

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32823

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14838

研究課題名（和文）霊長類脳における島皮質の機能的神経ネットワークマップの構築

研究課題名（英文）Functional mapping of primate insular cortical areas based on their neural networks

研究代表者

上園 志織（Uezono, Shiori）

東京医療学院大学・保健医療学部・助教

研究者番号：30755666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：霊長類の島皮質は細胞構築の違いから大きく3つの亜領野（無顆粒性島皮質、不全顆粒性島皮質、顆粒性島皮質）に分類される。大脳基底核からそれぞれの亜領野への多シナプス性の入力様式を明らかにするために、小型霊長類であるマーモセットを実験動物とし、島皮質の3つの亜領野に、それぞれ異なる蛍光タンパク質を発現する狂犬病ウイルスベクター（逆行性越シナプス神経トレーサー）を注入した。大脳基底核の線条体、淡蒼球外節、視床下核においてニューロンラベルが認められ、類似した分布傾向が見られた。大脳基底核からの入力様式は島皮質全体で類似していることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでマーモセット島皮質の線維連絡に着目した研究は国内、外において無く、マカクザルを含む他の霊長類動物においても島皮質の線維連絡に関する報告は少ない。本研究により得られた解剖学的知見は、生理学的研究や脳機能イメージングなどによる島皮質の研究にも有用であると考えられ、摂食、情動、報酬系などの多種多様な機能に關与する島皮質の情報処理様式の解明に貢献できると考えられる。さらに、島皮質は統合失調症やパニック障害などといった精神神経疾患への関連性が示唆されていることから、本研究結果が推進する島皮質機能の神経メカニズム解明は、これらの精神疾患の病態解明や治療法の開発などにもつながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The insula cortex is subdivided into three major cytoarchitectonic domains: the agranular (Ia), dysgranular (Id), and granular insular cortices (Ig). In the present study the Ia, Id and Ig in common marmosets were injected separately with the rabies viral vectors expressing RFP, mAG or GFP to investigate how the primate insula cortex connects multisynaptically with the basal ganglia. After the vector injections, the labeled neurons were located on the dorsal striatum, external segment of the globus pallidus and subthalamic nucleus. Similar neural labeling distributions following injections into three insular cortices were observed in the basal ganglion, suggesting that multisynaptic inputs from the basal ganglia of the three insular cortices were basically similar.

研究分野：神経解剖学

キーワード：霊長類 大脳基底核 島皮質 神経路 ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の島皮質は感覚野、運動野、連合野、辺縁系や、大脳基底核、視床などのさまざまな領域と双方向的に連絡していることが報告されており (Augustine, 1996) 恒常性、摂食、情動、報酬系などの制御に寄与し、その機能は多岐にわたると考えられている。島皮質は細胞構築の違いから大きく3つの亜領野、すなわち無顆粒性島皮質 (Ia)、不全顆粒性島皮質 (Id)、顆粒性島皮質 (Ig) に分類され、受容する感覚情報や関与する機能が亜領野ごとに異なることが神経生理学的および神経解剖学的研究や positron emission tomography (PET)、機能的核磁気共鳴画像 (fMRI) などの脳画像研究やメタ解析により示唆されている。しかし、島皮質における情報処理様式や機能の細分化に関する研究は断片的である。例えば、fMRI の研究から島皮質の前部は報酬系や中毒性と強い関連性が示唆されているが、空腹感や内臓の運動など摂食に関連する領域ははっきり特定されていないなど、不明な点も多く存在する。また、島皮質の分類に細胞構築の違い (Ia、Id、Ig) を用いているか、細胞構築を無視して前部・中部・後部と分類しているかは報告によって異なり、一貫性がない。島皮質が果たす役割を明らかにするためには、島皮質の線維連絡に関する一貫性のある網羅的研究が必要不可欠であり、それぞれの機能に関わる神経ネットワークを細胞レベルで明らかにする必要がある。例えば、さまざまな種類の運動・認知機能の調節に関与している大脳基底核との連絡については断片的である。大脳基底核は視床を介して大脳皮質に入力し、いわゆる大脳皮質-大脳基底核ループ回路を形成している [図1] が、大脳基底核から島皮質への多シナプス性入力に関する報告は霊長類を含め、哺乳類全体を通して存在しない。

