

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11319

研究課題名（和文）フラビン蛋白蛍光イメージングを用いたマウス大脳皮質前庭領野同定とその可塑性の解析

研究課題名（英文）Identification and plasticity of the vestibular area of the mouse cerebral cortex using flavoprotein fluorescence imaging

研究代表者

大島 伸介（OHSHIMA, SHINSUKE）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70632438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：C57BL/6マウスに対してカロリック刺激を行ったが、眼振所見の再現性は高くなかった。そこで、マウスに行った報告はないが他の動物種で実績のある前庭刺激法であるガルバニック刺激を試みたところ、大脳皮質の反応は刺激周波数に応じて変化し、低周波刺激ではPIVCと思われる前庭領野、より高周波刺激では聴覚野が反応する所見が得られた。次いで、フラビン蛋白蛍光の数倍の強度でイメージングが可能なGCaMP6マウスで同様の実験を行った。C57BL/6マウスと同様に、低周波刺激ではPIVCと思われる前庭領野、高周波刺激では聴覚野が反応する傾向が得られ、イメージングの反応強度は高くなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的の学術的意義は、聴覚や視覚、体性感覚刺激による前庭領野反応を測定し、前庭野以外の刺激による前庭領野の可塑性メカニズムを明らかにすることであり、それによる社会的意義は中枢代償をより効果的に促す新たなめまいリハビリテーション法の開発が期待できることである。本研究の成果はマウス大脳前庭領野の可塑性メカニズムに迫ることはできなかったが、前庭領野の局在を示唆する所見を得たと考えている。

研究成果の概要（英文）：Caloric stimulation was applied to C57BL / 6 mice, but the reproducibility of nystagmus findings was not high. Therefore, although there is no report on mice, we tried galvanic stimulation, which is a proven vestibular stimulation method in other animal species. The response of the cerebral cortex changed according to the stimulation frequency, and it was found that the vestibular area, which seems to be PIVC, responded to low-frequency stimulation, and the auditory cortex responded to higher-frequency stimulation. Next, a similar experiment was performed on GCaMP6 mice that can be imaged at several times the intensity of flavoprotein fluorescence. Similar to C57BL / 6 mice, the vestibular area, which seems to be PIVC, tended to respond to low-frequency stimulation, and the auditory cortex tended to respond to high-frequency stimulation, and the response intensity of imaging increased.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大脳前庭領野 PIVC マウス イメージング ガルバニック刺激

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルを用いた電気生理学的手法で明らかにされた前庭領野は、視覚や体性感覚など他の感覚入力も受けて互いに密に連絡する“multisensory vestibular cortical areas”であり、その中心的役割を果たすのは、PIVC (parieto-insular vestibular cortex) である。PIVCは、ヒト、サルでは島周辺、後方の大脳皮質に同定されているが、より汎用性のある実験動物であるマウスでは同定されていない。本研究では、われわれが行ってきたフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて、マウスの前庭領野を同定することを目的とする。

前庭障害後の中枢代償メカニズムとして、視覚や体性感覚情報に対する反応性の増加が考えられる。実際、臨床の現場では視覚および体性感覚に対する反応性を増加させるようなリハビリプログラムが組まれている。また、我々はめまい患者では立位保持のストラテジーが体性感覚依存にシフトしていることを報告した (Okumura T, Horii A et al. 2015)。これらは主に小脳や脳幹レベルでの現象と考えられるが、前庭領野における感覚統合を強化することで、その下行性出力が増加し代償を促進できる可能性も考えられる。また、VEMP (Vestibular Evoked Myogenic Potential) は強大音刺激による耳石反射を見る検査であるが、人工内耳患者では術前消失していた VEMP 反応が術後出現することが報告されている。すなわち、視覚や体性感覚刺激に加え、聴覚も中枢代償を促進させる感覚刺激として利用できる可能性も考えられる。

われわれは以前からフラビン蛋白蛍光イメージングを用いてマウス大脳聴覚野の神経活動や可塑性を研究している。サルの PIVC 領域は島周辺の大脳皮質で表層に近く、マウスの前庭領野もフラビン蛋白イメージングで観察可能と推測される。マウス前庭領野が同定できれば、その機能解析は聴覚野研究と同様の手法を用いて実現可能である。

2. 研究の目的

本研究ではフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて前庭刺激に反応するマウス前庭領野を同定することを第1の目的とする。次いで前庭領野が、他の空間認知に関与する視覚や体性感覚あるいは聴覚刺激に反応するのかどうか検討する。これらの感覚統合が前庭領野で確認できれば、感覚刺激の組み合わせのうち最も効率よく前庭領野を賦活化する感覚刺激を決定し、中枢代償を促進するめまいリハビリテーションの最適化への臨床応用が可能となると考えた。

3. 研究の方法

(1) マウス大脳皮質前庭領野の同定

① 前庭破壊

5-8週のCB57BL/6マウスをペントバルビタール腹腔内麻酔下に、耳介後部に切開を加え、外側および後半規管の隆起部を同定し、各々にドリルで小孔を開けてリンパ液の流出を確認後、削開部からエタノール注入、吸引を繰り返すことで一側前庭破壊を行う (Kitahara et al. 1996)。これにより破壊側の前庭機能は低下する。

② 内耳電気刺激

ラットの中耳骨胞に小孔をあけ、そこから電極を正円窓に挿入し陰性矩形波で電気刺激であり (Horii et al. 1993)、前庭機能を亢進させる刺激となる。内耳電気刺激では聴覚系への刺激にもなり得るので、聴覚野での反応をサブトラクションする、前庭神経核を前もって電気凝固した動物や内耳破壊動物で大脳での反応がブロックされるか検討する。

③ カロリック刺激

内耳骨胞にあけた小孔にシリコンチューブを留置し、30度、44度あるいは37度の生理食塩水を毎分1mlで還流しカロリック刺激とする (Horii et al. 1993)。

冷刺激は前庭機能を低下、温刺激は亢進させる刺激となる。

④ ガルバニック刺激

ヒトでは、乳様突起部に電極を貼付し、数mA程度の直流電流を通電して耳石器を刺激する前庭感覚刺激法である。VRにも応用されている。ラットでは経外耳道的に前庭窓へバイポーラ電極を固定し、直流電流、Biphasic刺激を行った報告がある。マウスでは報告がない。

実際に上記の刺激が前庭系へ入力したことの確認はハイスピードビデオカメラを用いて、マウスの眼振所見で行う。これらの刺激前後、および刺激中に以下に述べるフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて、ヒト、サル、P1VC領域を参考に島付近の側頭葉を観察し、マウス大脳皮質の前庭領野を同定する。

⑤ フラビン蛋白蛍光イメージング

イメージングの具体的方法はこれまでわれわれが行ってきた手法と同様に、経頭蓋的にフラビン蛋白蛍光を利用して行う。ウレタン麻酔 (1.7g/kg、腹腔内注射) したマウスの頭部皮膚を切除、側頭筋を翻転させ、大脳側頭葉を明視下に置く。経頭蓋的に青色励起光 (450-490 nm) を脳表に照射し、脳表より放射される緑色自家蛍光 (500-550 nm) を冷却 CCD カメラにより撮影する。反応は1秒あたり9フレーム (約110msec毎) の頻度で撮影する。フラビン蛋白蛍光の強度変化を、コンピュータ上で疑似カラー化し、神経活動の変化を観察する。腹臥位で水平方向から測定することにより両側同時に測定できる。

これまでのフラビン蛋白蛍光イメージングのシステムは、側頭部に位置する聴覚野を測定するためにマウスを側臥位に近い体位で固定して、マウスの直上から顕微鏡を垂直向きにして記録をとっていたため、測定は一側のみであった。われわれは、腹臥位でマウスを固定し、両脇に2台の顕微鏡を設置して水平方向から両側側頭葉の大脳皮質を両側同時に測定できるシステムを構築した。両側同時測定が可能になり、腹臥位により安定した呼吸状態を維持できる点がメリットで、本システムの独創的な点である (図1)。

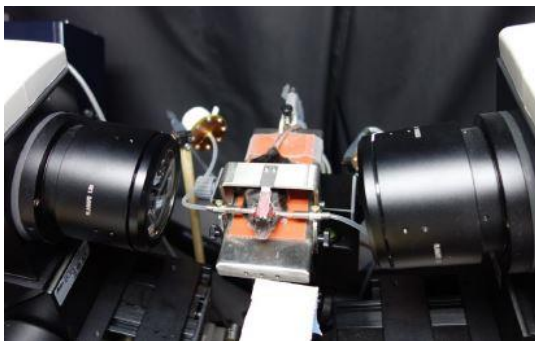


図1: 両側同時測定可能なフラビン蛋白蛍光イメージングシステム

中央の実験台にマウスを腹臥位とし、両側斜め上方に顕微鏡を配置した。マウス頭部はデンタルセメントで固定した。

(2) マウス前庭領野における感覚統合の検討

同定された前庭領野を関心領域として、視覚、体性感覚、聴覚刺激による反応性をフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて検討する。これらの刺激は、我々あるいは共同研究を行ってきた本学脳研究所システム生理学教室により大脳でフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて解析し、すでにそれぞれの1次感覚野に関して報告してきたものである (図2)。本研究では、これらで用いたのと同じ刺激条件で関心領域をそれぞれの1次感覚野ではなく、前庭領野で検討し前頭領野における感覚統合の有無を確認する。さらに、これらの感覚刺激を組み合わせることで前庭領野での反応が増強するかどうか検討する。

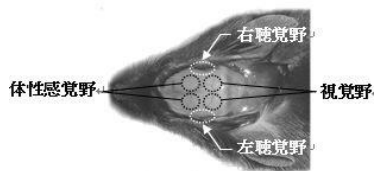


図2：マウス大脳皮質の一次感覚野

次に、両側前庭破壊した慢性動物で同様の実験を行い、最も効率的に前庭領野を賦活する刺激、あるいは刺激の組み合わせを同定する。このことにより、両側前庭機能低下の患者のリハビリテーションに用いる最適な感覚刺激を決定する基礎データを得る。

① 視覚刺激：マウスの眼球は左右に離れており、視野中央の両眼視領域に視覚刺激を与えるため、マウス正面から30cm離れた位置に赤色LED ($\lambda=613\text{nm}$) を設置し、1秒間点灯させる。

(Yoshitake et al. 2012)

② 体性感覚刺激：機械刺激装置の先端に綿棒を取り付け、50Hz、1秒間の振動刺激を尾の根元部分に加える。(Ikeda et al. 2005)

③ 聴覚刺激：マウス正面から10cm離してスピーカーを設置し、過去の研究でマウス一次聴覚野の大きな反応が得られたFM音 (5kHzから40kHzへ連続変調) を用いる。(Ohshima et al. 2010)

4. 研究成果

(1) マウス大脳皮質前庭領野の同定

① 前庭破壊と②内耳電気刺激：手術手技的に難易度が高く、断念した。

③ カロリック刺激

一側時に経外耳道的に冷水を注入し、イメージングを行った結果、PIVCと思われる領域の反応は得られず、大脳皮質の体性感覚野領域が反応した。原因として、マウスの外耳道や鼓室腔の容量は小さく、冷水注入量が多くなると外側半規管内のリンパ液の対流による前庭刺激より、注水した液体の外耳道への接触刺激の影響が強いためと考えられた。前庭刺激を生じ、かつ体性感覚刺激を生じないことは困難なため、次項の④ガルバニック刺激を用いた。

④ ガルバニック刺激 (GVS)

耳介を切除し鼓膜や耳小骨を摘出後、双極針電極を前庭窓周辺の鼓室壁に接触させ、電気刺激を行った(図3)。



図3：ガルバニック刺激 (GVS) の刺激電極

マウスではガルバニック刺激 (GVS) に関する過去の報告がなく、最適な刺激条件を探った。Biphasic 刺激 1.5V, 1mA 刺激では顔面神経が刺激された。漏電予防のため電極先端以外を絶縁し、刺激電流を小さくした。刺激側は右とし、両側大脳皮質を同時にイメージングした。

⑤ フラビン蛋白蛍光イメージング

1) PIVC(前庭領野)の位置

PIVCは聴覚野(AF)より約3.5mm頭側で腹側、頬骨弓の背側に存在すると思われた(図4)。

次いで、フラビン蛋白蛍光の数倍の強度でイメージングが可能な GCaMP6 マウスで同様の実験を行った。C57BL/6 マウスと同様に、低周波刺激では PIVC とされる前庭領野、高周波刺激で

は聴覚野が反応する傾向が得られ、イメージングの反応強度は高くなった

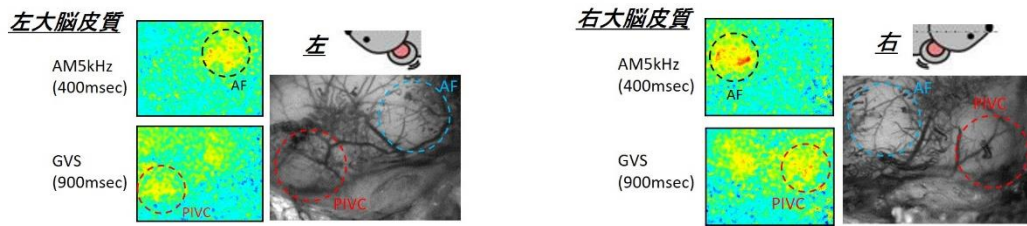


図4：ガルバニック刺激(GVS)に対するマウス大脳皮質の反応

2) 音刺激とガルバニック刺激の反応時間の違い

音刺激に対する聴覚野のフラビン蛋白蛍光の反応は、刺激開始から 0.5 秒後にあるが、ガルバニック刺激に対する反応は 0.8 秒後または 0.9 秒後にあり、聴覚野反応よりガルバニック刺激に対する反応の方が遅い傾向にあった(図5)。

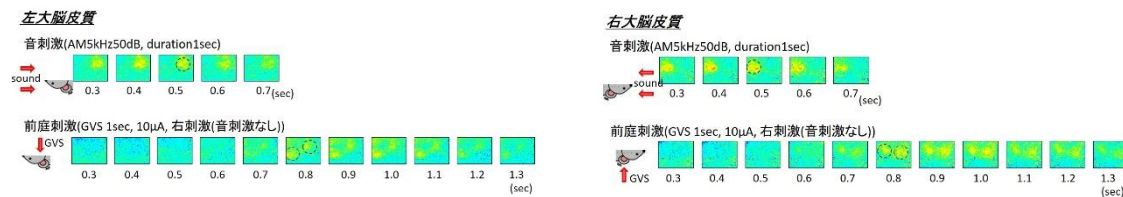


図5：ガルバニック刺激(GVS)に対するマウス大脳皮質の反応時間；音刺激に比し前庭刺激に対する反応のピークが遅いと思われる。

3) ガルバニック刺激周波数による反応領域の違い

同一個体のマウスに、2.5Hz、5Hz、10Hz のガルバニック刺激を行った。2.5Hz では PIVC 領域のみ反応を認めたが、5Hz、10Hz では聴覚野の反応も同時に認めた。前庭窓周囲への電気刺激の頻度に応じて、前庭神経と蝸牛神経の応答が異なることが示唆された(図6)。

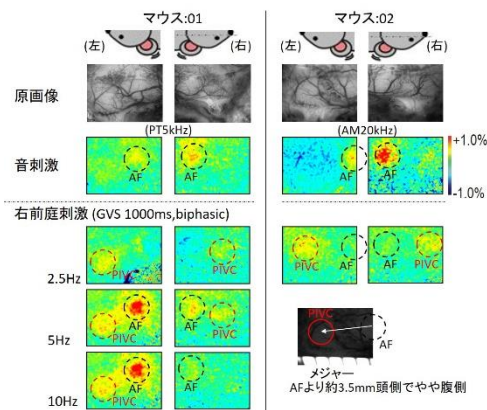


図6：ガルバニック刺激(GVS)周波数による大脳皮質聴覚野の違い

本研究の結果より、マウス大脳皮質における前庭領野は、サルやヒトの過去の研究と同様に PIVC 領域にあると考えられた。ガルバニック刺激による前庭領野の反応は、音刺激に対する一次聴覚野の反応に比して遅く、また 5Hz 以上の高周波数刺激では前庭領野ではなく聴覚野が反応すると思われた。

本研究では前庭刺激を電気刺激で行ったが、安定した刺激を行うための手術手技の難易度が高く、n=2 の結果である。今後、再現性を高めるために同条件での実験結果の集積を要する。また、より自然刺激に近いカロリック刺激により前庭領野の同定を再現する事、そして前庭覚以外のモダリティにより前庭領野に可塑性が起こる事が確認できれば、難治性めまい疾患の新しいリハビリテーションの構築に有用な基礎研究となると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------