

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750383

研究課題名(和文)TEO-TE野における神経結合の光イメージングと応答特性変換機構の解明

研究課題名(英文)Optical imaging of neuronal connections and understanding the mechanisms of signal transformation between areas TE0 and TE

研究代表者

中道 友(Nakamichi, Yu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：70586164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：視覚情報は腹側皮質視覚路の複数の領野で階層的に処理される。本研究では視覚情報処理の最終段であるTE0-TE野間でどのように視覚情報が変換されるかを解明するため、オプトジェネティクスと光内因性信号イメージングを用いた皮質間投射パターン計測法の開発を行った。検証のため既知の結合を持つV1/V2の対側投射に本手法を適用したところ、再現性の良い投射パターンが得られ、電気生理記録でも検証できた。投射パターンが未知であるTE0-TE野間に適用した場合においても、再現性のある投射パターンが得られた。以上より、本手法と電気生理記録の併用によってTE0-TE野間の視覚情報変換機構の解明が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Visual information is hierarchically processed in multiple cortical areas along ventral stream. In this study, to explore how the visual information is transformed between final stages of visual processing, areas TE0 and TE, a technique to identify cortico-cortical projection patterns was developed using optogenetics and optical intrinsic signal imaging. For validation, the technique was applied to well-known callosal connections in V1/V2 border. The results showed reproducible projection patterns and those were confirmed with electrophysiological recordings. The technique was applied to unknown connections between TE0 and TE, and reproducible projection patterns were also obtained. Therefore, mechanisms of visual information transformation between areas TE0 and TE can be revealed by combination of the cortico-cortical projection mapping and electrophysiological recording.

研究分野：脳科学

キーワード：オプトジェネティクス 光内因性信号イメージング 視覚

1. 研究開始当初の背景

私たちが見た物体像の視覚情報は、網膜から V1、V2、V4、TEO 野を経て、視覚情報処理の最終段階である TE 野に運ばれる。V1 から TEO 野までの神経細胞は、視野の位置に依存した応答特性を持ち (小さな受容野) 方位や線分、円弧等の単純な図形特徴に応答する。一方、TE 野の神経細胞は視野の位置に依存せず (大きな受容野) 顔等の複雑な図形特徴に応答する^[1,2]。このため、私たちの物体認識のメカニズムには TEO - TE 野間における応答特性の変換が重要な役割を果たしていると考えられる。

TEO - TE 野間の受容野と応答特性の変換機構を調査するためには、TEO - TE 野間で結合している細胞のペアを同定し、両者の神経活動の記録から視覚情報がどのように変換されたかを検討する必要がある。領野間の神経結合を調査する方法として、電気刺激により神経活動を誘起させ投射先で記録を行う手法^[3]や解剖学的な手法^[4]がある。しかし、前者の電気刺激は刺激部付近にある軸索も刺激してしまうため、正確な細胞のペアを同定することが難しい。後者は死後脳を対象とするため、生きているときの応答を得ることが不可能である。このため、TEO - TE 野間で結合している細胞のペアを同定し、その間での情報変換を解明した例は無い。

2. 研究の目的

TEO、TE 野を含む視覚野では、反応特性が同じ神経細胞が集まりコラムを作っていることが知られている^[1,5]。そこで本研究では、オプトジェネティクスと光内因性信号イメージング (OISI) を用いた皮質間結合パターン計測手法を新たに確立し、計測した TEO - TE 野間における細胞ペアの応答特性変換機構をコラムレベルで解明することを目的とする。オプトジェネティクスは神経細胞に光感受性蛋白質を遺伝学的に導入することにより、神経活動を光で制御する技術である。これを用い、細胞の細胞体、樹状突起選択的に光感受性蛋白質のチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させ、光刺激でこの細胞を活動させることにより、電気刺激で挙げた問題を解決できる。OISI は神経活動により誘起された二次的な信号 (血液の光吸収変化、組織散乱変化等) を広範な二次元画像として *in vivo* 可視化する技術であり、TE 野の機能計測にも実績がある^[6]。即ち、オプトジェネティクスの光刺激により誘起した TEO 野の神経活動を、投射先の TE 野にて OISI で記録することにより、TEO - TE 野間の神経結合パターンを同定することができる。本研究の遂行のため、以下の三段階の目的を設定し、それぞれ検討を行った。

- (1) オプトジェネティクス - OISI 法の確立
- (2) TEO - TE 野間の神経結合パターンの可視化
- (3) TEO - TE 野間の応答特性変換機構の調査

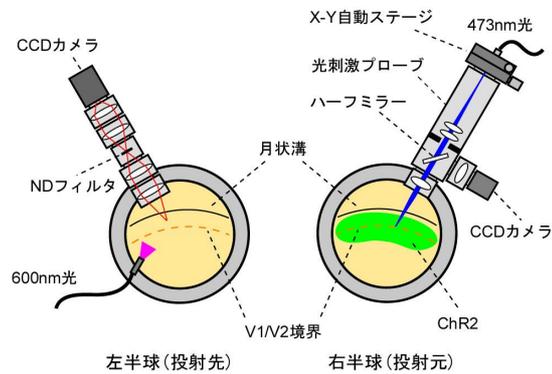


図1 検証実験のシステム概略図

3. 研究の方法

(1) オプトジェネティクス - OISI 法の確立

提案手法の確立のため、以下の二項目について検討を行った。

マカクサル脳における ChR2 発現量の経時変化の調査：オプトジェネティクスの光刺激において、神経細胞の発火頻度は ChR2 の発現量に大きく依存する。しかし、マウス脳における ChR2 発現量の経時変化については調査されているものの^[7]、マカクサル脳の報告例は無い。そこで、ChR2 をラベルした蛍光蛋白質の蛍光強度を計測し、その経時変化を調査した。

検証実験：提案手法の検証のため、その結合が解剖学的に知られているマカクサル V1/V2 領域の対側投射^[8]に手法を適用した。右半球の V1/V2 境界周辺に ChR2 を発現させ、左半球の V1/V2 境界周辺にて OISI を行い、両半球間の結合パターンを計測した (図 1)。得られた結合パターンの再現性と妥当性を検討するため、複数回にわたる実験と電気生理記録による検証も行った。

(2) TEO - TE 野間の神経結合パターンの可視化

検証実験の後、TEO - TE 野の神経結合パターン可視化実験を行った。右半球の V4、TEO 野に ChR2 を発現させ光刺激を行い、TE 野にて OISI 計測により投射信号を記録した。

4. 研究成果

(1) オプトジェネティクス - OISI 法の確立

マカクサル脳における ChR2 発現量の経時変化の調査：マカクサル (M1) にウイルスベクター AAV9 - CaMKIIa - hChR2 (ETTC) - Venus - MBD を複数個所注入し (図 2A)、V1/V2 境界周辺の神経細胞の細胞体及び樹状突起に ChR2 を発現させた。ChR2 の発現をラベルする蛍光蛋白質 (Venus) の脳表上の蛍光を記録し、その経時変化を調査した (図 2B - D)。Venus の蛍光は注入後から徐々に上昇し、注入後約 70 日以降は安定した強い蛍光が長期に渡り計測できた。同様の計測を他のサル (M2、M3) でも行い、平均蛍光強度の経時変化を図 2E にまとめた。なお、蛍光強度は励起光の強度で除算することで定量化し、ウイルス注入領

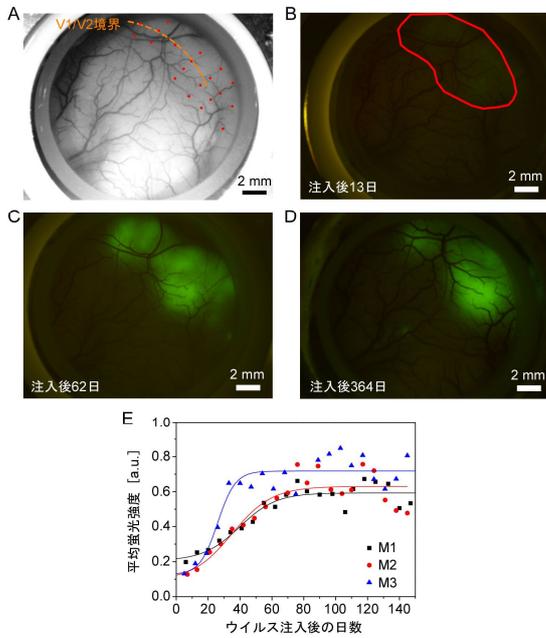


図2 Chr2 発現量の経時変化

(A) ウイルス注入部位(赤点)(B-D)注入後13日、62日、364日後のVenus蛍光画像。(E)各サル平均蛍光強度の経時変化。

域(図2B、赤枠)にて、その定量した蛍光強度の平均値を求めプロットしている。どの個体においても、平均蛍光強度は注入後から徐々に上昇し、ある時点で安定状態に達した。これらの経時変化をシグモイド関数により近似し(図2E、実線)安定状態(90%)に達するまでの日数を定量的に算出したところ、M1、M2、M3でそれぞれ65日、63日、38日であった。以上より、個体間で差はあるものの、サル脳におけるChR2の発現は、マウス脳(約45日^[7])に比べやや遅いという知見が新たに得られた。

検証実験: 図2A-DでChR2を発現させたサル(M1)を用い、提案手法の検証実験(図1)を行った。

最初に、異なる日に同じ場所にてオプトジェネティクス光刺激を行い(図3A)、露出させた対側のV1/V2境界周辺(図3B)でOISI計測を行うことで、手法の再現性を検討した。図3C-Eはそれぞれ、ウイルス注入後125日、133日、147日に行ったOISIの結果であり、画像中で暗く撮像された個所が神経活動部位に対応する(図3C-E、赤矢印)。結果より、神経活動部位は全ての実験日でほぼ一致しており、再現良く対側からの投射信号を検出できていることが分かる。また、この神経活動部位はV1/V2境界上で検出されているため、解剖学的知見^[8]からも妥当であると考えられる。

次に、OISIは神経活動により誘起された二次的な信号を検出しているため、神経活動を直接計測する電気生理学的検証も行った(図4)。図4Aは対側のある一点を光刺激したときに得られたOISI結果であり、図4A赤矢

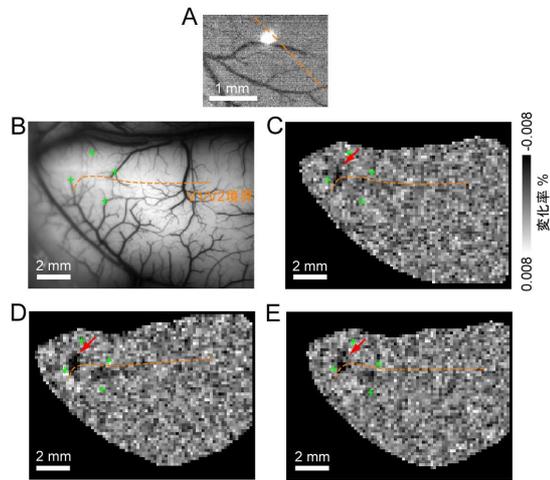


図3 提案手法の検証実験結果

(A) オプトジェネティクス光刺激位置。(B) 投射先の皮質。(C-E) ウイルス注入後125日、133日、147日のOISIの結果。位置の比較のため、血管パターンの特定位置に緑色の十字を付した。

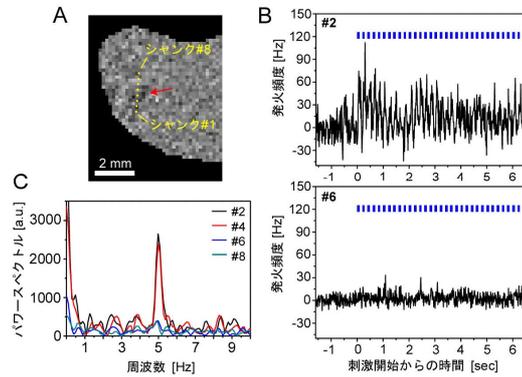


図4 電気生理学的検証実験の結果

(A) OISI結果と電極アレイの位置。(B) シャンク2と6における神経活動(発火頻度)。青点は光刺激を表す。(C) 各シャンクにおける神経活動のスペクトル。

印の部分に対側からの投射信号が観測できる。この投射信号が得られた領域を横切るように、8本のシャンクを持つ電極アレイを挿入し、対側に同様の光刺激(5Hzパルス光)を与え神経活動を記録した(図4B)。その結果、OISIで投射信号が得られた場所周辺(シャンク2)では、光刺激に伴い神経活動の上昇が見られた。一方、投射信号が得られなかった場所(シャンク6)では、神経活動にも光刺激に伴う変化は見られなかった。この神経活動の変調が5Hzのパルス光刺激によるものかを検証するため、図4Bに示す時間信号をフーリエ解析しスペクトルを算出したところ(図4C)パルス光刺激の周波数(5Hz)におけるピークは、OISIで投射信号が得られた場所周辺でのみ得られた(シャンク2と4)。即ち、シャンク2で見られた神経活動の上昇は、光刺激により誘起された対側の投射信号を反映しており、OISIもその投射信号

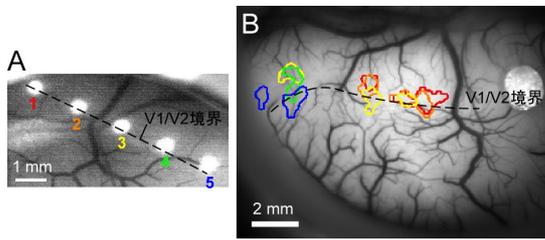


図 5 V1/V2 境界の対側投射パターン

(A) 光刺激位置(右半球)、(B) OISI 結果(左半球)。投射信号の得られた領域の枠色は光刺激位置 1~5 の色と対応している。

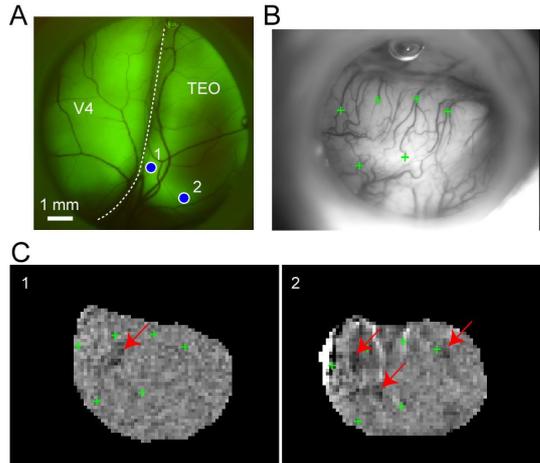


図 6 TE0 - TE 野間の結合パターン

(A) TE0 野の Venus 蛍光画像。青丸は刺激場所を示す。(B) TE 野の脳表面画像。(C) 刺激位置 1、2 でそれぞれ得られた OISI 結果。赤矢印で示した箇所に投射信号を確認できる。位置の比較のため、血管パターンの特定の位置に緑色の十字を付した。

を撮像できていたと考えられる。最後に、右半球の V1/V2 境界に沿って等間隔にオプトジェネティクス光刺激を行い、その投射信号をそれぞれ OISI で記録することにより、V1/V2 境界の対側投射の空間パターンを計測した(図 5)。ここでは、投射信号の得られた領域のアウトラインを表示している。結果より、V1/V2 境界における両半球間の結合は完全に対象となっておらず、複数個所に投射を行う場所もあることが新たに分かった。以上の検証実験より、提案手法は皮質間の結合している細胞の結合パターンをコラムレベルで *in vivo* 同定可能であり、これまで知り得なかった未知の結合を計測できる強力な手段であることが分かった。

(2)TE0 - TE 野間の神経結合パターンの可視化

TE0 野に ChR2 を発現させオプトジェネティクス光刺激を行い、TE 野にて OISI 計測をすることで TE0 - TE 野間の神経結合パターンを計測した(図 6)。ここでは、異なる日に別途実験を行い、再現性良く結果が得られた

2 例について表示している。刺激位置 1 (図 6A、C1) については、TE 野にて一か所のみ投射信号を確認できる。一方、刺激位置 2 の場合(図 6A、C2) 複数個所にて広範囲に投射信号が確認できた。以上のように、TE0 - TE 野のように神経結合パターンが未知かつ投射が広範囲に分布する領野においても、提案手法は適用可能であることが分かった。即ち、この手法と電気生理記録を組み合わせることにより、目的(3)で挙げた TE0 - TE 野間の応答特性変換機構の調査も可能であることが示唆された。

<引用文献>

Fujita I et al., *Nature* **360** (1992) pp.343-346.
 Wang G et al., *Neurosci Res* **32** (1998) pp.33-46.
 Lübke J & Feldmeyer D, *Brain Struct Funct* **212** (2007) pp.3-17.
 Mizuno H et al., *J Neurosci* **27** (2007) pp.6760-6770.
 Sato T et al., *Cereb Cortex* **19** (2009) pp.1870-1888.
 Tsunoda K et al., *Nat Neurosci* **4** (2001) pp.832-838.
 Diester I et al., *Nat Neurosci* **14** (2011) pp.387-97.
 Kennedy H et al., *J Comp Neurol* **247** (1986) pp.398-415.

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

Yu NAKAMICHI, Mitsuhiro HASHIMOTO, Naoto KITAMURA, Kei HAGIYA, Takayuki SATO, Manabu TANIFUJI, Combination of optogenetics and optical imaging to identify unknown cortico-cortical projection patterns in macaque, 2014 International Symposium, Vision, Memory, Thought, 2014 年 12 月 6 日、「伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)」

Yu NAKAMICHI, Mitsuhiro HASHIMOTO, Naoto KITAMURA, Kei HAGIYA, Takayuki SATO, Manabu TANIFUJI, A combination study of optogenetics and optical imaging to identify unknown cortico-cortical projection patterns in macaque, 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2014, 2014 年 11 月 18 日、「ワシントン DC (アメリカ)」

中道友、橋本光広、北村尚土、萩谷桂、

佐藤多加之、谷藤学、光遺伝学的手法と光イメージングを用いたマカクサル皮質間投射パターンの同定、第 37 回日本神経科学大会 2014、2014 年 9 月 11 日、「バシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中道 友 (NAKAMICHI, Yu)
国立研究開発法人理化学研究所・
脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：70586164