

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890007

研究課題名(和文) 記憶想起を担うサル大脳前頭葉 - 側頭葉間の多シナプス性機能結合の抽出と組織学的同定

研究課題名(英文) Anatomical identification of the multi-synaptic functional connectivity between frontal and temporal cortex of monkeys, responsible for memory recall.

研究代表者

節家 理恵子(市原理恵子)(Setsuie, Rieko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：30532535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：大脳前頭葉と側頭葉はそれぞれ、記憶の想起において重要な役割を果たす事が明らかになっているが、この二つの異なる領野間における機能性結合の存在や、その機能性結合を構成する組織学的投射リレーの構成についてはほとんど明らかになっていない。今回我々は、サルに新近判断テスト(複数の画像リストを順番に見せて学習させ、その後任意の2枚の画像を提示して、より最近見た画像を選んでもらうテスト)を遂行させ、その間のサルの脳の機能的磁気共鳴画像を取得することで、前頭葉の9野と呼ばれる領野と下部側頭葉TE野と呼ばれる領野間に機能的結合が存在することを明らかにし、論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：Prefrontal cortex and inferior temporal cortex are two important areas, involved in memory recall formation. However, the functional connectivity and its multi synaptic projection relays between these two areas have not been well identified. In this study, we trained macaque monkeys to perform recency test, a test which monkeys are asked to study many serially shown pictures. Then, monkeys are asked to choose one recently seen picture from two shown pictures. We performed functional MRI analysis when monkeys are performing these tasks in MRI. We found that area 9 in prefrontal cortex and area TE in inferior temporal cortex has functional connectivity and reported this result in a scientific journal.

研究分野：Neuroscience

キーワード：macaque monkey functional MRI memory recall tracer BDA

1. 研究開始当初の背景

(1) 過去に出会った出来事や人、物等を認識する事を記憶の再認という。霊長類の下部側頭葉と前頭葉はそれぞれ記憶の再認に重要な役割を果たすことが明らかになっているが、これらの領野を結ぶ機能結合の存在や、その基盤となる投射関係についてはほとんど明らかになっていない。

(2) 機能的磁気共鳴画像法(f-MRI)は神経活動に伴った血流や血中酸素レベルの変化をBOLD (blood oxygen level dependent)信号の変化として測定する解析法である。なかでも安静時機能的磁気共鳴画像法(rs-fMRI)は安静時のBOLD信号を測定することにより、自発的脳活動に由来する機能結合を網羅的に同定する解析法である(Deco et al., Nat Rev Neurosci 2011)。直接の神経投射が見られる領野間における機能結合はその結合性が強固である事が示唆されている(Honey et al., Proc Natl Acad Sci 2009)。また、サル体性感覚野における解析から、直接の軸索投射が見られる二つの領野間においては、その機能結合の強度は軸索投射の数に比例する事が明らかになっている(Wang et al., Neuron 2013)。一方、直接の軸索投射が見られない二つの領野間においても強い機能結合がしばしば観察される。我々の研究室においては、サル脳のrs-fMRIの解析から、直接投射が見られない二つの領野間においても機能結合が存在する事を明らかにしてきた(Matsui et al., PLoS One 2012, Adachi et al., Cerebral Cortex 2012)その基盤として、これら領野間に存在する多シナプス神経結合により形成された単一もしくは複数の神経回路が推定されるが、その解剖学的な解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、記憶の再認に重要な役割を果たす、下部側頭葉と前頭葉の間の機能結合を明らかにし、その機能結合の基盤となる組織学的な投射関係を明らかにすることで、再認記憶想起において重要な役割を果たす神経回路の組織学的詳細を明らかにし、さらに、多シナプス性機能結合の強度や方向性に寄与する単シナプス結合軸索投射の法則を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) タスク遂行中のサルによるfMRI解析ヒトやサルに複数の画像リストを見て学習させ、その後、任意の2枚の画像を提示して、より最近見た画像を選んでもらうテストを新近判断テスト(Recency judgement paradigm)という。新近判断テスト遂行中のマカクサルのfMRI画像を取得し、9野をシードとして機能結合の存在する領野の解析を行った。

