

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659746

研究課題名(和文) 可逆的光抑制法を用いたマウス大脳聴覚野機能と領野間相互関係の研究

研究課題名(英文) the research of the mutual relationship in the mouse auditory cortex using the reversible photo-inactivation

研究代表者

高橋 姿 (TAKAHASHI, Sugata)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：10154824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 大脳にはその部位に応じて役割が違う機能的コラムを形成していることがわかっている。従来の脳局所機能の研究は、動物では一部脳を破壊するなど侵襲的な研究しかできなかった。われわれはさまざまな音での大脳聴覚野の反応を調べると同時に、両側同時に大脳聴覚野を測定できる装置を開発、さらに可逆的脳局所抑制法を用いることで、左右の大脳の相互関係の研究を行った。その結果、マウス大脳聴覚野内に周波数変調音に反応する新しい領域、音の終わりに反応する新しい領域があることを発見した。加えて片側の大脳聴覚野機能を抑制することで、反対側の大脳聴覚野の反応が変化することも発見し、さらなる研究を続けている。

研究成果の概要(英文)： It is known that there are the functional columns in the brain with the different roles depending on the sites. A conventional study of local cortical function in animals could be only in invasive research such as electrical cauterization. We have improved our equipment to obtain the bilateral auditory cortex simultaneously and we have recorded the responses to various sounds in the mouse auditory cortex. And we have also research the relationship between bilateral auditory cortices with transcranial reversible photo-inactivation. As a result, we found the new areas which specifically respond to the frequency change direction of the frequency modulated sound, and the end of the sound in the mouse auditory cortex. We also found that the auditory responses were influenced by the inhibition of the opposite auditory cortex. We think that these results can contribute to further auditory cortex research.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大脳聴覚野 マウス イメージング 光抑制法

1. 研究開始当初の背景

大脳内の局所脳機能の研究はヒトでの限局的脳損傷患者の症状をみることから始まった。PETやfMRIなど機器の進化に伴い、ヒトの脳機能は少しずつ分かりつつあるが、空間分解能の問題から、現在でも小さな領域の機能を解明するには至っていない。一方、動物実験では電気焼灼などで脳の一部を破壊することで、局所脳機能の研究が行われてきた。しかしこれまでの方法では本当に必要な部位だけを破壊すること、同一個体で複数部位の関連性をみること、機能の回復過程を調べることは不可能であった。われわれがこれまで用いてきた技術を用いれば破壊を伴うことなく、動物の局所脳機能を可逆的かつ無侵襲に抑制できる。そこから大脳聴覚野内の小さな領域の相互関係と機能を探ることを考えた。さらにこれまで全く未知である左右の脳機能の関係を解明することにもつながると考えた。

2. 研究の目的

大脳には一次体性感覚野、運動野のホムンクルスのように、その部位に応じて機能的コラムを形成していることがわかっている。大脳聴覚野にも同様の機能コラムがあり、一次聴覚野、前聴覚野、二次聴覚野内には音の周波数に応じて反応する場所が変わる周波数マップが存在している。これまでわれわれは光学的イメージング法の一つであるフラビン蛋白蛍光イメージングを用いてこの周波数マップが可視化できる、すなわち部位別の機能的コラムがマウス大脳聴覚野内にもあるということ報告した。われわれはこのような小さな機能的コラムがある程度集まり一つの領域を形成、そしてその領域がまた集合し、ある程度の集団を形成することで機能を発揮すると考えている。そこでこの機能的にまとまった小さな領域を探ること、そしてその領域を抑制した場合の反応の変化、さらに両側大脳聴覚野間の関係を調べるために片側だけを抑制した場合の反対側の反応の変化を調べることにした。そしてその後可能であれば *in vivo* マウスでの反応の変化を見るために、光抑制のための小さな発光ダイオードのマウス体内への組み込みなどを目標に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 脳機能測定のための光学的イメージング - フラビン蛋白蛍光法による脳機能解析

われわれはこれまで光学的イメージング法の一つであるフラビン蛋白蛍光イメー

ジングを用いて、マウス大脳聴覚野の研究を行い、さまざまな研究成果を得てきた。フラビンとは細胞内のミトコンドリア電子伝達系を担う蛋白のひとつで、還元型から酸化型に変化するときに青色励起光のもとで緑色自家蛍光を発するという性質を持つ。すなわち神経活動に伴い細胞内酸素代謝が亢進すると、緑色蛍光を発するためそれを捉えることで神経活動を可視化できる技術である。また自家蛍光でありながらその強さは内因性信号と比較すると10倍近く強く、しかも神経活動の強さに比例して蛍光が強くなるという性質を持つ。すなわち蛍光を捉えることでその活動部位を可視化できるばかりでなく、蛍光強度とその変化を解析することで、神経活動の強弱とその変化を見ることが出来る。さらにマウスの頭蓋骨は湿った状態にあると光を通すほど十分薄いため、頭蓋骨越しに光を照射することで、脳自体に無侵襲で神経反応を得ることが出来るという大きなメリットがある。

基本的な神経活動の測定方法はこれまで行ってきた研究と同様であり、マウスを用いて経頭蓋的にフラビン蛋白蛍光イメージングを利用する。対象動物は C57BL/6 マウスを用いる。ウレタン 1.6g/kg 腹腔内投与によって深麻酔後、自発呼吸下に管理する。マウスの頭部皮膚を切除、頭蓋骨を露出させた後、デンタルセメントを用いて、実験台とネジ固定できるように作成した金具に固定する。その後、側頭筋を翻転させ、大脳聴覚野を明視下に置く。頭蓋骨は乾燥すると透明度が失われ、脳表に光が届かなくなるため、乾燥防止のために流動パラフィンにて常に湿った状態とする。測定方法は、青色励起光 (450-490 nm) を頭蓋骨越しに脳表に照射し、神経活動に伴って発せられる緑色自家蛍光 (500-550 nm) を冷却 CCD カメラにより撮影する。反応は通常 1 秒あたり 9 フレームの頻度で撮影し、20 回以上のトライアルを平均加算する。刺激音提示直前の複数枚の平均画像を基準とし、刺激音提示後の蛍光変化を経時的に画像化する。画像化された神経反応は、その活動範囲を可視化するとともに、活動範囲のうち、特定の領域に、関心領域を設定し、経時的な反応の変化を検討する。

(2) 左右の聴覚野を同時に測定、左右の耳に別々に刺激するための工夫

いままでわれわれが行ってきたフラビン蛋白蛍光測定システムはマウス大脳聴覚野だけでなく、視覚野、体性感覚野の研究に汎用できるように落射型蛍光顕微鏡を用いていた。マウス視覚野、体性感覚野は頭頂

部に位置するため、顕微鏡をマウスの直上、垂直から記録を取るのが有利である。しかし聴覚野は側頭部に位置するため、同装置で聴覚野の反応を測定する場合、マウスを側臥位に近い体位で固定する必要があった。マウスにとって側臥位は腹臥位と違い生理的な体位でなく、とくに自発呼吸下で管理している本研究では呼吸状態が安定しないことがしばしば起こった。フラビン蛋白蛍光イメージングは、神経活動に伴った酸素代謝を測定する系であることから、動物の呼吸状態の安定は本研究の肝であり、可能な限り生理的な体位をとることがよりよい研究成果を得ることにつながると考えた。加えて側臥位の場合、反対側の聴覚野は固定台側を向くことになり、同時に両側を測定することは不可能であった。さらにこれまで用いていたマウス前方に置いたスピーカーからの音提示では、両耳に全く同じ負荷がかかっているかは疑問が残った。そこで、両側同時に大脳聴覚野の反応の測定、両耳別々の刺激音提示、呼吸状態の安定のために、腹臥位で水平方向から測定することが必要と考え、顕微鏡を80度程度回転させ、両脇に2台設置、動物の側面から記録できるようにする(側射型)とともに時間的な差異が生じないように同期させた。それに伴い、マウスの固定台を1から設計、開発を行った。刺激音を発生させるスピーカーとしてこれまでと違う2台のコンデンサースピーカーを設置することで両耳を同時に別々にも刺激できるような装置を開発した。また今までと同様の安定した記録をとるために基礎的な実験を繰り返し、調整を行った。

(3) 刺激に用いた音

大脳聴覚野の周波数マップを見るには基本周波数を固定させた音、すなわち純音、振幅変調音(AM音)を用いるのがよい。主にAM音を用いてこれまで落射型蛍光顕微鏡で得られていた反応を側射型でも得られるか検証を行った。純音、AM音は大脳聴覚野より下位のレベルである視床ですでにその処理は完成されているといわれており、純音、AM音での大脳聴覚野での反応は周波数マップが存在するいわゆるコア領域と呼ばれる前聴覚野、一次聴覚野を中心に反応がみられる。コア領域周辺にはベルト領域と言われる領域があることがわかっているが、ベルト領域の反応を安定させて測定することはこれまで難しかった。そこで大脳聴覚野で処理されていると思われるより複雑な音を用いることで大脳聴覚野内の多くの領域を研究することとした。

その後、左右同時に同じ刺激音を提示するとともに、片側ずつの刺激音提示や、同期させた左右別々の刺激音を提示することで、片耳聴、両耳聴に対する反対側、同側の大脳聴覚野の反応の違いの研究、さらにはガウシアンノイズ負荷下で刺激音を提示、静寂下とノイズ環境下の反応の違いを研究することとした。

(4) 可逆的光抑制法

われわれはフラビン蛋白蛍光法で用いる青色励起光を長時間照射することにより、還元型フラビンが失活し、ミトコンドリア内の酸素代謝が抑制され、神経活動自体も抑制されることを発見し報告した。この神経活動は、青色励起光を一定の時間中断させることや、*in vitro*の実験で還元型フラビンを投与することで、容易に回復することもわかり、可逆的反応であることがわかった。この原理の応用によりマウス *in vivo* において脳機能測定と同時に、無侵襲、可逆的に局所脳機能を抑制することが可能となった。まずは本法を麻酔下マウスに適用し大脳聴覚野内の小さな領域の神経活動を抑制した場合の他の領域の反応性の変化、片側の聴覚野を抑制した場合、脳梁を介して反対側への聴覚野に及ぼす影響を研究することとした。また可逆的抑制装置をマウス体内に組み込みことが可能であれば、覚醒状態での機能抑制が可能となり、さらなる大脳聴覚野機能をみることもできると考えた。そこで電源供給、スイッチングを含めて可能な装置を開発することを目標とした。

4. 研究成果

(1) マウス大脳聴覚野コア領域以外の反応(図1, 2)

マウス大脳聴覚野にはコア領域と呼ばれる前聴覚野と一次聴覚野が存在する。コア領域はいずれの音でも容易に活性化され反応をみることができるとは難しかった。コア領域の反応は音の周波数によって反応する場所が変化し、周波数ごとに特定の場所に並ぶ周波数マップがあることがわかっていた。また周波数が一定の音である純音などは大脳聴覚野より下位の中枢で処理されていること、コウモリでは周波数ごとに並ぶ領域とは別に周波数変調音(FM音)に特異的に反応する領域が存在すること、マウスでも鳴き声は周波数が変調するFM音が多く使われていることから、FM音刺激によるマウス大脳聴覚野の研究を行った。

