

研究全体の概要を示す図

発表のポイント

- 経頭蓋直流電気刺激は、脳にダメージを与えることなく行える治療法の一つであり、うつ病、脳卒中、アルツハイマーなどの様々な精神・神経疾患の補助療法として研究が進められています。しかし、その詳細なメカニズムはまだ解明されていません。
- 近年、脳の老廃物を除去し、脳内環境を一定に保つ働きとして、脳内の水の動きが注目されています。この機構では、頭蓋骨の下で脳を浸し循環している脳脊髄液が、脳組織内に流入し、老廃物とともにリンパ管を通じて脳外に排出されると考えられています。脳の老廃物の代表例として、アルツハイマー病と関連が知られているアミロイドベータが挙げられます。
- これまでに、この老廃物の排出は睡眠、麻酔、運動によって促進されることが断片的に報告されてきましたが、人為的に脳の水の流れを改善する方法については、未解明な部分も多く、未だ統一見解はありません。
- 本研究では、(1) 微弱な電気刺激を脳に施すことで脳脊髄液の流れが改善され、細胞間質液と交換することで老廃物の排出が促進されること (2) そのメカニズムに、アストロサイトの IP_3/Ca^{2+} シグナル伝達に伴うデルタ波の上昇が重要な役割を果たしていることを明らかにしました。
- 今後、アルツハイマー病や、脳卒中の予防やリハビリテーション、薬が効きづらいタイプのうつ病の症状の軽減などへの応用が期待されます。

詳細な説明

背景

経頭蓋直流電気刺激（以下、tDCS）は、強力な電気ショック療法とは異なり、頭皮の上から微弱な直流電流（1～2 mA）を5～30分間流すことで脳を刺激する非侵襲的な治療法です。tDCSは、うつ病の症状を軽減したり、脳卒中後のリハビリテーションを促進したり、アルツハイマー病の進行を遅らせるなどの効果が確認されています。また、健常人においても記憶や学習の向上が見られ、スポーツ選手のトレーニング効果の向上や、計算のパフォーマンス向上など、集中力を高める効果が報告されており、多岐にわたる応用が期待されています。しかしながら、その作用メカニズムは完全には解明されておらず、安全性も確立されていないため、現時点では医療行為としては認可されていません。

マウスを用いた基礎研究では、tDCSがシナプス伝達の効率を向上させることや、その仕組みにアストロサイトと呼ばれる脳細胞を活性化することが報告されています。

参考：微弱な電気刺激が脳を活性化する仕組みを解明—ノルアドレナリンを介したアストロサイトの活動が鍵—、2016年3月、理化学研究所など

https://www.riken.jp/press/2016/20160322_1/

アストロサイトは、脳内で血管とニューロンの両方に接触し、ニューロンへのエネルギー供給や、ニューロンが放出した老廃物の回収・除去を通じて、脳内環境を維持する重要な役割を担っています。また、アストロサイトは炎症に敏感であり、何らかの原因で脳が炎症状態になると、機能不全を起こします。その結果、脳内のメンテナンス機能が低下し、ニューロンが正常に機能せず、ひいては細胞死に至ることもあります。事実、多くの動物実験から、うつ病や認知症のモデル動物におけるアストロサイトの機能不全が報告されています。このため、アストロサイトをターゲットにした治療法が、これらの疾患への新たなアプローチとして注目されています。

アルツハイマー病モデルマウスでは、アルツハイマー病と関連が深いアミロイドベータというタンパク質が脳に沈着し、炎症を引き起こすことが知られています。近年のマウスを用いた研究では、tDCSによってこのアミロイドベータの沈着が減少するという報告があります。

私たちは、tDCSがアミロイドベータに限らず、脳に蓄積された老廃物を減少させ、脳内環境を正常化させることによって、うつ、脳卒中、アルツハイマーなどの疾患の影響を軽減する可能性があると考えています。しかし、tDCSが脳の老廃物を減少させる詳細なメカニズムはまだ明らかになっていません。

頭蓋骨の下で、脳は脳脊髄液と呼ばれる無色透明な体液に浸っています。この液体は、主に脳のダメージを吸収するために存在すると考えられていますが、近年、脳細胞の隙間を満たす細胞間質液（以下、間質液）と交換することで、間質液に蓄積した老廃物を運び出し、脳内環境を維持する働きがあることが報告されています。