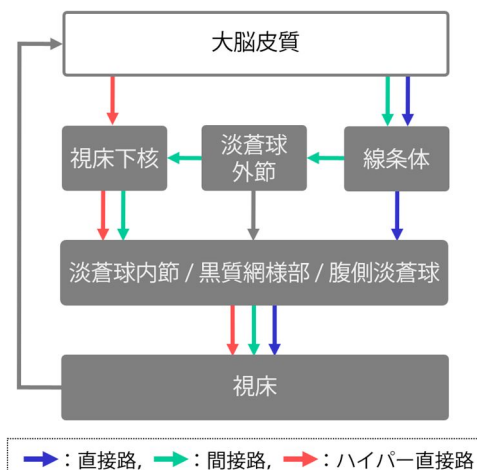


図1 大脳皮質-大脳基底核ループ回路の概略図 (Takada et al., 2013) 参考

2. 研究の目的

(1) 本研究は、小型霊長類であるマモセットを実験動物とし、神経トレーサーの注入により島皮質の入力および出力系のネットワークを明らかにすることで、包括的に島皮質の機能を示すことを最終的な目的とする。今回の研究では、大脳基底核から島皮質への多シナプス性入力様式を明らかにするために、マモセットの島皮質の3つの亜領野 (Ia、Id、Ig) に狂犬病ウイルスベクター [図2] を注入した。

(2) 近年島皮質はさらに細かく分類されつつあり (Evrard, 2019) 神経トレーサーをより限局的かつ正確に注入することが可能になれば、島皮質の線維連絡についてより包括的に解明することができる。MRI の脳画像とトレーサー注入部位の同期をより精密にすることを目的として、MRI および注入実験に使用する脳定位装置の改良と実験プロトコルの検討、改善を行なった。

3. 研究の方法

(1) 狂犬病ウイルスベクターの注入実験：大脳基底核から島皮質への多シナプス性入力様式を明らかにするために、マモセットの島皮質に逆行性越シナプス神経トレーサーである狂犬病ウイルスベクター [図2] を注入した。研究協力者の研究室では、異なる蛍光タンパク質 (RFP、mAG、GFP) を発現する狂犬病ウイルスベクターの開発、改良に成功している。島皮質の3つの亜領野 (Ia、Id、Ig) にそれぞれ異なる蛍光タンパク質を発現する狂犬病ウイルスベクターを注入した。特に、3シナプス性を入力を明らかにするため、3次ニューロンまで蛍光タンパク質を発現するように生存期間を3日設けたのち、灌流固定して脳を摘出した。摘出した脳を蛍光実体顕微鏡で観察し、3種類の蛍光タンパク質が発現していることを確認した。厚さ 40μm の脳の連続切片を作製し、免疫組織化学染色によりラベルニューロンを可視化した。注入部位を確認し、それぞれ3つの亜領野 (Ia、Id、Ig) を中心に注入されていることを確認した。大脳基底核のうち大脳皮質に3シナプス性を入力するニューロンが存在する線条体、淡蒼球外節、視床下核について、ニューロン

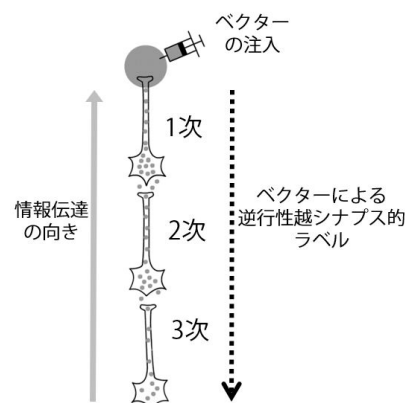


図2 狂犬病ウイルスベクターによる逆行性越シナプス的トレーシング

ラベルの解析を行なった。

(2) MRI による脳画像取得と注入実験のプロトコルの改善および検討：実験開始時は、MRI と注入実験とで異なる脳定位装置を使用していたため、脳画像と実際の注入部位に誤差が生じるリスクがあった。また研究協力者の研究室では、マカクザルへの注入実験の際に、動物手術支援ナビゲーションシステムである Brainsight を使用していたが、マーモセットの脳定位装置には、このシステムを有効活用するためのマーカーパーツが存在しなかった。MRI および注入実験で共通の脳定位装置を使用するとともに、マーモセットの注入実験に Brainsight を導入するために、新規マーカーパーツの設計、および従来使用していた脳定位装置の改良を行なった。ディスカッションは主に遠隔で行ない、新規のマーカーパーツおよび脳定位装置を用いて、トレーサー注入実験を行ない、実用化を進めた。

4. 研究成果

(1) 狂犬病ウイルスベクターの注入実験：島皮質の3つの亜領野をターゲットとして、異なる蛍光タンパク質を発現する狂犬病ウイルスベクターを注入した。大脳基底核のニューロンラベル分布を解析した結果、線条体、淡蒼球外節、視床下核においてニューロンラベルが認められ、それらの分布領域は類似していた。島皮質は亜領野ごとに異なる線維連絡をもつことが報告されているが、大脳基底核からの多シナプス性の入力については、島皮質全体を通して類似している可能性がある。

実体顕微鏡下で観察した結果、3種類の蛍光タンパク質が発現していることが確認できた。3種類の蛍光タンパク質は一部類似しているが、それぞれ異なる領域に発現しており、本研究で用いられた狂犬病ウイルスベクターがマーモセット脳の多重ラベル実験に有用なツールであることが証明された。

線条体のニューロンラベル：Ia、Id、Ig いずれの注入においても、辺縁系領域とされる腹側線条体に加えて、背側線条体である尾状核と被殻においてラベルニューロンが観察された〔図3〕。Iaへの注入では、主に尾状核、被殻の前部を中心に多くのラベルニューロンが観察された。Id、Igへの注入では、後部の尾状核と被殻でも多くのラベルニューロンが観察された。尾状核と被殻のニューロンラベルはいずれの亜領野の注入でも連合野領域とされる腹内側部に多く分布している傾向があった。マカク島皮質から線条体への連絡については、Iaのニューロンは主に線条体の腹内側部（辺縁系領域）に入力し、Igは背外側部（感覚運動系領域）に入力し、Idはその中間に入力すると報告されている（Chikama et al., 1997）。しかし、本研究で明らかになった線条体から島皮質への多シナプス性の入力については、亜領野間で類似している可能性が示唆された。

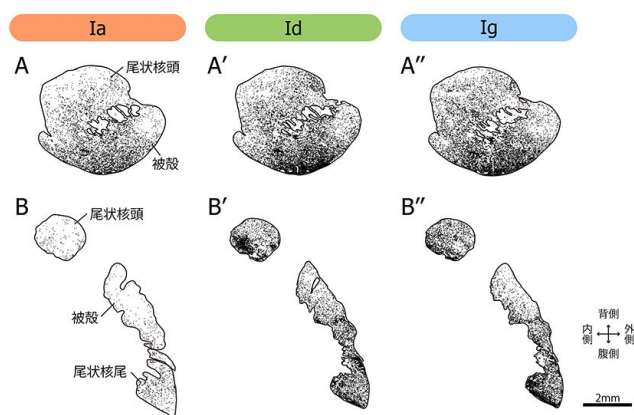


図3 線条体におけるラベルニューロンの分布

淡蒼球外節のニューロンラベル：Ia、Id、Ig いずれの注入においても、淡蒼球外節にラベルニューロンが認められた〔図4〕。淡蒼球外節のラベルニューロンの多くは、辺縁系領域とされる前部腹内側部と後部腹側縁部、そして連合系領域とされる前部背外側部と後部背内側部に多く観察された。Idへの注入については、前述の分布域に加え、感覚運動系領域とされる中間部および後部の背外側部においても、他の注入例に比べて、比較的多くのラベルニューロンが分布していた。線条体と同じく、淡蒼球外節から3つの亜領野への連絡は類似していることが示唆された。

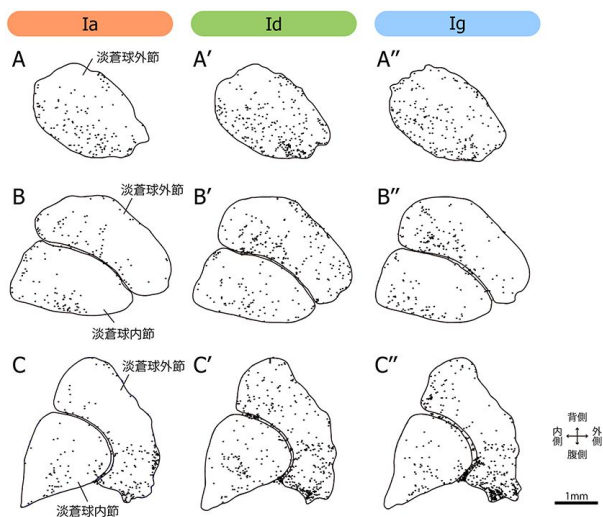


図4 淡蒼球におけるラベルニューロンの分布

視床下核のニューロンラベル：Ia、Id、Ig いずれの注入においても、ニューロンラベルは視床下核の広い範囲に観察された〔図5〕。Ia、Ig への注入では、特に視床下核内の辺縁系領域とされる内側部と、連合・眼球運動系領域とされる腹側部にニューロンラベルが多い傾向が見られた。一方、Id は内側部、腹側部に加え、感覚運動系領域とされる視床下核背側部にも多くのニューロンラベルが観察された。

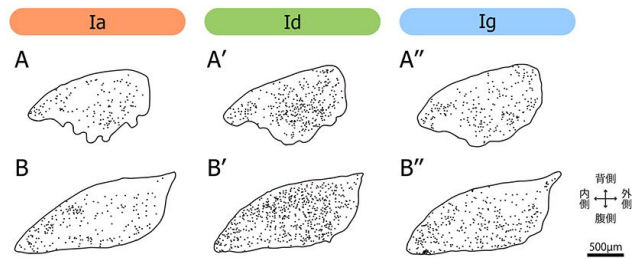


図5 視床下核におけるラベルニューロンの分布

(2) MRI による脳画像取得と注入実験のプロトコルの改善および検討：MRI で撮像した脳画像と注入実験の際に Brainsight と同期できるように、脳定位装置に装着するマーカーパーツを新しく設計した。必要な脳領域に合わせて、移動できるよう可動性を持たせた。加えて、MRI の際に使用する脳定位装置を注入実験に使用する実験台に設置できるように改良した。これにより、マーマセット頭部を脳底装置から固定したまま、MRI と注入実験を連続して行えるようになった。また、マーマセットへの負担を最小限に抑えるために、MRI の撮像プロトコルおよび麻酔を再検討した。新規の脳定位装置を用いてトレーサー注入実験を行ない、実用化を進めた。本研究の一環として改良された MRI - トレーサー注入実験プロトコルは、島皮質に限らずほかの脳領域の研究にも生かされることが期待される。

<引用文献>

- AUGUSTINE, James R. Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. *Brain research reviews*, 1996, 22.3: 229-244.
- TAKADA, Masahiko, et al. Elucidating information processing in primate basal ganglia circuitry: a novel technique for pathway-selective ablation mediated by immunotoxin. *Frontiers in neural circuits*, 2013, 7: 140.
- EVARD, Henry C. The organization of the primate insular cortex. *Frontiers in neuroanatomy*, 2019, 13: 43.
- CHIKAMA, Masanori, et al. Insular cortical projections to functional regions of the striatum correlate with cortical cytoarchitectonic organization in the primate. *Journal of Neuroscience*, 1997, 17.24: 9686-9705.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	高田 昌彦 (TAKADA Masahiko)		

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
---------	---------