

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入力を可視化し、大型抑制性ニューロンの存在部位によって入力の種類が異なることを明らかにした。第2に、生体マウスに音刺激をあたえることで下丘表層の多数の神経活動を可視化することに成功した。第3に、c-fos 遺伝子の発現を利用することで、大型抑制性ニューロンの活動を効率よく引き起こす音刺激についての知見を得ることに成功した。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、c-fos、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（トノトピー：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)に応答する一方、同じスペクトルの下降FM音には応答しない。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応答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？

前年度までの研究で、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) 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形態学的に明らかとなった。さらに、予備実験の結果から、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することも明らかとなった。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 ウイルスを下丘や、下丘に注射す

る3種類の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。下丘全体を共焦点レーザー顕微鏡でスキャンし、この接触を受けた大型抑制性ニューロンのマッピングを行った。同側下丘のニュー

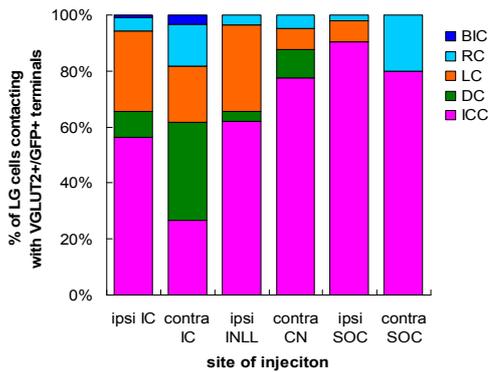


図1: トレーサー注入部位ごとに GFP 陽性興奮性終末の接触を受ける大型抑制性ニューロンの分布は異なる。下丘は下丘のすべての領域の大型抑制性ニューロンに inputs するのに対し、対側下丘のニューロンは下丘皮質の大型抑制性ニューロンに主に inputs する。また、下位神経核の線維は下丘中心核の大型抑制性ニューロンに inputs するなど、大型抑制性ニューロンへの主な inputs はそのニューロンの存在部位によって異なることが示唆された (図1)。

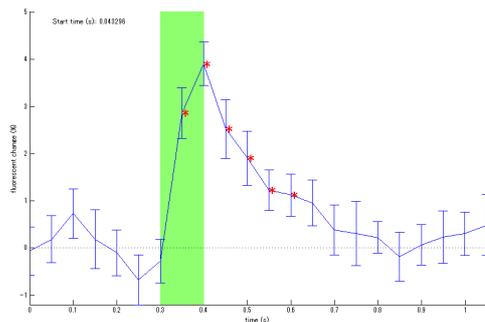


図2: ノイズ音刺激 (灰色) によって引き起こされた下丘表層ニューロンの蛍光強度変化。回の試行を平均した。*印は有意な応答を示す。

2: 生体マウス下丘のカルシウムイメージング

昨年度、生体マウス下丘におけるカルシウムイメージングで問題となる、呼吸や心拍などのアーティファクトの除去方法を解決したので、今年度は解析ソフトウェアを構築して、音刺激に対する多数の下丘表層細胞の活動を解析した。図2のよ

うに音刺激による蛍光強度変化を観察することが可能であった。データが大量に発生するため、これを解析する方法の開発が今後の課題となる。

3: c-fos 分子発現を利用した大型抑制性ニューロンの刺激選好性についての研究

ラットを防音箱に入れ、80分間 9 kHz 純音、8-10 kHz 帯域雑音、8-10 kHz ランダム周波数変調音 (以下ランダム FM 音) の何れかの刺激を 65 dB SPL の音圧で提示した。対照群として 80分間無刺激の動物も用意した。刺激提示後、動物を灌流固定し、定法にて薄切、VGLUT2, GAD67, c-fos に対する蛍光免疫染色を行うことで、刺激に対して強く応答したと考えられる c-fos 陽性細胞のうち、VGLUT2 陽性終末に取り囲まれる大型抑制性ニューロンと取り囲まれない小型抑制性ニューロンの割合を調べた。下丘の周波数選択性の高い領域である中心核で、ランダム FM 音は他の音刺激に比べ有意に多くの大型抑制性ニューロンの活動を引き起こした (図3)。この結果は大型抑制性ニューロンが幅広い周波数からの inputs を統合して活動することを示唆している。

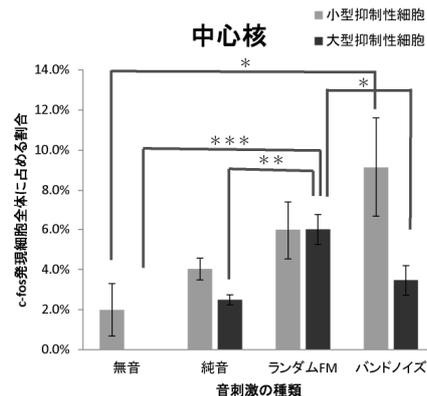


図3: 下丘中心核で c-fos を発現した細胞のうち、小型抑制性ニューロン (薄灰色) と大型抑制性ニューロン (濃灰色) の比率は音刺激の種類ごとに違いを示し、大型抑制性ニューロンの割合はランダム FM 音刺激時に最大となった (*: 0.01 < P < 0.05, **: 0.001 < P < 0.01, ***: P < 0.001, Tukey's multiple comparison test)

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」

Ito T and Oliver DL. The basic circuit of the IC: Tectothalamic neurons with different patterns of synaptic organization send different messages to the thalamus. *Front Neural Circuits* 6: 48, (2012).

廣瀬潤一 「Ca2+イメージングによる生体マウスの下丘表層細胞の音刺激に対する活動」、2012年 日本生体医学学会北陸支部大会

松田航太郎 平成24年度工学部卒業論文

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費 基盤 (C) 「かたちから探る聴覚情報統合のしくみ」代表 申請中

科学研究費 新学術領域 (公募) 「聴覚情報取捨選択機構に関わる論理ゲート回路の解明」代表 申請中

科学研究費 新学術領域 (公募) 「音オブジェクト弁別認知に関わる脳幹神経回路の解明」代表 申請中