

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05375

研究課題名(和文)視床核特異的Cre発現マウスを用いた高次視覚野の受容野形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Neural circuit mechanisms underlying receptive field formation in higher-order visual cortical areas

研究代表者

小坂田 文隆 (Fumitaka, Osakada)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授

研究者番号：60455334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの高次視覚野(HVA)の受容野特性が形成されるメカニズムを解明する目的で、まず解剖学的解析を行い、LGNニューロンはV1にのみ入力し、他のHVAには入力しないこと、LPニューロンはV1と高次視覚野へ投射することを見出した。次に、V1あるいはHVAに投射するLGNあるいはLPニューロンの視覚応答性を明らかにする目的で、HVAに投射する軸索終末から視覚応答を2光子顕微鏡イメージングにより記録した。さらに、HVAに投射するLPあるいはLGNニューロンを経路選択的に操作した際のHVAでの視覚応答変化を評価した。その結果、HVAニューロンの受容野特性に与える視床核の役割を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to reveal how the receptive fields of higher-order visual cortical areas (HVAs) are shaped by the thalamus. We identified synaptic input to the V1 and each HVA by injecting retrograde viruses into each visual area of mice. Neurons of the lateral geniculate nucleus (LGN) neurons project to both the V1 and various HVAs, whereas neurons of the lateral posterior nucleus (LP) project to various HVAs, but not to the V1. We imaged visual responses from axon terminals of the LP or LGN neurons expressing GCaMP6 by 2-photon microscopy. In addition, we imaged visual responses from the V1 or HVA while manipulating activity of neurons in the LP or LGN with the Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug (DREADD) system. From these results, we conclude that LP neurons play a pivotal role in formation of the receptive fields of HVA neurons in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：受容野 DREADD hm4Di ウイルスベクター 視覚弁別課題 経路選択的 多光子励起イメージング 神経薬理学

1. 研究開始当初の背景

視覚系の機能は、網膜上に並んだ光受容細胞である視細胞の活動パターンから、生体にとって意味のある情報を取り出すことである。網膜から出た信号は、LGN を中継して、大脳皮質の V1 に入力される。その後、V2、V3、V4、V5 などの高次視覚野へと伝達される。これらの視覚野は並列階層的に構成されており、異なる種類の視覚情報は異なる経路で処理される (Felleman and Van Essen, 1991)。サルの視覚系において、V1 に到達した視覚情報は背側視覚路と腹側視覚路と呼ばれる 2 種類の主要な視覚経路に分かれる。背側視覚路は対象の位置や動きの把握と関係しており、V1 から始まり、V2 や V3 を経て、middle temporal (MT) 野、medial superior temporal (MST) 野にいたる。一方、腹側視覚路は視覚対象の認識、色や形の表象と関係しており、V1 から始まり、V2 や V3 を経て、V4、IT 野、TEO 野、TE 野へ伝達される。

高次視覚野では視覚応答性は特異化し、単純な刺激にはあまり応答せず、はるかに複雑な刺激パターンに反応する。まず低次の領域の細胞の小さな受容野において、局所的かつ単純な特徴が取り出され、それらの特徴がより高次の領域で大きな受容野を持つ細胞に組み込まれる事により、複雑な特徴が取り出されると考えられている。

これまでは視覚研究は、歴史的にサルおよびネコ、フェレットを中心に発展してきた。しかし、近年マウスがヒトやサルの視覚野の基本的な性質を有している事が明らかになってきた。マウス V1 にも、サルやネコの V1 に特徴的な方位選択性応答を示す細胞が存在し (Niel and Stryker, JNS, 2008; Niel and Stryker, Neuron, 2010) さらにマウス AL や LM などが解剖学的にも、生理学的にもサル高次視覚野に相当する事が報告された (図 2B: Wang and Burkhalter, JCN, 2007; Marshel et al., Neuron, 2011; Andermann et al., Neuron, 2011)。マウスでは遺伝学や分子生物学的手法が発展しており、イメージングもしやすいことから、モデル動物としてマウスを用いることで、これまでサルでは不可能であった実験が可能になり、新たな発見が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、マウスをモデルとして、ほとんど未解明である高次視覚野の受容野特性の形成メカニズムの解明に挑む。マウスの高次視覚野 (HVA) の受容野特性が形成されるメカニズムを解明する目的で、まずマウスの大脳皮質の一次視覚野の V1 および高次視覚野の LM、PM、AL に入力する神経細胞の同定を試みた。マウスの各視覚野に逆行性ウイルスベクターを微量注入し、感染細胞の分布を組織学的に解析した結果、LGN の神経細胞は V1 にのみ入力し、他の高次視覚野には入力しないこと、LP の神経細胞は V1 と高次視覚野へ投射することを見出した。これらの結

果より、HVA への視覚情報伝達経路として、網膜→LGN→V1→HVA の cortico-cortical の feed-forward 投射による経路に加えて、視床核の LP を介した網膜→LGN→V1→LP→HVA による cortico-thalamo-cortical 経路 (あるいは transthalamic 経路) さらには V1 を介さない網膜→LP→HVA の経路や網膜→上丘→LP→HVA の経路が HVA の受容野形成に関わる可能性を考えた。

そこで本研究は、これら経路がマウスの高次視覚野 (HVA) の受容野特性の形成にどのように関わるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

動物は雄性 C57BL/6 マウスの 8 週齢-10 週齢を使用した。各種ウイルスベクターは HEK293 細胞あるいは BHK 細胞を用いて作製した。麻酔下のマウスを脳定位固定装置に固定し、標的とする脳部位上の頭蓋骨をドリルで削り、脳表面を露出させた後に、ガラスキャピラリーを用いてウイルスベクターを微量注入した。イメージングには、頭蓋骨に金属フレームを設置し、重層化ガラスを用いてイメージングウインドウを作製した。視覚野の各領域を同定するために、intrinsic signal imaging により retinotopic map を作製した。同定した。視床核の軸索末端および視覚野のニューロンの機能を評価するために、マウス 2 光子顕微鏡下にて頭部固定し、モニターに呈示した視覚刺激に対する応答を緑色カルシウム感受蛍光タンパク質である GCaMP6 の蛍光強度変化として記録した。行動解析には視覚弁別課題を行った。左右のモニターに異なる視覚刺激を呈示し、水迷路を用いてマウスに正しい視覚刺激を弁別・選択させた。

4. 研究成果

マウスの高次視覚野 (HVA) の受容野特性が形成されるメカニズムを解明する目的で、まずマウスの大脳皮質の一次視覚野の V1 および高次視覚野の LM、PM、AL に入力する神経細胞の同定を試みた。マウスの各視覚野に逆行性ウイルスベクターを微量注入し、感染細胞の分布を組織学的に解析した結果、LGN の神経細胞は V1 にのみ入力し、他の高次視覚野には入力しないこと、LP の神経細胞は V1 と高次視覚野へ投射することを見出した。これらの結果より、HVA への視覚情報伝達経路として、網膜→LGN→V1→HVA の cortico-cortical の feed-forward 投射による経路に加えて、視床核の LP を介した網膜→LGN→V1→LP→HVA による cortico-thalamo-cortical 経路 (あるいは transthalamic 経路) さらには V1 を介さない網膜→LP→HVA の経路や網膜→上丘→LP→HVA の経路が HVA の受容野形成に関わる可能性を考えた。

カルシウム応答性タンパク質 GCaMP6 を神経細胞に発現させると、GCaMP6 が軸索終

末にも分布し、投射先にて軸索終末におけるカルシウム変化を記録できる。一方で、視床においてウイルスの感染を単一の神経核に限局させるのは非常に難しく、特に LGN と LP は隣り合う神経核で、片方の視床核にのみ特異的に遺伝子導入するのは難しかった。そこで LGN あるいは LP に特異的に発現するマーカーを探索した。その結果、LGN に特異的に Cre を発現する LGN-Cre マウスと LP に特異的に Cre を発現する LP-Cre マウスを同定することに成功した。Cre 依存的にカルシウム応答性蛍光タンパク質 GCaMP6m を発現する AAV-FLEX-GCaMP6m を LP-Cre マウスの LP に微量注入した。その結果、LP に特異的にウイルスの感染が認められ、LP の投射先においてもウイルス感染細胞の軸索終末を観察することができた。また LP-Cre マウスの LGN に AAV-FLEX-GCaMP6m を微量注入しても、GCaMP6m を発現する細胞は認められなかった。

