

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700365

研究課題名（和文） 下丘大型抑制性細胞の神経回路に注目して聴覚情報の統合様式を形態学的に解明する

研究課題名（英文） A morphological study on integration of auditory information on inhibitory tectothalamic neurons in the inferior colliculus.

研究代表者

伊藤 哲史 (ITO TETSUFUMI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：90334812

研究成果の概要（和文）：下位脳幹の聴覚神経核で抽出された様々な音情報は中脳下丘で再統合されるが、その形態学的な基盤は不明であった。下丘のニューロンの約10%を占める投射ニューロンである大型抑制性ニューロンの細胞体上には多数の興奮性入力収束する。本研究ではこの興奮性入力がほぼすべての下位聴覚神経核及び下丘ニューロンの軸索側枝に由来することを示した。つまり、大型抑制性ニューロンは音情報の再統合を行なっていると考えられる。また、大型抑制性ニューロンへの詳細な入力様式を解析するために最適な組み換えウイルスレーザーの開発にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Information of sound is analyzed in several auditory nuclei in lower brainstem, and re-integrated in the inferior colliculus in the midbrain. Detailed morphological basis on the integration of sound information, however, is poorly known. Large GABAergic neurons, which compose approximately 10% of inferior collicular neurons and project to the thalamus, receive dense excitatory axosomatic inputs. In this study, we showed that the axosomatic inputs originated from almost all lower auditory nuclei as well as local neurons, suggesting that large GABAergic neurons integrate auditory information. We also have developed viral tracers which are optimal for the study on detailed dendritic morphology of large GABAergic neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網、聴覚神経回路

1. 研究開始当初の背景

自然の音はしばしば複雑な周波数成分と非常に速い時間変化を含む。そこから情報を得るためには周波数と時間に対して高い分解能をもつシステムが必要とされる。細胞レ

ベルで見ると、こういった時間精度の高い情報処理のために強力な興奮性軸索細胞体シナプスが重要な働きをしていると考えられている。抽出された音情報は脳内で再構成されることによって意味を持ち、この音情

報の再構成が最初に起こるのは中脳下丘と
考えられているが、どの細胞がそのような処
理を行うか不明であった。

下丘の大型 GABA 作動性抑制性ニューロ
ンは、細胞体に多数のグルタミン酸作動性神
経終末マーカ VGLUT2 陽性の終末が作る非
対称性軸索細胞体シナプスを受け、視床内側
膝状体に上行投射する。この大型抑制性ニュー
ロンは聴覚系に必要な時間精度の高い情報
処理と迅速な情報伝達に適する可能性が
高い。

2. 研究の目的

興奮性軸索細胞体シナプスは、聴覚情報処
理の時間的正確性の最も重要な基盤である。
申請者は聴覚情報を統合する最初の部位で
ある下丘の大型抑制性細胞上に興奮性軸索
細胞体シナプスが密集して形成される、とい
う新たな神経回路様式を発見した。本研究の
目的は、下丘大型抑制性細胞が高い時間解像
度で聴覚情報を統合する、という仮説を検証
することである。

3. 研究の方法

(1) VGLUT2 を含有する軸索の下丘内での終 末形成様式の解明

ガラスピペットに詰めた Sindbis palGFP ウイ
ルスをラットの聴覚系神経核に注入する。感
染した細胞は樹状突起と軸索の隅々にまで
GFP を発現する。つまり、このウイルスは順
行性トレーサーとして使用することができる。
得られた脳標本に対し VGLUT2 蛍光免疫
組織化学を行い、VGLUT2 免疫陽性と順行
性標識が単一終末上で共存するか検討する。
この実験によって VGLUT2 陽性終末がどの
神経核に由来するのかについて知ることが
できる上、Sindbis palGFP ウイルスは単一軸
索レベルの解像度を持つトレーサーである

ため、単一軸索が形成する神経終末様式につ
いても知ることができる。

(2) 大型抑制性細胞の形態の3次元再構築

大型抑制細胞のみを標識する方法として、
parvalbumin (PV)-Cre マウスと loxp-GFP 配列
を組み込んだ組み換えウイルスを組み合わせ
て利用する。下丘では PV と GABA は同じ
細胞で発現している (Fredrich et al., 2009)。
loxp-GFP 組み込みウイルスを感染させると、
感染細胞が PV を発現している場合、Cre の
作用によって GFP 上流の loxp 配列が除去さ
れ、感染細胞は GFP を発現する。この理屈
から、視床に投射する抑制性細胞、つまり大
型抑制性細胞を選択的に調べることができ
る。ここで、抑制性ニューロンマーカの
GAD67 と VGLUT2 でこの下丘切片を染色す
ることで、感染細胞が VGLUT2 終末で取り
囲まれた抑制細胞か判定できる。これによ
って VGLUT2 陽性終末がこの細胞のどのよ
うな位置にシナプスを作るのか、定量的に調
べることができる。

