

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24223004

研究課題名(和文) 実行系機能の脳内メカニズム - 最新技術で神経回路の構成と働きに心の動作原理を探る

研究課題名(英文) Brain mechanisms behind executive function: Uncovering operating principles of the mind by applying innovative techniques to the structural and functional organizations of neural circuits

研究代表者

筒井 健一郎 (Tsutsui, Ken-Ichiro)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90396466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 144,700,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した単一ニューロン電気穿孔法を用いて、作業記憶関連ニューロンを組織学的に同定することに成功した。それらが主に線条体に投射していることから、作業記憶の保持には皮質-基底核回路が主要な役割を果たしていることが示唆された。そして、世界に先駆けて行動中のサルに導入した経頭蓋磁気刺激を用いた実験では、前頭連合野、頭頂連合野、運動前野などが、それぞれ作業記憶の異なるコンポーネントを構成していることが示唆された。さらに、最新の手法を用いたニューロン活動の解析により、前頭連合野内に、積分やXOR論理計算などを行うための回路があり、それらが意思決定や論理的思考の神経基盤となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using in-vivo single neuron electroporation technique that has been developed in our lab, we for the first time identified working-memory neurons histologically. As many of them project to striatum, it was suggested that the cortico-basal ganglia circuit may be playing an important role in the maintenance of working memory. By the world's first transcranial magnetic stimulation (TMS) experiment using behaving monkeys, it was suggested that the prefrontal, parietal, and premotor cortices are forming different components of the working memory function, i. e., sensory, motor, and sensorimotor. Furthermore, by the detailed analysis of neural activity driven by computational models, it was suggested that there may be some specific circuits, such as integral and XOR logic, within the prefrontal cortex, which are dedicated for neural computations for decision making and logical thinking.

研究分野：生理心理学、システム神経科学

キーワード：高次脳機能 単一ニューロン電気穿孔法 経頭蓋磁気刺激

1. 研究開始当初の背景

D. O. Hebb (The organization of behavior: A neuropsychological theory, Wiley, 1949; 「行動の機構 - 脳メカニズムから心理学へ」, 鹿取ら訳, 2011) は、心の働きが脳内の神経回路の構成と動作に基づいていることをはじめて体系的に論じ、その後の心理学、さらにそれ以上に、脳神経科学の枠組みに多大な影響を与えた。それにより、今日の生理心理学や神経科学に携わる多くの研究者が、それらの学問領域の最終的な目的は、神経回路の構成と働きによって心を理解することだと考えている。一方で、従来の脳神経系の計測・実験技術は、その目的を達成するためには十分なものではなく、現在のところ、神経回路の構成と働きによって明確に説明できるのは、脊髄や脳幹レベルの反射機能にとどまっている。脳幹より上位の脳によって実現される高度な心理・精神機能に関しては、主に、脳損傷の臨床研究や脳の破壊実験、および脳機能イメージング法による局在論的知見(特定の心理機能が脳のどこで担われているか)、単一ニューロン (= 神経細胞) の活動記録による情報論的知見(脳のどの部分のニューロンがどのような情報を表現しているか)、および、神経投射に関する解剖学的知見が、それぞれ別々に蓄積されているにとどまっております。それらの断片的な知識をつなぎ合わせてシステム論を構成しているに過ぎない。そのような背景のもとで、最近、分子生物学的技術をはじめとする様々な新技術の導入によって、脳研究に方法論的ブレークスルーをもたらそうという機運が高まってきた。

2. 研究の目的

本研究は、実行系機能 (= 自分が取りうる行動の結果を予測しながら行動の計画をたて、衝動的な欲求を抑制しながら、その計画を実行していく能力) の背景にある脳内メカニズムを、神経回路の構成と働きによって理解することを目的とした。そのために、独自開発の < 動物の行動中に活動を記録した単一ニューロンやそれとシナプスを形成するニューロンに、遺伝子導入によって蛍光タンパク質を発現させ、標識する技術 > や、世界に先駆けて行動中のサルに導入した < 経頭蓋磁気刺激 (TMS) >、さらには、計算論や大規模データ解析などの新たな神経活動解析手法など、最新の実験技術を駆使して、実行系機能に関係した脳内現象を、多角的・包括的に調べるための実験を行った。

3. 研究の方法

実行系機能と神経回路動態との関係を調べるために、遅延反応課題などの行動課題を動物に行わせながら、脳活動の計測を行った。局所神経回路レベルの研究では、活動を記録した単一ニューロンに蛍光タンパク質をコードしたプラスミドを注入して標識する手法を用いて、発火活動を記録したニューロン

について、単一ニューロントレーシングを行った。領域間神経回路レベルの研究は、薬物の脳内微小注入、経頭蓋磁気刺激 (TMS) による脳活動の操作、複数脳領域における単一ニューロン活動の記録、局所電場電位 (local field potential: LFP) の同時多点計測などを行い、最新の手法を用いて分析した。

4. 研究成果

(1) 作業記憶に関わる前頭連合野ニューロンの同定 前頭連合野には、実行系機能の機能要素のなかでも最も重要な作業記憶に関連して、持続的な発火を示す「遅延ニューロン」が存在することが従来から知られていた。しかし、そのニューロンがどのような種類のニューロンで、どのような神経回路に組み込まれているかについては、諸説あるものの、それを実証する研究は行われてこなかった。そこで、遅延ニューロンを組織学的に同定するため、遅延反応課題を遂行中のラットにおいて、遅延ニューロンを電気生理学的に(発火パターンに基づいて)同定した上で、独自に開発した「単一ニューロン電気穿孔法」(Oyama et al., 2013) によって蛍光タンパク質をコードしたプラスミドを注入し、標識する実験を行った(図1)。組織学的な解析によって、標識されたニューロンの大部分が、層の錐体細胞であり、その大部分が、反対側の線条体に投射していた。これにより、実行系機能の重要な機能要素である作業記憶の神経基盤と考えられている持続的発火活動は、皮質 - 基底核ループ回路において形成されている可能性が示唆された(Oyama et al., in preparation)。

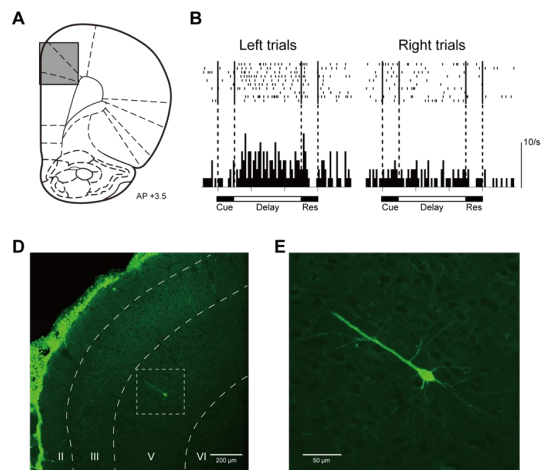


図1 記録・標識された「遅延ニューロン」 A: ラット脳前額面 (AP +3.5) における記録・標識の対象領域 (内側前頭皮質 (霊長類の前頭前野背外側部に相当する領域)) B: 記録された「遅延ニューロン」の活動。このニューロンは、「左」試行の遅延期間に持続的発火を示した。D、E: 作成された組織切片において、GFP発現によって標識された記録細胞。層にあり、線条体に投射することが確認された。(Oyama et al., in preparation)

(2) 作業記憶にかかわる大規模神経回路動態の解明 実行機能を発揮するにあたって、前頭連合野は単独で機能しているのではなく、感覚系・運動系のさまざまな脳領域と通信しながら行動を制御していると考えられる。作業記憶にかかわる大規模神経回路動態を明らかにするため、本研究ではまず、遅延反応課題を遂行中のラットにおいて、単一ニューロン活動の記録を前頭連合野外でも広く行い、活動の特徴を分析した。その結果、前頭連合野以外でも、頭頂連合野にて、持続的発火活動が認められた (Oyama et al., in preparation)。次に、多数の皮質領域に留置電極をインプラントし、遅延反応課題を遂行中に、LFP の同時多点記録を行った。グレンジャー因果 (Granger causality) 解析によって、情報の流れを推定したところ、手がかり刺激呈示期間には、視覚皮質から頭頂連合野へ、遅延期間の前半には、頭頂連合野から前頭連合野へという情報の流れが認められ、遅延期間の後半には、前頭連合野と運動関連領域間の相互的な情報の流れが見出された。

