

Nicotinic regulation of tone-evoked flavoprotein autofluorescence responses and neural circuits of thalamorecipient layers in mouse auditory cortex

マウス聴覚野における音誘導フラビンタンパク質自家蛍光応答と
視床・皮質系入力層神経回路のニコチン性制御

学籍番号：17D5601 氏名：中西誠 指導教員：川井秀樹

SYNOPSIS

Systemic nicotine administration regulates neuronal activities in mouse auditory cortex but how nicotine regulates the spread of the activities across auditory cortical areas is not well known. We investigated this phenomenon by using flavoprotein fluorescence imaging. Nicotine exposure expanded the activated area and enhanced sound-evoked fluorescence intensity at optimal frequency peak site in AI. Intracortical administration of DH β E, an inhibitor of nicotine acetylcholine receptors composed of α 4 and β 2 subunits (α 4 β 2*-nAChR), blocked nicotine-induced enhancement in the fluorescence intensity peak site, but it did not affect to the expansion of activated area.

In the primary auditory system, acute nicotine exposure is known to induce sensory filtering to synchronize thalamocortical axon excitability and increase synaptic activity in AI. However, cell type and mechanism of nicotinic regulation remains unclear. We prepared *in vitro* auditory thalamocortical slice and investigated reduction of thalamocortical-induced action potentials in excitatory neurons in the thalamorecipient layer in AI. Moreover, we revealed a reduction in thalamocortical input to fast-spiking (FS) inhibitory cells, but not significant reduction in direct inhibitory postsynaptic potentials (IPSCs) onto cortical excitatory cells. Additionally, thalamocortical induced excitatory and inhibitory balance shifted towards excitatory dominance. These results suggest that nicotine exposure reduced cortical circuit activity but consequently increase excitatory dominance.

Keywords:

Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), Auditory cortex, Sensory filtering, Flavin autofluorescence imaging

1. 緒言

本研究の主題は、マウス一次聴覚皮質 (AI) におけるニコチン性制御機構の解明にある。これまで、ニコチンの受容体であるニコチン性アセチルコリン受容体 (Nicotinic acetylcholine receptor: nAChR) が認知機能、学習・記憶、または不安や恐怖、報酬といった高次機能においても重要な役割を果たしていることが解明されてきた。ニコチン性認知機能向上に関するいくつかの論文では、音の認知がニコチンによって増強され、注意・集中のメカニズムの一つである可能性が示唆されたが、そのプロセスは非常に精密であり、音という複雑な情報をいかに脳が処理するかといった基礎的な理解にも繋がるものであった。この認知機能向上に対するニコチン性制御が注意・集中のメカニズムのモデルとして重要であると考え、2つのアプローチで本研究に取り組んだ。

マウス AI においては、ニコチンがある周波数音に対する応答の増大と、その音から離れた周波数を持つ音の応答の低下が起こることが知られ、シグナル・ノイズ比を向上させるこの神経情報制御の仕組みは、ニコチン性フィルター機構 (Nicotinic filtering) と呼ばれている。本研究ではまず、これまで局所的な電気生理学的測定によって明らかにされてきたこの機構の可視化を試みるため、神経活性の挙動を非侵襲的かつ空間的に捉えることのできるフラビンタンパク質自家蛍光イメージング (Flavoprotein autofluorescence imaging: FAI) を用い、Nicotinic

filtering における神経活性の強度と伝播を測定した。また、このフィルター機構は、視床から AI の主な入力層である第 3/4 層への入力において、nAChR が、投射経路の軸索活性の同期化を引き起こし、皮質応答を増強させることが知られているが、nAChR を介した皮質内制御に関与する細胞や機構など、特に、感度調整に関わるとされる抑制性介在ニューロンへの関与に関しては未だ明らかにされていない。nAChR を介した細胞活性の同期化や局所神経回路における抑制性細胞によるフィードフォワード抑制、脱抑制機構などが知られており、それらの機構が Nicotinic filtering に関与する仮説を立て、Auditory thalamocortical (TC) slice を作成し、検証を行った。

