

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430034

研究課題名(和文)かたちから探る聴覚情報統合のしくみ

研究課題名(英文)Anatomical basis of the integration of auditory information

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然界に存在する音は時間的に変化する複雑な音であり、私たちはそれを認知するための神経回路を備えているが、その形態学的・生理学的詳細についてはほとんどわかっていない。本研究ではさまざまな音情報が脳内で初めて収束して処理される統合中枢である下丘のニューロンがどのような入力を受け、それを受けてどのような情報を出力するかについて、単一細胞レベルの生理学と形態学を組み合わせることによって解析した。結果より、下丘は細胞の配列による情報表現と、細胞の種類による情報表現の両者が行われていることや、複雑な音に対する応答性が局所回路によって創りだされることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Natural sounds are always complex in a temporal aspect, and our brain must have specialized neural circuitry which is involved in the analysis of such complex sound, although the anatomical and physiological basis of the analysis is poorly known. In this study, we studied the input and output properties of local circuit of the inferior colliculus, which is the first integration center of many aspects of auditory information, with combination of physiological and anatomical techniques at a single cell level. From the results, in the inferior colliculus auditory information is represented not only by spatial assembly of each neurons but also by cell types. The data also suggested that some of the responsiveness to complex sounds is created de novo by local circuitry of the inferior colliculus.

研究分野：神経解剖学

キーワード：局所神経回路 聴覚 シナプス

1. 研究開始当初の背景

自然環境は複雑な周波数成分を持ち、時間変化に富んだ音に満ちている。コミュニケーション音は音圧や周波数が複雑に時間変化するし、獲物/捕食者の立てる足音は音空間で時間に伴い移動することからわかるように、ダイナミックに変動する音こそが生物学的に重要である。このため振幅変調音や周波数変調音(FM音)のような時間変化する音を検出する神経回路が聴覚系に存在する。その神経回路はどこにあるのだろうか？

蝸牛で符号化された聴覚情報は多数の聴覚神経核で並列処理され、個々の神経核で音の様々な情報が抽出される。これらの下位神経核のニューロンは時間変化するような複雑音への応答性に乏しい。

一方、下丘はすべての聴覚神経核からの上行性線維が収束する場所であり、並列処理された聴覚情報が初めて統合される。このためFM音などの複雑音に特異的に応答する細胞が出現する(Pollak, 2011)。

ではこのような複雑音に選好性を持つ細胞は形態学的に同定可能であろうか？

興奮性終末マーカー-VGLUT2 と抑制性ニューロンマーカー-GAD67 を用いて下丘のニューロンを3つの機能区分に分類することが可能である。下丘のニューロンの約10%を占める大型GABA作動性抑制性細胞(Ito et al., 2009; Ito and Oliver, 2012) は、VGLUT2陽性終末による興奮性入力を密に細胞体上に受ける。小型抑制性細胞や興奮性細胞はこのような入力を欠く(Ito et al., 2009; Ito and Oliver, 2010, 2012)。興奮性細胞の単一軸索が大型抑制性細胞の細胞体上に作る終末の支配様式の解析から、細胞体への入力は多数の下丘興奮性細胞や下丘より下位の様々な神経核の細胞からやってくることで、個々の興奮性細胞が作る軸索-細胞体接触の数は1-7個と少なく、興奮性細胞約80個が1個の大型抑制性細胞の細胞体に入力すること、さらに下丘興奮性細胞は近傍に大量の軸索側枝を伸ばし、10-30個の大型抑制性細胞を支配することも判明した。つまり、大型抑制性細胞が多数の神経核や近傍の興奮性細胞で並列処理された聴覚情報を統合することを強く示唆する。

下丘への入力線維は背腹軸に直交して層状に走っており、単一の層は特定の周波数の音に対して活動する。例えば腹側の層は低周波数の音に対して活動し、背側の層は高周波数の音に対して活動する(トノトピー構築)。この入力を受ける下丘のニューロンは樹状突起の展開の違いから2種類に分かれる。平板細胞は入力線維の層に平行に樹状突起を伸ばし、従って特定の周波数の音によって活動する入力を多く受ける。一方、星状細胞は入力線維層に無関係に様々な方向に樹状突起を展開し、結果様々な最適応答周波数を持つ線維から入力を受ける。大型抑制性細胞は星状細胞であろうと示唆されており(Ito and