身体の他の組織ではリンパ液が老廃物の排出を担っています。これらの老廃物は細胞の活動によって生じ、リンパ管を通じて体外に排出されます。しかし、脳にはリンパ管が存在しないため、脳細胞が放出した間質液中の老廃物がどのように排出されるのかは長らく謎でした。動物を用いた研究が

らは、特に睡眠中に脳脊髄液が活発に流れることで脳の老廃物が排泄されることが報告されており、睡眠の重要性が再認識されています。さらに、ヒトにおいてもこの排出機構が機能していることが世界中で確認されており、特に深い睡眠中に排出が促進されることが明らかになっています。

この脳内の水の流れのメカニズムは、完全には解明されていませんが、グリア細胞の一種であるアストロサイトが重要な役割を果たしていることが示唆されています。そのため、「グリア」と「リンパ系」を組み合わせた「グリンパ系（英語では、グリンファティック・システム）」と呼ばれ、注目を集めています。

これまでに、脳の水の流れは睡眠や麻酔、また運動等によって促進されることが断片的に報告されてきましたが、人為的に脳の水の流れを改善する方法については、未解明な部分が多く、未だに活発な議論がなされています。本研究では、tDCS が脳の老廃物を軽減するメカニズムにおいても、脳脊髄液と間質液の交換による老廃物の排出が重要な役割を果たすと考え、これを検証しました。

研究手法と結果

本研究では、大学の倫理委員会で定められた方法に従って飼育された実験用マウスを使用しました。野生型マウスにケタミン・キシラジンをを用いて麻酔を施し、苦痛を軽減させた上で、頭皮を慎重に切除しました。その後、頭頂部の頭蓋骨上に設置した陽極と首の筋肉に設置した陰極の間に、0.1 ミリアンペアの非常に微弱な直流電気を 10 分間通電しました。この間、マウスに異常反応は見られませんでした。

次に、脳脊髄液の流れを可視化するため、トレーサーとしてビオチン化デキストランアミン (BDA、分子量 70,000) を使用しました。脳脊髄液は、脳内の第三脳室および側脳室で生成され、第四脳室を経て後頭部の下側にある大槽へと流れます。脳組織にできるだけダメージを与えないようにトレーサーを注入するため、大槽に先端が非常に細い中空のガラス管を注意深く挿入し、ポンプを用いて 5 分間で 0.005 ml のトレーサーをゆっくり注入しました。

tDCS を行ってから 30 分後、トレーサーを注入してから 30 分後および 60 分後に慎重に脳を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定しました。翌日、脳を 0.06 ミリメートルの厚さでスライスし、トレーサーの信号を増幅して蛍光標識することで、脳のどの部位にどれだけのトレーサーが流入していたかを確認しました (図 1)。その結果、tDCS を行ったグループでは、30 分後および 60 分後の両方で無刺激群に比べて脳脊髄液と間質液の交換が有意に促進したことが示されました。図 1 では大脳皮質の例を示していますが、海馬や線条体においても同様の傾向が確認されました。一方、視床や小脳ではこの促進の効果は見られなかったため、tDCS が引き起こす効果は、脳部位によって異なることが示唆されました。

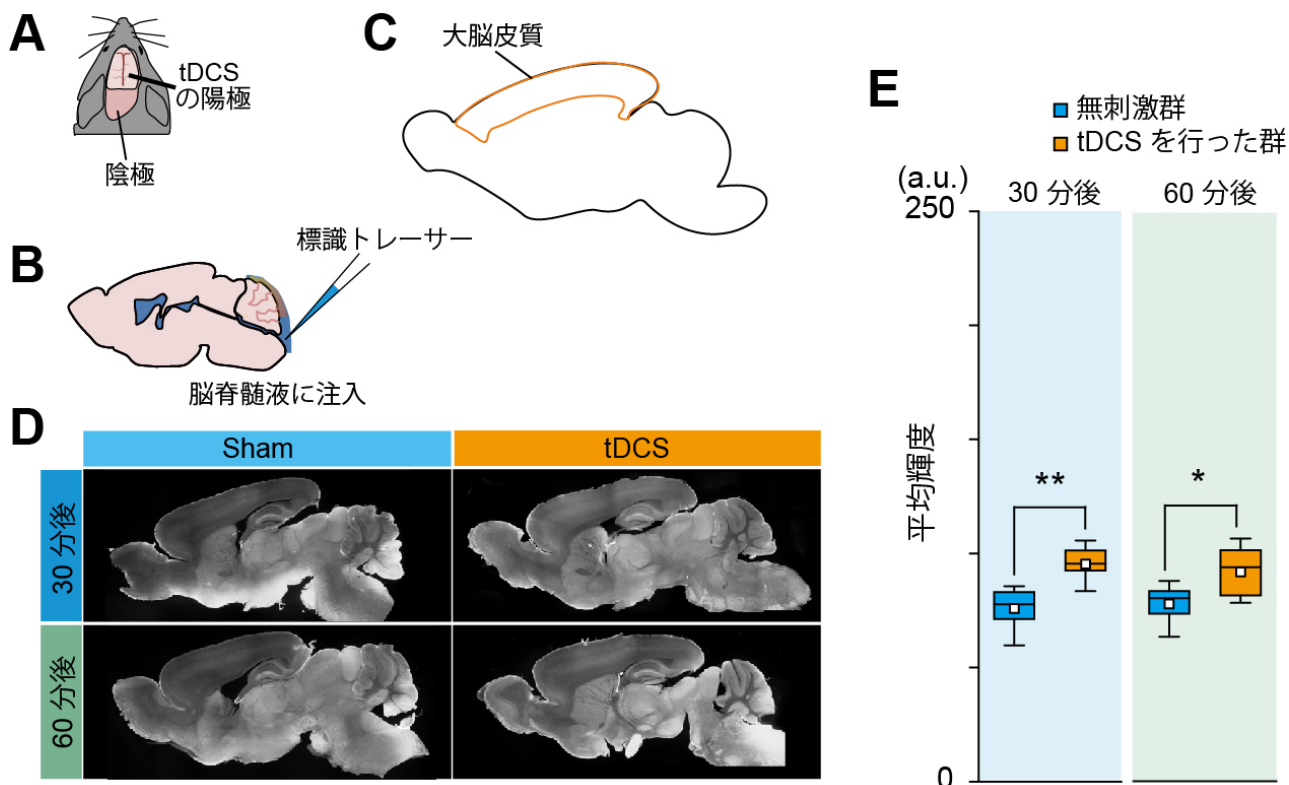


図 1 tDCS によって大脳皮質における脳脊髄液と間質液の交換が促進された

- A. マウスの頭皮を慎重に切除し、頭頂部の頭蓋骨上に設置した陽極と首の筋肉に設置した陰極の間に、0.1 ミリアンペアの非常に微弱な直流電気を 10 分間通電した。
- B. 先端が非常に細い中空のガラス管を大槽に注意深く挿入し、ポンプを用いて 5 分間で 0.005 ml の標識トレーサーをゆっくり注入した。
- C. tDCS を行ってから 30 分後、トレーサーを注入してから 30 分後および 60 分後に、慎重に脳を摘出し 0.06 ミリメートルの厚さで脳を左右に分ける断面でスライスした。図は大脳皮質の場所を示している。
- D. トレーサーの信号を蛍光標識した脳画像の例。
- E. 6 匹のマウスで実験を繰り返し行った実験に基づく大脳皮質における蛍光輝度の分布を示す箱ヒゲ図。青は無刺激群、オレンジは tDCS を行った群を示している。*は統計的に有意な差があることを表しており、特に 30 分後の測定で有意な差が見られた。データは、平均値±標準誤差で表示した。

次に、脳脊髄液に注入したトレーサーがどの程度脳の外へ排出されるのかを可視化するため、マウスの頸部リンパ節を蛍光顕微鏡でライブイメージングしました (図 2)。この実験では、蛍光物質であるエバンスブルー (分子量 960) をマウスの大槽に注入しました。その結果、tDCS を行った群では、頸部リンパ節への排出が有意に高まることが明らかになりました。この結果は、tDCS がアミロイドベータのような脳の老廃物の除去を促進するという既知の知見と矛盾しないものであり、tDCS が脳脊髄液の脳組織への流入だけでなく、排出を促進することも示唆しています。ただし、今回用

いたのは脳の老廃物を模したトレーサーであり、実際に tDCS によって沈着したタンパク質が、リンパ節へと排出されるかどうかは今後さらなる検討が必要です。

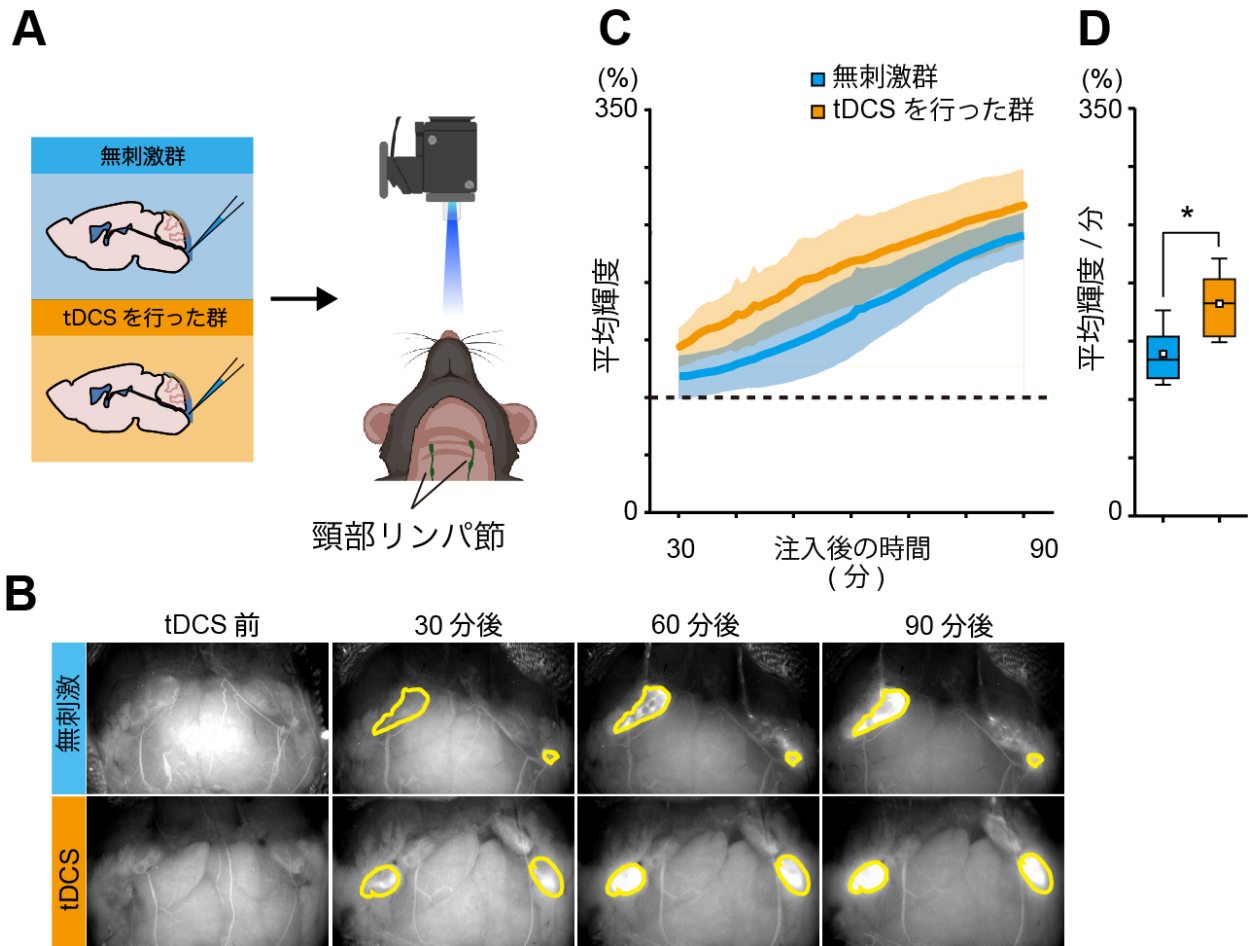


図 2 tDCS によって頸部リンパ節への排出が促進された

A. マウスの大槽に傾向トレーサーを注入し、その後マウスの頸部リンパ節をライブイメージングした。

B. tDCS をしなかったマウスと tDCS を行った群における代表例。黄色で囲んだ部分が頸部リンパ節の場所を示している。

C. tDCS を行ってから 30 分後、トレーサーを注入してから 30 分後から 90 分後の頸部リンパ節における蛍光輝度の変化率を 6 匹のマウスで繰り返し測定した結果。データは、 $\text{平均値} \pm \text{標準誤差}$ で表示され、実線は平均値、色のついた影が誤差範囲を示している。青は無刺激群、オレンジは tDCS を行った群を示している。

D. トレーサーを注入してから 30 分後から 60 分後の、1 分間あたりの平均輝度の変化を示す箱ひげ図。青は無刺激群、オレンジは tDCS を行った群を表している。*は統計的に有意な差が認められたことを示している。データは、 $\text{平均値} \pm \text{標準誤差}$ で表示されている。

脳脊髄液と間質液の交換は、徐波睡眠（深い睡眠）中に著しく促進されることが知られています。したがって、tDCS が脳脊髄液と間質液の交換や排出を促進するメカニズムに、徐波睡眠の割合の増加が関与する可能性が考えられます。この仮説を検証するため、マウスの頭蓋骨に電極を取り付けて、tDCS 前後の脳波を測定しました（図3）。

脳波は周波数（一秒間に何回振動するか）によって特徴づけられます。脳波は単一の波ではなく、さまざまな波の合成として記録されますが、各周波数成分に分解することで、その波にどの成分がどれくらい含まれていたかを計算することができます。覚醒中には安静閉眼時のアルファ波（8-12 Hz）、脳活動が高まるとベータ波（12-30 Hz）、集中力が高まる時にはガンマ波（30-45 Hz）の成分の割合が増加します。一方、徐波睡眠時には、ゆっくりとしたデルタ波（1-4 Hz）が観測されます。

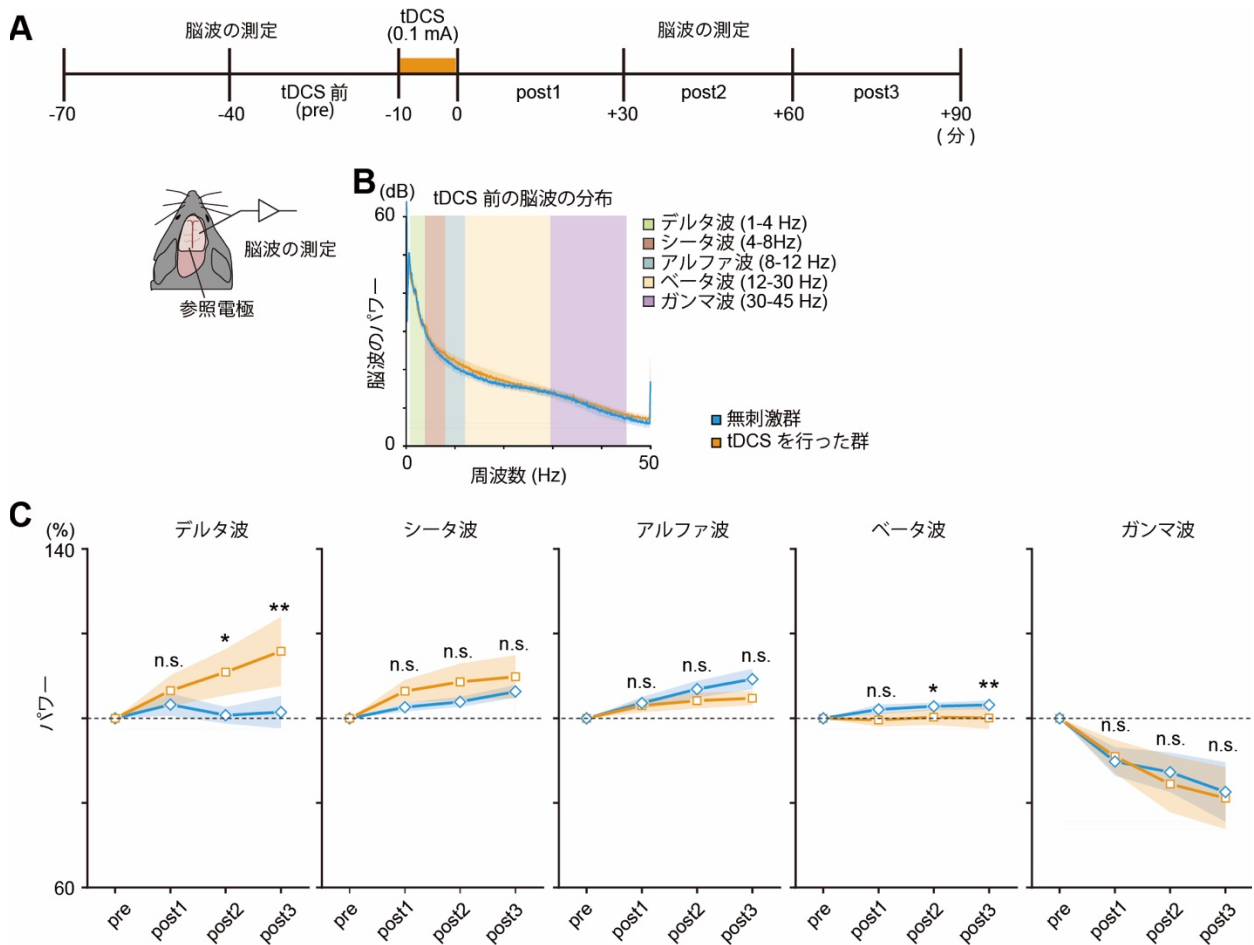


図3 tDCS によって深い睡眠を示すデルタ波が増強した

A. 実験のスケジュールを示している。tDCS を行う 30 分前より記録を開始し、tDCS 後から 30 分ごとに脳波の周波数成分の割合を計算した。下に脳波電極の位置を示す模式図を示す。

B. 脳波を周波数ごとに分解し、各周波数成分のパワーを計算した。

C. 1-45 Hz の全体のパワーの積算値を 100%とした時の、各周波数成分のパワーの積算値の割合を計算した。さらに、tDCS を行う前を 100%として、tDCS 後の割合の変化を 6 匹のマウスで繰り返し測定した結果を各周波数成分ごとに図示した。データは、平均値±標準誤差で表示され、実線は

平均値、色のついた影が誤差範囲を示している。*は統計的に有意な差が認められたことを示している。n.s は統計的に有意な差がないことを表している。青は無刺激群、オレンジは tDCS を行った群を示している。

実験の結果、tDCS 後 30 分から 60 分 (post2)、および 60 分から 90 分 (post3) の間にデルタ波の割合が顕著に増加し、逆にベータ波の割合が減少することが確認されました (図 3)。この結果は、デルタ波が脳の水の動きに関連しているという過去の知見と矛盾しません。ただし、このマウスはケタミン・キシラジンで麻酔されていたため、結果の解釈には注意が必要です。tDCS が覚醒中の集中力を高める可能性もあり、ガンマ波が増加することも示唆されています。マウスとヒトでは脳の大きさや構造が異なるため、慎重に解釈する必要があります。この点に関しては、今後さらに詳細な検討が必要です。

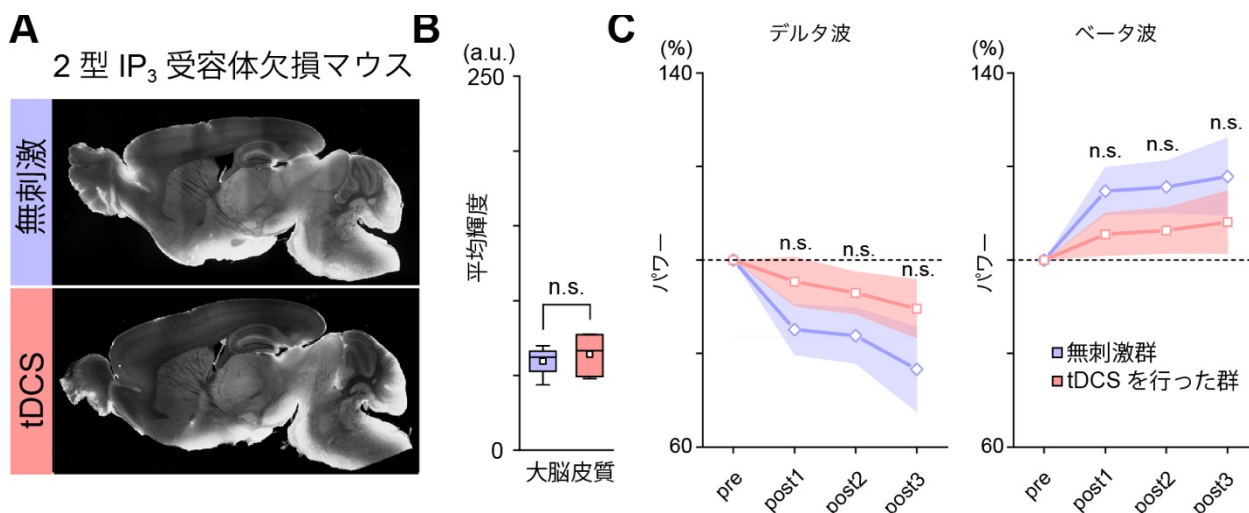


図 4 アストロサイトの機能を一部欠損した遺伝子改変マウスでは tDCS を行っても、脳脊髄液と間質液の交換が促進せず、脳波の変化も見られなかった

A. 2型 IP₃ 受容体欠損マウスの大脳にトレーサーを注入し、30 分後に、図 1 と同様に 0.06 ミリメートルの厚さで脳を左右に分ける断面でスライスした例。上：無刺激の例。下：tDCS を行った例。

B. 6 匹のマウスで実験を繰り返し行った実験に基づく大脳皮質における蛍光輝度の分布を示す箱ヒゲ図。青は無刺激群、赤は tDCS を行った群を示している。n.s は統計的に有意な差がないことを表している。データは、平均値±標準誤差で表示した。

C. 図 3 と同様に、tDCS を行う前 (pre) および tDCS を行ってから 30 分ごとの脳波の周波数ごとのパワーの割合を示している。n.s は統計的に有意な差がないことを表している。データは、平均値±標準誤差で表示され、実線は平均値、色のついた影が誤差範囲を示している。青は無刺激群、赤は tDCS を行った群を示している。

最後に、tDCS がどのようにしてデルタ波の増強を引き起こしたかを探求しました。これまでの研究では、tDCS がアストロサイトに作用し、特に重要な細胞内シグナル伝達経路の一種であるイノシ

トール三リン酸 (IP_3) を介した細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の濃度上昇を引き起こすことが報告されています。また、このアストロサイトの $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達がデルタ波を増幅することも示されています。したがって、この実験において tDCS が、アストロサイトの $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達を介してデルタ波を増強した可能性が考えられます。

これを検証するために、アストロサイトの $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達を遺伝的に遮断した遺伝子改変マウスである 2 型 IP_3 受容体欠損マウスを用いて再度実験を行いました。このマウスでは、tDCS を行ってもアストロサイトの $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達が生じないことがすでに確認されています。その結果、2 型 IP_3 受容体欠損マウスでは、野生型マウスで見られた tDCS による脳脊髄液と間質液の交換の促進やデルタ波の増強、ベータ波の減少がみられませんでした (図 4)。

これらの結果から、tDCS が脳脊髄液と間質液の交換を促進し、デルタ波の増強とベータ波の減少を引き起こすメカニズムに、アストロサイトの $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達が重要な働きを担っていることが明らかになりました。この発見は、アストロサイトの $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達の機能不全がうつ病やアルツハイマー病の病態と関連しているという報告と矛盾しません。脳脊髄液と間質液の交換の促進とデルタ波の増強の間の因果関係は未解明ですが、少なくとも重要な関連があり、アストロサイトが中心的な役割を果たしている可能性が示唆されました。

今後の期待

tDCS は、脳組織を傷つけることなく刺激が行える点で、医療やスポーツなど、さまざまな分野への応用が期待されています。しかし、安易に飛びつくのではなく、その安全性についてはグリア細胞や脳脊髄液動態も含めて慎重に検証する必要があります。うつ病、脳卒中、アルツハイマー病は高齢化社会において無視できない社会問題であり、これら病態の正確な理解や治療法、介入法の開発は、健康長寿社会を実現するための喫緊の課題のひとつです。多くの薬が開発されている一方で、薬が効かないタイプの病態も存在することが知られています。さらに、予防の観点から、薬の服用が単なる対症療法であることに懸念があります。グリア細胞による脳内環境の維持や、脳脊髄液と間質液の交換機構のように、脳には本来自浄作用とも言うべき機構が備わっています。今後は、何らかの原因でこの機構が不調になっている場合に、その改善を目指す革新的な治療法の開発が必要不可欠です。特に現在、tDCS をはじめとするブレインテック技術の開発が注目を集めています。さらに、アストロサイトは、治療の新たなターゲットとして今後ますます重要になることが予想されます。本研究結果が、その一助となることが期待されます。