次に、特定の神経細胞を制御する方法として、光感受性のチャンネルやポンプを利用した光遺伝学、人工リガンドに特異的なチャンネルを利用した薬理遺伝学が開発されている。そこで LGN および LP の神経活動を特異的に操作する目的で、これら光遺伝学ツールおよび薬理遺伝学ツールの導入を試みた。特定の神経核の Cre 発現細胞にのみ特異的に遺伝子導入を行う目的で、Cre 依存的に発現可能なアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。光遺伝学ツールとして活性化のために ChR2(H134R), ChR2(E123T) (ChETA) を、抑制のために ArchT を、薬理遺伝学として活性化のために hM3Dq, PSAM/5HT3HC, KORD を、抑制のために hM4Di, PSAM/GlyR を用いた。これらを Cre 依存的に発現する AAV-DIO/FLEX ベクターを作製し、成体マウスの脳に微量注入し、比較・検討を行った。いずれのウイルスベクターもレポーターとして蛍光タンパク質を同時に発現することから、ウイルス感染 3 週間後にこれらの発現を組織学的に解析した結果、いずれの AAV でもレポーターの蛍光の発現が認められた。光遺伝学操作には光ファイバーを用い、薬理遺伝学操作には各々に特異的なリガンドとして hM3Dq と hM4Di には CNO を、PSAM/GlyR と PSAM/5HT3HC には PSEM を、KORD には SALB を用いた。上記のアプローチを比較した結果、2 光子顕微鏡イメージングとの相性を優先し、実験の簡便さおよびコストなどを総合的に判断して、活性化には hM3Dq を、抑制には hM4Di を用い、そのリガンドである CNO を腹腔内投与することによる薬理遺伝学的アプローチが最適であると結論付けた。

上記方法を用いて、LP および LGN からの大脳皮質に投射する軸索終末からの多光子励起イメージングを行い、視床ニューロンの応答性を評価した。さらに LP あるいは LGN の神経活動を hM4Di により経路選択的に抑

制した時の大脳皮質ニューロンの応答性の変化を多光子励起イメージングにより評価した。その結果、高次視覚野のニューロンの受容野特性に与える視床核の役割を明らかにすることができた。

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 12 件)

1. 恩田将成, 小坂田文隆
視覚情報処理を担う神経回路の構造と機能.
日本薬理学雑誌 149, 274-280 (2017)
2. Xu C, Krabbe S, Gründemann J, Botta P, Fadok JP, Osakada F, Saur D, Grewe BF, Schnitzer MJ, Callaway EM, Lüthi A.
Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval.
Cell. 167, 961-972 (2016)
3. Tian J, Huang R, Cohen JY, Osakada F, Kobak D, Machens CK, Callaway EM, Uchida N, Watabe-Uchida M.
Distributed and Mixed Information in Monosynaptic Inputs to Dopamine Neurons.
Neuron. 91, 1374-1389 (2016)
4. Padmanabhan K, Osakada F, Tarabrina A, Kizer E, Callaway EM, Gage FH, Sejnowski TJ.
Diverse Representations of Olfactory Information in Centrifugal Feedback Projections.
The Journal of Neuroscience. 36, 7535-7345 (2016)
5. Faget L, Osakada F, Duan J, Ressler R, Johnson AB, Proudfoot JA, Yoo JH, Callaway EM, Hnasko TS.
Afferent Inputs to Neurotransmitter-Defined Cell Types in the Ventral Tegmental Area.
Cell Reports. 15, 2796-2808 (2016)
6. Tuncdemir SN, Wamsley B, Stam FJ, Osakada F, Goulding M, Callaway EM, Rudy B, Fishell G.
Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits.
Neuron. 89, 521-535 (2016)
7. Osakada F (corresponding author), Takahashi M.
Challenges in retinal circuit regeneration: linking neuronal connectivity to circuit function.
Biological & Pharmaceutical Bulletin 38, 341-357 (2015)
8. 小坂田文隆
神経回路の構造と機能を明らかにする新規 G 欠損狂犬病ウイルストレーシング法.

- 日本薬理学雑誌** 146, 98-105 (2015)
9. **小坂田文隆**
新規手法が切り拓く神経回路研究の新時代.
化学と生物 53, 673-680 (2015)
 10. 鈴木俊章、**小坂田文隆**
大脳皮質の層ごとに異なる方向選択性をもつ機能単位の発見.
実験医学 33, 2600-2601 (2015)
 11. 鈴木俊章、**小坂田文隆**
マウスを用いた視覚研究と抑制性神経回路の最前線.
日本薬理学雑誌 148, 162 (2015)
 12. 荒川大二郎、伊藤ありさ、**小坂田文隆**
ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を用いた新規治療法の開発.
日本薬理学雑誌 148, 217 (2015)

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 山口真広、森本菜央、**小坂田文隆**
長期の生理学実験および行動実験に適用可能な G 欠損狂犬病ウイルスベクターの開発. 日本薬学会, 金沢, 2018 年 3 月
2. **小坂田文隆**
細胞種特異的な網膜神経回路の病態生理学的な役割を目指して. 大阪大学蛋白研セミナー. 大阪, 2018 年 1 月
3. **小坂田文隆**
相互結合かつ共通入力をもつサブネットワークの新規解析技術. ConBio2017. 神戸, 2017 年 12 月
4. **Fumitaka Osakada**.
Viral and imaging approaches for linking neuronal connectivity to circuit function. 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」, 三島, 2017 年 12 月
5. Toshiaki Suzuki, **Fumitaka Osakada**.
Targeting enveloped viruses to multiple, distinct populations for neural circuit analysis. The 48th NIPS International Symposium: Neural circuitry and plasticity underlying brain function. Okazaki, 2017 年 5 月
6. 鈴木俊章、坂口綾菜、赤池昭紀、**小坂田文隆**
Targeting enveloped viruses to two distinct populations for neural circuit analysis. 第 40 回神経科学大会, 千葉, 2017 年 7 月
7. **Fumitaka Osakada**
Viral and electrophysiological approaches to elucidate structure and function of retinal circuits. 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017 年 3 月
8. **Fumitaka Osakada**
Neural circuit tracing with rabies viral vectors for neural circuit research. Viral vector technology for neural circuit and pathology research, 岡崎, 2016 年 12 月
9. **小坂田文隆**
視覚再生を目指した新規治療開発. 材料

- 科学フロンティア研究院講演会, 名古屋, 2016 年 11 月
10. **Fumitaka Osakada**
Neural Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses. 第 38 回日本神経科学大会, 横浜, 2016 年 8 月
 11. **小坂田文隆**
網膜の神経回路を解析するウイルス遺伝子工学と電気生理学的手法. 第 31 回東北眼疾患病態研究会, 仙台, 2016 年 5 月
 12. **Fumitaka Osakada**
Neural Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses. 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 2016 年 3 月
 13. **小坂田文隆**
G 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いた新規神経回路解析法. 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 2016 年 3 月
 14. **Fumitaka Osakada**
Molecular and viral approaches to elucidate structure and function of neural circuits. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015 年 12 月
 15. **小坂田文隆**
神経回路の構造と機能を対応付ける狂犬病ウイルストレーシング法. 研究戦略ワークショップ「Strategy for Neuroscience 2015」, 埼玉, 2015 年 9 月
 16. **小坂田文隆**
高密度多電極アレー解析による網膜神経節サブタイプ特異的な機能変化. 生体機能と創薬シンポジウム 2015, 千葉, 2015 年 8 月
 17. **小坂田文隆**
視覚機能の再生に向けた治療開発と神経回路研究. 田辺三菱製薬, 横浜, 2015 年 6 月

〔図書〕(計 2 件)

1. **Osakada F** (Corresponding author), Takahashi M.
Stem cells in the developing and adult nervous system.
Regenerative Medicine -from Protocol to Patient- 3rd edition, Springer, 123-149 (2016) 査読無
2. **小坂田文隆**、高橋政代
網膜
臨床薬学テキストシリーズ バイオ医薬品と再生医療, 中山書店 (2016)

〔産業財産権〕

なし

出願状況 (計 0 件)

名称 : 該当なし

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 0 件）

名称：該当なし
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小坂田 文隆 (OSAKADA, Fumitaka)
名古屋大学・大学院創薬科学研究科
准教授
研究者番号：60455334

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし
()