

令和元年6月11日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07026

研究課題名(和文)かたちから探る聴覚情報表現

研究課題名(英文)Functional anatomy on information coding of sound

研究代表者

伊藤 哲史 (ITO, Tetsufumi)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90334812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：下丘では時間変化する複雑音がどのように表現されているのか解明すべく、個々の細胞の種類とその空間配置に注目しつつ神経細胞の活動性を調べた。実施した実験のうち、傍細胞記録・染色法が特に詳細かつ明瞭な結果を示した。それによると、下丘に存在する大型抑制性細胞、小型抑制性細胞、興奮性細胞は異なる生理学特性、樹状突起形態、入出力様式をしめすのみならず、音に対する応答性に関する地図表現に関し、いくつかの音情報について、細胞種ごとに異なる地図が存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、聴覚統合中枢の一つ、下丘では、音の様々な情報が下丘内で地図のようなかたちで表現されていること、また、下丘には様々な細胞種が存在しており、細胞種ごとに地図が異なることが明らかとなった。この成果は、次世代型の補聴器として考えられる、下丘刺激型補聴器を実現する上で重要である。すなわち、本研究は、下丘内に電極アレイを挿入し、細胞種特異的・空間地図選択的に刺激を行うことで、言語音のような複雑な音を脳内に再生することが理論的に可能であることを示している。

研究成果の概要(英文)：To investigate how time-varying complex sound is coded in the inferior colliculus (IC), we examined sound-evoked responses of IC neurons. In particular, we focused on the relationships among cell types, spatial distribution, and sound responsiveness. Among the experiments tested, juxtacellular recording/staining experiment was the most detailed and precise. As results, three cell types of the IC, namely large GABAergic, small GABAergic, and glutamatergic neurons, showed different physiological properties, dendritic morphologies, and input/output patterns. Furthermore, for some aspects of sound information, spatial maps inside the IC were found, and the maps were different between cell types.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路 聴覚 機能構築

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

感覚神経回路において類似した刺激に应答する細胞が近くに配置される傾向がある。これを機能地図という。このように配置することによって配線が簡略化したり、側方抑制のような情報処理を行いやすくなったりする利点がある。したがって機能地図を解明することは神経回路の情報処理や機能を知る上で本質的に重要である。加えて、近年応用が視野に入ってきたブレイン・マシン・インターフェイス (BMI) において、神経活動とその意味との間の双方向の翻訳が必要になるが、そのために機能地図の同定は必須である。したがって、機能地図のような機能構築の研究は脳内情報処理を理解する基礎的観点と、臨床応用の観点の両面から見て重要である。

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。コミュニケーション音で音圧や周波数が複雑に時間変化 (それぞれ振幅変調 AM と周波数変調 FM に対応) 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。

聴覚神経経路では、まず蝸牛で音が神経活動に変換される。音のさまざまな比較的単純な特徴 (周波数、音圧、両耳間時間差、音圧差など) は蝸牛神経核、上オリーブ核、外側毛帯核といった下位の神経核で抽出される。抽出された音の様々な単純な特徴を統合する神経回路が AM 音や FM 音のような複雑な音への特異的な应答を生み出す。下丘は下位の聴覚神経核で並列処理された音の特徴についての様々な情報すべてが初めて収束する場所であり、複雑音に特異的に应答する細胞が出現する。例えば、下丘ニューロンの 70% は AM 音の変調周波数に対する発火率が帯域通過特性を示す (Langner and Schreiner, 1988) つまり特定の AM 音の振幅変調周波数に対して特異性を有する。また、下丘ニューロンの一部は FM 音の方向 (周波数の上昇/下降) に対して選択性を有し、それはシナプス入力の相互作用によって生まれる (Kuo and Wu, 2012, Neuron)。

ではこのような複雑音に選好性を持つ細胞の空間配置には何らかの規則性があるのだろうか? 換言すると、複雑音に対する機能地図は下丘に存在するのだろうか? 例えば、コウモリの大脳皮質聴覚野では、音の周波数に対する機能地図と別に FM 音に対する機能地図が存在するのであるが (Suga, 2015, Hear Res) 下丘にこのようなものがあるのか定かでない。

