

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06947

研究課題名(和文) Visual experience-dependent genetic and functional changes in mouse auditory cortex

研究課題名(英文) Visual experience-dependent genetic and functional changes in mouse auditory cortex

研究代表者

川井 秀樹 (Kawai, Hideki)

創価大学・理工学部・教授

研究者番号：90546243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：視覚喪失による一次聴覚皮質への影響を、機能的及び細胞形態的に検討するとともに、個々のニューロンにおける遺伝子発現変化の網羅的検証および皮質層網羅的検証を試みた。一次聴覚皮質第4層の興奮性ニューロンにおける内因性膜特性や活動電位の発火特性については、有意な変化は観察されなかった。しかし、ニコチン性制御において、抑制性ニューロンでの視床皮質系シナプスの変化を発見し、ニューロン形態をもとにした解析が必要であることも明らかとなった。また、単一ニューロンにおけるmRNA発現の網羅的解析は、技術的問題が生じ、今後改善が必要となるが、皮質層網羅的な遺伝子発現検証を行う手法を確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次聴覚皮質第4層興奮性ニューロンへの興奮性シナプス入力における視覚喪失による影響は先行研究で報告されていた。本研究で、そのニューロンの膜特性自体への影響が観察されなかったことから、主にそれ以外のニューロンでの生物学的変化が示唆された。そのため、今回確立した皮質層網羅的な遺伝子発現解析方法は、クロスモード可塑性の学術分野に貢献するものと考えられる。また、視床皮質系神経回路における、新たなニコチン性制御機構の解明は、認知機能に重要なコリン作動性制御機構の理解に一石を投じるものである。こうした大脳皮質における可塑性、機能的制御機構の解明は、認知症における新たな治療法の確立に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：We have examined the effects of visual deprivation on the functional and morphological properties of primary auditory cortex and attempted to exhaustively examine gene expression of individual layer 4 neurons and single gene expression cortical layer-exhaustively. Visual deprivation did not induce clear changes in intrinsic membrane properties and action potential properties in layer 4 pyramidal neurons. However, we found a novel effect of nicotinic regulation in thalamocortical synapses of inhibitory neurons. Also, it became apparent that neuronal morphologies must be considered for nicotinic regulations of excitatory synapses. Meanwhile, our attempt to examine mRNA expression in single neurons faced a roadblock, and technical improvement is required for successful analysis. Meanwhile, we successfully developed a gene expression analysis technique for cells across cortical layers.

研究分野：神経機能学

キーワード：crossmodal plasticity visual loss cholinergic modulation auditory processing

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

盲目の方が健常者より音源定位や周波数認識などの聴覚機能が優れているという報告がある。これは聴覚皮質の変化によってもたらされていると考えられるが、その変化のメカニズムは明らかではない。一つの可能性としては、音刺激による神経情報が一次聴覚皮質に最初に到達する場所、つまり、6層に別れた皮質のうち第4層での変化の可能性が考えられた。研究開始当時、生後20日から1週間暗暴露した視覚喪失マウスにおいて、第4層興奮性ニューロンの機能変化が周波数検出能の向上に関与していることが報告され、このニューロンへの、視床からの入力応答が大きくなり、第2・3層からの入力応答が減少することが報告されていた。これらの結果から、視覚喪失マウス一次聴覚皮質において、視床からの入力(シグナル)を増強し、特徴的周波数から離れた場所からの皮質内神経活動(ノイズ)を減少させる神経回路が再構築されたと考えられた。こうしたシグナル・ノイズ比の急性的な増加がニコチン投与で観察されることと、数十年に渡り、ニコチンが脳の注意機能を乗っ取ることでシグナル・ノイズ比が増加することが示唆されていたことから、視覚喪失マウスにおいて、聴覚情報への継続的な注意機能の増加とともに、注意機能に関与する神経伝達物質アセチルコリンによるニコチン性アセチルコリン受容体の活性化が、再構築の原因として考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、視覚喪失による聴覚皮質でのクロスモード可塑性のメカニズムの一端を解明することである。特に、第4層興奮性ニューロンにおける機能的(電気生理学的)特性、遺伝子発現、形態変化を検証することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 実験マウス

生後20日から27日までのC57BL系統マウスを用いた。一週間暗暴露するため、マウス用ケージを暗暴露ボックス(段ボール箱)の中に入れて、視覚喪失を行った。比較的狭い空間での飼育による音環境を標準化するため、対照実験マウスと暗暴露マウスの両方を、透明なアクリル箱でマウスケージを囲って飼育した。

(2) 脳スライス作成

イソフルランで麻酔したのち断首し聴覚視床・皮質系スライスを作成した(Cruikshank et al., 2002, J Neurophysiol, 87, 361-384)。暗暴露マウスは、麻酔まで暗暴露を維持するため、暗室で赤外線カメラを用いて観察しながら、暗暴露ボックスから黒いプラスチックボックスに入れ、その中で麻酔した。対照実験マウスは透明なプラスチックボックスの中で麻酔した。

(3) シングルセル cDNA ラブラリーの作成・解析

Cadwell et al. (2017) Nature Protocol, 12(12), 2531-2553 を参考に、論文で使用されている材料と方法を極力使用して実験を行った。簡単に説明すると、ガラス電極で細胞内をアクセスできるホールセルパッチクランプ法で活動電位を確認し、機能的な細胞から陰圧により RNA を抽出し、特殊なプライマー(短い DNA 鎖)を用いて、mRNA の一本鎖相補的 DNA (cDNA) を作成し、続いて別の特殊なプライマーを用いて cDNA ライブラリーを作製した。PCR 法およびアガロース・ゲル解析法でニューロン種の解析をし、Agilent Bioanalyzer (東海大、幸谷教授に依頼) で網羅的に cDNA 配列長と濃度を測定した。

(4) 電気生理学実験

ホールセルパッチクランプ法を用いて、電流固定下で電流注入による電位変化を記録し、内在的膜特性および活動電位の特徴を検証した。また静止電位固定下で、興奮性シナプス電流を記録・解析した。

(5) ニューロン形態解析

染色用バイオサイチンを細胞内にホールセルパッチ下で充填した細胞を含む脳スライスを、主に、 Ni^{2+} /3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 染色法(Otsuka and Kawaguchi, 2008, J Neurosci, 28, 11186-11195)で染色した。この手法では、脳スライス(約 $500\mu\text{m}$)を4%パラフォルムアルデヒド/1.25%グルタルアルデヒド/0.2%ピクリン酸溶液で固定し、再度厚み $50\mu\text{m}$ で薄片を作成した。その後、ペルオキシターゼ酵素反応を可能にするアビジン・ビオチン複合体(ABCキット)でバイオサイチンを認識させ、酵素基質の Ni^{2+} /DABで染色した後、1% OsO_4 で更に強く染色したのち、切片の脱水およびマウンティングを行った。細胞形態を解析するため、ImageJ/FijiのPlugin機能であるSimple Neurite Tracer (SNT)を活用した。

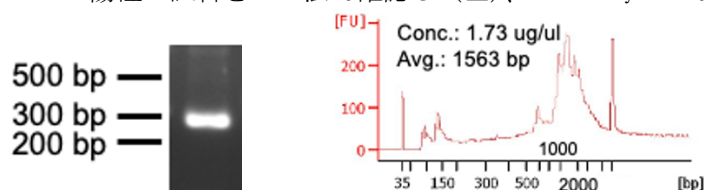
上記の形態解析を行う一方で、電気生理学実験後に、OsO₄を用いず、Ni⁺/DAB でのみ染色されたニューロンを明視野顕微鏡で画像解析、もしくは蛍光色素結合アビジンを用いて共焦点レーザー蛍光顕微鏡で画像解析して、樹状突起の分岐数の計測をおこなった。

4. 研究成果

(1) 単一ニューロンにおける mRNA 解析

単一ニューロンから RNA を抽出するには、ホールセルパッチクランプ法の技術と細胞質溶液を吸引する技術、およびその後の RNase-free 環境を維持したスピード感のある溶液処理と分子生物学的技術を要する。そのため、実験の段階的な成功を確認しながら研究を進めていった。

活動電位の発火パターンと PCR 法を用いて細胞種を特定した。RNA 抽出に成功した試料を用いて cDNA ライブラリーを作成し、興奮性または抑制性ニューロンであるかを区別するため、細胞種を特定する遺伝子の mRNA (興奮性ニューロンには vesicular glutamate transporter 1 (vGluT1)、抑制性ニューロンには GABA 合成酵素 Glutamic Acid Decarboxylase 67 kDa) の存在を PCR 法で確認し、その後、区別できた cDNA ライブラリーを Bioanalyzer で解析した。下図は vGluT1 陽性の試料を PCR 法で確認し (左)、Bioanalyzer で解析した結果 (右) を示す。



上図右は代表的な結果で、横軸は cDNA の塩基対 (bp) を示しており、Cadwell et al. (2017) で報告されたように、cDNA 量を示す蛍光強度 (FU) のピークは約 1700bp 程度であったが、分解された mRNA と考えられる 100-500bp の cDNA が比較的多く存在する結果となった。このような質の低い試料では、次の段階である RNA 配列 (RNA-seq) 解析に進めないため、質の高い試料を得るために実験を続けた。しかし、この頃にこれまで使用していたホールセルパッチ用マニピュレータが故障し、試料の作成にかなり時間がかかった。新たなマニピュレータを購入し、試料解析を試みたが、これまで、求められる質を持った試料の作成には至らなかった。

(2) 第 4 層興奮性ニューロンの内在的膜特性と活動電位特性

内在的膜特性に対する暗暴露マウスの影響について検証したところ、静止電位や入力抵抗に有意な変化は見られなかった。また、定電流注入による活動電位の発火閾値、発火開始時、最初の活動電位の最大振幅などにも有意差が観察されなかった。これらのことから、静止状態に関わるチャネルやトランスポーター、活動電位に関わる電位依存性のナトリウムイオンチャネルやカリウムイオンチャネルに明らかな変化がないことが示唆された。しかし、暗暴露マウスにおいて対照マウスよりも各パラメーターの標準偏差が小さいため、細胞種の平均化が生じている可能性もある。実験時の細胞選択によるものか、それとも視覚喪失によるものか、実験細胞数を増やして今後さらに検証する必要がある。

(3) ニューロンの形態解析

視覚喪失による第 4 層興奮性ニューロンの形状の変化を解析するため、ホールセルパッチで電気生理学実験を行ったニューロンや、細胞内溶液を抽出したニューロンで染色を行い、Simple Neurite Tracer を使用して、ニューロン形状の描写を行った。Ni⁺/DAB で染色できた樹状突起や軸索を更に濃く染色することで、より詳細な構造を観察できると考え、OsO₄による osmium black を生成させる処理を行った。(2)の電気生理学実験で使用したニューロンの染色は得られたが、統計学的な解析に十分なデータを得られていないため、今後の更なる研究が必要となる。また、単一ニューロンにおける mRNA 解析とともに、そのニューロンの形態解析も同時に行う実験を試みた。しかし、細胞内溶液を抽出できたニューロンでは、まだ染色できていない。これには、ニューロンの細胞体から細胞内溶液を取り出す際の陰圧や、細胞体からガラス電極を取り出す際の技術的な熟練が要すると考えられる。

(4) シナプス特性とニコチン性受容体による制御

自発的興奮性後シナプス電流 (sEPSCs) を記録し、応答発生周波数、振幅、応答の上昇時間および下降時間を解析した。暗暴露マウスと対照マウスにおいて、周波数に有意差が見られなかったことから、第 4 層興奮性ニューロンへ入力する興奮性ニューロンの自発的賦活状態に変化がないことが示唆された。また、sEPSCs の振幅および波形にも平均的に有意差がなかった。先行研究では視床皮質系および第 2・3 層興奮性ニューロンからの EPSCs に違いがあったことから、個々のニューロン間のシナプス応答を検証する必要があると考えられる。

次に、視覚喪失下で変化する注意・集中機能が、コリン作動性制御を活用して先行研究や今回の研究の結果をもたらしている可能性がある。そのため、興奮性シナプスにおけるニコチン性制

御機構が視覚喪失によって変化していることが考えられる。そこでまず、健常マウスで第4層興奮性ニューロンにおいて、視床皮質系シナプスでの monosynaptic EPSCs のニコチン性制御について検討したが、ニコチン投与によって応答の変化は観察されなかった。一方で、抑制性ニューロンの視床皮質系シナプスではニコチン性による変化が見られた。また、sEPSCs 及び 400 μ m 以上離れた場所からの電気刺激誘導による EPSCs (eEPSCs) と、Ni⁺/DAB 染色あるいは蛍光染色によるニューロン形態（主要樹状突起からの分岐数）との相関性を解析したところ、ニューロン形態種によるニコチン性制御の違いがわかってきた（第 99 回日本生理学会大会で一部発表）。これらのことから、視覚喪失におけるコリン作動性制御、特にニコチン性制御の検討を、ニューロン種の違いに注目すべきことが明らかとなった。

(5) in situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現の検討

個々のニューロンで発現する mRNA のもう一つの検出方法として、in situ ハイブリダイゼーションが考えられる。この手法では、脳薄片の細胞内にある mRNA を、標識可能な相補的 RNA と結合させることで、特定の遺伝子の発現を皮質層全体で検証できる。一次聴覚皮質の層横断的な遺伝子発現の変化を検証するため、蛍光標識法を活用することで、少なくとも 2 種類の遺伝子発現を検討することが可能になる。当研究室で持ち合わせていなかったこの実験手法の確立に成功し、現段階において 1 種類の mRNA 検出が可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川井秀樹
2. 発表標題 Nicotinic regulation of sensory filtering in mouse auditory cortex.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	池田 光一 (Ikeda Kouichi)	創価大学・工学研究科・生命情報工学専攻 (32690)	
研究協力者	中西 誠 (Nakanishi Makoto)	創価大学・工学研究科・生命情報工学専攻 (32690)	
研究協力者	申 惠連 (Shin Hyeryun)	創価大学・工学研究科・生命情報工学専攻 (32690)	

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