

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430011

研究課題名(和文) 注意の選択フィルターを形成するマウス頭頂連合野の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the mouse posterior parietal cortex that forms the filter of selective attention

研究代表者

菱田 竜一 (Hishida, Ryuichi)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：90313551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス頭頂連合野から一次視覚野への逆行性投射が存在し、一次視覚野を抑制することを見出したが、その生理学的役割は不明であった。そこで、「頭頂連合野からの投射が一次視覚野に選択的注意の初期選択フィルターを形成しているのでは？」という仮説を立て解析を進めたところ、一次視覚野抑制の可塑性は、視覚刺激への特異性を有していること、一次視覚野興奮性細胞の方位選択性を修飾すること、抑制機能は頭頂連合野にマッピングされた、等を明らかにした。これらの結果は、仮説を支持するものと考えられ、さらに踏み込んだ解析を勇気づけるものであった。

研究成果の概要(英文)：Although we found that the feedback projection from the mouse posterior parietal cortex (PPC) to the primary visual cortex (V1) exists and suppresses V1, its physiological role was unknown. Therefore, we made a hypothesis that the projection from the PPC forms an initial selection filter of selective attention in V1, and proceeded with the analysis. We found that (1) the PPC has an ability to cause plastic changes in V1 responses to visual stimuli in a selective manner, (2) the PPC modifies the direction selectivity of excitatory neurons in V1, (3) the function of the V1 suppression is mapped to the PPC, etc. These results are supposed to support the hypothesis and encourage the further analysis.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 脳・神経 生理学 可視化 認知科学 注意 フラビン蛋白質イメージング マウス

1. 研究開始当初の背景

霊長類の前頭頭頂連合野ネットワークは、選択的注意に参与する。大脳皮質高次領野は、異なるモダリティの感覚情報の統合や認知などの高次機能に働くとされるが、その詳しいメカニズムは未だ明らかにされていない。そこで研究代表者は、分子機構の解析が容易なマウスを用いて高次領野の機能とそのメカニズムの解明に取り組んできた。

研究代表者は、フラビン蛋白蛍光イメージング(ミトコンドリア酸素代謝と共役した自家蛍光を利用する脳機能イメージング法)を主要な研究手段として、大脳皮質の解析をおこなってきた。神経活動の抑制をフラビン蛍光シグナルの減少として測定できることを示すとともに、マウス高次領野の解析を容易にするために経頭蓋で大脳皮質を刺激できる経頭蓋電気刺激法を開発した。

この経頭蓋電気刺激法を用いて、一次感覚野を起点とする大脳皮質内の情報伝達を解析したところ、感覚情報が頭頂連合野へと集積する一方で、この部位から一次視覚野への抑制性投射が存在することを見出した。さらにこの抑制性投射は、一次視覚野応答の強弱を逆行性に制御するだけでなく、一次視覚野に可塑的变化を誘導しうることも見出した。

2. 研究の目的

以上の結果から研究代表者は次の仮説を提唱した。『マウス頭頂連合野は、選択的注意において意味処理中枢として働き、個々の視覚情報に対する一次視覚野の応答を制御して注意の初期選択フィルターを形成する』この仮説を検証し、選択的注意に機能する神経回路メカニズムを解明することが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

本研究は、新潟大学動物実験指針に基づいておこなった。

(1) 手術

マウスはウレタン(1.6~1.7 g/kg, i.p.)で麻酔した。局所麻酔(bupivacaine)を注入後、頭蓋骨上の皮膚と左側側頭筋を切除した。歯科用レジンを用いて右頭蓋骨に金具を接着し、頭部を固定した。経頭蓋電気刺激する場合には、左頭蓋骨は歯科用ドリルの刃を使って削り、わずかな力で歪曲するまで薄くした。乾燥を防ぐために表面を流動パラフィンで覆い、頭蓋骨の透明度を維持した。

(2) 麻酔下マウスのイメージング

フラビン蛋白質イメージングは麻酔開始から1時間以上経過してから開始した。LED光源の青色光($\lambda = 470 \sim 490 \text{ nm}$)で励起し、得られた緑色蛍光画像($\lambda = 500 \sim 550 \text{ nm}$, $128 \times 168 \text{ pixels}$)を、冷却 CCD カメラ(浜松ホトニクス ORCA-ER)を使って毎秒7コマの速度で60コマ取り込んだ。画像を滑らかにするため、 $5 \times 5 \text{ pixel}$ の空間フィルターを用い

た。20~60秒間隔で20~50セットの画像を取り込み、平均加算した。その画像を刺激直前の3枚の画像の平均で割るという正規化をピクセル毎におこなった。

(3) 大脳皮質の電気刺激

電流強度 100-500 μA 、持続時間 200 μs の2相性電流を刺激に用いた。経頭蓋電気刺激法では、先端を鈍らした縫い針を電極として用いた。直接電気刺激法では、タングステン電極を用いた。グラント電極は側頭筋もしくは背側皮下に設置した。

(4) 大脳皮質のグルタミン酸刺激

先端径約 10 μm のガラスピペットを用いて、10 mM の MNI-ケージド-L-グルタミン酸 0.1-0.2 μl を大脳皮質(脳表下 300 μm)に注入した。UV光源(FLOS-01-365nm with a 600- μm output fiber, Craft Center SAWAKI Inc.)に接続したのコア径 200 μm の光ファイバーから 100 ms の紫外線フラッシュ光を照射。これによって、ケージド化合物よりグルタミン酸を放出させた。

4. 研究成果

(1) 「大脳皮質頭頂領域(頭頂連合野・後部帯状回・内側高次視覚野)から、大脳皮質視覚野への抑制投射経路の形態解析」

GAD-GFP マウス(抑制神経細胞に緑色蛍光蛋白質 GFP を発現している遺伝子改変マウス)の頭頂領域に順行性トレーサーを注入して解析したところ、一次視覚野の抑制神経細胞にシナプス結合しているという予備的な実験結果を得ることができた。この結果は、一次視覚野の活動を抑制的に制御するという頭頂領域の機能に対して、構造的な基盤があることを示したものであり、本研究課題にとって極めて重要な成果である。ただし現段階では、実験例数が少なく、定量的な解析も試みていない。これらの点を改善する必要があると考えられる。

(2) 「2光子顕微鏡 in vivo カルシウムイメージングを使った一次視覚野チューニングカーブの解析」

まずは、難易度が高いとされる2光子顕微鏡カルシウムイメージング実験の習熟を目的として、予備的な実験を繰り返しおこない、一次視覚野の神経細胞の方位選択性や方向選択性を測定することができるようになった。現在、頭頂領域から視覚野への抑制投射経路を切断したマウスでのイメージング解析を進めている。また、頭頂領域を電気刺激したところ、カルシウム指示色素により染色された一次視覚野は陰性の応答を示した。この結果は、抑制応答のイメージング解析は、フラビン蛋白蛍光イメージング以外の手法でも可能性があることを示しており、研究課題の将来的な発展にとって重要な知見が得られた。

(3)「2光子顕微鏡 in vivo カルシウムイメージングを使った選択フィルター特性の解析」

一次視覚野の神経細胞の方位選択性や方向選択性を測定した。GAD-GFP マウス(抑制神経細胞に緑色蛍光蛋白質 GFP を発現している遺伝子改変マウス)を使用することで、興奮性および抑制性神経細胞を同定・区別して解析した。頭頂領域から視覚野への大脳皮質内抑制性投射経路を切断した直後のマウス(急性群マウス)、切断後3週間以上の回復期をおいたマウス(慢性群マウス)、および切断していないマウス(対照群マウス)での結果を比較・検討した。興奮性神経細胞の方位選択性は急性群マウスでのみ低下が見られた。この結果は、抑制性投射経路が方位選択性の形成には関係しないが、モジュレーションに関与していることを示唆していた。一方、興奮性神経細胞の方向選択性は急性群マウスおよび慢性群マウスにおいて低下が見られ、抑制性投射経路が方向選択性の形成に働いていることを明らかにした。さらに、抑制神経細胞の方位選択性は抑制性投射経路の切断に影響されないという結果を得られた。これは、視覚野抑制応答のメカニズムとして想定していた、視覚野抑制性神経細胞の活性化という単純なモデルでは説明できず、研究課題の将来的な展開にとって重要な知見が得られた。

(4)「頭頂連合野から視覚野への抑制投射経路の形態解析」

頭頂連合野に順行性トレーサーを注入して解析したところ、前帯状回・背側線条体・視床の背側外側核・後外側核へ投射していた。それら各部位を電気刺激したところ、前帯状回・背側線条体では視覚野に抑制応答が、背側外側核・後外側核では逆に興奮性の応答が見られ、視覚野抑制のメカニズムとその機能を明らかにするうえで極めて重要な成果が得られた。

(5)「一次視覚野を負に制御する頭頂皮質領域の正確なマッピング」

MNI-ケージド-L-グルタミン酸を頭頂部のいくつかの部位に注射し、UV フラッシュ光を照射してグルタミン酸を放出させた。グルタミン酸によって放出部位に誘起された興奮とともに、一次視覚野の抑制をフラビンイメージングにより解析した。頭頂連合野の活性化が最も効果的であることを見出し、頭頂連合野のひとつの機能が一次視覚野の抑制制御であることを明らかにした。

(6)「一次視覚野抑制の可塑性に視覚刺激への特異性の解析」

2種類の視覚刺激(縦縞または横縞)を30秒ごとにマウスに交互に提示した。いずれか一方の視覚刺激と頭頂連合野の電気刺激とを5

分間隔でペアリングしたところ、ペアリングした視覚刺激に対する一次視覚野の応答は、ペアリング形成後に有意に減少した。一方、ペアリングしていない視覚刺激への応答はわずかに増強された。これらの結果は、視覚刺激に選択的な可塑性変化を一次視覚野応答に引き起こす機能を頭頂連合野が有することを示唆している。

(7)「視覚刺激と頭頂連合野活性化との時間的關係を解析」

LED 発光による視覚刺激と頭頂連合野の電気刺激とを様々なタイミングで組み合わせた。LED 刺激による一次視覚野の ON 応答は、LED 発光開始の前後の広い時間枠内で頭頂連合野が電気刺激されたときに有意に抑制された。この結果は、頭頂連合野からの神経活動が、視覚刺激前後の広い時間枠内で一次視覚野を調節することができることを示しており、マウス頭頂連合野がトップダウンおよびボトムアップの注意において生理学的役割を持つという示唆を得られた。

(8)「一次視覚野の周辺領域の神経活動が一次視覚野に及ぼす影響の解析」

二次視覚野の LM 領域の賦活は一次視覚野を正に制御することを示した。MNI-ケージド-L-グルタミン酸を LM 領域に注射し、UV フラッシュ光を照射してグルタミン酸を放出させた。グルタミン酸によって放出部位に誘起された興奮とともに、一次視覚野の抑制をフラビンイメージングにより解析した。頭頂皮質領域の賦活が一次視覚野を負に制御することとは逆の効果であり、対照実験としても意義のある結果を得られた。

(9)「一次視覚野抑制に可塑性があることを示した実験の対照実験」

視覚刺激を30秒ごとにマウスに交互に提示し、5分間隔で視覚刺激と頭頂連合野の電気刺激とをペアリングし、ペアリング形成後の視覚刺激に対する一次視覚野の応答が有意に減少することを示したが、このペアリングを行わなかった場合には応答の減弱が見られないことを明らかにした。この結果は、先の応答減弱が、イメージング実験における励起光照射がもたらした退色によるものではないことを示し、対照実験として重要な結果が得られた。

(10)「頭頂連合野の構造的破壊が一次視覚野の応答を増強する」

頭頂連合野から一次視覚野への皮質内経路の構造破壊や、薬物注入による頭頂連合野の機能的破壊が、一次視覚野抑制を阻害して応答を増強することと同様の結果であり、頭頂連合野の機能についてより厳密に議論できるようにできた。

(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10件)

Maniwa K, Yamashita H, Tsukano H, Hishida R, Endo N, Shibata M, Shibuki K. Tomographic optical imaging of cortical responses after crossing nerve transfer in mice. PLoS One. vol.13, e0193017, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0193017. 査読有

Tsukano H, Horie M, Ohga S, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. Corrigendum: Reconsidering Tonotopic Maps in the Auditory Cortex and Lemniscal Auditory Thalamus in Mice. Front Neural Circuits. vol.11, 39, 2017. doi: 10.3389/fncir.2017.00039. 査読有

Tsukano H, Horie M, Ohga S, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. Reconsidering Tonotopic Maps in the Auditory Cortex and Lemniscal Auditory Thalamus in Mice. Front Neural Circuits. vol.11, 14, 2017. doi: 10.3389/fncir.2017.00014. eCollection 2017. Review. 査読有

Tsukano H, Horie M, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. Independent tonotopy and thalamocortical projection patterns in two adjacent parts of the classical primary auditory cortex in mice. Neurosci Lett. vol.637, 26-30, 2017. doi: 10.1016/j.neulet.2016.11.062. 査読有

Baba H, Tsukano H, Hishida R, Takahashi K, Horii A, Takahashi S, Shibuki K. Auditory cortical field coding long-lasting tonal offsets in mice. Sci Rep. vol.6, 34421, 2016. doi: 10.1038/srep34421. 査読有

Tsukano H, Horie M, Hishida R, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K. Quantitative map of multiple auditory cortical regions with a stereotaxic fine-scale atlas of the mouse brain. Sci Rep. vol.6, 22315, 2016. doi: 10.1038/srep22315. 査読有

Watanabe T, Sasaki M, Komagata S, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K. Spinal mechanisms underlying potentiation of hindpaw responses observed after transient hindpaw ischemia in mice. Sci Rep. vol.5, 11191,

2015. doi: 10.1038/srep11191. 査読有

Tsukano H, Horie M, Bo T, Uchimura A, Hishida R, Kudoh M, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K. Delineation of a frequency-organized region isolated from the mouse primary auditory cortex. J Neurophysiol. vol.113, 2900-20, 2015. doi: 10.1152/jn.00932.2014. 査読有

Meguro R, Hishida R, Tsukano H, Yoshitake K, Imamura R, Tohmi M, Kitsukawa T, Hirabayashi T, Yagi T, Takebayashi H, Shibuki K. Impaired clustered protocadherin- leads to aggregated retinogeniculate terminals and impaired visual acuity in mice. J Neurochem. vol.133, 66-72, 2015. doi: 10.1111/jnc.13053. 査読有

Hishida R, Kudoh M, Shibuki K. Multimodal cortical sensory pathways revealed by sequential transcranial electrical stimulation in mice. Neurosci Res. vol.87, 49-55, 2014. doi: 10.1016/j.neures.2014.07.004. 査読有

[学会発表](計24件)

菱田竜一、堀江正男、塚野浩明、任海学、澁木克栄。マウス頭頂連合野から一次視覚野への抑制投射は視覚応答の可塑的变化を特徴選択的に誘導する。第40回日本神経科学大会、幕張メッセ、2017年7月22日。

小木学、山岸達矢、塚野浩明、西尾奈々、菱田竜一、堀井新、八木健、澁木克栄。マウス聴覚野における音・図形連想応答に必要な音刺激の複雑性。第40回日本神経科学大会、幕張メッセ、2017年7月22日。

西尾奈々、小本学、山岸達矢、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄。視聴覚統合に關与する側頭部高次領野の覚醒マウスにおけるイメージング。第40回日本神経科学大会、幕張メッセ、2017年7月22日。

吉武講平、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄。覚醒マウス後部頭頂連合野の予測誤差応答解析。第40回日本神経科学大会、幕張メッセ、2017年7月22日。

西尾奈々、小本学、山岸達矢、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄。形状認知を担うマウス高次領野候補としての視覚野腹側領域。第94回日本生理学会大会、浜松アクトシティコンgresセンター、20

17年3月30日。

大西毅、渡部達範、河野達郎、塚野浩明、菱田竜一、馬場洋、澁木克栄。マウス後肢血流遮断中の脊髄NO発生の可視化とNOによる脊髄応答増強。第94回日本生理学会大会、浜松アクトシティコンgresセンター、2017年3月28日。

小小学、山岸達矢、塚野浩明、鎌谷大樹、菱田竜一、堀井新、八木健、澁木克栄。音と図形の連想学習に必要なマウス皮質機能の解析。第94回日本生理学会大会、浜松アクトシティコンgresセンター、2017年3月28日。

吉武講平、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄。マウス後部頭頂連合野の予測誤差応答の解析。第94回日本生理学会大会、浜松アクトシティコンgresセンター、2017年3月28日。

吉武講平、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄。プロトカドヘリンの多様性減少はマウス後部頭頂連合野の予測誤差応答を阻害する。第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016年7月22日。

小小学、山岸達矢、塚野浩明、鎌谷大樹、菱田竜一、堀井新、八木健、澁木克栄。音と図形の連想学習に必要なマウス皮質機能の解析。第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016年7月22日。

菱田竜一、堀江正男、塚野浩明、任海学、澁木克栄。マウス一次視覚野興奮性ニューロンの特徴選択性は頭頂連合野からの抑制投射により制御される。第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016年7月21日。

大西毅、渡部達範、塚野浩明、菱田竜一、河野達郎、馬場洋、澁木克栄。マウス後肢血流遮断による脊髄NO発生の可視化と脊髄応答増強。第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016年7月20日。

菱田竜一、堀江正男、塚野浩明、任海学、澁木克栄。マウス頭頂連合野から一次視覚野への抑制投射の2光子イメージングによる解析。第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015年7月30日。

鎌谷大樹、渡邊健児、山岸達矢、菱田竜一、八木健、澁木克栄。空間/形状情報の視覚的短期記憶課題におけるプロトカドヘリン多様性減少マウスの障害。第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015年7月30日。

吉武講平、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄。マウス後部頭頂連合野の予測誤差応答は経験によって形成される。第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015年7月29日。

大西毅、渡部達範、塚野浩明、菱田竜一、河野達郎、馬場洋、澁木克栄。片側後肢血流遮断後の対側脊髄増強は一酸化窒素によって媒介される。第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015年7月29日。

塚野浩明、菱田竜一、澁木克栄。マウス聴覚野に新規同定された領域は求愛歌に対し良く応答する。第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015年7月28日。

間庭圭一、山下晴義、塚野浩明、菱田竜一、柴田実、遠藤直人、澁木克栄。マウス腕神経叢交差神経後の両半球体性感覚野応答の比較。第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014年9月13日。

任海学、目黒玲子、塚野浩明、菱田竜一、車田正男、澁木克栄。マウス高次視覚野特性に対する外膝状視覚経路の役割。第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014年9月13日。

吉武講平、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄。プロトカドヘリンのクラスター数減少は後部頭頂連合野の連合刺激応答を阻害する。第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014年9月13日。

21 菱田竜一、堀江正男、塚野浩明、任海学、澁木克栄。視覚野を抑制するマウス頭頂連合野。第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014年9月12日。

22 塚野浩明、堀江正男、菱田竜一、澁木克栄。マウス一次聴覚野の背側部は超音波の雄マウス歌声によく応ずる。第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014年9月12日。

23 鎌谷大樹、渡邊健児、菱田竜一、八木健、澁木克栄。プロトカドヘリンのクラスター数減少マウスにおける視覚的短期記憶障害。第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014年9月12日。

24 山岸達矢、塚野浩明、鎌谷大樹、菱田竜一、高橋姿、澁木克栄。マウスの音・図形連想記憶の経頭蓋イメージングによる解析。第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014年9月12日。

〔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

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~physio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱田 竜一 (HISHIDA RYUICHI)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：90313551

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者