

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11200

研究課題名(和文) 光遺伝学を応用した下丘聴覚神経路の音情報処理回路の解析

研究課題名(英文) The analysis of the neuronal circuit of the inferior colliculus using optogenetics.

研究代表者

小野 宗範 (ONO, Munenori)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30422942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：覚醒動物からの光遺伝学的脳活動記録システムを構築し中脳聴覚神経核下丘の興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの覚醒時活動特性を明らかにした。その結果下丘の局所回路は相同性の高い周波数受容野を持つ興奮性及び抑制性ニューロンによって構成されていること、また麻酔による影響が下丘レベルにおいて顕著に存在することも明らかとなった。加えて抑制性ニューロンの自発活動レベルは興奮性ニューロンに比べて有為に高いことが観察されたが、この関係は内耳損傷による聴覚障害によって逆転することが観察された。このことから下丘ニューロンは可塑的にその活動性を変化させ聴覚経路における情報伝達効率を動的に調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

興奮性及び抑制性の情報伝達は脳内の感覚情報の伝達に極めて重要な役割を持つことがよく知られている。本研究の結果から下丘は大脳皮質に代表される他の脳領域とは異なる独自の音情報処理機能を持つことを示唆しており、その学術的意義は高い。また抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの活動レベルが内耳からの入力レベルに応じて可塑的に変化していることから下丘が、耳鳴のような難聴に対する不適応から生じる疾患に関わっていることが強く示唆された。耳鳴は現在治療不可能な疾患であるため、その治療に向けた基礎的な知見を本研究が与えたことの意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Using the novel optogenetics recording method, we compared the activities of the excitatory and inhibitory neurons in the inferior colliculus (IC). We found that responses of both inhibitory and excitatory classes of neurons were similar in their response to sound. In the local circuit, the excitatory and inhibitory neurons shared the similar frequency response areas. The activity level of the IC neurons was profoundly affected by anesthesia. In contrast to the response to sound, the inhibitory neurons had higher spontaneous firing rates than the excitatory neurons. Interestingly, this relationship was altered by the hearing loss. In the noise exposed mice, the spontaneous activities of the excitatory neurons were enhanced, while those of the inhibitory neurons did not change. These results showed that the IC transform the afferent inputs into the excitatory and inhibitory output, and its balance is dynamically modified depending on the strength of the afferent inputs.

研究分野：神経生理学

キーワード：下丘 興奮性ニューロン 抑制性ニューロン 光遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下丘はすべての音情報が集積することに加えて、明確な周波数マップを持ち比較的外科的アプローチが容易であるため、近年難聴の治療の対象として注目されており、埋め込み型電極を使った電気刺激による難聴治療が試みられている(引用文献1)。しかしながら現在必ずしもその試みは成功しているとは言えない。その原因として下丘神経回路の音情報処理の理解が不十分であることが大きい。

音を人工的に下丘内で再現するためには、下丘神経回路内ニューロンの音に対する反応パターンを再現する必要がある。下丘は非常に複雑な神経回路を持つことで知られ、代表者と研究分担者(伊藤)、海外研究協力者(Oliver)のグループはその局所神経回路の詳細について調べてきた。下丘の神経回路は、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンによって構成される。また、興奮性/抑制性ニューロンは、さらに細胞体と樹状突起の形態学的特徴から複数のサブグループに分かれる。それぞれのサブグループに属するニューロンは異なる機能を持つことが予想されるが、現在どのような音反応特性を持つのかは不明である。特に、正反対の機能を持つ興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの反応特性を識別して知ることが下丘での音情報処理を理解するうえで必要不可欠であるが、その重要性にもかかわらず、従来生体内の下丘で興奮性/抑制性ニューロンを区別することは不可能であった。その理由は両者が下丘内で混在して分布することと電気生理学的に顕著な膜特性の違いを持たないことに起因する。この問題を解決するために代表者は光遺伝学を応用して下丘の抑制性ニューロンを生体内で識別する方法を開発した。光遺伝学とは、光感受性膜タンパクを用いて細胞の活動を制御する画期的技術であり現在広範な分野で応用されている。下丘で抑制性ニューロンを識別するために抑制性ニューロンに光感受性膜蛋白ChR2が特異的に発現する遺伝子改変動物(VGAT-ChR2 マウス、#14548, Jackson Labs)を用い *in vivo* で下丘内の興奮性/抑制性ニューロンを効率よく識別することに成功していた。ただし研究開始当初の状況では麻酔科の動物からの記録に限定されており覚醒動物からの記録には成功していなかった。覚醒下での感覚情報処理の実態は、当時から注目を浴びており(引用文献2)その重要性の認識は年々高まっていた。下丘においても麻酔により神経活動が変化することが知られていたが(引用文献3)記録が困難であることから知見は少なく覚醒下での記録自体が貴重であった。

