

受賞対象論文

Kin I, Sasaki T, Yasuhara T, Kameda M, Agari T, Okazaki M, Hosomoto K, Okazaki Y, Yabuno S, Kawauchi S, Kuwahara K, Morimoto J, Kin K, Umakoshi M, Tomita Y, Tajiri N, Borlongan CV, Date I: Vagus Nerve Stimulation with Mild Stimulation Intensity Exerts Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects in Parkinson's Disease Model Rats. Biomedicines (2021) 9, 789.

ハイライト

- ・低強度迷走神経刺激はパーキンソン病モデルラットの中脳黒質ドパミン神経を保護し、行動学的改善を示した。
- ・同刺激は炎症性ミクログリアとアストロサイトの発現を減少させ、青斑核ノルアドレナリン神経を保護した。
- ・新規開発した小型電気刺激装置は様々な刺激条件で長時間連続刺激可能で、動物実験に有用である。

金 一 徹

Ittetsu Kin



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経外科学

Department of Neurological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

<プロフィール>

2011年3月 宮崎大学医学部医学科卒業
 2011年4月 福山市民病院 初期研修医
 2013年4月 福山市民病院 脳神経外科 後期研修医
 2015年4月 岡山大学病院 脳神経外科 後期研修医
 2016年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学
 2019年10月 福山市民病院 脳神経外科
 2022年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了
 現在に至る

研究の背景と経緯

パーキンソン病 (PD) は安静時振戦、筋強直、姿勢反射障害などの運動障害、自律神経障害等を主体とする神経変性疾患である。現在、非進行期 PD の治療では L-DOPA やドパミン (DA) アゴニストを用いた薬物治療が中心である。PD の主病態は黒質緻密部 (SNc) の DA の減少であり、慢性的な神経炎症による DA 神経細胞の変性が原因と考えられている¹⁾。SNc におけるミクログリアとアストロサイトの過剰な活性化は PD 患者と PD モデル動物の両方に共通する特徴であり、DA 神経細胞の変性に強く関与している。増殖・活性化したグリア細胞は、腫瘍壊死因子 (TNF α)、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ などの炎症性サイトカインを産生し、最終的に DA 神経細胞を障害する¹⁾。

また、PD の発症と進行は、SNc の DA 減少に加えて、青斑核 (LC) のノルアドレナリン (NA) 神経細胞の著しい変性と減少が関与する。LC は脳内の NA の最大の供給源として機能し、NA 神経細胞は線条体や SNc に直接投射し、DA 神経細胞を保護し機能的に制御している。つまり、LC の NA 細胞の変性と喪失

は、SNc での DA 神経細胞障害と PD 進行につながる。

現在、抗 PD 薬治療効果が減弱した進行 PD 患者では脳深部刺激療法 (deep brain stimulation: DBS) が標準的外科治療である。しかし、DBS は認知機能低下を合併する患者は適応から外れ、さらに高精度の手術であるため、施行医療機関が限定される問題がある。また、DBS には頭蓋内出血・感染の合併症が低頻度だが存在する。このため、PD 患者へより低侵襲な代替的・補完的外科的治療法の開発が望まれている。迷走神経刺激療法 (VNS) は頭蓋内侵襲を伴わない安全な治療法であり、本邦では難治性てんかんの緩和的治療として臨床適応がある。VNS は抗炎症作用を持ち、基礎研究では神経炎症を含めた慢性炎症性疾患や自己免疫疾患へ強い治療効果をもつ²⁾。VNS は PD モデル動物への神経保護効果を認めるが、ごく少数の研究に留まり、PD 治療への VNS の有効な刺激条件や作用は不明である。また、従来の電気刺激装置は有線式であり、動物への侵襲性、行動自由度は大きく制限されていた。疾患モデル動物への電気刺激実験では、安定した慢性刺激、簡便な刺激条件の調節、低侵襲性と行動自由度の獲得は極めて重要である。しかし、これら条件を全

て満たすデバイスは無く、臨床に近い環境を構築できるシステムの開発が必要と考えられた。我々は、刺激条件が可変式かつ長期連続刺激可能な小型電気刺激装置を開発し、PD モデルラットへの VNS の刺激強度を 0.10mA, 0.25mA, 0.50mA, 1.0mA の 4 段階に分け、治療効果を行動学的・組織学的に検討し、VNS の有効刺激強度を検討した。

研究成果の内容

1. 無線制御式小型電気刺激装置の開発

我々はユニークメディカル社（東京）と共同で、動物専用の小型体外固定式刺激装置を開発した。持続刺激および刺激条件の調整が可能な動物専用装置としては初の試みである。刺激装置は重量約 27 g、大きさ約 $2 \times 4 \times 2$ cm、アルミ製筐体に制御基板と充電式リチウムイオン電池が内蔵され小動物体表に固定して使用する。二相性矩形波を出力でき、刺激条件は外部 PC から Bluetooth® を介して無線で入力調整可能である。装置外側の LED ライトの明滅により電池残量低下やプログラム入力を検出できる。電池交換は筐体のビス 2 本の開閉で簡便に可能である。刺激電極は実験に応じて複数の形状が使用でき、装置外側コネクタ部に接続して使用する。制御プログラムは任意設定可能であり、当科では刺激強度は 0～2.0mA の 10 段階、刺激頻度は 0～300Hz での 11 段階、刺激幅は 100・250・500 μ s の 3 段階、刺激周期設定 5 段階設定している。つまり、本システムで 1,500 通り以上の多彩な刺激条件が作成でき、動物の行動自由度も獲得できる特徴がある。

2. PD モデルへは低強度刺激での VNS が有効である

動物は雌 SD ラットを使用した。三種混合麻酔薬で全身麻酔を行い、左前頸部を切開し左迷走神経を露出させ、カフ式銀製電極を留置し、背部の小型刺激装置に接続した。ジャケットを装着し装置の固定を安定化させた³⁾。その後、定位脳装置に動物を固定し、左前頭部穿頭し、6-hydroxydopamine : 6-OHDA 20 μ g を左線条体に定位投与し PD モデルを作成した。モデル作成直後より 14 日間の VNS を施行した。刺激条件は臨床用パラメーターを使用し、刺激幅 : 500 μ sec, 刺激頻度 : 30Hz, 刺激周期 : 30s ON, 5 min OFF の繰り返し、刺激強度 : 0.10mA, 0.25mA, 0.50mA, 1.0mA の 4 群に分け治療効果を判定した。対照群は偽性刺激

装置を使用し、sham VNS を施行した。第 7 日目と 14 日目に装置を取り外し、シリンダーテストとメタアンフェタミン誘発回転テストを施行した。その後、線条体および SNc におけるチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性神経線維/神経細胞発現数、同部の Iba1 陽性ミクログリアと GFAP 陽性アストロサイト発現数、LC での NA 産生を担うドパミン β 水酸化酵素陽性神経細胞発現数を評価した。結果として、VNS は 0.25mA と 0.50mA の低強度刺激で第 7 日から行動学改善を認め、その効果が 14 日目でも維持された。同条件で、TH 陽性線維密度と細胞数は対照群と比較して顕著に保持され、同部の炎症性ミクログリアとアストロサイトの発現数は刺激群で減少した。また、LC での NA 神経細胞は刺激群で保持された。一方で、0.1mA と 1.0mA 刺激群はいずれも治療効果が乏しかった。本システム概要と免疫染色結果の一部を図 1 に提示する。

