

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16654

研究課題名(和文)上丘における視覚空間情報表現の解明

研究課題名(英文)Visual space representation in the mouse superior colliculus

研究代表者

笠井 昌俊(Masatoshi, Kasai)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70625269

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):マウスの中脳上丘の視覚応答とその性能を明らかにするために、2光子レーザー顕微鏡による in vivo Ca²⁺ イメージングをおこない神経細胞集団の活動を計測した。特に、覚醒下と麻酔下での視覚応答の違いを検討し、上丘の神経細胞集団の視覚空間表現について解析をおこなった。また、覚醒下においては、視覚刺激の提示に合わせて眼球運動と歩行運動を計測し関連する上丘の応答の有無についても解析をおこなった。

研究成果の概要(英文):The superior colliculus (SC) is a brainstem center which plays essential roles in mediating the signal for sensory-motor translation. To reveal the visual processing ability of the mouse SC, I applied in vivo two-photon Ca²⁺ imaging and recorded neuronal population activities from hundreds of neurons simultaneously. Specifically, I examined the differences of visual and spontaneous Ca²⁺ responses between awake animals and isoflurane anesthetized animals. I found that the baseline activities and visual response amplitude were significantly reduced by anesthesia. I also recorded saccade-like eye movement and locomotion activities during visual stimulus presentation. In many case, saccade-like eye movement and locomotion were occurred in nearly same timing. I couldn't find any correlation between eye-movement and visual response of SC neurons. However, when the mice started to run, large Ca²⁺ responses were found in the neuropiles and in some neurons.

研究分野：神経生物学，神経生理学

キーワード：上丘 2光子顕微鏡 in vivo イメージング マウス 視覚情報処理 眼球運動 サッカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の中脳にある上丘は、複雑な視覚情報の中からより目立った物体を抽出し、そこに素早く視線を向けるための眼球運動(サッカド)の情報が生成するための重要な神経核である。解剖学的には上丘は大きく3層の構造に別れており、もっとも背側表面に位置する浅層は網膜からの直接投射を受ける視覚情報の入力部位である。より腹側の深部側には、中間層・深層がありここでは、視覚情報からサッカドの運動情報への変換がおこなわれている。

眼球運動の正確なコントロールには、上丘浅層に存在する網膜部位再現 retinotopic map、つまり視野地図上で、対象物が選択される必要がある。抽出されたターゲットの位置情報が中間層・深層にあるサッカドの motor map に変換されることが重要であると考えられる。

(2) 長年神経科学でもモデル動物としてマウスが使用されてきたが、夜行性の小動物であるげっ歯類は霊長類などに比べて視覚機能が乏しいと考えられてきた。実際に、マウスの大脳皮質第一次視覚野などでの視覚応答特性や選択制は、霊長類などに比べて弱いことが知られている。一方で、上丘の視覚情報処理能力そのものを詳しく調べた研究はまだまだ少ない。近年発展してきた生体脳からのイメージング手法を上丘の視覚応答の記録に適用することで、私や、海外の少数のグループは上丘の視覚機能を詳しく調べ始めており、新たな知見が得られはじめ、だんだんと盛り上がりつつある分野になってきている。

2. 研究の目的

(1) 上丘における「視覚 - 運動の空間情報の変換」の初段には、網膜からの直接の視覚入力がある。上丘の retinotopic map は、この視神経からの入力のパターンによって形成されていることが知られているが、どのような空間的な特性を持っているのかを生理学的に証明した研究はない。さらに、視神経からの入力の結果として、実際に上丘浅層の神経細胞、特に、神経細胞の集団に対して、どのように視覚情報を表現しているのかは詳しく分かっていない。上丘の視覚機能を明らかにするために、この入出力関係を調べる必要がある。

(2) またより生理学的な条件での記録を行うために、*in vivo* で慢性的に上丘の視覚応答を安定的に記録する手法の確立を目指す。これが可能になると、覚醒状態の動物から繰り返し、神経活動を記録することが可能になり、様々な条件の視覚応答を比較することが可能になると考えられる。また、覚醒条件下ともに、麻酔によって減弱・変化した神経活動