また近年の *in vivo* Ca<sup>2+</sup> イメージング研究によれば 2 次聴覚野 (Issa et al., 2014, Neuron) 機能地図は巨視的なもので、局所回路のレベルではさまざまな应答性の細胞が混在していて機能地図は不明瞭になっていく。これは細胞種ごとに应答性が異なることを反映している。つまり、機能地図の研究をするにあたって、細胞種の同定と、細胞種毎の地図を作っていくことが重要であろうと研究代表者は考えている。

研究代表者は特定の細胞種に着目することで下丘の局所回路を解析してきた。下丘のニューロンの 10% を占める大型抑制性細胞は、多数の下丘興奮性細胞や下丘より下位の様々な神経核の興奮性細胞から密な興奮性支配を受ける。単一軸索の支配様式の解析から、1 個の大型抑制性ニューロンは複数の神経核に由来する 80 個程度の興奮性細胞からの入力を細胞体を受けていることが判明した。さらに、下丘には層板が積み重なった形状の周波数地図表現 (トノトピー) が存在し、下丘の多くの神経細胞が特定の周波数情報に対応した 1 枚の層状の入力を受けるのに対し、大型抑制性細胞は多数の層をまたぐ樹状突起を有し、さまざまな周波数情報を統合するのに適している。さらに、下丘内部は異なる神経核からの入力を受ける複数の機能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が (Ito and Malmierca, 2018) 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、機能ドメインの配列が周波数で

外の音情報に関する機能地図を作ると考えられる。大型抑制性細胞は局所興奮性細胞を介在して複数の機能ドメインからの入力を統合することから、我々は大型抑制性細胞が様々な機能ドメインからの異なる聴覚情報を統合することで複雑音への選好性を持つと推測している。このように、下丘の機能地図は個々の細胞種の空間的配置が重要となると研究代表者は考えてきた。

## 2. 研究の目的

従来の神経解剖学・神経生理学技法に加え、多数の神経細胞を顕微鏡視野内に同定し、それらの細胞の活動を同時に記録することができると便利である。我々のグループは下丘で *in vivo*  $Ca^{2+}$  イメージングを行い、多数の細胞の音刺激に対する応答性を記録することに世界に先駆けて成功した。このようなさまざまな機能形態学的技法を用いて下丘の複雑音に対する機能地図を、細胞レベルの解像度で細胞種毎に明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### 実験 1: *in vivo* $Ca^{2+}$ イメージングによる聴覚機能構築の詳細の検討

研究代表者のグループが確立した下丘の *in vivo*  $Ca^{2+}$  イメージングや電位イメージング技法を用いて、下丘の局所回路の解析を行う。超音波発生システムを用いて音刺激を提示し、音で誘発されるニューロンの活動を観察する。また、電位イメージングを用い、聴覚神経回路の活動様式からその機能構築を探る。

### 実験 2: c-fos 分子発現を用いた音刺激依存的な活動ニューロンの下丘内分布の解明

下丘には 3 種類のニューロンが同定可能である。これらのニューロン、とりわけ大型抑制性細胞がどのような音刺激に対して活動を示すのか調べる。防音箱内にラットを入れ、120 分間無音、純音、AM 音あるいは FM 音に暴露する。直後に動物を固定し、切片を作成する。c-fos 分子の発現は直前の神経活動を反映することが知られている。そこで c-fos 発現を示した 3 種類の下丘ニューロンの空間分布を調べることで純音や AM 音や FM 音に対する下丘内地図表現を得ることができる。これらの地図表現を比較することで、AM 音や FM 音といった複雑音に対する応答細胞の空間配置はトノトピー構築とどのような対応を持つのか判明する。

### 実験 3: 下丘単一ニューロンの機能形態学

実験 1 や 2 で得られる機能構築は空間的分解能に優れる一方、刺激に対するニューロンの応答の詳細は分からない。下丘のさまざまな機能ドメインからのサンプリングを行い、抽出された標本(ニューロン)の応答の詳細をユニット記録によって調べることでこの問題を解決する。さらに、ユニット記録した細胞を染色することができれば、ニューロンの刺激反応性に関するパラメータである下丘の層構造に対する樹状突起の展開や、興奮性・抑制性終末の入力様式と応答性の関係を明らかにすることができ、下丘の個々の細胞種が行う情報処理のメカニズムを解明することに繋がる。

そこで、下丘ニューロンの形態と機能の関連を調べるため、蛍光色素 TMR-cadaverine を詰めたガラス電極をラット下丘に刺入し、傍細胞記録・染色法 (Pinault, 1996) の要領で音刺激に対するユニット活動記録を行った細胞を TMR で標識する。24 時間後に動物を灌流固定し、内側膝状体から蝸牛神経核に至る聴覚核全領域の連続切片を作成し、免疫組織化学によって大型抑制性細胞、小型抑制性細胞、非抑制性細胞の同定を行う。細胞の樹状突起形態やそこに接触する興奮性・抑制性終末の空間分布、標識細胞の軸索展開や細胞体の存在部位を NeuroLucida でトレースし、定量解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### 実験1：機能イメージングによる聴覚機能構築の詳細の検討

脳の機能地図の形態学的基盤を明らかにする技法を開発すべく、下丘スライスに色素を詰めた電極を刺し、電位イメージングを行いながら軸索の標識を行なった。すると、神経活動伝様式と標識軸索終末の空間分布に強い相関が見られた(論文)。この技法を *in vivo* に応用するための条件を現在検討している。

##### 実験2：c-fos 分子発現を用いた音刺激依存的な活動ニューロンの下丘内分布の解明

c-fos 分子の音刺激に対する発現パターンは個体差が大きいことが問題であった。そこで、c-fos の以外の活動依存性分子の発現についても検討を行った。リン酸化 Erk は下丘皮質で強く免疫反応性が見られた。これは c-fos が下丘皮質で強い発現を示すこととよく対応していた。一方、下丘中心核でこの分子の発現は見られず、この分子は音刺激による神経可塑性に関係すると推測された。実験条件の詳細を検討中である。

##### 実験3：下丘単一ニューロンの機能形態学

67 例のラット下丘中心核ニューロン(大型抑制性細胞 13 個、小型抑制性細胞 5 個、興奮性細胞 49 個)について、細胞種、樹状突起形態、入力終末の空間分布と音刺激に対する応答性の関連について検討した。大型抑制性細胞はスイープ音に対する選好性が確認された。この選好性がどのような形態学的パラメータと相関が強いのか解析したところ、樹状突起の展開も重要ではあるが、最も強い要因は興奮性や抑制性を入力終末の密度であることが判明した。一方、小型抑制性細胞は素早く変化する正弦変調 FM 音の変調位相によく追従することが判明した。この選好性と相関のある形態学的パラメータは樹状突起の広がりや抑制性を入力終末の密度であったが、何れも弱い相関に留まったことから、この選択性は膜特性のような細胞内部の特性によって主に生み出されると考えられた。

下丘中心核神経細胞の樹状突起形態を NeuroLucida を用いて定量化したところ、抑制性細胞と興奮性細胞の間で様々な形態学的特徴に違いが見られることが明らかになった。さらに、細胞体周囲のコンフォーカル Z スタック画像から、細胞体及び樹状突起に接触する興奮性及び抑制性終末の密度を定量化した。すると、大型抑制性細胞は樹状突起、細胞体両者の部位で他の細胞種に比べ有意に多い入力を受けることも明らかになった。一部の生理学的性質はこのような樹状突起形態や終末密度といった形態学的パラメータと相関を示した。NEURON シミュレータを用いて、大型抑制性細胞と小型抑制性細胞をシミュレーションしたところ、実際の音刺激応答性に類似した発火様式を再現することに成功した。

サンプル数の多い大型抑制性細胞と興奮性細胞について、各々の細胞の生理学特性と空間座標をプロットし、同一細胞種および異なる細胞種について、生理学特性の相違度の細胞間距離に関する関数(dissimilar index)を算出し、この関数と、細胞がランダムに分布していた場合の関数を 5000 回算出することによって求めた 95% 信頼区間を比較した。すると、いくつかの生理学特性について、近隣の細胞がより類似した性質を有する、すなわち地図表現が存在することと、この地図表現が大型抑制性細胞と興奮性細胞で異なることが明らかとなった。近隣の細胞は視床の同じ領域に投射することから、異なる生理学特性をもった興奮性細胞と大型抑制性細胞からの出力が視床で収束することで新たな情報表現が生まれることを示唆している(学会発表・シンポジウム、論文)。以上のデータをまとめて、現在論文を執筆している。また、これらのデータを支持する形態学的データをコウモリでも得ることができたので、それについても発表を行った(学会発表・シンポジウム、論文、)。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線、\*は責任著者、+は equal contribution )

[ 雑誌論文 ] ( 計 10 件 )

Ono M, Ito T Inhibitory Neural Circuits in the Mammalian Auditory Midbrain.  
Journal of experimental neuroscience 12 1179069518818230 2018 年 12 月 査読有

Ito T\*, Furuyama T, Hase K, Kobayasi KI, Hiryu S, Riquimaroux H Organization of subcortical auditory nuclei of Japanese house bat (*Pipistrellus abramus*) identified with cytoarchitecture and molecular expression. The Journal of comparative neurology 2018 年 8 月 査読有

Ito T\*, Furuyama T, Hase K, Kobayasi KI, Hiryu S Organization of projection from brainstem auditory nuclei to the inferior colliculus of Japanese house bat (*Pipistrellus abramus* ) Brain and Behavior e01059 2018 年 7 月 査読有

Yamamoto R, Ahmed N, Ito T, Gungor NZ, Pare D Optogenetic Study of Anterior Bnst and Basomedial Amygdala Projections to the Ventromedial Hypothalamus eNeuro 5(3) e0204-18 2018 年 6 月 査読有

Chen C, Cheng M, Ito T\*, Song S\* Neuronal organization in the inferior colliculus revisited with cell-type-dependent monosynaptic tracing Journal of Neuroscience 38(13) 3318-3332 2018 年 2 月 査読有

Itokazu T, Hasegawa M, Kimura R, Osaki H, Albrecht UR, Sohya K, Chakrabarti S, Itoh H, Ito T, Sato TK, Sato TR Streamlined sensory motor communication through cortical reciprocal connectivity in a visually guided eye movement task. Nature communications 9(1) 338 2018 年 1 月 査読有

Kobayashi J, Saito T, Ito T, Yoshimura H, Matsuda S, Yoshida H, Fujita R, Sano K Association of tongue brushing with the number of fungiform taste buds and taste perception: A preliminary study using confocal laser scanning microscopy in combination with a filter-paper disc method. Archives of oral biology 84 145-150 2017 年 9 月 査読有

Morita N, Ito T, Hasegawa RP, Murase K Development of Functional Interlaminar Pathways in the Mouse Superior Colliculus Revealed by Optical Imaging with Axonal Labeling Journal of Biosciences and Medicines 5(8) 11-35 2017 年 7 月 査読有

Saito T+, Ito T+, Ito Y, Manabe Y, Sano K Relationship between gustatory function and average number of taste buds per fungiform papilla measured by confocal laser scanning microscopy in humans. European journal of oral sciences 125(1) 44-48 2017 年 2 月 査読有

Saito T+, Ito T+, Ito Y, Yamada T, Okamoto M, Manabe Y Gustatory Dysfunction and Decreased Number of Fungiform Taste Buds in Patients With Chronic Otitis Media With Cholesteatoma. The Annals of otology, rhinology, and laryngology 125(9) 704-709 2016年5月 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

シンポジウム

伊藤哲史 アブラコウモリ下丘を直接制御する終脳3領域 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会 2019年3月28日

伊藤哲史、大森治紀 聴覚神経回路解析の新戦略-新規に発見した順行性経シナプストレーサーと電気記録を併用した機能的神経回路網の可視化 第124回 日本解剖学会総会 全国学術集会 2019年3月27日

伊藤哲史 下丘における音情報の細胞種表現と地図表現 第123回日本解剖学会全国学術集会 2018年3月

国際学会ポスター

伊藤哲史、山本亮、古山貴文、長谷一磨、小林耕太、飛龍志津子 Triadic forebrain structures that directly control the auditory midbrain of echolocating bats 北米神経科学学会 2018年11月6日

〔図書〕(計2件)

伊藤哲史、小野宗範、Douglas L. Oliver (分担) The Oxford Handbook of the Auditory Brainstem Oxford University Press 2018年12月 ISBN:9780190849061

伊藤哲史、Manuel S Malmierca (分担) The Mammalian Auditory Pathways, Springer Handbook of Auditory Research, Vol. 65 Springer 2018年3月 ISBN:978-3-319-71796-8

〔その他〕

ホームページ: <https://researchmap.jp/t-ito/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 村瀬 一之

ローマ字氏名: (MURASE, Kazuyuki)

所属研究機関名: 福井大学

部局名: 工学(系)研究科(研究院)

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40174289

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。