周波数を連続的に5k 30kと上昇させるFM上昇音、逆に30k 5kと下降させるFM下降

音を用いて反応を測定するとこれまでに安定して反応を測定することができなかったベルト領域を含めて、大脳聴覚野の広い範囲に反応がみられることがわかった。そこで FM 変調に特異的な領域を探るために連続的に続く FM 上昇音から連続する FM 下降音に急激に変化させる音、その逆で FM 下降音から FM 上昇音に急激に変化する音を作成、研究を行った。その結果、これまで特異的な反応を得ることが難しかった 2 つのベルト領域で反応を得ることができた。比較的反応が大きく見られたのはこれまで Ultrasonic field (UF, 超音波領域) と呼ばれていた部位であった。これまで UF は高音に対する反応が見られる領域と考えられていたが、直接的、特異的にそれを証明する研究はなく、本研究成果により UF はむしろ周波数変調によく反応する領域であることがわかった。さらに DorsoPosterior aera (DP) と呼ばれる領域でも FM 方向変調に対して反応がみられることがわかった。そしてこれらの領域の反応を活性化するためには音の周波数変調スピードにより違いがあることもわかった。またこの領域の組織学的な性質を調べるために逆向性の神経トレーサーを注入したところ視床からの入力は大脳聴覚野コア領域に投射するメインの核である内側膝状体腹側核ではない周囲の領域から投射されるということもわかった。

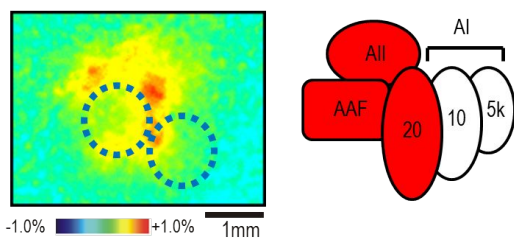


図 1 : 20kHz 純音に対する反応。コア領域である前聴覚野 (AAF)、一次聴覚野 (AI)、および二次聴覚野 (AII) に反応がみられる。(緑色が音刺激を行う直前の平均と変化のない部分、黄色、赤色となるにつれて、反応が強くなりみられた部位となる)

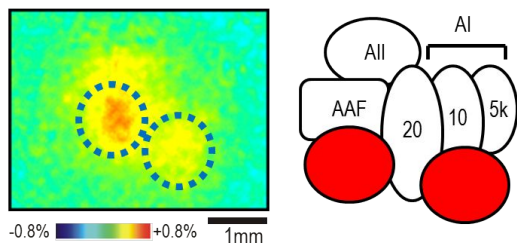


図 2 : 図 3 と同様のマウスによる FM 上昇音から連続する FM 下降音に急激に変化させる音に対する反応。これまで反応を得ることができなかった 2 つの領域に反応がみられた。

(2) 音の OFF に対する反応 (図 3)

音には始まりと終わりがあり、これまでの電気生理学的な研究では、音の始まりのタイミングで神経活動 (ON 反応) がみられる ON ニューロンと、音の終わりのタイミングで活動 (OFF 反応) がみられる OFF ニューロンがあるということが言われてきた。一般に ON 反応を捉えることの方が容易であり、フラビン蛋白蛍光反応での研究でも、これまでは ON 反応を捉えてきた。本法で OFF 反応を捉えにくかったもう一つの理由として、活動を引き起こす刺激音は 0.5~1.01 秒という単位のものを使用していたこと、そして ON 反応後に遅れて 1.0~2.0 秒後に周囲の動脈から流入する血流の増加によって吸光反応が起こることから、音の OFF のタイミングと血流による吸光反応とが重なり、OFF 反応の測定は困難であった。そこで刺激に使用する音を 7 秒程度に延長することで、OFF 反応と血流反応とを分離し、OFF 反応を捉えようとする研究を開始した。その結果、長い音刺激により OFF 反応を捉えることができ、しかも OFF 反応は ON 反応のように周波数に応じて反応する位置が変わるといふ周波数マップはなく、いずれの周波数においても同様の場所が反応する OFF 領域があることがわかった。

続いてある程度の長さを持った先行音を聞かせてから、これまで ON 反応をとらえていた音と同様の 1.0 秒の音刺激による反応をみる実験を行った。その結果、これまで先行音なしで 1.0 秒の音刺激では捉えることができなかった OFF 反応が血流反応に重なって見られることがわかった。すなわち先行音なしでの 1.0 秒刺激では抑制されていた OFF ニューロンが反応するようになった。この事実はこれまで OFF ニューロンを抑制していた介在ニューロンの存在と、先行音刺激によりその介在ニューロンが Short-Term Depression のような何らかの可塑性を生じていることが考えられた。

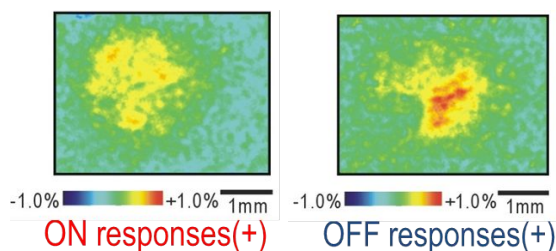


図 3 : ON 反応と OFF 反応。これまでみることができなかった OFF 反応がきれいに出現している。また OFF 反応の位置は ON 反応の位置と異なっている。

(3) 両側大脳聴覚野の反応と反対側へ与える影響 (図 4、5)

動物の感覚入力、運動出力は、主に反対側の脳により制御されている。しかし単純な入

力ではないヒトでの言語理解のような高次の機能は、多くの人が左大脳半球で処理されているように、優位半球があることがわかっている。このような機能分化がなぜあるのかは、いまだわかっていない。聴覚では耳からの入力された音が、大脳聴覚野まで伝わるまでに、すでに複数回の神経核を經由し、処理されている。われわれは片耳からの音入力に単純に反対側大脳聴覚野で処理されているのか、もしくは複雑な情報処理を受け、優位半球があるのか、また脳梁を介した大脳聴覚野間の相互作用があるのかを探るための研究を行った。最初にこれまで行ってきたマウス前方に設置したスピーカーから発信した音刺激に対して左右の大脳聴覚野が全く同じ反応を示すのか、そして片側大脳聴覚野に対し可逆的光抑制を用いて神経活動を抑制した場合、反対側へはどのような影響が出るのかの実験を行った。刺激音はこれまで多く使用してきた AM 音を用いた。その結果、マウス前方スピーカーからの刺激では、両側大脳聴覚野とも同じような反応を得ることができた。その後、右大脳聴覚野のみを光抑制を行ったところ、左大脳聴覚野で照射前にみられた反応だけではなく別の場所の反応がみられた。この領域の反応は高音域の音の場合にみられる傾向があること、また反対側の抑制の程度が弱い場合は見られにくいという特徴があった。両側の耳から刺激が入ると優位に反応が伝わると思われる反対側耳 (contra) からの影響に加え、同側耳 (ipsi) から大脳聴覚野に与える影響があり、複雑になるため、次に本当に ipsi の反応が見られるのか、そしてそれは何を意味しているのかを探るために片耳刺激だけで実験を行うことを考えた。

片耳ずつ AM 音を入力した場合、予想通り右耳入力でも、左耳入力でも反対側 (contra) の大脳聴覚野での反応が強く出現した。しかし、すべての神経活動が反対側の大脳聴覚野だけで見られるわけではなく、同側 (ipsi) の大脳聴覚野でも反応が見られることがわかった。この同側大脳聴覚野での反応が、単純に反対側大脳聴覚野の反応が脳梁を伝わり、観察されているだけなのか、もしくは何かの意味があって神経活動処理されているのかを、研究するために現在可逆的光抑制法を用いて研究を進めている。

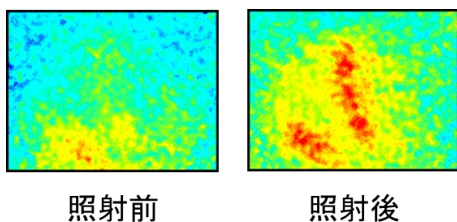


図4：右大脳聴覚野へ光抑制する前後での左大脳聴覚野の反応。明らかに抑制後では抑制前にみられなかった部位に反応がみられる。

左聴覚野の反応

右耳刺激 左耳刺激

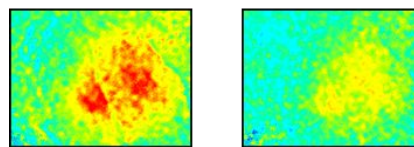


図5：AM音を刺激音として用い、片側ずつ音刺激をした場合の、左大脳聴覚野の反応。反対側の右耳から刺激した場合で反応がみられるが、同側の左耳から刺激した場合でも反応がみられる。

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1件)

Honma Y, Tsukano H, Horie M, Ohshima S, Tohmi M, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K: Auditory cortical areas activated by slow frequency-modulated sounds in mice. PLOS ONE. 8(7): e68113, 2013. (査読有)

[学会発表](計17件)

Tatsuya Yamagishi, Hiroaki Tsukano, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi: The cortical area located dorsally to auditory cortex involved in sound-shape association memory in mice (The 30th Politzer Society Meeting / the 1st World Congress of Otolaryngology, June 30-July 3 2015, TOKI MESSE (Niigata, Japan))

Hironori Baba, Hiroaki Tsukano, Tatsuya Yamagishi, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi: OFF responses produced by short-term depression of thalamic inputs to inhibitory neurons in the mouse auditory cortex (The 30th Politzer Society Meeting / the 1st World Congress of Otolaryngology, June 30-July 3 2015, TOKI MESSE (Niigata, Japan))

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿: Higher visual cortices responsible for shape recognition in mice (第92回日本生理学会大会: 2015年3月21日-23日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市))

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿：マウス聴覚・視覚連想記憶の行動学的解析（第59回日本聴覚医学 会総会・学術講演会、2014年11月27日～28日、海峡メッセ（山口県・下関市）

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿：Transcranial imaging of cortical activities after sound-shape association in mice（Neuroscience2014：2014年9月11日-13日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

馬場洋徳、本間悠介、高橋邦行、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿：マウス聴覚野のOFF応答のイメージング解析（第10回側頭骨疾患研究会：2013年1月8日、第一ホテル東京（東京都・港区）

Shinsuke Ohshima, Kuniyuki Takahashi, Tatsuya Yamagishi, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Hiroaki Tsukano, Yamato Kubota, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi：Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning (29th politzer society meeting, 14-17 November 2013, Susesi Resort (Antalya, Turkey)

Kuniyuki Takahashi, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, and Sugata Takahashi：Bilateral functional differences in the mouse auditory cortex using flavoprotein autofluorescence imaging. (2nd meeting of EA ORL-HNS and CE ORL-HNS, 27-30 April, 2013, Nice Acropolis (Nice, France)

馬場 洋徳、本間 悠介、大島 伸介、窪田和、高橋邦行、澁木克栄、高橋姿：先行持続刺激により出現する マウス聴覚野の二相性応答パターン（第57回日本聴覚医学 会総会：2012年10月12日 国立京都国際会館（京都府・京都市）

馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、菱田竜一、高橋姿、澁木克栄：Biphasic ON-OFF responses in the mouse auditory cortex appeared after exposure to sustained tone bursts（第35回日本神経科学大会：2012年9月21日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、菱田竜一、高橋姿、澁木克栄：ON and OFF responses in the mouse auditory cortex after exposure to long-lasting tone bursts.（第89回日本生理学会大会：2012年3月30日、長野県松本文化会館（長野県・松本市）

本間悠介、高橋邦行、塚野浩明、堀江正男、馬場洋徳、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿：マウス大脳聴覚野の周波数変調(FM)音処理機構（第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会：2012年5月10日、朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/oto/about/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 姿 (TAKAHASHI SUGATA)
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：10154824

(2) 研究分担者

高橋 邦行 (TAKAHASHI KUNIYUKI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：40452057

窪田 和 (KUBOTA YAMATO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40547593

(3) 連携研究者

なし