も変化したため、 Ca^{2+} 以外で蛍光に影響を与える要素が変化したことが示唆されました。

(C) 細胞内 pH が酸性化すると fYFP と dYFP はともに蛍光が減少する一方、fCFP はあまり影響を受けないことが予想されます。また、光ファイバー先端近傍の血管径が膨らんで、蛍光タンパク質を含まない領域が拡大して局所血流量が増大すると、fYFP, dYFP, fCFP の全ての蛍光が減少すると考えられます。これらの影響を考慮して、計測された3つの蛍光波形 (fYFP, dYFP, fCFP) から、アストロサイト細胞内 Ca^{2+} 、pH、局所血流量の変化を読み出す方法を開発しました。レム睡眠時、アストロサイト内 Ca^{2+} は減少し、局所血流量 (BBV) は増大 (図では下方向に波形が触れると血流量が増大したことを反映するように表示してあります)、アストロサイト内 pH は酸性化することが示されました。特に、アストロサイト酸性化は予想外で、細胞内 pH は生来の炭酸水素イオンで強く緩衝されているにも関わらず、生理的な条件下でも細胞内 pH が変動しうることを示した初めての例と言えます。

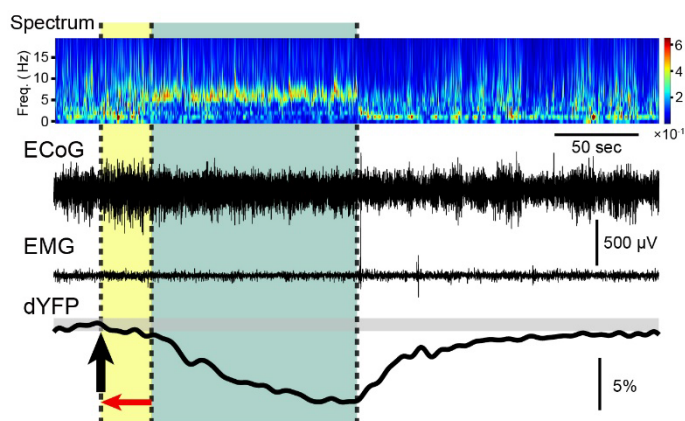


図3. 脳内環境の変動は、脳波上で判定されるレム睡眠移行に先行する

脳波 (ECoG) の周波数を解析し、脳波上のシータ波 (6 – 9 Hz) が増大し、デルタ波 (1 – 4 Hz) が減少するタイミングで、レム睡眠に移行することが判定できます。一方、視床下部のファイバーフォト

メトリーで記録された dYFP 蛍光が下方に変化するタイミングを精査すると、脳波上で判定されるレム睡眠開始時より、20 秒近く先行することが明らかになりました。アストロサイト内の pH の酸性化と局所血流量 (BBV) 増大すると、dYFP から発せられる蛍光の計測値は小さくなると考えられます。このような脳内環境変化が、脳神経活動の変化に先行することから、アストロサイトや血管活動の変化が神経細胞と協調して、レム睡眠等の脳機能に影響を与えていることが示されました。

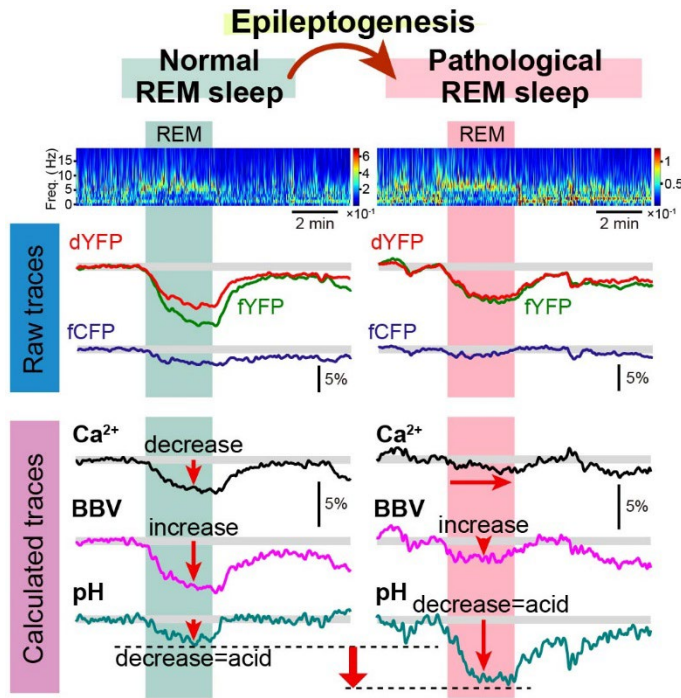


図4. てんかん病態時のレム睡眠特性の変化

レム睡眠時の視床下部の蛍光特性の変化から、アストロサイト内 Ca^{2+} が減少、局所血流量が増大 (BBV)、アストロサイト内 pH が酸性化することが示されました (左列)。同じ動物を用いて、海馬を電気刺激しててんかん発作を引き起こし、これを数日に渡り繰り返すことで、てんかん病態を進展させる実験を行いました (キンドリング実験)。その後、海馬刺激をしていない時に、自発的に生じるレム睡眠時の視床下部の蛍光変化を計測しました (右列)。

生の蛍光波形で気が付くことは、fYFP と dYFP の差がなくなったことでした。したがって、細胞内 Ca^{2+} 濃度減少は生じなくなったことが示唆されます。また、fCFP の信号もほぼなくなりまし。したがって、BBV もあまり変化しなくなったと考えられます。それにも関わらず、dYFP の蛍光は減少したので、細胞内 pH の酸性化がより大きくなったことが推測できました。従来、FRET 型センサータンパク質を用いた研究では、fYFP と fCFP しか計測されていませんでした。その場合、てんかん病態を獲得した後のレム睡眠時でも、細胞内 Ca^{2+} 濃度減少が相変わらず生じていて、健常時のレム睡眠とほとんど違いがないと判断されていたと考えられます。今回、新しく開発された光信号の解析法を用いることで、レム睡眠時におけるアストロサイト内の酸性化現象が、てんかん病態を獲得した後、より強化されることが明らかになりました。

【論文題目】

Title: Properties of REM sleep alterations with epilepsy

Authors: Yoko Ikoma, Yusuke Takahashi, Daichi Sasaki, Ko Matsui

タイトル: てんかんにともなうレム睡眠の変化

著者: 生駒 葉子、高橋 佑輔、佐々木 大地、松井 広*

雑誌: Brain

DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awac499>

【筆頭著者情報】

氏名: 生駒 葉子

所属: 東北大学 大学院生命科学研究科 超回路脳機能分野

【研究者情報】

東北大学大学院生命科学研究科 教授 松井 広

研究者 <https://researchmap.jp/komatsui/>

研究室 <http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院生命科学研究科

教授 松井 広 (まつい こう)

電話番号: 022-217-6209

Eメール: matsui@med.tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院生命科学研究科広報室

担当: 高橋 さやか (たかはし さやか)

電話番号: 022-217-6193

Eメール: lifsci-pr@grp.tohoku.ac.jp