

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500383

研究課題名(和文) マウス帯状回による注意の神経回路メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the attentional mechanism in the mouse cingulate cortex

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：高次領野からの逆行性投射は、皮質の感覚機能を修飾するとされるが、その詳しい機序は不明である。そのメカニズムを解明するため、マウス高次領野から一次視覚野への抑制性投射を経頭蓋フラビン蛋白質イメージングにより解析した。トレーサー実験によれば、その抑制性投射は直接経路と間接経路により構成されていることが示唆された。阻害実験によりその投射が、一次視覚野を常時抑制していること、視覚のコントラスト感受性に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It is thought that feedback projections from higher areas modulate sensory functions in the neocortex. However, it remains to be elucidated how higher areas modulate functions of the primary areas. To better understand the neural mechanisms, we studied properties of inhibitory projections from higher areas to the primary visual cortex (V1) in mice using transcranial flavoprotein fluorescence imaging. We investigated the functions of the feedback projections by blocking the pathways from the higher areas to V1. The acute blocking experiments indicated the presence of tonic inhibition mediated by the feedback projections. The chronic blockings resulted in a significant reduction of V1 response to grating stimuli with reduced contrasts. Tracer injections to the areas showed the presence of direct and indirect pathways. These observations strongly suggest that feedback inhibitory projections from the areas to V1 can adjust neural responses in V1 for keeping appropriate visual acuity.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：フラビン蛋白質イメージング マウス in vivo 高次領野

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の高次領野は、モダリティの異なる感覚情報の統合や、一次感覚野の逆行性修飾、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不明である。研究代表者は、分子機構の解析が容易なげっ歯類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。

大脳皮質の神経活動を、簡便かつ再現性高く定量的に測定できる方法として、フラビン蛋白質蛍光イメージング(ミトコンドリア酸素代謝とカップルした自家蛍光を使った脳機能イメージング)が有効であることを研究代表者のグループは実証してきた。ところがこのイメージングでは、自然刺激による高次領野のイメージングは難しい。これは、麻酔によって高次領野の反応性が低下してしまうためと考えられる。そこで麻酔動物において高次領野を強制的に賦活するために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情報伝達を解析したところ、「前帯状回・頭頂連合野」へと情報が集積し、逆にこの部位の賦活が一次感覚野を抑制することを見出した。

2. 研究の目的

霊長類の帯状回は情動・注意という高次認知機能に関与することが知られている。このことから類推して、研究代表者が見出したマウス一次感覚野の抑圧は、抑圧されていない部位へ注意を集中する機能があるかも知れないと考えた。そこで本研究では、マウスの「前帯状回・頭頂連合野」の賦活による一次感覚野の抑制が、「注意の選択フィルター」の実体であるという仮説を検証し、注意の神経回路メカニズムを解明することとした。

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。75ワットのキセノンランプを光源とする青色光($\lambda = 470 \sim 490 \text{ nm}$)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6

0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. 研究成果

(1) 「帯状回および頭頂連合野の活性化により視覚野に抑制反応が誘起される」

視覚野の抑制を誘起する大脳皮質領域を同定するため、前部帯状回・後部帯状回・頭頂連合野を1ミリの細目に区切り、その交点に経頭蓋電気刺激を順次与え、視覚野への効果を調べた。その結果、前部帯状回の後端、後部帯状回および頭頂連合野への刺激が抑制を誘起すること、さらに頭頂連合野が抑制を最も強く誘起することを明らかにした。

(2) 「視覚野抑制は、皮質内経路または視床を経由する神経回路によるのかもしれない」

抑制反応の神経基盤を調べるため、後部帯状回および頭頂連合野ヘトレーサーを注入し、同部位との神経接続を解析した。その結果、まばらではあるが視覚野への投射と、視床網様核への投射が見られた。これらの結果から、視覚野抑制には2つの経路が機能している可能性が示唆された。第1は、視覚皮質内の抑制細胞が機能して視覚野が抑制されるという直接経路。第2は、まず視床網様核の抑制細胞が機能して外側膝状体の活動を抑制し、その結果視覚野が抑制されるという間接経路である。

(3) 「頭頂連合野の活性化により視覚野の応答が抑圧される」

視覚野の視覚刺激に対する応答に対して、頭頂連合野の電気刺激が及ぼす効果を調べた。その結果、視覚刺激に対する応答がシャットダウンされ、さらに、その抑圧の効果は電気刺激終了後も10分程度持続することを明らかにした。後者の結果は、視覚野抑制が可塑的に変化しうることを示しており、頭頂連合野・帯状回の活性が学習に関与するかもしれないという示唆を得た。

(4) 「頭頂連合野・帯状回の不活性化により視覚野の応答が増強される」

活性化と逆の効果を調べるため、頭頂連合野・帯状回と視覚野の間の皮質領域に切れ目を入れ、これらの領野からの出力を遮断した。

その結果、視覚刺激に対する視覚野の応答が増強され、視覚野への抑制が定常的に存在することが示された。

(5)「頭頂連合野の活性化により聴覚野に抑圧反応が誘起される」

聴覚野付近に陰性のフラビン信号を微弱ながら観察することができた。そこで、聴覚野の聴覚刺激に対する応答に対して、頭頂連合野の電気刺激が及ぼす効果を調べたところ、応答が抑圧されることを明らかにすることができた。

(6)「頭頂連合野の機能破壊により視覚野の応答が増強される」

大脳皮質に切れ目を入れるという構造破壊によって頭頂連合野の抑制機能を解析したが、この方法では単なる通過繊維の切断が原因とする可能性を排除できなかった。そこで、頭頂連合野にムシモールを注入して同領野の興奮性神経活動を機能的に不活性化する実験を行った。結果は構造破壊実験と同様であったので、視覚野の定常的な抑制を頭頂連合野の機能として確定できた。

(7)「視覚領域への抑制投射経路の解析」

抑制神経細胞でGFAP蛍光蛋白質が発現している系統のマウスの頭頂連合野に電気刺激を加えて視覚野の抑制反応を起こし、c-fos(神経興奮のマーカー)の発現を調べ、抑制反応が起こっている時に活性化している神経回路部位と抑制細胞との関係を解析した。視覚野内の抑制神経細胞の活動が向上していたことから、皮質内を通った抑制投射経路の存在を明らかにした。

(8)「頭頂連合野損傷によるコントラスト感受性の低下」

大脳皮質に切れ目を入れて頭頂連合野の出力を遮断した実験群と切れ目をいれていない対照群とで、縞パターン視覚刺激に対する視覚野応答のコントラスト感受性を測定した。対照群に比べ実験群では、低コントラストの視覚刺激に対する応答性が低下していたことから、頭頂連合野の生理的機能としてコントラスト感受性の制御を示唆することができた。

(9)「頭頂連合野の深層の方が浅層よりも視覚野を抑圧する活性化能が高い」

大脳皮質の錐体神経細胞の多くは、浅層(脳表より250マイクロメートル付近)と深層(750マイクロメートル付近)に分布する。どちらの細胞群がより効果的に視覚野を抑圧するかを調べるため、刺激電極を大脳皮質に刺入し、電気刺激による抑制効果をフラビン蛍光蛋白質イメージング法により観察し、針先が浅層あるいは深層にある状態での差異を調べた。結果は、負フラビン信号では2倍程度の差異が見られ、深層刺激の方が浅層よ

りも抑制が強いことを明らかにした。

(10)「頭頂連合野の活動活性化により視覚野の応答が抑制される」

これまでの実験では、大脳皮質の電気刺激という賦活方法によって頭頂連合野の抑制機能を解析してきたが、この方法では単なる通過繊維の刺激が抑制の原因となっている可能性を排除できなかった。そこで、頭頂連合野にある神経細胞の樹状突起・細胞体を直接グルタミン酸で刺激する方法を試みた。頭頂連合野にケージド・グルタミン酸を注入した後、同領野に紫外光を照射した。ケージド化合物の光分解により放出されたグルタミン酸の効果フラビン蛍光蛋白質イメージング法により観察した。電気刺激による視覚野抑制と同様な結果を得られることができ、通過繊維の可能性を排除することができた。

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)

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. *Curr Biol.* vol.24, 587-597, 2014. doi: 10.1016/j.cub.2014.01.061. 査読有
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 Rep.* vol.5, 1365-1374, 2013. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.006. 査読有
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.* vol.556, 204-209, 2013. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.015. 査読有
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.* vol.8, e68113, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0068113. 査読有
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.* vol.76,

207-212, 2013. doi: 10.1016/j.neures.2013.05.004. 査読有
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. vol.7, e35676, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0035676. 査読有
Hishida R, Watanabe K, Kudoh M, Shibuki K. Transcranial electrical stimulation of cortico-cortical connections in anesthetized mice. J Neurosci Methods. vol.201, 315-321, 2011. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.08.007. 査読有
Tsukano H, Hishida R, Shibuki K. Detection of virtual pitch up to 5kHz by mice. Neurosci Res. vol.71, 140-144, 2011. doi: 10.1016/j.neures.2011.06.005. 査読有
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. vol.31, 4896-4905, 2011. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6753-10.2011. 査読有
Watanabe K, Kamatani D, Hishida R, Shibuki K. Timing-dependent effects of whisker trimming in thalamocortical slices including the mouse barrel cortex. Brain Res. vol.1385, 93-106, 2011. doi: 10.1016/j.brainres.2011.02.026. 査読有
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. vol. 69, 348-351, 2011. doi: 10.1016/j.neures.2011.01.005. 査読有

[学会発表](計28件)

渡部達範、駒形成司、塚野浩明、菱田竜二、河野達郎、馬場洋、澁木克栄。一過性血流遮断によるしびれ中のマウス脊髄イメージング。第91回日本生理学大会、鹿児島大学郡元キャンパス、2014年3月18日。
間庭圭一、山下晴義、塚野浩明、菱田竜二、柴田実、遠藤直人、澁木克栄。マウス腕神経叢交差神経移植後の体性感覚野応答。第91回日本生理学大会、鹿児島大学郡元キャンパス、2014年3月1

8日。
塚野浩明、菱田竜一、澁木克栄。マウス一次聴覚野の連想記憶回路特性。第91回日本生理学大会、鹿児島大学郡元キャンパス、2014年3月17日。
吉武講平、塚野浩明、任海学、菱田竜一、八木健、澁木克栄。ヒゲによって誘導されるマウス視覚野脳地図移動と眼優位ラム構造形成。第91回日本生理学大会、鹿児島大学郡元キャンパス、2014年3月16日。
鎌谷大樹、渡邊健児、菱田竜二、八木健、澁木克栄。視覚的作動記憶のプロトカドヘリン多様性減少マウスにおける障害。第91回日本生理学大会、鹿児島大学郡元キャンパス、2014年3月16日。
澁木克栄、塚野浩明、駒形成司、菱田竜二。マウス深部脳機能の経頭蓋光学イメージング。第36回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2013年6月22日。
渡部達範、駒形成司、塚野浩明、菱田竜二、河野達郎、馬場洋、澁木克栄。血流遮断によるしびれの脊髄メカニズム。第36回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2013年6月22日。
菱田竜一、堀江正男、塚野浩明、任海学、竹林浩秀、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遮断による視力低下。第36回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2013年6月21日。
吉武講平、塚野浩明、任海学、菱田竜一、八木健、澁木克栄。感覚連合依存的な視覚野抑圧におけるプロトカドヘリン多様性の役割。第36回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2013年6月20日。
塚野浩明、菱田竜二、澁木克栄。二光子機能イメージングによるマウス一次聴覚野和音処理機構の解析。第36回日本神経科学大会、国立京都国際会館、2013年6月20日。
塚野浩明、菱田竜一、澁木克栄。マウス一次聴覚野の前背側部に新たに分離・同定された新領域。第90回日本生理学大会、タワーホール船堀、2013年3月28日。
馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、菱田竜二、高橋姿、澁木克栄。マウス聴覚野における二相性 ON-OFF 応答の持続音刺激後の出現。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月21日。
塚野浩明、菱田竜二、澁木克栄。二光子カルシウムイメージングによるマウス一次聴覚野和音応答の解析。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月21日。
渡部達範、駒形成司、塚野浩明、菱田竜

- 二、河野達郎、馬場洋、澁木克栄。血流障害性しびれの脊髄機構：一過性虚血後のマウス体性感覚野応答増強。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月20日。
- 澁木克栄、塚野浩明、駒形成司、渡邊健児、菱田竜一。マクロ共焦点顕微鏡によるマウス脳活動イメージング。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月19日。
- 渡邊健児、菱田竜一、澁木克栄。帯状回と視覚野を含む水平断スライス神経回路に対する慢性ストレスの効果。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月19日。
- 任海学、目黒玲子、塚野浩明、菱田竜一、澁木克栄。マウス高次視覚野の速度応答特性はLGNを介さない経路で決定される。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18日。
- 吉武講平、任海学、菱田竜一、八木健、澁木克栄。マウス後部頭頂連合野における視覚・ヒゲ組み合わせ刺激応答のイメージング。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18日。
- 菱田竜一、堀江正男、塚野浩明、任海学、竹林浩秀、澁木克栄。マウス高次連合野から一次視覚野へのフィードバック投射による抑制とその機能。第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18日。
- 塚野浩明、岩里啄治、八木健、菱田竜一、澁木克栄。マウス一次聴覚野は音の組合せを記憶・想起する。第89回日本生理学大会、タワーホール船堀、2012年3月31日。
- 21 馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、菱田竜一、高橋邦行、高橋姿、澁木克栄。長期暴露音刺激後のマウス大脳皮質聴覚野におけるオンオフ反応。第89回日本生理学大会、タワーホール船堀、2012年3月31日。
- 22 吉武講平、任海学、菱田竜一、八木健、澁木克栄。マウス視覚野脳地図の経験依存的な位置調整。第89回日本生理学大会、タワーホール船堀、2012年3月31日。
- 23 渡邊健児、菱田竜一、澁木克栄。帯状回から視覚野への興奮伝播：マウス水平断スライスにおける解析。第89回日本生理学大会、タワーホール船堀、2012年3月30日。
- 24 渡部達範、駒形成司、塚野浩明、菱田竜一、河野達郎、馬場洋、澁木克栄。一過性後肢虚血後の後肢振動刺激に対するマウス体性感覚野応答。第89回日本生理学大会、タワーホール船堀、2012年3月30日。
- 25 渡邊健児、菱田竜一、澁木克栄。マウス

- 帯状回水平断スライスフラビン蛋白蛍光応答伝播。第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月17日。
- 26 菱田竜一、任海学、澁木克栄。経頭蓋電気刺激によって明らかにされたマウス一次感覚野への高次連合野からの抑制性投射。第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月17日。
- 27 塚野浩明、菱田竜一、澁木克栄。二光子励起顕微鏡によるマウス聴覚野ニューロンの和音に対する応答解析。第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月17日。
- 28 任海学、目黒玲子、菱田竜一、車田正男、澁木克栄。上丘を経由するマウス高次視覚野の応答。第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月17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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：