

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300104

研究課題名（和文） 新しく開発した生体内線維連絡可視化法による他者の意図を認知する脳メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms of recognizing other's intention using newly developing *in vivo* connection imaging and electrophysiology

研究代表者 一戸 紀孝 (NORITAKA ICHINOHE)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 微細構造研究部 部長

研究者番号：00250598

研究成果の概要（和文）：我々は生体内で、線維連絡を可視化する手法を見いだしたので (Ichinohe et al., 2012, Sci Rep)、この手法を用いて他者行動を認知するシステムを、最初に他者を認知する脳部位を見だし、そこと結合のある領域で行われている他者行動および、条件による他者行動に対する反応から、他者行動認知および他者の行動意図を認知する結合のあるシステムの各部位でどのような情報処理が行われ、またダイナミックに相互にどのような情報交換があり得るかを追求した。まず、我々は状側頭溝(STS)の後端に他者の摂餌行動を行っているときに、麻酔下の特殊なフェイズで神経活動の起こる領域を見いだした。ここにトレーサーを注入すると、前頭葉に結合のスポットが観察でき、この注入部位である STS と前頭葉に慢性電極を埋め込んで、覚醒下での記録を試みた。この結果、前頭葉（含む前頭前野、6v）で、自己の動作と他者の動作で同じ行動の際に、活動が見られるミラーニューロンが見いだされ、新世界ザルで初めて、ミラーニューロンの存在を確かめた。このことは、自閉症ミラーニューロン説を確かめる重要な発見と思われる。同時に、STS は他者の意図、運動野に近い細胞群は、他者の行動そのものの形やツールの使用などに、影響されることが分かった。他者認知のネットワークでの各ポイントにおける部位の表現している情報に違いあることが分かった。

研究成果の概要（英文）：We investigated circuits for object recognition in macaque anterior (TE) and posterior inferotemporal cortex (TEO), using a two-step method with *in vivo* anatomical imaging. In step 1, red fluorescent tracer was injected into TE to reveal and Pre-target patches of feedforward neurons in TEO. In step 2, these were visualized on the cortical surface *in vivo*, and injected with green fluorescent tracer. Histological processing revealed that patches >500 μ m from the injection site in TEO consisted of intermingled green TEO intrinsically projecting neurons and red TEO-to-TE neurons, with only few double-labeled neurons. In contrast, patches near the injection site in TEO contained many double-labeled neurons. Two parallel, spatially intermingled circuits are suggested: (1) TEO neurons having very local intrinsic collaterals and projection to TE (2) TEO neurons projecting more widely in the intrinsic network, but not to TE. These parallel systems might be specialized for, respectively, fast vs. highly processed signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2011 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

物体認知はその網膜からの入力複雑さ多様さ、物体形態の高次元性などにより、脳に行っている最も計算論的に困難なタスクの一つと考えられ、現在のコンピューター・システムにおいても実現が難しい。霊長類の脳においてはV1に始まりV2、V4を経て下側頭葉に到達する腹側視覚経路(“what” pathway)において、物体認知において重要な情報変換が行われていると考えられている (Ungerleider and Mishkin, 1982)。初期視覚野V1, V2, V4, TEO野は受容野が小さく物体形態の小部分(輪郭の直線/曲面、色、両眼視差)を表現するニューロンが見いだされている(Connor et al., 2007 参照)。これに対して、下側頭葉とりわけその前部(TE野)では、受容野も大きく中等度に複雑な形態に反応する細胞が見いだされている(Tanaka et al., 1991; Fujita et al., 1992; Kobatake and Tanaka, 1994)。しかし、これらの腹側視覚経路の情報の変換(トランスフォーメーション)の原理、様式はいろいろな仮説があるが、まだよくわかっていない。例えば feedforward の収斂でトランスフォーメーションが起こるという Poggio ら(2004)の説があるが、TEレベルの顔の表現する細胞へ収斂する一段階下のレベルになると、何を表現しどのような、収斂・計算がおこるかは、ほとんど分かっていない。さらに、顔ニューロンには、単純化した顔の絵には反応するが、それから口を取ったり、目を取ったり、輪郭を取ったりすると反応が著しく低下するなどの単純な加算では説明出来ず、全体的な配置(holistic)に反応するような特性がある(Kobatake と Tanaka, 1994)。