(3) 作業記憶にかかわる脳領域の役割の因果論的な検証 単一ニューロン活動や LFP の記録によって、作業記憶への関与が示唆された脳領域について、その役割を因果論的に調べるため、機能阻害の実験を行った。ラットを用いた実験では、ムシモール (GABA_A 受容体の作動薬) の局所注入を行った。前頭連合野、頭頂連合野への注入によって遅延期間の長さ依存的な成績の低下 (短い遅延期間では成績の低下なし) が、頭頂連合野への注入では、遅延期間の長さに依存しない成績の低下が認められ、前者は作業記憶に、後者は視空間認知に重要な役割を果たしていることが示唆された (Oyama et al., in preparation)。サルを用いた実験では、オンライン TMS による機能阻害を行った (図 2)。前頭連合野背外側部 (DLPFC) の刺激により、反対側の視野に視空間ワーキングメモリの障害が、運動前野 (PMC) の刺激により、反対側の手に運動性ワーキングメモリの障害が、頭頂連合野 (PPC) の刺激により、視空間と手運動のマッチングに関する障害が生じることが明らかになった (Nakamura et al., in preparation)。さらに、課題遂行中の異なるタイミングで TMS を与えることにより、視空間認識は、後頭葉 - 頭頂葉 - 前頭連合野という順に情報処理が進んでいくのに対して、視覚・運動の情報変換は前頭連合野で、運動性のワーキングメモリは運動前野で、また、視空間的な運動の実行には、運動前野と頭頂葉との連関によって行われていることが示唆された。これは、認知課題を遂行中のサルに TMS 実験を行った最初の例であるが、TMS が新たな非侵襲的な機能阻害法として非常に有用であることを示しており、脳研究一般に大きな波及効果があると考えられる。

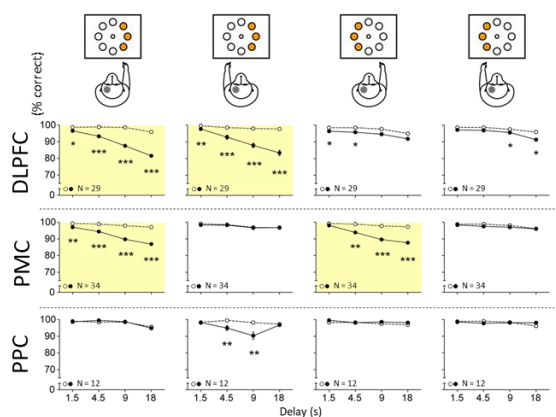


図 2 オンライン TMS 機能阻害による遅延反応課題への影響。 刺激部位によって、異なる症状が認められた。黒丸のプロットは TMS 条件、白丸のプロットは統制条件における成績を示している。黄色でハイライトされた条件では、いずれも、遅延期間依存的な成績低下が見られており、作業記憶が障害されていることがわかる。

(4) 前頭連合野による意欲の制御に関する因果論的な検証 実行系機能には、自己の欲求や感情を制御するという、情動制御の側面がある。前頭連合野の諸領域が意欲の制御にどのような関わりを持っているのかを因果論的に検証するため、サルを用いて反復 TMS (rTMS) による脳活動操作の実験を行った。(rTMS においては、高頻度刺激で局所脳活動の促進、低頻度刺激で抑制をすることができる。) 内側前頭皮質の腹側部の抑制によって、著しい課題遂行意欲の低下が認められ、特に難易度の高い課題においてそれが顕著であった (図 3)。また、背外側前頭前野の促進によって、課題遂行意欲が上昇する傾向が認められた。今後は、前頭連合野の内側部および外側部の機能的連関を LFP の同時多点記録などで調べていく必要があることが明らかになった。

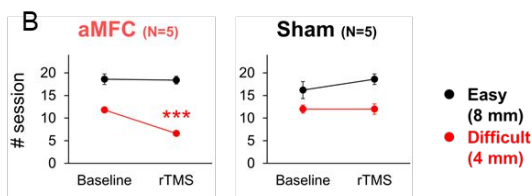


図 3 改変プリンクマンテストと課題成績 A : 課題遂行意欲の評価に用いた改変プリンクマンテスト。プリンクマンテストは本来、手運動の巧緻性の評価に用いられる。B : 内側前頭皮質への抑制刺激によって、難易度の高い課題に特異的に意欲の低下が認められた。

(5) 前頭連合野の推論機能に関わる情報論的検証 文脈依存的行動選択を含む、高度な実行機能を要求する課題 (図 4) をサルに行

わせながら記録したニューロン活動データの分析により、文脈情報の保持には背外側部が、知識（一般化されてコードされた過去の経験）情報の読み出しには、腹外側部が関わっていることが、また、推論結果の情報の保持には双方の領域のニューロンが関わっていることが明らかになった（図5）。また、情報論的手法を用いてニューロン活動の経時的变化を分析したところ、知識と文脈の情報を統合して行動の選択を行うための排他的論理和（XOR）を計算するための論理回路が前頭連合野内にあることが示唆された（Hosokawa et al., 2016）。

