

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500402

研究課題名(和文)聴覚皮質における神経伝達機構の視覚剥奪による変化

研究課題名(英文)Effects of visual deprivation on neuronal processing in auditory cortex

研究代表者

川井 秀樹(Kawai, Hideki)

創価大学・工学部・准教授

研究者番号：90546243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウスをモデルに、視覚喪失(盲目)による聴覚皮質での神経細胞機能の変化について調べた。これまでの実験で、聴覚情報が入力される神経細胞において、神経伝達物質アセチルコリンによる興奮性の制御に、盲目と健常マウスとの違いがみられた。しかし、盲目による神経細胞の内在的興奮性の変化はみられなかった。また、聴覚皮質各層の神経細胞において、音刺激による遺伝子発現制御因子の活性が生じた。盲目マウスでは、音刺激による因子活性が減少した。これらの成果は、視覚障害者の幼少期からの発達における聴覚皮質での変化を示唆するとともに、異なる感覚の欠如による神経細胞の変化の可能性について考察を与える結果となった。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we examined whether the loss of eye sight affects cortical neurons in auditory cortex using mice as a model. In an electrophysiological examination of cortical neurons in primary auditory cortex that receive direct auditory thalamic inputs, we found that the regulation of neuronal excitability by the neurotransmitter acetylcholine is compromised by visual loss, while intrinsic membrane properties of them were largely unaffected. Further, in the auditory cortex of blind mice, sound stimulation elicited little activation of regulatory proteins of gene expression, while they are clearly activated in sighted control mice. These results suggest that neuronal functions in auditory cortex change due to the loss of eye sight during development and raise the possibility that sensory loss changes neuronal properties in the cortex of different modality.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学 視床皮質系 コリン作動性 クロスモーダル 聴覚皮質 視覚剥奪

## 1. 研究開始当初の背景

幼少期早期の視覚喪失は優れた聴覚機能をもたらすことが知られている。一次聴覚皮質における音刺激への反応は早く、反応部位も拡大する。しかし一方で、反応閾値が高くなり、反応強度が低くなることが報告されている。これらの原因は解っていないが、音の情報を効率的に神経処理するように、聴覚皮質の神経回路が発達上再編成したのではないかと考えられる。

効率的な神経処理の一つの方法として、シグナル・ノイズ比の増加、つまり重要な入力信号(シグナル)の増加と不要な情報(ノイズ)の減少が考えられる。一次聴覚皮質におけるそのような感覚情報フィルタリングのメカニズムは、アセチルコリン(ACh)受容体の活性で生じるといふ論文を私たちは最近いくつかの論文を通して発表してきた(Kawai et al., 2007, *Nature Neurosci.*, 10, 1168-1175; Kawai et al., 2011, *J. Neurosci.*, 31, 14367-14377; Metharate et al., 2012, *Front Behav Neurosci.* 6:44; Kawai et al., 2013, *Synapse*, 67, 455-468)。しかし、音に対する反応閾値の増加と反応強度の減少は、これまでのアセチルコリン制御では説明できない。

そこで、私たちは視覚喪失によって再編成された新たな神経回路では、アセチルコリンによる制御機構の変化が生じ、情報入力層(皮質第3・4層)へのシグナルの増加、第3・4層から第2層へのシグナルの減少、そして第2層間でのシグナルの減少によってシグナル・ノイズ比の増加が生じているのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、視覚喪失による一次聴覚皮質第2～4層神経回路での神経伝達機構について、以下のようなより具体的な仮説を立てた。

- (1) 視覚喪失(盲目)のマウスにおいて、情報入力層(皮質第3・4層)の神経細胞での内在的興奮性が減少し、聴覚視床からの興奮性シナプスが増強することにより、シグナル・ノイズの増加が生じる。アセチルコリンは、この増加を強化する。
- (2) 健常マウスに比べ、視覚喪失マウスにおいては、第3・4層から入力、および第2層から第2層神経細胞への興奮性入力が減少し、第2層の神経細胞の興奮性が減少する。シグナル・ノイズ比の増加は、アセチルコリンによる第2層神経細胞の興奮性の増加に起因する。

本課題研究では、神経細胞の興奮性および活性を調べながら、これらの仮説を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

早期視覚喪失のマウスモデルを構築するため、C57BL/J マウスの齢が開く日齢(生後14-15日)に眼球剥奪を麻酔下で行い、8-10日間、動物舎において通常の飼育環境で生育する。生育後、健常マウスと盲目マウスにおいて、以下の手法を用いて実験を行った。

### (1) 電気生理学的手法

ホールセルパッチクランプ法を用いて一つの細胞に電極を刺し、電流固定を行い、細胞内電位変化を測定し、神経細胞の内在的および誘発的膜特性、特に静止膜電位、膜抵抗および時定数、方形波電流の入力による活動電位の閾値、ピーク値、スパイク幅、そして脱分極および再分極の傾斜、後再分極値、スパイク間の時間間隔などを計測する。また、アセチルコリンを投与し、それらの計測値の変化を測定し、健常マウスと盲目マウスで比較する。

### (2) 組織化学的手法

手術を施したマウスに、ウレタンおよび筋弛緩剤キシラジンを投与し麻酔を施し、防音チャンバー内でホワイトノイズによる音刺激を15分間行う。心臓緩灌流で脳を化学的に固定した後、脳切片を作成し、免疫蛍光染色を行う。特に、転写因子 CREB の活性(リン酸化)を、一次抗体で認識し、適切な蛍光染料抱合型二次抗体で標識する。蛍光顕微鏡で画像を撮影し、画像解析ソフトで蛍光輝度および細胞数などを解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

#### 第3・4層錐体細胞の電氣的膜特性の比較

##### ① 内在的膜特性

健常マウスと盲目マウスにおいて、静止膜電位、および過分極方形波電流入力による膜抵抗とその時定数には、統計学的な有意差はみられなかった。また、過分極誘導性脱分極にも変化はみられなかった。

##### ② 誘発的膜特性

脱分極方形波電流の入力により活動電位を誘発させ、発火の開始時、閾値、閾値からのピーク値、スパイク幅などを計測したところ、健常マウスと盲目マウスにおいて顕著な違いはみられなかった。

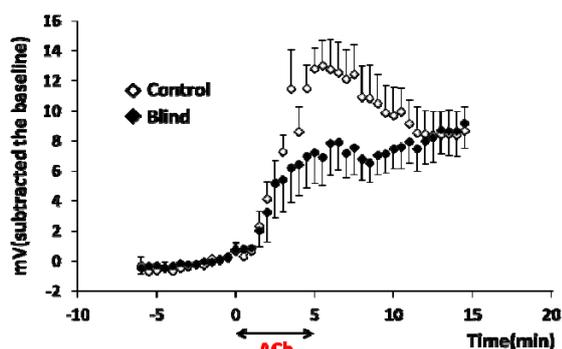
しかし、後過分極は盲目マウスで統計学的に有意な減少がみられた。これは、興奮性の減少を示唆している。しかし、発火数およびスパイク間の時間間隔には有意な差はこれまでのところみられていない。今後の更なる

検討が必要である。

### ③ アセチルコリンによる内在的興奮性と誘発的活動電位の制御

内在的膜特性に対するアセチルコリン (ACh, 100  $\mu$ M) の影響を解析したところ、静止膜電位の ACh による変化が、盲目マウスのほうが小さかった (図 1)。同様に、膜抵抗にも減少がみられ、アセチルコリンによる内在的膜特性の制御が、健常マウスより盲目マウスのほうが弱くなっていることが示唆された。

図 1. 静止膜電位のアセチルコリンによる変化



アセチルコリンによる活動電位への影響も調べた。静止膜電位の上昇は、スパイク開始時の早期化とスパイク数の増加をもたらしたが、健常マウスと盲目マウスでの統計学的に有為な差はまだみられていない。また、アセチルコリンは閾値、ピーク値、そして後過分極をあまり変化させなかったが、スパイク幅を増加させたことから、静止膜電位変化とともに、電位依存性のカリウムチャンネルへの影響が考えられる。しかし、これらの制御は健常マウスと盲目マウスにも同様にみられた。

これらのデータから、盲目による第 3/4 層錐体細胞への影響は、アセチルコリン受容体の活性による静止膜電位および入力抵抗の制御にあり、活動電位自体には影響がないことが示唆された。この結果は、仮説 (1) をサポートする。視覚喪失によって生じた聴覚皮質の再編成により、第 3/4 層の錐体細胞の興奮性がコリン作動性制御により減少し、シグナル選択とノイズの減少に関与していると考えられる。

### (2) 音刺激による神経活性と転写因子の活性

#### ① 転写因子 CREB の活性

遺伝子発現の制御に関わる転写因子である CREB という蛋白質は、学習による長期的な脳の構造および機能変化に大きく関与していることが多く報告されている。視覚喪失による聴覚皮質の再編成にも関与している可能性がある。CREB は、いくつかのリン酸化

酵素によってリン酸化されることにより活性化される。その活性化パターンは、時間的な違いから数分で生じる早い活性と数十分から数時間で生じる遅い活性とに分けられる。早い活性は、神経活性の標識としても使うことができるため、視覚喪失による神経活性の変化を、これまでの様の一つずつの細胞で電気生理学的に検討するのではなく、免疫蛍光組織染色法を用いて、聴覚皮質全体、特に各層で検討することにした。

CREB は聴覚皮質のほとんどの神経細胞で発現しており、通常でも活性されていることが判った。音刺激 (15 分) を行なうと、特に第 2~4 層の各層でリン酸化された CREB (活性 CREB) の増加がみられた。一方、盲目マウスにおいては、この活性上昇はみられなかった。これは、視覚喪失による音刺激に対する反応の減少と一致する結果となった。

#### ② CREB 活性の機序

CREB の活性は異種の酵素によって行なわれていることが知られている。早い活性は CaMKIV と呼ばれる酵素により活性されると考えられているため、阻害剤を局所的に投与して、その酵素の関与を検討したところ、上記でみられた結果がこの酵素を介して行なわれていることが示唆された。

#### (3) 研究成果の位置づけとインパクト

これらの研究成果は、脳の再編成のメカニズムを理解する上で、重要であると考えられる。視覚喪失による視覚皮質におけるユニモードな再編成に関する研究は、1981 年にノーベル賞を受賞したヒューベルとウィーゼルの研究から端を発し、これまで神経科学分野を大きく牽引してきた。視覚のみならず、体性感覚や聴覚においても同様の研究がなされてきた経緯もある。本研究は、そうしたユニモード的脳の再編成ではなく、感覚を跨ぐクロスモードな脳の再編成の研究になる。そうした研究において、細胞・分子レベルでの研究はこれまであまり行なわれていない。本研究は、その一歩として貢献すると考えている。

視覚喪失による聴覚皮質の第 3/4 層神経細胞の機能に関する研究は、最近他の研究者によって報告された (Petrus et al., 2014, Neuron, 81, 664-673)。発表された論文では、第 3/4 層錐体細胞への視床からのシナプス入力の増加が報告され、仮説 (1) と一致する結果であった。ここで報告するように、第 3/4 層錐体細胞の神経伝達物質アセチルコリンによる制御は、これまでの理解を更に前進させるものである。

また、転写因子 CREB の活性においては、聴覚皮質の再編成に関する研究に新たな見地をもたらすと考えられる。これまでの結果はクロスモードな脳の再編成のメカニズムに転写因子 CREB の関与を強く示唆するものである。視覚喪失によるユニモード的再編成

に CREB 活性が関与していることは示唆されてきたが、クロスモード的再編成の関与にはこれまで研究がなされていない。

#### (4) 今後の展望

仮説(1)に関しては、第3/4層錐体細胞におけるシナプス入力、特に第3/4層細胞同士のシナプス入力について研究する必要がある。更に、それらのシナプス入力に対するアセチルコリン制御を研究する必要がある。また、視覚喪失によって生じた、アセチルコリンによる内在的膜特性制御の減少のメカニズムも探求して行く。仮説(2)に関しても今後更に研究を進めて行く。

一方、視覚喪失による聴覚皮質での CREB 活性減少のメカニズムは、CaMKIV 酵素のシグナル経路において、何らかの異常もしくは変化が生じていることを示唆している。今後は、これらの機序を解明していく。さらに、シグナル-ノイズ比の増加を、音刺激の特性を変更し、聴覚皮質内で局所的な活性を起こしながら、CREB 活性の標識を用いて、生体において実証することを検討している。

#### (5) 結論

本研究課題の採択のお陰で、クロスモード的脳の再編成に新たな見地を見出すことができた。脳という複雑な組織における分子のメカニズムの理解は、精神病や神経変性疾患のような脳に関わる複雑な病気の治療に役立つと考えている。今後も大学生および大学院生の教育とともに、神経科学の分野、延いては医療の分野にも貢献できるよう、更にこの分野で研究を進めていく。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木俊雄、川井秀樹  
一次聴覚皮質 3/4 層錐体細胞におけるコリン作動性反応の視覚剥奪による下降調節  
第 36 回 日本神経科学学会 No. P1-1-4.

本年度の第 37 回日本神経科学学会でも、最新の研究結果を発表する予定。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川井秀樹 (KAWAI, Hideki)  
創価大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：90546243

##### (2) 研究分担者

なし ( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし ( )  
研究者番号：

##### (4) 研究協力者

鈴木俊雄 (SUZUKI, Toshio)  
創価大学・大学院工学研究科・博士前期課程 2 年

野村正明 (NOMURA, Masaaki)  
創価大学・大学院工学研究科・博士前期課程 2 年

山本信広 (YAMAMOTO, Nobuhiro)  
創価大学・大学院工学研究科・博士前期課程 1 年