2. 研究の目的

以上の状況を踏まえて、本研究では覚醒動物から光遺伝学を応用した脳活動記録をとるシステムを確立し下丘における興奮性及び抑制性ニューロンの活動特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞外電気記録によるスパイク活動解析により下丘ニューロンの活動特性を解析した。VGAT-ChR2マウスを用いて光照射による活動応答の差異を利用し興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの活動特性を比較した。また覚醒動物からの記録と麻酔下での記録を比較し、下丘ニューロンに対する麻酔の影響を評価した。

4. 研究成果

(1)下丘興奮性ニューロンと抑制性ニューロンは局所回路において相同性の高い受容野を持つ。麻酔下における下丘興奮性及び抑制性ニューロンの音応答特性を検証したところ両者はよく似た音応答特性を持つことが明らかとなった(引用文献4)。音応答閾値(図1B)スパイク応答遅延(図1C)音応答受容野(図1D)等の音応答特性を表すパラメーターにおいて両者は様々な特

性を持つニューロンを含み集団として見た場合に大きな差は見られなかった。また近傍の細胞の受容野特性を検証したところ興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの間においても受容野は高い相関性を示したことから、局所回路において両者は相同性の高い受容野を持つことが明らかとなった。ただし自発活動レベルは抑制性ニューロンの方が高いこと(図1A)や速い時間変化を持つ音への追従性は興奮性ニューロンの方が高い(引用文献4)といった違いも両者の間には見られた。このことから下丘興奮性及び抑制性ニューロンは周波数及び音圧に対する応答特性は相同性が高い一方、応答の時間的特性には差異があることが明らかとなった。

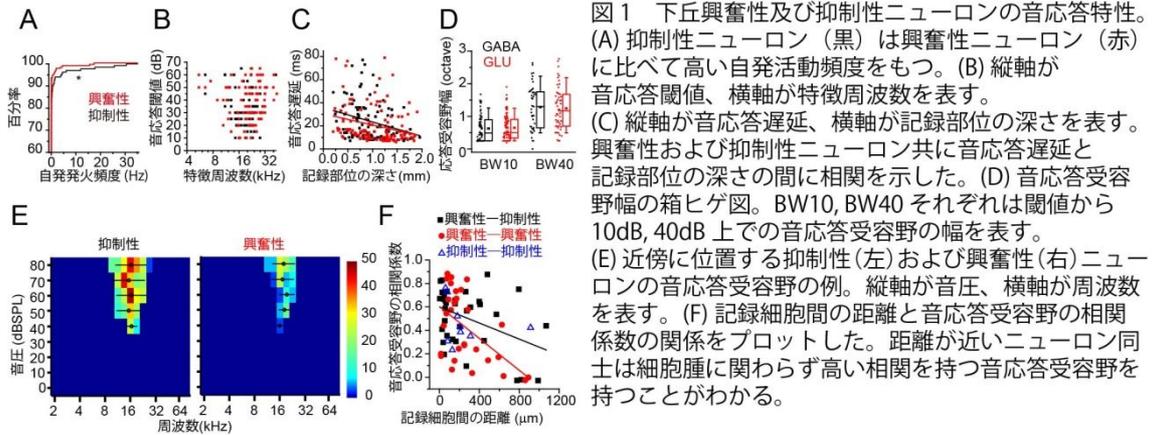
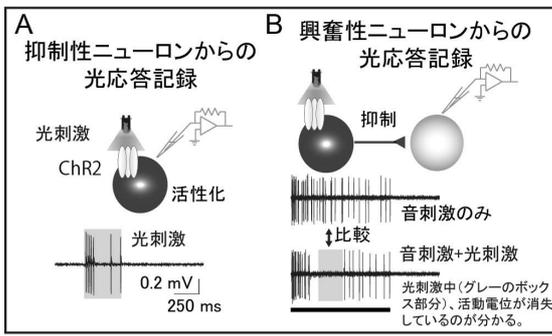


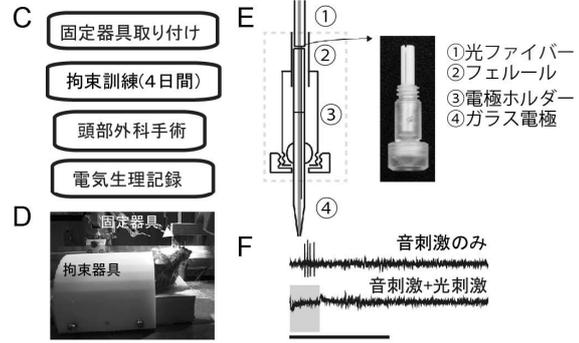
図1 下丘興奮性及び抑制性ニューロンの音応答特性。(A) 抑制性ニューロン(黒)は興奮性ニューロン(赤)に比べて高い自発活動頻度をもつ。(B) 縦軸が音応答閾値、横軸が特徴周波数を表す。(C) 縦軸が音応答遅延、横軸が記録部位の深さを表す。興奮性および抑制性ニューロン共に音応答遅延と記録部位の深さの間に相関を示した。(D) 音応答受容野幅の箱ヒゲ図。BW10, BW40 それぞれは閾値から10dB, 40dB 上での音応答受容野の幅を表す。(E) 近傍に位置する抑制性(左)および興奮性(右)ニューロンの音応答受容野の例。縦軸が音圧、横軸が周波数を表す。(F) 記録細胞間の距離と音応答受容野の相関係数の関係をプロットした。距離が近いニューロン同士は細胞腫に関わらず高い相関を持つ音応答受容野を持つことがわかる。

(2) 覚醒動物からの神経活動記録システムの確立。

覚醒動物の下丘から光遺伝学を用いた細胞腫識別を行いながら神経活動を記録するシステムを確立した(引用文献5)。興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを記録時に識別するために VGAT-ChR2 マウスを使用する。この遺伝子改変動物の脳内では抑制性ニューロンに特異的に光感受性膜タンパクであるチャンネルロドプシン 2(ChR2)が発現している。ChR2 は光刺激によって活性化され発現細胞の活動を引き起こす。そのため、活動記録中に記録細胞に対して光刺激を行うと抑制性ニューロンは活動を起こすが、興奮性ニューロンは逆に活動が抑制される(図2A,B)。このように光刺激に対する応答を観察し、細胞種を同定する。覚醒動物からの記録のためには、まず麻酔下で頭部に固定器具を取り付け回復後に4日間の拘束訓練を行う(図2C,D)。その後開頭手術により下丘を露出させる。開頭手術後動物の回復を待ち、光ファイバーを装着した微小ガラス電極(図2E)を覚醒動物の下丘に挿入し単一細胞からの電気活動記録を計測する。覚醒動物からの記録時には開頭手術後に回復期間を持たせるため脳表が滲出物により覆われ外部からの光刺激を遮るケースが多く見られた。しかし、このように記録用のガラス電極を通じて光を照射することにより安定した光刺激を行うことが可能となった(図2F)。このようにして覚醒動物からの下丘ニューロン活動記録を麻酔下での記録と比較した場合、自発活動レベルが麻酔下(図1A)では覚醒時に比べて(図3A)興奮性及び抑制性ニューロン双方において低下していること、音応答閾値が麻酔下では覚醒時に比べて上昇していること、が明らかとなった。このように下丘においても麻酔が顕著にニューロン活動を抑制していることが明らかとなった。



(A, B) VGAT-ChR2 マウス脳内の抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの光応答。
 A. 抑制性ニューロンは光刺激により活動電位が誘発がされる。グレーのボックスが光刺激のタイミングを表す。B. 興奮性ニューロンは光刺激により抑制される。図中黒色バーは音刺激のタイミングを表わす。



