

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871135

研究課題名(和文) マウス視覚野におけるトップダウン注意信号入力のイメージング

研究課題名(英文) Imaging of neural inputs to the mouse visual cortex under top-down attention

研究代表者

吉田 崇将 (Yoshida, Takamasa)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：50525904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視覚的注意が機能している時、高次皮質領域から出力されたトップダウン信号が視覚野に入力して、その活動を修飾すると考えられるが、その直接的な証拠は得られていなかった。本研究では、まず、視覚的注意を頭部固定状態のマウスにおいて惹起させるための課題システムの開発、次に、注意のトップダウン入力をシナプス終末におけるカルシウム信号として2光子イメージングで観察することを計画していた。しかし、研究開始後と同じコンセプトの研究が発表されたため、目的の達成レベルを上げるために後半部分を広域カルシウムイメージングの開発に方針転換した。それにより、注意にも関係する連合野における感覚統合メカニズムに迫ることができた。

研究成果の概要(英文)：Although it is thought that attentional top-down signal from higher-order cortices regulates neural activity in the visual cortex, there has been no direct evidence. In this study, I have planned, firstly, to develop a visual attention task system using head-restricted mice and, secondly, to capture top-down input signal as calcium signal at the axon terminals using two-photon microscopy. However, some studies that introduced the similar concept were published after starting this study. The latter part was changed into development of a wide-field calcium imaging system in order to improve the achievement level of the goal. As a result, the cortex-wide imaging suggested a mechanism of multisensory integration involving attention in the association cortices.

研究分野：神経科学

キーワード： トップダウン型注意 視覚的注意 頭部固定型課題 マウス視覚野 皮質ネットワーク カルシウムイメージング 全脳広域イメージング

1. 研究開始当初の背景

視覚的注意には、受動的に注意が向くボトムアップ型と、能動的に注意を向けるトップダウン型がある。高次皮質領野から出力されたトップダウン信号は第一次視覚野の皮質第1層に入力し、その活動を修飾すると考えられているが、その直接的な証拠は得られていなかった。本研究では、トップダウン型注意が惹起される視覚弁別課題を設計し、頭部固定状態にあるマウスに実行させるシステムの開発を目指した。さらに、カルシウム感受性蛍光タンパク質のトップダウン経路選択的な導入と2光子励起イメージングにより、課題遂行中の視覚野第1層におけるトップダウン信号の入力の証拠をシナプスレベルで捉え、注意関連行動ならびに視覚野における神経活動がトップダウン信号入力によってどのように修飾され変化するかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、まず、視覚的注意を頭部固定状態のマウスにおいて惹起させるための課題システムの開発、次に、注意のトップダウン入力をシナプス終末におけるカルシウム信号として2光子イメージングで観察することを計画していた。しかし、研究開始後に本研究のコンセプトに近い研究が発表されたため (Pinto et al., 2013; Zhang et al., 2014; Makino & Komiyama, 2015; Wimmer et al., 2015), 特に後半部分の方針転換を余儀なくされた。これらの研究では、共通して注意メカニズムにおける抑制性回路の重要性が示唆されており、細胞種特異的なアプローチが必須であることが分かった。さらに、注意機能を調べる際には2つの領域間における相互作用を調べることが殆どであるが、本質的には複数の領域間における相互作用が重要であり、これを広域的に同時記録する必要があると考えた。しかし既出の研究においてはこれをクリアしていなかったため、細胞種特異的な神経活動を脳皮質全体で記録する広域イメージングの手法を用いることで、本提案の当初の目的を維持しつつ、既出の研究を凌駕することができると見込んだ。しかし、適切な広域イメージングシステムが存在しなかったため、それを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 頭部固定状態のマウスに視覚的注意を惹起させるための課題システムの開発

新たに提案した視覚的注意課題パラダイムを実現するためのタスク装置と運用システムをデザインし実際に構築した。実験システムは、次に挙げる4つの機構を要する：覚醒マウスの脳を定位固定するための機構、マウスの判断を給水ポートの舐め分けとして検知するための機構、視覚、聴覚、触覚などの刺激を提示するための機構、および

