

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500371

研究課題名（和文） 光による霊長類側頭葉記憶ニューロンのリアルタイム操作

研究課題名（英文） Optogenetic control of macaque temporal neurons

研究代表者

中原 潔（NAKAHARA KIYOSHI）

新潟大学・研究推進機構・超域学術院

研究者番号：50372363

研究成果の概要（和文）：霊長類内側側頭葉記憶システムの時空間的な神経活動を光遺伝学手法と多チャンネル皮質脳波(EECoG)記録とを組み合わせ解析することを目指した。これに向けた下位課題として、ラット視覚野にウイルスベクターによってチャンネル・ロドプシンを発現させ、光刺激とEECoG電極による記録を同時に行うことに成功し、光遺伝学手法によって誘導された皮質脳波の時空間的なダイナミクスが明らかとなった。さらに、ニホンザルが記憶課題を行う間、内側側頭葉からの多チャンネルEECoG記録に成功し、内側側頭葉における神経オシレーションが記憶の想起において何らかの役割を果たすことを示す結果を得た。

研究成果の概要（英文）：To explore the spatio-temporal dynamics of cortical activities associated with long-term memory retrieval, we aimed to combine optogenetic methods and multi-channel electrocorticogram (EECoG) recordings from the inferior and medial temporal cortices in macaque monkeys. In the first part of the project, we optogenetically stimulated the rat V1 at various stimulus frequencies, and performed spatiotemporal analysis of evoked cortical activity using a micro-EECoG array. We revealed the spatio-temporal dynamics of EECoG responses induced by optogenetic methods. In the second part of the project, we conducted multi-channel EECoG recordings from the medial temporal cortices, in two macaque monkeys while they performed a visual pair-association task. Time-frequency analyses of the EECoG responses suggested that the neural oscillation in the medial temporal lobe are involved in mechanisms of memory retrieval.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：ウイルスベクター、光脳科学、皮質脳波、霊長類、長期記憶

## 科学研究費助成事業（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

霊長類内側側頭葉は長期記憶の記録、貯蔵、想起において本質的な役割を果たす。過去に我々の研究グループは、内側側頭葉に視覚性対連合記憶の長期貯蔵を担う神経細胞群を明らかにしてきた(Tomita *et al.* Nature 1999など)。これらの神経細胞は、対として記憶した視覚アイテムが提示されると、その双方に選択的な発火を示す。さらにこうした神経細胞群は、内側側頭葉連合野内に数箇所の皮質カラム様構造(直径1 mm程度)を形成して分布している。しかし、こうした神経細胞ネットワークと記憶の貯蔵・想起との因果関係を解析するには、記憶課題の試行中に内側側頭葉神経細胞活動を実験的に操作する手法、および皮質間神経ネットワークの神経活動を網羅的に記録する手法が必要である。そこで本研究課題では、こうした手法をサルの脳に対して確立し、内側側頭葉記憶システムのネットワーク活動を解析することを目指した。

### 2. 研究の目的

神経活動の実験操作手法として、チャンネルロドプシン(ChR2)などを用いた光遺伝学的手法が有望である。我々はアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた遺伝子導入によって、*in vivo*の霊長類において神経細胞活動や実際の行動を光で操作する実験系を実現することを目指した。

次に、皮質間神経ネットワークの神経活動を網羅的に記録する手法として、多点電極による皮質脳波(ECoG)記録が有望である。この手法は従来、脳外科の術前検査に用いられてきた手法であり、侵襲性が低く、長期の慢性記録が可能となる。我々はこの手法をサルの脳に適用するために、独自の多チャンネル高密度ECoG電極を開発し、これを用いて、記憶課題を遂行するサルの内側側頭葉からの高密度多点ECoG記録を行うことを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) ラット V1 野における光遺伝学手法の適用と ECoG 記録

CAG プロモーター下に hChR2(E123T/T159C)-Venus(スタンフォード大 Deisseroth 教授からの供与)を組み込んだ AAV を合成し、ラット V1 野に遺伝子導入した。発現部位を蛍光実体顕微鏡で確認し、微小電極と光ファイバーを組み合わせた optrode を刺入し、レーザー光源による光照射を行うとともに、惹起されたスパイク活動および局所電位(LFP)を記録した。また独自に開発した多点 ECoG 電極を設置し、光刺激で誘導された皮質脳波を時空間的に記録・解

析を行った。

(2) 記憶課題を遂行するサル内側側頭葉からの ECoG 記録

2頭のニホンザルに、5ペアの図形の対応関係を記憶させる性対連合記憶課題を学習させ、視覚性の長期記憶を成立させた。これらのサルに対して、独自に開発した 128 チャンネル皮質脳波(ECoG)電極を内側側頭葉に慢性留置した。サルが記憶課題を遂行する間、内側側頭葉の皮質脳波の多点記録を行った。得られた皮質脳波をウェーブレット解析等の手法を用いて周波数解析を行った。

### 4. 研究成果

ラット視覚野にウイルスベクターによってチャンネル・ロドプシンを発現させ、光刺激と ECoG 電極による記録を同時に行った。その結果、光刺激によって誘導される皮質脳波の時空間的な性質が明らかにされた。光刺激の刺激頻度の効果については、刺激頻度を上げることによって、最高 140Hz 程度までの皮質脳波を誘導できることが明らかとなった(図1)。また誘導される皮質脳波は刺激頻度に対応する周波数成分の他に、複数の高調波成分を含んでいた。また皮質上の一点を光刺激したとき、誘導される皮質脳波の空間的な伝播パターンを解析すると、皮質上を一様ではなく不均一に伝播することが観察された。

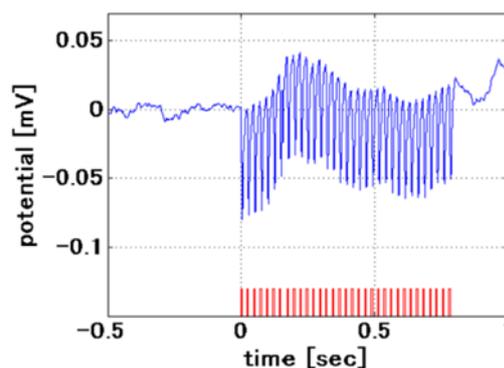


図1 光刺激によって誘導されたラット V1 野における皮質脳波。赤い縦線は光刺激のタイミングを示す。

さらに我々は、ニホンザルが対連合記憶課題を行う間、内側側頭葉からの ECoG 記録に成功した。手がかり刺激(cue)呈示期間に視覚性

の ECoG 応答が複数のチャンネルにおいて得られ、この cue-related 応答の中には、図形の対連合に有意な選択性を持つものが見られた。また遅延期間には限局したチャンネルにおいて特定帯域のパワーが漸増し、かつ局所のシータ波と位相周波数カップリングを示すことを見出した(図2)。皮質上の情報伝達を明らかにするために、試行の各期間においてチャンネル間の Granger causality 解析を行ったところ、試行の各期間において情報伝達の方向性が変化することが明らかとなった。これらの新しい知見は内側側頭葉における神経活動オシレーションが長期記憶想起において何らかの役割を果たすことを示唆する。

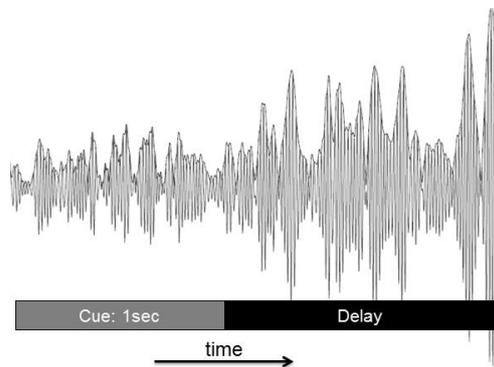


図2 記憶想起期間(Delay 期間)に増大するシータ波との cross-frequency coupling

以上の成果より、我々は霊長類脳に対して AAV を用いて光遺伝学手法の分子ツールを導入する手法の開発に先鞭をつけた。霊長類脳への光遺伝学手法の適用は世界的に見ても遅れているが、我々が用いる AAV ベクターは高い純度に精製され、霊長類脳においてニューロン選択的に高効率に感染することが確認されており、この現状を打開するものとして期待される。我々の手法によれば、光刺激によって 140Hz 以上の高い周波数成分を持つ皮質脳波を誘導できることが明らかとなった。この手法を用いて大脳皮質に任意の周波数成分を含む皮質脳波を誘導することによって、大脳皮質機能の向上する可能性を検討している。

さらに我々は霊長類内側側頭葉において神経オシレーションが長期記憶想起において何らかの役割を果たすことを示唆する新たな知見を得た。神経オシレーションと記憶との関係はげっ歯類で比較よく調べられているが、今回、我々が得た知見は霊長類における発見として知る限り世界で初めてである。現在論文を準備中であるため、本成果

報告には掲載を控えるその他の新規知見も得られている。これら新規知見を元に、さらに霊長類内側側頭葉記憶システムの解析を進めることによって、将来的にはアルツハイマー病などを含む記憶障害の病態生理の解明や、ニューロフィードバックによる記憶機能の向上支援法の開発など、神経科学の立場から基盤的な成果を提供することを我々は目指している。

#### 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 3 件)

1. Masamizu Y., Okada T., Kawasaki K., Ishibashi H., Yuasa S. Takeda S., Hasegawa I. & Nakahara K.\* (2011). Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. *Neuroscience* 193, 249-258. (査読有り)
2. Matsuo T., Kawasaki K., Osada T., Sawahata H., Suzuki T., Shibata M., Miyakawa N., Nakahara K., Iijima A., Sato N., Kawai K., Saito N. & Hasegawa I. (2011). Intraculcal electrocorticography in macaque monkeys with minimally invasive neurosurgical protocols. *Front. Syst. Neurosci.* 5:34. doi: 10.3389/fnsys.2011.00034. (査読有り)
3. Masamizu Y., Okada T., Ishibashi H., Takeda S., Yuasa S. & Nakahara K.\* (2010). Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuroreport* 21, 447-451. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

1. Adachi K., Kawasaki K., Sawahata H., Matsuo T., Suzuki T., Tanigawa H., Iijima A., Hasegawa I., Nakahara K. Cross-frequency coupling of cortical oscillations during long-term memory retrieval in the monkey medial temporal lobe. Neuro2013 (June 21, 2013, Kyoto).
2. Tanigawa H., Majima K., Sawahata H., Nakahara K., Suzuki T., Kamitani Y., Hasegawa I. Decoding recalled visual memory using electrocorticographic (ECoG) signals in macaque inferior temporal and prefrontal cortices. Neuro2013 (June 21, 2013, Kyoto).
3. Sato S., Nakahara K., Kawasaki K., Horie M.,

Sawahata H., Gougeon L., Toda H. and Hasegawa I. Spatiotemporal analysis of optogenetically evoked cortical activity using micro-ECOG array in the rat visual cortex. The 22nd Annual Conference of Japanese Neural Network Society (Sept. 12, 2012, Nagoya).

4. Kawasaki K., Matsuo T., Osada T., Sawahata H., Suzuki T., Shibata M., Miyakawa N. Nakahara K., Sato N., Kawai K., Sato N. and Hasegawa I. Intrasulcal electrocorticography in macaque monkeys. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Sept. 14-17, 2011, Yokohama).
5. Masamizu Y., Okada T., Kawasaki K., Ishibashi H., Takeda S., Yuasa S., Hasegawa I. & Nakahara K. Efficient gene transfer into neurons in the primate brain via antero- and retrograde infections by adeno-associated virus serotype 8 and 9. Neuroscience 2010 (Nov. 13-17, 2010, San Diego, USA).
6. Matsuo T., Kawasaki K., Sawahata H., Shibata M., Miyakawa N., Kawai N., Sato N., Saito N., Nakahara K., Suzuki T. & Hasegawa I. Minimally invasive surgical procedures for intrasulcal electrocorticography in macaques. Neuroscience 2010 (Nov. 13-17, 2010, San Diego, USA).
7. 松尾健、川崎圭祐、長田貴宏、澤畑博人、宮川尚久、柴田昌宏、佐藤昇、川合謙介、中原潔、鈴木隆文、齊藤延人、宮下保司、長谷川功：マカクザルにおける脳溝内皮質脳波のための低侵襲手術。社団法人日本脳神経外科学会第69回学術総会，2010.10.27，福岡。
8. Masamizu Y., Okada T., Kawasaki K., Ishibashi H., Takeda S., Yuasa S., Hasegawa I. and Nakahara K. Gene transfer into the primate central nervous system via antero- and retrograde infections by adeno-associated viruses. Neuro2010 (Sept. 2-4, 2010, Kobe).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中原 潔 (NAKAHARA KIYOSHI)  
新潟大学・研究推進機構・准教授  
研究者番号：50372363

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

岡田尚巳 (OKADA TAKASHI)  
国立精神・神経医療研究センター・神経研  
究所・室長  
研究者番号：00326828