

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26830008

研究課題名(和文) 大脳聴覚野・記憶-連想回路の二光子イメージング解析

研究課題名(英文) Investigation of the auditory cortex as associative memory circuits

研究代表者

塚野 浩明 (Tsukano, Hiroaki)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90624338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス聴覚野の和音選択ニューロンの活動性を二光子イメージングを用いて観察し、聴覚野入力層で和音ニューロンが現れるかどうかを検討した。他の多くの自然音刺激も用いて網羅的解析を行い、聴覚野が自然音処理する普遍原理の一端を可視化した。さらに、フラビンイメージングと細胞構築学を組み合わせ、マウス聴覚野地図の精緻化を試みた。精緻化された地図を基に聴覚視床(内側膝状体腹側核)との結合パターンを調べ、内側膝状体腹側核が単一構造でなくコンパートメント化している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The activity of harmony-selective neurons in the mouse auditory cortex was observed using two-photon imaging and investigated in which layer harmony-selective neurons appear. We conducted comprehensive analysis using many other natural sounds and revealed a part of the underlying principle that the auditory cortex processes natural sound. Furthermore, we tried to delineate a fine-grained mouse auditory cortex map using combination of flavoprotein fluorescence imaging and immunohistochemistry. Based on the refined map, we investigated the connective patterns with the auditory thalamus (the ventral division of the medial geniculate body), and found that the ventral division of the medial geniculate body is not single structure but is composed of multiple compartments with distinct frequency organizations.

研究分野：聴覚中枢

キーワード：聴覚野 内側膝状体腹側核 マウス 自然音 フラビンイメージング 二光子イメージング 視床皮質
路 和音

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質聴覚野は、声を把握したり外界の様子を把握するため、複雑な音を処理していることが知られている。これまでの多くの聴覚実験では純音を聴覚刺激として頻りに用いてきた。しかしながら、純音はもっと末梢の下丘などで精緻に分析されており、大脳聴覚野の機能を可視化することに適した音刺激ではない。従って、自然界で存在するような複雑音を実験に用いて聴覚野を研究する必要があるが、自然音に対する神経活動は複雑となって解釈が難しいこともあり、自然音に対する聴覚野処理メカニズムはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

和音は我々人間にとって身近な音であり、音楽などの基盤となる重要な複雑音である。近年、マウスは聴覚野研究にとって重要なモデル動物として扱われている。他の哺乳類と同様に、マウスが和音を知覚出来ることは過去の研究で知られていた (Tsukano et al., 2011, *Neuroscience Letters*)。さらに、広い脳領域を観察できるフラビン蛋白蛍光イメージングを用いた研究によって、マウス一次聴覚野において和音特異的な神経活動が観察されることは知られていた (Tsukano et al., 2008, *Society for Neuroscience Abstracts* 68.2)。これらの知見を元に、聴覚野の和音選択ニューロンを可視化し、その性質を調べることを試みた。

聴覚野は単一の領域でなく、複数の小領域から構成される。研究を行っている過程で、これまで描かれていたマウス聴覚野の小領域の配置 (聴覚野地図) に修正すべき点が多く見つかった。聴覚野地図は多くの研究がその基盤とする重要なものである。従って、マウス聴覚野地図を修正し新しい地図を提案するとともに、視床との結合を見直す試みも同時に行った。

3. 研究の方法

聴覚野ニューロンをカルシウム指示薬で染めたりアデノ随伴ウイルスを感染させて GCaMP を発現させた後、二光子顕微鏡を用いて聴覚野ニューロンのカルシウム応答を可視化した。

聴覚野地図の描出は、フラビン蛋白蛍光イメージングと免疫染色を用いた。さらに、逆行性トレーサーを聴覚領域に注入することで各聴覚領域と視床との結合を可視化した。

4. 研究成果

フラビン蛋白蛍光イメージングなどのマクロイメージングを用いると、一次聴覚野 (A1) において低周波 (低音) から高周波 (高

音) まで一方向に並ぶトノトピー構造が観察される。二光子イメージングを用いて観察すると、聴覚野の各ニューロンがどの音にチューニングされているか知ることが出来、かつ個々のニューロンがどの程度の乱雑さでトノトピーを構成しているかを知ることが出来る。過去の知見の通り、A1 2/3 層では、トノトピーが局所的に極めて乱雑であることが分かった。予想外なことに、内側膝状体 (medial geniculate body, MGB) からの入力層である 3b/4 層においても局所的なトノトピーが乱雑であることが分かった。この結果は、A1 3b/4 層のトノトピーは整然としているという既知の知見と異なるものであり、3b/4 層もある程度複雑な回路を持っていることを示唆している。次に我々は、2/3 層に和音選択的に活動するニューロンが存在するという知見を元に 3b/4 層を観察した。その結果、和音ニューロンは 3b/4 層にもある程度存在することが分かった。このことは、計算処理層である 2/3 層だけでなく、3b/4 層内の回路による計算によっても和音情報が作られる可能性、もしくは 2/3 層からのフィードバックが 3b/4 層に来ている可能性を示唆している。

和音以外の自然音に対する神経活動も解析を試みた。しかし、自然音やそれに関わる音響特徴量は無数に存在するため、研究者が一つ一つ全てを検証して行くことはほぼ不可能である。そこで、大量の複雑な自然音を GCaMP 発現マウスに聞かせ、その聴覚野活動パターンを仮説フリーな行列分解解析により検討した。その結果、多くの音に対する聴覚野活動は、[限られた数のコンポーネントとなる神経活動パターン × 重み] の足し算で説明出来る可能性があることが判った。このコンポーネントの神経活動の空間的模式は、我々が解剖学的に描写していた聴覚野地図と良く調和することも分かった。加えて、解剖学的に未同定の領域も複数見つかった。この結果は、複雑音を用いた仮説フリーな領域同定法が有用であることを示している。

解剖学的な聴覚野地図の描出は、フラビンイメージングと SMI-32 染色を用いて行った。その結果、4 つのトノトピー領域である A1、前聴覚野 (anterior auditory field, AAF)、二次聴覚野 (secondary auditory field, A2)、内背側領域 (dorsomedial field, DM) と、2 つのノントノトピック領域である前背側領域 (dorsoanterior field, DA)、後背側領域 (dorsoposterior field, DP) の少なくとも 6 領域から成る地図を新たに提案した。既存の有名な聴覚野地図である Stiebler の地図では ultrasonic field (UF) という超音波領域が描かれていたが、UF を仮定する必要はないことが判った。即ち、A1, AAF, A2, DM の 4 つの領域は全て約 100 kHz の高音まで続くトノトピーを持っていることが判った (図 1)。本聴覚野地図は、今後の聴覚野研究の基盤となることが期待される。

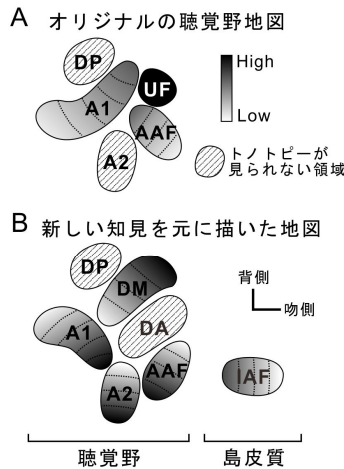


図1. 新しいマウス大脳聴覚野地図

MGB は、聴覚野の一つ末梢側に位置する聴覚視床である。MGB は、低次核である腹側核 (ventral division of MGB, MGv) と高次核である背側核 (dorsal division of MGB, MGd) に分類される。教科書的な理解では、耳から続く聴覚伝導路はMGvを経由してA1もしくは前聴覚野 (anterior auditory field, AAF) に入力することが知られている。これまでMGvは単一構造の神経核と思われてきたが、各聴覚領域にCTBを注入すると、MGvが複数のコンパートメントから成る複雑な構造になっていることが判明した。即ち、MGvの吻尾中間部の外側部はA1に投射し、吻尾中間部の内側部がAAFに投射し、吻側部がDMに投射するという様に、毛帯系聴覚視床皮質路は並列回路になっていることが分かった (図2)。

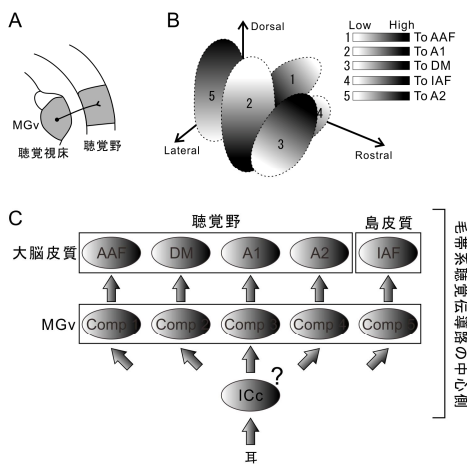


図2. マウスMGvのコンパートメント構造

A2はMGvから直接投射は受けておらず、A1から二次的に音情報が送られると考えられている。我々はMGvの尾側部がA2に直接投射を送っている可能性が高いと考えた。C57BL/6マウスのA2に逆行性トレーサーであるCTBを注入すると、MGdだけでなくMGvの尾側部にCTB陽性ニューロンを多数

認めた。次に、A2の低周波から高周波にかけて蛍光CTBを注入すると、MGv尾側部において腹背方向にCTB陽性ニューロンがシフトしていくことが判った。このことから、直接MGvからA2に入力する新しい経路が存在することが明らかになった。

A2にCTBを注入すると、MGvだけでなくMGdにも多くのニューロンが可視化された。これまでの研究では、MGdに明らかなトノトピー構造が発見されていないため、MGdはノントノトピックな神経核であると考えられている。しかし、A2の低周波から高周波にかけて蛍光CTBを注入すると、CTBはMGd内で明らかにシフトしていることが判った。このことは、MGdにもトノトピーが存在する可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

Maniwa K, Yamashita H, Tsukano H, Hishida R, Endo N, Shibata M, Shibuki K. (2018) Tomographic optical imaging of cortical responses after crossing nerve transfer in mice. *PLoS One*. 13:e0193017.

Ohga S, Tsukano H, Horie M, Terashima H, Nishio N, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. (2017) Thalamocortical Projection Divergence Leads to Complexity in Functional Organizations in Mouse Auditory Cortex. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/226100>

Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S. (2017) Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Scientific Reports*. 7:12646.

Tsukano H, Horie M, Ohga S, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. (2017) Corrigendum: Reconsidering Tonotopic Maps in the Auditory Cortex and Lemniscal Auditory Thalamus in Mice. *Frontiers in Neural Circuits*. 11:39.

Tsukano H, Horie M, Ohga S, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. (2017) Reconsidering Tonotopic Maps in the Auditory Cortex and Lemniscal Auditory Thalamus in Mice. *Frontiers in Neural Circuits*. 11:14.

Tsukano H, Horie M, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. (2017) Independent tonotopy and thalamocortical projection patterns in two adjacent parts of the classical primary auditory cortex in mice. *Neuroscience Letters*. 637, 26–30.

Baba H, Tsukano H, Hishida R, Takahashi K, Horii A, Takahashi S, Shibuki K. (2016) Auditory cortical field coding long-lasting tonal offsets in mice. *Scientific Reports*. 6:34421.

Tsukano H, Horie M, Hishida R, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K. (2016) Quantitative map of multiple auditory cortical regions with a stereotaxic fine-scale atlas of the mouse brain. *Scientific Reports*. 6: 22315.