顔は我々が認知する最も情報の多い刺激であり、顔を一瞬見ただけで、identity、性別、年齢、ムード、注意の方向などが分かり、社会行動を行うに当たって重要な情報を多く含んでいる。ヒトにおいてもサルにおいても、顔の認知システムには特異な点が多くあることが知られているが(Tsao と Livingstone, 2008, Ann Rev Neurosci)、TE野における顔ニューロンの反応の基盤に関しては上記のごとく推測の域をでない。もしも、顔ニューロンと顔ニューロンへ投射する一段階下のおそらくよりシンプルな視覚刺激に反応すると考えられる細胞から、同時に多点電極を用いて電気記録することが出来

れば、顔ニューロンの反応形成機構に重要な知見が得られると思われる。例えば、顔ニューロンに投射する細胞がどのような反応特性を持つかや、また、顔ニューロンとその一段前の細胞の種々の視覚刺激に対する反応の同時モニタリングによる、顔反応性形成に関する時系列的にダイナミックな神経活動の変化に関する情報、これに基づく細胞間のインターアクションに関する知見が得られ、顔ニューロン形成のよりリアルなモデル創生、ひいては神経機構に迫れると思われる。

2. 研究の目的

最近、我々は顔ニューロンがクラスターを形成しているTE野に蛍光の逆行性トレーサーCTB-Alexa 555を注入すると、その逆行性にラベルされた細胞の集団が、脳表面から蛍光実体顕微鏡で観察可能であることを見いだした。TE野に少量のトレーサーを注入し、500 μm径(機能カラム大)の注入部位を作り、TEO野を蛍光実体顕微鏡で観察すると、明るいパッチ状の部位が認められる。我々は、その後、標本を作りこの直下に逆行性にラベルされた細胞が集積していることを観察している。このことは、カラム大のTE野へ投射する細胞の集積部位を生体内で観察することが出来ることを示している。また、TE野で視覚刺激反応を記録した後に、トレーサーを注入した後に、7日後、同じチャンバー内に、パッチを認めた後、注入部位から記録を取ると視覚刺激反応性に大きな違いがないことが分かった。また、注入部位に投射するパッチからも強いはっきりとした刺激選択性のある反応が記録でき、投射の生体内可視化実験の課程がニューロンの反応性に大きな違いを導かないことが分かった。この手法を用いて、TE野の顔ニューロンの集積する顔カラムと、その一段階前のTEO野の顔カラムに投射する細胞群の集積する領野から、顔、顔のスクランブル、顔の部分、顔の一部のマスキング、顔の回転、顔のサイズ・位置、顔のパーツの位置の変化を系統的に変えた刺激および顔以外の刺激への反応、顔認知コンピューター-のアルゴリズムをから予見しうる視覚刺激への反応を、多点電極による神経活動記録をおこない顔ニューロンの形成のメカニズムを探ることを目的とする。また、これらのネットワークに属する細胞を刺

