

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14931

研究課題名（和文）マーモセット視覚トップダウン結合のin vivo二光子カルシウムイメージング

研究課題名（英文）In vivo two-photon calcium imaging of top-down connections in the marmoset visual cortex

研究代表者

松井 鉄平（Matsui, Teppei）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師

研究者番号：10725948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではin vivo二光子カルシウムイメージングをマーモセット大脳皮質視覚野に適用し、大脳皮質視覚野間を繋ぐ領野間結合の機能を軸索末端の活動イメージングにより調べるための技術を開発した。特に、霊長類神経細胞で大きいカルシウム反応が得られるようにGCaMPの発現手法を開発した。この技術により、軸索末端や樹状突起スパインでのカルシウム応答の計測に成功した。更に、この技術を応用することで高次視覚野から低次視覚野へのトップダウン結合が、多様な視覚情報を伝達していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の情報処理機構の解明は生物学的・医学的な重要性を持つ課題であるだけでなく、新しい人工知能の開発など工学的にも重要な意義を持つ。本研究では、そのような脳の情報処理機構の中でも特に機能が良く分かっていないトップダウン結合に着目し、その機能を実験的に調べる技術を開発した。さらに、この技術を高度な視覚処理能力を持つマーモセットサルに应用することにより、トップダウン結合が運ぶ多様な視覚情報を可視化することに成功した。今後、この技術を応用しトップダウン結合を含む様々な視覚情報処理の脳神経回路を調べることで、生物の脳が持つ情報処理能力を社会的問題の解決に応用するための知見が得られると期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for in vivo two-photon calcium imaging that could study functions of cortico-cortical connections between visual areas of the marmoset neocortex. Specifically, we developed a method for expressing GCaMP in the primate cortical neurons at high efficiency. We successfully recorded visual responses in the axon terminals and the dendritic spines of the marmoset cortical neurons. By applying the method to top-down connections connecting higher and lower visual areas, we found that the top-down connection conveyed information about diverse visual features possibly providing contextual information necessary for complex visual information processing.

研究分野：神経科学

キーワード：脳活動イメージング 2光子顕微鏡 大脳皮質 軸索 霊長類 カルシウムイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む霊長類の視覚システムは階層性を持つ複数の皮質領野と視床領野が双方向的に結合して作る複雑なネットワークである(Fellman & Van Essen 1991)。このうち、低次視覚皮質から高次皮質皮質へのボトムアップ結合は、複雑な視覚反応特性の獲得に役立つと考えられており、その機能獲得に関わる神経回路も明らかになりつつある(Ried & Alonso, 1996; Glickfeld et al., 2013; Matsui & Ohki, 2013)。

また、トップダウン結合も低次視覚皮質の活動に大きく影響していることが先行研究から示されている。サルやネコにおいて、動きの知覚に関連する高次視覚皮質の活動を阻害すると、V1の細胞で物体の動きに対する反応選択性が変化することが分かっている(Hupe et al., 1998; Galuske et al., 2002)。このことから、高次視覚皮質からのトップダウン結合はV1の特徴抽出機能を補助する役割があると考えられている。一方、高次視床の一つ Pulvinar の活動を阻害するとV1の視覚反応そのものが激減する為、Pulvinar から V1 への視床-皮質間トップダウン結合は、V1の活動をゲーティングすると考えられる(Purushothaman et al., 2012)。

このようなトップダウン結合の機能を生み出す神経回路を理解するには、「どのような視覚情報が、どのような視覚反応性を持つ神経細胞または機能カラムに入力しているか」を明らかにする必要がある。皮質皮質間のトップダウン結合に関しては、内因性シグナルイメージングで調べた機能カラム単位での機能マップ(e.g. 方位マップ)と皮質皮質間の解剖学的結合とを対応させることが試みられてきたが、統一的な見解は得られていない(Angelucci et al., 2002; Stettler et al., 2002; Shumuel et al., 2005)。高次視床では類似の先行研究は無く、何も分かっていない。これらの研究が難しかった原因は、従来の手法では、「受け手側のV1の機能マップに対して、どのような視覚反応特性を持つトップダウン結合が、どのように分布するか」という機能と結合の関係を高精度で調べることが出来なかったことにある。

近年、申請者らの研究から、軸索末端の二光子カルシウムイメージングにより機能と結合の対応関係を調べることが可能になった(Matsui & Ohki, 2013)。同様の手法によりマウスでは視床から皮質への軸索の機能解析も行われているが、その軸索からの入力を受け取る細胞の機能特性を明らかにすることは、未だ技術的に困難である(Kondo & Ohki, 2015)。これは、機能カラム構造を持たないマウスでは、受け手側の機能を個々の細胞レベルで調べる必要があるからである。そこで申請者は、機能カラム構造を持つ霊長類において、軸索末端の二光子イメージングと内因性シグナルイメージングを組み合わせ、視覚反応特性を調べたトップダウン結合軸索末端(入力側)のV1機能マップ(受け手側)上の分布を調べることで、入力側と受け手側の視覚反応特性の対応関係を正確に同定することが可能だとの着想に至った。

2. 研究の目的

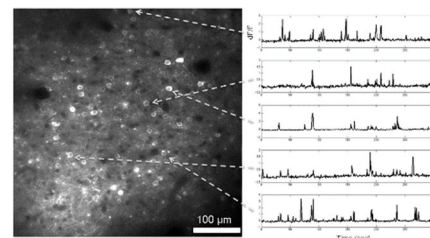
本研究の目的は、マーマセットにおいて、「高次視覚皮質から一次視覚皮質(V1)」及び「高次視床からV1」へのトップダウン結合が、それぞれどのような視覚反応特性を持つV1神経細胞に入力しているか解明することである。霊長類では、高次皮質および高次視床からのトップダウン結合が異なる機能を持ち、その違いは、二種類の結合がV1に対して異なる仕方で視覚情報を送ることに起因すると推測されている。本研究では、二光子および内因性シグナルのイメージングを組み合わせ、軸索末端で見たトップダウン結合の視覚反応特性と、それが分布する機能カラムの視覚反応特性を比較する。これにより、入力側と受け手側の視覚反応特性の対応関係が皮質-皮質間と視床-皮質間のトップダウン結合で異なるか否か明らかにする。

3. 研究の方法

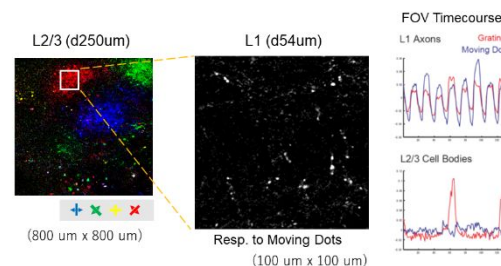
まず、マーモセット大脳皮質において、内因性シグナルイメージングにより一次視覚皮質(V1)および高次視覚皮質(MT)を同定する。次に、MTの神経細胞に AAV で GCaMP6 の発現を誘導し、V1 に分布するトップダウン結合の軸索末端の位置を sCMOS カメラにより同定する。その後、広域二光子カルシウムイメージングで、個々の軸索末端の視覚反応特性を調べる。得られた軸索末端の視覚反応特性とその V1 上での位置と、内因性シグナルにより調べた V1 の機能マップとの対応関係を明らかにする。高次視覚視床(Pulvinar)についても、マーモセット脳アトラスを参考に AAV を注入し、GCaMP6 の発現を誘導する。その後、上記にして、軸索末端の視覚反応特性および空間位置と V1 機能マップとの対応関係を調べる。最後に、皮質-皮質間と視床-皮質間のトップダウン結合の差異を明らかにし、その機能的意義を検討する。

4. 研究成果

本研究はマウスで開発が進んでいる最新の光学的神経活動観察法をマーモセットに適用することで、これまで調べることが出来なかった神経機能を解析する研究である。したがって、本研究の重要な要素、また最も困難な部分は技術的なものである。本研究の技術的目標のうち重要な要素は3つある。そのうち一つはミクロレベルでの機能解析を可能にするためにマーモセット神経細胞に GCaMP を発現させ、神経活動を観察する実験系を構築することである。当初マウスで行われているのと同様の手法をそのままマーモセットに適用していたが、これはうまくいかなかった。マーモセットの大脳皮質ではマウスの大脳皮質と異なり通常のプロモーターでは神経細胞に GCaMP6 を発現させることが難しかった。現在では、Thy1 と ttA プロモーターの組み合わせによりマーモセット V1 で良好な GCaMP6 の発現が得られることを確認している (Matsui et al., unpublished; 右図)。これにより、一つ目の技術的目標は達成されたと言える。



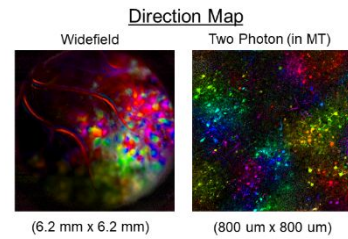
2つ目の技術的目標は、高次視覚野、特に MT 野、の機能解析を行う実験系を構築することである。これについては、まず実験が容易な V1 で実験系を確立し、次に MT 野での実験を行った。我々の研究では、GCaMP による 1 光子イメージングで、広範囲 (10 mm x 10 mm) に渡ってカラムレベルの神経活動を観察することに成功した。予想された通り、マーモセット V1 では密に方位選択性カラムが存在した。一方で、マーモセット V1 の方向に対する選択性は弱く、方向選択性カラムを見ることは出来なかった。ネコの V1 でも方向選択性カラムが存在するかどうかは議論が分かれていたが、申請者が二光子カルシウムイメージングにより調査したところ、ネコ V1 には方向選択性カラムが存在し、そのカラムの位置は視床からの Magnocellular 系の入力が入っている場所に偏っていることが分かった (Nishiyam*, Matsui*, et al., Cell Reports, 2019)。マーモセットにおいても、高次視覚野の MT 野では、領野全体において満遍なく方向選択性カラムが存在する様子が見取れた (右図)。



MT 野の方向選択性カラムの存在は、マカサルを中心とした霊長類での先行研究とも一致しており、信頼性が高い結果と考えられる。このことから、本研究の目標の一つである MT 野をターゲットとした GCaMP の導入と機能解析は成功したと言える。また、マーモセット V1 で方向選択性カラムが存在しないことは、カルシウムイメージングの技術的問題ではなく、実際の神経細

胞機能を反映しているということも強く示唆される。

本研究の3番目の技術的目標として、マーモセットにおいて神経軸索末端での機能解析を行うということがある。MT野からV1への軸索は長距離であり、GCaMPの軸索末端への移行が行われるか不明であったため、まずは比較的近距离である三次視覚野DMから二次視覚野V2へのフィードバック結合の機能解析を行った。DMからV2へのフィードバック結合は大腦皮質1層に分布しており、V2の細胞体とは異なる刺激選択性を示していた(右図)。



このことから、3番目の技術的目標である軸索末端の機能解析を達成した。さらに、V2にある一つ視覚特徴に特化した機能カラムに、フィードバック結合からは多様な視覚特徴の情報が入力しているということも分かった。このことは、過去の解剖学的な研究から示唆されていたが、実際に霊長類で機能的にそれを実証したのは本研究が最初である。

このように、目標としていた3つの技術目標を達成することができた。これらの技術目標は、今までマウス以外の動物ではほとんど適用されたことが無い技術であり、また、マーモセットにおいては初めて適用された技術であることを考えると、2年間で達成した成果としては大きいと考える。このほかにも、これまで他の霊長類では調べることが難しかったDM野について、V2との視覚機能の違いを明らかにすることが出来た。更に、DM野に特徴的な視覚特徴の情報がV2野にもフィードバックされていることを発見したことで、視覚野間のフィードバック結合が持つ機能的意義について新しい示唆を得ることが出来た。以上のことから、本研究計画の当初の目標は十分に達成され、加えて予想外の新しい知見が得られたと考えられる。今後、日本国内でのマーモセットの入手が容易になるに従い、本研究で開発した技術によって、他の視覚野間や視床皮質間での情報処理について機能解析を進めることが可能になるだろうと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiyama Megumi, Matsui Teppei, Murakami Tomonari, Hagihara Kenta M., Ohki Kenichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Cell-Type-Specific Thalamocortical Inputs Constrain Direction Map Formation in Visual Cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1082 ~ 1088.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sonoda Keita, Matsui Teppei, Bito Haruhiko, Ohki Kenichi	4. 巻 505
2. 論文標題 Astrocytes in the mouse visual cortex reliably respond to visual stimulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1216 ~ 1222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.027	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Teppei, Murakami Tomonari, Ohki Kenichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Mouse optical imaging for understanding resting-state functional connectivity in human fMRI	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 e1528821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1080/19420889.2018.1528821	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Teppei, Murakami Tomonari, Ohki Kenichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Neuronal Origin of the Temporal Dynamics of Spontaneous BOLD Activity Correlation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 1496 ~ 1508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/cercor/bhy045	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Matsui, T. Murakami, K. Ohki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Neuronal Origin of the Temporal Dynamics of Spontaneous BOLD Activity Correlation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhy045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Murakami, T. Matsui, K. Ohki	4. 巻 37
2. 論文標題 Functional Segregation and Development of Mouse Higher Visual Areas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9424-9437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0731-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Matsui, T., Hashimoto, T., Uemura, M., Murakami, T., Kikuta, K., Kato, T., Ohki, K.
2. 発表標題 Mesoscale and cellular scale calcium imaging of the primary and secondary visual cortex in marmoset monkeys
3. 学会等名 Society for Neuroscience 44th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uemura M., Matsui T., Hashimoto T., Murakami T., Kikuta K., Kato T., Ohki K.
2. 発表標題 Optimization of GCaMP expression system for functional calcium imaging in marmoset visual cortex
3. 学会等名 Society for Neuroscience 44th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murakami T., Matsui. T, Ohki, K
2. 発表標題 Multi-scale calcium imaging in the visual cortex of marmoset monkeys
3. 学会等名 CSHL Asia Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohizumi Y, Murakami T, Matsui T, Yoshida T, Ohki K
2. 発表標題 Asymmetric Processing of Visual Motion in Mouse Retrosplenial Cortex
3. 学会等名 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto T, Matsui T, Uemura M, Murakami T, Kikuta K, Kato T, Ohki K
2. 発表標題 Multiscale calcium imaging in the visual cortex of marmoset monkeys
3. 学会等名 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsui, T
2. 発表標題 Multi-scale and multi-modal imaging of the visual cortical network in marmosets
3. 学会等名 国際マーモセット研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsui, T
2. 発表標題 Multi-scale and multi-modal imaging of the visual cortical network in marmosets
3. 学会等名 日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsui, T
2. 発表標題 Functional imaging in the primate neocortical network using genetically encoded calcium indicator
3. 学会等名 国際ワークショップ「遺伝子導入技術による霊長類脳機能操作とイメージング」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsui, T
2. 発表標題 マウス大脳皮質の広域カルシウムイメージングによる安静時脳活動の研究
3. 学会等名 生理学研究所 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui T, Nishiyama M, Murakami T, Ohki K
2. 発表標題 Functional microarchitecture of direction selectivity in the cat area 17.
3. 学会等名 第40回神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hashimoto T, Uemura M, Matsui T, Murakami T, Ohki K
2. 発表標題 Multiscale Calcium Imaging in Visual Cortex of Marmoset Monkeys.
3. 学会等名 第40回神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsui T, Murakami T, Ohki K
2. 発表標題 Brain-wide mapping of stimulus induced variability quenching reveals modularity of cortical networks.
3. 学会等名 Computational and Cognitive Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsui T, Hashimoto T, Uemura M, Murakami T, Kikuta K, Kato T, Ohki K
2. 発表標題 Multi-scale, multi-modal imaging of the visual cortical network in marmosets.
3. 学会等名 第7回マーモセット研究会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考