

令和 4 年 8 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06908

研究課題名（和文）内側膝状体亜核への選択的遺伝子導入法を用いた聴覚情報処理機構の解明

研究課題名（英文）The medial nucleus of the medial geniculate body in auditory processing

研究代表者

宋文杰（Song, Wen-Jie）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：90216573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：聴覚視床である内側膝状体は、腹側核、内側核と背側核を含むとされているが、各亜核の同定や機能は十分解明されていない。本研究では、極めて低いレベルでありながら、内側核に特異的に伝達物質輸送体が発現していることを発見し、それを利用して内側核に選択的に遺伝子を発現させ、ニューロンの可視化に成功した。更なる探索により、その細胞体の分布と同様な分布や相補的な分布を示す分子マーカーも同定し、内側核を分子的に初めて定義できた。一方、内側核ニューロンの軸索終末が、光イメージング法で同定した聴覚皮質のすべての領野に分布していることを明らかにした。内側核が皮質における聴覚並列処理に影響を与えると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内側膝状体は聴覚に重要な役割を果たしていると考えられているが、その機能の解明は、亜核の同定から始めなければならない。本研究の成果によって、三つの亜核の一つである内側核を分子的に同定できることが示されたため、内側膝状体研究のマイルドストーン的な発見と言える。分子マーカーの同定により、内側核が全ての聴覚皮質領野に投射し、それらの出力を直接制御する回路も明らかとなった。これらの研究成果は内側核機能の完全解明に基礎と手段を提供するものである。聴覚はヒトのコミュニケーションや社会生活に不可欠な感覚機能で、本研究の成果は聴覚の理解、しいては聴覚障害の治療に繋がるため、その社会的意義も明らかである。

研究成果の概要（英文）：The medial geniculate body, or the auditory thalamus, is considered to have three subdivisions: the ventral nucleus, the dorsal nucleus, and the medial nucleus. Identification of these sub-nuclei, however, has been based largely on Nissl staining and eye judgement. The borders between the sub-regions are not always clear, and this has hindered the identification and the understanding of the function of the sub-nuclei. Finding a molecular marker for each subdivision will be an important step towards understanding the structure and function of the sub-nuclei. In this study, we identified several molecular markers for the medial subdivision (MGm). The discovery made it possible to label all MGm neurons in a specific manner, and the results showed that MGm projects to all auditory regions in the cortex, targeting primarily cortical layer 5. These results suggest that MGm controls directly the output of all auditory areas in the cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：聴覚

## 1. 研究開始当初の背景

聴覚は我々のコミュニケーションにとって必要不可欠である。聴覚機能は聴覚神経系によって実現されるが、これまでに内耳から大脳皮質聴覚野までの聴覚伝導路の解明が進んだ(Oertel & Doup, 2013)。聴覚野の聴覚応答は、主に聴覚視床である内側膝状体からの入力によって制御される。内側膝状体は腹側核、背側核と内側核の三つの亜核からなるが(Winer, 1984)これらの亜核が皮質ニューロンの聴覚応答にどのように寄与するかは不明である。特に、腹側核は一次聴覚野(A1)の第4層に投射するが(Huang & Winer, 2000)内側核に関しては統一した見解は得られていない。第4層と第3層だけに投射するとの報告もあれば(Linke, 1999; Kimura et al., 2003)全ての層に投射するとの報告もある(Huang & Winer, 2000)。一方、聴覚野は複数の領野から構成されており、マウスにおいては、主要領野であるA1と前聴覚野(AAF)以外に、二次聴覚野や島皮質聴覚野なども存在し(Sawatari et al., 2011; Guo et al., 2012; Tsukano et al., 2017)内側膝状体亜核とこれらの領野との関係は現在も研究段階にある(Takemoto et al., 2014; Ohga et al., 2018)。内側膝状体亜核はサイズが小さく、古典的な方法では、選択的な可視化や活動操作が困難である。このことが研究を阻んでいた。上記の皮質への投射に関する研究報告の不一致も、内側核を選択的に標識できないことが理由として考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の諸問題を解決するために、内側核に特異的な分子マーカーを見つけることがカギだという考えのもと、以下の三つの項目について研究を行う。1)内側核に特異的な分子マーカーを探索する。2)1)において同定できたマーカー分子を利用し、内側核から大脳皮質への投射の全容を解明する。3)1)において同定できたマーカー分子を利用し、内側核ニューロンの活動を選択的に操作し、内側核の機能について探索する。

## 3. 研究の方法

(1)内側核に特異的な分子を探索するために、免疫組織化学法、文献および各種データベースを利用して探索した。

(2)内側核に特異的なマーカー分子を利用し、内側核から大脳皮質への投射を解明するために、その分子のプロモーターの制御下にあるCreリコンビナーゼを利用した。内側核にCre依存的にレポータータンパク質を発現させるウイルスベクターを注入し、内側核ニューロンを選択的に可視化した。大脳皮質における内側核ニューロンの軸索の分布は、薄切片において、または薄切前の全脳において観察し、記録した。聴覚野との関係を明らかにするために、聴覚皮質全体の位置と大きさを、光イメージング法を用いた聴覚応答を計測する方法で測定した。

(3)内側核に特異的なマーカー分子を利用し、内側核の機能を操作するために、マーカー分子のプロモーターの制御下にあるCreリコンビナーゼを用いた。内側核にCre依存的にChR2を発現させるウイルスベクターを注入し、内側核ニューロンを選択的にオプトジェネティクス法を応用し、可逆的に活動を操作した。内側核の機能を探索するため、音刺激を弁別刺激とするオペラント学習法を確立し、学習中における内側核の活動操作が学習に対する影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1)内側膝状体内側核を分子的に同定できた。

マウスの内側膝状体亜核に特異的に発現する遺伝子を探索するために、免疫組織化学法、文献および各種データベースを利用して探索を行った。結果として、極めて低いレベルでありながら、ある神経伝達物質輸送体が内側核に特異的に発現していることを見出した。このマーカー分子のプロモーターによってCre組み換え酵素を発現させ、内側膝状体全体にCre依存的にレポータータンパク質(蛍光タンパク質)を発現させるウイルスを注入すると、期待通りに内側核に特異的に蛍光タンパク質の発現を観察した(図1)。この発見は内側膝状体亜核の最初の分子マーカーの発見である。

図1のレポータータンパク質陽性の部位は果たして、内側核なのかをさらに検討した。多くの分子を探索した結果、その部位と同等な部位がある種の小胞輸送体陽性であることを明らかにした。さらに、プロテインキナーゼのあるサブタイプは、上記部位においては陰性で、その周辺が陽性であることも突き止めた。このように、本研究の成果によって、内側膝状体の内側核を複数の分子マーカーによって、同定できることを初めて可能となった。

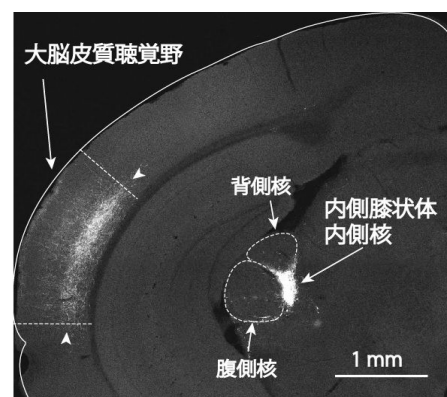


図1. 内側膝状体内側核を分子的に同定できた。

(2)内側膝状体内側核から聴覚皮質への投射の全容を解明できた。

上記内側核に特異的なCre活性により、レポータータンパク質を内側核ニューロンに選択的に

発現させ、内側核ニューロンを可視化し、その投射先を明らかにした。主な投射先は大脳皮質聴覚野と線条体尾部であることが明らかとなった(図1, 図2)。

聴覚皮質では、その第1層に僅かに投射があるものの、大部分は第5層への投射が見られた(図1)。これらの結果は、これまでの内側核が皮質のどの層に投射するかに関する論争(Linke, 1999; Kimura et al., 2003; Huang & Winer, 2000)に終止符を打つものである。他の新皮質部位と同じように、第5層は聴覚皮質の出力層であるため、内側核が聴覚皮質の出力を直接制御することが本研究によって明らかとなった。

一方、マウスの聴覚皮質には、一次聴覚野以外に、多数の領野が存在する(Sawatari et al., 2011; Guo et al., 2012; Takemoto et al., 2014; Tsukano et al., 2017; Ohga et al., 2018)。内側核からは、特定の領野にのみ投射するのか、すべての領野に投射するのかを明らかにするために、光イメージング法によって、聴覚野全体の位置と大きさを明らかにし、Sawatariら(2011)と一致した結果を得た。内側核からの投射の全体像を見るために、薄切する前に、全脳における分布を調べた(図2)。その結果、内側核からの軸索終末が聴覚皮質の位置に、前後方向と背腹方向のそれぞれに約2mmの範囲に分布し、聴覚野全体の大きさと一致した。即ち、内側核から聴覚皮質の全ての領野に投射することが強く示唆された。