激や抑制して、その効果も見る。

顔認知の特殊性・困難性は、顔認知機械コンテンツなどが盛んに行われている人工視覚研究の方面でもよく知られており、多くのアルゴリズムが提唱されているが、未だ遠く人に及ばない (Zhao et al., 2003; Ullman, 2007)。また、ヒト顔認知のメカニズムの研究は、fMRI の導入により大きく前進し、これまでの脳病変による顔認知の障害と合わせて、どの領野でどのレベル (顔検知、顔の測定、顔のカテゴリー分類等) の処理が行われているかが、解明されてきている、(Cohen and Dehaene, 2004)。また、サルでも、fMRI と電気生理を組み合わせた研究により、やはり顔の情報処理に特異的な領野の存在が確認されている (Tsao et al., 2006)。また、この知見は共同研究者である谷藤学のグループによっても確認されつつある。Tsao のグループは、fMRI と電気刺激を用いて、複数の顔関連領野間に機能的結合があることを示している (Moeller et al., 2008)。しかし、TEO野のようにシンプルなものに反応を示すことの知られている領野からの投射を受けて、いかにして顔ニューロンという複雑な物体への特異的反応が形成されるのかは、大きな謎として残っている。この謎は、本研究で用いる最近我々が見いだした生体内線維連絡可視化と多点電極記録の組み合わせによって、大きな前進が見込まれる。また、本手法は、このTE/TEO野のシステム以外にも、多くの領野で使える可能性があり、本研究は解剖学的線維連絡による情報変換の解明という神経科学の大きな課題を解く道を切り開く一歩となると思われる。

3. 研究の方法

光学測定用のチャンバーを顔ニューロンがクラスターを作っている TE 野の前方 (Tsao et al., 2006; 谷藤グループ、未発表) を中心につけて、硬膜を切除し、透明な人工硬膜を入れる。この実験は、基本的に麻酔下で行う。

マネキン顔、その塗りつぶし、サル顔、マネキン顔のシャッフルやその他の、画像刺激 (サル全体の像、果物 (リンゴなど)) を含む 100 以上の刺激を用い光学測定、3つのタングステン電極を束にした電極より記録した multiple unit activity (Sato, Tanifuji et al., in press) の平均において顔に対する反応が強くその輪郭、シャッフルには反応が弱いまたはないような顔カラムを同定する。この手法はすでに、我々の実験系でうまくいっている。

顔カラムに $0.12 \mu\text{l}$ という微量の CTB-alexa 555 (蛍光トレーサー) を注入し、7-10 日間逆行性に移動するのを待ち、TEO 野につけたチャンバーから、蛍光顕微鏡により逆行性に標識された細胞群の集積領域を可視化する。これまで、解剖学的研究用のサルではあるが、5頭中、5頭常に観察可能であったので、電気生理のチャンバーをつけるためにはスペース等の問題があるが、解決可能であると考えている。

TE の顔カラムと TEO の投射ニューロンのフォーカスに多点電極を刺入する。刺入する多点電極に関しては、全層から記録できるように NeuroNexus 社のシリコンプローブ Polytrode 1A のような平たく多数の記録点のあるものを考慮中であるが、 $1 \times 16 - 5\text{mm}$ $100 - 413$ のような細身の電極も試す予定である。ここでは、適宜経験のある理研の平瀬先生、磯村先生、阪大の田村先生等に意見・指導を仰ぐ。

視覚刺激を始める前に、フィードフォワード投射が主として TEO 野の 3 層からおこり、TE 野の 4 層に終わることから、TE 野を刺激して、逆行性の反応を見て、どの記録細胞が直接、顔カラムに投射しているか? TEO 野の刺激をして、順行性の反応から、どの記録細胞が TEO 野から直接情報を受ける細胞なのかを、同定しておく。

神経活動の記録は、記録電極により local field potential, MUA, および単一神経記録が出来るように適宜調整しておく。まずは最初のカラムを決定したイメージセットを用いて、TEO 野のニューロンの反応特性がどれほど、その投射している TE 野のニューロンと似ているかを調べることから始める (Kobatake と Tanaka, 1994 参照)。次のステップが重要であり、かつ本実験自体が、これまでで最初の結合のある TEO 野および TE 野のスポットからの同時記録であるので、初期には試行錯誤が必要であると考えられる。アイデアとしては、現在、いくつか考えられる。a) TEO 野の受容野は TE 野より小さく TE 野の適刺激では、TEO 野の受容野を超える可能性がある。しかし、TE 野の細胞の反応性は受容野の位置やサイズにあまり影響をうけない (position invariance または view invariance)。それゆえ、像を TE 野の細胞に見せたときには、反応に変化が無く、それに投射する TEO 野の領域または細胞で起こる大きな反応の変化を取れる限りの細胞で調べ、TE 野の position invariant や size invariant のメカニズムをいかにして TEO 野の反応から作りうるか検討する。TEO 野からの投射ニューロンのデータが足りなくて解

積が困難な場合には、TEO野の他の投射スポットにも電極の刺入を考える。b)イメージのなかのもっとも強く反応する部位を探すリダクションプロセスも適応し、TE野のカラムのcritical featureを捜す段階でのTEO野細胞への反応性も検討する(Tanaka, 1996)。このリダクションプロセスの最中にはTE野の活動は変わらないので、上と同様の論理で、この間のTEO野の活動の変化を観察し、critical featureを捜す変形時の活動不変性の由来を探る。このような現象を手がかりに、TEO野からTE野への情報変換のルールを探っていく。また、この間に得られた、より新しい着想・洞察・仮説に基づく刺激セットも工夫する。Brincat and Connor (2004, 2006)や、Logothetis and Pauls, (1995)で用いられたようなコンピューターで形成する幾何学刺激セットも考慮する。また、近年、商品化さえされている顔認知コンピュータシステムのアルゴリズム(PCA等、Zhao et al., 2003参照)も試す。

また、電気記録の解析は、多点電極同時記録である強みを生かして、オートコリレーションやLFP測定によるオッシレーションの同期などの現象を解析する。これにより、細胞同士のインタラクションやどの層同士が強いシンクロナイゼーションを示すかなどに関しても調べる。

TEO野の刺激、ムシモルの注入で、顔カラムの反応性の変化を見て、TEO野の活動の顔カラムへの寄与について考えるデータにする。平成21年度：上記の実験を3頭のサルにわたって行う。光学測定チャンバーによる実験では、硬膜を取るの、一頭あたり、3ヶ月以上の維持には、リスクがあるからである。この際に、チャンバーの位置決め、刺激の検討、電極の比較・検討を行う。とりわけ、顔カラムへ注入した際に、TEO野のどこに出るのかについて、注意深く観察する。この最初の年は、再現性の高い手法の確立のため、刺激に関しては、顔カラムを決定する際に使用したものを試すなど、比較的シンプルなものとする。

平成22年度以降：初年度で、考えられた上記のような刺激セットをためす。やはり、年に3頭程度のペースで行う。早いうちに、ある程度、はっきりした結果が得られた際には、麻酔下の実験を覚醒下でも行えるような、技術的改良を試みる。また、ウイルスによるチャンネルロドプシンおよびハロロドプシンの逆行性発現と光による制御実験も試みる。これは、福島県立医大の小林和人先生のグループは、現在、逆行性レンチウイルスに(Kato et al., 2008)、チャンネルロドプシンおよび/ま

たはハロロドプシンをコードした遺伝子を組み込むウイルスの開発を行っている。チャンネルロドプシン・ハロロドプシンはそれぞれ光によって、発現細胞の活動を抑制したり、刺激したりするものであり、可能であれば、ウイルスをTE野のトレーサー注入部位に注入し、TEO野の電極を入れた領域に光を当てて、電気刺激やムシモルよりもよりコントロールの効いた実験系の確立に努める。

4. 研究成果

我々は生体内で、線維連絡を可視化する手法を見いだしたので(Ichinohe et al., 2012, Sci Rep)、この手法を用いて他者行動を認知するシステムを、最初に他者を認知する脳部位を見いだし、そこと結合のある領域で行われている他者行動および、条件による他者行動に対する反応から、他者行動認知および他者の行動意図を認知する結合のあるシステムの各部位でどのような情報処理が行われ、またダイナミックに相互にどのような情報交換があり得るかを追求した。まず、我々は状側頭溝(STS)の後端に他者の摂餌行動を行っているときに、麻酔下の特殊なフェイズで神経活動の起こる領域を見いだした。ここにトレーサーを注入すると、前頭葉に結合のスポットが観察でき、この注入部位であるSTSと前頭葉に慢性電極を埋め込んで、覚醒下での記録を試みた。この結果、前頭葉(含む前頭前野、6v)で、自己の動作と他者の動作で同じ行動の際に、活動が見られるミラーニューロンが見いだし、新世界ザルで初めて、ミラーニューロンの存在を確かめた。このことは、自閉症ミラーニューロン説を確かめる重要な発見と思われる。同時に、STSは他者の意図、運動野に近い細胞群は、他者の行動そのものの形やツールの使用などに、影響されることが分かった。他者認知のネットワークでの各ポイントにおける部位の表現している情報に違いあることが分かった。

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11件)

① Oga T, Aoi H, Sasaki T, Fujita I, Ichinohe N. Postnatal development of layer III pyramidal cells in the primary visual, inferior temporal, and prefrontal cortices of the marmoset. *Front Neural Circuits*. 2013;7:31. doi:10.3389/fncir.2013.00031. (査読あり)

② Ichinohe N, Borra E, Rockland K. Distinct feedforward and intrinsic

neurons in posterior inferotemporal cortex revealed by in vivo connection imaging. *Sci Rep*. 2012;2:934. doi: 10.1038/srep00934. (査読あり)

③ Suzuki S, Harasawa N, Ueno K, Gardner JL, Ichinohe N, Haruno M, Cheng K, Nakahara H. Learning to simulate others' decisions. *Neuron*. 2012 Jun 21;74(6):1125-37. doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.030. (査読あり)

④ Watakabe A, Hirokawa J, Ichinohe N, Ohsawa S, Kaneko T, Rockland KS, Yamamori T. Area-specific substratification of deep layer neurons in the rat cortex. *J Comp Neurol*. 2012 Nov 1;520(16):3553-3573. doi: 10.1002/cne.23160. (査読あり)

⑤ Kurotani T, Miyashita T, Wintzer M, Konishi T, Sakai K, Ichinohe N, Rockland KS. Pyramidal neurons in the superficial layers of rat retrosplenial cortex exhibit a late-spiking firing property. *Brain Struct Funct*. 2013 Jan;218(1):239-254. doi: 10.1007/s00429-012-0398-1. (査読あり)

⑥ Ichinohe N. Small-scale module of the rat granular retrosplenial cortex: an example of the minicolumn-like structure of the cerebral cortex. *Front Neuroanat*. 2012;5:69. doi: 10.3389/fnana.2011.00069. (査読あり)

⑦ Odagiri S, Meguro R, Asano Y, Tani T, Ichinohe N. Single axon branching analysis in rat thalamocortical projection from the anteroventral thalamus to the granular retrosplenial cortex. *Front Neuroanat*. 2011;5:63. doi: 10.3389/fnana.2011.00063. (査読あり)

⑧ Banno T, Ichinohe N, Rockland KS, Komatsu H. Reciprocal connectivity of identified color-processing modules in the monkey inferior temporal cortex. *Cereb Cortex*. 2011 Jun;21(6):1295-310. doi: 10.1093/cercor/bhq211. (査読あり)

⑨ Ichinohe N, Matsushita A, Ohta K, Rockland KS. Pathway-specific utilization of synaptic zinc in the macaque ventral visual cortical areas. *Cereb Cortex*. 2010 Dec;20(12):2818-31. doi: 10.1093/cercor/bhq028. (査読あり)

⑩ Miyashita T, Wintzer M, Kurotani T, Konishi T, Ichinohe N, Rockland KS. Neurotrophin-3 is involved in the formation of apical dendritic bundles in cortical layer 2 of the rat. *Cereb Cortex*. 2010 Jan;20(1):229-240. doi:10.1093/cercor/bhp093. (査読あり)

⑪ Borra E, Ichinohe N, Sato T, Tanifuji M, Rockland KS. Cortical connections to area TE in monkey: hybrid modular and distributed organization. *Cereb Cortex*. 2010 Feb;20(2):257-70. doi: 10.1093/cercor/bhp096. (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[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.ncnp.go.jp/nin/guide/r_mic/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者 一戸 紀孝

(Noritaka Ichinohe)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 微細構造研究部 部長

研究者番号 : 00250598