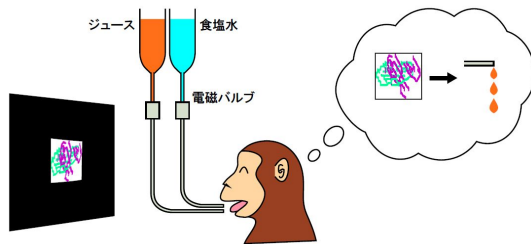


図4 実験装置とサルに行わせた課題の概要 サルは、数秒後に、口元のチューブから、ジュースがでてくるのか、食塩水がでてくるのかを、スクリーンに呈示された図形のカテゴリーを基に予測する。一定期間の訓練の後、サルは、ジュースを予測すると、それが口元のチューブから出てきたときに取りこぼしなく飲めるようにチューブを舐めながら待ち、食塩水を予測すると、それを飲まないで済むように口を閉じて待つようになった。

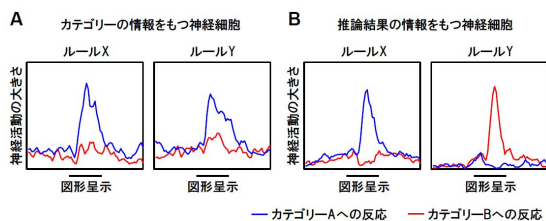


図5 記録された神経活動の代表例 A：いずれのルールのもとでも、カテゴリーAの図形が呈示されたときに活動が上昇する神経細胞の一例。このような活動を示す神経細胞は、カテゴリーの情報を保持しているといえる。B：ルールXのもとではカテゴリーAの図形、ルールYのもとではカテゴリーBの図形が呈示されたときに活動が上昇する神経細胞の一例。常に特定の結果（ジュース）が予想される条件で活動が上昇していることから、このような活動を示す神経細胞は、予測の結果の情報を保持しているといえる。

(6) 前頭連合野の意思決定機能に関わる情報論的検証 報酬情報に基づいた意思決定を要求する課題をサルに行わせながら記録したニューロン活動データの分析により、前頭連合野には、対象となっている物体の価値を表現するニューロンと、その差分を計算しているニューロンが存在することが明らかになった。これらデータの計算論的な解析により、前頭連合野内に、意思決定のための価値情報の積分回路があることが示唆された（Tsutsui et al., 2016）。

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 10 件)(すべて査読あり)

- 1) Fujiwara J, Usui N, Eifuku S, Iijima T, Taira M, Tsutsui KI, Tobler PI (2018) Ventrolateral prefrontal cortex updates chosen value according to choice set size. *Journal of Cognitive Neuroscience* 30 307-318.
- 2) Kodama T, Kojima T, Honda Y, Hosokawa T, Tsutsui KI, Watanae M (2017) Oral administration of Methylphenidate (Ritalin) affects dopamine release differentially between the prefrontal cortex and striatum: a microdialysis study in the monkey. *Journal of Neuroscience* 37: 2387-2394.
- 3) Tsutsui KI, Grabenhorst F, Kobayashi S, Schultz W (2016) A dynamic code for economic object valuation in prefrontal cortex neurons. *Nature Communications* 7: 12554.
- 4) Tsutsui KI, Hosokawa T, Yamada M, Iijima T (2016) Representation of functional category in the monkey prefrontal cortex and its rule-dependent use for behavioral selection. *Journal of Neuroscience* 36 3038-48
- 5) Tateyama Y, Oyama K, Lo CW, Iijima T, Tsutsui KI (2016) Neck collar for restraining head and body movements in rats for behavioral task performance and simultaneous neural activity recording. *Journal of Neuroscience Methods* 263, 68-74.
- 6) Tsutsui KI, Oyama K, Nakamura S, Iijima T (2016) Comparative overview of visuospatial working memory in monkeys and rats. *Frontiers in Systems Neuroscience* 10: 99.
- 7) Oyama K, Tateyama Y, Hernadi I, Tobler PN, Iijima T, Tsutsui KI (2015) Discrete coding of stimulus value, reward expectation, and reward prediction error in the dorsal striatum. *Journal of Neurophysiology*, 114, 2600-2615.
- 8) Oyama K, Ohara S, Sato S, Karube F, Fujiyama F, Isomura Y, Mushiake H, Iijima T, Tsutsui KI (2013) Long-lasting single-neuron labeling by in vivo electroporation without microscopic guidance. *Journal of Neuroscience Methods* 218 139-147.
- 9) Fujiwara J, Usui N, Park SQ, Williams T, Iijima T, Taira M, Tsutsui K, Tobler PN (2013) Value of freedom to choose encoded by the human brain. *Journal of Neurophysiology* 110 1915-29
- 10) Ishii H, Ohara S, Tobler PN, Tsutsui KI, Iijima T (2012) Inactivating anterior insular cortex reduces risk taking. *Journal of Neuroscience* 32 16031-39

〔学会発表〕(計 11 件)(すべて招待講演)

- 1) Tsutsui KI Do rodents have prefrontal cortex? 山梨大学脳科学国際シンポジウム

“ The first international symposium for frontend brain science: University of Yamanashi ” 2018/2/21, 東京

2) Tsutsui KI TMS approach to study cortical network 新学術領域「適応回路シフト」国際シンポジウム "Behavioral adaptation and functional recovery from pathological states". 2017/12/19, 東京

3) 筒井健一郎 内側前頭皮質腹側部の気分・情動調節機能 - 低頻度経頭蓋磁気刺激 (TMS) による機能阻害による検討 第39回生物学的精神医学会 2017/9/28, 札幌

4) Tsutsui KI Critical role of the monkey 2017dorsolateral and ventrolateral frontal cortex in the top-down control of behavior:inactivation study using low-frequency repetitive trans-cranial magnetic stimulation (lf-rTMS) 第40回 日本神経科学大会サテライトシンポジウム(東北大・生理研合同企画)「洞察・予測・意思決定:高次脳機能研究の最先端 (Insight, foresight, and decision making: Frontiers of higher brain function research)」2017/7/19, 幕張

5) Tsutsui KI Use of trans-cranial magnetic stimulation (TMS) as a tool for basic neuroscience research: The role of medial frontal cortex tested by inhibitory repetitive TMS. MyNeuro 2017 (Joint Meeting of 27th Malaysian Society of Neurosciences and 17th Neurosurgical Association of Malaysia) 2017/8/12 マレーシア・クアラルンプール

6) 筒井健一郎 rTMS の作用機序解明および臨床利用における刺激条件最適化に向けて脳科学研究戦略推進プログラム「BMI技術」報告会 2016/11/10, 東京

7) Tsutsui KI Using transcranial magnetic stimulation (TMS) as a tool for primate neuroscience research. 31st International Congress of Psychology (ICP2016) 2016/7/25, 横浜

8) 筒井健一郎 反復経頭蓋磁気刺激 (rTMS) によるサル内側前頭葉の気分・気分調節機能の検証 第57回日本心身医学会総会 2016/6/5, 仙台

9) 筒井健一郎 経頭蓋磁気刺激 (TMS) で拓く霊長類研究の新展開 ナショナルバイオリソース第12回公開シンポジウム 2015/12/11, 東京

10) Tsutsui KI Different contributions of monkey frontal, premotor, and parietal cortices in spatial working memory task revealed by on-line rTMS. International Symposium on Magnetic Stimulation: Past, Present and Future. 2015/6/6, 東京

11) Tsutsui KI Investigating the functional specialization within the monkey neocortex using TMS. Magstim Neuroscience Conference 2014/5/10 英国 オックスフォード

筒井健一郎 経頭蓋磁気刺激 (TMS) で拓く脳の研究と治療の最前線 第78回日本心身医学会東北地方会 2014/2/22, 仙台

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/fields/laboratory.html?id=2592>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井健一郎 (TSUTSUI, Ken-Ichiro)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号: 90396466

(2) 研究分担者

大原慎也 (OHARA, Shinya)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号: 10570038

櫻井芳雄 (SAKURAI, Yoshio)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号: 60153962

飯島敏夫 (TOSHIO, Iijima)

東北大学・生命科学研究科・名誉教授

研究者番号: 90333830

渡邊正孝 (WATANABE, Masataka)

公益財団法人東京医学総合研究所・認知症

・高次脳機能研究分野・特任研究員

研究者番号: 50092383

(3) 連携研究者

藤原寿里 (FUJIWARA, Juri)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30569322