

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06940

研究課題名(和文) 視覚野 - 上丘間で共有される視覚情報と相互調節機構の解明

研究課題名(英文) Visual information shared between visual cortex and superior colliculus and their mutual regulation mechanisms

研究代表者

笠井 昌俊 (KASAI, Masatoshi)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、中脳の皮質下初期視覚、複数感覚統合、感覚運動変換の鍵として機能すると考えられる上丘の生理学的役割を視覚機能を中心としてを明らかにすることである。特に、哺乳類の視覚機能に重要な大脳皮質視覚野と上丘の間で作られる神経回路ループに着目し、2つの脳領域でやり取りされる視覚情報を細胞集団レベルの活動として可視化と、ループに関わる神経経路を選択的に操作する手法の開発をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上丘は、進化的に古くから感覚情報の統合や感覚-運動変換を司る脳領域として古くから発達している。哺乳類が獲得した大脳皮質を発達させたことで高次の脳機能に獲得したが、上丘の意識にのぼる知覚への関与については不明な点が多い。本研究で上丘と視覚野が作る神経回路活動を記録・操作すること可能になり、新旧の情報統合領域の関係、違いを比較するで、上丘の認知機能への影響を評価する系が確立できた。

研究成果の概要(英文)：The superior colliculus is a key structure for subcortical visual processing, multimodal sensory integration, and sensory-motor transformation, in the midbrain. In this project, I focused on the loop-like circuits between the superior colliculus and the visual cortex. I developed the method for visualizing and manipulating pathway-specific neural circuit dynamics between the superior colliculus and the visual cortex. I also found that the isofluorane anesthesia changed the spatial properties of the neuronal population responses. This suggested that the functional organization in the visual layer of the superior colliculus might be altered in various states by the local circuit mechanisms or top-down input from the cerebral cortex.

研究分野：神経生理学

キーワード：上丘 視覚 方向選択性 方位選択性 2光子顕微鏡 in vivo イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳は進化の過程で大脳皮質を獲得した。我々の脳は、大脳皮質の発達にともなって認知機能のような複雑かつ高次の機能を獲得してきたと考えられる。一方で哺乳類と比較して、進化的に古い動物や、大脳皮質が未発達な哺乳類では、中脳の上丘が大脳皮質の代わりに重要な機能を担っていると考えられる。中脳の上丘は、古くは視覚中枢として、また複数の感覚を統合し運動生成のための信号処理をおこなう中枢として、非常に重要な機能を持つ神経核と考えられてきた。これまでの研究では、上丘がボトムアップの視覚情報から、saccade のような素早い眼球運動等をどのように生成するのかといった点についての神経メカニズムや局所神経回路の働きが調べてられてきた。しかしながら、上丘における視覚応答は、我々の“見え”のような知覚には直接的な影響は少ないと考えられているため、上丘が持つ視覚情報の処理機能やその能力については、大脳皮質の視覚関連領域とくらべて注目は薄い。また上丘の視覚応答と大脳皮質視覚野での視覚情報は基本的には別の用途で用いられると考えられてきたため、2つの領域の協調した機能の実態には不明な点が多い。

解剖学的な知見から、大脳皮質の一次視覚野と上丘は、直接、間接的な神経結合を有しており、特に視覚野から上丘への入力を制限すると上丘の視覚応答が多少減弱することが知られている。一方でより詳しい視覚応答特性への影響については詳しくはわかっていない。さらに、上丘の活動が大脳皮質にどの程度影響を与えるかについてもほとんど知られていない。この点を明らかにすることは、中脳の知覚や認知機能に対する影響を理解することにつながると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類の脳における中脳上丘と、大脳皮質視覚野進化的に古くから機能する中脳の、協調した感覚情報処理メカニズムと、その生理学的な機能を理解することである。

この研究課題では特に、視覚情報処理における大脳皮質と中脳の関係に着目した。大脳皮質の一次視覚野 (V1) と、中脳の上丘の相互的な神経結合を対象として、(1) V1 から上丘 に送られる視覚情報、および (2) 上丘から V1 に送られる視覚情報、の時空間的な特性を、*in vivo* 2光子イメージングによって明らかにしていくさらに (3) 光遺伝学や化学遺伝学法により、一方の経路からの視覚入力への抑制が、もう一方の領域に与える影響から2つの領域の相互的な関係を明らかにする。これまで、上丘の視覚応答は“見え”のような意識にのぼる知覚には直接関与することはないと考えられてきたが、本研究では、V1 と上丘が協調した機能があることを確かめ手法を開発し、知覚機能への関与の理解につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

中脳の上丘と、上丘と相互に連絡する大脳皮質視覚野の領域において、どのような視覚情報が共有されているのかを明らかにする。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、巡行性およ

び逆行性に、カルシウムセンサー、光感受性チャネル、DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) 受容体を上丘または V1 に発現させ、相互的な情報のやり取りを 2 光子顕微鏡を用いた *in vivo* 2 光子カルシウムイメージング法、光遺伝学法、化学遺伝学法を組み合わせによって確かめる。まず V1 から上丘へ送られる視覚情報の性質を明らかにする。次に V1 が上丘の視覚応答にどのような影響を与えるかを知る。上丘から視覚野へと送られる視覚情報の性質を確かめた。

#### (1) 上丘および V1 からの *in vivo* 2 光子イメージングのための動物標本作成と目的細胞のターゲティング

マウスの上丘および V1 (いずれも右半球) にカルシウムセンサー (GCaMP6f, somaGCaMP6f2) を発現させ、2 光子レーザー顕微鏡による  $Ca^{2+}$  イメージング法をもちいて、麻酔下および、覚醒下で細胞集団の神経活動を計測した。上丘からのイメージングでは、大脳皮質の尾内側部を吸引しガラスプラグを埋め込みイメージング窓を作成した。V1 からのイメージングでは、丸型カバーガラスによるイメージング窓を作成し、長期間イメージングが可能な動物標本作成した。

逆行性の AAV ベクターを上丘に注入することで、上丘へ投射する V1 の神経細胞にカルシウムセンサーを発現させ、視覚野から上丘へ送られる視覚情報の性質を調べた。

セロタイプ 1 の AAV で報告された、経シナプス性 (シナプス結合する次の細胞に感染が拡大する特性) を利用して、V1 から情報を受け取る上丘の神経細胞に Cre を発現させ、Cre 依存的に GCaMP もしくは、赤色の蛍光マーカー (tdTomato, mCherry 等) を発現させることで、V1 から直接入力を受ける上丘の神経細胞を識別し、視覚応答の記録をおこなった。

抑制性細胞特異的に Cre を発現する遺伝子改変マウス (VGAT-IRES-Cre) を導入し、Cre 依存的にカルシウムセンサー、オプシン、DREADD 受容体を発現させる AAV ベクターを用いることで、局所回路内の抑制性細胞と興奮性細胞の応答の違いを調べた。

#### (2) 視覚刺激と視覚応答の計測および行動の計測

マウスの眼前に液晶モニタ (75Hz) を設置し自作の視覚刺激提示プログラムにより、moving bar による視覚刺激をおこなった。moving bar は、黒地の背景画面に白色 (フルコントラスト)、bar の太さは、1-10°、動く速度は 5, 10, 20, 40°/sec を組み合わせて、最も視覚応答が大きくなる bar width: 3°、speed: 10°/sec を用いた。

マウスは対物レンズ下でイメージングをおこなうため頭部を固定してあるが、覚醒下での視覚応答計測の場合は自発的な眼球運動もしくは歩行運動をおこなう。これらの運動は、視覚応答の大きさに影響する場合があるため、瞳孔中心のビデオトラッキング (iRecHS2) と、ロータリィエンコーダを用いた歩行の計測を行った。視覚応答解析の際には、大きな眼球運動や歩行運動があった刺激トライアルを解析から除外した。また、ビデオトラッキングは瞳孔の検出に失敗した場合にデータが不明であるため、別のカメラを新たに設置し、500 Hz で眼球部分の動画を保存する機能を自作の計測プログラムに追加した。これにより、オンラインでは不明になった眼球運動のデータを実験終了後に動画から検証することが可能になった。このシステムは GitHub で公開した。

### (3) 回路特異的な神経活動の操作

AAV ベクターを用いて光遺伝学用のオプシン (ChR2, Jaws, eNpHR 等) や, DREADD 受容体 (hM4Di, hM3Dq 等) によって, 視覚野の視覚応答を興奮・抑制した場合の上丘の神経活動の変化を調べる. 単に応答の強弱が変わる (ゲイン調節) だけなのか, 特定の特性に影響があるのかを明らかにする.

### (4) 脳の状態による上丘神経細胞の視覚応答特性の影響

睡眠と覚醒, 注意の有無, 運動との関連など, 動物の様々な状態によって, 感覚刺激に対するニューロンの反応の増減が起こると考えられる. また反応する刺激に対するチューニング特性の変化が起こる場合もあると考えられる. 上丘の視覚応答が, 脳の状態によってどのように変化するかを確かめるため, 麻酔下と覚醒下条件で, 同一の細胞集団の視覚応答を記録し比較を行った. 使用する麻酔については, ケタミン・キシラジン混合麻酔 (腹腔注射), 3 種混合麻酔 (メドミジン・ミタゾラム・ブトルファノール, 腹腔内注射), イソフルラン (吸引), での比較検討おこなった. 視覚刺激には moving bar 刺激を用いた. 視覚応答の大きさの変化だけでなく, bar 刺激の動く方向および, bar の方位に対するチューニング特性に対する変化について解析をおこなった.

## 4. 研究成果

### (1) 経シナプス AAV 感染による 上丘 <- V1 ニューロン の視覚応答

AAV1-hSyn-Cre を高力価 ( $\sim 10^{13}$  gc/mL) で野生型マウスの V1 (右半球) 深層に注入し, その数日後, 同側の上丘に Cre 依存的にカルシウムセンサー (GCaMP6f, somaGCaMP6f2), または蛍光タンパク質を発現可能な AAV ベクターを注入した. GCaMP を発現させたマウスを用いて, 2 光子レーザー顕微鏡による *in vivo* での観察をおこなったところ, GCaMP の蛍光シグナルが確認できた. さらに, 視覚刺激を用いて,  $Ca^{2+}$  イメージングを行ったところ, 視覚応答を記録することに成功した.

同様に, V1 に AAV1-hSyn-Cre を注入し, 同側の上丘には, AAV-hSyn-GCaMP 及び AAV-CAG-Flex-tdTomato を混合して注入し, 広範囲の神経細胞に GCaMP, V1 から入力を受ける神経細胞に tdTomato を発現する系を確立した. 2 色を同時にイメージングすることで, V1 からの入力の有無によって, 上丘浅層の神経細胞の視覚応答の比較を行った. V1 からの入力を受ける上丘の細胞では, 方向選択性が弱い傾向にあることが観察された. この結果を確認するためさらなるデータの取得を行っている. さらに moving bar 刺激以外にも, 受容野のサイズや, 周辺抑制応答の脳内空間情報の違いについても, データを取得し解析を進めている.

### (2) 経路特異的な神経活動の操作

上丘に AAV-hSyn-GCaMP 及び, AAVrg-CAG-hChR2, AAVrg-hSyn-JAWS 等を注入し, 上丘に投射する V1 の神経細胞特異的にオプシンを発現させた. V1 上に光刺激用のカニューレを埋め込み, *in vivo* でのイメージングと光遺伝学的な操作をおこなう系の開発を進めた. V1 への光刺激の影響が, 観察窓を通して上丘の局所回路に影響がある可能性があるため, 逆行性に Cre を発現させる ベクター (AAVrg-pmSyn1-EBFP-Cre) を注入し, V1 で Cre 依存的にオプシンを発

現させる系を確立した。しかし、V1 に埋め込んだカニューレと対物レンズの接触が問題になり、東大で開発中のフィルム型の LED デバイスの使用に切り替えた。十分薄いフィルムデバイスではあるが面積を小さくする、また光の波長を変更して作成依頼をしているが、予算期間中には終わらず、今後も開発を継続予定である。

上丘にアセチルコリンの入力を行う PBN (parabigeminal nucleus) と上丘との生理機能を調べるため、コリン作動性ニューロン に Cre を発現する ChAT-IRES-Cre マウスを用いて、上丘に入力する逆 PBN の神経細胞特異的に、抑制性のオプシンを発現させた。PBN 上部に埋め込んだカニューレから 光刺激を行った。PBN の神経活動を抑制した際の、上丘の視覚応答を調べたところ、上丘の再表層と浅層の視覚応答に違いを見出した。上丘の細胞種の違いと合わせてアセチルコリン入力の視覚応答の制御についても今後の研究を進めていく予定である。

### (3) 麻酔による SC 細胞の視覚応答特性の変化

動物の状態、と視覚応答特性の違いを明らかにするため、麻酔による視覚応答の影響について検討をおこなった。麻酔の作用機序によって神経活動に違いが出ることは容易に想像できるが、視覚応答のチューニング特性への影響などについてはほとんど知られていなかったため、3種類の麻酔の影響を、覚醒時の神経活動と比較を行った。特に、軽イソフルラン麻酔の影響では顕著な違いが観察された。moving bar 刺激を用いて、個々の神経細胞の、方位選択性と、(運動)方向選択性を調べたところ、イソフルラン麻酔下では、近くにいる細胞同士にチューニング特性が類似しクラスター状の機能構造を示すことが確認された。反対に覚醒下の上丘では、個々の神経細胞の方位・方向選択性チューニング特性は、完全ランダムと比較すると弱いクラスターはあるものの乱雑であることが明らかになった。イソフルランは、GABAB 受容体を活性化させることで神経活動に対する抑制の効果を上昇させることで麻酔機能を引き起こすが、この変化が、上丘浅層内の興奮・抑制のバランスを乱し、その結果クラスター状の構造を作っている可能性が示唆された (Kasai & Isa, JNS, 2022)。

同様に、ケタミン・キシラジン (KX)、メドミジン・ミタゾラム・ブトルファノール (MMB)を用いた麻酔状態では、上記のようなクラスター状の空間的に同期したような活動は見られなかった。KX 麻酔では、作用時間が短いためイメージングでチューニング特性をしっかりとるための十分なデータを取得することは難しかったため解析を諦めたが、より持続時間の長い MMB 麻酔では安定に記録が可能なることから、MMB 麻酔についても今後解析を進めていく予定である。麻酔の作用機序の違いを元に、上丘の局所回路と、他領域と協調した上丘の視覚応答処理機構の解明に繋がる可能性が十分得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tokuoka Kota, Kasai Masatoshi, Kobayashi Kenta, Isa Tadashi	4. 巻 124
2. 論文標題 Anatomical and electrophysiological analysis of cholinergic inputs from the parabigeminal nucleus to the superficial superior colliculus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1968 ~ 1985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00148.2020	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 Kasai Masatoshi, Isa Tadashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of Light Isoflurane Anesthesia on Organization of Direction and Orientation Selectivity in the Superficial Layer of the Mouse Superior Colliculus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 619 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1196-21.2021	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠井昌俊, 伊佐正
2. 発表標題 上丘の方向, および方位選択的な視覚応答に対するイソフルラン麻酔の影響
3. 学会等名 第98回日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳岡広太, 笠井昌俊, 伊佐正
2. 発表標題 二丘傍核から上丘浅層へ向かうコリン作動性神経投射の解剖学および電気生理学的解析
3. 学会等名 第98回日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 KASAI Masatoshi, ISA Tadashi
2. 発表標題 Anesthesia alters orientation and direction selectivity properties in mouse superior colliculus
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KASAI Masatoshi, Isa Tadashi
2. 発表標題 Effect of light isoflurane anesthesia on orientation selectivity in mouse superior colliculus
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 KASAI Masatoshi
2. 発表標題 Population dynamics of visual responses in mouse superior colliculus
3. 学会等名 1st CU- KU Symposium and 4th CU-NIPS Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

視覚応答記録プログラム <a href="https://github.com/kassai/lattice628/Rec_Ver11">https://github.com/kassai/lattice628/Rec_Ver11</a>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------