(C-F) 覚醒マウスからの神経活動記録法。
 C. 覚醒マウスからの記録スケジュール。記録前に拘束訓練を行う。D. 覚醒マウスからの電気生理記録のイメージ。E. 光電極の模式図。ガラス電極の後に光ファイバーを取り付け記録細胞に光照射する。F. 光電極による覚醒 VGAT-ChR2 マウスの下丘興奮性ニューロンからの記録例。光刺激がスパイク応答を抑制。

図2 覚醒 VGAT-ChR2 マウスを用いた興奮性 / 抑制性ニューロンの生体内記録

(3) 内耳障害による興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの活動レベルの可塑的变化

1カ月齢のVGAT-ChR2マウスに対して内耳障害を音響暴露(116 dB, オクターブバンド白色雑音、中心周波数16 kHzを1時間)によって導入し、その下丘ニューロンの活動に対する影響を検証した(引用文献6)。音響暴露によって聴性脳幹反応は幅広い周波数帯域で30-40dB程度の閾値上昇を見せた。またこの閾値上昇は2カ月間持続したことから慢性的な聴力障害が音響暴露によって導入されたことが明らかとなった。音響暴露より2か月後に下丘ニューロンの自発活動レベルを検証したところ、興奮性ニューロンにおいて有意な上昇がみられた(図3A)。一方抑制性ニューロンにおいては変化は見られなかった(図3A)。この変化により興奮性-抑制性ニューロンの活動バランスは逆転することとなった。自発活動レベルの上昇は下丘内の広い範囲においてみられた(図3B)。また記録したスパイクの形状を検証したところ、スパイクの半値幅およびピークとアンチピークの振幅比に内耳障害による影響がみられた。このことから、自発活動レベルの変化には下丘ニューロンの後シナプス膜における興奮性の変化が存在することが示唆された。これらの結果から下丘ニューロンは聴覚情報入力の強弱に応じて可塑的な活動変化を通じて興奮性及び抑制性ニューロンの活動バランスを動的に変化させていることが明らかとなった。

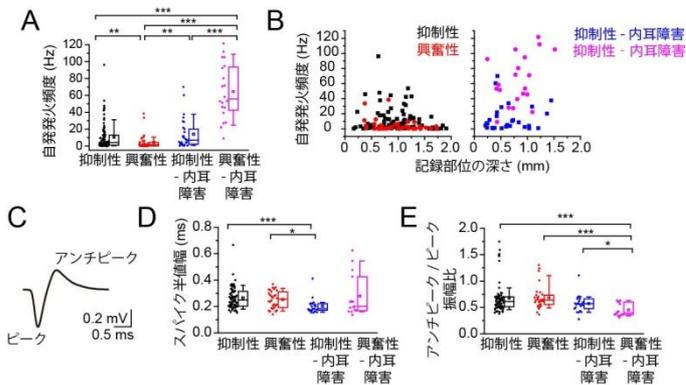


図3 内耳障害により下丘興奮性及び抑制性ニューロンの自発活動バランスが変化する。(A) 自発活動頻度の箱ヒゲ図。(B) 自発活動頻度を記録部位の深さでプロットした。(C) 細胞外記録での下丘ニューロンのスパイクの形状の例。(D) スパイク半値幅の箱ヒゲ図 (E) スパイクのアンチピークとピークの振幅比。図中アスタリスクは有意差のあるペアを表す。
 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001
 Steel-Dwass test.

< 引用文献 >

1. Lim HH, Lenarz T. Auditory midbrain implant: research and development towards a second clinical trial. Hearing Research. 322:212-23. 2015
2. Schneider DM, Nelson A, Mooney R. a synaptic and circuit basis for corollary discharge in the auditory cortex. Nature. 513(7517):189-94. 2014.

3. Duque D, Malmierca MS. Stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the mouse: anesthesia and spontaneous activity effects. *Brain Structure & Function*. 220(6): 3385-98. 2015.
4. Ono M, Bishop DC, Oliver DL. Identified GABAergic and Glutamatergic Neurons in the Mouse Inferior Colliculus Share similar Properties. *Journal of Neuroscience*. 37(37): 8952-8964. 2017
5. Ono M, Muramoto S, Ma L, Kato N. Optogenetics Identification of a Neuronal Type with a Glass Optorode in Awake Mice. *Journal of Visualized Experiments*. 136: 57781. 2018.
6. Ma L, Ono M, Qin L, Kato N. Acoustic trauma induced the alteration of the activity balance of excitatory and inhibitory neurons in the inferior colliculus of mice. 391:107957. 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono M, Muramoto S, Ma L, Kato N.	4. 巻 136
2. 論文標題 Optogenetics identification of neuronal type in awake mice with a glass optrode.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono M, Ito T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibitory Neural Circuits in the Mammalian Auditory Midbrain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1179069518818230	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 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.	4. 巻 37
2. 論文標題 Identified GABAergic and Glutamatergic Neurons in the Mouse Inferior Colliculus Share Similar Response Properties.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8952-8964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0745-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ma L, Ono M, Qin L, Kato N.	4. 巻 391
2. 論文標題 Acoustic Trauma Induced the Alteration of the Activity Balance of Excitatory and Inhibitory Neurons in the Inferior Colliculus of Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heares.2020.107957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.	4. 巻 385
2. 論文標題 Neuronal Sensitivity to the Interaural Time Difference of the Sound Envelope in the Mouse Inferior Colliculus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1016/j.heares.2019.107844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小野宗範、馬蘭蘭、加藤伸郎
2. 発表標題 覚醒マウス下丘内の興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの神経活動
3. 学会等名 日本音響学会聴覚研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ono M
2. 発表標題 Excitatory and inhibitory neural circuits in the auditory midbrain.
3. 学会等名 FAOPS 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ono M, Ohmori H, Xu F, Kato N.
2. 発表標題 Simultaneous in vivo recording of the local field potential and the signal of fluorescent calcium indicator in the hippocampus of Alzheimer's mouse model.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野宗範、大森治紀、許峰、呉祖波、加藤伸郎
2. 発表標題 測光電極法を用いた海馬局所電位とカルシウム動態の同時記録
3. 学会等名 第65回中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.
2. 発表標題 The Sound Response Properties of the Optogenetically Identified GABAergic Neurons in the Mouse Inferior Colliculus.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ono M
2. 発表標題 Neuronal Sensitivity to the Interaural Time Difference of the Sound Envelope in the Mouse Inferior Colliculus.
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on the Science of Mental Time (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ono M, Kato N.
2. 発表標題 Sound response properties of identified GABAergic and glutamatergic neurons of the inferior colliculus in awake mice.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.
2. 発表標題 聴覚中脳における音刺激により惹起される可塑的活動性変化
3. 学会等名 日本音響学会聴覚研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小野 宗範
2. 発表標題 下丘において音刺激により惹起される可塑的神経活動性変化
3. 学会等名 第52回 滋賀県立成人病センター研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.
2. 発表標題 Long-Lasting Sound-Evoked Afterdischarge in the Auditory Midbrain.
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Chen C, Cheng M, Ito T, Ono M, Song S.
2. 発表標題 Cell type specific connectivity and function in auditory midbrain.
3. 学会等名 Neuroscience 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.
2. 発表標題 光遺伝学的手法によって同定されたマウス下丘GABA作動性ニューロンの音応答特性
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小野宗範、大森治紀、村本進司、山木幸子、許峰、馬蘭蘭、呉祖波、加藤伸郎
2. 発表標題 Simultaneous in vivo recording of the local field potential and the signal of fluorescent calcium indicator in the hippocampus of Alzheimer's mouse model.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬蘭蘭、小野宗範、加藤伸郎
2. 発表標題 Aberrant balance between the excitatory and inhibitory neuronal activities in the inferior colliculus after the cochlear insults.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.
2. 発表標題 Neuronal Sensitivity to the Interaural Time Difference of the Sound Envelope in the Mouse Inferior Colliculus
3. 学会等名 日本音響学会聴覚研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ito T, Ono M, Oliver DL.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Oxford University Press	5. 総ページ数 26
3. 書名 The Oxford handbook of the Auditory Brainstem (Chaptr 18, Neuron Types, Intrinsic Circuits, and Plasticity in the Inferior Colliculus.)	

1. 著者名 生物音響学会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 464
3. 書名 生き物と音の事典 (1-17, マスキング・カクテルパーティ効果, 1-18, 協和音と不協和音 分担)	

〔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
研究 分 担 者	伊藤 哲史 (ITO Tetsufumi) (90334812)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	