

耳鳴りの脳内発生機構を明らかにし、根治につなげる

金沢医科大学 医学部 解剖学Ⅱ

准教授 伊藤 哲史

(共同研究者)

金沢医科大学 医学部 生理学Ⅰ 准教授 小野 宗範

はじめに

加齢に伴い耳鳴りを訴える人が増える。原因は完全に解明されているわけではないが、内耳に由来する感音性難聴に伴う中枢神経系における病的な可塑的变化であると考えられている。耳鳴りをきたしているヒトやネズミで、中枢聴覚神経経路の上位の神経核である下丘および内側膝状体における抑制性伝達物質が減少していることが報告されており (Brozoski et al., 2012 など)、聴覚神経回路における興奮-抑制のバランスの乱れが耳鳴りの原因であると考えられるが、その詳細はわかっていない。下丘では、抑制性神経細胞は大型と小型の2種類に分けられ、前者は下丘と内側膝状体の両方に軸索を伸ばし、両者の神経活動を抑制する働きをもつ。耳鳴りモデル動物で下丘と内側膝状体での抑制性伝達物質が減少していることから、大型抑制性細胞の活動性を高めることができれば耳鳴りを抑えることができると考える。しかしながら、大型抑制性細胞に特異的に発現する分子マーカーがわかっていないことから、細胞特異的な介入を実験的・臨床的に行う方法が確保されていない。そこで本研究はまず下丘抑制性細胞の特異的なマーカーを同定し、遺伝子ツールをもちいて大型抑制性細胞依存的な神経活動のリアルタイム制御を行うことを目指した。

結 果

実験1：大型抑制性細胞特異的なマーカーの絞り込み及び確認

Allen Brain Atlas (www.brain-map.org) のデータベースで、下丘において特徴的な発現を示す遺伝子が48あることが判明した。まず、これらの中で、大型の細胞に選択的に発現している遺伝子を12まで絞り込んだ。これら遺伝子に対する特異的なin situ hybridization プローブを作成し、抑制性伝達物質GABA合成酵素のGAD67との2重in situ hybridizationを行った。このうち抑制性ニューロンとの共存が明確な3遺伝子についての結果を図1に示す。すべての遺伝子について、GAD67とのほぼ完全な発現の一致が見られた。すなわち、これらの遺伝子は下丘における抑制性ニューロンのマーカーとして役に立つことが強く示唆された。一方で、大型抑制性ニューロンに選択的な発現を示す遺伝子を同定することはできなかった。

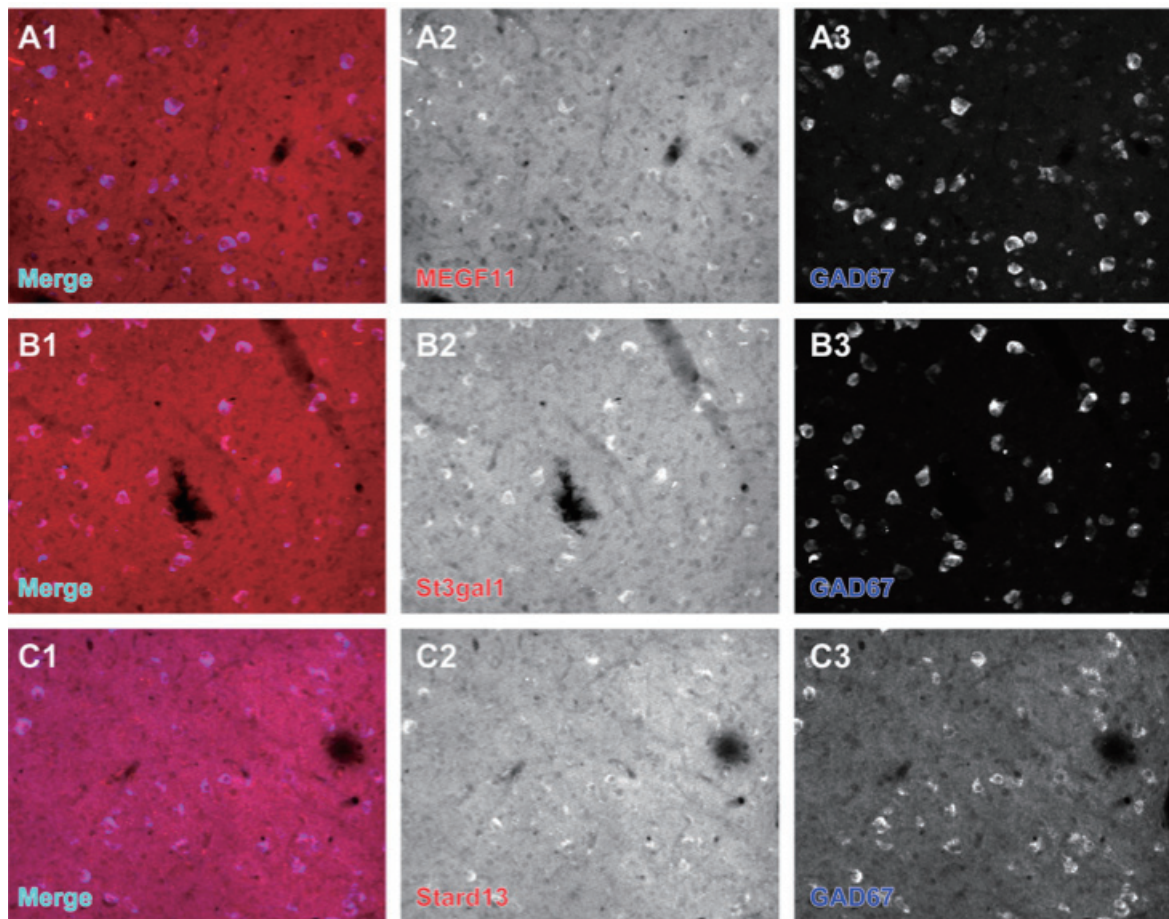


図1：データベース検索から絞り込んだ3遺伝子mRNAの下丘中心核における発現パターン。縦2列目が候補遺伝子の発現、3列目がGAD67遺伝子の発現、1列目が両者の合成である。これら3遺伝子はGAD67遺伝子とほぼ一致した発現パターンを示しており、下丘における抑制性ニューロンの特異的マーカーとして利用できることを強く示唆している。

実験2：聴覚系特定神経経路選択的遺伝子導入及び細胞除去方法の開発

実験1の結果から、細胞種特異的遺伝子の同定とその遺伝子を標的とした神経活動調節は実験期間内での実現が困難になった。そこで、同様の機能を有する別の技術を開発することとした。

大脳皮質の聴覚野には複数のサブ領域が存在することがわかっていて、それぞれのサブ領域は異なる音情報の処理に対応していると考えられている。マウスでは、このうち、4領域が鋭い周波数選択性を持っていることがわかっている。これら4領域は下丘から内側膝状体を経由して入力を受けており、異なる領域が下丘の異なる部位・細胞種から入力を受けることが示唆されている。耳鳴りでは、下丘の特定周波数領域の神経活動が亢進することがわかっているため、耳鳴りで活動亢進している周波数領域を聴覚野で同定した上で、この領域を最終目的地とする下丘神経細胞に限定して神経活動を減少させることができれば、耳鳴りの症状を緩和することが期待され、本研究の当初の目的に合致する。

聴覚野のサブ領域を同定する方法として、経頭蓋フラビン蛍光イメージング (Shibuki et al., 2003) を利用する。これは頭皮を切開するだけで頭蓋骨を介して脳活動を計測する方法であり、ほぼ無侵襲であるため、従来の電極を用いた方法に比べ実用上有用である。

特定神経経路依存的に遺伝子導入する方法として、retrograde AAVベクターによる遺伝子導入が利用されているが、これは注入領域に入力する神経細胞を標識するにとどまる。聴覚野に下丘は直接入力しないので、この方法は利用できない。そこで、機能イメージングで聴覚野サブ領域を同定した後、そこにretroAAVベクターを注入し、内側膝状体を標識した後、標識内側膝状体ニューロンにシナプス入力する下丘細胞を組換えrabiesベクターを用いて標識する方法を考案した。

経頭蓋フラビン蛍光イメージング同定した領域の1つに、rgAAV-Ef1a-Cre ウイルスを微量注入すると、この領域に投射するニューロンが逆行性感染を起こし、Creリコンビナーゼを発現する。次に、内側膝状体にAAV8-FLEX-TVA-2A-eGFP-2A-oG ウイルスを注入する。感染ニューロンのうち、Creリコンビナーゼを発現する、つまり特定の聴覚野領域に投射する内側膝状体ニューロンのみが鳥ウイルス受容体TVAと緑色蛍光タンパクeGFPと狂犬病ウイルスグリコプロテインoGを発現する。2週間待ち、感染ニューロンにTVAが十分発現してから、EnvA G-deleted Rabies mCherryを内側膝状体に注入する。TVA受容体を発現する細胞のみがRabiesウイルスに感染し赤色蛍光タンパクmCherryを発現するとともに、ウイルス粒子を産生する。この際グリコプロテインの補充を受けることで、このウイルス粒子は逆行性シナプス超え能力を得る。これによって、感染ニューロンに直接シナプス入力する細胞がmCherryを発現する。結果として、聴覚野の特定の領域に投射する内側膝状体細胞群はGFPで標識され、それらに入力する下丘の細胞（及びその他の神経核の細胞）がmCherryで標識される。図2は正常マウスにてこの実験を実施した例であり、想定通り一部の

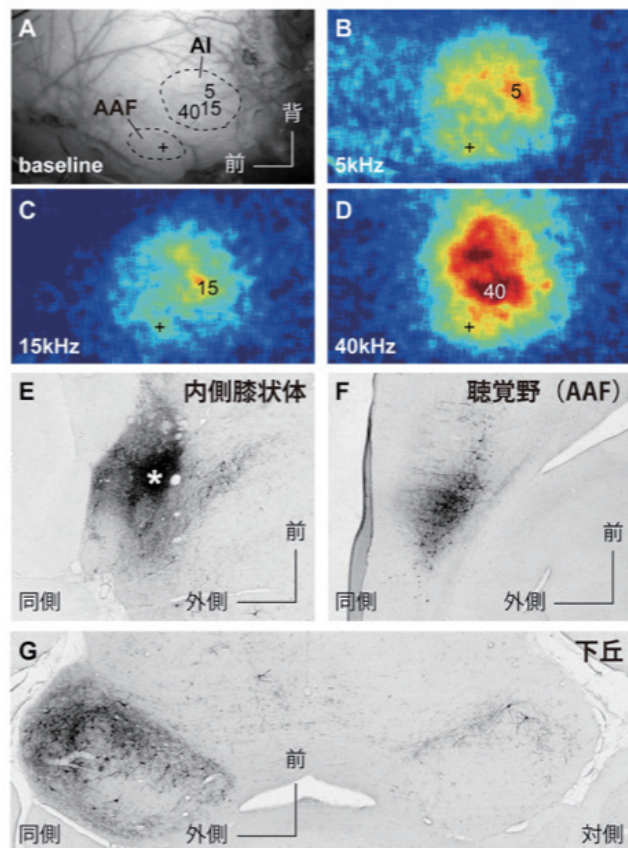


図2：神経経路特異的遺伝子導入方法。(A-D)フラビン蛍光イメージング。B-Dは音刺激開始後0.5秒の蛍光差分像。数字は各刺激周波数で最大活動を示した領域、+はrgAAV-Ef1a-Creを注入した部位。(E-G) 同一個体のmCherry免疫染色水平断切片。内側膝状体(E)の*にEnvA G-deleted Rabies mCherryウイルスを注入。(A-D)の+を最終目的地とする、聴覚野(AAF)や下丘の細胞が標識された。

丘ニューロンが標識された。つまり、ここで考案した経路特異的下丘ニューロン遺伝子導入法はうまく機能することがわかった。

考 察

実験1で同定した抑制性ニューロン特異的遺伝子の利用方法として、トランスジェニックマウスの作成が考えられる。GAD67遺伝子標的として外来遺伝子を導入するトランスジェニックマウスはGAD67遺伝子との発現一致度が低いことや、GAD67遺伝子を1つ除去してそこに外来遺伝子を挿入するノックインマウスはGABA生産量が低下するなど、様々な問題点が示されていた。実験1で同定した遺伝子に対するトランスジェニックマウスを作成することで、GAD67遺伝子そのものを標的とするより精度の高い外来遺伝子発現を行える可能性がある。

実験2で開発した技法の今後の展望として、神経経路特異的神経活動抑制が考えられる。Rabiesベクターで標識された標識細胞は10日程度で機能停止することが報告されている(Reardon et al., 2016)。つまり、耳鳴りで活動亢進している周波数領域を最終目的地とする下丘神経細胞に限定してrabiesベクターを導入すれば、下丘における耳鳴り周波数に該当した神経活動を減少させることができると考えられる。今後は耳鳴りモデル動物を作成し、それに対して実験2で開発した方法を適用し、神経活動を調節できるか検討する。

要 約

耳鳴りでは下丘の特定周波数領域の活動が亢進している。本研究ではまず、下丘における神経活動を抑えるために抑制性ニューロンに選択的な遺伝子マーカーの同定を試みた。抑制性ニューロンに特徴的に発現する遺伝子の同定に成功したものの、抑制性ニューロンの詳細な分類に対応したマーカーは見つけられなかった。そこで、本研究では次に、低侵襲機能イメージングと複数の遺伝子導入ベクターを組み合わせることで、下丘の特定周波数領域の神経細胞集団に選択的に遺伝子導入を行う方法を開発した。今後の展開として、耳鳴りモデル動物に対して本方法を適用し、耳鳴りに対応して亢進した神経活動を調節することが考えられる。

文 献

研究代表者を下線で、共同研究者を二重下線で、責任著者を*で示す。

1. Ito T*, Yamamoto R, Furuyama T, Hase K, Kobayashi KI, Hiryu S, Honma S. Three forebrain structures directly inform the auditory midbrain of echolocating bats. *Neurosci Lett*. 2019 Sep 5;134481. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134481. (2019) (原著論文)

2. Ono M*, Ito T. Inhibitory Neural Circuits in the Mammalian Auditory Midbrain. J Exp Neurosci. 2018 Dec 12;12:1179069518818230. doi: 10.1177/1179069518818230 (2018) (総説)
3. Ito T*, Furuyama T, Hase K, Kobayasi KI, Hiryu S, Riquimaroux H. Organization of subcortical auditory nuclei of Japanese house bat (*Pipistrellus abramus*) identified with cytoarchitecture and molecular expression. J Comp Neurol. 2018 Dec 1;526(17):2824-2844. doi: 10.1002/cne.24529. (2018) (原著論文)
4. Ito T*, Ono M, Oliver DL Neuron Types, Intrinsic Circuits, and Plasticity in the Inferior Colliculus. In: The Oxford Handbook of the Auditory Brainstem Oxford University Press ISBN:9780190849061 2018年12月 (著書)
5. 伊藤哲史* 聴覚求心路と遠心路 生き物と音の事典 ISBN978-4-254-17167-9 2019年10月 (著書)