

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06473

研究課題名(和文) 霊長類視覚トップダウン結合のin vivo二光子イメージング

研究課題名(英文) In vivo two photon imaging of visual top-down connection in primates

研究代表者

松井 鉄平 (Matsui, Teppei)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：10725948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の技術的目標のうち重要な要素は2つある。1つはマイクロレベルでの機能解析を可能にするためにマーモセット神経細胞にGCaMPを発現させ、神経活動を観察する実験系を構築することである。現在では、プロモーターの選択によりマーモセットV1で良好なGCaMP6の発現が得られている。2つ目の技術的目標は、カラムレベルの機能解析を行う実験系を構築することである。これについては、血流由来の内因性シグナルを光学的に観察する方法が適用可能であることを確かめた。更に、カルシウムイメージングでカラムレベルの神経活動を観察することに成功した。これらの成果を組み合わせることでトップダウン信号の機能解析が可能である。

研究成果の概要(英文)：There were two technical challenges that need to be overcome. First goal was to establish a method to express GCaMP in marmoset cortical neurons at a level sufficient for in vivo imaging. We accomplished this goal by finding an appropriate promoter for driving GCaMP expression in marmoset neurons. Second goal was to have columnar level functional mapping over marmoset visual cortex. We confirmed that traditional intrinsic signal optical imaging can meet this goal. We further established a wide-field calcium imaging technique that far exceed the intrinsic signal imaging in both temporal resolution and signal to noise ratio. Combination of these two techniques will enable functional mapping of top down signal in the marmoset visual cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：視覚 二光子 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む霊長類の視覚システムは階層性を持つ複数の皮質領野と視床領野が双方向的に結合して作る複雑なネットワークである。このうち、トップダウン結合も低次視覚皮質の活動に大きく影響していることが先行研究から示されている。高次視覚皮質からのトップダウン結合は V1 の特徴抽出機能を補助する役割があると考えられている。従来の手法では、「受け手側の V1 の機能マップに対して、どのような視覚反応特性を持つトップダウン結合が、どのように分布するか」という機能と結合の関係を高精度で調べることが出来なかった。

ヒトを含む霊長類の視覚システムは階層性を持つ複数の皮質領野と視床領野が双方向的に結合して作る複雑なネットワークである(Fellman & Van Essen 1991)。このうち、低次視覚皮質から高次皮質皮質へのボトムアップ結合は、複雑な視覚反応特性の獲得に役立つと考えられており、その機能獲得に関わる神経回路も明らかになりつつある(Ried & Alonso, 1996; Glickfeld et al., 2013; Matsui & Ohki, 2013)。

また、トップダウン結合も低次視覚皮質の活動に大きく影響していることが先行研究から示されている。サルやネコにおいて、動きの知覚に関連する高次視覚皮質の活動を阻害すると、V1 の細胞で物体の動きに対する反応選択性が変化することが分かっている(Hupe et al., 1998; Galuske et al., 2002)。このことから、高次視覚皮質からのトップダウン結合は V1 の特徴抽出機能を補助する役割があると考えられている。一方、高次視床の一つ Pulvinar の活動を阻害すると V1 の視覚反応そのものが激減する為、Pulvinar から V1 への視床-皮質間トップダウン結合は、V1 の活動をゲーティングすると考えられる(Purushothaman et al., 2012)。

このようなトップダウン結合の機能を生み出す神経回路を理解するには、「どのような視覚情報が、どのような視覚反応性を持つ神経細胞または機能カラムに入力しているか」を明らかにする必要がある。皮質皮質間のトップダウン結合に関しては、内因性シグナルイメージングで調べた機能カラム単位での機能マップ (e.g. 方位マップ) と皮質皮質間の解剖学的結合とを対応させることが試みられてきたが、統一的な見解は得られていない(Angelucci et al., 2002; Stettler et al., 2002; Shumuel et al., 2005)。高次視床では類似の先行研究は無く、何も分かっていない。これらの研究が難しかった原因は、従来の手法では、「受け手側の V1 の機能マップに対して、どのような視覚反応特性を持つトップダウン結合が、どのように分布するか」という機能と結合の関係を高精度で調べることが出来なかったことにある。

近年、申請者らの研究から、軸索末端の二光子カルシウムイメージングにより機能と結

合の対応関係を調べることが可能になった (Matsui & Ohki, 2013)。同様の手法によりマウスでは視床から皮質への軸索の機能解析も行われているが、その軸索からの入力を受け取る細胞の機能特性を明らかにすることは、未だ技術的に困難である (Kondo & Ohki, 2015)。これは、機能カラム構造を持たないマウスでは、受け手側の機能を個々の細胞レベルで調べる必要があるからである。そこで申請者は、機能カラム構造を持つ霊長類において、軸索末端の二光子イメージングと内因性シグナルイメージングを組み合わせ、視覚反応特性を調べたトップダウン結合軸索末端 (入力側) の V1 機能マップ (受け手側) 上の分布を調べることで、入力側と受け手側の視覚反応特性の対応関係を正確に同定することが可能だとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、軸索末端の二光子イメージングと内因性シグナルイメージングを組み合わせ、視覚反応特性を調べたトップダウン結合軸索末端 (入力側) の V1 機能マップ (受け手側) 上の分布を調べることで、入力側と受け手側の視覚反応特性の対応関係を正確に同定する。また、そのために必要な新規の技術を開発し、それらが実際にマウモセットにおいて実用的であることを確認する。

3. 研究の方法

広範囲の内因性シグナルイメージングによりマウモセットの V1 および、動きの検出に特化した高次視覚皮質 (MT) の位置を同定し、そこにアデノ随伴ウイルス (AAV) を注入して MT の神経細胞にカルシウム感受性タンパク (GCaMP6s) を発現させる。マウモセットにおいては GCaMP を使った実験の報告がほとんど無いため、実際の *in vivo* イメージングで実用的なレベルで神経細胞に GCaMP を発現させる手法を開発することが重要である。次にトップダウン結合の視覚反応特性 (方位選択性、時空間周波数選択性、レチノトピー) を、V1 に分布する軸索末端で二光子イメージングを行うことで調べる。これらの実験と同時に、内因性シグナルイメージングを用いて V1 における機能マップ (e.g. 方位選択性) を調べることで、視覚反応特性を調べた軸索末端が V1 の機能マップ上でどのように分布するのかという空間的対応関係を明らかにする。

4. 研究成果

本研究はマウスで開発が進んでいる最新の光学的神経活動観察法をマウモセットに適用することで、これまで調べることが出来なかった神経機能を解析する研究である。したがって、本研究の重要な要素、また最も困難な部分は技術的なものである。本研究の技術的目標のうち重要な要素は2つある。そのうち一つはミクロレベルでの機能解析を可能

にするためにマーモセット神経細胞に GCaMP を発現させ、神経活動を観察する実験系を構築することである。当初マウスで行われているのと同様の手法をそのままマーモセットに適用していたが、これはうまくいかなかった。マーモセットの大脳皮質ではマウスの大脳皮質と異なり通常のプロモーターでは神経細胞に GCaMP6 を発現させることが難しかった。現在では、Thy1 と ttA プロモーターの組み合わせによりマーモセット V1 で良好な GCaMP6 の発現が得られることを確認している (Matsui et al., unpublished; 下図)。これにより、一つ目の技術的目標は達成されたと言える。

2 つ目の技術的目標は、カラムレベルの機能解析を行う実験系を構築することである。これについては、先行研究で用いら

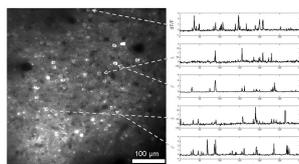


図6 マーモセットV1におけるGCaMP6発現細胞の自発発火活動 (松井、上村、橋本、大木 未発表データ)

れていたような血流由来の内因性シグナルを光学的に観察する方法が適用可能であることを確かめた。我々の研究では更に、GCaMP による 1 光子イメージングで、広範囲 (10 mm x 10 mm) に渡ってカラムレベルの神経活動を観察することに成功した。予想された通り、マーモセット V1 では密に方位選択性カラムが存在した。また、それ以外にも白黒の点滅を視覚刺激に用いた際に Cytochrome Oxidase Blob と思われる斑点状の構造が確認された。このことにより、当初考えていた方位選択性以外に点滅刺激に対する反応性を観察するというオプションが出来た。また、V2 においてもマカクで良く知られている Cytochrome Oxidase Stripe に相当する構造を確認することが出来た。更に、V1 と V2 にまたがった観察範囲で視覚刺激を見せていない状態での自発的脳活動を観察し、Matsui et al. PNAS (2016)にある方法で解析を行ったところ、自発的活動のみからでも V1 と V2 の境界や構造をある程度特定できることが示唆された。これは、1 つ目の技術的目標の副産物と言えるものであったが、GCaMP は非常にシグナルが強いため、従来の内因性シグナルを用いる方法では数時間かかっていたレベルのデータを取得するのに数十分で足りるということが分かった。これにより 2 つ目の技術的目標も達成された。

更に、マーモセットにおいて広範囲で見た自発的な神経活動は、Matsui et al. PNAS (2016)で報告したようなマウスの自発活動の構造とは異なり、マーモセット視覚野のカラム構造 (マウスには存在しない) を反映したように、複数のパッチ状の活動領域が広範囲で協調的に活動する様子が見られた。このようなパッチ状の自発活動は二光子イメージングでも観察することができており、二光子

イメージングで得た方位選択性カラムと自発的に活動するパッチとの間に空間的な類似性が見られることも確認できている。しかしながら、マーモセットの V1 には方位選択性カラム以外にも、少なくとも空間周波数カラム、眼優位性カラム、Cytochrome Oxidase Blob が存在することから、自発的活動から見えるパッチ状の構造が方位選択性カラムのみを反映しているのか、それ以外のカラムの構造も反映したものなのかは、現時点では不明である。このことに関しては、方位選択性のマッピング以外に空間周波数等のマッピングを付け加えることにより回答が得られるものと考えている。

このように、2 年間の研究期間は 2 つの技術目標を達成するのに費やされた。これらの技術目標は、今までマウス以外の動物ではほとんど適用されたことが無い技術であり、また、マーモセットにおいては初めて適用された技術であることを考えると、2 年間で達成した成果としては大きいと考える。また、ここで開発した手法を単純に組み合わせることによりトップダウン信号の分布パターンを調べることは可能なので、当初の研究目標の最も困難な部分は達成されたと言えるだろう。

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. Matsui T, Murakami T, Ohki K. Transient neuronal coactivations embedded in globally propagating waves underlie resting-state functional connectivity. **PNAS**, 113(23):6556-61.
2. Koyano KW, Takeda M, Matsui T, Hirabayashi T, Ohashi Y, Miyashita Y. Laminar Module Cascade from Layer 5 to 6 Implementing Cur-to-Target Conversion for Object Memory Retrieval in the Primate Temporal Cortex. **Neuron**, doi: 10.1016/j.neuron.016.09.24.
3. Murakami T, Yoshida T, Matsui T, Ohki K. Wide-field Ca²⁺ imaging reveals visually evoked activity in the retrosplenial area. **Frontiers in Neural Circuits**, doi:10.3389/fnmol.2015.00020.

[学会発表](計 2 件)

1. Matsui T, Murakami T, Ohki K. 安静時機能結合の動的・静的な変化は一過性の神経活動の空間パターンで説明される, 日本神経科学大会 Neuro2016, 横浜, 2016 年 7 月
2. Matsui T, Murakami T, Ohki K. 広域カルシウムイメージングにより調べた刺激誘

発性および自発的大脳皮質活動の関係,
日本神経科学大会 Neuro2015, 神戸,
2015年7月

〔図書〕(計 0 件)

〔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
特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 鉄平 (MATSUI, Teppei)
東京大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 10725948

(2) 研究分担者

(なし)

(3) 連携研究者

(なし)

(4) 研究協力者

(3人)

村上 智成 (MURAKAMI, Tomonari)
橋本 卓之 (HASHIMOTO, Takayuki)
上村 正人 (UEMURA, Masato)