

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22115004

研究課題名（和文）大脳新皮質第 5 層微小カラムの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of microcolumns in neocortical layer V

## 研究代表者

細谷 俊彦 (Hosoya, Toshihiko)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：70272466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 52,300,000 円

研究成果の概要（和文）：大脳新皮質が機能単位の繰り返しで構成されているか不明である。我々は、大脳新皮質第5層に位置し皮質外への出力を担う皮質下投射細胞が微小なカラム状に並んでいることを発見した。これらの微小カラムは周期的に配置され、皮質に沿って六角形の格子状のパターンをつくっていた。同一微小カラム内の細胞は発生期にはギャップ結合によって結合し、後に共通なシナプス入力を受けることがわかった。視覚野、体性感覚野、運動野のいずれでも、同一微小カラム内の細胞はよく似た活動パターンを示した。以上より微小カラムは大脳新皮質の機能単位であり、多数の微小カラムによる並列処理が大脳新皮質の基本的な計算様式であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The computational architecture of the nervous system is largely determined by the structure of its circuit. In the mammalian neocortex, whether the circuit has an elementary unit that repeats along the cortical sheet remains unknown. We found that subcerebral projection neurons (SCPns), excitatory neurons in layer 5 projecting to extracortical targets, are organized into microcolumnar clusters. These microcolumns were arranged periodically along the cortical sheet into an approximately hexagonal pattern. SCPns in individual microcolumns were connected by gap junctions during development and later received common synaptic inputs. In the visual, somatosensory and motor cortices, neuronal activity was synchronized specifically within microcolumns. These results indicate that microcolumns represent repeating units in the neocortical circuit, and suggest that parallel processing in a regular array of microcolumns is a basic computational architecture of the neocortex.

研究分野：神経科学

キーワード：脳 神経 大脳新皮質 哺乳類 マウス 視覚 体性感覚

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳新皮質は極めて複雑な内部回路をもつ。ほぼ1世紀にわたって回路の構造と機能の解析が進められてきたが、未だ不明な点も多い。皮質研究の当初より、単位となる部分的な回路が存在しこれが繰り返しているのか、また感覚野や運動野などの異なる皮質領野の機能構築がどの程度共通なのか議論されてきた。もし単位となる回路があれば、皮質処理は多数の相同な機能単位による並列処理とみることができる。さらに、この単位が異なる領野で共通であれば、多様な皮質機能が共通な並列処理基盤を持つことになる。我々はマウス大脳新皮質の視覚野・体性感覚野などにおいて、第5層の主要な興奮性細胞である皮質下投射細胞が微小なカラムを形成し、さらにこの微小カラムが周期的に配置していることを発見した(図1)。このため、この微小カラムが大脳メゾ回路の機能単位である可能性があると考えられた。

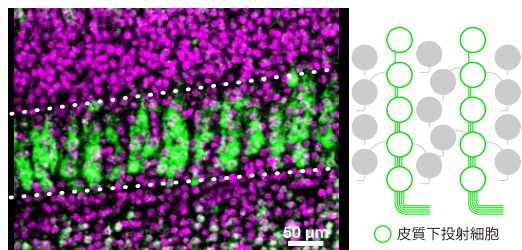


図1 皮質下投射細胞の微小カラム。(左) マウス視覚野。点線: 第5層の上下境界。マゼンタ: 全ての細胞の核。緑: 皮質下投射細胞の細胞体。(右) 微小カラムの模式図。灰色: 皮質下投射細胞以外の細胞。

## 2. 研究の目的

微小カラムが大脳メゾ回路の基本的な単位である可能性を検討するため以下を目的とする研究を行った。

### (a) 構造解析

微小カラム構造の領野間での比較、皮質上での2次元配置の解析、細胞タイプ特異性の決定などを行い、微小カラム構造の詳細を明らかにする。

### (b) 機能解析

微小カラムの生体内での神経活動を解析し、個々の微小カラムが機能単位であるか否かを明らかにする。

### (c) 神経回路探索

微小カラム特異的な神経活動をもたらす神経回路を探索する。

### (d) 発生機構

微小カラムおよびそれに特異的な神経回路の形成を担う発生機構の探索を行う。

## 3. 研究の方法

### [構造解析]

微小カラムの構造、配置を解析するため、細胞を高密度で染色しその座標取得を行う技術を開発した。脳スライスを用いた解析および透明化脳ブロックを用いた。脳スライスでは、細胞タイプ特異的な遺伝子の mRNA やタンパクの染色や逆行性トレーサーを用いて特定のタイプの細胞を同定し、2次元座標を取得した。脳ブロック実験では、遺伝子組み替えマウスの蛍光タンパク発現または逆行性トレーサーによって特定のタイプの細胞を染色した。固定後に透明化した後、脳の広い範囲を2光子顕微鏡でスキャンし、細胞の3次元座標を取得した。

2次元座標の解析では、細胞密度をスライス上で測定し自己相関およびパワースペクトルを計算した。3次元座標解析では、細胞の相対位置を解析することにより微小カラムの方向を決定した。個々の細胞の皮質に沿った方向での座標を決定し、その密度の2次元自己相関および2次元パワースペクトルを計算した。

### [活動解析]

微小カラムは大脳皮質の深層に存在するため、研究開始当初は活動解析が比較的困難であった。このため、神経活動の測定はつぎの2段階の方法で行った。

第1段階では、神経活動に伴って細胞内に蓄積するタンパク cFos の発現を指標とした。マウスに2時間程度光刺激を与えた後、脳の切片を作成し cFos タンパクを染色した。細胞の2次元座標を取得し、cFos 発現の空間パターンを解析した。

第2段階では in vivo カルシウムイメージングを用いた。新たに開発されたカルシウム感受性蛍光タンパクをウイルスベクターによってマウス脳に導入した。2光子顕微鏡の光学系を最適化することにより、生体内の多数の皮質下投射細胞から良好な信号を得ることができた。高速Zスキャン装置を用いて多数の細胞からイメージングし、カルシウム応答の比較を行った。

### [電気生理学]

微小カラム内での同期活動の神経機構および微小カラム回路の発生機構を解析するため、脳スライスでのパッチ記録による電気生理学実験を行った。皮質下投射細胞は遺伝子組み替えマウスでの蛍光タンパク発現によって同定した。この系を用いて皮質下投射細胞間の相互結合および共通入力解析した。また発生期のスライス中で皮質下投射細胞間のギャップ結合の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### [研究の主な成果]

##### (a) 構造解析

微小カラムがマウスの視覚野、体性感覚野および運動野を含む広い範囲に存在し、ほぼ同一の構造をとっていることが確認された。さらに、微小カラムは皮質に沿って周期的に配置しており、格子状の構造をとっていることが明らかとなった。またこの構造は細胞タイプ特異的であり、微小カラムからは他のタイプの興奮性細胞は排除されていることも分かった。

##### (b) 機能解析

微小カラムが *in vivo* で機能単位として振る舞うかを調べるため、まず cFos 発現を指標とした実験を行った。マウスの片目に光刺激を与え、大脳皮質視覚野の両眼視部の細胞のうち刺激した眼に感受性をもつ細胞群を活動させた(図 2A)。皮質下投射細胞での cFos 発現を染色によって測定し、その空間相関を調べた(図 2B)。その結果、cFos 発現は細胞 1 個程度の距離である 10  $\mu\text{m}$  の範囲で強く相関しており(図 2C)、cFos は個々の微小カラムを単位として発現していることが分かった(図 2D)。

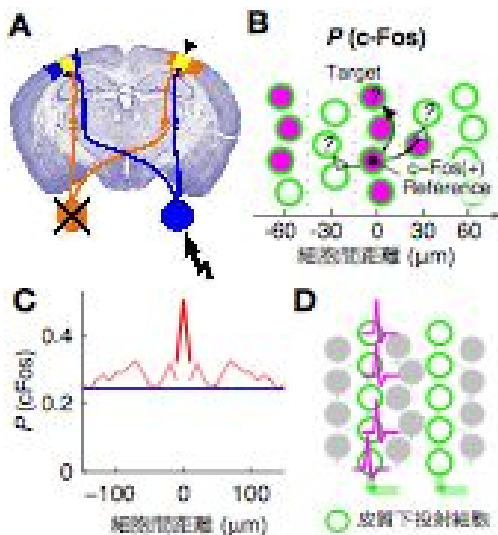


図 2 cFos 発現による活動解析 (A)片目への光刺激。黄：両眼視部。(B)発現相関解析。cFos を発現した細胞(Reference)の近傍の細胞がcFosを発現する確率  $P(\text{c-Fos})$  を、細胞間距離の関数として計算する。(C) 赤は実験データ。青はランダムな場合の理論値。(D)cFos 発現(マゼンタ)の模式図。

cFos 発現は神経活動の間接的な指標であるため、さらにカルシウムイメージングによる解析を行った。実験系の改良により、多数の微小カラム細胞から良好な信号を取得す

ることが可能となった。無刺激下での自発活動を測定したところ、微小カラム内の細胞が類似した時間パターンで活動していることが明らかとなった。この類似性は視覚野、体性感覚野および運動野で共通してみられた。また刺激に対する応答性も微小カラム内で類似していることが明らかとなった。これらの結果より微小カラムが機能単位として振る舞うことが示された。

##### (c) 神経回路探索

微小カラム内の同期活動をもたらす神経機構を明らかにするため、スライスパッチ記録を用いた実験を行った。その結果、同一の微小カラム内の細胞は、同じ細胞からの共通な強いシナプス入力を受けていることが明らかとなった。この入力は同期した神経活動を惹起し、*in vivo* 活動の類似性をもたらしていると考えられる。

##### (d) 発生機構

微小カラム特異的な回路の発生機構を明らかにするために、発生期のスライスを用いたパッチ記録を行った。その結果、第5層には細胞タイプ特異的な高密度のギャップ結合があることが明らかとなった。さらに皮質下投射細胞の結合は微小カラム特異的であった。このギャップ結合は微小カラム特異的な回路の形成に寄与している可能性が高い。

##### [国内外における位置づけとインパクト]

以上の結果より、微小カラムが大脳新皮質の機能単位であることが明らかとなった。この結果は、多数の微小カラムによる並列処理が大脳新皮質の基本的な計算様式であることを示唆する。微小カラムは周期的に配置されているため、その並列処理は組織化された構造を持つ可能性がある。微小カラムさまざまな領野で共通であるため、感覚処理、運動制御、言語機能などの幅広い情報処理が微小カラムに依存した共通な処理基盤を持つと予想される。この結果は、機能単位に関する長く続いていた議論を大きく前進させ、大脳皮質研究に新たな戦略をもたらすと期待できる。

##### [今後の展望]

個々の微小カラム間でどのような機能分担がされているか、異なる領野間でどのような機能の共通性があるか、微小カラムに結合している脳部位にも並列構造があるかなどを明らかにすることにより、大脳新皮質の並列処理の特性を明らかにしていけると期待される。

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 5 件)

1. Maruoka, H., Kubota, K., Kurokawa, R., Tsuruno, S. & Hosoya, T.  
Periodic Organization of a Major Subtype of Pyramidal Neurons in Neocortical Layer V.  
*J. Neurosci* **査読有 31 (50)**, 18522-42(2011)  
<http://www.jneurosci.org/content/31/50/18522.full.pdf+html>
2. Kamitani-Kawamoto, A., Hamada, M., Moriguchi, T., Miyai, M., Saji, F., Hatamura, I., Nishikawa, K., Takayanagi, H., Hitoshi, S., Ikenaka, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Takahashi, S. & Kataoka, K. MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development.  
*J Bone Miner Res* **査読有 26 (10)**, 2463-72(2011)  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.458/abstract>
3. Hitoshi, S., Ishino, Y., Kumar, A., Jasmine, S., Tanaka, KF., Kondo, T., Kato, S., Hosoya, T., Hotta, Y. & Ikenaka, T. Mammalian Gcm genes induce Hes5 expression by active DNA demethylation and induce neural stem cells.  
*Nature Neuroscience* **査読有 14 (8)**, 957-64(2011)  
<http://www.nature.com/neuro/journal/v14/n8/abs/nn.2875.html>
4. Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, Ti., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, M., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima, S. & Okamoto, H. The habenula is crucial for experience-dependent modification of

fear responses in zebrafish.

*Nature Neuroscience* **査読有 13 (11)**,

1354-56(2010)

<http://www.nature.com/neuro/journal/v13/n11/full/nn.2654.html>

5. Oizumi, M., Ishii, T., ISHIBASHI, K., Hosoya, T. & Okada, M. Mismatched decoding in the brain.

*The Journal of Neuroscience* **査読有 30 (13)**, 4815-26(2010)

<http://www.jneurosci.org/content/30/13/4815.full.pdf>

[学会発表](計 5 件)

1 細谷俊彦 大脳新皮質の微細モザイク構造, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「中枢神経研究を拓く新しい潮流」, 2013.3.8-9, 大阪大学蛋白質研究所(大阪)

2 細谷俊彦 脳深部および単一細胞の活動計測と操作を目的とした光生理学, 第34回日本生物学的精神医学会, 2012.9.28-30, 神戸国際会議場(神戸)

3 Hosoya, T. Micro-Periodic Functional Organization in neocortical Layer V, COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES, 2013.3.28-31, NewYork

4 細谷俊彦 脳に基本単位回路はあるか, 応用数学連携フォーラム第22回ワークショップ, 2011.10.6, 東北大学青葉山キャンパス(仙台)

5 Hosoya, T. Micro-Periodic Organization in Neocortical Layer V, 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011.5.19, Okinawa Convention Center (Okinawa)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/17>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細谷 俊彦 (HOSOYA, Toshihiko)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合  
研究センター・局所神経回路研究チーム・チ  
ームリーダー研究者番号：70272466

### (2) 研究分担者

丸岡 久人 (MARUOKA, Hisato)  
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研  
究センター・研究員  
研究者番号：60443032

鶴野 瞬 (TSURUNO, Shun)  
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研  
究センター・研究員  
研究者番号：80548991

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者