を比較することで、過去の知見との差異を検証しつつ、より生理学的な条件下での上丘の視覚応答が明らかにできると考えられる。

3. 研究の方法

(1) アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、上丘の神経細胞もしくは、網膜の神経節細胞にカルシウム感受性タンパク質である GCaMP を発現させる。これによって、上丘浅層に入力する視神経末端、もしくは上丘の神経細胞の視覚応答を慢性的に記録する。

上丘に AAV ベクターを注入する場合は、上丘の表面を覆っている大脳皮質を一部吸引切除し、上丘表面を露出させる。ガラスピペットにより AAV ベクターを注入した後、大脳皮質を吸引してあいた空間に微小なガラスプラグを埋め込む。ガラスプラグの片側には、カバーガラスを貼り合わせ、カバーガラスと頭蓋骨を接着し固定する。ガラスプラグは、露出させた上丘の上に、張り出してくる新たな組織が視野に侵入することを防ぎつつクリアな視野を確保する。このガラスプラグは上丘を観察するために観察窓として、安定に機能することを確かめていく。同時に顕微鏡下にマウスを固定する際に用いる頭部固定用のチタン製のヘッドプレートに頭蓋骨に貼り付ける。処置後マウスは回復と、GCaMP が十分発現するまで3週間程度、間の期間は、ハンドリングと頭部固定の慣らしをおこない馴化させる。

網膜神経節細胞に GCaMP を発現させる場合は、ガラスピペットを用いて、硝子体に AAV ベクターを注入する。麻酔したマウスの眼球の周辺をピンセットで軽く押さえ眼球を少し飛び出させたのち、角膜と強膜の間にガラスピペットを刺入していき、十分刺さったところでピペット内に圧力をかけ注入を行う。眼圧が高くなるため、ピペットを抜いた後は、注入したのウイルス溶液が漏れないように軟膏を塗り眼球を眼窩に戻す。と同様に、術後の回復および GCaMP の発現まで3週間程度待つ。

(2) *in vivo* 2光子イメージング

2光子レーザー顕微鏡を使って、AAV ベクターを注入したマウスの上丘からイメージングをおこなう。GCaMP は 920 nm 付近のレーザーで励起をおこなう。

(3) 遺伝子改変マウスの利用

上丘浅層は、脳の中でも抑制性神経細胞の割合がいが非常に多い領域である。上丘浅層のうちの約半数が、抑制性の神経細胞である。興奮性細胞の活動と抑制性細胞の神経活動

の大きな違いを明らかにし、神経回路モデルを検討するために、抑制性の神経細胞に赤色の蛍光タンパク質である tdTomato を発言するマウスを (VGAT-tdTomato) 利用する。現在使用している GCaMP は緑色の蛍光を出すため、現在して要している VGAT-Venus マウスなどは、発生する蛍光の波長で区別できず利用できなかった。VGAT-tdTomato マウスを使用した場合、蛍光波長のオーバーラップが少なく、蛍光シグナルをフィルタで分離しイメージングすることができる。このマウスは、群馬大学の金子涼介博士より最近開発されたもので、これを譲渡いただき導入を進め、実験に利用する。

(4) 視覚刺激

視神経からの視覚入力、もしくは、上丘神経細胞の視覚応答を記録するため、顕微鏡下で頭部固定されたマウスの眼前に液晶モニタを設置し、視覚刺激を提示する。用いる視覚刺激は、黒い背景画面に、視野角 1° から 10° 程度の白色の丸い画像、または、幅 10° 程度の簡単な構造を持った図形 (アルファベットやなどを利用) を提示した。さらに、動きのある刺激として、 1° から 10° の幅の白いバーを用いた。バーは、画面いっぱいの長さで $12\sim 16$ 方向に傾けてあり、傾きと垂直の方向に速 $10^\circ \sim 40^\circ/\text{sec}$ で画面の端から端まで滑らかに動く。視覚刺激提示中もマウスにはいかなるタスクも課しておらず、受動的に刺激を見たり、自由に眼球運動を行うことができる。

(5) 運動 (眼球運動・歩行運動) の計測

無麻酔下であっても、マウスが安静にしている場合は、感覚応答を含めて神経活動が低下することが知られている。マウスの覚醒度をなるべく下げないように、頭部固定した状態であっても歩行運動ができるように、若干不安定で回転可能な筒上にマウスを置いた。マウスはこの筒状で好きなタイミングで自由に歩行運動を行う。運動量を記録しておくため、この筒の軸は、ロータリエンコーダに接続しており、つつの回転角度を記録した。また視覚刺激を提示している間、サッカー様の眼球運動の頻度が高くなることを事前の実験で確認できていた。上丘の重要な機能であるサッカーの生成と神経活動の対比することも重要であるため、小型のデジタルカメラを用いたビデオトラッキング法によってマウスの眼球運動の計測した。計測ソフトとして、産業技術総合研の松田博士が開発した iRecHS2 の開発版を利用させていただいた。このシステムでは、約 500 Hz で瞳孔中心を計算して、水平方向と垂直方向の位置、また動向の大きさなどを記録することができる。

(6) 記録システム

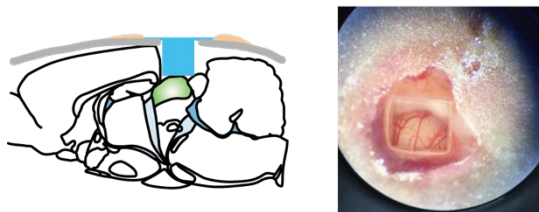
2 光子顕微鏡によるイメージングは

OLYMPUS FV-1000 MPE で行った。視覚刺激の提示、眼球運動、歩行運動のシグナルは、MATLAB で作成した自作のプログラムによって制御と記録をおこなった。実験後のデータの解析にも MATLAB のプログラムは、GitHub に公開した (5. [その他] 参照)。

4. 研究成果

(1) 覚醒下行動中のマウス上丘からのイメージング

2 光子顕微鏡下に頭部固定したマウスを回転可能ロッドにのせ直線的な歩行運動可能な状態で *in vivo* カルシウムイメージングをおこなった。ガラスプラグを埋め込んで作成した観察窓は感染や組織の侵入などを防ぎ綺麗な観察面が保たれることが確認できた。観察窓は $1.3\text{ mm} \times 1.5\text{ mm}$ の面積があり、AAV ベクタの注入箇所の上上にうまくガラスを配置できれば、広範囲からの観察が可能になることが確かめられた。埋め込み時に上丘表面に多少の出血がある場合や、出血した血液が残っている場合であっても、 $2\sim 3$ 週間待っている間に表面が綺麗になることもわかった。おそらく脳脊髄液の流れで灌流され残った血液が拡散したためと考えられる。



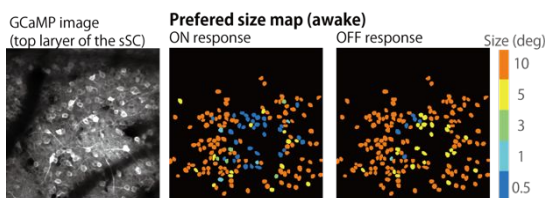
この観察窓を通して、GCaMP を発現した上丘の神経細胞集団 ($100 - 300$ 個程度) の視覚応答を Ca^{2+} イメージングによって同時に記録することが可能になった。一方、マウスがロッド上を激しく走っている場合や、顔の周辺を手で頻りに拭くような行動をしている場合には、イメージングしている光学断面の深さが大きく動く場合があった。頭部は頭蓋骨に貼り付けたヘッドプレートでかなりしっかりと固定されているが、あまりに大きな運動をさせてしまうと脳は頭の内部でもかなり動いてしまう。より安定な記録環境が保つために、実際の記録を行う前の期間に、頭部固定 + 暗室での視覚刺激提示という環境に十分馴化させておく必要があると考えられる。

網膜神経節細胞から上丘へ投射する軸索末端のイメージングについては、今回は納得のいく結果は得られなかった。AAV ベクタを眼球に注入したマウスから、感染から約 1 ヶ月後に、眼球を取り出し網膜部分を単離して蛍光顕微鏡で観察したところ、中心窩付近に

GCaMP を発現する細胞は確認することができた。一方で、上丘でイメージングした場合に網膜の神経節細胞から投射するGCaMPを発現した軸索やその終末構造の蛍光は非常に弱く、視覚応答を観察するには、至らなかった。この点については、感染効率のより高い AAV (もしくは別のウイルスベクター) を利用するか、発現効率がより高いプロモータなどを使う必要があり、さらに検討が必要だと考えられる。

(2) 麻酔下及び覚醒下での神経活動

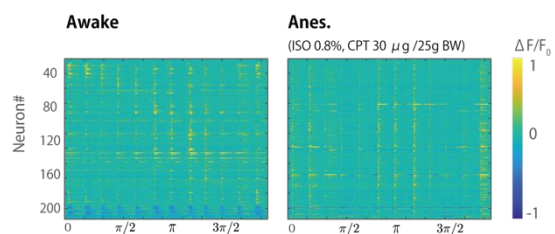
以前までの研究では、ウレタン麻酔下のマウスの上丘で、急性実験をおこない、視覚応答を計測してきた。また、過去の多くの研究でも麻酔下の神経活動の結果が公開されている。ウレタンは、急性実験でのみ使用できるため、慢性的に使用することはできない。また最近では、ウレタンを麻酔薬として利用すること自体も推奨されない場合が多くなってきた。そのため、慢性実験においては、イソフルランの吸入麻酔、もしくは、ケタミン・キシラジン混合麻酔に変更して、全ての処置及び記録をおこなった。イソフルランはマウスでは 2~3% 程度の濃度で麻酔維持に使用される。しかしこのレベルでも、大脳皮質の神経活動が大きく減弱することが知られている。上丘の神経活動自体がイソフルランによってどの程度影響を受けているかはよく知られていないが、なるべく影響が少ないよう、通常使用されるの 2~3% から 0.8~1% に濃度を落として記録をおこなった。麻酔の影響と区別するため、まず覚醒下で視覚応答の記録をはじめ、その後、イソフルランを吸入ししばらくしてから、麻酔下で同様に実験をおこない視覚応答を記録した。さらに、イソフルラン吸入をやめ 30 分から 1 時間経過後に、再度同じ視覚刺激を提示し、神経活動の記録をおこなった。覚醒下で記録した場合の刺激のサイズによる神経活動の変化を元に、最もよく反応する刺激サイズ (Preferred size) との関係の例を図に示す。



まず、イソフルラン麻酔下においては全体的に神経細胞に発現する蛍光強度が減弱していることが確認された。一方で、細胞の形態学的な特徴から大型の抑制細胞と予想される神経細胞ではベースラインの蛍光強度が高くなる傾向にあった

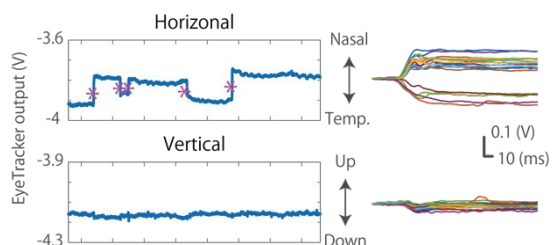
視覚刺激に対する応答については、抑制性の神経細胞の一部のニューロンでは、視覚刺激を提示した際に、蛍光シグナル