Oliver, 2012)、この仮定が正しければ大型抑制性細胞はさまざまな最適周波数の入力線維を統合することになる。以上をまとめると、大型抑制性細胞は様々な聴覚情報を統合する、つまり複雑音への選好性を持ちうる形態を有していると考えられる。

2. 研究の目的

当研究の目的は大型抑制性細胞が下丘や下丘下の多数の興奮性ニューロンの活動を統合して複雑な音への応答を作り出す、という仮説を検証することにある。

仮説検証のための戦略として、2つの実験軸を設定した。第1の軸はより巨視的な実験である。多数の細胞の活動を可視化することによって、下丘内の細胞の相互作用を観察したり、下丘の細胞種間で適刺激が異なるか調べる。第2の軸はより微視的な実験である。個々の下丘細胞に注目してその詳細な形態や刺激に対する応答性を調べる。複雑音への応答は明らかに多数のニューロンのネットワークによって作られるので、微視的な単一細胞レベルの調査ではその全体像に迫れないし、かといって巨視的な機能イメージング技法単体ではなぜその応答が起きるか、という機序そのものに迫ることは困難である。その両者を行うことによって神経回路網が複雑な応答を作り出すメカニズムに迫ることができると考えた。

3. 研究の方法

実験1: in vivo Ca^{2+} イメージングによる下丘神経回路網の音刺激に対する応答の解明

マウスでは後頭骨を一部除去することで下丘を直接観察することができる。マウスの下丘に膜透過性蛍光 Ca^{2+} 指示薬を注入し、ニポウディスク顕微鏡で細胞の Ca^{2+} 応答を記録する。超音波発生システムを用いてさまざまな音圧の純音、ノイズ、FM音を片耳ないし両耳に提示し、音で誘発される活動電位によって引き起こされる Ca^{2+} 指示薬の蛍光強度変化(以下単に発火と書く)を観察する。下丘ニューロンは近傍に多数の軸索側枝を伸ばし、周りのニューロンを支配しているため、多くの場合、記録するニューロン集団は強く相互結合していると見積もられる。そこでニューロンの活動の相互作用を解析する。特に発火の細胞間同期や、発火の順番と、細胞種、細胞の空間配置に注目する。

実験2: 神経活動依存性分子発現を用いた下丘ニューロンの刺激選好性解析

c-fosの発現は直前の神経活動を反映することが知られている。純音やFM音に暴露後の下丘でのc-fos発現から、FM音に反応するニューロンの方が純音に反応するニューロンより核が大きいことが判明している(Lu et al., 2009)。本実験では、大型抑制性ニューロン(大きな核を持つ)がFM音に対する選好性を有するという仮説を検証する。下

丘の3種類のニューロン、とりわけ大型抑制性細胞がどのような音刺激に対して活動を示すのか調べる。防音箱内にラットを入れ、80分間無音、純音、あるいはFM音に暴露する。直後に動物を固定し、切片を作成、蛍光免疫染色を行う。3種類の下丘ニューロンにおけるc-fos発現細胞数を数え、その比率が音刺激の種類によってどのように変化するか調べることによって、3種類のニューロンが好む刺激の種類を決定する。

実験3: 下丘単一ニューロンの機能形態学

実験1や2で得られるような刺激反応性を作り出す上で下丘の層構造に対する樹状突起の展開や興奮性・抑制性終末の入力様式が重要であると考えられる。ニューロンの形態と機能の関連を調べるため、

(1) 感染ニューロンに膜移行性シグナル付加GFP (palGFP) を発現させるウイルスベクターを用いて1個のニューロンのみを標識し、VGLUT2とGAD67に対する免疫染色を行うことで感染ニューロンが3種類のニューロンの何れか同定した上で、樹状突起や軸索の形態や樹状突起上のVGLUT2陽性終末の分布を調べ、単一ニューロンの情報統合様式を解析する。

(2) 近傍記録・染色技法(Pinault, 1996)を用いて、刺激音に対する応答を確認したニューロンに色素を注入し、まず蛍光免疫染色を行い標識ニューロンが3種のニューロンの何れであるか同定し、その後、注入色素に対する明視野免疫染色を行い、樹状突起や軸索の展開をNeuroLucidaソフトウェアでトレースする。これによって大型抑制性ニューロンなど下丘のそれぞれのニューロン種がどのような音刺激に選好性をもち、その応答がどのような機構によって生成されるか判明する。

4. 研究成果

実験1: in vivo Ca^{2+} イメージングによる下丘神経回路網の音刺激に対する応答の解明

8匹のマウスについて、音刺激に反応する細胞の計測に成功した。ニポウディスク顕微鏡の特性から、下丘表面から50 μ m以下の深さに分布する細胞の活動を計測することができた。これはちょうど下丘背側皮質の第1層に対応する。この領域の音刺激に対する応答性はいままで不明であった。

下丘背側皮質第1層の細胞は広帯域雑音に強く反応した。また、さまざまな周波数の純音を提示したところ、5-10kHzという、マウスの可聴域ではかなり低い領域の音に対して最も強く反応を示した。

各動物で、観察した細胞から任意のペアを選び、刺激に対する応答の波形の類似度(相関係数)と細胞の距離の関係を調べたところ、多くの計測で距離と類似度の間に負の相関が見られた。すなわち、互いに近くにある細胞は類似した活動性を示すことを示唆する。

そこで、最も強い応答を示した周波数(最適周波数)と細胞の位置との関係を調べたところ、背側皮質第1層の内側部では、より内側の細胞がより高い最適周波数を持つ、というトノトピー構築が存在することが示唆された。本研究の内容はBrain Res誌にて2014年に報告した(Ito et al., 2014)。このような音への選択性がどのような局所神経回路の構築によってもたらされるか、という問いが立ち上がってきた。そこで、急性スライスで電位感受性色素で染色し、順行性トレーサーを詰めたガラス電極で電気刺激することで、電気刺激に対する神経回路の応答性を測るとともに、その局所神経回路を形態学的に明らかにする技術を開発した(森田他、2015年日本神経科学学会にて報告)。この技術を下丘皮質急性スライスに应用することで下丘皮質局所回路の構築を明らかにすることが今後の課題である。

実験2: 神経活動依存性分子発現を用いた下丘ニューロンの刺激選好性解析

純音刺激を行った動物では、下丘中心核内に帯状にc-fos陽性細胞が出現した。この応答細胞の9割がGAD67陰性、すなわち非抑制性細胞であった。この一方、0.3octの帯域幅のランダムに周波数が変化するFM音に対しては2割程度のc-fos陽性細胞がGAD67を発現しており、その過半数が大型抑制性細胞であった。0.3octの帯域幅のバンドノイズに対する細胞のc-fos発現は個体差が大きかった。しかしながら、c-fos発現細胞の数にはきわめて個体差が大きく、有意差を検出するには至らなかった。下丘は大脳皮質からの下行性制御や、網様体からの活動性制御が行われているため、動物の意識や注意レベルがc-fos発現に強い影響を与えるものと考えられた。今後の課題として、麻酔下でこのc-fosの空間発現パターンがどのように変化するか検討したい。

実験3: 下丘単一ニューロンの機能形態学

(1) ウイルスベクターによって、3例の下丘興奮性細胞の樹状突起や軸索の三次元展開を解明することに成功した。これらの細胞はいずれも広範かつ複雑な局所軸索叢をもち、9-30個の大型抑制性細胞に対して軸索細胞体接触を行っていた。1個の興奮性細胞が1個の大型抑制性細胞に作る軸索細胞体接触の数は1から7個であった。

ウイルスベクターを他の脳幹聴覚核に注入し、単一興奮性軸索が大型抑制性細胞細胞体にどのように接触するかについて調べたところ、下丘興奮性細胞と同様、1個の興奮性細胞が1個の大型抑制性細胞に作る軸索細胞体接触の数は1から7個であった。なお、他の脳幹核由来の終末の大きさは下丘由来終末の大きさより大きかった。また、異なる脳幹核は下丘内で異なる領域におもに終末を形成する、すなわちシナプスドメインを形

成することが確認された。

これらの知見と、大型抑制性細胞上の軸索細胞体終末の密度から、大型抑制性細胞は数十個もの興奮性細胞からの入力を収束して受けること、そして下位脳幹核からの音情報と、下丘局所回路によって修飾された音情報の双方の情報を統合することが形態学的に示唆された。

(2) 109 個の下丘ニューロン (大型抑制性細胞 18 個、小型抑制性細胞 5 個、非抑制性細胞 86 個) から記録を取り、記録の性質と細胞種の間に関連付けることができた。現時点では、3 種類の細胞種で AM 音の変調周期に対する追従性に違いが見られない ($P > 0.05$, Fisher's exact test) のに対し、最適周波数の純音より掃引 FM 音に対して発火率が高い細胞の比率は有意に違いがあり ($P = 0.018$, Fisher's exact test)。大型抑制性細胞はより掃引 FM 音を好み、小型抑制性細胞は全く掃引 FM 音への選好性が見られないことがわかった。実験 3-1 のデータを合わせて考えると、大型抑制性細胞はさまざまな脳幹核からの情報と下丘局所ニューロンからの情報を統合することによって、時間的に変化する複雑な音に対する選好性を作り出しているのではないかと想像される。今後の課題として、データ数を増やすとともに、生理データと形態データのより詳細な解析を行う必要がある。

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 11 件)

Comparison of fungiform taste-bud distribution among age groups using confocal laser scanning microscopy in vivo in combination with gustatory function. Saito T, Ito T, Ito Y, Manabe Y, Sano K. Eur J Oral Sci. 124(2):135-40. 2016. doi: 10.1111/eos.12259. 査読有

Tectothalamic inhibitory projection neurons in the avian torus semicircularis. Ito T, Atoji Y. J Comp Neurol. in press. 2016. doi: 10.1002/cne.23979. 査読有

Long-term Follow-up Results of Regeneration Process of Fungiform Taste Buds After Severing the Chorda Tympani Nerve During Middle Ear Surgery. Saito T, Ito T, Ito Y, Manabe Y. Ann Otol Rhinol Laryngol. 125(5):393-9. 2016. doi: 10.1177/0003489415617775. 査読有

Functional organization of the local circuit in the inferior colliculus. Ito T, Bishop DC, Oliver DL. Anat Sci Int. 91:22-34. 2016.

doi:10.1007/s12565-015-0308-8 査読有

Functional organization of the mammalian auditory midbrain. Ono M, Ito T. J Physiol Sci. 65(6):499-506. 2015. doi: 10.1007/s12576-015-0394-3. 査読有

Convergence of Lemniscal and Local Excitatory Inputs on Large GABAergic Tectothalamic Neurons. Ito T, Hioki H, Sohn J, Okamoto S, Kaneko T, Iino S, Oliver DL. J Comp Neurol. 523(15):2277-96. 2015. doi: 10.1002/cne.23789. 査読有

Distribution of glutamatergic, GABAergic, and glycinergic neurons in the auditory pathways of macaque monkeys. Ito T, Inoue K, Takada M. Neuroscience. 310:128-51. 2015. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.041. 査読有

Degeneration process of fungiform taste buds after severing the human chorda tympani nerve-observation by confocal laser scanning microscopy. Saito T, Ito T, Ito Y, Kato Y, Manabe Y, Narita N. Otol Neurotol. 36(3):539-44. 2015. doi: 10.1097/MAO.0000000000000444. 査読有

Determining auditory-evoked activities from multiple cells in layer 1 of the dorsal cortex of the inferior colliculus of mice by in vivo calcium imaging. Ito T, Hirose J, Murase K, Ikeda H. Brain Res. 1590:45-55. 2014. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.049. 査読有

Local and commissural IC neurons make axosomatic inputs on large GABAergic tectothalamic neurons. Ito T, Oliver DL. J Comp Neurol. 522(15):3539-54. 2014. doi: 10.1002/cne.23623. 査読有

Observation of regenerated fungiform taste buds after severing the chorda tympani nerve using confocal laser scanning microscopy in vivo. Saito T, Ito T, Kato Y, Yamada T, Manabe Y, Narita N. Otol Neurotol. 35(3):e110-6. 2014. doi: 10.1097/MAO.0000000000000223. 査読有

[学会発表](計 16 件)

伊藤 哲史, こだま定位コウモリに見られる下丘神経回路の解析, 2016.3.30, 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会, ビックパレットふくしま(福島県・郡山市)

伊藤哲史, 阿閉泰郎, 鳥下丘相同構造物抑

制性ニューロンの神経回路, 2015.10.4, 日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会, 福井大学松岡キャンパス(福井県・永平寺町)

伊藤 哲史, 阿閉 泰郎, 鳥類下丘の GABA 含有細胞の超微形態, 第 38 回日本神経科学大会, 2015.7.28, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

轟 真語, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之, 下丘表層における神経活動の計測, 2015.7.28, 第 38 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

森田 奈々, 長谷川 良平, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之, 軸索標識と電位イメージングを組み合わせることで上丘層間の機能的非対称を解明した. 2015.7.28, 第 38 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

福澤 拓也, 荒本 顕, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之, マウス坐骨神経結紮による神経損傷が脊髄後角細胞の自発及び誘発活動に与える影響, 2015.7.28, 第 38 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

伊藤 哲史, 阿閉 泰郎, 力丸 裕, 進化的に保存された下丘局所回路 - 抑制性細胞の形態解析 -, 日本音響学会聴覚研究会, 2015.5.28 豊橋技術科学大学(愛知県・豊橋市)

T.Hosoe, T.Ito, M. Makinodan, H.Ikeda, K.Murase, Changing in sociality, learning ability, and neural activity induced by the juvenile isolation in mice, 第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会, 2015.03.23, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Y.Watanabe, T.Ito, K. Iwata, H.Matsuzaki, Y.Konishi, H.Ikeda, K.Murase, Analysis of neurotransmitters in the brain and behavioral abnormalities of offsprings from stressed mother in mice, 第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会, 2015.03.23, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

伊藤 哲史, 下丘局所神経回路の機能構築(解剖学会奨励賞受賞講演), 第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会(招待講演), 2015.03.22, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

伊藤 哲史, 下丘局所神経回路の構築, 第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会, 2015.03.21, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

伊藤 哲史, 廣瀬 潤一, 村瀬 一之, 池田 弘, 下丘背側皮質第 1 層細胞集団の音刺激応答性 -in vivo カルシウムイメージングによる解析-, 日本音響学会聴覚研究, 2014.11.27, 豊橋技術科学大学(愛知県・豊橋市)

T.Ito, Auditory-evoked unit responses of large GABAergic neurons in the inferior colliculus, Neuroscience 2014, 2014.11.17, ワシントン DC(米国)

T.Ito, Auditory-evoked responses of large GABAergic neurons in the inferior colliculus, 第 37 回日本神経科学学会, 2014.09.12, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

伊藤 哲史, 下丘抑制性ニューロンの音刺激応答性, 第 119 回日本解剖学会総会, 2014.03.27, 自治医科大学(栃木県・下野市)

J.Hirose, T.Ito, K.Murase, H.Ikeda: Sound evoked activity of cells in the superficial layer of the mouse inferior collicular cortex: an in vivo calcium imaging study, neuro2013, 2013.06.20, 京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<https://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

池田 弘(IKEDA, Hiroshi)
福井大学・工学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 80377473

村瀬 一之(MURASE, Kazuyuki)
福井大学・工学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 40174289