3. VNS は抗炎症作用をもつ

VNS の抗炎症作用は、主に迷走神経上行性線維を介するノルアドレナリン系抗炎症経路と下行性線維を介するコリン系抗炎症経路の 2 通りで発揮される²⁾。上行性経路では VNS は NA を保護し、中枢神経系でのミクログリア・アストロサイトの過剰発現と炎症性サイトカイン分泌を抑制し、神経炎症へ抗炎症作用をもつ²⁾。また、PD モデルラットに対して VNS は、線条体 TH 陽性線維と黒質 TH 陽性細胞を維持し、アストロサイト・ミクログリアの発現を抑制、LC の NA 陽性細胞を維持し歩行活動を増加させる報告がある⁴⁾。しかし、この VNS は固定刺激で短時間刺激のため有効な刺激条件までは不明であった。本研究は微弱刺激を除いた低強度刺激による VNS が PD モデルに対する治療効果が高く、上行性経路を介して 6-OHDA による神経炎症を抑制すると考えられた。

4. VNS は「逆 U 字効果」により、神経炎症へ治療効果を発揮する

本研究の疑問点が、なぜ低刺激強度の VNS の治療効果が高いかである。神経疾患モデルでの VNS では低～中等度刺激強度が脳皮質領域の可塑性をもち、微弱・高刺激強度で効果が低い現象（逆 U 字効果）を認める⁵⁾。VNS は低強度刺激で抗炎症効果をもつ迷走神経の A・B 神経線維が特に強く活性化され、高強度刺激は治療効果発現が遅延し神経可塑性を阻害する。より精緻な刺激強度の検討が必要だが、本研究においては皮質までに至る経路上にある橋～黒質・線条体で

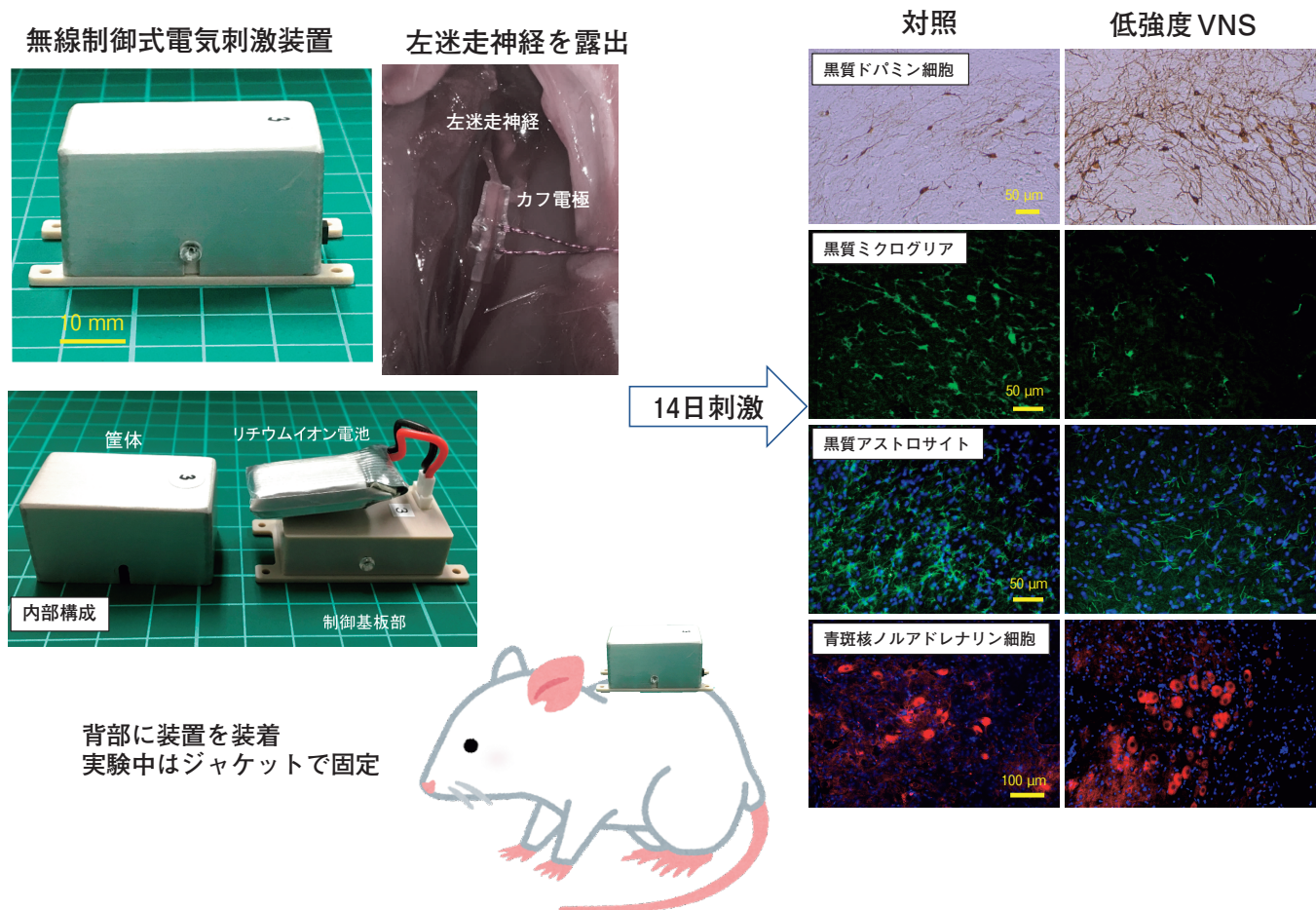


図1 新規刺激システムと実験概要

低強度 VNS のドパミン・ノルアドレナリン細胞保護作用と、ミクログリア・アストロサイトの発現抑制の例を提示する。(受賞論文より引用改変)

の治療効果が低強度刺激による逆U字効果を介して得られたと推察される。

研究成果の意義

0.25mA と 0.50mA の低強度刺激の結果から、VNS は PD モデルに対する治療効果が高く、抗炎症作用や NA 神経保護効果が関与している可能性が考えられた。臨床では VNS は低侵襲かつ高額設備を要さず比較的簡便に施行できるため、低強度刺激による VNS は PD への新たな治療戦略になり得ると考える。また、本研究を通じて、新規開発した電気刺激装置は刺激調節性・刺激連続性に優れ、小型軽量のため小動物への侵襲性とストレスが大幅に軽減された実験が可能と考える。更なる電気刺激実験の適応拡大・メカニズム解明に有用と期待する。

今後の展開や展望

迷走神経は全身に広く分布されており、VNS の正確な機序については不明点が多いのが実情である。今後、迷走神経の上行性・下行性線維をそれぞれ刺激し、炎症性サイトカイン、アセチルコリン受容体の発現動態の評価を追加で行う予定である。

近年では、PD の発症と腸管炎症の関連性、腸脳相関が注目されており⁶⁾、腸管炎症モデルを使用した実験も病態解明に有効と考える。また、当科は PD モデルへ新規システムを使用した脊髄刺激実験も施行している³⁾。低侵襲外科治療の開発に向けて、複数の電気刺激実験を並行して施行する計画である。

文 献

- 1) Hirsch EC, Hunot S: Neuroinflammation in Parkinson's

- disease; A target for neuroprotection? *Lancet Neurol* (2009) 8, 382-397.
- 2) Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S: Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: Potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol* (2016) 594, 5781-5790.
- 3) Kuwahara K, Sasaki T, Yasuhara T, Kameda M, Okazaki Y, et al.: Long-Term Continuous Cervical Spinal Cord Stimulation Exerts Neuroprotective Effects in Experimental Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* (2020) 12, 164.
- 4) Farrand AQ, Helke KL, Gregory RA, Gooz M, Hinson VK, et al.: Vagus nerve stimulation improves locomotion and neuronal populations in a model of Parkinson's disease. *Brain Stimul* (2017) 10, 1045-1054.
- 5) Engineer, ND, Riley JR, Seale JD, Vrana WA, Shetake JA, et al.: Reversing pathological neural activity using targeted plasticity. *Nature* (2011) 470, 101-104.
- 6) Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K: Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* (2003) 110, 517-536.
-

2022年5月2日受稿

〒721-8511 広島県福山市蔵王町5丁目23-1

福山市民病院 脳神経外科

電話：084-941-5151 FAX：084-941-5159

E-mail：ippachi1982@yahoo.co.jp