

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07360

研究課題名(和文) TE野の神経細胞が表現する図形特徴と受容野の形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Formation mechanisms of object feature and receptive field in area TE neurons

研究代表者

中道 友(Nakamichi, Yu)

山陽小野田市立山口東京理科大学・工学部・助教

研究者番号：70586164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、視覚情報処理の最終段であるTE野の表現する図形特徴と受容野の形成メカニズムを解明することを目的とし研究を行った。オプトジェネティクスを利用した皮質間機能的コネクトーム計測法(opto-OISI)を開発し、マカクサルTE0野(TE野の前段の領野)-TE野に適用することによって、TE0野からTE野へのdivergentな投射の空間パターンを可視化できた。また、opto-OISIにより結合を持つTE0野とTE野の神経細胞ペアをin vivoで同定することが可能であることを示し、それぞれの応答特性を比較からTE野の表現する図形特徴と受容野の形成メカニズムの解明が可能であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したopto-OISIは、これまで困難であった異なる皮質間で結合する細胞ペアのin vivoでの同定を可能にするため、本研究で対象としたTE0-TE野だけでなく、様々な領野で用いられる一般的な手法となり得る。また、過去の解剖学研究と本研究で明らかになったTE0野からTE野へのdivergentな投射を考えると、TE0野-TE野ではdivergentな結合とconvergentな結合が混在することが示唆される。これは視覚情報処理を理解するための1つの知見であり、今後の視覚情報処理に関する研究をデザインする上でも有用な情報であると言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanisms of how object feature and receptive field of neurons are formed in area TE, the final stage of visual information processing. We developed a novel technique to measure cortico-cortical functional connectome using optogenetics (opto-OISI) and applied opto-OISI to areas TE0 and TE in macaque monkeys. The opto-OISI revealed spatial patterns of divergent projections from areas TE0 to TE and enabled us to identify connected pairs of neurons between areas TE0 and TE in vivo, suggesting that it is possible to understand the formation mechanisms of object feature and receptive field in area TE by comparing neural activities of the identified pairs of neurons between areas TE0 and TE.

研究分野：脳科学, 医工学, 光計測

キーワード：視覚 TE野 TE0野 光内因性信号イメージング オプトジェネティクス opto-OISI 脳機能イメージング
顔認知

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

私たちが見た物体の視覚情報は、網膜から V1, V2, V4, TEO 野を経て、視覚情報処理の最終段である TE 野に運ばれる。このとき、各領野の神経細胞が符号化する図形特徴は次第に複雑化し、受容野も次第に大きくなることが知られている (図 1) [1][2]。また、V1 から TEO 野では神経細胞の脳上での位置と受容野の視野上での位置に対応関係 (レチノトピー) があるのに対して、TE 野ではこのレチノトピーが消失し^[3]、視野上のどこに物体が提示されても神経細胞は活動する。即ち、TE 野の神経細胞の応答特性は私たちの視覚能力に相当しており、TE 野の神経細胞の表現する図形特徴と受容野がどのようにして形成されるかを知ることは、私たちの物体認識メカニズムを知る鍵となり得る。しかし、これまで TE 野の神経細胞とその神経細胞に投射を持つ前領野 (TEO 野) の神経細胞のペアを同定し、この問題を探求した例は無い。

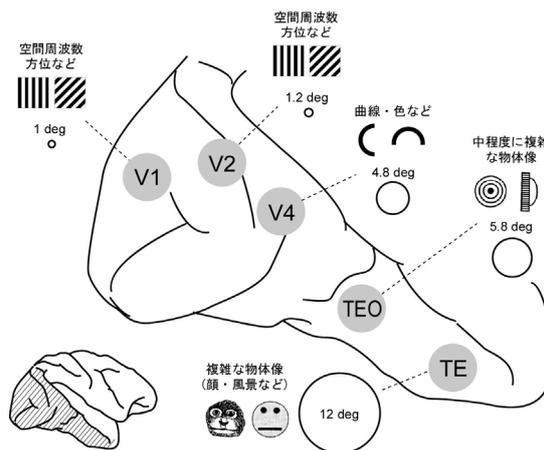


図 1 マカクサル腹側経路 (斜線部) における各領野の表現する図形特徴と受容野の大きさ。

2. 研究の目的

本研究では、オプトジェネティクス (optogenetics) を利用した新たな皮質間機能的コネクトーム計測法である opto-OISI 法を用い、マカクサル TEO 野と TE 野の間で結合を持つ神経細胞のペアを同定し、これらの神経活動の電気記録から TE 野の細胞が表現する図形特徴と受容野の形成メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

異なる領野間で結合している神経細胞のペアを *in vivo* で同定する既存の手法には、電気刺激で投射元の神経活動を誘起させ投射先で記録を行う方法や^[4]、蛍光トレーサーを用いた方法^[5]がある。しかし、前者は刺激部位付近を走る軸索も刺激してしまうため、結合する細胞ペアを正確に同定することが難しい。後者は正確な細胞ペアを同定することが可能であるが、複数の細胞ペアを知りたい場合、蛍光波長の異なる複数のトレーサーが必要となり、現実的に数個の細胞ペアしか同定することができない。即ち、既存の手法では領野間で結合している複数の細胞ペアを *in vivo* で同定することは困難である。そこで本研究では、オプトジェネティクスを利用した新たな皮質間機能的コネクトーム計測法である opto-OISI 法を用いる。この手法は、投射元の皮質の細胞体と樹状突起にのみ光活性化蛋白質であるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させ、光刺激により神経活動を誘起し、投射先の皮質にて光内因性信号イメージング (Optical intrinsic signal imaging ; OISI) で神経活動を記録する。これにより、電気刺激で挙げた軸索への刺激を回避するとともに、投射元の光刺激を行う位置と投射先の OISI で検出する神経活動部位の位置から、数の制限無く異なる皮質間の結合する細胞ペアを同定することができる (図 2)。本研究では TEO 野を投射元、TE 野を投射先として opto-OISI 法を適用し、TEO 野と TE 野の機能的な結合パターンの計測および同定した TEO 野-TE 野の細胞ペアの応答特性の比較から TE 野の神経細胞が表現する図形特徴と受容野の形成について検討を行う。

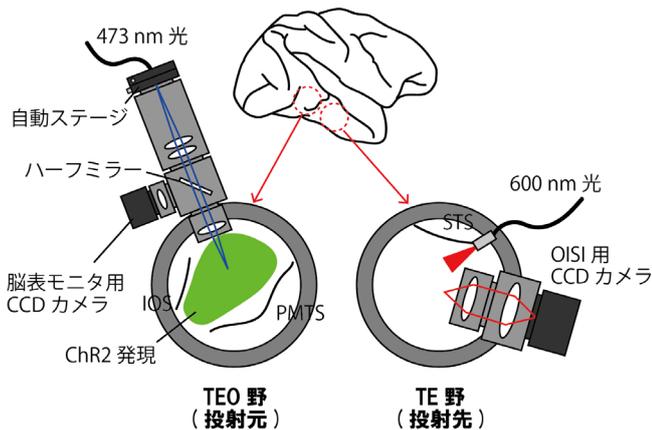


図 2 TEO 野-TE 野への opto-OISI 法の適用。TEO 野は複数個所にウイルスベクターを注入することにより ChR2 を広く一様に発現させる。脳表上の光刺激箇所はカメラによりモニタリングでき、光刺激箇所は自動ステージにより走査できる。TE 野ではタンデムレンズ光学系を用いた OISI 計測を行う。本研究の OISI システムは最大 $13.4 \times 10.1 \text{ mm}^2$ の範囲の神経活動部位をイメージングできる。

4. 研究成果

4-1. opto-OISI 法の確立

既知の結合パターンを持つマカクサル V1/V2 境界領域^[6]に opto-OISI を適用し、opto-OISI 法の検証を行った。右半球の V1/V2 境界領域にウイルスベクター (AAV9-CaMKII-hChR2 (ETTC)-Venus-MBD) を複数箇所注入し、細胞体と樹状突起にのみ広く ChR2 を発現させた。十分に ChR2 が発現した後、右半球の V1/V2 境界領域の複数箇所を光刺激したときの、左半球の V1/V2 境界領域の神経活動を OISI で計測した。図 3 に示すように、光刺激位置 (図 3a) に対して対象な位置に神経活動が検出され (図 3b)、レチノトピーを反映した結合パターンが得られた。しかし、同じ場所に投射する細胞や (刺激箇所①②)、広範囲に投射する細胞 (刺激箇所④) なども得られ、V1/V2 境界領域にも *divergent* な結合と *convergent* な結合があることが分かった。これらの研究成果は国際論文誌にて発表した (Yu Nakamichi, Kai Okubo, Takayuki Sato, Mitsuhiro Hashimoto, Manabu Tanifuji, Optical intrinsic signal imaging with optogenetics reveals functional cortico-cortical connectivity at the columnar level in living macaques, Scientific Reports, 9(1), 6466 (2019)).

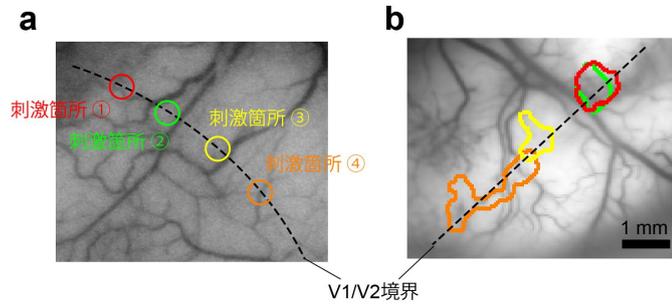


図 3 V1/V2 境界領域を利用した opto-OISI 法の検証。(a) 右半球の V1/V2 境界領域。V1/V2 境界に沿って 4 か所光刺激を行った。(b) 左半球の V1/V2 境界領域。線で囲まれた領域が OISI で検出した神経活動部位を示しており、それぞれの色は a の刺激箇所の色と対応している。

4-2. opto-OISI による TEO 野-TE 野の結合パターンの計測

TEO 野-TE 野に opto-OISI を適用し、TEO 野-TE 野の結合パターンを計測した。右半球の TEO 野にウイルスベクター (AAV9-CaMKII-hChR2 (ETTC)-Venus-MBD) を複数箇所注入し、細胞体と樹状突起にのみ広く ChR2 を発現させた (図 4a)。十分に ChR2 が発現した後、TEO 野の複数箇所を光刺激したときの、TE 野の神経活動を OISI で計測した (図 4b)。図 4c に示すように、異なる日 (day 1, day 2) に得られた実験結果が同様の結合パターンを示したことから、opto-OISI によって TEO 野から TE 野への投射を *in vivo* で可視化できていることが分かる。また、刺激箇所②に対する応答に注目すると、複数の箇所にて神経活動部位が得られたことから、TEO 野から TE 野には *divergent* な結合があることが示された。また、過去の解剖学の研究^[5]と本実験結果を考慮すると、TEO 野-TE 野には *divergent* な結合と *convergent* な結合の両者が混在することが示唆された。

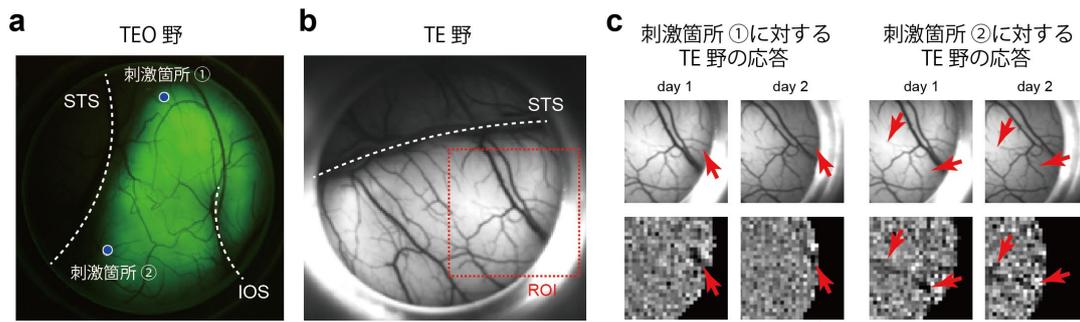


図 4 opto-OISI で計測した TEO 野-TE 野の結合パターン。(a) TEO 野の蛍光画像と刺激箇所。蛍光強度の強い部分に ChR2 が発現している。(b) TE 野の脳表写真。OISI 計測は図中の ROI に注目した。(c) TEO 野の光刺激に対する TE 野の応答。再現性の良い応答の得られたところに矢印を付している。

4-3. TEO 野-TE 野の結合する細胞ペアの電気記録

opto-OISI の結果に基づき同定した TEO 野-TE 野の結合する細胞ペアに対し、電気記録を行った。同定した TEO 野の細胞に光刺激を与えたところ、TE 野の細胞は与えた光刺激の周波数に対応した応答を示したことから、両者が結合していることが確認された (図 5a)。図 5b は両者の細胞の受容野を測定した結果であるが、図 1 に示したような TE 野の大きな受容野と、TEO 野の小さな受容野がそれぞれ検出された。また、顔、顔のパーツ、体、その他の生物、植物、自然物、人工物の 7 つのカテゴリから成る計 809 の刺激画像を用い、視覚刺激に対する TEO 野、TE 野の細胞の神経活動の電気記録から両者の応答特性を求めた。図 5c に示すように、TE 野の細胞は主に顔や顔のパーツに高い応答を示したが、TEO 野の細胞は顔だけでなく人工物にも高い応答を示した。図 5d のカテゴリ別の応答を見ると、TE 野の細胞は顔や顔のパーツに高い応答を示しているが、TEO 野の細胞は顔のパーツ以外の刺激に対して同程度の応答を示した。

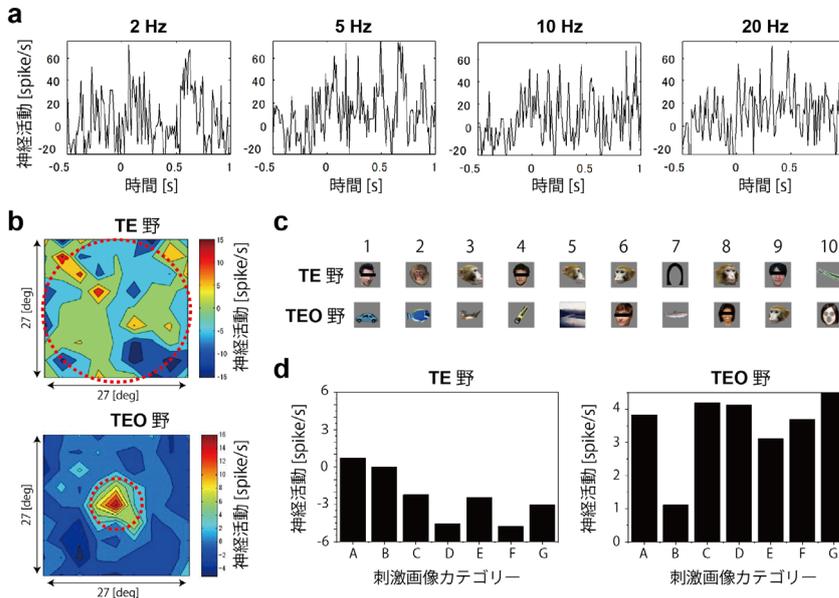


図5 TEO野-TE野の細胞ペアの電気記録。(a)TEO野の細胞に光刺激を与えたときのTE野の神経活動。(b)TE野とTEO野の細胞の受容野。(c)TE野とTEO野の細胞が最も大きな神経活動を示した上位10の刺激画像。(d)TE野とTEO野の細胞の応答特性。カテゴリ-A~Gはそれぞれ顔、顔のパーツ、体、その他の生物、植物、自然物、人工物を示す。

以上の4-1, 4-2から, 本研究によって opto-OISIにより TEO野-TE野を含む皮質間の機能的な結合パターンを計測可能であること, TEO野とTE野で結合する神経細胞のペアを同定可能であること, 結合する細胞ペアの応答特性を比較可能であることを示した。しかしながら, 本研究の目的であるTE野の表現する図形特徴と受容野の形成メカニズムの解明には至っていない。これにはTEO野とTE野の両者の脳の健康状態を維持することが難しいことと, opto-OISIの脳機能イメージングとして用いたOISIの信号検出感度が低かったことが課題として挙げられる。前者については, 研究開始当初において最も長期実験が可能と見込まれたチェンバー^[7]を使用した, さらに長期実験が可能なるチェンバーを調査あるいは新規に製作する必要があると考える。後者については, OISIは脳の深さ方向に積分された反射光を検出するため, 結果として得られるTE野の神経活動信号が小さくなったと考えられる。このため, OISIに代わる脳機能イメージングとして, 機能的OCT^[8]や超高空間分解能な機能的MRI^[9]など, 0.5 mm以下の空間分解能かつ神経活動信号を深さ方向に分解して検出する手法の導入が考えられる。以上より, チェンバーの改良などによる脳表の健康状態の維持と脳機能イメージングの高感度化により, TE野の表現する図形特徴と受容野の形成メカニズムの解明も可能となると考える。

4-3. その他の成果

上述の研究を遂行する中で, ①TE野における顔の角度の脳内表現イメージングと, ②OISIに代わる脳機能イメージングについて一定の研究成果が得られたため, 以下に簡単に説明する。

①TE野における顔の角度の脳内表現イメージング

TE野には顔の角度に対して応答する細胞が存在し, 顔の角度が変わるにつれそれらの脳表上での配置が徐々にシフトすることが知られている^[10]。しかし, 過去の研究ではある1つの顔に対する局所的な空間パターンしか分かっていた。本研究では, TE野のOISI計測を行う中で, 顔の角度に反応する細胞の広域なイメージングに成功した。図6に示すように, TE野に存在する顔に反応する細胞が集まる領域(顔パッチ)と考えられる領域にて, 顔の角度に対して反応する細胞が, その角度を変えながら徐々にシフトしながら分布の様子が検出された。

②OISIに代わる脳機能イメージング

OISIに代わる脳機能イメージングとして, 機能的OCTおよび機能的OCT Angiography(機能的OCTA)という新しい脳機能イメージングの検討を行い, 信号特性に関する基礎検討や実験結果(図7)について, 国内学会発表8件, 国際学会発表2件, 国際論文誌1件(Nakamichi Y, Chiu KS, Sun CW. Signal properties of split-spectrum amplitude decorrelation angiography for quantitative optical coherence tomography-based velocimetry, Biomedical Optics Express, 12(10), pp. 5955-5968 (2021))にて研究成果を発表した。

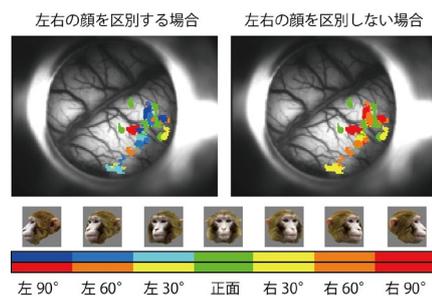


図6 マカクサルTE野における顔の角度マップ。

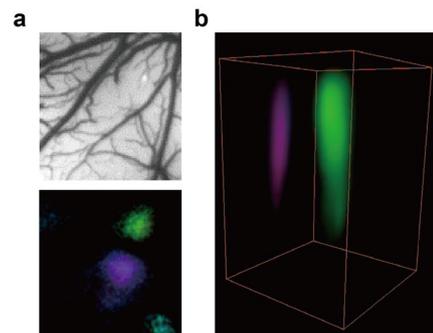


図7 ラットバレル皮質におけるOISI(a)と機能的OCTA(b)の計測結果。

引用文献

- (1) Kobatake E, Tanaka K, Neuronal selectivities to complex object features in the ventral visual pathway of the macaque cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, 71(3), pp. 856-867 (1994).
- (2) Kravitz DJ, Saleem KS, Baker CI, Ungerleider LG, Mishkin M, The ventral visual pathway: an expanded neural framework for the processing of object quality, *Trends in Cognitive Sciences*, 17(1), pp. 26-49 (2013).
- (3) Lafer-Sousa R, Conway BR, Parallel, multi-stage processing of colors, faces and shapes in macaque inferior temporal cortex, *Nature Neuroscience*, 16(12), pp. 1870-1878 (2013).
- (4) Suzurikawa J, Tani T, Nakao M, Tanaka S, Takahashi H, Voltage-sensitive-dye imaging of microstimulation-evoked neural activity through intracortical horizontal and callosal connections in cat visual cortex, *Journal of Neural Engineering*, 6(6), 066002 (2009).
- (5) Ichinohe N, Borra E, Rockland K, Distinct feedforward and intrinsic neurons in posterior inferotemporal cortex revealed by in vivo connection imaging, *Scientific Reports*, 2, 934 (2012).
- (6) Kennedy H, Dehay C, Bullier J, Organization of the callosal connections of visual areas V1 and V2 in the macaque monkey, *Journal of Comparative Neurology*, 247(3), pp. 398-415 (1986).
- (7) Li M, Liu F, Jiang H, Lee TS, Tang S, Long-term two-photon imaging in awake macaque monkey, *Neuron*, 93(5), pp. 1049-1057 (2017).
- (8) Nakamichi Y, Kalatsky VA, Watanabe H, Sato T, Rajagopalan UM, Tanifuji M, 3D topology of orientation columns in visual cortex revealed by functional optical coherence tomography, *Journal of Neurophysiology*, 119(4), pp. 1562-1575 (2018).
- (9) Cheng K, Exploration of human visual cortex using high spatial resolution functional magnetic resonance imaging, *Neuroimage*, 164, pp. 4-9 (2018).
- (10) Wang G, Tanaka K, Tanifuji M, Optical imaging of functional organization in the monkey inferotemporal cortex, *Science*, 272(5268), pp. 1665-1668 (1996).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yu Nakamichi, Kai-shih Chiu, Chia-Wei Sun	4. 巻 12
2. 論文標題 Signal properties of split-spectrum amplitude decorrelation angiography for quantitative optical coherence tomography-based velocimetry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 5955-5968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/BOE.432297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yu Nakamichi, Kai Okubo, Takayuki Sato, Mitsuhiro Hashimoto, Manabu Tanifuji	4. 巻 9
2. 論文標題 Optical intrinsic signal imaging with optogenetics reveals functional cortico-cortical connectivity at the columnar level in living macaques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42923-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中道友
2. 発表標題 光干渉断層血管撮影（OCT Angiography）を用いた皮膚生理機能の3次元イメージング
3. 学会等名 日本生体医工学会 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中道友, 川崎悟史
2. 発表標題 光干渉断層血管撮影を用いた皮膚の微小循環応答の3次元マイクロ計測
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Nakamichi
2. 発表標題 Three-dimensional detection of hemodynamic changes in skin microcirculation by optical coherence tomography-angiography
3. 学会等名 The 2nd joint meeting of ESCHM-ISCH-ISB 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中道友, Kai-Shih Chiu
2. 発表標題 光干渉断層血管撮影の信号特性の解明と血流速の定量化に関する研究
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kai-Shih Chiu, 谷藤学, Chia-Wei Sun, 中道友
2. 発表標題 機能的OCT Angiographyによる血管網と脳神経活動の同時計測法の開発
3. 学会等名 日本機械学会 2020年度年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川崎悟史, 中道友
2. 発表標題 光干渉断層血管撮影を用いた皮膚機能イメージング法の開発
3. 学会等名 日本機械学会 中国四国学生会第51回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Nakamichi, Manabu Tanifuji
2. 発表標題 Functional optical coherence tomography with Fourier imaging reveals three-dimensional and micro-scale brain functional structure
3. 学会等名 日本生物物理学会 第57回年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中道友, Kai-Shih Chiu
2. 発表標題 Micro-tomographic imaging of brain function using functional optical coherence tomography
3. 学会等名 日本生体医工学会 第59回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中道友, Valery A. Kalatsky, 渡邊秀行, 佐藤多加之, Uma Maheswari Rajagopalan, 谷藤学
2. 発表標題 機能的干渉断層画像法とフーリエイメージングによる脳機能の3次元マイクロ計測
3. 学会等名 日本機械学会 2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kai-Shih Chiu, 谷藤学, Chia-Wei Sun, 中道友
2. 発表標題 干渉断層血管撮影に基づく3次元脳機能イメージング
3. 学会等名 日本機械学会 第30回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

光を使って神経回路をトレースする - 霊長類の脳機能メカニズムの解明に向けて -
https://www.riken.jp/press/2019/20190522_2/index.html
A new window into macaque brain connections
https://www.eurekalert.org/pub_releases/2019-04/r-anw042319.php

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
その他の国・地域	国立陽明交通大学(台湾)			
その他の国・地域	国立交通大学(台湾)			