

## 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 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791593

研究課題名（和文） 音声認識機構を脳幹で解明する

研究課題名（英文） Neural Circuit in the Auditory Brainstem

研究代表者

瀧 公介（TAKI KOUSUKE）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：20359772

研究成果の概要（和文）：

聴覚特異的な作動原理を下位聴覚中枢である下丘の神経回路に着目して明らかにしようとする戦略で、シナプス特異的タンパクである小胞性グルタミン酸トランスポーターとトレーサーによるシナプス前後の特異的神経回路標識を組み合わせニューロンレベルでの神経回路形成を可視化した。シナプス前成分の標識法としてシンドビスウイルスによる感染実験系を立ち上げ、観察された大脳皮質の特定聴覚領域から下丘腕核や下丘背側皮質・外側皮質への濃密で特徴的な投射パターンに対し数理的解析法の開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Auditory specific mechanism of neuronetwork is searched for through visualization of synapse formation in inferior colliculus with pre-and-post synaptic element by tracer technique and synapse-specific proteins, vesicular glutaminase transporters. Sindbis virus vector mediated GFP induction as a trial for presynaptic labeling revealed remarkable projection from auditory neocortex into nucleus brachium of inferior colliculus and dorsal or external cortex of inferior colliculus with notable pattern, which is now mathematically analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学・中枢

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 視覚に対して聴覚のシステムの理解は遅れており、その理由は視覚に比べて複雑な下位構造にあると考えた。この聴覚伝導路の下位中枢である下丘の神経回路網と動作原理が明らかにされることが聴覚情報処理の解

明にとって重要であると考えられる。

(2) 神経回路の実態はニューロン間のシナプス形成にあるが、シナプス特異的に分布するタンパク質として小胞性グルタミン酸トランスポーターが見つかっており、その標識によってシナプス形成パターンを組織学的に

可視化することが可能になった。

(3) シンドビスウイルスによって改変 GFP 遺伝子を導入・発現させることにより驚くべき高効率で神経軸索の標識・可視化を行う技法が確立されていた。

## 2. 研究の目的

(1) シナプス前要素・シナプス後要素・シナプスマーカーの3重染色によるシナプス形成パターンの可視化を用いた神経回路分析手法の開発。

(2) (1)において、シナプス前要素として大脳皮質から下丘における投射成分を適用し、聴覚情報処理におけるトップダウン的な要素を解析する。ボトムアップとトップダウンの双方向性結合が感覚系におけるニューロンの学習において重要であることが理解されている。

(3) シナプス前要素・シナプス後要素についてさまざまな組み合わせで網羅的に情報を収集し、下丘における神経回路の全体像を明らかにする。シナプスの数や分布様式から、特定の神経要素間の影響力を個別に推定することができる。

(4) 情報系研究室などとの共同研究により、あきらかになった解剖学的特徴の情報処理上の意義について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) シナプス前要素・シナプス後要素・シナプスマーカーの3重染色によるシナプス形成パターンの可視化を行う。シナプス前要素はすなわち下丘に入力するボトムアップ・トップダウンの要素であり、前者としては蝸牛神経核や上オリーブ核群が、後者としては大脳皮質聴覚関連皮質からの下行性投射があげられる。シナプス後要素はすなわち下丘のニューロンであり、投射ニューロンは逆行性トレーサーによる標識で、GABAなどのマーカー分子をもつグループはマーカーに対する免疫染色で標識できる。シナプスの存在を確認するためのシナプスマーカーとして小胞性グルタミン酸トランスポーターを用いる。

(2) シナプス前要素としてまずはトップダウン的な情報を運ぶと考えられる大脳皮質聴覚関連皮質からの下行性投射を選び、その下丘内軸索が下丘投射ニューロンとの間で形成するシナプスパターンを蛍光3重標識ののち共焦点レーザー顕微鏡による3D撮像で可視化・解析する。標識された下丘ニューロンの細胞体周囲で形成される皮質からの入力シナプスの分布について解析する。

(3) シナプス前要素となる軸索成分の標識にはとりわけ高い効率が求められ、従来法のトレーサー分子ではシナプス形成部位まで標識できるか不安がある。従来法の順行性トレーサーによる投射線維の軸索標識が不十

分だった場合、シンドビスウイルスを感染させ改変 GFP 遺伝子を導入する感染実験系を立ち上げる。シナプス後要素としては内側膝状態への逆行性トレーサー注入で下丘投射ニューロンを標識するが、その他の選択肢についても情報収集する。

(4) 撮像後の画像データに関しては MATLAB 等のプログラミングを用いた自動化や、神経線維やシナプスの空間的分布に対する統計解析手法の開発を試みる。

## 4. 研究成果

(1) 最終的に申請研究計画の中核をなす3重染色によるシナプス形成パターンの可視化には成功し、2013年度の神経科学会で発表予定になった。しかし後述のようにシナプス前要素の標識効率についての問題解決と、付加的・発展的成果に対する研究活動の為に当初の予定よりは遅れたが、データが集積した時点で学術雑誌への投稿を予定している。

(2) シナプス前要素の標識について従来法の順行性トレーサーによる投射線維の軸索標識では不十分であったため、シンドビスウイルスの感染実験系を当大学に導入し、レポーター遺伝子として導入した改変 GFP による標識を行った。その結果得られた軸索分布の像は、従来法の標識法にくらべ少数のニューロンに由来する軸索成分だけが明瞭に染色されており、ターゲットとなる神経組織の隠れた微細構造について示唆を与えるようなものになった。そこで、その空間的統計解析により軸索分布の見られた下丘腕核の微細構造について解析する試みを行い、その途中経過は2012年の新学術領域（上皮管腔組織形成）のトークセッションで「神経上皮内の投射線維に対する数理解析の試み」として発表された。また、画像データ解析や聴覚情報処理の理論研究に助力を得るため京都大学情報学研究科との協力関係を作り、この数理解析においても Hough 変換を利用した特徴抽出というアイデアを提供され興味深い結果を得ている。

(3) 前項のように協力関係を持った京都大学情報学研究科の超音波デバイスに対するビームフォーミング理論の応用研究において、神経解剖学のみならず解剖実習を担当する講座として保持する総合的な形態学のノウハウをもって協力し、生体材料を用いた実証・評価系の構築などを行った。これは周波数領域干渉計法と呼ばれる信号処理法を超音波のデータに適用して超解像度を得ようとするものだが、理論的にいくつかのハードルの存在が指摘されていたが、いくつかの革新的な処理段階を導入してブレイクスルーに成功した物である。この理論と実証の一貫した研究の成果は該当領域である医工学分野の国際的リーディングジャーナルに掲載

され高い評価を受けており、またいくつもの発展的および実用化研究につながっている。(4) (2)で述べたシンドビスウイルスベクターによる皮質下丘投射の標識では、特定皮質領域から特に多くの下行性投射が下丘腕核および下丘外側皮質・背側皮質に対して見られることがわかった。これらは従来聴覚情報の主たる中継路を形成する下丘中心核の周囲に位置するが、これらの部位が中枢性耳鳴の発生機序において大きな役割を果たしている可能性が指摘されるようになった。逆に下丘中心核については十分多くの投射線維の標識を得ることが難しいため、現在ではこれら下丘周辺領域でのトップダウン情報入力様式の解析に切り替えていると同時に、この領域のニューロンの化学的性質について解析を進めている。

#### 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 3 件)

- ① Kousuke Taki, Hirofumi Taki, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Toru Sato and Motoi Kudo, Performance evaluation of high-resolution ultrasound imaging methods for practical use in conventional device, Proc. Auditory Res. Meeting, The Acoustical Society of Japan, 査読無, Vol. 43, No. 3, 2013, pp. 161-167
- ② Kousuke Taki, Motoi Kudo, Yoshinari Aimi, Satoru Honma, Fuduki Inoguchi, Tomoko Kimura and Miki Nishimura, Golgi like staining of corticofugal axon terminals in the auditory brainstem of the rat, Proc. Auditory Res. Meeting, The Acoustical Society of Japan, 査読無, Vol. 42, No. 3, 2012, pp. 299-301
- ③ Hirofumi Taki, Kousuke Taki, Takuya Sakamoto, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Motoi Kudo and Toru Sato, High range resolution ultrasonographic vascular imaging using frequency domain interferometry with the Capon method, IEEE Trans Med Imaging, 査読有, 2012, Vol. 31, No. 2, pp417-429.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Hirofumi Taki, Takuya Sakamoto, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Toru Sato, Kousuke Taki and Motoi Kudo, Real-time high-resolution imaging method with accurate intensity estimation

technique for vascular ultrasound imaging, IEEE US 2013(2013 IEEE-UFFC joint symposia), 2013, July 21-25, ブラハ (ハンガリー)

- ② Hirofumi Taki, Takuya Sakamoto, Kousuke Taki, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Motoi Kudo, Toru Sato, Real-time high-resolution vascular ultrasound using frequency domain interferometry with the ROI-division process, 2013, July 3-7 大阪市
- ③ Motoi Kudo, Satoru Honma, Aimi Yoshinari, Kousuke Taki, Jun Utagawa, Ring formation of the internal iliac artery: a risk for pelvic bleeding control, European joint congress of clinical anatomy 2013, 2013, June 26-29, リスボン (ポルトガル)
- ④ 瀧 公介, 相見 良成, 井之口 文月, 木村 智子, 西村 美紀, 本間 智, 工藤基, 聴覚関連領域からの下行性投射系の形態学的解析, Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会), 2013 年 6 月 20 日~23 日, 京都市
- ⑤ 井之口 文月, 瀧 公介, 玉川 俊広, 木村 智子, 西村 美紀, 本間 智, 工藤基下丘外側皮質から視蓋前域-中脳網様体への投射, Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会), 2013 年 6 月 20 日~23 日, 京都市
- ⑥ 井之口 文月, 瀧 公介, 木村 智子, 西村 美紀, 玉川 俊広, 本間 智, 松田 和郎, 工藤 基, 聴覚伝導路は 2 つのシステムからなる: 下丘外側核から視蓋前域-中脳網様体への投射, 第 118 回日本解剖学会全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日~30 日, 香川県高松市
- ⑦ 井之口 文月, 木村 智子, 西村 美紀, 玉川 俊広, 本間 智, 瀧 公介, 工藤基, Dual system of ascending auditory pathways: Projection from external nucleus of inferior colliculus to pretectum and midbrain reticular formation, The 17th Auditory Research Forum, 2012 年 12 月 8 日~9 日, 滋賀県大津市
- ⑧ 瀧 公介, 相見 良成, 井之口 文月, 木村 智子, 西村 美紀, 本間 智, 工藤基, ラット大脳皮質聴覚野後背側領域からの下行性投射軸索終末の解析, Neuro2012 (第 35 回日本神経科学大会), 2012 年 9 月 18 日~21 日, 名古屋市
- ⑨ Hirofumi Taki, Takuya Sakamoto, Kousuke Taki, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Motoi Kudo and Toru Sato, High-resolution vascular ultrasound imaging for accurate

measurement of carotid intima-media thickness, ESC2012, 2012, Aug 25-29, ミュンヘン (ドイツ)

- ⑩ 瀧 公介, 相見 良成, 井之口 文月, 木村 智子, 西村 美紀, 本間 智, 工藤基, Axon terminals of the cortico-collicular projection in the rat auditory system, 第117回日本解剖学会全国学術集会, 2012年03月26日~28日, 山梨県甲府市
- ⑪ Hirofumi Taki, Takuya Sakamoto, Kousuke Taki, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Motoi Kudo and Toru Sato, High range resolution ultrasound imaging of a human carotid artery using frequency domain interferometry, IEEE International Ultrasonics Symposium 2011, 2011, Oct 18-21, オランダ (アメリカ、フロリダ州)
- ⑫ 瀧 宏文, 瀧 公介, 阪本 卓也, 山川 誠, 椎名 毅, 工藤 基, 佐藤 亨, 周波数領域干渉計法を用いた医用超音波血管イメージング法の血管壁境界描出能, 日本超音波医学会第84回学術集会, 2011年5月27日~29日, 東京都
- ⑬ Hirofumi Taki, Kousuke Taki, Takuya Sakamoto, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, and Toru Sato, High Range Resolution Ultrasonographic Vascular Imaging with Frequency Domain Interferometry, 32nd Annual International Conference of the IEEE EMBC, 2010, Aug 31-Nov 4, ブエノスアイレス (アルゼンチン)
- ⑭ 瀧 宏文, 瀧 公介, 阪本 卓也, 山川 誠, 椎名 毅, 佐藤 亨, 周波数領域干渉計法とCapon法を用いた超音波B-mode像の高空間分解能化, 日本超音波医学会第83回学術集会, 2010年5月29日~30日, 京都市

[図書] (計1件)

瀧 宏文, 山川 誠, 椎名 毅, 佐藤 亨, 瀧 公介, 工藤 基, 周波数領域干渉計を用いた超音波イメージング法における適切な周波数平均幅=周波数平均に用いる帯域幅と推定電力精度=, 超音波テクノ, 2012, 4

[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

<http://www.shiga-med.ac.jp/db/pub>

\_top.php

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀧 公介 (TAKI KOUSUKE)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20359772