2. マウス聴覚野における音誘発性神経活性と活性化領域の皮質内および皮質下ニコチン性制御

背景・目的

全身性ニコチン曝露は、健常者の非喫煙者における聴覚認知機能の増強を引き起こすことが知られている [1-2]。このニコチン誘導性知覚増強は、注意・集中のフィルターシステムの向上を促す薬剤効果によって引き起こされる [3-6]。AI では、注意・集中は、あるタスクに関連しない音への応答を抑制すると共に、タスクに関連する音への応答を強化することで、周波数チューニングを強化していることが明らかになっている [7-8]。また、注意・集中は、二次聴覚皮質

[9]、および聴覚連合領域[10]においても音誘発性反応の増強を引き起こす可能性がある。先行研究では、AI内の局所的な電気生理学実験から、ニコチンの投与により音誘発応答を強化することが知られているが[11-12]、部位特異的な記録方法のため、AI以外の部位への影響についてはほとんど知られていない。

FAIは、開頭手術なしで、感覚誘導性神経活性における空間的・時間的変化を観測することができる[13-15]。フラビントタンパク質の蛍光反応は、生体内では主に、イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (AMPA) を介した後シナプス活性を仲介していると考えられている[14,17]。マウス聴覚野では、音誘発性のフラビン反応により、AIにおける周波数地図を描画可能で、さらに二次聴覚領域 (AII) と前側聴覚領域 (AAF)、背内側領域 (DM) のサブ領域を同時に検出することが可能である。この手法の強みを生かし、麻酔下のマウスにおける、音誘発性の聴覚皮質活性の時空間的な性質が、全身性ニコチン曝露によってどのような調節がなされるか検討した。

材料・方法

C57BL/6J 系統の生後 36-40 日の雄マウスを使用し、ウレタンとキシラジンを腹腔内投与で麻酔を行った。聴覚野の開頭手術後、防音チャンバー内のマニピレーターでマウスの頭部が水平になるよう固定した。FAIは、聴覚皮質直上の頭蓋骨が見えるよう、70°傾けた落射型蛍光顕微鏡から CMOS カメラで画像を得た。約 9 秒間のトライアルを 8 回繰り返す、各トライアル 60 枚の画像を、140 ms の露光時間と 10 ms のインターバルを設け、6.67 Hz で撮影した。画像は MATLAB ソフトウェアで自作したプログラムで記録・解析した。MATLAB を使用し、各トライアルの音開始直前の 3 つの画像 (28-30 枚目) の光強度の平均を、60 枚の全ての画像から減算した後、1 セット分 (8 トライアル分) を平均し、ガウシアンフィルターをかけることで、生体およびカメラの人工ノイズを処理した。

ニコチン投与は、20 kHz と 5 kHz の周波数をもつ振幅変調 (AM) 音で少なくとも 3 セット安定したイメージングができた後、2 mg/kg フリーベースの濃度となるよう、生理食塩水で薄めたニコチンを腹腔内投与した。また、ニコチンのアンタゴニストとして、10 μ M Dihydro- β -erythroidine (DH β E) もしくは 10 nM Methyllycaconitine (MLA) を、皮質内に局所的に投与し、nAChR の関与を検討した。

結果

4x 対物レンズをつけた落射型顕微鏡を 70°傾けて固定することで、マウスを水平に保った状態で FAI を可能にし、また生体ノイズおよび人工ノイズを 2 つのフィルターにより減算することで安定したイメージング画像が得られるようになった。

5 kHz の音刺激では 3 つの異なる活性領域を見ることができ、先行研究より[15]、それぞれ AI、AAF、そして AII と予測された。20 kHz の音刺激は、上記の 3 つの皮質領域が組み合わせられたような広い活性化領域を示した。

次に、全身性ニコチン曝露は、特定周波数 (Characteristic frequency: CF) 部位で CF 音誘発反応を増強し、非 CF 音誘発反応を減少させることが知られており[11]、音誘発反応の空間パターンを調節する可能性がある。ニコチン投与下では、音刺激開始 0.29 秒から 0.74 秒での最大活性強度が増加し、ニコチン投与後最初の 5 分間で約 63% 増加した。この増強は時間経過と共に減少するが、有意的な増強は少なくとも 20-25 分まで続いた。また、反応閾値を超えるフラビン蛍光強度を持つ皮質の活性化領域もニコチンによって増加し、この増加した活性化領域は、ほとんどの実験で少なくとも 45 分まで継続した。

上述のニコチンの影響が、皮質内のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) によるものかどうかを調べるために、 $\alpha 4$ および $\beta 2$ を含む nAChR ($\alpha 4\beta 2^* -nAChR$) の拮抗阻害剤である DH β E、もしくは $\alpha 7$ サブユニットを含むホモマー ($\alpha 7-nAChR$) の阻害剤である MLA を、ハミルトンシリンジから局所注入した。DH β E を注入した場合、ニコチン投与後の音誘発による最大活性強度の増強を抑制できたが、活性化領域の増強は阻止できなかった。一方で、MLA の皮質内投与では、ニコチンによる最大活性強度や活性化領域の増強をほとんど阻害しなかった。

CF 音および非 CF 音誘発性活性におけるニコチンの影響について、5 kHz (非 CF) 音誘発性最大活性部位の蛍光強度の変化は、20 kHz (CF) 音誘発性最大活性部位とほとんど変わらず、CF と非 CF を逆のパターンにしても同様の結果となった。

また、ニコチンが、非一次聴覚皮質である AAF と AII の音誘発フラビン応答に影響を与えるかどうかを検討すると、5 kHz 音で誘発された AAF と AII において、最大強度が増強し、AI 同様の経時的な変化が見られた。ニコチンは、AI だけでなく、いずれの皮質領域においても、非常に類似した影響を示した。これらのデータから、ニコチンが一次および非一次の聴覚皮質において、音による皮質神経活動を同様に制御する可能性を示唆している。

考察

マウスに AM 音を与えたところ、聴覚皮質のフラビントタンパク質蛍光強度が増加し、AI、AII、そして AAF と推定される部位で蛍光強度の最大値が観測された。また、ニコチンによって、音活性皮質領域の拡大もみられた。これらの結果は、ニコチン曝露は、最大強度が増加するにつれて局所神経活動を増加させ、音による活性領域を超えて、大脳皮質の広範な活動を促進したことを示唆しており、非最適部位 (いわゆる非 CF 領域) においてもニューロン活動を強化することを示唆している。

DH β E および MLA を投与した実験結果から、音に対する活性最大部位における局所神経活動によるニコチン性増強は、皮質内 $\alpha 4\beta 2^* -nAChR$ を介して行われており、また、ニコチンによる音活性化領域の拡大は、内側膝状体 (MGv) を介した視床・皮質系伝達のニコチン性増強に依存している可能性が示唆された。非一次領域である AII、AAF の最大活性化領域においても、ニコチンによって優位的な増強が

見られ、この増強は AI における増強の経時変化と類似しているため、視床・皮質系回路を介した同様の神経活性の増強がなされている可能性が示唆された。

以上より、本研究では、これまで知られていたようなニコチン性フィルタリングを視覚化することはできなかったが、ニコチンが音刺激誘発性の皮質活性に及ぼす影響の新たな知見を提示できた。非一次領域 (AII、AAF) でもニコチン性制御の影響が、一次領域 (AI) 同様に強く表れることから、聴覚システムの高次の情報処理においても、コリン作動性制御が起こる可能性が示唆された。今後の展開として、AII、AAF といった高度領域を含む複合的解析とそれと同時によりミクロな視点、神経細胞および微小回路の活性化のメカニズムを知ることで、聴覚野における注意集中のメカニズムの解明がなされると期待される。

3. マウス一次聴覚野第 3/4 層における視床・皮質系神経回路のニコチン制御

背景・目的

ニコチンは、認知機能の強化に作用することが知られている。たとえば、健常者の非喫煙者において、喫煙は、ヒトの脳波 (EEG) によって記録された聴覚誘発電位を促進する [18]。また、ヒトを含む哺乳類の認知および注意行動において、ニコチンが感覚認知機能の向上に深く関わっていることも知られている [19-20]。感覚認知機能におけるニコチン性増強のメカニズムは未だ明らかにされていないが、感覚フィルタリング (Sensory filtering) 機構がそのメカニズムの解明に重要な手がかりとなる可能性がある。これは特異的な情報を抽出し、非特異的な情報を減らす機能であるが、nAChR を介したコリン作動性システムが重要な役割を果たしていると考えられている [19,21-23]。

