

生命科学複合研究教育センター 「平成22年度学内共同研究等」
**聴覚系神経回路における興奮性と抑制性ニューロン集団の in vitro
および in vivo 機能イメージング**

研究代表者：伊藤 哲史（医学部、助教）

共同研究者：池田 弘（工学部 知能システム工学研究科、准教授）

概 要
中脳下丘は下位脳幹で分散処理された音情報が統合される最初の核である。下丘局所回路の機能解析によってどのように音情報が統合されるか判明するはずであるが、このためには多数の細胞の活動を同時に記録してその相互作用を解析する必要がある。我々はスライス及び生体における下丘細胞集団活動を解析することによって下丘局所回路の機能構築と、さらにその回路の生体における役割に対して迫ろうと考えている。スライス活動の解析方法は確立したので、現在 in vivo 2光子イメージングを行うための準備を行っている。現在までに実験を行う主な障害は解決しており、今後 in vivo 実験を実際に開始する予定である。
関連キーワード

聴覚神経回路、下丘、GABA、グルタミン酸、カルシウムイメージング

研究の背景

正常な神経ネットワークの活動には興奮性と抑制性の入力との調和が必須である。正帰還回路は発振しやすいので、視床-皮質ループのような興奮性の相互連絡回路は癲癇のような異常興奮の危険をはらんでいる。このため、適切な抑制が系の正常な活動に必要である。聴覚系の場合、視床聴覚核の内側膝状体には抑制性ニューロンが殆ど存在しないので、下位核からのフィードフォワード抑制が系の活動を正常に保つために重要な働きをしていると考えられる。内側膝状体にフィードフォワード抑制を（興奮性入力と共に）行う核が下丘である。下丘の上行性抑制性線維は興奮性線維より太く、その活動電位は視床に最も早く達するため、上行抑制性ニューロンは速やかに視床を抑制することで視床の活動が異常に高まることを防ぐと考えられる。下丘の上行抑制性ニューロンが生体内でどのような条件下で活動しているのかを知るこ

とによって、視床-皮質ループでの興奮性と抑制性活動のバランスをとるために下丘で行われる情報処理について理解を深めることができるのだが、生体内で抑制性ニューロンを同定して記録をとることは今まで成功していなかった。

申請者の最近の知見を総合すると、下丘の上行抑制性細胞は多数の下丘興奮性細胞から密な興奮性支配を受ける。下丘の多くの神経細胞が特定の周波数の音に対応した入力を受けるのに対し、上行性抑制性細胞はさまざまな周波数からの音を統合するのに適した形態を有している。このことから大型抑制性細胞は高い音圧の広帯域ノイズのような刺激で下丘全体の神経活動が過大となったときに発火すると推測される。この仮説を示すためにはさまざまな音刺激に対して、多数の大型抑制性細胞と興奮性細胞が作る神経ネットワークが生体内でどのように応答するか調べる必要がある。

研究の目的

下丘の局所回路の構築と、それによって実際に行われる音情報処理の解明のために、当研究では2種類の実験を計画している。すなわち、(1) 下丘スライスを用いて、下丘局所回路の集団の活動を可視化する。この後に組織学的手法を用いて興奮性、抑制性といった細胞種を同定し、下丘局所回路における多数の興奮性と抑制性細胞の相互作

用を解明する。(2) 生きた動物に実際に音を聞かせながら、2光子顕微鏡を用いて下丘のカルシウムイメージングを行い、実験後に実験1と同様の方法で細胞種を同定し、実験1で解明した局所回路が実際の音情報処理でどのような機能を有するか解明する。本年度はスライス実験を開始したほか、in vivo 実験に必要な実験環境の構築を行った。

研究の成果

(1) 下丘局所回路の *in vitro* 機能イメージング

下丘への入力線維（外側毛帯）を温存するように下丘スライスを作成し、これに細胞膜透過性カルシウム濃度指示薬 Fluo-4 AM を負荷した。外側毛帯に刺激電極を置き、電気刺激を行いながらカルシウムイメージングを行った。電気刺激によって下丘の背腹軸に沿って並ぶ層状の細胞集団が活動を示した。これは同じ最適周波数を持つ細胞集団であると考えられた。GABA_A 受容体阻害剤を負荷することによって活動細胞数が増え、層状の活動性が失われた。これは音情報処理における側方抑制の寄与を反映していると考えられる。

(2) 下丘局所回路の *in vivo* 機能イメージング

in vivo イメージングを行うためには以下の技術的問題を解決する必要がある。

- 2光子顕微鏡に適合する脳定位装置の開発
- 音刺激システム（ハードウェア及びソフトウェア）の開発
- 2光子顕微鏡による全脳イメージング条件の設定
- カルシウム指示薬の *in vivo* 注入染色法の確立
以下のように現時点で殆どの問題を解決することに成功した。
 - ナリング製脳定位装置を改造し、顕微鏡ステージと組み合わせて、条件に合致する定位装置の試作に成功した。
 - 中空イヤバーを介して超音波をマウスに提示するための工作を技術部と共同で行った。ソフトウェアは MATLAB で作成し GUI を用いたプログラムを開発した。このプログラムではスピーカーの較正を行うことができ純音、周波数変調音、振幅変調音、ノイズ、クリックといった様々な音刺激を合成することができる。複雑な音に対する応答は下丘をはじめとした上位統合中枢で主に行われるので、これによって細胞の音刺激に対する選択性を確認することが期待される。
 - 固定した GAD67-GFP マウス頭部を上記固定装置に設置したあと、2光子顕微鏡で観察を行った。800nm の励起光によって下丘表面から*** μm

に存在する GFP 陽性細胞 (GABA 作動性ニューロン) を観察することができた。

d) 蛍光カルシウム指示薬 Oregon Green 488 BAPTA AM を 10mM になるように 20% Pluoronic/ DMSO に溶解し、これを生理食塩水に 100 μM になるように希釈し、先端抵抗 6-9M Ω のガラスピペットに詰めてこれを視覚野に挿入、100kPa の圧力で1分間注入した。注入1時間後にスライスを作成したところ、注入部位近辺で多数の三角形の大型の細胞（錐体細胞と考えられる）が標識されていた。K⁺を負荷してスライスを刺激したところ、これらの細胞は盛んに活動を示した(図)。

これら予備実験が順調に行っているため、次年度からは *in vivo* 実験を開始する予定である。

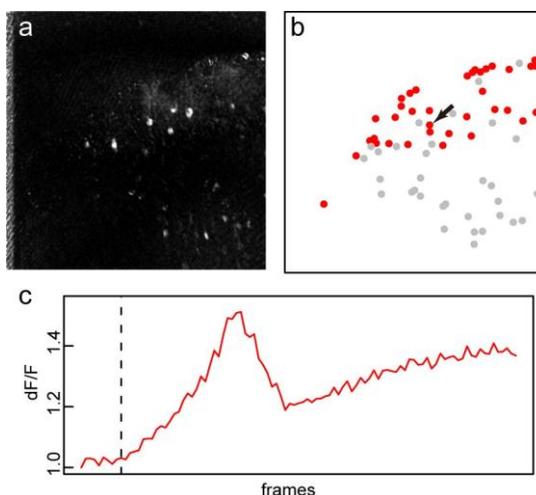


図 *in vivo* 注入法によって活動を示した大脳皮質ニューロン集団。(a) 蛍光強度変化を示したピクセルを maximal projection 法で表示。(b)抽出された細胞と、K⁺負荷後 30 フレーム以内に活動した細胞（赤）の分布。(c) b 中矢印で示した細胞の蛍光強度変化。点線は K⁺負荷を行ったフレームを示す。

特記事項・発表論文など

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

金原一郎記念財団 基礎医学研究奨励金
2010年度 「聴覚系神経回路における興奮性と抑制性ニューロン集団の *in vitro* および *in vivo* 機能イメージング」 代表 採択 50万円

上原記念財団 研究奨励金 2011年度
「聴覚系神経回路機能イメージング」 代表 採択 200万円

科研費 新学術領域 2011-12年度
「複雑音応答を生み出す神経回路の解析」 代表申請中