4. 研究成果

(1) VGLUT2 を含有する軸索の下丘内での終 末形成様式の解明

VGLUT2 を発現し、下丘に投射することが
わかっている上オリーブ核、外側毛帯中間核、
蝸牛神経背側核および下丘自身のいずれか
にウイルスを注入したところ、どの核に注入
した場合でも下丘の大型抑制性ニューロン
の細胞体上に VGLUT2 と GFP を共存する神
経終末が接触するさまが観察された。単一軸
索が細胞体上に形成する終末の数は数個で
あることから、大型抑制性ニューロンの細胞
体には数十個の興奮性ニューロンが入力す
ると見積もられた。3例については下丘の単
一興奮性ニューロンの標識に成功した。いず

れの場合も興奮性ニューロンは下丘内で平板上の軸索側枝の展開を示し、その軸索叢内で9-30個の大型抑制性ニューロンの細胞体上に終末を形成していた。下丘興奮性ニューロンは数百 μm 遠方の大型抑制性ニューロンも支配していた。このことから下丘局所ニューロンは下丘内の幅広い範囲の大型抑制性ニューロンを支配しているといえる。一方、上オリーブ核、外側毛帯中間核、蝸牛神経背側核由来の軸索は下丘の特定の部位の大型抑制性ニューロンに入力する傾向があった。これは下丘内に入力の異なる様々な機能ドメインが存在することを示唆する。個々の機能ドメイン内部の大型抑制性ニューロンに下位の神経核から音情報が直接入力するのみならず、近隣ドメインの興奮性ニューロンの軸索側枝を介して近隣ドメインへ入力する下位の神経核からの音情報も間接的に入力することが強く示唆された (図1)。

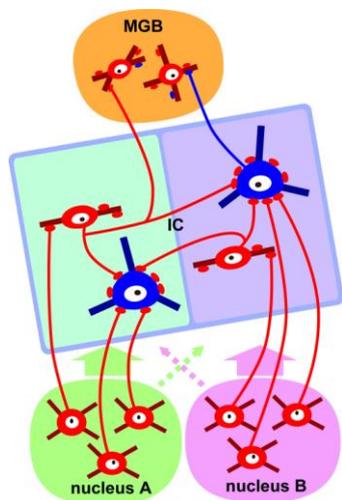


図1: 下丘(IC)はいくつかのドメインに分かれ、各々のドメインは異なる神経核からの入力を受ける。大型抑制性ニューロン(青)は上行性投射と近隣興奮性ニューロンからの入力を受けることで、結果的に複数の神経核(この場合AとB)からの情報を統合する。

(2) 大型抑制性細胞の形態の3次元再構築

Sindbis palGFP ウイルスや, loxp-GFP を搭載したアデノウイルスやアデノ随伴ウイルス(AAV)の大型抑制性ニューロンに対する感染特性を調べた。Sindbis ウイルスはほとんど大型抑制性ニューロンに感染しなかった。アデノウイルスは高張液に希釈することで、神経終末に微小なダメージを与え、細胞を逆行性標識することが期待された。しかしながら、大脳皮質にウイルスを注入した際に視床などで逆行性標識が行われたのに対し、内側膝状体にウイルスを注入しても決して下丘に標識細胞は出現しなかった(N=10)。次にこのウイルスを下丘に注入することで直接大型抑制性ニューロンの標識を試みたが、Cre-loxp システムを用いているにもかかわらず、極めて多数のグリア細胞やGAD67陰性細胞が標識された。つまり、Cre-lop システムのみでは細胞選択性が不足しているようであった。このため、loxp-GFP 配列を搭載するウイルスを、抑制性ニューロンに効率よく感染することで知られる AAV に変更した。AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5 の3種類について検討を行ったところ、AAV2/5 がもっとも抑制性ニューロンへの感染性が高く、感染細胞の実に50%程度が抑制性ニューロンであった(図2)。今後このウイルスを使用して大

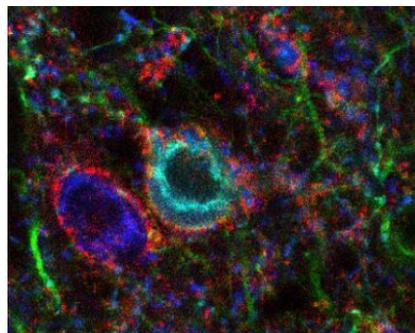


図2: PV-Cre マウスに AAV2/5-||palGFP|| ウイルスを注入したところ、大型抑制性ニューロン(中央)がGFPを発現した。赤: VGLUT2、緑: GFP、青: GAD67。

型抑制性ニューロンの樹状突起形態について検討を加えて行きたい。

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7件)

- ①Ninomiya S, Esumi S, Ohta K, Fukuda T, Ito T, Imayoshi I, Kageyama R, Ikeda T, Itoharu S, Tamamaki N, Amygdala kindling induces nestin expression in the leptomeninges of the neocortex. *Neuroscience Research* (75), 121-129, 2013, 査読有, doi: 10.1016/j.neures.2012.12.006
- ②Ito T, Oliver DL, The basic circuit of the IC: tectothalamic neurons with different patterns of synaptic organization send different messages to the thalamus. *Frontiers in Neural Circuits* 6:48, 2012 査読有, doi: 10.3389/fncir.2012.00048
- ③Saito T, Ito T, Narita N, Yamada T, Manabe Y, Light and electron microscopic observation of regenerated fungiform taste buds in patients with recovered taste function after severing chorda tympani nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 120(11), 713-721, 2011, 査読有, http://www.annals.com/toc/auto_abstract.php?id=15783
- ④Saito T, Narita N, Yamada T, Ogi K, Kanno M, Manabe Y, Ito T, Length of nerve gap defects correlates with incidence of nerve regeneration but not with recovery of taste function in patients with severed chorda tympani nerve. *Otol Neurotol*, 32(8), 1352-1357, 2011, 査読

有, doi:10.1097/MAO.0b013e31822e96d6.

- ⑤Saito T, Narita N, Yamada T, Manabe Y, Ito T, Morphology of human fungiform papillae after severing chorda tympani nerve. *Annals Otol Rhinol Laryngol*, 120(5), 300-306, 2011, 査読有, http://www.annals.com/toc/auto_abstract.php?id=15704
 - ⑥Ito T, Bishop DC, Oliver DL, Expression of Glutamate and Inhibitory Amino Acid Vesicular Transporters in the Rodent Auditory Brainstem. *J Comp Neurol*, 519(2), 316-40, 2011, 査読有, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3454-09
 - ⑦Ito T, Oliver DL. Origins of glutamatergic terminals in the inferior colliculus identified by retrograde transport and expression of VGLUT1 and VGLUT2 genes. *Front Neuroanat.*, 4, 135, 2010, 査読有, doi: 10.3389/fnana.2010.00135.
- [学会発表] (計9件)
- ①伊藤哲史, Douglas L. Oliver, 聴覚情報統合の形態学的基盤, 第118回日本解剖学会総会全国学術集会, 2013.3.28, 香川
 - ②Tetsufumi Ito, Douglas L. Oliver Tectothalamic inhibitory neurons in the inferior colliculus receive converged axosomatic excitatory inputs from multiple sources., Neuroscience 2012 (北米神経科学学会), 2012.10.15 ニューオーリンズ (米国)
 - ③伊藤 哲史, Douglas L Oliver, 下丘大型抑制性ニューロン上での入力統合, Convergence of Inputs from Multiple Auditory

Nuclei on Tectothalamic Inhibitory Neurons.
第 35 回日本神経科学大会, 2012.9.21, 名古屋

④伊藤 哲史 下位聴覚神経核からの情報が収束する下丘抑制性細胞, 日本音響学会聴覚研究会, 2012.5.26, 京都

⑤伊藤哲史, Tectothalamic inhibitory neurons in the inferior colliculus receive converged axosomatic excitatory inputs from multiple sources, 第 117 回日本解剖学会総会, 2012.03.27, 甲府市

⑥平田雄大, 伊藤哲史, 池田弘, 村瀬一之: Influence of inhibitory input to tonotopic organization of the inferior colliculus by voltage and Ca²⁺ imaging., 第 34 回日本神経科学大会, 2011.09.17, 横浜市

⑦伊藤哲史, 高田昌彦, ニホンザル聴覚神経核におけるグルタミン酸、GABA、グリシン作動性ニューロンの分布, 第 34 回日本神経科学大会, 2011.09.15, 横浜市

⑧T. Ito, Distribution of neurons expressing amino acid neurotransmitters in the superior olivary complex of Japanese Macaque (*Macaca fuscata*), 第 116 回日本解剖学会総会, 2011.03, 横浜 (誌上開催 *Physiological Sciences*, 61 (1), S292)

⑨伊藤 哲史, Douglas L. Oliver, 下丘内のグルタミン酸作動性終末の由来, 第 33 回日本神経科学大会, 2010.09.3, 神戸

[その他]

ホームページ

<http://researchmap.jp/t-ito/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 哲史 (ITO TETSUFUMI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：90334812

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし