

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目： 特定領域研究  
 研究期間： 2005～2009  
 課題番号： 17023020  
 研究課題名（和文）透明頭蓋マウス大脳皮質における高次感覚情報処理機構の研究  
 研究課題名（英文）Higher sensory processing mechanisms investigated by transcranial imaging of mouse cortical activities  
 研究代表者  
 澁木 克栄（SHIBUKI KATSUEI）  
 新潟大学・脳研究所・教授  
 研究者番号： 40146163

## 研究成果の概要（和文）：

脳が活動すると酸素代謝が活性化され、ミトコンドリアのフラビン蛋白が酸化され、緑色蛍光を発する。この活動依存的な緑色自家蛍光変化を用いると脳機能イメージングが可能である。特にマウスは頭蓋骨が透明なため、脳に外科的ダメージを加えることなしに経頭蓋的に大脳皮質活動の活動を可視化することができる。我々はこの方法を用い、体性感覚野、視覚野、聴覚野の3つの主要な感覚野において経験依存的な可塑性を記録し、解析した。

## 研究成果の概要（英文）：

Endogenous green fluorescence signals derived from mitochondria reflect activity-dependent changes in brain metabolism, and may be exploited in functional brain imaging. Endogenous flavoprotein fluorescence imaging in mice is especially important because the transparent skull of mice allows transcranial fluorescence imaging of cortical activities. Using this technique, we investigated cortical activities and experience-dependent plasticity in the somatosensory, visual and auditory cortices of mice.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	17,800,000	0	17,800,000
2006年度	15,200,000	0	15,200,000
2007年度	14,000,000	0	14,000,000
2008年度	14,100,000	0	14,100,000
2009年度	14,200,000	0	14,200,000
総計	75,300,000	0	75,300,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：フラビン蛋白蛍光・経頭蓋イメージング・体性感覚野・視覚野・聴覚野・マウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年進展が著しい高次脳機能研究の多くは、霊長類を対象とした大脳皮質の非侵襲的な機能画像解析によって得られている。しかし分子・細胞機構に関してはまだ未解明の点

が多い。多数の個体を要する分子・細胞機構の研究のためには、多彩な遺伝子改変技術が利用可能なマウスは実験動物として最適である。マウスを用いた高次機能の研究は主として海馬や小脳の機能についてなされてき

たが、高次機能の究極の座である大脳皮質の機能に関しても研究が始められている。また既に数多くの遺伝子改変マウスが作成され、一般に利用可能なバイオリソースとして登録されている。以上の状況から、マウス大脳皮質活動を記録・解析する研究手段の開発、並びに開発された研究手段を用いて、高次機能をマウスで解析しようとする研究は高次脳機能の分子・細胞機構を解明するために重要である。

## 2. 研究の目的

フラビン蛋白蛍光が脳の酸素代謝を反映して変化することは1960年代から知られているが、我々はこの信号を脳機能イメージングに初めて応用した。本研究ではこの方法をマウスの経頭蓋イメージングと組み合わせ、体性感覚野、視覚野、聴覚野の経験依存的可塑性を解析することを主要な目的とした。また、既知の現象以外にも様々な未知の現象がマウス感覚野で生ずることを明らかにし、そのメカニズムを解析した。

## 3. 研究の方法

マウスの脳は柔らかく、脳を露出すると脳浮腫などによってダメージを受けやすい。一方、マウス頭蓋骨は透明であり、頭蓋骨越しにかなりの脳部位を観察することができる。本研究はマウス大脳皮質の内因性のフラビン蛋白蛍光を経頭蓋的に画像解析し、マウス体性感覚野・視覚野・聴覚野の高次感覚情報処理機構を経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングによって解明することを目指した。フラビン蛋白蛍光イメージングは、ミトコンドリア電子伝達系の酸化型フラビン蛋白が緑色蛍光を発することを利用する。神経が興奮して細胞内Ca濃度が高まると、酸化型フラビン蛋白が増え、緑色蛍光強度が高まるので神経活動パターンを可視化できる。本法は一般的に用いられている量子効率の高い特異的蛍光プローブを用いるイメージング法と比較すると、再現性・定量性において優れている。我々はこの利点を生かし、マウス感覚野の経験依存的な可塑性の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 体性感覚野における成果

体性感覚野脳地図の改変：我々は活動依存的なフラビン蛋白蛍光を用い、マウス体性

感覚野における経験依存的可塑性を解析した。体性感覚野では末梢入力が損傷されると、体性感覚野脳地図の改変が生じることが知られている。従ってこの現象が再現できるかどうかを検討した(Kitaura et al., 2010)。尾の約3分の2を切断すると、尾の先端部に対応する体性感覚野が尾の基部の振動刺激に対して応ずらなくなり、脳地図改変が生ずることが判った。

末梢神経切除後の体性感覚野応答増強：体性感覚野脳地図の改変は末梢神経障害後速やかに生ずると言われている。我々は神経切断後の体性感覚野応答の初期変化を解析した。まず前肢掌側の支配神経を切断すると、前肢掌側の振動刺激に対する体性感覚野応答は減弱するが、前肢背側の支配神経を介する応答が数時間以内に増強することを観察した。このような現象は、皮膚に加わる大きな物理的な外力を回避するための代償機構と考えることが出来るが、何故速やかな代償的可塑性が生じるのかについては良く判っていない。一つには末梢感覚神経線維の自発発火が神経損傷によって中枢に伝わらなくなると脱抑制が生じ、この脱抑制によって代償的可塑性が生ずるという考えがある。しかし、末梢感覚神経線維に実質的な抑制を駆動するにたる十分な自発発火は存在しないとされている。

我々は、神経を切断する代わりに末梢神経における活動電位の伝導を阻害しても代償的可塑性が生ずること、神経を切断しても切断部位の中枢端に0.1 Hz程度の電気刺激を加え続けると代償的可塑性が生じないこと、振動に応ずる末梢Aβ線維の約半数に実際に0.1 Hzかそれ以下の極低頻度の自発発火が存在することを突き止めた。振動に応ずるAβ線維以外では自発発火が観察されなかった。これらの結果は、振動に応ずるAβ線維切断によってその極低頻度の自発発火が中枢に伝わらなくなることが代償的可塑性を誘発することを示している。

それでは末梢神経になぜ低頻度の自発発火が生ずるのであろうか？我々は振動に応ずるAβ線維を発するMeissner小体に栄養因子の一種のGDNFとその受容体が局在すること、さらに皮下にGDNFに対するsiRNA、GDNFに対する中和抗体、GDNF受容体に対する中和抗体を投与すると自発発火を阻

害することを見いだした。以上から、振動に  
応ずる A $\beta$  線維の極低頻度自発発火は  
Meissner 小体に局在する GDNF の作用に  
よって生ずると思われる。末梢神経を切断し  
た場合、断端に GDNF を作用させると代償  
的可塑性の発生がブロックされること、この  
GDNF の作用が TTX によって阻害されるこ  
とも、我々の仮説を裏付けている。

末梢神経の部分損傷は神経因性疼痛を引  
き起こす実験操作でもある。我々は前肢掌側  
支配神経切断後 1 - 2 週のマウスにおいて  
von Frey テストを行ったところ、機械的刺激  
に対する前肢の回避行動の閾値が低下して  
いること、GDNF に対する siRNA 投与でも  
同様に閾値の低下が生ずることを見いだし  
た。この結果は、体性感覚野応答の代償的増  
強は神経因性疼痛の始まりでもあることを  
示している。

## (2) 視覚野における成果

眼優位性可塑性： 視覚野で最も良く解析  
されている可塑性の一つに、片眼遮蔽による  
眼優位性可塑性がある。即ち臨界期（マウス  
の場合は生後 1 ヶ月前後）において片眼から  
の視覚入力を遮断すると、視覚野の両眼視領  
域において健常眼を刺激したときの応答は  
良く保たれるが、遮蔽眼からの応答が抑圧さ  
れる。我々はこの現象を、経頭蓋フラビン蛋  
白蛍光イメージングによって解析できるか  
否かを検討した（Tohmi et al., 2006）。その  
結果、視覚野の両眼視領域に選択的な抑圧が  
生ずることを確認した。この抑圧は、縞模様  
などの視覚刺激を用いた場合は、単眼遮蔽終  
了後 2 週間経過した時点でも維持されてい  
た。また、頭蓋骨をデンタルレジンなどで覆  
って保護し、単眼遮蔽の前後で同一のマウス  
から記録したところ、単眼遮蔽の効果を確認  
することができた。

視覚とヒゲ入力との干渉による視覚野可塑  
性： 高次感覚連合野の機能の一つは複数の  
モダリティの感覚情報を統合することである。  
例えば霊長類の頭頂連合野では体性感覚情  
報と視覚情報が統合され、空間認知がなさ  
れることはよく知られている。マウスではヒ  
ゲ情報と視覚情報の双方に基づいて空間認  
知がなされるので、霊長類の頭頂連合野に  
相当する部位でこの両者が統合されている可  
能性がある。我々は経頭蓋フラビン蛋白蛍光

イメージングを用いて片側眼にプリズムを  
装着したときの眼優位性可塑性の解析を行  
った。その結果、今まで報告されていない未  
知の現象として、ヒゲ入力と視覚入力の干渉  
による、新しいタイプの視覚野可塑性を発見  
した。

マウスの片目に約 30 度光を屈曲させる  
プリズムを装着させ、5 - 7 日間斜視にす  
ると、プリズムを取り去った後もプリズム装  
着眼を介する視覚野の応答が抑圧された。視  
覚野の応答が抑圧されるには、生後 4 週齢程  
度が最も効率良く、臨界期の存在が示され  
た。さらに単眼遮蔽による抑圧と異なり、視  
覚野の両眼視領域だけでなく単眼視領域でも  
変化が見られた。即ち単眼遮蔽による抑圧と  
は異なり、両眼からの入力が競合すること  
によって抑圧が生じたのではないことが判  
る。片目を斜視にする実験はネコやサルでも  
行われてきたが、視覚野応答が抑圧される  
という報告はない。マウスでは何故抑圧が  
起きたのであろうか？実は予めマウスのヒ  
ゲを切ってからプリズムを装着させると、  
視覚野応答の抑圧は起こらない。当然なが  
ら単眼遮蔽による視覚野可塑性はヒゲの有  
無によって殆ど影響を受けない。以上の実  
験結果からプリズム装着による視覚野応答  
の抑圧は、単眼遮蔽による可塑性とは全く  
異なるメカニズムによって生じ、ヒゲ入力  
との干渉が重要であることが判る。つまり、  
マウスでは身近な空間を「見る」のに主に  
ヒゲに頼るので、ヒゲからの情報と視覚情  
報が食い違ふときに、視覚野応答の抑圧が  
生じたと思われる。それではヒゲ入力と  
視覚入力という全く異なる情報をマウスは  
どのように比較し、空間認知における食い  
違ひを検出できたのであろうか？少なく  
とも霊長類では異なる感覚入力を統合して  
空間認知を行う脳部位は頭頂連合野である。  
マウスでも頭頂連合野に相当する脳部位が  
存在するので、この部位を破壊する予備的  
な実験を行ったところ、プリズム装着によ  
る視覚野応答の抑圧が生じにくくなること  
が判った。最も効果の強い破壊部位はプレ  
グマから 1 ミリ外側、2 ミリ後方の部位で  
あり、一次視覚野の前方内側に位置してい  
た。最後に神経系に特異的な細胞接着因子  
プロトカドヘリン $\alpha$  を欠損するマウスでは、  
プリズム装着による抑圧は阻害されるの  
に対し、単眼遮蔽による抑圧は誘発された。

これまでの解析で、視覚とヒゲ入力の間空間的不一致が生じた場合、視覚野応答が抑圧されることが判ったが、視覚野応答が抑圧されたとしても、空間不一致が解消されるわけではない。視覚野応答が抑圧されると同時に位置がシフトし、その結果空間的不一致が解消されるのではないだろうか。この可能性を検証するには、プリズム装着の前後で同一マウスの視覚応答の位置を精査すればよい。予備的な実験で、視覚刺激の周期的提示に伴う周期的活動変化成分を Fourier 解析で抽出し、その強度分布のイメージングを行ったところ、視覚野応答の位置シフトを裏付ける結果を得たので、今後より詳細に検討する必要がある。

### (3) 聴覚野における成果

環境音に対する聴覚野可塑性： 聴覚野では特定の高さの音に曝して動物を飼育すると、その高さの音に対する聴覚野応答が増強されることが報告されている。我々は経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングを用い、この現象を解析した (Takahashi et al., 2006)。その結果、特定の高さの音に曝してマウスを飼育すると、その音に対する聴覚野応答が増強されるがそれ以外の音に対する応答はあまり増強されないこと、増強は聴覚野スライス標本でも観察され、多分皮質内回路において増強が生じているであろうことが判った。

$F_0$  応答を引き起こす聴覚野可塑性： 周波数の比が比較的単純な幾つかの音を同時に聴いたとき、ハーモニーの感覚が生ずる。ハーモニーの成分に基底周波数 (周波数の最大公約数)  $F_0$  の成分が含まれない場合でも、ハーモニーを聞くと  $F_0$  の知覚が生ずる。この  $F_0$  に相当する応答を聴覚野の  $F_0$  に対応する部位の活動として記録できることが判った。また、この  $F_0$  応答は、 $F_0$  を有する自然な音であるマウスの鳴き声を聞いて育つと生じることも判った。従来、 $F_0$  応答はハーモニーの波形を重なり合わせたときの  $F_0$  に相当するうなりによって生ずるのではないかという考え方がある。即ち 20 kHz の音と 25 kHz の音を重ね合わせると 5 kHz に相当するうなりが生じ、このうなりを検出することで 5 kHz の  $F_0$  応答が生まれるとするのである。この可能性を否定するために、モザイク音を用いた実験を行った。即ち 20 kHz

の音と 25 kHz の音をモザイク状に組み合わせ、重なりによるうなりが生じないようにしてマウスに聴かせた。この時、モザイクの粗さが十数ミリ秒以下になると  $F_0$  応答が出現した。このようにモザイク音でも  $F_0$  応答が出現するという事は、うなりによって  $F_0$  応答が出現するという考え方では説明出来ず、経験依存的に形成される皮質内回路によって  $F_0$  応答が出現するという可能性を示唆するものである。

### 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 16 件)

Ohshima S, Tsukano H, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K: Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning. *Neurosci Res*, (査読有) 67: 51-58, 2010.

Kitaura H, Hishida R, Shibuki K: Transcranial imaging of somatotopic map plasticity after tail cut in mice. *Brain Res*, (査読有) 1319: 54-59, 2010.

Kitaura H, Tsujita M, Kakita A, Shibuki K, Sakimura K, Kwee KL, Nakada T: Activity dependent glial swelling is impaired in aquaporin-4 knockout mice. *Neurosci Res*, (査読有) 64: 208-212, 2009.

Tohmi M, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Shibuki K: Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity and plasticity. *J Neurochem*, (査読有) 109 Suppl. 1: 3-9, 2009.

Kubota Y, Kamatani D, Tsukano H, Ohshima S, Takahashi K, Hishida R, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K: Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex. *Neurosci Res*, (査読有) 60: 422-430, 2008.

Watanabe K, Kamatani D, Hishida R, Kudoh M, Shibuki K: Long-term depression induced by local tetanic stimulation in the rat auditory cortex.

Brain Res, (査読有) 1166: 20-28, 2007.

Kitaura H, Uozumi N, Tohmi M, Yamazaki M, Sakimura K, Kudoh M, Shimizu T, Shibuki K: Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory cortex. Neurosci Res, (査読有) 59: 160-171, 2007.

Kamatani D, Hishida R, Kudoh M, Shibuki K: Experience-dependent formation of activity propagation patterns at the somatosensory S1 and S2 boundary in rat cortical slices. Neuroimage, (査読有) 35: 47-57, 2007.

Hishida R, Kamatani D, Kitaura H, Kudoh M, Shibuki K: Functional local connections with differential activity-dependence and critical periods surrounding the primary auditory cortex in rat cerebral slices. Neuroimage, (査読有) 34: 679-693, 2007.

Tohmi M, Kitaura H, Komagata S, Kudoh M, Shibuki K: Enduring critical period plasticity visualized by transcranial flavoprotein imaging in mouse primary visual cortex. J Neurosci, (査読有) 26: 11775-11785, 2006.

Kudoh M, Nakayama Y, Hishida R, Shibuki K: Requirement of the auditory association cortex for discrimination of vowel-like sounds in rats. Neuroreport, (査読有) 17: 1761-1766, 2006.

Kudoh M, Shibuki K: Sound sequence discrimination learning motivated by reward requires dopaminergic D2 receptor activation in the rat auditory cortex. Learn Mem, (査読有) 13: 690-698, 2006.

Ono K, Kudoh M, Shibuki K: Roles of the auditory cortex in discrimination learning by rats. Eur J Neurosci (査読有) 23: 1623-1632, 2006.

Takahashi K, Hishida R, Kubota Y, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K: Transcranial fluorescence imaging of

auditory cortical plasticity regulated by acoustic environments in mice. Eur J Neurosci (査読有) 23: 1265-1276, 2006.

Takao T, Murakami H, Fukuda M, Kawaguchi T, Kakita A, Takahashi H, Kudoh M, Tanaka R, Shibuki K: Transcranial imaging of audiogenic epileptic foci in the cortex of DBA/2J mice. Neuroreport (査読有) 17: 267-271, 2006.

Shibuki K, Ono K, Hishida R, Kudoh M: Endogenous fluorescence imaging of somatosensory cortical activities after discrimination learning in rats. Neuroimage (査読有) 30: 735-744, 2006.

〔図書〕(計2件)

Shibuki K, Hishida R, Tohmi M, Takahashi K, Kitaura H, Kubota Y: Flavoprotein fluorescence imaging of experience-dependent cortical plasticity in rodents. In In vivo optical imaging of brain function 2nd Edition (Frostig R ed). CRC Press, New York, pp193-220, 2009

Shibuki K, Hishida R, Kitaura H, Takahashi K, Tohmi M: Coupling of brain function and metabolism: Endogenous flavoprotein fluorescence imaging of neural activities by local changes in energy metabolism. In Handbook of Neurochemistry & Molecular Neurobiology. 3rd Edition, Vol. 5, Neural Energy Utilization (Gibson G and Dienel G, ed). Springer, New York, pp322-342, 2007.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~physio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澁木 克栄 (SHIBUKI KATSUEI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40146163