(2) fMRI 及び rs-fMRI 画像の取得

fMRI活動を記録するためには、サルの脳がMRIのボア内で動かないように固定する必要がある。そこで、外科的手術によりMRIに対応した頭部固定具を装着した。麻酔下のサルの脳を固定し、Bruker社製4.7T MRIスキャナーを用いて、全脳を撮像野としてカバーした高空間解像度(1.25 x 1.5 x 1.5mm³)の機能画像を取得した。ただし、通常のfMRI的手法では、外耳道からくるアーティファクトの影響で、下部側頭葉の嗅周皮質近傍のTE野や36野における活動を検出する際に、多くのアーティファクトが乗ってしまう。そこで、これらの領野をfMRIにて検出するために当研究室にて改良された方法(Matsui and Koyano et al., in preparation)を用いてrs-fMRI実験を行った。fMRIによる機能画像を取得する際にはデータ解析のテンプレートとなる3D構造画像も取得した。これら実験により、麻酔下においてサルの脳のrs-fMRI画像を取得し、上記(1)と同様に9野をシードとした解析を行い、9野と機能結合のある下部側頭葉の領野を同定した。

(3) サル脳へのトレーサーの注入と解析

サルの脳にトレーサーを注入するためには、サルの脳が固定され、さらに、マニピュレーターを装着するためのチャンバーが装着されていなければならない。そこで、外科的手術により、サルに脳の固定具とチャンバーを装着した。その上で、脳の3D-MRI画像を取得し、この画像をもとに、サルの36野の場所(特に記憶想起にとって重要であることをこれまでの研究で明らかにしてきた特定の場所)を推定し、チャンバー内の標的座標を決定した。36野は腹側に位置するため、正確な座標へのトレーサーの注入は技術的難易度が高い。そこで、標的座標近傍の電気生理学的プロファイリングと電極挿入下における3D-MRI画像を取得し、標的座標に間違いがないことを確認した。当研究室にて開発されたinjectrode(インジェクションピペットの中心にタングステン電極を配置することで、電気生理学的解析を行いながらピペットの挿入深度を同定することができるもの)を用いてBDA(biotin conjugated dextran amine)を4トラック注入した。また、電極挿入下における3D-MRI撮像時にはX線写真も撮影しておき、BDA注入トラックごとにX線写真を撮影することで、injectrodeを挿入している座標に大きなズレが生じていないことを確認し、注入を行った。それぞれ10%BDAを2~3ul/trackで注入し、2~3週間後にサルの還流固定をPFA(4% paraformaldehyde)を用いて行った。還流固定後、脳を取り出し、脳を正中で半分に分けた後、Temporal poleの前及びAP-4.0mm近傍で前後に切断し、Sucrose置換を行った。その後、脳をブロック化し、脳組織の薄切(40um)を

行った。切片は10枚おきにBDAトレーサーの検出をbiotin-avidin法を用いておこない、明らかな投射が確認された切片については、その隣接切片に対してニッスル染色を行う事で、BDAが投射している投射先の領野の同定を行ったBDAを注入した1頭目のサルでは10% BDAを1 trackあたり1ulしか注入しなかったが、このサルにおいては、すでに報告のあるOrbitofrontalへの密な投射が確認できなかったため、2頭目と3頭目のサルでは10% BDAの注入量を1 trackあたり3ulに増量した。

4. 研究成果

(1) 新近判断テストと呼ばれる記憶課題遂行中のマカクサルの脳活動を fMRI 法を用いて測定し、課題遂行時に活動する前頭葉の領域を複数同定した。そして、各領域間の相互作用(機能結合性)を解析し、これらの領域がネットワークを形成している事を明らかにした。さらに課題遂行時のネットワークの活動変化に着目して解析を行い、記憶想起時に活動するネットワークにおいて、他の部位と機能的に多く結びつく脳部位、9/46d 野とTE野が存在し、これら部位は機能的ハブとして脳の情報処理において中心的な役割を果たしている事、これら領野間には強い機能結合が見られる事を明らかにした(引用文献)

(2) 記憶想起において重要な役割を果たす事が明らかになっている下部側頭葉36野に着目し、3頭のマカクサルの36野に対してBDA(10kDa,主に順行性)の注入を行った。先に研究方法でも述べたように、36野の標的座標への精度の高いトレーサー注入には高い技術が要求される。そこで、まず、BDAの注入が目的とした座標に行われているのか否かをBDAに対するbiotin-avidin染色により確認した。これまでに解析した3頭のサル全てにおいて、BDAの注入が目的とした場所にきちんと行われていることを確認した。これらサルの脳の組織学的解析から、以下の領野を主とした複数の領野への密な投射が確認された。(Entorhinal Cortex, Area TE, Ventral Temporal Pole, Amygdala, Insula, Orbitofrontal Cortex, Indusium Griseum, Olfactory Tubercle, Nucleus Accumbens, thalamus)。BDAの注入量が少なかった1頭目のサル脳では、Orbitofrontal Cortexへは非常に弱い投射しか確認できなかったため、さらに頭数を増やして実験を実施する予定である。また、今回の実験条件では、すでに報告のある24野への投射については、いずれのサルでも確認できなかった。今回用いたトレーサーが主に順行性であったため、今後は順行性(10kDa)と逆行性(3kDa)のBDAトレーサーを混ぜて36野に注入し、36野からの投射のみならず、36野への投射も同定する予定である。

また、前頭葉9野へのBDAの注入を行ったサルの組織学的な解析も1頭については開始している。さらに頭数を増やした解析を行い、前頭葉、側頭葉間の投射解析を行う予定である。

(3) 麻酔下のサルの脳活動を fMRI 法を用いて測定し、下部側頭葉36野をシードとしてデータ解析を行ったところ、36野と機能結合が見られる前頭葉の領野が複数同定された。しかし、同様の結果が他のサル脳においても観察されるのか否かについての検討が終わっていないため、引き続き同様の実験を行う予定である。

引用文献

Osada, T. et al., PLoS Biol, 13(6), 2005

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 2件)

Miyamoto K, Adachi Y, Osada T, Watanabe T, Kimura HM, Setsubie R, Miyashita Y, Dissociable memory traces with the macaque medial temporal lobe predict subsequent recognition performance, J Neurosci., 査読あり, 34(5), 2014, 1988-97
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4048-13.2014

Osada T, Adachi Y, Miyamoto K, Jimura K, Setsubie R, Miyashita Y, Dynamically Allocated Hub in Task-Evoked Network Predicts the Vulnerable Prefrontal Locus for Contextual Memory Retrieval in Macaques, PLoS Biol., 査読あり, 13(6), 2015, e1002177
DOI: 10.3171/journal.pbio.1002177.
eCollection 2015 Jun.

[学会発表](計 3件)

Miyamoto K, Adachi Y, Osada T, Watanabe T, Setsubie R, Kimura HM, Watanabe T, Miyashita Y, Dissociable memory traces with the macaque medial temporal lobe, The Society for Neuroscience Annual Meeting, 2014年11月15日~2014年11月19日, Washington DC Convention Center (USA)

Miyamoto K, Adachi Y, Osada T, Watanabe T, Setsubie R, Kimura HM, Watanabe T, Miyashita Y, Whole-brain network dynamics of recognition memory processes in macaque monkeys: an fMRI study, 2014 International

Symposium, Vision, Memory, Thought:
How Cognition Emerges from Neural
network, 2014年12月6日～2014年12
月7日

Osada T, Adachi Y, Miyamoto K, Jimura
K, Setsuie R, Watanabe T, Miyashita
Y, Hub-centric prefrontal network
predicts lesion-effective site for
contextual memory in macaques, The
Society for Neuroscience Annual
Meeting, 2015年10月17日～2015年
10月21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.physiol.m.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

節家 理恵子 (SETSUIE, Rieko)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究
員

研究者番号：30532535