

# 研究報告書

## 「聴覚神経回路での入力依存的な神経活動制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 久場 博司

### 1. 研究のねらい

我々の複雑な脳機能が発現するためには、神経回路機能が最適化され、維持されることが必要である。この過程で神経活動は重要な役割を担うことが示唆されているが、その詳細はまだよく分かっていない。脳神経回路の可塑性は二つに大別される。一つは、長期増強や長期抑圧と呼ばれる学習や記憶の発現に関与する可塑性であり、もう一つはその回路の定常性を維持しようとする可塑性である。後者は恒常的可塑性といわれ、回路の神経活動を適切なレベルに調節するよう働き、回路機能の最適化や維持に関わると考えられている。従来、これらの可塑性はシナプス伝達効率の変化によって生じると考えられてきた。我々は近年、神経細胞の軸索起始部 (axon initial segment, AIS) の分布が、神経回路への入力レベルに応じて変化するという新たな恒常的可塑性を見いだした。AIS は活動電位の発生部位であることから、この可塑性は神経活動を効果的に調節することが可能であり、神経回路機能の最適化・維持に深く関わる可能性が示唆される。従って、本研究では構造と機能が明確なトリ脳幹の聴覚神経回路を対象として、AIS に生じる恒常的可塑性の特性と分子機序、さらに機能意義を調べることにより、神経細胞における活動レベルの制御機構を理解するとともに、特定の神経回路機能が入力依存的に獲得され、維持される分子・細胞基盤を明らかにすることを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

トリの大細胞核 (nucleus magnocellularis, NM) は哺乳類の蝸牛神経核に相当する神経核であり、聴神経からのシナプス入力に対して正確なタイミングで活動電位を発生することにより音の時間情報のコードに関わる。これまで我々は、孵化後のヒヨコにおいて内耳除去により聴覚入力を遮断すると、NM の神経細胞では AIS が長くなり、膜興奮性が増すことを見いだした。このことは AIS 分布の入力依存的な変化が、恒常的可塑性として神経活動の調節に関わることを示している。神経活動は神経回路機能の最適化・維持に重要なことが知られている。従って本研究では、この AIS 可塑性が内耳障害時に NM 細胞の神経活動を亢進し、聴神経活動の消失を代償することで、聴覚中枢神経回路の構造と機能の維持に関わるという仮説のもと研究を行った。

AIS 可塑性の働きを理解するためには、その特性を明らかにする必要がある。従って、まず入力遮断による AIS 可塑性時に AIS の電気的特性がどのように変化するのか、また AIS 可塑性の表現型は細胞種、脳領域、さらに発達過程に応じてどのように異なるのかという点について検討し、以下のことを明らかにした。(1) NM 細胞では AIS 分布の延長に伴って Na チャネルのサブタイプや密度は変化しないのに対して、K チャネルの密度は

サブタイプ特異的に変化し、このことにより AIS 局所の膜電位と興奮性が巧妙に調節される（研究成果 5）。(2) NM 細胞の投射先である層状核（nucleus laminaris, NL）では、成熟期の AIS は聴覚入力の影響を受けないのに対して、発達期の AIS はその分布が最適化される過程で聴覚入力が必要な役割を果たす（研究成果 4）。一方、AIS 可塑性の分子機構については、薬理阻害や遺伝子導入の容易な培養実験系の確立を目指した。その結果、NM 細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い切片培養標本を得ることができ、さらに NM 細胞の自発神経活動を阻害することで AIS 可塑性を再現することに成功した。現在はこの系を用いて AIS 可塑性の誘導機構として細胞内 Ca 濃度変化に着目して解析を行っている。また、AIS 可塑性の機能意義としては、NM の神経活動が上位の神経回路の維持に関わる可能性を検討してきた。これまで NM 細胞を除去することにより NL 細胞へのシナプス入力を完全に消失させた場合、NL 細胞の樹状突起がほぼ消失することを明らかにした。

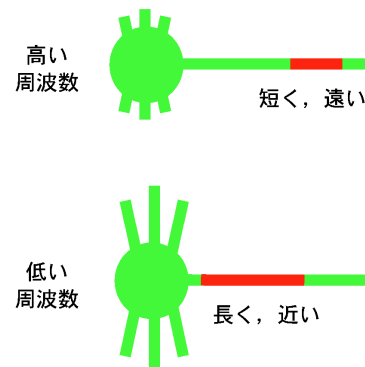
## (2) 詳細

### AIS 可塑性の特性 1（細胞種と時期特異性）

NL は哺乳類の内側上オリブ核に相当する神経核であり、両側の蝸牛神経核（大細胞核, NM）からの時間情報を統合することにより音源定位に関わる。これまで我々は、両側内耳を除去することによりこれら神経核へのシナプス入力を回路成熟後に遮断した場合、AIS の可塑性が NM では生じるのに対して、NL では生じないことを明らかにした。このことは AIS 可塑性の発現が神経核（細胞種）毎に異なることを示している。

一方、NL には周波数局在構造があり、高い特徴周波数をもつ細胞ほど高頻度のシナプス入力を受ける。さらに、NL では特徴周波数に応じて細胞の AIS 分布が異なる。すなわち、高い特徴周波数をもつ細胞ほど AIS は短く、細胞体から離れており、このことにより NL における正確な時間情報統合が可能となる。そこでさらに、この NL における AIS 分布の形成過程には入力依存的な AIS の制御機構が関わるののではないかと考え、NL 細胞の AIS 分布の発達過程とこの過程に対する聴覚入力の関与について検討を行った。

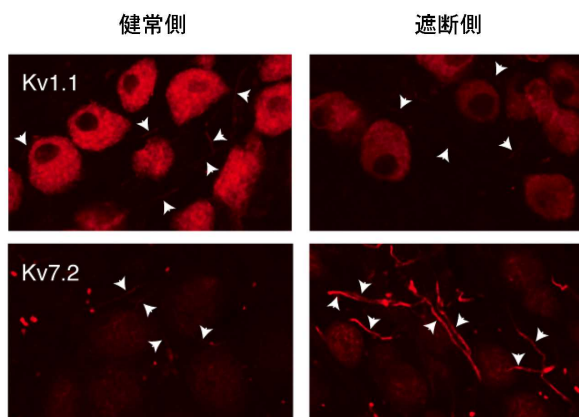
NL 細胞の AIS は、聴覚入力開始前には細胞体近くに長く分布し、その分布に特徴周波数による違いはみられなかった。一方、聴覚入力開始後からこの AIS 分布には特徴周波数に応じた変化がみられた。すなわち、AIS の長さは短縮し、かつ細胞体からの距離は延長し、これらの変化は高い特徴周波数をもつ細胞ほど大きかった。さらに、発生初期に聴覚原基を除去することで聴覚入力を遮断したところ、聴覚入力開始後にみられた AIS の短縮は抑制された。以上のことから、NL 細胞では AIS 可塑性に臨界期があり、この可塑性は特に発達期に AIS 分布を調節することで回路機能の最適化に関わることを明らかにした（研究成果 4）。



NL での特徴周波数に応じた AIS 分布の違い

## 可塑性の特性 2 (K チャンネルの変化)

AIS はその分布だけでなくその電気的特性も、細胞の興奮性に大きく影響する。従って、膜特性の重要な決定要因である K チャンネルに焦点を絞って、その AIS 可塑性に伴う発現変化を解析した。まず、NM 細胞の AIS では聴覚入力の遮断に伴って Kv1 が減少し、Kv7 は増加することを免疫染色により明らかにした。次に、各 K チャンネル成分の電流をパッチクランプ法により記録し、聴覚遮断



聴覚遮断によるNMでの相補的なKチャンネルの発現変化

断が Kv1 を介した電流成分を減少させるのに対して、Kv7 を介した電流成分は増加させることを明らかにした。さらに、聴覚遮断の膜興奮性に対する効果について調べ、以下のことを明らかにした、(1) 聴覚遮断後の NM 細胞では活動電位の閾値が低下し、膜興奮性が増加する。(2) 聴覚遮断後の NM 細胞でみられる自発神経活動の頻度は、Kv7 を活性化させると減少し、Kv7 を阻害すると増大する。(3) 二光子レーザー顕微鏡観察下に AIS への薬剤の局所投与を行なうと、Kv7 の阻害剤は聴覚遮断後の細胞でのみ活動電位の閾値を低下させるのに対して、Kv1 の阻害剤は聴覚遮断前の細胞でのみ閾値を低下させる。Kv1 は活性化の閾値が低く、速度も速いため、Kv7 に比べて活動電位の発生を抑える効果が強い。つまり、これらの結果は、聴覚遮断時に NM 細胞が AIS での K チャンネルを、Kv1 から Kv7 に変化させることで膜興奮性を高めていることを示している。さらに、コンピューターモデルによる解析を行った結果、これら K チャンネルの相補的な発現変化は、AIS の静止膜電位を維持しつつ、AIS の延長と協調することで効果的に興奮性を高めるしくみとして働くことを明らかにした (研究成果 5)。

## AIS 可塑性の分子機構

AIS 可塑性の誘導因子や分子経路の同定を効率的に行なうために、培養実験系の確立を目指した。特に AIS は細胞接着因子 (NrCAM, NF186) を介して周囲の細胞外基質と結合しているため、細胞外環境が比較的保たれている切片培養標本の作製を行なった。様々な培養条件を検討した結果、NM 細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い標本を得ることができた。この切片培養標本の NM 細胞では、発火や膜電流の特性は生体内でみられるものと同様であり、さらに約 20Hz の自発神経活動がみられることを確認した。この神経活動はグルタミン酸受容体の阻害剤である DNQX で阻害されることから、興奮性のシナプス入力により生じていると考えられる。そこで、さらにこの自発神経活動を阻害することの AIS 長に対する効果を調べたところ、生体内で聴覚遮断時にみられるのと同様な AIS の延長を観察することができた。この結果は、AIS 可塑性が NM 細胞での脱分極 (シナプス電位、活動電位) の消失により生じる可能性を示している。脱分極の消失は Ca チャンネルの活性化を減弱させると考えられる。従って、現在は自発神経活動時

の細胞内 Ca イオン濃度の時空間分布についての検討を行っている。

### 3. 今後の展開

切片培養標本を用いた AIS 可塑性の分子機構の解析を継続する。特に Ca チャネルの阻害剤を含めた種々の薬理学的解析を行うことで、AIS 可塑性の誘導因子と下流の分子経路を検討する。薬理学的解析により明らかになった候補分子については、電気穿孔法を用いた shRNA 導入によるノックダウンを行なうことで、その関与を検証する。AIS の遠位端の位置決定には、ankyrinG と ankyrinB の発現量の相対的なバランスが重要だという報告がある。従って、可塑性の発現前後でのこれら分子の発現量と細胞内局在を調べるとともに、その活動依存性との関係についても検討する。さらに、vitro で得られた知見を vivo でも検証することで、聴覚神経回路での活動依存的な AIS 制御のしくみと役割を明らかにする。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

これまで、AIS 可塑性の特性については、いくつかの重要な知見を得ることができた。一方、AIS 可塑性の分子機構については、主に培養実験系の確立と AIS の可視化手法の改善を行ってきたが、AIS 可塑性の誘導因子や分子経路を同定するには至っていない。しかし、実験遂行のための環境は整ったため、今後も研究を継続することにより大きな進展が得られると考えている。また、音入力との関係を含めて AIS 可塑性の生体内での役割についての理解も十分に進んでいない。例えば、これまでの AIS 可塑性は内耳除去により全周波数帯域の聴覚入力を遮断することを行ってきたが、音響障害や薬剤などによる感音性難聴では特定の周波数領域のみが障害されることが知られている。また、感音性難聴時には耳鳴りを発症することも知られている。従って、今後さらに、音響障害により特定の周波数領域の内耳を選択的に障害することの効果や、耳鳴りに対する AIS 可塑性の関与を調べることで、AIS 可塑性の生理意義を明らかにしたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経回路において神経情報を搬送する活動電位は神経細胞軸索の付け根にあたる軸索起始部(AIS)において発生するが、その部位の微細構造が活動電位発生の調節・制御にどのように関わるかは明らかでなかった。本研究は、ヒヨコ脳幹にあって聴覚入力の要である大細胞核(NM)と音源定位に関わる層状核(NL)に着目し、内耳除去等の処置・スライス培養系の確立などにより、NM 神経細胞の AIS では K チャネルサブタイプの変化により膜電位と興奮性が巧妙に調節されていること、また NL 神経細胞 AIS の最適化には発達途上臨界期の聴覚入力が必要であることを見出した。さらに免疫細胞組織学的解析とパッチクランプ法により、この AIS 可塑性における K チャネルの 2 サブタイプの役割を解明し、かつスライス培養系の改良により、



薬理的に AIS の可塑性を誘導できることを見出した。これらの独創性の高い成果は神経回路の機能維持に重要な恒常的可塑性の分子基盤の理解に大きく貢献するものである。研究成果は適宜論文発表している。今後、AIS 可塑性を誘導する分子機構の解明と生体脳における検証が進展し、聴覚系以外の神経回路への敷衍、さらに恒常的可塑性に関わる神経疾患病理への手がかりにつながることを期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Taruno A, Ohmori H, Kuba H Inhibition of presynaptic Na(+)/K(+)-ATPase reduces readily releasable pool size at the avian end-bulb synapse. <b>Neurosci. Res.</b> 2012. 72: 117-128.
2. Yamada R, Okuda H, Kuba H, Nishino E, Ishii TM, Ohmori H The cooperation of sustained and phasic inhibitions increases the contrast of ITD-tuning in low-frequency neurons of the chick nucleus laminaris. <b>J. Neurosci.</b> 2013. 33: 3927-3938.
3. Okuda H, Yamada R, Kuba H, Ohmori H Metabotropic glutamate receptors improves the accuracy of coincidence detection by presynaptic mechanisms in the nucleus lamirnaris of the chick. <b>J. Physiol. (Lond.)</b> 2013. 591: 365-378.
4. Kuba H, Adachi R, Ohmori H Activity-dependent and activity-independent development of the axon initial segment. <b>J. Neurosci.</b> 2014. 34, 3443-3453.
5. Kuba H, Yamada R, Ishiguro G, Adachi R Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity. <b>Nat. Commun.</b> 2015. 6:8815.

### (2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 英文総説

1. Grubb MS, Shu Y, Kuba H, Rasband MN, Wimmer VC, Bender KJ  
Short- and long-term plasticity at the axon initial segment.  
**J. Neurosci.** 2011. 31: 16045-16055.
2. Kuba H  
Structural tuning and plasticity of axon initial segment in auditory neurons.

**J. Physiol. (Lond.)** 2012. 590: 5571-5579.

3. Adachi R, Yamada R, Kuba H

Plasticity of the axonal trigger zone.

**Neuroscientist** 2015. 21, 255-265.

4. Susuki K, Kuba H

Structural tuning and plasticity of axon initial segment in auditory neurons.

**J. Physiol Sci.** in press.

#### 和文総説

1. 久場博司

軸索起始部による聴覚回路機能の制御

日本神経精神薬理学雑誌, 2014. 34, 87-92.

#### 学会発表

1. Kuba H

Homeostatic regulation of axon initial segment in an avian auditory neuron

Neuroscience meeting 2011, 2011.11.15, Washington DC

2. 久場博司

中枢聴覚神経回路における恒常的可塑性機構

第 37 回日本神経科学大会, 2014. 9. 12, 横浜

3. 久場博司

聴覚神経回路における軸索興奮制御

第 120 回日本解剖学会総会・第 92 回日本生理学会大会, 2015. 3. 2, 神戸