Horie M, Tsukano H, Takebayashi H, Shibuki K. (2015) Specific distribution of non-phosphorylated neurofilaments characterizing each subfield in the mouse auditory cortex. *Neuroscience Letters*. 606: 182–187.

Watanabe T, Sasaki M, Komagata S, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K. (2015) Spinal mechanisms underlying potentiation of hindpaw responses observed after transient hindpaw ischemia in mice. *Scientific Reports*. 5:11191.

Tsukano H, Horie M, Bo T, Uchimura A, Hishida R, Kudoh M, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K. (2015) Delineation of a frequency-organized region isolated from the mouse primary auditory cortex. *Journal of Neurophysiology*. 113(7): 2900–2920.

Meguro R, Hishida R, Tsukano H, Yoshitake K, Imamura R, Tohmi M, Kitsukawa T, Hirabayashi T, Yagi T, Takebayashi H, Shibuki K. (2015) Impaired clustered protocadherin- α (cPcdh- α) leads to aggregated retinogeniculate terminals and impaired visual acuity in mice. *Journal of Neurochemistry*. 133(1): 66–72.

Tohmi M, Meguro R, Tsukano H, Hishida R, Shibuki K. (2014) The Extrageniculate Visual Pathway Generates Distinct Response Properties in the Higher Visual Areas of Mice. *Current Biology*. 24(6): 587–597.

{ 学会発表 }(計 46 件)

塚野浩明、澁木克栄、マウス聴覚野における二次聴覚野特異的な扁桃体との双方向結合 (第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム「聴覚系システムの形態・機能研究の最前線」講演、日本医科大学、東京、2018 年 3 月 28-30 日)

塚野浩明、大賀慎平、堀江正男、寺島裕貴、西尾奈々、竹林浩秀、澁木克栄、マウス二次聴覚野に入力する新たな視床経路の発見 (第 7 回新潟脳研 - 霊長研 - 生理研合同シンポジウム、ポスター発表、生理学研究所、愛知、2018 年 3 月 6~7 日)

Tsukano H, Ohga S, Horie M, Hou X, Terashima H, Kitaura H, Sugiyama S, Kakita A, Takebayashi H, Shibuki K. Characterization of higher order fields in the mouse auditory cortex. (第 8 回共同研究拠点国際シンポジウム The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models、ポスター発表、新潟大学脳研究所、新潟、2018 年 2 月 10~11 日)

寺島裕貴、塚野浩明、古川茂人、自然音刺激を用いたマウス聴覚野構造解析の試み (脳と心のメカニズム Mechanism of Brain and Mind、ポスター発表、ルスツリゾート、北海道、2018 年 1 月 9~11 日)

Onishi T, Watanabe T, Sasaki M, Kamiya Y, Kohno T, Horie M, Tsukano H, Hishida R, Takebayashi H, Baba H, Shibuki K. Spinal potentiation after hindpaw ischemia mediated by group II mGluRs and nitric oxide in mice. *Society for Neuroscience Abstracts* 659.19 (Neuroscience 2017. Washington, DC, November 11-15).

Inaba H, Namba H, Tsukano H, Shibuki K, Nawa H. Abnormal auditory OFF responses recorded from the cortex of an EGF-induced schizophrenia rat model. (第 40 回日本神経科学大会、ポスター発表、幕張メッセ、千葉、2017 年 7 月 20-23 日)

Tsukano H, Ohga S, Horie M, Terashima H, Takebayashi H, Shibuki K. Tonotopic properties in the secondary auditory field are derived from structural organization of the ventral medial geniculate body and thalamocortical projections in mice. (第 40 回日本神経科学大会、ポスター発表、幕張メッセ、千葉、2017 年 7 月 20-23 日)

Hishida R, Horie M, Tsukano H, Tohmi M, Shibuki K. Plastic changes of visual responses in the primary visual cortex are induced selectively by inhibitory projection from posterior parietal

cortex in mice. (第40回日本神経科学大会、ポスター発表、幕張メッセ、千葉、2017年7月20-23日)

Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Nishio N, Hishida R, Horii A, Yagi T, Shibuki K. Complexity of sound stimuli required for sound-shape associative responses in the mouse auditory cortex. (第40回日本神経科学大会、ポスター発表、幕張メッセ、千葉、2017年7月20-23日)

Nishio N, Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Optical imaging of temporal cortical areas involved in audiovisual integration in awake mice. (第40回日本神経科学大会、ポスター発表、幕張メッセ、千葉、2017年7月20-23日)

Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Analysis of prediction error responses in the posterior parietal cortex of awake mice. (第40回日本神経科学大会、ポスター発表、幕張メッセ、千葉、2017年7月20-23日)

Nawa H, Sotoyama H, Narihara I, Tsukano H, Jodo E, Eifuku S, Namba H. Neuropathologic implication of pallidal hyperactivity in the auditory abnormality of schizophrenia animal models. (13th World Congress of Biological Psychiatry, Lecture in Symposium, Copenhagen, Denmark, 2-6, Jun, 2017)

Onishi T, Watanabe T, Kohno T, Tsukano H, Hishida R, Baba H, Shibuki K. Spinal NO production visualized during hindpaw ischemia and NO-induced spinal potentiation in mice. (第94回日本生理学会、ポスター発表、アクトシティ浜松、静岡、2017年3月28-30日)

Tsukano H, Shibuki K. Frequency organization of the secondary auditory fields reflecting tonotopically-arranged afferents from the primary auditory thalamus. (第94回日本生理学会、ポスター発表、アクトシティ浜松、静岡、2017年3月28-30日)

Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Kamatani D, Hishida R, Horii A, Yagi T, Shibuki K. Higher cortical functions required for sound-shape associative learning in mice. (第94回日本生理学会、ポスター発表、アクトシティ浜松、静岡、2017年3月28-30日)

Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Analysis of prediction error responses in the mouse posterior parietal cortex. (第94回日本生理学会、ポスター発表、アクトシティ浜松、静岡、2017年3月28-30日)

Nana N, Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Ventral visual cortex as a candidate for a higher area responsible for shape recognition in mice. (第94回日本生理学会、ポスター発表、アクトシティ浜松、静岡、2017年3月28-30日)

Tsukano H, Shibuki K. Functional properties in the secondary auditory field are derived from structural organization of primary auditory thalamus and thalamocortical projections in mice. *Society for Neuroscience Abstracts* 236.12 (Neuroscience 2016. San Diego, USA. Nov11-16).

Shibuki K, Yamagishi T, Kamatani D, Yoshitake K, Tsukano H, Watanabe K, Hishida R, Takahashi K, Takahashi S, Horii A, Yagi T. Functional footprints of impaired consciousness in mice with reduced molecular diversity of clustered protocadherin. *Society for Neuroscience Abstracts* 642.01 (Neuroscience 2016. San Diego, USA. Nov11-16).

Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Prediction error responses in the mouse posterior parietal cortex are dependent on molecular diversity of clustered protocadherin. *Society for Neuroscience Abstracts* 620.03 (Neuroscience 2016. San Diego, USA. Nov11-16).

Onishi T, Watanabe T, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K. Visualized spinal NO production after ischemic treatment applied to the hindpaw and NO-induced spinal potentiation in mice. (第39回日本神経科学大会、ポスター発表、パシフィコ横浜、神奈川、2016年7月20-23日)

Tsukano H, Shibuki K. Formation of voice-dependent associative memory circuits in primary auditory cortex in mice. (第39回日本神経科学大会、ポスター発表、パシフィコ横浜、神奈川、2016年7月20-23日)

Hishida R, Horie M, Tsukano H, Tohmi M, Shibuki K. Inhibition derived from parietal association area regulates the neural properties of the primary visual cortex in mice. (第39回日本神経科学大会、ポスター発表、パシフィコ横浜、神奈川、2016年7月20-23日)

Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Kamatani D, Hishida R, Horii A, Yagi T, Shibuki K. Higher cortical functions required for sound-shape associative learning in mice. (第39回日本神経科学大会、ポスター発表、パシフィコ横浜、神奈川、2016年7月20-23日)

Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Impaired prediction error responses in the posterior parietal cortex of mice with reduced diversity of protocadherin- α . (第39回日本神経科学大会、ポスター発表、パシフィコ横浜、神奈川、2016年7月20-23日)

Nawa H, Sotoyama H, Tsukano H, Shibuki K, Namba H. Hyperdopaminergic activity and abnormal auditory processing in a cytokine-induced schizophrenia model. (第39回日本神経科学大会サテライトシンポジウム、シンポジウム、パシフィコ横浜、神奈川、2016年7月19日)

Tsukano H, Shibuki K. Voice dependent formation of associative memory circuit in mouse primary auditory cortex. (第93回日本生理学会、ポスター発表、札幌コンベンションセンター、北海道、2016年3月22-24日)

Onishi T, Watanabe T, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K. Bilateral spinal potentiation induced by NO after hemilateral and transient ischemia applied to the mouse hindpaw. (第93回日本生理学会、ポスター発表、札幌コンベンションセンター、北海道、2016年3月22-24日)

Nawa H, Tsukano H, Shibuki K, Kakita A, Sotoyama H, Namba H. Neuroinflammatory features of the cytokine-induced animal model for schizophrenia; implication of the regional specificity. (第58回日本神経化学会大会、シンポジウム、大宮ソニックシティ、埼玉、2015年9月11-13日)

Tsukano H, Hishida R, Shibuki K. Newly identified region in the auditory cortex responding to ultrasonic male songs in mice. (第38回日本神経科学学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年7月28-31日)

Onishi T, Watanabe T, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K. Spinal potentiation contralateral to the ischemic treatment applied to the hindpaw is mediated by nitric oxide. (第38回日本神経科学学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年7月28-31日)

Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Prediction error responses in the mouse posterior parietal cortex are produced by experience. (第38回日本神経科学学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年7月28-31日)

Hishida R, Horie M, Tsukano H, Tohmi M, Shibuki K. Two-photon imaging analysis of inhibitory projections from the parietal

association area to the primary visual cortex in mice. (第38回日本神経科学学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年7月28-31日)

Tsukano H, Shibuki K. Re-definition of the primary auditory cortex by separating a newly identified region and their functional specialization in mice (第92回日本生理学会、シンポジウム「聴覚皮質は何をしているのか」講演、神戸国際会議場、兵庫、2015年3月21-23日)

Ohnishi T, Watanabe T, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K. Ischemia-induced potentiation of cortical responses to hindpaw stimulation is partly mediated by nitric oxide at the spinal cord level (第92回日本生理学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年3月21-23日)

Ohga S, Tsukano H, Shibuki K. The secondary auditory cortex receives topological projections from the ventral division of the medial geniculate body in mice (第92回日本生理学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年3月21-23日)

Yoshitake K, Tsukano H, Hishida R, Yagi T, Shibuki K. Prediction error responses in the mouse posterior parietal cortex are dependent on protocadherin- α diversity (第92回日本生理学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年3月21-23日)

Yamagishi T, Tsukano H, Kamatani D, Hishida R, Yamamoto Y, Yagi T, Shibuki K. Higher visual cortices responsible for shape recognition in mice (第92回日本生理学会、ポスター発表、神戸国際会議場、兵庫、2015年3月21-23日)

紙面の都合で以降省略

〔その他〕
ホームページ等
<http://1qaz2wsx3edc.webcrow.jp/TsukanoH.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚野 浩明 (Hiroaki Tsukano)

新潟大学脳研究所・システム脳生理学分野
助教

研究者番号：90624338