

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K24025

研究課題名（和文）末梢感覚機能喪失後の中枢神経回路再編過程における感覚情報の統合のメカニズム解明

研究課題名（英文）Deciphering the Enigmatic Fusion of Sensory Information in the Dynamic Remodeling of Central Nervous System Circuits following Peripheral Sensory Impairment

研究代表者

浦田 真次 (Urata, Shinji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60849404

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、聴覚、平衡覚、嗅覚などの末梢感覚機能が長期にわたり傷害された際に、中枢神経回路の変化を解析することで、中枢代償のメカニズムを明らかにすることである。AAVを用いて聴覚皮質、前庭神経核、嗅球の神経細胞にGCaMPを発現させ、GRINレンズ挿入後にUCLA miniscopeを接続し神経活動のカルシウムイメージングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難聴、めまい、嗅覚障害は独立事象ではなく、実臨床での感覚障害は多岐にわたる。本研究では感覚中枢領域の多点同時イメージング技術を確立し、末梢神経傷害後に長期に観察することを目的とした。本研究では、AAVを用いて聴覚皮質、前庭神経核、嗅球にGCaMPを発現させ、GRINレンズ越しに小型内視鏡（UCLA mini scope）を用いてCaイメージングできる技術を確立させた。一方、scopeの干渉により多点観察は聴覚皮質と嗅球のみで可能であった。本研究目的の達成には体動補正、scopeの小型化、高感度カルシウムセンサーの開発、などさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the mechanisms of central compensation when peripheral sensory functions such as auditory, vestibular, and olfactory senses are chronically impaired. By analyzing the changes in central nervous system circuits, we utilized adeno-associated virus (AAV) to express GCaMP in neurons of the auditory cortex, vestibular nuclei, and olfactory bulb. Following the insertion of GRIN lens, calcium imaging of neural activity was performed using the UCLA miniscope.

研究分野：Neuroscience

キーワード：感覚障害 難聴 平衡障害 嗅覚障害 感覚中枢 可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

感覚中枢は神経回路網の可塑性が一過性に高まる生後の限られた時期に臨界期を有し、視覚や聴覚機能に関わる神経回路は臨界期に集中的に形成され、臨界期前後での最適刺激入力欠如により生涯にわたり感覚機能を失う。これらの事実から一定条件下でのみ感覚入力の変化による神経可塑性を有することが示唆される。感覚器の機能喪失に対して人工内耳、人工前庭、などの治療開発が進む一方、人工感覚器装用後の中枢神経回路再編に及ぼす影響については不明な点が多い。

### 【聴覚】

世界における難聴患者は5億人とされ、聴覚消失後の人工内耳装着による新たな神経ネットワークの形成過程の詳細は不明であり、その解明は機器やリハビリテーション法の改良のみでなく、現在不可能とされる音楽聴取を可能とする戦略にもつながる。小動物用人工内耳を用い、難聴モデルマウスへの人工内耳装着後の神経ネットワークの形成・神経の可塑性について網羅的かつ経時的に検討することにより、従来不可能であった中枢での聴覚に関する神経回路の再編について重要な所見が得られる。

### 【平衡覚】

平衡感覚は内耳の前庭器で受容される前庭感覚であるが、前庭機能が消失して生まれた乳児では体平衡(頸定、歩行など)の発達が著明に遅れるが最終的にはキャッチアップし、驚くことに前庭機能の欠落した児が成長してスキージャンプの選手になった事例もある。急性前庭機能低下による平衡障害では機能が回復しなくても代償機構により改善することが知られているが、神経ネットワークの再構成については不明な点が多い。

### 【嗅覚】

個々の嗅神経細胞は他の感覚器と異なる特異な性質として、嗅覚伝導路には末梢、中枢とも高い組織再生能がある。嗅粘膜では傷害後に基底細胞が分裂して神経上皮が再生するが、この時上記の三次元的な組織構築もほぼ正確に復元されることが分かっている。一方、中枢においては脳室下層で新生した神経細胞が恒常的に遊走して嗅球に到達し主として顆粒細胞などの interneuron に分化して匂い情報の修飾に関わることが知られているがどのようなメカニズムで三次元的に精緻に達成されるのかは不明である。

これら複数の感覚情報の統合は、高次機能において最も重要な機能である。複数の感覚刺激に対する反応について、脳底部に至る広い範囲での脳機能を包括的に評価技術開発が必要である。本研究では感覚器の機能喪失後の中枢神経再編について、感覚領域を横断した多点同時 in vivo imaging による機能解析、末梢感覚器から脳組織までの神経伝導路の形態解析を行う。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は 多点感覚伝導路同時イメージング技術の開発と 透明化技術を用いた解剖学的三次元形態構造解析を行うことで末梢感覚機能喪失後の中枢神経回路再編過程における感覚情報の統合のメカニズムを解明することである。また、聴覚、平衡覚、嗅覚障害モデルマウスを作成し、各感覚器官の障害モデルの変性過程、神経再生課程、長期的な神経回路形成を明らかにすることは各論的にも重要な課題である。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 感覚領域を横断した多点同時 in vivo imaging による機能解析

MCI Pryer 対物レンズと屈折率分布型 (gradient index; GRIN) レンズに小型統合蛍光顕微鏡 (UCLA miniscope) を用いる方法、もしくは、GRIN レンズを複数箇所脳内へインプラントを行う。

### 3-2. 透明化手法を用いた感覚伝導路の可視化

硬組織の透明化に有効とされてる手法 (modified Sca/eS, Bone CLARITY, PEGASOS, SHANEL) を用いた。

### 3-3. 聴覚、平衡覚、嗅覚障害モデルマウスの作成

聴覚、平衡覚、嗅覚障害モデルは、強大音暴露、物理的前庭破壊、薬剤(メチマゾール)を用いて作成した。

## 4. 研究成果

本研究で、AAV を用いて聴覚皮質、前庭神経核、嗅球に GCaMP を発現させ、GRIN レンズと小型内視鏡(UCLA mini scope)を接続させ Ca イメージングできる技術を確認させた。一方、scope の干渉により多点観察は前庭神経核と嗅球の組み合わせでのみ可能であった。本研究目的の達成には体動補正、scope の小型化、高感度カルシウムセンサーの開発、などさらなる検討が必要である。

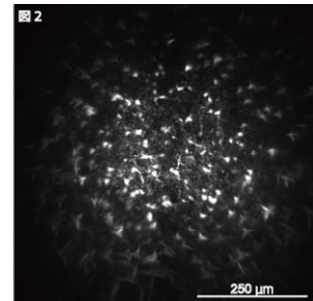
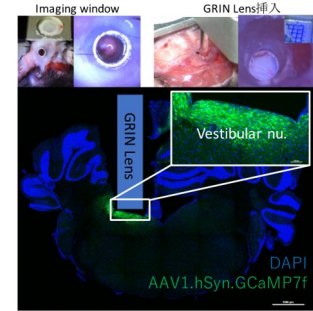
4-1. 感覚領域を横断した多点同時 in vivo imaging による機能解析  
C57BL/6J マウスの聴覚皮質、前庭神経核、嗅球に AAV を用いて GFP もしくは GCaMP を発現させた。遺伝子導入の有無は脳浮遊切片を作成して確認した。聴覚皮質、嗅球への遺伝子導入はそれぞれ 96.8% (31 匹/32 匹)、100% (11 匹/11 匹)であったが、前庭神経核へは 60% (18 匹/30 匹)であった(図 1)。

Pryer 対物レンズと GRIN レンズに接続する UCLA mini scope はいずれの組み合わせでも干渉するため不可能であった。また、GRIN レンズの脳内多点挿入によるイメージングは嗅球、前庭神経核に挿入した GRIN レンズに UCLA miniscope を挿入することは技術的に可能であったが、その他の組み合わせは miniscope 同士が干渉するため不可能であった。

GRIN レンズと UCLA miniscope の組み合わせのイメージングの解像度は神経細胞体程度であった(図 2)。

以上、本研究では、GRIN レンズおよび UCLA miniscope を用いて前庭神経核と嗅球に存在する神経細胞のカルシウム動態を観察する技術を確認した。

図 1 脳深部イメージング



### 4-2. 透明化手法を用いた感覚伝導路の可視化

C57BL/6J マウスを 4%PFA で灌流固定した後に、硬組織に有効とされる透明化手法(modified Sca/eS, Bone CLARITY, PEGASOS, SHANEL)を行った。肉眼的透明度は modified Sca/eS, PEGASOS, Bone CLARITY, SHANEL の順番であった。

組織切片を用いて聴覚、平衡覚、嗅覚に対応する末梢感覚神経細胞からの軸索は Neurofilament 200, Olfactory Marker Protein (OMP)を用いて可視化できることを確認したが、蛍光免疫染色法、免疫組織化学法のいずれにおいても前述の組織透明化手法では軸索の可視化は不可能であった。非有機溶媒性の透明化技術である Modified Sca/eS と Bone CLARITY によって透明化された組織を切片化したところ神経伝達路の一部に蛍光タンパク質が確認されたことから、抗体が十分に浸透していない可能性が示唆された。

### 4-3. 聴覚、平衡覚、嗅覚障害モデルマウスの作成

先行研究に従い、聴覚、平衡覚、嗅覚がそれぞれ単独で傷害されるモデルを作成した。聴覚は強大音暴露による騒音性難聴、平衡覚はソニケーターを用いた前庭破壊、嗅覚障害はメチマゾールによる嗅上皮傷害モデルを作成した。聴覚は聴性脳幹反応(ABR)、平衡覚は circulation とビームテストによる行動型、嗅覚は Buried Food Test にて評価した。強大音暴露による聴覚障害や薬剤性嗅覚障害では平衡覚の行動型に異常はみられなかった。一方、前庭傷害モデルの 36% (4 匹/11 匹)に永続的な難聴が観察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Urata Shinji, Maruyama Junki, Kishimoto-Urata Megumi, Sattler Rachel A., Cook Rebecca, Lin Nantian, Yamasoba Tatsuya, Makishima Tomoko, Paessler Slobodan	4. 巻 12
2. 論文標題 Regeneration Profiles of Olfactory Epithelium after SARS-CoV-2 Infection in Golden Syrian Hamsters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 589 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acchemneuro.0c00649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishimoto-Urata Megumi, Urata Shinji, Kagoya Ryoji, Imamura Fumiaki, Nagayama Shin, Reyna Rachel A., Maruyama Junki, Yamasoba Tatsuya, Kondo Kenji, Hasegawa-Ishii Sanae, Paessler Slobodan	4. 巻 12
2. 論文標題 Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-09731-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Urata Shinji, Iida Tadatsune, Yamamoto Masamichi, Mizushima Yu, Fujimoto Chisato, Matsumoto Yu, Yamasoba Tatsuya, Okabe Shigeo	4. 巻 8
2. 論文標題 Cellular cartography of the organ of Corti based on optical tissue clearing and machine learning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.40946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Urata Shinji, Iida Tadatsune, Suzuki Yuri, Lin Shiou-Yuh, Mizushima Yu, Fujimoto Chisato, Matsumoto Yu, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 A Novel Technique for Imaging and Analysis of Hair Cells in the Organ of Corti Using Modified Sca/eS and Machine Learning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦田真次
2. 発表標題 新規透明化手法 (modified Sca/eS) を用いた蝸牛全解析
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦田真次
2. 発表標題 中枢における聴覚認知機能イメージング
3. 学会等名 第29回日本耳科学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------