それらを制御するためのシステム、である。実験システムにおける各ブロックの機械設計および回路設計を行い、装置及び回路基板を作製した(図1)。

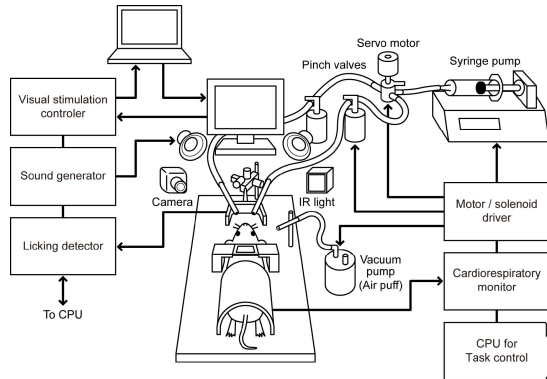


図1. 頭部固定型視覚的注意課題システム

(2) 細胞種特異的な広域カルシウムイメージングシステムの開発

独自に開発した興奮性神経細胞および抑制性神経細胞に特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いた。カルシウム感受性蛍光タンパク質には蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を応用した Yellow Cameleon2.60 (YC2.60) を採用した (Nagai et al., 2004). YC2.60 では供与体および受容体分子から2波長 (黄および青緑) の蛍光が放出されるため、分光機構を搭載したマクロ顕微鏡システムを設計し作製した (図2A)。注意課題遂行中の全脳にわたる広域イメージングが可能になるように、頭部固定型課題システムをマクロ顕微鏡の下に設置し、イメージングシステムと連動するようにした。

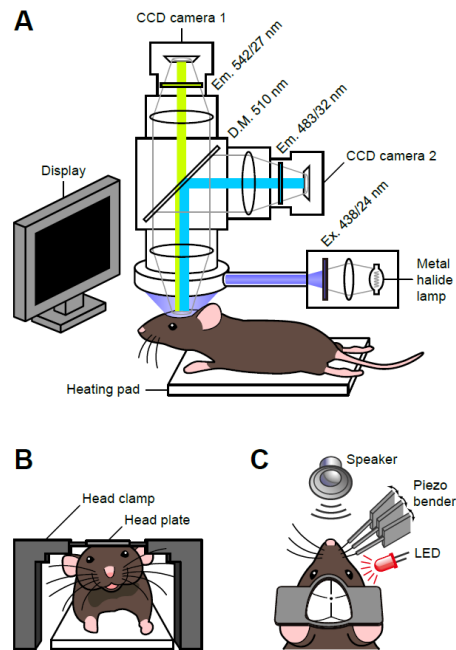


図2. 広域カルシウムイメージングシステム

(3) 細胞種特異的な広域カルシウムイメージングシステムの評価

麻酔下のマウスの頭皮を切除し、頭蓋骨を露出してステンレス製の頭部固定用プレートをデンタルセメントで固定した。プレートには中心部には観察窓が空いており、窓内の頭蓋骨が露出するようにした(図 2C)。その露出部分は透明色のデンタルセメントでコーティングして骨を透明化した。プレートを頭部固定装置に固定して(図 2B)、青色の励起光を照射し、マクロ顕微鏡で経頭蓋的に皮質表面を観察した。

マウスに視覚、聴覚およびヒゲの刺激を与えた際の大脳皮質半球におけるカルシウム応答を、CCD カメラを用いてビデオレートで記録した。また、無刺激状態の時の活動(自発活動)も記録した。さらに、多感覚刺激を組み合わせた際の応答も記録した。記録した信号を用いて、FRET 受容体および供与体信号の比を計算した。これにより、両信号に同様に含まれる生理学的ノイズ(心拍および呼吸成分)を除去した。

4. 研究成果

(1) 頭部固定型課題システムの評価

実験システムを構成する殆どの装置と制御プログラムを自前で設計・作製することにより、市販品を組み合わせた時に比べて約 20 分の 1 程度にコストを抑えられた。これにより、課題システムの大規模チャンネル化を安価に実現できるようになった。また、実際に覚醒マウスを固定しシステムが設計通りに機能するか評価したところ、概ね想定通りに機能することが確認された。

(2) 刺激誘発応答の評価

視覚、聴覚およびヒゲ刺激に対する誘発応答を評価したところ、大脳半球全体をカバーする画角でも網膜位置再現性、周波数局在性およびヒゲ位置再現性を精密に捉えることができた。さらに、興奮性細胞および抑制性細胞由来の信号の両方で、応答振幅の最大値は 1 ~ 5% 程度であることが分かった。

(3) 自発活動の評価

無刺激状態の自発活動において、1 Hz 前後の皮質徐波振動がみられることが分かった。また、特定のピクセルとその他全てのピクセル間の相関をマップ化したところ、皮質機能領野と一致する高相関領域パターンが出現した。興奮性細胞由来では領域パターンが広がり、抑制性細胞由来では狭くなった。これは、皮質間の長距離接続のパターンと一致しているようだった。これらの結果は、自発活動のみから皮質機能領野の分離と皮質間接続性の情報を抽出できる可能性を示唆している。

さらに、特定の機能領野間の相互相関解析により、カルシウム活動の湧き出しと吸い込みを定義したところ、吻側から尾側に向けて

流れる傾向があること、内側および頭頂連合野は流れのハブ(湧き出しと吸い込みがバランスする)になっていることが示唆された。これらの性質は、興奮性細胞および抑制性細胞由来の活動で違いがないことも示された。

(4) 多感覚刺激に対する応答の評価

視覚、聴覚およびヒゲ刺激を同時に入力した際の皮質全体の活動を観察したところ、z スコアに規格化された応答振幅では興奮性細胞および抑制性細胞由来の活動間で違いはなかった。その一方で、信号の瞬時位相の試行間同期度を調べたところ、興奮性細胞由来の信号では刺激後数秒にわたり位相同期が保持され、皮質全体に広がっており、さらにそれは連合野においてより強く現れる傾向があることが分かった。ところが、この位相同期の性質は、抑制性細胞由来の信号では極端に弱くなった。このことは、位相同期が皮質間接続に依存していることと、多感覚統合の機能的基盤である可能性を示唆している。

(5) 総括

本研究の前半で開発した頭部固定型課題システムと後半で確立した細胞種特異的な広域カルシウムイメージングを組み合わせたことにより、視覚的注意を惹起する課題中における広域神経活動を高い時間空間分解能で記録することができ、さらに、注意課題の中に感覚統合の条件を組み込むことで、より本質的なトップダウン型注意の神経メカニズムにアプローチできるようになると期待される。

< 引用文献 >

Pinto et al., "Fast modulation of visual perception by basal forebrain cholinergic neurons", *Nat. Neurosci.*, Vol.16, No.12, pp.1857-1863, 2013.

Zhang et al., "Long-range and local circuits for top-down modulation of visual cortex processing", *Science*, Vol.345, No.6197, pp.660-665, 2014.

Makino and Komiyama, "Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex", *Nat. Neurosci.*, Vol.18, No.8, pp.1116-1122, 2015.

Wimmer et al., "Thalamic control of sensory selection in divided attention", *Nature*, Vol.526, No.7575, pp.705-709, 2015.

Nagai et al., "Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol.101, No.29, 2004.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Takamasa Yoshida, Satoshi Kuroki, Hidekazu Tsutsui, Mizuho Iwama, Takayuki Michikawa, Atsushi Miyawaki, and Shigeyoshi Itoharu, "Phase-Locking of Cortical Slow Waves Induced by Multisensory Inputs at Hub Areas in Excitatory Networks", The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2016 年 11 月 13 日, San Diego, U.S.A.

黒木暁, 吉田崇将, 筒井秀和, 道川貴章, 岩間瑞穂, 宮脇敦史, 糸原重美, "多感覚刺激によって誘発される皮質徐波振動の細胞種選択的な位相同期現象 / Multisensory Inputs Induce Phase Locking of Cortical Slow Oscillation in a Cell-type Selective Manner", 第 39 回 日本神経科学大会, 2016 年 7 月 22 日, 神奈川県横浜市・パシフィコ横浜

Satoshi Kuroki, Takamasa Yoshida, Hidekazu Tsutsui, Takayuki Michikawa, Mizuho Iwama, Atsushi Miyawaki, and Shigeyoshi Itoharu, "Cell-Type-Specific Calcium Imaging of Cortical Slow Oscillation Reveals Phase-Locking Induced by Multisensory Inputs", The 10th FENS Forum of Neuroscience, 2016 年 7 月 3 日, Copenhagen, Denmark

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 崇将 (YOSHIDA, Takamasa)
国立研究開発法人理化学研究所・
脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号: 50525904