

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 馬場 洋徳
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第745号
学位授与の日付 平成29年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Auditory cortical field coding long-lasting tonal offsets in mice.
(持続音の終わりに特異的に応ずるマウス大脳皮質聴覚野の領野)

論文審査委員 主査 教授 小野寺 理
副査 教授 染矢 俊幸
副査 教授 堀井 新

博士論文の要旨

【背景と目的】

マウスの鳴き声は複雑な時間的構造を持ち、鳴き声の情報を聴覚野で処理する場合、音の時間的な情報処理が重要となる。最も基本的な時間的情報処理は、音の持続時間の長短を識別する機能である。そこで、我々は音の終了時点に生ずる OFF 反応に焦点をあて、この OFF 反応が音の持続時間に応じて変化すると考えて研究を行った。従来の聴覚研究では、通常0.5-1秒程度しか持続しない音刺激を用いてきたが、少なくとも我々の方法では、明確な OFF 反応は観測されていない。従ってより長い音刺激を用い、OFF 反応を記録することを試みた。また数秒以上続く音刺激の持続時間をコードする一つのメカニズムとして、音刺激による短期可塑性の関与が想定される。この可能性についても検討した。最後に、最近マウス聴覚野の研究が進展し、複数の領野に分かれることが判明している。しかし、これらの領野分類は音刺激を与えた時の ON 反応に基づくものである。そこで OFF 反応の分布が ON 反応に基づく領野分類と如何なる関係にあるかという点についても解析した。

【方法】

《神経活動の測定》動物は C57BL/6N マウスを用いた。マクロレベルの聴覚野神経活動は、活動依存的な酸素代謝変化を反映するミトコンドリアフラビン蛋白由来の内因性緑色蛍光を用い、経頭蓋的にイメージングを行った。マウスをウレタン麻酔 (1.6 g/kg, i. p.) し、直腸音を 37.5 度に保った。右聴覚野上の頭蓋骨を露出し、露出部を顕微鏡下に固定した。麻酔導入後約1時間で実験を開始し、動物の状態が安定している3時間以内に記録を終了した。またニューロンレベルの活動を解析するときは、二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを用いた。この時は頭蓋骨を除去し、フラビン蛋白蛍光イメージングで予め OFF 応答が出現する場所を同定した後、この場所にカルシウム指示薬である Cal-520 を注入し、2光子顕微鏡で Cal-520 に由来する緑色蛍光を発する細胞体のカルシウム濃度変化を記録した。その際アストロサイトを特異的に染める赤色蛍光色素の SR-101 も注入し、赤色蛍光を発する細胞を除外することでニューロンのカルシウム濃度変化のみを記録した。

《刺激音》音刺激はマウスの 10 cm 前方に置いたスピーカーから 70 dB の強度で与えた。周波数は 5 kHz

と 20 kHz を主に用い、7 秒間持続する音刺激を用いて、刺激開始直後の ON 反応と終了後直後の OFF 反応を可視化した。また長い音刺激が短期可塑性を起こす可能性を検証するために、1 秒間の音刺激に対する OFF 反応を測定し、それに先行するタイミングで長時間の音刺激を予め与えておくと、1 秒間の音刺激に対する OFF 反応がどう修飾されるのかも検討した。

《薬剤》皮質可塑性の誘発には NMDA 受容体の関与が想定される。そこで NMDA 受容体拮抗薬である MK801 (0.1-0.5 mg / kg) を腹腔内投与し、投与前と投与後 30 分後の OFF 反応を比較した。

【結果】

我々は 7 秒間持続する音刺激を用いることで明確な OFF 反応を捉えることに成功した。OFF 反応の振幅が最も大きくなるピークの位置を解析したところ、ON 反応を用いて分類された前聴覚野 (AAF)、一次聴覚野 (AI)、二次聴覚野 (AII) などの位置とは異なり、AI の内側に隣接する小さな領域に局在して分布することが判明した。また OFF 反応を誘発する音の高さを変化させても OFF 反応のピーク位置は変化しなかった。

次に短時間の音刺激に対する OFF 反応を解析した。10 秒間の先行音刺激を与え、その 30 秒後に 1 秒間の刺激を行い測定したところ、明確な OFF 反応を記録した。またそのピークの位置は 7 秒間刺激に対する OFF 反応のピーク位置と同部位に出現した。10 秒間の先行音刺激と 1 秒間の音刺激を異なる周波数にしても OFF 反応は記録された。また 10 秒間の先行音刺激と 1 秒間の音刺激の間隔を最長 90 秒まで延長しても OFF 反応が記録された。

NMDA 受容体に依存する短期シナプス可塑性と OFF 反応の関係を解析するため、NMDA 受容体阻害剤である MK-801 (0.5 mg / kg) を腹腔内投与したところ、7 秒音刺激に対する OFF 反応が抑制された。

OFF 反応領域の個々のニューロン活動を観察するため、二光子カルシウムイメージングを行った。同域 387 個の神経細胞に対する 7 秒音刺激の反応を解析したところ、OFF 反応が ON 反応より有意に大きいことが判明した。また OFF 反応に先行して徐々にカルシウム濃度が増加するニューロンが記録された。

【考察】

我々は 7 秒間の長時間音刺激を用い、明確な OFF 反応を捉えることに成功した。OFF 反応のピークは、ON 反応で調べた聴覚野の領野とは明らかに異なる皮質部位に分布し、音の高さとは無関係であった。こうして発見された OFF 領域は音の時間的な情報処理に特化した領野の一つではないかと推測される。

長い音刺激の効果は 90 秒間持続するので、何らかの短期可塑性が OFF 反応に関与すると考えられる。NMDA 受容体拮抗薬である MK801 が OFF 反応を阻害したという結果は、この推測を裏付ける。二光子カルシウムイメージングの結果、幾つかのニューロンでは OFF 反応に先行して徐々にカルシウム濃度が上昇することが観察された。これは、抑制ニューロンへの興奮性入力に依存する短期抑圧で阻害され、その結果脱抑制が生じたとすれば説明できる。長い音刺激を与えることによって脱抑制が生じ、本来は抑圧されるはずの OFF 反応が抑圧されなくなり、長い音刺激に対する OFF 反応が記録されたと推定される。

審査結果の要旨

マウスの鳴き声は複雑な時間的構造を持ち、音の時間的な情報処理が重要となる。申請者は音の終了時点に生ずる OFF 反応に焦点をあて研究を行い、明確な OFF 反応を捉えることに成功した。OFF 反応の振幅が最も大きくなる位置は、ON 反応を用いて分類された一次聴覚野 (AI) の内側に局在した。また音の高さでは変化しなかった。次に 10 秒間の先行音刺激を与え、その 30 秒後に 1 秒間の刺激を行い測定したところ、明確な OFF 反応が記録され、その間隔を最長 90 秒まで延長しても OFF 反応が記録された。NMDA 受

容体阻害剤である MK-801 にて OFF 反応が抑制された。OFF 反応領域の 387 個の神経細胞に対する 7 秒音刺激の反応を解析したところ、OFF 反応が ON 反応より有意に大きいことが判った。以上、申請者 7 秒間の長時間音刺激を用いて明確な OFF 反応を捉えることに成功し、OFF 反応のピークが、ON 反応で調べた聴覚野の領野とは明らかに異なる皮質部位に分布すること、音の高さとは無関係であることを明らかにした。長い音刺激の効果は 90 秒間持続するので、何らかの短期可塑性が OFF 反応に関与すると考えられるが、NMDA 受容体拮抗薬である MK801 が OFF 反応を阻害したという結果は、この推測を裏付ける。これらに学位論文としての価値を有すると判断した。