

in vitro および in vivo イメージングを用いて聴覚神経回路における 聴覚情報の統合の仕組みを探る

研究代表者： 伊藤 哲史（医学部・助教）
共同研究者： 池田 弘（工学研究科・教授）

概 要	
	音情報は多数の神経核によって特徴が抽出される。抽出された情報が収束する下丘で音情報が統合されると考えられるが、その統合がどの細胞で行われるか不明であった。下丘局所回路での情報処理様式を調べるため3つの実験を行った。第1に、組み換えウイルスを用いたニューロン標識によって、下丘大型抑制性ニューロンに対する情報の収束や放散の仕組みを可視化することに成功した。第2に、下丘スライスを用いて下丘への入力線維と下丘ニューロンの活動を切り分けて可視化することに成功した。第3に、生体マウスの下丘の多数の神経活動を可視化するための最適条件を決定することができた。これらのイメージング技術を組み合わせて下丘での情報処理、情報統合の仕組みを可視化することが可能であると考えられる。
関連キーワード	聴覚、電位イメージング、カルシウムイメージング、神経回路

研究の背景および目的

自然環境は周波数成分や時間変化に富んだ複雑な音に満ちている。聴覚系の一番明瞭な機能地図が周波数地図（トノトビー：同一最適周波数を持つ細胞が縞状に並ぶ）であることから従来の聴覚研究で用いられてきた純音は時間構造が定常であるが、そのような音は生物学的意義に乏しい。コミュニケーション音は音圧や周波数が複雑に時間変化するし、獲物/捕食者の立てる足音は音空間で時間に伴い移動することからわかるように、ダイナミックに変動する音こそが生物学的に重要である。このため音の時間変化について検出する神経回路が聴覚系に存在する。たとえば一部のニューロンは純音には殆ど応答せず、上昇する周波数変調音（FM）に反応する一方、同じスペクトルの下降 FM 音には反応しない。下丘は下位の聴覚神経核で並列処理された聴覚情報が初めて収束する場所であり、FM 音などの複雑音に特異的に反応する細胞が出現する。ではこのような複雑音に選好性を持つ細胞は形態学的に同定可能であろうか？

申請者が最近発見した下丘のニューロンの約10%を占める大型抑制性細胞（Ito et al., 2009）は、VGLUT2 陽性興奮性終末をその細胞体の周りに密

に受ける。ここで、VGLUT2 は聴覚系細胞の多くが発現することから、この大型抑制性細胞がさまざまな聴覚系神経核からの情報を統合することが想定される。さらに、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、大型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様々な聴覚情報を統合する、つまり複雑音への選好性を持ちうる形態を有していると考えられる。

大型抑制性細胞が下丘や下丘下の多数の興奮性ニューロンの活動を統合して複雑な音への応答を作り出す、という仮説を検証するためには、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の構築を調べ、それが生体内でどのように応答するか調べる必要がある。

本研究は、申請者が得意とする局所神経回路の分析に加え、下丘の興奮性と抑制性細胞集団の活動を機能イメージング技法によって調べる。これによって大型抑制性細胞の聴覚情報処理における役割が解明することを目的とする。

研究の内容および成果

下丘の局所神経回路の構築とその機能を解明するため、以下に挙げる3種類の実験を行った。

1：組み換えウイルスを用いた下丘大型抑制性細胞への興奮性入力の解析

Sindbis palGFP ウイルスや Sindbis pal-mRFP ウイ

ルスを下丘や、下丘に投射する下位神経核に注入したところ、標識終末の一部が大型抑制性細胞細胞体に接触するさまが観察された。単一終末レベルの解析から、1個の大型抑制性細胞の細胞体上に約300個の興奮性ニューロンの軸索が終末を

作っていると概算された。また、単一下丘興奮性細胞を標識することで、興奮性細胞は周囲の大型抑制性細胞を支配していることも明らかになった(図1)。さらに2つの神経核に2種類のウイルスを打ち分けることで、単一大型抑制性細胞の細胞体上に複数の神経核からの入力収束することも明らかとなった。

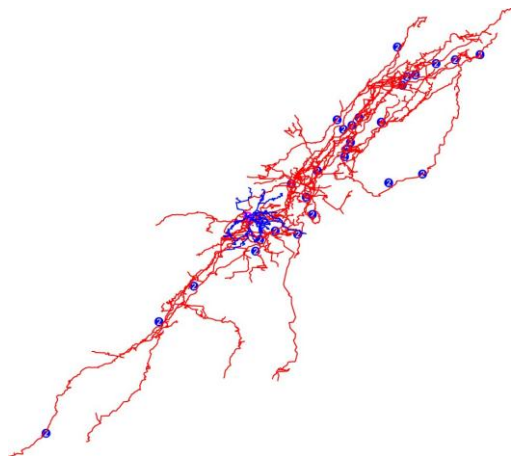


図1. 下丘単一興奮性細胞の再構築画像。この細胞は30個の大型抑制性細胞(丸)を支配しており、それらは単一下丘の層板(トノトピー構造を反映する)に並んでいる。

2: 下丘スライスを用いた、下丘内の興奮伝播様式の解明と抑制性、興奮性伝達の役割についての解析

電位感受性色素で染めた下丘スライスを入力線維が通る部位で刺激したところ、下丘中心核を経由し背側核へ達する経路と、外側核を上行する経路の2つを通して神経活動が伝播することが明らかとなった。この経路は抑制性伝達を遮断しても変化しなかった。抑制性伝達の遮断によって背側核や外側核の活動が大きく上昇したのに対し、中

心核では上昇の度合いは小さかった。

また、興奮性伝達を遮断すると、中心核や外側核下部でわずかに刺激直後の活動が残存したものの、それ以外の領域で活動が消失した。カルシウムイメージングで活動が残存した領域を観察したところ、興奮性伝達の遮断によって活動細胞体は見られなくなった。このことは、興奮性伝達の遮断によって残存する活動が入力線維の活動であることを示す。以上のことから、下丘中心核では入力線維そのものの活動が重要であるのに対し、それ以外の領域では下丘興奮性細胞と抑制性細胞の相互作用によって複雑な活動が引き起こされることを示唆している。

3: 生体マウス下丘のカルシウムイメージング

生体マウスの下丘に蛍光カルシウム指示薬を負荷することによって、下丘細胞の活動を可視化することが可能であるが、この際、呼吸や心拍などのアーティファクトが問題になってきた。麻酔薬や、指示薬の負荷法、頭部の固定法などを比較検討した。

キシラジンを混合した麻酔薬を用いることで、劇的に拍動を低下させることができた。これはキシラジンの降圧効果によるものと考えられた。指示薬の負荷を再現性よく行うためにミリ秒単位で作動するタイマーで制御されるガス注入装置を開発した。更に、頭部の固定に頻用されるイヤバーは音刺激の際にイヤバー内部での音の残響が問題になることが明らかになったため、頭蓋骨を直接接着剤で固定するヘッドプレート固定法を採用した。ヘッドプレート固定によっても安定した固定を得ることに成功している。

この結果、工学部のニポウディスク顕微鏡、医学部の二光子顕微鏡の何れでも安定した生体イメージングが可能になった。さらに、GAD67-GFPマウスに蛍光カルシウム指示薬を負荷することによって、抑制性細胞を同定した上でイメージングすることも可能となった。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

論文を1本投稿中、1本は投稿準備中である。

また、本研究の一部は

平田雄大 他 「電位イメージング法とカルシウムイメージング法による下丘トノトピー構造への抑制性入力の影響の解明」、2011年 神経科学学会

平成23年度工学研究科修士課程修了論文(平田雄大、古川博史)、平成23年度工学部卒業論文(廣瀬潤一)にて発表された。

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

助成組織・助成制度・種目・期間・研究課題・代

表/分担・採否・採択金額など

かなえ医薬振興財団 研究助成金 2011年度 「聴覚神経回路の集団機能イメージングを用いて聴覚情報の統合の仕組みを探る」代表 不採択

武田科学振興財団 2011年度 医学系研究奨励

「音情報の統合の仕組みを形から迫る-形態学、in vivo/ vitro 機能イメージング-」代表 不採択

内藤記念科学奨励金(研究助成) 2011年度

「音情報の統合の仕組みを形から迫る -形態学、in vivo/ in vitro 機能イメージング-」代表 不採択

第一三共生命科学研究振興財団 平成23年度(第29回)研究助成

「音情報の統合の仕組みを形から迫る-形態学、in vivo/ vitro 機能イメージング-」

代表 不採択