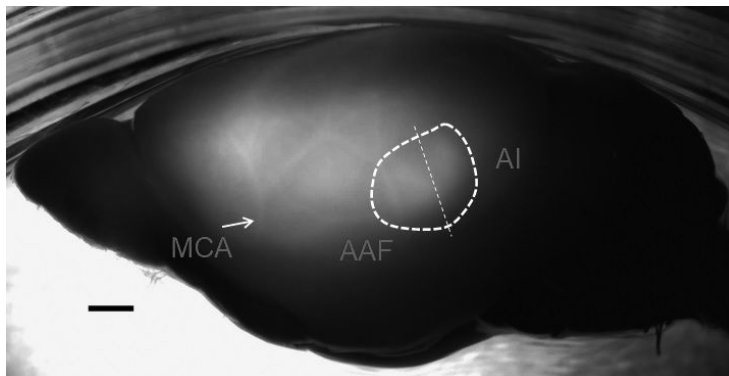


図2. 大脳皮質における内側膝状体内側核ニューロンの軸索終末の分布(点線で囲まれた部位; レポータータンパク質の蛍光色で同定したが、白黒写真では不明瞭)。MCA: 中大脳動脈。AI と AAF はそれぞれ一次聴覚野と前聴覚野の凡その位置。スケール: 1 mm。

### (3) 連合学習における内側膝状体内側核の役割

内側核の機能を探索するために、まずその聴覚応答を最初期遺伝子 c-fos の発現を指標に調べた。音刺激に応じて、聴覚皮質に c-fos を発現するニューロンが多く見られ、内側膝状体内側核においても発現がみられた。これらの結果は、分子的に同定できた内側核のニューロンが音刺激に応答することを示したと同時に、内側核の機能に重要な示唆を与える。C-fos は神経活動のマーカーであるだけでなく、転写制御にもかかわるため、学習記憶に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、音刺激を弁別刺激とするオペラント学習における内側核の役割を調べることにした。

上記内側核に特異的な Cre 活性を利用し、Cre 依存的にチャネルロドプシンを発現させるウイルスベクターを内側膝状体に注入し、内側核ニューロン活動の可逆的操作を可能にした。音刺激に応じて、水ノズルを舐めるというオペラント学習における内側核の役割を調べた。対照群に比べ、学習中に内側核に光刺激を加えたグループの学習は速く進行することを示唆するデータを得たため、内側核は音刺激に関わる連合学習において重要な役割を果たしている可能性が示された。

最後に、内側核ニューロンの音刺激選択性は c-fos 発現を利用した研究以外に、他の方法を用いる研究も望ましい。しかし、内側核のサイズが小さいため、古典的な電気生理学的な方法では困難である。そこで、内側核に特異的に GCaMP6s を発現させるウイルスを作成し、聴覚皮質において内側核の軸索終末の活動を2光子顕微鏡法でカルシウム・シグナルとして観察し、内側核がどのような聴覚刺激に応答するのかを明らかにしようと考えた。結果、作成されたウイルスは細胞体では発現が見られたが、軸索の先端では見られなかった。そこで、ファイバーフォトメトリー法を用いて内側核細胞体の活動を計測することにした。現有のレンズとフィルターキューブなどを活用し、ファイバーフォトメトリーシステムを立ち上げ、内側膝状体の聴覚応答記録に成功した。

### < 引用文献 >

- Arakawa H, Suzuki A, Zhao S, Tsytsarev V, Lo F-S, Hayashi Y, Itohara S, Iwasato T, Erzurumlu RS. 2014. Thalamic NMDA receptor function is necessary for patterning of the thalamocortical somatosensory map and for sensorimotor behaviors. *J Neurosci*, 34 (36) 12001-12014.
- Guo W, Chambers AR, Darrow KN, Hancock KE, Shinn-Cunningham BG, Polley DB. 2012. Robustness of cortical topography across fields, laminae, anesthetic states, and neurophysiological signal types. *J Neurosci* 32: 9159-9172.

- Huang CL, Winer JA. 2000. Auditory thalamocortical projections in the cat: laminar and areal patterns of input. *J Comp Neurol* 427: 302-331.
- Kimura A, Donishi T, Sakoda T, Hazama M, Tamai Y. 2003. Auditory thalamic nuclei projections to the temporal cortex in the rat. *Neuroscience*, 117(4):1003-16.
- Linke R. 1999. Differential projection patterns of superior and inferior collicular neurons onto posterior paralaminar nuclei of the thalamus surrounding the medial geniculate body in the rat. *Eur J Neurosci*, 11(1):187-203.
- Ohga S, Tsukano H, Horie M, Terashima H, Nishio N, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. 2018. Direct relay pathways from lemniscal auditory thalamus to secondary auditory field in mice. *Cereb Cortex*. 28(12):4424-4439.
- Oertel D, Doup AJ. 2013. The auditory central nervous system. In "Principles of neural science", Eds. Kandel E, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. pp 682-711.
- Sawatari H, Tanaka Y, Takemoto M, Nishimura M, Hasegawa K, Saitoh K, Song WJ. 2011. Identification and characterization of an insular auditory field in mice. *Eur J Neurosci* 34: 1944-1952.
- Takemoto M, Hasegawa K, Nishimura M, Song W-J. 2014. The insular auditory field receives input from the lemniscal subdivision of the auditory thalamus in mice. *J Comp Neurol*, 522(6): 1373-89.
- 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. *Front. Neural Circuits*, 11, p.14.
- Winer JA. 1984. The human medial geniculate body. *Hear Res* 15: 225-247.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata Shiro, Takemoto Makoto, Song Wen-Jie	4. 巻 386
2. 論文標題 Differential cortical and subcortical projection targets of subfields in the core region of mouse auditory cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 107876 ~ 107876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heares.2019.107876	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 Miwa Toru, Ohta Kunimasa, Ito Naofumi, Hattori Satoko, Miyakawa Tsuyoshi, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Song Wen-Jie, Minoda Ryosei	4. 巻 13
2. 論文標題 Tsukushi is essential for the development of the inner ear	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00570-z	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 Nishimura Masataka, Wang Chi, Shu Reika, Song Wen-Jie	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamic changes of timing precision in timed actions during a behavioural task in guinea pigs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76953-y	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 Chen Feifan, Takemoto Makoto, Nishimura Masataka, Tomioka Ryohei, Song Wen-Jie	4. 巻 400
2. 論文標題 Postnatal development of subfields in the core region of the mouse auditory cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 108138 ~ 108138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heares.2020.108138	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 Takemoto Makoto, Song Wen-Jie	4. 巻 26
2. 論文標題 Cue-dependent safety and fear learning in a discriminative auditory fear conditioning paradigm in the mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Learning & Memory	6. 最初と最後の頁 284 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/lm.049577.119	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 Fujikawa Akihiro, Noda Yukihiro, Yamamoto Hideko, Tanga Naomi, Sakaguchi Gaku, Hattori Satoko, Song Wen-Jie, Sora Ichiro, Nabeshima Toshitaka, Katsuura Goro, Noda Masaharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ) show reduced responsivity to methamphetamine despite an enhanced response to novelty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0221205	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 Nishimura Masataka, Song Wen-Jie	4. 巻 480
2. 論文標題 Region-dependent Millisecond Time-scale Sensitivity in Spectrotemporal Integrations in Guinea Pig Primary Auditory Cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 229 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2021.10.030	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 CHEN Y-T, TAKEMOTO M, TOMIOKA R, SONG W-J
2. 発表標題 Postnatal refinement of inhibitory and excitatory colliculo-thalamic synapses in mice.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryohei Tomioka, Bo Zhou, Kenji Sakimura, Yuchio Yanagawa, Nobuaki Tamamaki, Wen-Jie Song
2. 発表標題 Multilevel innervations to the auditory pathway by GABAergic neurons in the mouse basal ganglia
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宋 文杰
2. 発表標題 聴覚皮質の構造と機能
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zhou B, Tomioka R, Song W-J
2. 発表標題 Temporal patterns of neuronal responses to repeated stimuli in the mouse auditory cortex.
3. 学会等名 The 8th Annual Meeting of the Society for Bioacoustics (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

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	

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学生命科学研究部知覚生理学教室  
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/physiol2/index.html>  
業績 | 熊本大学生命科学研究部知覚生理学教室  
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/physiol2/publications.html>

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
研究協力者	竹本 誠  (Tekemoto Makoto)		

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
---------	---------