

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

( 1 / 1 )

研究題目	パルス超音波による神経機能修飾作用の機序の解明と神経ネットワーク活動の制御法の開発	報告書作成者	三嶋 竜弥
研究従事者	三嶋 竜弥、田原 麻梨江、駒野 賢太		
研究目的	<p>薬剤の効きにくい難治性てんかんや、パーキンソン病、重症うつ病などの治療には局所的な脳の刺激が有効である。外部デバイスを用いて脳を刺激し、神経の機能を調節する手法をニューロモデュレーションと呼び、電気や磁気を用いた非侵襲的なニューロモデュレーションが局所脳刺激法として臨床利用されている。しかし、これらのニューロモデュレーション手法は刺激領域が脳表層付近に限られ、かつ空間分解能が低いなどの欠点がある。現在、ヒトの脳の深部領域の活動をミリメートル単位の分解能で、非侵襲的かつ可逆的に調節できるツールは存在しない。</p> <p>本研究では新たな脳刺激法として、パルス超音波を用いたニューロモデュレーション法を開発することを目指す。超音波は生体透過性に優れるため頭蓋骨を透過して脳深部に到達でき、さらに照射音波を収束させることでミリメートルサイズの局所領域に局限した刺激が可能である(図 1)。これまでに超音波ニューロモデュレーションによって神経の興奮性を調節する効果や、神経機能の可塑性を誘導する効果が観察されている。また、脳の高次機能(運動機能や知覚機能)の亢進/抑制作用のほか、薬物で誘発した痙攣の抑制作用が観察されており、超音波ニューロモデュレーションが幅広い精神神経疾患(てんかん・うつ病・パーキンソン病等)に適用できる可能性が示されている。しかし、① 超音波刺激の神経への作用機序が不明なだけでなく、② パルス波のパラメーター(図 2)により神経機能に対する作用が大きく異なると報告されており、求めるニューロモデュレーション効果を引き出す刺激プロトコルを確立する必要がある。</p> <p>そこで本研究では神経活動と疾患との関係が明白な、てんかんを対象にして、パルス超音波のニューロモデュレーション作用の分子・細胞機序を明らかにする。次に、神経ネットワーク活動を抑制する刺激プロトコルを確立し、この効果を“てんかんモデルマウス”の痙攣抑制効果によって検証することを目指す。先行研究では、超音波刺激のプロトコルによって神経活動を亢進するもの、逆に抑制するものが報告されている。特に、低デューティー比のパルス波が神経活動の抑制を起こすことが報告されているため、これを初代培養下の海馬神経を用いて確認する。脳内に発現している機械刺激感受性チャネルが超音波刺激の受容に関与すると考えられており、薬理的にこれを同定することで超音波ニューロモデュレーションの分子、細胞機序を明らかにすることを試みる。</p>		

研究内容	<ul style="list-style-type: none"><li>・ 超音波刺激が神経の情報伝達機能に及ぼす影響を明らかにするために、神経ネットワーク活動に対する影響及びシナプス伝達機能に対する影響を調べた。本研究では小型(外形 2mm)で高周波数(5MHz)の超音波トランスデューサーを用いた。ハイドロホンで音圧の空間分布を求めた。入力電圧 40V 時の最大音圧は約 150kPa で、トランスデューサーとの距離が 3~4mm の時、半径 1.0mm の円状に音圧の高い狭いエリアを示した。超音波刺激の効果は刺激のパターンによって異なるとの報告があり、本研究では二種類の刺激パターンを用いた。一つ目は、連続波とし音波強度は 0.7W/cm<sup>2</sup> の音波を 100msec の間与えた。二つ目はパルス波として、5MHz の基本周波数の 0.5msec のトーンバースト波を 10msec インターバルで 200 回与えた。上記 2 種類の刺激パターンを単発で与えた時の、興奮性・抑制性シナプス伝達に及ぼす効果を解析したところ、自発性シナプス小胞の放出頻度、振幅はどちらの刺激パターンに対しても影響を受けなかった。次に自発的な神経ネットワーク活動に対する効果を解析したところ、活動電位の頻度、膜電位はともに刺激による影響は見られなかった。</li><li>・ 単発刺激に効果がみられなかったため、繰り返し超音波刺激を与えた時の効果を検討した。連続波を繰り返し加えても神経ネットワーク活動に変化は見られなかったが、パルス波を繰り返し与えると刺激開始とともに徐々に活動電位頻度の低下が生じた(図 3)。初代培養神経の自発的なネットワーク活動の活性は、興奮性と抑制性ニューロンの活動バランスが重要な要素となる。神経ネットワークの活動状態の低下は、抑制性シナプス入力が増加するか、細胞の興奮性が低下していることが予測される。あるいは反対に、興奮性シナプス入力低下している可能性も考えらる。そこで、抑制シナプス伝達を遮断した時の超音波刺激の効果を観察した。GABA<sub>A</sub> 受容体のブロッカーである bicuculline をバス投与し、ネットワーク活動に対する超音波刺激の効果を見たところ、超音波刺激による抑制効果がみられなくなった。さらに、シナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体のみを阻害しても超音波刺激による抑制効果は阻害されなかったことから、超音波の効果はシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体を介したものであることが示唆された。シナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体は細胞外 GABA により活性化し、その濃度によって制御される。細胞外 GABA 濃度は、神経終末から放出された GABA が GABA 輸送体により取り込まれる速度により制御されるため、これを発現するアストロサイトの関与が考えられる。</li><li>・ アストロサイトに発現する機械刺激感受性チャネルとして、ASIC1a, PIEZO1, TRPA1, TRPV4 等が報告されている。中でも TRPA1 はアストロサイトに選択的に発現していることから、超音波刺激による神経活動の抑制に関わる受容体の強力な候補と考えた。TRPA1 の agonist である AITC をバス投与し、超音波刺激の代わりに TRPA1 薬理的に活性化した。その結果、AITC を投与すると、神経ネットワーク活動が低下した。また、TRPA1 受容体のブロッカーである HC-030031 をバス投与したところ、繰り返し超音波刺激の抑制効果がみられなくなった。最後に、繰り返し超音波刺激によって TRPA1 が活性化し、周囲 GABA レベルが上昇しているのかを調べた。その結果、持続性 GABA 電流の振幅から細胞外 GABA 濃度が上昇していることが確認された(図 4)。</li></ul>
------	--

