

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430023

研究課題名(和文) 新しい遺伝子導入法を用いた、上丘を中心とした盲視の神経経路の解明

研究課題名(英文) Study about the superior colliculus related neural pathway for blindsight by using new genetic method

研究代表者

木下 正治 (Kinoshita, Masaharu)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60599083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：片側の一次視覚野を除去した盲視モデルマカクザル2頭を用いて実験を行った。逆行性ウイルスベクター-FuGB2を視床枕に注入し、さらに順行性ベクター-AAVを上丘に注入する二重遺伝子導入法を用いて上丘から視床枕への神経経路選択的に破傷風毒素の遺伝子を導入し、ドキシサイクリン(Dox)の経口投与により上丘-視床枕経路選択的に神経伝達を遮断した。Dox投与前と投与中に視覚刺激誘導性サッケード課題をサルに行わせた結果、調べた2頭で損傷視野における課題の成績はDox投与中に有意に低下した。これらの結果から盲視サルにおける視覚情報の伝達経路として上丘から視床枕への経路が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Two blindsight model monkeys, whose primary visual cortex (V1) was removed unilaterally, were used in this study. For the pathway specific blockade of the superior colliculus (SC) to pulvinar pathway, the retrograde vector was injected into the pulvinar and the anterograde vector was injected into the SC. After the vector injections, doxycycline (Dox) was administered to block the synaptic transmission of the double infected SC neuron, which projected to the pulvinar. The performance of the visually guided saccade task in the affected visual field of V1 lesion was significantly decreased during the Dox administration period than the performance before Dox administration in two monkeys. These results suggest that the SC to pulvinar pathway at least partly mediates the visual information signal for the blindsight.

研究分野：神経科学

キーワード：盲視 視床枕 上丘 マカクザル 遺伝子導入 サッケード ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質第一次視覚野(V1)を損傷した患者は、その損傷部位に対応する視野に呈示された対象を視覚的に意識することが出来ない。しかし、その見えないはずの視野にある対象を指さしたり、あるいは視線を向けたりする定位行動を出来る場合がある。このような現象は盲視(Weiskrantz, Oxford, 1986)と呼ばれており、視覚的意識とは何かを考える上で重要な現象であると考えられているが、その神経基盤については未解明な問題が多く残されている。片側V1を除去したマカクザルにおいても、V1損傷領域に対応する(見えないはずの)視野に提示した視覚刺激に対しても視線を向けるサックード運動を行うことが出来ることが報告されており(Yoshida M et al, *J. Neurosci*, 2008)盲視のモデル動物として研究が行われている。

このように視覚的意識を伴わない視覚情報処理である盲視の神経基盤として、V1を経由しない残存視覚経路、特に網膜から直接入力を受ける中脳上丘が重要であることが報告されている(Kato R et al, *Eur. J. Neurosci*, 2011)。しかし上丘以降の神経経路として従来から提唱されていた上丘-視床枕-高次視覚皮質の系が重要なのか、上丘-外側膝状体-高次視覚皮質の系が重要(Schmid MC et al, *Nature*, 2010)なのか議論が分かれていた。

ある機能が特定の神経経路に依存していることを検証するための方法として、GABAアゴニストであるムシモル等の薬物微量注入による不活性化実験が広く行われている。しかし薬理的な不活性化法では複数の経路からの入力が収束している領域の場合、どの経路からの入力が重要であるのかを示すことは難しい。近年2種類のウイルスベクターを用いて経路選択的に神経伝達を遮断する二重遺伝子導入法を筆者らは開発し報告している(Kinoshita M et al, *Nature*, 2012)。

2. 研究の目的

盲視に必要な視覚情報を処理する神経回路として視床枕が重要であることを、ヒトと類似した視覚情報処理を行っていると考えられるマカクザルを用いて検証する。さらに上丘から視床枕への経路が重要であることを、二重遺伝子導入法を適用して検証する。

3. 研究の方法

盲視の神経経路を明らかにするために、ヒトに近い視覚情報処理が行われていると考えられている2頭のマカクザルを用いて実験を行った。2頭のマカクザルは片側V1を吸引除去され、その後、損傷視野に対する視覚刺激に対してサックード出来るように、視覚誘導性サックード(visually guided saccade, VGS)課題を訓練された。

盲視に重要な役割を果たしていることが報告されている上丘から入力を受ける視床

枕の領域を同定するために、微小電極を視床枕に刺入してニューロン活動を記録し、上丘の微小電気刺激に対する短潜時応答が記録される視床枕の領域を同定した。

上丘から短潜時応答を受ける視床枕の領域に、GABAアゴニストであるムシモルの微量注入を行い、注入による視床枕の不活性化前後のVGS課題に対する成績を記録した。ガドリニウムを含むムシモル溶液を注入して磁気共鳴画像の撮影を行い、ムシモルの拡散範囲を推定した。

上丘から視床枕への経路の神経伝達を選択的に遮断するために、二重遺伝子導入法(Kinoshita M et al, *Nature*, 2012)をこの系に適用した(図1)。Tetプロモータ下流に破傷風毒素の遺伝子を搭載した逆行性ウイルスベクター(FuGB2-TRE-eTeNT.EGFP)を上丘から短潜時応答を受けた視床枕の領域に注入し、その後Tetアクチベータを搭載した順行性ウイルスベクター(AAV-CMV-rtTAV16)を上丘に注入した。これらのウイルスベクター注入により、上丘に細胞体があり視床枕へと軸索を投射しているニューロンでのみ二重感染が起こる。そしてウイルス注入から1ヶ月以上経過後にドキシサイクリン(Dox)を投与し、導入した破傷風毒素遺伝子の発現を誘導することにより、上丘から視床枕への神経伝達を経路選択的に遮断し、その前後の期間におけるVGS課題の成績を記録、解析した。

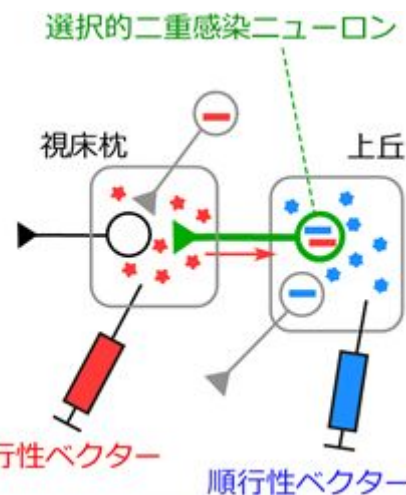


図1: 経路選択的神経伝達遮断のための二重遺伝子導入法の模式図。

4. 研究成果

上丘からの投射を受ける視床枕の領域へムシモルの微量注入を行った結果、V1損傷に対応する視野領域におけるVGS課題の成績がテストを行った2頭において有意に低下した(図2)。この結果から盲視の視覚情報処理経路として視床枕が重要であることを示唆された。

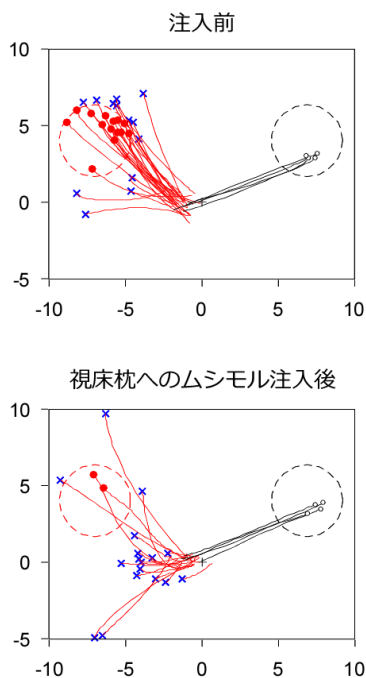


図2：視床枕へのムシモル注入前（上段）と注入後（下段）のVGS課題におけるサッケードの軌跡の例。縦軸、横軸は視野の位置（視野角）。破線の丸の中心が視標の呈示位置。V1損傷対応視野（左側視野）へのサッケードの成績がムシモル注入後に低下している。

さらに、ウイルスベクター二重感染法により上丘から視床枕への経路の神経伝達を選択的に遮断した結果、V1損傷に対応する視野の一部において、Dox投与中のVGS課題の成績がテストを行った2頭において有意に低下した（図3）。これらの結果から盲視の視覚情報の少なくとも一部は上丘から視床枕への神経経路が担っていることが示唆された。

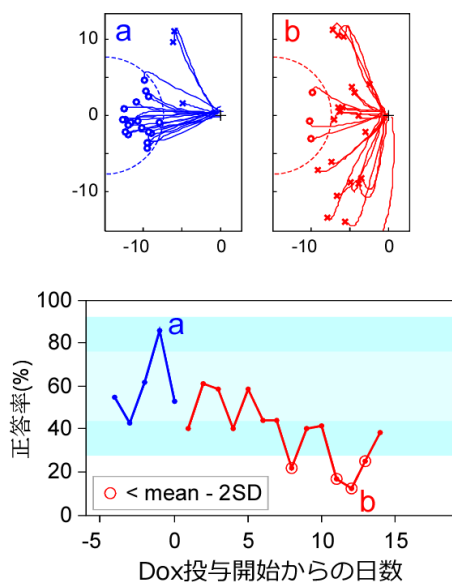


図3：Dox投与前後のVGS課題成績の変化の

例。上段はV1損傷対応視野（左側視野）へのサッケードの軌跡。(a)はDox投与前、(b)はDox投与開始から12日目の例。下段はVGS課題成績の経日変化。縦軸はVGS課題の正答率、横軸はDox投与開始からの経過日数。薄い水色はDox投与前の成績の平均±標準偏差、濃い水色は平均±2×標準偏差の範囲。赤丸はDox投与前の成績の平均-2×標準偏差よりも成績が低下したことを示す。

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 0件)
〔論文一件を投稿準備中〕

〔学会発表〕(計 4件)

Masaharu Kinoshita, Rikako Kato, Kaoru Isa, Kenta Kobayashi, Hirotaka Onoe, Tadashi Isa, “Pulvinar inactivation impairs the visually guided saccade in the blindsight monkeys”, The 45th annual meeting of society for neuroscience, October 17-21, 2015, Chicago (USA). ポスター (794.09)

Masaharu Kinoshita, Rikako Kato, Kaoru Isa, Kenta Kobayashi, Hirotaka Onoe, Tadashi Isa, “Pulvinar inactivation impairs performance of the visually guided saccade in the blindsight monkeys”, 第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) ポスター(3P194)

Tadashi Isa, Masaharu Kinoshita, Rikako Kato, Kenta Kobayashi, Hirotaka Onoe, “Dissecting the circuit for blindsight in macaque monkeys”, Cell symposia: Engineering the Brain: Technologies for Neurobiological Applications, October 15-16, 2015, Chicago (USA). ポスター(P069)

木下正治、加藤利佳子、伊佐かおる、小林憲太、小林和人、尾上浩隆、伊佐正、“視床枕の抑制は盲視サルにおける視覚誘導性サッケードを阻害する”, 第47回東北生理談話会、2015年10月31日、弘前大学(青森県・弘前市) 口演

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 正治 (KINOSHITA, Masaharu)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号： 60599083

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし