

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20700347

研究課題名 (和文) 差分イメージングによるマウス高次視覚野の解析

研究課題名 (英文) Analysis of mouse higher-order visual cortex by differential imaging

研究代表者 任海 学 (TOHMI MANAVU)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：10401770

研究成果の概要 (和文)：フラビン蛍光イメージングと速度の異なるパターン刺激との組み合わせにより、マウスの高次視覚領域を分離・同定することが可能になった。そこでこれまででは困難であった高次視覚野の観察をおこなった。各領域の神経は速度に対する応答特性や方向選択性が異なり、その特性はフラッシュ下で飼育した動物において消失した。また各領域の解剖学的な結合を観察した。さらに図形の変化に対し応答する領域を発見した。また細胞接着因子 CNR 遺伝子を消失させることにより、高次視覚領域の反応特性に異常が生じることを発見した。

研究成果の概要 (英文)：It became possible to separate and to identify mouse's several higher-order visual areas by the combination with the pattern stimulus having different speed with flavin fluorescent imaging. Therefore the high order visual areas which were difficult to study until that time were observed. The properties of neurons in each area were different in the directional selectivity and the preferred stimulation speed. The property was disturbed in the animal that had bred under the flash light condition. Moreover, the anatomical combinations of each region were observed using with neural traser. Finally, abnormality was discovered in the property of the higher-order visual areas in the knockout mouse of cell-adhesion molecule CNR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：(1)高次視覚領域 (2)フラビン蛍光イメージング (3)差分イメージング (4) 経験依存的可塑性 (5) in vivo (6)プロトカドヘリン (7)ノックアウトマウス (8) スライス

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

それまでの高次視覚領域の研究は、サルやヒトを用いて進められてきた。しかし実験手技的な制約により、詳細な構造や分子メカニズムについての解明は困難であった。一方マウスは分子生物学的手法を用いて研究できるが、高次視覚領域の研究はほとんど行われてこなかった。我々が開発・発展させてきたフラビン蛍光イメージング法は、マウスの大脳皮質における神経活動を詳細に測定するのに非常に優れた手法である。このフラビン蛍光イメージングと速度の変化する格子状視覚刺激パターンを組み合わせることで、速度選択特性の異なるマウスの高次視覚領域を分離同定する手法を開発した。

突然現れる格子状パターン視覚刺激を麻醉下のマウス網膜に与えると、大脳皮質視覚野においてフラビン蛍光の上昇が観察されるが、格子状パターンの速度により蛍光変化の空間パターンが異なることが観察された。そこで格子状パターンを提示したまま刺激速度のみを突然変化させて引き起こされる傾向変化を観察したところ、速度の上昇・下降それぞれに対していくつかの領域において分離した反応領域が観察された。この研究において、これらの高次視覚領域について、特性・結合・可塑性・関連遺伝子および機能についての解明を試みた。

2. 研究の目的

- (1) 各視覚領野の活動特性を明らかにする。それにより、各領域の機能を解明する。
- (2) 各領野の経験・学習による可塑性や発達による活動変化の観察をする事により、高次機能獲得や応答特性の獲得する仕組みを解明する。
- (3) フラビン蛍光変化は局所における神経集団の活動の総量を反映していると考えられるため、同じ領域内の個々の神経活動の相違を観察することが出来ない。そのため各視覚領野内の個々の神経の活動特性をユニットレコーディングにより明らかにする。またフラビン蛍光イメージングで観察される反応特性が神経活動を反映したものであるかどうかを確認する。
- (4) 各視覚領野の機能・可塑性に影響を与える分子を探る。そのことにより高次機能と分子や微細な構造との関わりを解明する。
- (5) 各領域の解剖学的な構造を観察することにより、視覚情報処理過程における仕組みを解明する。

3. 研究の方法

- (1) 様々な刺激に対する応答をフラビン蛍

光イメージングにより観察する。特に高次視覚領域が処理していると考えられている要素を持つ刺激(動き・速さ・方向・大きさ・形・色・両眼視差・空間等)をマウスに与え、大脳皮質における各領域の応答を観察する。

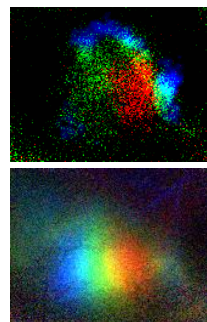
- (2) マウスの発達期の過程において様々な環境での飼育や視覚経験の操作により、神経活動の変化を観察する。Area RL等 は動きに関する視覚情報処理に関わっていることが示唆された。そのため動きを認知することが出来ないフラッシュ下の環境においてマウスを飼育し、神経活動の変化を観察する。また第一次視覚野で可塑性が誘導されることが知られている単眼遮蔽等の処理を行う。
- (3) 分離同定した各領域においてユニットレコーディングを行う。
- (4) 多くの遺伝子のノックアウトマウスが作成されているが、これらのマウスの高次視覚領域の反応特性の異常を探る。特に今まで大きな異常が報告されていない細胞接着因子 $CNR\alpha$ ノックアウトマウスの特性を調べる。
- (5) 同定した各領域に神経トレーサーである BDA を注入し、他の領域において染色された細胞を観察することにより、領域間の結合を観察する。

4. 研究成果

- (1) 様々な刺激に対する反応の観察

① Retinotopy Map の観察

速度の上昇(左 Figure; 上パネル)・下降(右)に反応する各領域が網膜の投射に対応する Retinotopy Map を持っているかどうかを確かめるため、動物の正面(赤)・側方 45 度(緑)・側方 90 度(青)に視覚刺激をおき

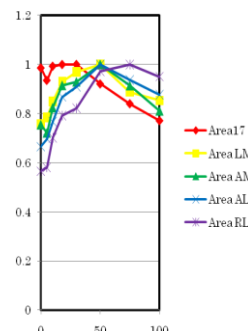


反応を観察した。反応領域は視覚刺激位置を変えるに伴い変化し、この構造とすでに知られている解剖学的構造を参照することにより各領域(第一次視覚

野 (V1), Area LM, Area AL, Area AM) を同定した。

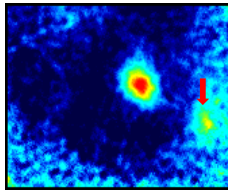
② 各領域の視覚刺激応答特性

速度の変化に対する反応の違いから、各視覚領域が異なる速度応答特性を持つのではないかと予想



された。そこで様々な速さの視覚刺激に対する各領域の反応を観察したところ、左 Figure にみられるような反応特性をしめした。

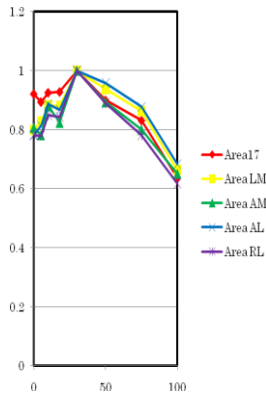
③変形する図形に対する反応領域の同定



図形の形態に対する反応領域を同定するため、円形の視覚刺激パターンを突然変形させそれに対する反応を観察したところ、Area LM の側方領域の Area LI において蛍光変化が観察された(左 Figure 矢印)。

(2)高次視覚領域における経験依存的可塑性

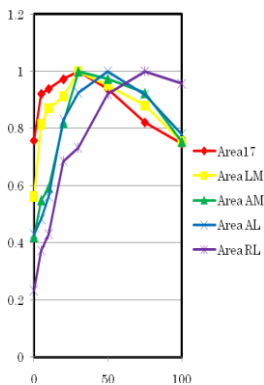
これらの高次視覚領域における経験依存的可塑性を観察するため、マウスが開眼してから成熟後まで動きに関する視覚情報を認知することができない 2Hz のフラッシュライト



の環境下で飼育を行い、速度応答特性を観察した。左 Figure に示した通り、高次視覚領域特有の速度応答特性は消失し、第一次視覚野の応答特性とほぼ同じになった。またそれらの領域の反応強度も低下した。

(3)各高次視覚領域の神経発火特性

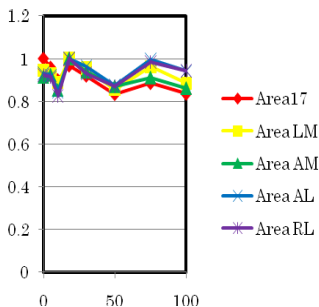
領域の同定後、電極を刺入しユニットレコーディングを行い、個々の神経の発火特性を観察した。



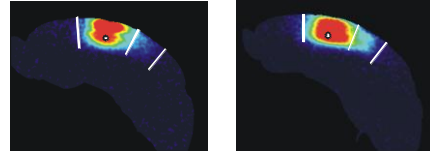
その結果、個々の神経の発火特性とフラビンイメージング法で観察された速度応答特性はほぼ一致することが確認された。またそれぞれの領域ごとに異なる特性の方向選択性を示した(not shown)。

(4)CNR α KO マウスの高次視覚領域特性

高次視覚領域の機能に関連する遺伝子を見つけるため、様々な遺伝子のノックアウトマウスの高次視覚領域の観察を行

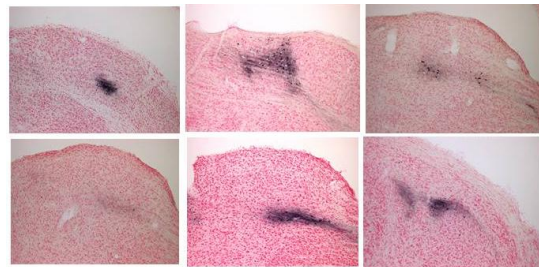


ったところ、CNR α ノックアウトマウスにおいて、各視覚領域の反応特性に異常がみられた(左 Figure)。この異常の原因ををさらに解明するためこのマウスから第一次視覚野と Area LM を含むスライスを作製し、各領域間の機能的結合をフラビンイメージングで観察した。第一次視覚野を電気刺激したところ、Area LM への神経活動の伝播が wild(下 Figure, 左パネル)と比較して CNR KO マウス(右パネル)で上昇していることが確認された。また Area LM から第一次視覚野への活動の伝播も KO マウスにおいて亢進が確認された(not shown)。



(5)高次視覚領域の解剖学的結合

各高次視覚領域の解剖学的結合をかんさつするため、神経トレーサーである BDA を各領域に注入し、脳内の各領域を観察した。その結果、第一次視覚野はよく知られているように外側膝状体(下 Figure, 左上)、Area LM は視床の Area LP の中層(上中)から Area AL は Area LP の深層(右上)、Area AM は LP の外側膝状体下部(左下)、Area RL は VP と外側膝状体の境界(下中)、Area LI は MG と外側膝状体の境界(右下)からそれぞれ異なる投射を受けていることが解明された。



・成果の位置づけとインパクト

外界を視覚情報に基づき認識する過程は、高次視覚領域の機能によるものと考えられている。その機能はこれらの領域の神経回路構造に依存しており、その形成は視覚経験だけでなく遺伝的プログラムによりもたらされることは疑いない。しかしこれまでもたらされた高次視覚領域の研究の大半はサルやヒトを用いて行われており、遺伝的研究や局所回路・微細構造の研究には大きな制約があった。一方マウスでの高次視覚領域の研究は、領域の同定の困難さにより、ほとんど解明されていなかった。しかし我々が開発・発展させてきたフラビン蛍光イメージング法は、視覚刺激の速度や形態を変化させることにより、in vivo での各視覚領域の同定を可能に

した。それにより初めてマウス高次視覚領域の特性を明らかにした。

各領域の視覚刺激速度にたいする応答は異なり、特に Area RL は非常に速い視覚刺激によく応答した。またこれらの特性は、フラッシュ下で飼育された動物において消失した。前から後ろに向かう刺激によく応答する神経の特性(not shown)とともに、Area RL は動きの視覚情報を処理していることを予想させる。また高次視覚領域回路の正常な形成には視覚刺激経験に依存することを示唆している。また形態の変化するパターン刺激に対し Area LI が反応を示すことは、この領域が形態視に関わっていることを示している。この結果は非常に大きな意味を持つ。サルや人において、形態視は腹側視覚経路において処理されていることがよく知られている。第一次視覚野から側方・腹側に位置する Area LI を含む経路が、腹側視覚経路と相同である可能性を強く示唆する。

CNR α KO マウスにおける高次視覚野の活動の異常も非常に重要である。特異的な遺伝子構造と発現パターンからその機能に大変興味を持たれているにも関わらず、これまで CNR α KO マウスにおける大きな大脳皮質回路の異常は報告されていない。今回ノックアウトマウスの速度選択特性の異常が観察されたが、高次視覚領域を観察できる測定法がなければ不可能なことであった。またマウスを用いることの利点としてスライス実験が可能になったことが挙げられる。結果として第一次視覚野と Area LM 間の神経興奮の伝播が亢進していることが確認された。これにより高次視覚領域の少なくとも一部は、各視覚領域間の結合の異常によるものであると結論することができた。この分子が視覚領域間の神経回路形成に関与していることが示唆される。またこの結果は、高次視覚野の活動に関わる遺伝子を初めて同定した事においても重要である。

・今後の展望

マウスの高次視覚野の研究は、この研究により始まったばかりである。そのためここで解明した知見以外にも、まだ解明しなくてはならない特性が多く残っている。空間周波数特性や受容野等の基本特性だけでなく、サル等の知見でよく知られている両眼視差・色・空間視のような高次視覚機能も探求する余地がある。また CNR α だけでなく高次視覚領域に関与するさらなる遺伝子・分子等を探ることになる。また機能・特性をになう局所回路を細胞・シナプス・分子レベルで研究していく。これまでマウスの視覚野の研究は第一次視覚野が中心だったが、今後間違いなく高次視覚野にその重心が移っていくことになるだろう。

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)

- ① 著者名 M.Tohmi, K.Takahashi, Y.Kubota, R.Hishida, K.Shibuki
発表表題 Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity and plasticity
雑誌名 Journal of Neurochemistry
査読 有
第 109 巻 2009 年 P3~9

[学会発表] (計 5 件)

- ① 発表者名 M.Tohmi
発表表題 Imaging of higher visual cortices based on differences in response properties between the primary and higher visual cortices in mice
学会名 38th annual meeting of the Society for Neuroscience
発表年月日 2009 年 10 月 19 日
発表場所 アメリカ合衆国シカゴ
- ② 発表者名 M.Tohmi
発表表題 Imaging of higher visual cortices based on differences in response properties between the primary and higher visual cortices in mice
学会名 第 32 回日本神経科学大会
発表年月日 2009 年 9 月 18 日
発表場所 名古屋国際会議場
- ③ 発表者名 M.Tohmi
発表表題 Imaging of higher visual cortices based on differences in response properties between the primary and higher visual cortices in mice
学会名 The 36th IUSP2009 Congress
発表年月日 2009 年 7 月 30 日
発表場所 国立京都国際会館
- ④ 発表者名 M.Tohmi
発表表題 The Autofluorescence imaging revealed the property and the plasticity of the mouse high order visual cortex.
学会名 38th annual meeting of the Society for Neuroscience
発表年月日 2008 年 11 月 16 日
発表場所 アメリカ合衆国ワシントン・D.C.
- ⑤ 発表者名 任海学
発表表題 The Autofluorescence imaging revealed the property and the plasticity

of the mouse high order visual cortex
学会名 第31回日本神経科学大会
発表年月日 2008年7月10日
発表場所東京国際フォーラム

[図書] (計 1 件)

- ① 著者名 K.Shibuki, R.Hishida, M.Tohmi,
K.Takahashi, H.Kitaura, Y.Kubota
出版社名 Frostig R ed
書名 In vivo optical imaging of brain
function 2nd Edition
発行年 2009年
P 28

6. 研究組織

(1) 研究代表者 任海 学
新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号 : 10401770