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

( 1 / 1 )

<p>研究のポイント</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 超音波による非侵襲的な脳刺激法は、すでに実用化されている磁気刺激(TMS)や電流刺激(tDCS)と比べると、空間分解能や脳内部への浸透性の点で優れており、脳深部の数ミリオーダーの領域を限局して刺激することが可能。興奮性の効果と抑制性の効果の両方が観察されており様々な神経疾患の治療に応用できる可能性がある。しかし、超音波刺激が神経に作用するメカニズムが十分に解明されておらず、実用化のためにはこの点が重要となる。</li> <li>・ 超音波の神経作用は刺激パラメータによって変化することが報告されている。特に刺激強度・刺激持続時間・超音波周波数・デューティ比等が重要とされているが、統一的な関係性は見つかっていない。本研究では、てんかん治療への応用を目指し、神経活動の可塑的な抑制につながる刺激パラメータを探索する。</li> <li>・ 先行研究では Ca イメージングによるものが多く、神経機能への作用解析が不十分なため、本研究では電気生理学的手法で行う。</li> </ul>
<p>研究結果</p>	<p>① 超音波刺激の神経への作用機序</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 超音波刺激の受容には、神経細胞ではなく、アストロサイトの機械刺激受容体チャネル(TRPA1)が関与。</li> <li>・ TRPA1 の活性化によってシナプス周囲の GABA 濃度が上昇する。</li> <li>・ シナプス周囲の GABA 濃度の上昇はシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体を持続的に活性化する。この活性化により、膜コンダクタンスが上昇し、神経の興奮性が低下することで神経ネットワーク活動が低下する。</li> </ul> <p>② 神経ネットワーク活動の抑制に適したパルス波のパラメーター</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 連続波による超音波刺激は、単発・繰り返し刺激ともに神経機能に影響を与えない。</li> <li>・ 低デューティ比のパルス波による刺激は、繰り返し与えることで神経ネットワーク活動を可塑的に抑制する。</li> </ul>
<p>今後の課題</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 低デューティ比のパルス波がアストロサイトの TRPA1 を活性化することが明らかになったが、それが細胞外 GABA 濃度を上昇させるメカニズムは未解明である。アストロサイト自身が GABA を放出する、あるいは神経終末から放出された GABA の取込み速度を低下させることによる機序が予測される。今後の更なる解析が必要である。</li> <li>・ 本研究では、神経活動を抑制する刺激パラメータを見出すことができた、このパラメータをさらに最適化すると共に、神経活動を亢進する刺激パラメータを探索することで、広い神経疾患の治療に適応可能な刺激法になると考えられる。</li> <li>・ 本研究は培養神経細胞を用いる実験系での解析であり、この刺激法の有効性を疾患モデルマウスを用いた行動解析や、ヒトでの有効性を検証する必要がある、今後のさらなる検証が重要である。</li> </ul>