の変化量 ($\Delta F/F_0$) がマイナス方向に変化する応答が観察される場合があった。一般に、カルシウムイメージングにおいては、カルシウムの蛍光強度の上昇は、活動電位に由来する細胞内のカルシウム濃度の上昇が反映されていると考えられる。つまり膜電位の過分極のような抑制性のシナプス応答は見ることはできないと考えられる。しかし、もともと自発的な発火頻度が上昇している状況で、発火頻度の急激な減少がおこれば、その間のカルシウム濃度の低下に伴い、蛍光強度の現象が見える可能性は否定できない。特に、イソフルラン麻酔は、GABA 受容体が活性化されていることから、麻酔の効果によって、抑制性のカルシウム応答が観察できているのかもしれないがその実態は不明である。実際には、イメージング中に、細胞外・もしくは細胞内で電気記録を行い、神経活動レベルまたは膜電位レベルで起こっていることを確かめる必要がある。現段階では、この抑制的なカルシウム応答を元に、神経回路モデルを構築しているところである。



(3) 運動関連応答

覚醒下で視覚刺激を提示すると、マウスのサッカド様の眼球運動の頻度が多くなることを確かめた。通常マウスは、サッカドによって視線を移動させることは少ないと考えられている。一方で、実験的に頭部固定した状況では、サッカド様の急速眼球運動を行うことが知られている。今回、視覚刺激を動かさない、静的な条件では、サッカドの頻度は、視覚刺激がない場合と比較して大きく変化しなかった。一方、画面上を動くパースペクティブ刺激を提示した場合には、サッカド様の眼球運動の回数が上昇した。また、水平方向の眼球運動は多く起こるものの、垂直成分はほとんど変化しない。



眼球運動のタイミングと、視覚刺激のタイミングや、動く方向との関連については、現

在解析しているところであるが、刺激のタイミングに合わせて毎回サッカードするという様な強い影響は観察されなかった。

サッカード様の眼球運動が起こる場合、マウスの歩行運動の頻度が上がることが観察された。特に、歩行・走行の開始のタイミングで、目が動く場合が多い。この眼球運動と歩行運動の関連についての生理学的な意味はまだ不明であるが、今後、神経活動との比較と合わせて、実際にどの様な関連も興味深い。最近の研究でも、上丘の活動は、獲物に向かう行動や敵から逃げる行動を生み出すことに重要な役割を持つことが明らかになりつつある。眼球運動でターゲットを捉えるとともに、そこに向かうか、それとも素早く逃げるのかを無意識的に定まめ、実際に歩行運動が発生するという可能性が示唆される。

一方、現在までの結果では、上丘浅層において、直接眼球運動や、歩行運動と関連した細胞（集団）の神経活動は観察できてはいない。運動関連の応答を計測するにはより深い層（中間層・深層）からの記録が必要となり、今後の研究では深部からも安定に記録できる手法が重要になってくると考えている。

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 1 件)

Masatoshi Kasai, Tadashi Isa.

Imaging population dynamics of surround suppression in the superior colliculus

European Journal of Neuroscience, 査読有り, 2016, Oct;448(8):2543-2556. doi: 10.1111/ejn.13371.

〔学会発表〕(計 3 件)

笠井昌俊, 伊佐正, in vivo 2 光子イメージングに夜覚醒下マウス上丘の視覚応答, 第 95 回日本生理学会大会, 2018 年

Kota Tokuoka, Masatoshi Kasai, Tadashi Isa, Anatomical properties of the cholinergic projection from the parabrachial nucleus to the superficial layer of superior colliculus, Neuroscience 2017, 2017 年

徳岡広太, 笠井昌俊, 伊佐正, 上丘浅層への中脳コリン作動性神経投射の解剖学的特徴と生理学的機能, 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年

〔図書 (Book Chapter)〕(計 1 件)

Tadashi Isa, Masatoshi Kasai, Richard

Veale, Oxford University Press, Handbook of Brain Microcircuits, Second Edition, Chapter 39. The Superior colliculus, 2018, 624 ページ

〔産業財産権〕

なし

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://nscinbiol.med.kyoto-u.ac.jp/people/4/>

https://github.com/kassailattice628/Rec_Ver11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 昌俊 (KASAI Masatoshi)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70625269

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし