

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30日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800017

研究課題名（和文） 霊長類連合記憶を司る層構造ユニット：MRI、電気生理、組織学の複合手法による検証

研究課題名（英文） Cortical laminar units for associative memory in primates: a combinational approach with MRI, electrophysiology and histology.

研究代表者

小谷野 賢治 (KOYANO KENJI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：90613315

研究成果の概要（和文）：

霊長類の大脳皮質は高度に発達し、連合記憶をはじめとした高次認知機能を司っている。大脳皮質は6層からなる特徴的な層構造を持つことが解剖学的知見より知られているが、その高次認知機能へ果たす機能的役割はほとんど解明されていない。本研究では、磁気共鳴画像法(MRI)・電気生理学的記録法・組織学的解析を組み合わせた新しいアプローチを採用することで、連合記憶に関わる機能的活動が大脳皮質の層ごとに異なることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

The cerebral cortices were highly developed tissue in primates and important for higher cognitive functions such as associative memory. Although characteristic six-layered structures of the cortices were well known by classical anatomical studies, functional significance of the laminar structure, especially in the processing of higher cognitive functions, remains to be elucidated. In this study, I took a new combinational approach with MRI, electrophysiology and histology, and found functional laminar differences of the primate cerebral cortices in the associative memory processing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：

総合領域

科研費の分科・細目：

脳神経科学・神経科学一般

キーワード：

MRI、皮質層構造、電気生理、連合記憶、高次認知機能、霊長類、エルジロイ、微小電極

1. 研究開始当初の背景

霊長類の下部側頭葉は、視覚図形の認識や記憶に重要な役割を果たしていると考えられている。過去、対連合記憶課題を用いたサル

の電気生理学的研究により、下部側頭葉から記憶の符号化をするもの、想起に関わるもの、手がかり刺激情報を保持するものなど様々なタイプの記憶に関わる神経細胞が発見されてきた(Sakai & Miyashita, Nature, 1991; Naya et al., Science, 2001; Fujimichi et

al., Eur. J. Neurosci, 2010)。これらの神経細胞は、主に下部側頭葉の嗅周皮質と TE 野に存在し、相互に連絡を持つクラスターを形成していることが分かっている (Naya et al., J. Neurosci. 2003; Yoshida et al., PNAS, 2003)。解剖学的見地からは、これらの下部側頭葉の領野には 6 層からなる大脳皮質の各層ごとに特徴的な入出力があることが示されており (Suzuki & Amaral, J. Comp. Neurol. 1994; Saleem & Tanaka, J. Neurosci. 1996; Fujita & Fujita, J. Comp. Neurol. 1996)、大脳皮質層構造をユニットとした情報処理過程の存在が示唆されてきた。研究開始時点の直前においては、多点電極を用いた同時記録法により、対連合記憶課題遂行中の層間神経結合の可逆的ダイナミクスが嗅周皮質のクラスターにおいて示された (Takeuchi et al., Science, 2011)。連合記憶の情報処理過程において大脳皮質層構造が果たす役割の解明はますますその重要性を増していたが、6 層から成る皮質層構造の各層がそれぞれどのような機能分化を持ち、連合記憶に関わる様々なタイプの神経細胞がどのような神経回路網により記憶システム全体を構成しているのかについては、研究開始時点においても、本報告書執筆時点においても未だ十分に分かっていない。

低次の感覚野においては、急性実験による電気生理学的記録とその直後の組織学的解析を組み合わせた手法により、霊長類の皮質層構造の機能分化と各層をユニットとする情報処理過程についての研究が行われてきた (Hubel & Wiesel, J. Physiol. 1968)。このような手法は急性実験には有効であるが、高次認知機能の研究では、課題遂行中のサルから多数の神経細胞活動を記録するために慢性実験を行う必要があり、動物の死後に行うことが前提の組織学的解析は毎回の記録後に行うことができない。その結果、高次認知機能の研究においては多数の活動記録部位を全て同定することができなかつた。この方法論的限界を克服するため、本研究代表者は現在までに電気生理学的手法に構造 MRI を併用することで、生きた動物から毎実験ごとに記録部位を 150 μm という高精度で同定する手法を開発してきた (Matsui, Koyano et al., Nature Methods, 2007; Koyano et al., J. Neurophysiol., 2011)。本研究では、この新しい手法を適用することにより、今まで調べることの出来なかつた高次認知機能に関連する神経活動と層構造の関連、ひいては大脳皮質における情報処理過程を解明することを目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、視覚性連合記憶に関する大脳皮質層構造の機能分化を調べることで、その情報処理過程を解明することを目的とした。記憶の符号・想起に関わる個々の神経細胞の活動は、過去の研究において微小電極記録法により調べられてきたが、行動下の霊長類からの記録には慢性実験が必要となり、大脳皮質層構造の中における記録位置を詳細に同定するには方法論的限界があつた。本研究では、本研究代表者自身において開発してきた、微小電極記録法に構造 MRI を併用した新しい手法により、連合記憶に関わる神経細胞の位置を詳細に同定し、大脳皮質層構造における機能分化を調べその局所神経回路を明らかにしようとした。さらに、複数の領野間において、連合記憶に関わる情報がどのように伝達・処理されているかを、細胞の反応性および特定の層間の機能的結合を調べることで明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) 頭部固定下での対連合記憶課題訓練および課題関連神経細胞の領野内分布マッピング

研究開始時点で 2 頭双方のサルに対し、12 ペア 24 種類の図形による視覚性対連合記憶課題 (Sakai & Miyashita, Nature, 1991) の訓練を既に終了していた。この課題は異なる 2 つの図形の対を記憶・想起するもので、各試行において被験体は手がかり刺激と対をなす図形を選択することを要求される。2 頭中 1 頭は頭部固定訓練を終了していなかつたため、この動物に対し MRI 対応の頭部固定具を外科的に設置し、頭部を固定した姿勢で課題を遂行させる訓練を行った。頭部固定に慣れた後、MRI 対応電気生理記録用チェンバを外科的に設置した。続いて、課題遂行中のサル下部側頭葉から、微小電極を用いて単一ユニット電位を記録し、課題に関連した活動を示す神経細胞の分布を調べた。毎回の電極刺入位置の同定には簡便な X 線撮影を用いた。課題関連活動を示す神経細胞のクラスター (Naya et al., J. Neurosci., 2003) の位置を同定し、次段階の MRI を使用した実験において精査する対象とした。

(2) 構造 MRI と微小電極記録法の併用による神経活動の層分布マッピング

研究開始時点で 2 頭中 1 頭のサルにおいては、課題訓練を終え既にこの段階の神経記録を開始しており、他の 1 頭に関しては、記憶に関連する活動を示す神経細胞のクラスター位置を同定後、この段階での記録を開始した。

まず、異なる撮像日における構造 MRI どうしの位置を詳細に合わせるため、MRI で検出

可能な位置基準点を、記録標的部位となるクラスター周辺部に標識した。標識の生成にはエルジロイ記録電極を電気分解し鉄成分を脳組織へ沈着する手法を用いた(Koyano et al., J. Neurophysiol., 2011)。

その後、直径 125 μm のタングステン留置電極を用い、1回の電極刺入につき3~5日程度をかけて、MRIにより電極先端を定位しながら神経細胞活動を記録した(図1、上)。その際、課題遂行下の神経細胞活動記録と麻酔下のMRI撮像による電極先端の定位を1日ごとに交互に行った。電極の留置には複数日にわたり電極位置を保定できるMRI対応超小型マニピュレータを用いた(Matsui, Koyano et al., Nature Methods, 2007)。撮像のための麻酔には半減期が15分と短いプロポフォルを用い、その負担を解消した。MRIで電極先端を150 μm の高精度で正確に定位するため、静磁場と電極の角度を60度以上とし、周波数エンコーディング方向を電極に対し垂直に設定することで電極を強調し、4.7 T高磁場MRIで150 μm の超高解像度画像を取得した(Matsui, Koyano et al., Nature Methods, 2007)。神経活動記録時のマニピュレータの目盛りとMRI構造画像から、活動を記録した全ての神経細胞の位置を再構成した(図1、下)。

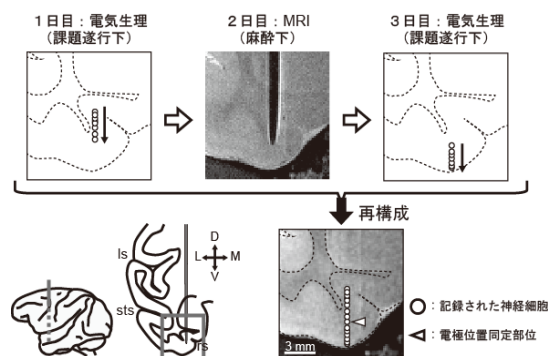


図1 MRIと微小電極記録による層分布マッピング

(3) 領野間の同時記録

大脳皮質内の分布に関し十分な数のサンプルを得た後、対連合記憶に関する層構造の機能分化が見られた箇所を対象に、MRIを用いて層内における活動記録部位を確認しながら異なる領野間での2電極同時記録を行った。

(4) 領野間神経結合評価の手法検討

異なる大脳皮質領野間における神経結合は層構造と密接な関係にあることが知られている。この結合様式を調べるため、in vivoにおける手法としてfMRIによる計測を、postmortemにおける評価を含んだ手法としてウイルスベクターによる多シナプス標識法をそれぞれ検討した。

(5) 層構造ユニットに関連付けた電気生理学的データの解析

単一神経細胞活動に関し、連合記憶に関する皮質層構造の機能分化を調べた。特に、課題で提示された視覚刺激に対する反応性、記憶に関連する活動、反応潜時、細胞発火波形について注目し、層構造との関連について解析した。

4. 研究成果

微小電極による視覚性連合記憶課題遂行中の単一細胞活動記録を行い、本研究の終了までに、計2頭の動物の下部側頭葉の嗅周皮質全域から2800以上の神経細胞活動をX線計測によりマッピングした。これらの神経細胞のうち視覚性連合記憶課題に関連した活動を示すものを選択するため、手がかり図形提示期間における刺激選択性を一元配置分散分析($p < 0.01$)によって調べたところ、刺激選択性を持つ神経細胞が嗅周皮質においてクラスターを形成していることが分かった。

各動物個体ごとにおける神経細胞クラスターの位置を同定したのち、高磁場MRIを組み合わせた手法により、当該クラスター周辺における単一神経細胞活動の詳細なマッピングを150 μm の解像度で行った。2個体より総計千個以上の単一神経細胞活動を詳細にマッピングし、その分布パターンを調べた。図形提示に対する反応に着目し、刺激選択性を持つ神経細胞のクラスターが嗅周皮質の36野に存在すること、およびクラスターは皮質に垂直な円筒状のカラム様構造を持っていることが明らかになった。

層構造と機能との関連を調べるため、このクラスター内における神経細胞の性質を皮質内の分布と関連付けて調べたところ、図形提示期間に続く遅延期間中の刺激選択性に、皮質内の分布と関連があることが分かった。遅延期間中にも刺激選択性を持つ神経細胞は、皮質内においてより深層に多く分布する傾向があり、浅層に分布する神経細胞は遅延期間中における選択性を持つ割合が少なかった。

さらに、連合記憶に関する活動において皮質層構造と関わりを調べた。視覚性対連合記憶課題において、図形提示期間と遅延期間の神経活動の相関、図形提示期間の対刺激どうしに対する活動の相関、および図形提示期間とその対刺激の遅延期間での活動の相関を計算し、それぞれ記憶手がかりの保持、記憶の符号化、記憶の想起に関わる活動の指標とした。相関係数が有意($p < 0.05$)な細胞の分布を調べたところ、記憶手がかりの保持、記憶の符号化、記憶の想起に関わる神経細胞

が、それぞれ大脳皮質において異なる深度に局在することが新たに分かった。このことは、下部側頭葉嗅周皮質の大脳皮質層構造が連合記憶に関わる機能分化を持ち、これに基づいた情報処理を行っていることを示している。今後、これらの成果を学会や論文での発表により広く報告する予定である。

上記の実験と並行して、層構造特異的な領野間結合の評価法として fMRI とウイルスベクターを用いた手法をそれぞれ検討した。fMRI による自発活動の相関および微小電気刺激法に基づく機能的結合検出手法を検討したところ、この2つはそれぞれ異なる解剖学的結合に影響を強く受けることが分かった。また、ウイルスベクターを用いた手法では、多シナプスを標識することができ、さらにサルにおいても適用可能であることが示された。これら手法開発に関しては、共著者と共に学会および論文にてその成果を発表した。今後、これらの手法を用いることで、領野間における層間神経結合パターンを明らかにし、連合記憶に関わる神経細胞の層分布との関連性を検討していく予定である。

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4件)

- ①Matsui T, Koyano KW, Tamura K, Osada T, Adachi Y, Miyamoto K, Chikazoe J, Kamigaki T, Miyashita Y. (2012) fMRI activity in the macaque cerebellum evoked by intracortical microstimulation of the primary somatosensory cortex: evidence for polysynaptic propagation. PLoS One 7(10). pp. e47515-47515. 査読有。DOI: 10.1371/journal.pone.0047515.
- ②Matsui T, Tamura K, Koyano KW, Takeuchi D, Adachi Y, Osada T, Miyashita Y. (2011) Direct Comparison of Spontaneous Functional Connectivity and Effective Connectivity Measured by Intracortical Microstimulation: An fMRI Study in Macaque Monkeys. Cerebral Cortex 21(10) pp. 2348-2356. 査読有。DOI: 10.1093/cercor/bhr019.
- ③Matsui T, Koyano KW, Tamura K, Watanabe T, Takeuchi D, Adachi Y, Osada T, Miyashita Y. (2011) Similarities and differences of functional connectivity as measured by spontaneous correlation of fMRI signals and effective

connectivity as measured by simultaneous intracortical microstimulation and fMRI. Neuroscience Research, 71 Suppl. 1, p. e88. 査読無。

URL:<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01680102/71/supp/S>

- ④Ohashi Y, Tsubota T, Sato A, Koyano KW, Tamura K, Matsuyama M, Yaguchi M, Wang N, Miyashita Y. (2011) Selective visualization of rodent and macaque neural circuits using transsynaptic and stationary markers driven by a 2A-based bicistronic lentiviral vector. Neuroscience Research, 761 Suppl. 1, p. e411. 査読無。
URL:<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01680102/71/supp/S>

[学会発表] (計2件)

- ①松井 鉄平、小谷野 賢治、田村 啓太、渡辺 朋美、竹内 大吾、足立 雄哉、長田 貴宏、宮下 保司。自発活動の相関に基づく機能的結合と微小電気刺激法に基づく機能的結合の相違に関する fMRI 研究。第34回日本神経科学大会。2011年9月17日。パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)。
- ②大橋 陽平、坪田 匡史、佐藤 礼奈、小谷野 賢治、田村 啓太、松山 真、矢口 雅江、王 寧群、宮下 保司。2 シストロン性レンチウイルスベクターを用いたラット及びサルの神経回路の選択的可視化法。第34回日本神経科学大会。2011年9月17日。パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷野 賢治 (KOYANO KENJI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：90613315

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし