

聴覚情報の脳内地図表現の解明

研究代表者：伊藤 哲史（医学部・助教）
共同研究者：村瀬 一之（工学研究科・教授）

概 要	
聴覚神経回路がどのように音を表象するのか明らかにする上で、神経細胞集団の時空間活動様式、すなわち機能地図を明らかにすることは極めて重要である。機能地図を明らかにするために、生理学と形態学を結びつけることは必須であり、本研究は機能イメージングや記録細胞標識法によってこれを明らかにすることを目的としている。本年度は機能地図解析に役立つ3つの新しい機能イメージングの実験技法、すなわち①電位イメージングと軸索標識の結合、②カルシウムセンサー導入動物脳スライスの神経活動解析、③カルシウムセンサー導入動物による <i>in vivo</i> イメージング技法、を開発した。いずれの技法も機能イメージングとさらなる形態学的解析を可能にする特徴があり、今後これらの方法を用いて機能地図の形態・機能解析を行なっていきたい。	
関連キーワード	聴覚、神経回路、形態学、機能イメージング

研究の背景および目的

感覚神経回路において類似した刺激に応答する細胞が近くに配置する傾向がある。これを機能地図といい、その同定は神経回路の機能を知る上で本質的に重要である。時間変化を伴う複雑な音は自然環境中に満ちていて、それを検出する能力は生存上重要である。そのような音の特徴は脳内に機能地図のかたちで埋め込まれているのだろうか？

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ことはわかっている。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。下丘には応答周波数に対する機能地図が存在することがわかっているが、それ以外の音の特徴（例えばFM音のような複雑音）に関する機能地図の存在についてはよくわかっていない。

下丘内部は複数のシナプスドメインに分かれていることが複数の研究によって示唆されている（Ito and Malmierca, 分担執筆中）。各々のドメインは異なる神経核からの入力を受け、異なる神経核は異なる種類の音の特徴をコードすることから、シナプスドメインの配列が周波数以外の機能地図を作ると考えられる。シナプスドメインの中のニューロンは興奮性細胞、大型抑制性細胞、小型抑

制性細胞の少なくとも3種類に分類されることがわかっている。このうち、大型抑制性細胞は近隣のシナプスドメインの興奮性細胞から入力を受けることによって、より複雑な応答を作り出すことが想定されている。つまり、下丘の機能地図を考える際には、単に細胞の位置のみならず、細胞の種類も考慮すべきではないかと申請者は考えている。

下丘の機能地図を細胞種も考慮しつつ検討するのが当研究の目的である。実験1では、特にその機能がわかっていない下丘表層に機能構築があるか、種々の機能イメージング技法を用いて調べる。去年度までの研究によって、下丘表層の細胞が実際に音に応答することが確認され、さらに表層に機能構築が存在することが示唆された。そこで下丘表層の機能構築の有無をより詳細に検討することとする。高速イメージングが可能な電位イメージング法や、Ca²⁺指示蛍光タンパクを神経系に発現する遺伝子改変マウスを用いて、下丘表層の神経線維の配線や、機能構築の詳細について検討する。実験2では、3種類の細胞の音への応答性を作り出す基盤を調べるため、単一細胞レベルでの追求を行う。これによって細胞の種類も考慮に入れた機能地図を解明することが可能であると考えている。

研究の内容および成果

実験1：機能イメージングによる神経回路機能構築の解析

今年度は3種類のイメージング技法の開発を行

い、一定の成果を得た。それぞれ解説する。

1-1: 電位イメージングと軸索形態の関連解析

下丘スライスでの電位イメージングによって、

下丘皮質表層の神経線維走行には規則性があることが示唆されたが[8]、電位イメージングで観察された現象の形態学的基盤に関する研究は乏しい。機能地図解明のためには両者を結合することが欠かせない。そこで、刺激電極として、蛍光色素を詰めたガラス電極を使用し、電位イメージングで活動を示した軸索を標識する技法を開発した。まず上丘でこの実験を行ったところ、電位イメージングの活動伝播の初期の流れが標識軸索展開と定性的に合致することが確認された。現在標識軸索終末とイメージングの間に定量関係が存在するか検討中である (Morita et al., 投稿中、及び[10])。現在この技術を下丘に適用するための条件を検討中である。

1-2: Thy1-GCaMP3 マウスを用いた Ca²⁺イメージング

従来頻用された蛍光色素を用いた Ca²⁺イメージングは染色効率が良くない上、色素が固定不可能なため、標識細胞の同定が困難であった (例えば [11])。そこで、神経細胞特異的プロモーター制御下で Ca²⁺センサー蛋白 GCaMP3 を発現する Thy1-GCaMP3 マウスを用いた Ca²⁺イメージングを検討した。GCaMP は発現強度が強く、特定の細胞種で発現が見られることを免疫染色によって確認した。GCaMP が細胞外に流出するのを防ぐスライス作成法を導入することで、スライスを用いた Ca²⁺イメージングの成功率を高めることができた。下丘では、下丘中心核や、下丘皮質 2 層の Ca²⁺イメージングにこのマウスが適していることが確認

された。また、このマウスを慢性疼痛モデルにおける大脳皮質の自発神経活動変化を検出するのに利用することができた (伊藤晃、卒業論文)。

1-3: AAV-Syn-GCaMP6f を用いた in vivo Ca²⁺イメージング

Thy1-GCaMP3 マウスの GCaMP 発現は下丘皮質表層では弱く、このため、当初予定した下丘皮質表層の in vivo Ca²⁺イメージングには使いにくいことが判明した。そこで、P1 レベルで使用可能な組み換え AAV ベクターを利用して下丘皮質表層ニューロンに GCaMP を導入することを試みた。また、従来から in vivo 実験は動物の死亡率が高かったため、より安全な実験プロトコルの確立を目指した。結果、8 匹のマウスの下丘皮質表層ニューロンに 1 週間以上安定して GCaMP を発現させることに成功した。このような安定発現は蛍光色素を用いた Ca²⁺イメージングでは不可能なことである。また、記録された蛍光強度変化も蛍光色素に比べて高く、本技法が有望であることがわかった (品川恭平、卒業論文)。

実験 2: 下丘単一ニューロンの機能形態学

本年度も傍細胞記録・染色実験を追加して行い、現在 109 個の下丘細胞の形態と生理学的性質に対応を与えることができた。またデータ解析プログラムの開発を行い、これによって、細胞の分類を行っているところである。

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」

2015 年度の発表論文は以下のとおり。下線は生命センター教員。

- [1] Ito T, Hioki H, Sohn J, Okamoto S, Kaneko T, Iino S, Oliver DL. Convergence of lemniscal and local excitatory inputs on large GABAergic tectothalamic neurons. *J Comp Neurol* 523: 2277-2296, 2015.
- [2] Ito T, Inoue K, Takada M. Distribution of glutamatergic, GABAergic, and glycinergic neurons in the auditory pathways of macaque monkeys. *Neuroscience* 310: 128-151, 2015.
- [3] Saito T, Ito T, Ito Y, Manabe Y. Long-term Follow-up Results of Regeneration Process of Fungiform Taste Buds After Severing the Chorda Tympani Nerve During Middle Ear Surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* in press.
- [4] Ito T, Atoji Y. Tectothalamic inhibitory projection neurons in the avian torus semicircularis. *J Comp Neurol* in press.
- [5] Saito T, Ito T, Ito Y, Manabe Y, Sano K. Comparison of fungiform taste-bud distribution among age groups using confocal laser scanning microscopy in vivo in combination with gustatory function. *Eur J Oral Sci*, in press.
- [6] Ono M, Ito T. Functional organization of the

mammalian auditory midbrain. *J Physiol Sci*, 2015.

- [7] Ito T, Bishop DC, Oliver DL. Functional organization of the local circuit in the inferior colliculus. *Anat Sci Int*, 2015.

学会発表は以下のとおり (すべて第 38 回 日本神経科学学会 大会、ポスター発表)。下線は生命センター教員及び工学部学生。

- [8] 轟 真語, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之 下丘表層における神経活動の計測
- [9] 伊藤 哲史, 阿閉 泰郎 鳥類下丘の GABA 含有細胞の超微形態
- [10] 森田 奈々, 長谷川 良平, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之 軸索標識と電位イメージングを組み合わせることで上丘層間の機能的非対称を解明した
- [11] 福澤 拓也, 荒本 顕, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之 マウス坐骨神経結紮による神経損傷が脊髄後角細胞の自発及び誘発活動に与える影響

「特記事項」

工学部卒業論文指導 3 件、修士論文指導 5 件。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費・基盤 (C) 代表 申請中

科研費・新学術 (公募) 代表 申請中