

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22115011

研究課題名（和文）マウス感覚連合のメゾ回路

研究課題名（英文）Neural circuits underlying sensory association functions in mice

研究代表者

澁木 克栄（Shibuki, Katsuei）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40146163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 67,900,000 円

研究成果の概要（和文）：視覚系背側経路の後部頭頂連合野が成長期のマウスがヒゲと眼によって得る異質な空間感覚のブレを調整するメカニズムを担うこと、空間情報の短期記憶を担うことを発見した。また視覚系腹側経路連合野は形状情報の短期記憶を担うこと、視覚・聴覚連想記憶を担うことを発見した。これらの連合野機能は神経特異的な細胞接着因子のプロトカドヘリンのクラスター数を減少させると障害され、細胞接着因子の分子多様性に依存する情報保持回路が一連の機能の背景に存在することが示唆された。これら情報保持回路が感覚情報を保持することによって広範な脳部位に関連活動を惹起し、視覚的意識などの心の働きを生む可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The posterior parietal cortex (PPC) is a part of the higher visual cortices in the dorsal pathway. We found that PPC was responsible for the integration of spatial information obtained from the eyes and whiskers in mice. PPC was also responsible for short-term memory of visual spatial information. In contrast, higher visual cortices in the ventral pathway were responsible for short-term memory of shape information, and for the integration of visual and auditory information. These functions were dependent on clustered protocadherin alpha, neuro-specific cell adhesion molecules. It is suggested that common neural circuits, dependent on clustered protocadherins, work as short-term memory circuits to achieve these functions. The sensory information, kept as sustained neural activities in the circuits, is likely to induce related neural activities in the wide brain areas connected with higher visual cortices. The activity complex may be regarded as the neural correlate of visual awareness.

研究分野：神経科学

キーワード：感覚連合野 高次視覚野 短期記憶 細胞接着因子 マウス 光学的機能イメージング 行動解析

1. 研究開始当初の背景

一次感覚野の情報は、高次感覚野を介して異なる感覚情報を統合する連合野へと伝わる。異なる感覚情報がいかに連合されるかという問題は霊長類で研究されているが、そのメカニズムを担う神経回路は明らかでない。高次感覚連合機能の神経回路レベルのメカニズムを理解するためには、多彩な遺伝子改変技術や経頭蓋イメージングが可能なマウスが有用である。しかし、これまでマウスの連合野機能を調べる良い実験系がなかった。

感覚連合が必要な情報処理の例として、空間認知が挙げられる。霊長類では視覚入力と、手などを介して得られる体性感覚入力が頭頂連合野で統合されて身の回りの空間認知がなされる。マウスも空間を認知するために視覚入力と、マウスではよく発達しているヒゲ入力を連合していると考えられる。もし、ヒゲを介して得られる空間感覚と視覚を介して得られる空間感覚に何らかの食い違いがあった場合、マウスはそれに対応するための何らかの脳の可塑的变化を起こすと想定される。そのような現象を解析することによってマウス連合野機能を解析する実験系を作り上げ、連合野機能の神経回路レベルのメカニズムを解明する必要性があった。

2. 研究の目的

我々は生後1ヶ月の臨界期マウスの眼前に、視線を30度屈曲させるプリズム眼鏡を装着させて飼育すると、プリズムを取り去った後でもプリズム装着眼を介する視覚野応答が抑圧されること、しかもこの視覚野応答の抑圧は、プリズム装着時に予めヒゲを切っておくと生じないことを見出した。即ち、視覚情報とヒゲ情報に空間的誤差があると、視覚野応答の抑圧が生じると思われる。この現象は視覚野の前内側に存在する後部頭頂連合野 (Posterior parietal cortex, PPC) を破壊すると阻害される。PPC は、視覚情報とヒゲ情報が収束する部位であり、おそらく霊長類の頭頂連合野に相当する領域であると推測される。

そこで本研究では PPC を含む視覚系連合野に的をしぼり、以下のような具体的な目標に沿って研究を進めることとした。

(1) ヒゲ入力と視覚入力がプリズム装着によらずれると、視覚野応答が抑圧されるが、視覚野応答を抑圧するだけでは空間的な誤差は是正されない。そこで抑圧された視覚野応答の位置を調べると、視覚野脳地図のシフトが生じている可能性があると考えた。この現象を解析するため、同一マウスのプリズム装着前後で視覚野応答の位置を精査する、またはグループ間で視覚野応答の中心と中心静脈同の距離を比較する方法を用い、視覚野脳地図のシフトの有無を検証した。

(2) これまでの破壊実験から、PPC でヒゲ入力と視覚入力の空間的誤差が検出されると思われる。この領域には視覚に特異的なニューロン、ヒゲ入力に特異的なニューロン、両者に応ずるニューロン、両者の誤差に特異的に応ずるニューロンなどが混在すると予想される。そこで、実際に PPC の活動を何らかの方法で引き起こし、その活動が、PPC で視覚とヒゲ感覚の食い違いを検出しているのかどうかを解析した。

(3) 感覚連合の機能を実現する神経回路が、連合野特異的な特徴を有するならば、何らかの分子的特徴がある可能性がある。大阪大学の八木健は、神経細胞ごとに多様性を持って発現する細胞接着因子のクラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) を発見した。cPcdh は何らかの特異的な神経回路の形成に寄与すると考えられるが、良く判っていない。予備的な実験でアルファ型 cPcdh をノックアウトすると、プリズム装着による視覚野応答の抑圧効果がなくなることが判った。そこで cPcdh は連合野に特徴的な神経回路形成に重要な役割を果たす可能性があるため、さらに解析を進めた。

(4) プリズム装着によって視覚野応答が変化する現象は、PPC の機能の一部に過ぎない。PPC は空間認知における短期記憶を促進するという報告があるので、cPcdh の遺伝子改変マウスを

用い、この可能性を解析した。さらに PPC は視覚系連合野のうち、空間情報を処理する背側経路に属すると思われるが、形状情報を取り扱う腹側経路についても解析を広げ、視覚系連合野に共通して存在する可能性のある神経回路を解析した。

3. 研究の方法

(1)脳活動の解析: マウスの脳活動は主に経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージング法で解析した。これは、神経活動と共役する酸素代謝の亢進を、ミトコンドリア電子伝達系のフラビン蛋白由来の緑色内因性変化として記録する機能イメージング法である。さらにマウスの頭蓋骨は透明であるため、脳が頭蓋骨に保護された状態で経頭蓋イメージングを行った。また、この方法で脳の活動領域を同定したのち、活動部位にカルシウム指示薬を注入し、ニューロンレベルの活動を2光子顕微鏡で解析して、フラビン蛋白蛍光イメージング法の知見を補完した。

(2)遺伝子改変マウス: cPcdh の分子多様性が、連合野の神経回路に及ぼす影響を解析するため、大阪大学の八木研究室で作製されたアルファ型cPcdh 欠損マウスを用いた。また12種類あるアルファのcPcdh のクラスター数を12種類から2種類まで減少させたマウスも用い、解析を行った。後者のマウスは、アルファ型cPcdh の発現量自体は変化しないが、多様性のみが減少するため、多様性の持つ意義を検証するためには、より適切なモデル動物である。

(3)行動学的解析法: 視覚系背側経路連合野の PPC の機能を調べるため、T字型の迷路を用い、マウスが指標の空間的な位置に関する短期記憶に基づいて報酬を得られる迷路を正しく選択する正答率を行動学的に解析した。また視覚系腹側経路連合野の機能を調べるため、M字型の経路を新しく考案し、マウスがディスプレイに映し出された図形の形状情報の短期記憶に基づいて報酬を得られる迷路を正しく選択

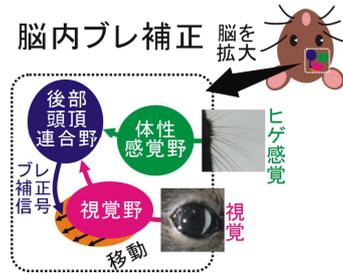
する正答率を行動学的に解析した。

(4)視覚・聴覚統合機能: 視覚野背側経路の PPC は、視覚・体性感覚の統合機能と視覚的な空間情報の短期記憶を併せ持つ。従って視覚系腹側経路連合野も、視覚的な空間情報の短期記憶の他に視覚・聴覚の統合機能を併せ持つ可能性がある。この問題を解析するため、特定の図形と音刺激をマウスに同時に繰り返し提示することにより、視覚・聴覚の連想記憶を形成させた。またこの連想記憶を、M字迷路を用い、特定の音から連想図づけられた図形を想起する能力を行動学的に解析した。また特定の音刺激から図形を連想した時の高次視覚野の応答を、経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージング法等で解析し、形状情報の短期記憶を司る、視覚系腹側経路連合野の部位の同定を試みた。

4. 研究成果

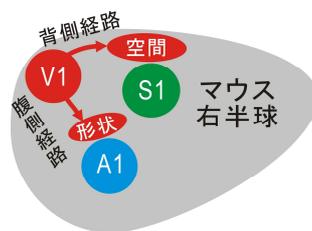
(1)プリズム装着による視覚野可塑性: プリズムを装着させて視覚とヒゲの空間情報の不一致を起こすと、単に視覚野応答が抑圧されるだけでなく、視覚野応答のシフトが生じることを見出した。さらにプリズムで直接影響を受ける視野だけでなく、それ以外の場所でもほぼ均一に視覚野応答のシフトが起きていた。この現象に関係すると思われる PPC の性質を解析するため、前方から後方へ、又は後方から前方への移動縞刺激やヒゲ刺激を加えたが、単独では何ら効果が出なかった。そこで移動縞刺激とヒゲ刺激を逆相にして加えたところ、PPC の活動がフラビン蛋白蛍光イメージングで捉えられた。ちなみに同相にして加えても PPC の活動は誘発されなかった。アルファ型プロトカドヘリン欠損マウスではプリズムを装着させても視覚野の抑圧は起きなかった。さらに移動縞刺激とヒゲ刺激を逆相にして加えても PPC の活動は生じなかった。同様の阻害結果はアルファ型プロトカドヘリンの多様性を減少させたマウスでも観察された。以上の結果は PPC が、視覚とヒゲの空間情報を連合する責任部位であること、またアルファ型

プロトカドヘリンの分子多様性に強く依存していることを示している。以上の結果により、PPC の働きによって視覚情報、ヒゲ情報が統合され、両者のブレを補正する脳内ブレ補正メカニズムの存在が明らかになった(図参照)。



(2) PPC における空間情報短期記憶: PPC は視覚情報とヒゲ情報の統合だけでなく、視覚的空間情報の短期記憶にも関わるとい報告がある。この可能性について検証するため、アルファ型プロトカドヘリンの多様性減少マウスにおいて T 字迷路を用いて空間情報の短期記憶を解析したところ、障害されていることが判った。すなわち一見異なる二種類の現象は、アルファ型プロトカドヘリンの分子多様性に依存する共通の神経回路に依存することが示唆された。

(3) 視覚系腹側経路連合野による形状情報の短期記憶: 大脳皮質視覚情報処理システムは、空間情報を取り扱う背側経路と形状情報を取り扱う腹側経路に分かれる。霊長類で知られたこの構造は、基本的にはマウスにも存在するはずである。しかし、マウスの腹側経路がどの程度発達しているの



か、終着点の形状認知の責任部位はどこに存在するのか等々、その性質は殆ど判っていない(図参照)。そこでマウスの腹側経路の終着点、即ち形状認知の責任部位に関して、その機能と部位を研究した。我々はマウスの能力を評価するため、M字迷路法を開発した。これはM字型の迷路の上縁部分に液晶画面を設置し、そこに提示した画像情報に基づいて迷路を選択させる装置である。M字迷路を用いると、マウスは少なくとも20秒間は複雑な図形を記憶し、保持する能力があることが判った。また

この能力はアルファ型プロトカドヘリンの分子多様性減少マウスでは障害されていた。

(4) 視覚系腹側経路連合野における視覚・聴覚統合機能: それではマウスの形状認知の責任部位はどのように同定できるであろうか? 複雑な図形を提示して視覚野を活動させると、図形に選択的な応答が出るだけでなく、明暗や図形を構成する線分に応ずる非選択的な応答も出現し、図形選択的の応答と非選択的の応答を区別することは困難である。しかし、複雑な図形と複雑な音を連想付け、音刺激によって図形を連想させた場合は、明暗や図形を構成する線分に対する非選択的な応答を起こすことなく、直接図形選択的な応答を起こすことができると期待される。そこで我々はまずマウスの連想記憶能力をテストした。複雑な図形と音を連想付けると、マウスは音から図形を連想し、連想した図形と同じものを選択する能力があることを、M字迷路法で確認した。さらにこのようなマウスの音に対する皮質応答が、聴覚野の背側(視覚野の腹側部)に出現した。行動学的な連想記憶能力と視覚野腹側部の活動は、ともにアルファ型プロトカドヘリンの分子多様性減少マウスで障害されていた。さらに視覚野腹側部の応答を2光子イメージングで解析すると、連想付けに用いた音に応ずるニューロンと図形に応ずるニューロンが記録された。この視覚野腹側部が、形状認知の責任部位である可能性がある。

(5) まとめ: 本研究では4種類の視覚系連合野が関わると思われる現象を発見した。具体的には視覚・体性感覚の統合機能、空間情報の保持機能、図形情報の保持機能、視覚・聴覚の統合機能である。いずれもアルファ型プロトカドヘリンの分子多様性に依存するため、共通の神経回路に依存すると想定される。情報保持機能と異種感覚の統合機能では、情報保持機能の方がより基本的であると思われる。何故なら、異種感覚が同時に神経回路上に保持されれば、両者の統合が容易に成立するからである。それでは高次連合野の情報保持機能には、どのよ

うな本質的な意味があるのだろうか。おそらく高次連合野に感覚情報が持続的な発火活動として保持されれば、この部位と結合を持つ広範な脳部位に関連する神経活動を引き起こす(図参照)。このような高次連合野を中心とする広範な神経活動こそ、視覚的意識などの心の働きの実体である可能性がある。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 18 件、全て査読有)

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. *Scientific Reports*, in press, (2015).

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.* **113**, 2900-2920 (2015).

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- α (cPcdh- α) leads to aggregated retinogeniculate terminals and impaired visual acuity in mice. *J. Neurochem.* **133**, 66-72 (2015).

Hishida, R., Kudoh, M. & Shibuki, K. Multimodal cortical sensory pathways revealed by sequential transcranial electrical stimulation in mice. *Neurosci. Res.* **87**, 49-55 (2014).

Tohmi, M., Meguro, R., Tsukano, H., Hishida, R. & Shibuki, K. The extrageniculate visual pathway generates distinct response properties in the

higher visual areas of mice. *Current Biology* **24**, 587-597 (2014).

Yoshitake, K., Tsukano, H., Tohmi, M., Komagata, S., Hishida, R., Yagi, T. & Shibuki, K. Visual map shifts based on whisker-guided cues in the young mouse visual cortex. *Cell Reports* **5**, 1365-1374 (2013).

doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.006.

Tsukano, H., Horie, M., Honma, Y., Ohga, S., Hishida, R., Takebayashi, H., Takahashi, S. & Shibuki, K. Age-related deterioration of cortical responses to slow FM sounds in the auditory belt region of adult C57BL/6 mice. *Neurosci. Lett.* **556**, 204-209 (2013).

Honma, Y., Tsukano, H., Horie, M., Ohshima, S., Tohmi, M., Kubota, Y., Takahashi, K., Hishida, R., Takahashi, S. & Shibuki, K. Auditory cortical areas activated by slow frequency-modulated sounds in mice. *PLoS ONE* **8**, e68113 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0068113.

Horie, M., Tsukano, H., Hishida, R., Takebayashi, H. & Shibuki, K. Dual compartments of the ventral division of the medial geniculate body projecting to the core region of the auditory cortex in C57BL/6 mice. *Neurosci. Res.* **76**, 207-212 (2013).

Todaka, H., Tatsukawa, T., Hashikawa, T., Yanagawa, Y., Shibuki, K. & Nagao, S. G-protein coupled modulatory actions of motilin on K⁺ channels and postsynaptic GABA receptors in mouse medial vestibular nuclear neurons. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 339-350 (2013).

Yamashita, H., Chen, S., Komagata, S., Hishida, R., Iwasato, T., Itohara, S., Yagi, T., Endo, N., Shibata, M. & Shibuki, K. Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. *PLoS ONE* **7**, e35676 (2012).

doi: 10.1371/journal.pone.0035676.

Hishida, R., Watanabe, K., Kudoh, M. & Shibuki,

K. Transcranial electrical stimulation of cortico-cortical connections in anesthetized mice. *J. Neurosci. Meth.* **201**, 315-321 (2011).

Tsukano, H., Hishida, R. & Shibuki, K. Detection of virtual pitch up to 5 kHz by mice. *Neurosci. Res.* **71**, 140-144 (2011).

Kitaura, H., Hiraishi, T., Murakami, H., Masuda, H., Fukuda, M., Oishi, M., Ryufuku, M., Fu, Y.-J., Takahashi, H., Kameyama, S., Fujii, Y., Shibuki, K. & Kakita, A. Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices. *Neuroimage* **58**, 50-59 (2011).

Watanabe, K., Kamatani, D., Hishida, R. & Shibuki, K. Timing-dependent effects of whisker trimming in thalamocortical slices including the mouse barrel cortex. *Brain Res.* **1385**, 93-106 (2011).

Komagata, S., Chen, S., Suzuki, A., Yamashita, H., Hishida, R., Maeda, T., Shibata, M. & Shibuki, K. Initial phase of neuropathic pain within a few hours after nerve injury in mice. *J. Neurosci.* **31**, 4896-4905 (2011).

Komagata, S., Tamaki, K., Hishida, R., Takeshita, N. & Shibuki, K. Nociceptive cortical responses during capsaicin-induced tactile allodynia in mice with spinal dorsal column lesioning. *Neurosci. Res.* **69**, 348-351 (2011).

Ohshima, S., Tsukano, H., Kubota, Y., Takahashi, K., Hishida, R., Takahashi, S. & Shibuki, K. Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning. *Neurosci. Res.* **67**, 51-58 (2010).

[学会発表] (計 4 件、全てシンポジウム講演)

Shibuki, K. Visual object recognition based on short-term memory in mice. 第 92 回日本生理学会大会, 2015.3.21-23, 神戸国際会議場 (兵庫県、神戸市)

Shibuki, K. Higher visual functions revealed by flavoprotein fluorescence imaging in mice. 第 91 回日本生理学会大会, 2014.3.16-18, 鹿

児島大学 (鹿児島県、鹿児島市)

Shibuki, K. Flavoprotein fluorescence imaging of cortical mass and single neuronal activities in mice. 第 34 回日本神経科学大会, 2011.9.14-17, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

Shibuki, K., Komagata, S., Chen, S., Suzuki, A., Yamashita, H., Hishida, R., Maeda, T. & Shibata, M. Imaging of somatosensory cortical responses elicited by neuropathic pain in mice. 第 33 回日本神経科学大会, 2010.9.2-4, 神戸国際会議場 (兵庫県、神戸市)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

新潟日報文化賞受賞 (平成 24 年 11 月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澁木 克栄 (SHIBUKI, Katsuei)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 40146163

(2) 連携研究者

菱田 竜一 (HISHIDA, Ryuichi)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 90313551

任海 学 (TOHMI, Manavu)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 10401770

塚野 浩明 (TSUKANO, Hiroaki)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 90624338

渡邊 健司 (WATANABE, Kenji)
新潟大学・脳研究所・特任助教
研究者番号: 80609272

吉武 講平 (YOSHITAKE, Kohei)
新潟大学・脳研究所・特任助教
研究者番号: 60649218