AI は、音の周波数特異的な活性領域が存在していることが知られているが、視床の MGv においてすでに周波数地図が存在し、AI 第 3/4 層で最もチューニングが行われていることが知られている [23-24]。このチューニングは、情報処理機能の結果として考えられているが、そのメカニズムとして、音刺激によって誘発される皮質内の抑制性細胞を介したフィードフォワードな抑制性入力、また同層内の興奮性細胞の入力によって、より特異性の高い応答が可能となることが報告されている [25-27]。実際に、皮質内の興奮性細胞、および抑制性細胞への視床・皮質系入力がどのように行われているかの実験もなされている [28-29]、これらの聴覚情報処理機構に、nAChR がどのように関わっているかは明らかになっていない。

近年の *in vivo* 電気生理学の実験では、急性のニコチン投与が、AI の CF 音誘発反応を増強し、非 CF 音反応を減少させることがわかった [11]。この結果は、聴覚反応の感受性は、視床・皮質系回路における伝達の増強 (特異的情報) と皮質間での伝達の減少 (非特異的情報) が同時に起こることで変わることが示唆される。聴覚皮質内で記録されたこれ

らのニコチンの効果は、皮質内のニコチン性活性の複合的な作用であり [30-31]、と同時に、皮質下ニューロンにおけるニコチン性制御の関与も示唆されている [31-34]。

以上より、nAChR の挙動は興奮性細胞のみならず、抑制性介在ニューロンを含んだ皮質回路内でも大きな役割を果たすと示唆されるが、ニコチン性フィルタリング機構においては、抑制性介在ニューロンの関与は不明である。本実験で、音誘発性のニコチン性活性作用において、抑制性介在ニューロン、特に情報処理に関わるとされる FS 細胞への関与の可能性を検討し、TC slice を用いて、視床・皮質系経路上を電気刺激し、誘発される興奮性後シナプス電流 (EPSC) および抑制性後シナプス電流 (IPSC) を測定し、またそれによって興奮性細胞の出力 (活動電位) にどのような変化が起こっているか検討した。

材料・方法

C57BL/6J 系統および GAD67-GFP ノックインマウスである ICR.Cg-Gad1<tm1.1Tama>系統のマウスを使用した。生体内における局所電場電位記録 (LFP) においては、C57BL/6J 系統の生後 26-30 日の雌マウスを使用した。ウレタンとキシラジンを腹腔内投与で麻酔した後、聴覚皮質における周波数地図を特定し、CF 部位を決定した。皮質表面から 300-400 μm まで電極を挿入し、音誘発性の安定した LFP を得た後、ニコチン (2 mg/kg フリーベース) を腹腔内投与した。CF 音誘発 LFP は、3 分間隔で 60 分間記録した。

ホールセルパッチクランプ実験においては、まず、イソフルランで麻酔したマウス (雌 C57BL/6J 系統および雌 ICR 系統、いずれも生後 26-30 日) を断頭し、先行研究同様に、視床の MGv から AI への投射を含む視床・皮質系スライス (400-500 μm) を準備した。ホールセルパッチを行うガラスピペット (3-7 M Ω) は、以下の組成の内液を満たして使用した、140 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 2 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na₂-GTP, 10 mM Phosphocreatine, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 0.3-0.5% Biocytin (pH 7.28-7.32)。EPSC-IPSC バランスを観察する実験では、140 mM CsMeSO₃, 10 mM CsCl, 2 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na₂-GTP, 10 mM Phosphocreatine, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 2 mM QX-314 (細胞膜非透過性 Na⁺チャンネル阻害剤), 0.3-0.5% Biocytin (pH 7.28-7.32) の内液を用いた。ホールセル記録は、皮質表面から 30-40% 以内に位置する第 3/4 層の細胞を微分干渉顕微鏡 (IR-DIC) でモニターしながら、適切な細胞を探索した。抑制性細胞のホールセル記録においては、青色の励起光で励起させ、緑色の蛍光をモニターすることで、GFP 陽性細胞を特定することができるため、IR-DIC で細胞の状態を見ながら、並行使用して探索した。細胞の内存在特性 (活動電位や入力抵抗など) は、矩形電流注入によって取得した。視床・皮質間の求心性線維の刺激をするために、平行双極性電極を上視床放線 (Superior thalamic radiation, STR) をまたいで置いた。FS 細胞における TC 誘発性の単一シナプス EPSC 記録に関する実験では、単一シナプス性だと予測される EPSC を、最も小さい刺激で特定した。活動電位

記録におけるニコチン投与は、exciting ACSF に溶かしたニコチン (1 μ M) を、灌流投与している exciting ACSF から切り替えた。皮質内への局所投与に関しては、30 ゲージの針をマニピレーターに固定して操作した。ACSF (もしくは exciting ACSF) とニコチン (0.3 μ M) の入った2つのシリンジを用意し、重力供給方式で局所的に投与した。

結果

In vivo の LFP でニコチンの影響を検討すると、CF 音誘発性 LFP の増強と共に、CF 音応答の変動が減少することがわかった。一方で、非 CF 音に対する応答は、変動が変わらない状態で減少した。これらのことから、ニコチンが音誘発性応答に対して、神経活性の変動、つまり同期化を制御すると共に、同期化以外での応答の減弱を行うことが示唆された。*In vitro* スライスの実験では、TC 線維が束になって通っている STR を電気刺激し、FS 細胞でホールセルパッチクランプを行い、皮質内へ局所的なニコチン投与を行うと TC 入力の見られ、これまでの興奮性細胞へのニコチン性制御とは逆の制御が行われていることが示唆された。加えて、TC input による興奮性・抑制性入力のバランスにおいては、ニコチンによって興奮性入力・抑制性入力共に減少する傾向がある一方で、興奮性入力を優位にするようなバランスを生み出した。しかしながら、興奮性・抑制性細胞のダブルホールパッチクランプの実験において、興奮性細胞に投射する直接的な IPSC の有意な減少は確認されなかった。興奮性細胞における TC 誘発性の活動電位はニコチンで減少したことから、ニコチンが TC 入力の増強と、皮質回路内の活性減少、さらに活性減少の割合を制御し、興奮性優位にする役割を担っている可能性が示唆された。これらのことから、ニコチンがこれまで考えられていた神経活性増強よりもむしろ、皮質内神経回路の活性を限定的にすることで、興奮性入力をより優位に立たせる働きを持たせている可能性が示唆された。

考察

本研究では、AI の第 3/4 層におけるニコチン性制御について、抑制性細胞、特に FS 細胞における制御、および興奮性細胞を含む神経回路への制御の検討を行った。第 4 層の興奮性細胞における FS 細胞誘発性の IPSC への直接的な制御はほぼないと考えられるものの、TC 経路における抑制作用があると示唆された。フィードフォワード経路の観点からみると、皮質内回路の活性を促す作用があると考えられるが、興奮性細胞における TC 誘発性の活動電位はむしろ減少する結果となった。しかしながら、TC 誘発性の興奮性・抑制性入力を分けて解析すると、興奮性・抑制性共に活性化増加のある細胞と減少傾向にある細胞があり、ニコチンの制御が細胞依存的である可能性が高まった。このような結果から、ニコチン性フィルタリング機構は当初の仮説であった、抑制性細胞によるものである可能性はあるものの、その制御機構は興奮性細胞種もしくは神経回路依存的な可能性があり、さらなる検討を要する必要がある。

4. 結論

本研究において、マウス聴覚野におけるニコチン性制御について、以下の結果が得られた。まず、フラビンタンパク質イメージングからは、ニコチン性フィルタリングのような結果を見出すことができなかったが、ニコチン投与により、AM 音誘発性フラビンタンパク質蛍光応答が、 $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR を介して増強されること、また、活性化の伝播は、皮質内 nAChR 非依存的に増強され、別のシステムが関与している可能性があることを見出した。加えて、AII や AAF といった非一次領域においても、AI 同様に蛍光強度増強が引き起こされていることが分かり、ニコチンの大規模かつ強力な活性増強制御が観察された。

また、電気生理学的実験においては、ニコチンの FS 細胞からの興奮性細胞への直接的な制御はなかった一方で、FS 細胞における TC 誘発性の EPSC の伝達効率率は減少しており、TC 誘発性フィードフォワード抑制の減少が示唆された。しかし一方で、TC 誘発性の活動電位が抑制されてしまうことが分かり、細胞によって興奮性・抑制性共に増加、もしくは共に減少していることが分かった。一方で、増強、もしくは減少のバランスはいずれも興奮性に偏ってくることも分かった。これらは細胞特異的、もしくは回路特異的なニコチン性制御がある可能性が示唆される。

以上のことから、結論として、マウス AI におけるニコチン性フィルタリング機構は、第 3/4 層における細胞もしくは回路依存的な制御の結果である可能性があり、フラビン蛍光イメージングではとらえられないほど緻密な機構であることが示唆された。今後は細胞種依存的な活性の違いがある可能性も考慮しながら、ニコチン性フィルタリング機構の解明に向けて、*in vivo* パッチクランプなどを用いた実験が必要となってくる。

参考文献

- [1] Knott et al., 2009, *Nicotine Tob Res* 11:519–530.
- [2] Smucny et al., 2015, *Psychopharmacol* 232:2017–2028.
- [3] Domino and Kishimoto, 2002, *Nicotine Tob Res* (1):71–8.
- [4] Gilbert et al., 2007, *Nicotine Tob Res* 9(3):351–63.
- [5] Behler et al., 2015, *Psychopharmacol* 232(7):1269–77.
- [6] Kassel, 1997, *Clinical psychol rev* 17:451–478.
- [7] Atiani et al., 2009, *Neuron* 61, 467–480.
- [8] O'Connell et al., 2014, *J Neurosci* 34:16496–16508.
- [9] Herdman, 2011, *Brain topography* 24:271–278.
- [10] Jäncke et al., 1999, *Neuroscience letters* 266:125–128.
- [11] Kawai et al., 2011, *J Neurosci* 31:14367–14377.
- [12] Askew et al., 2017, *Synapse* 73(9):e22116.
- [13] Shibuki et al., 2003, *J Physiol* 549:919–927.
- [14] Reinert et al., 2004, *J Physiol* 92:199–211.
- [15] Tsukano et al., 2015, *J Neurophysiol* 113:2900–2920.
- [16] Hishida et al., 2007, *NeuroImage* 34:679–693.
- [17] Tsukano et al., 2016, *Sci Rep* 6:1–12.
- [18] Domino, 2003, *Nicotine Tob Res* (1):71–8.
- [19] Piccotto, 2003, *Trends Pharmacol Sci* 24:493–499.
- [20] Levin et al., 2006, *J Neurobiol* 53:633–640.
- [21] Levin 2002, *Psychopharmacol* 184:523–539.
- [22] Disney et al., 2007, *Neuron* 56:701–713.
- [23] Hackett et al., 2011, *J Neurosci* 31:2983–2995.
- [24] Li et al., 2014, *J Neurosci* 34:13670–13683.
- [25] Wehr & Zador, 2003, *Nature* 426:442–446.
- [26] Liu et al., 2007, *Nat Neurosci* 10:1594–1600.
- [27] Zhou et al., 2012, *J Neurosci* 32:9969–9980.
- [28] Rose & Metherate, 2005, *J Neurophysiol* 94:2019–2030.
- [29] Schiff & Reyes, 2011, *J Neurophysiol* 107:1476–1488.
- [30] Intskirveli and Metherate, 2012, *J Neurophysiol* 107:2782–2793.
- [31] Tebecis, 1970, *Br J Pharmacol* 38:117–137.
- [32] Kawai et al., 2007, *Nat Neurosci* 10:1168–1175.
- [33] Askew et al., 2017, *eNeuro* 4(3):ENEURO.0192-17.
- [34] Sottile et al., 2017, *J Physiol* 595:5375–5385.