

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221003

研究課題名(和文) 霊長類の大規模神経回路活動記録・操作法による部分的意識の生成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the neural mechanism to generate the partial awareness by large-scaled neuron network analysis and circuit manipulation techniques in non-human primates

研究代表者

伊佐 正 (ISA, Tadashi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20212805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 153,000,000円

研究成果の概要(和文)：一次視覚野損傷後の「盲視」に関して、片側一次視覚野損傷サルを用いて、(1)視覚的意識が障害されているが一部残存していること、(2)網膜 上丘 視床枕及び外側膝状体 高次視覚野 頭頂連合野 前頭葉という経路が関わること、(3)盲視には高次な認知機能が維持されていること、(4)部分的意識に対応すると考えられる視覚応答から意思決定に至る過程を前頭連合野で観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「無意識の視覚 運動変換」として長年議論されてきた「盲視」の神経機構のほぼ全容を明らかにしたことは学術的意義が大きい。そこには損傷後の大規模な神経回路の可塑性が関わっていることも明らかになり、このことは今後「皮質盲」のメカニズムと対処を考える上での指針を与えるものとして社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the macaque monkeys with unilateral V1 lesion as an animal model of blindsight, and clarified (1) that visual awareness was actually impaired by showing the reduction in sensitivity of object detection, (2) that the “retina - superior colliculus - pulvinar and lateral geniculate nucleus - extrastriate visual cortices - parietal cortex” pathway underlies blindsight, and (3) that complex cognitive functions are maintained, and (4) neural correlates of the “partial awareness” could be detected in the frontal association cortex.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経回路 意識 盲視 霊長類 皮質脳波

1. 研究開始当初の背景

盲視という現象がヒトにもサルにも存在していることはほぼ確立していたが、言葉を使えないサルにおける意識の評価法については議論があり、さらに盲視の中枢神経機構についても議論が分かれていた。我々の研究グループは本基盤研究(S)に先立つて、ニホンザルにおいて片側一次視覚野を吸引除去する盲視モデルを確立し(Yoshida et al. J Neurosci, 2008)、その視覚行動(特に眼球サックード運動)の回復過程、さらに上丘の関与(Kato et al. Eur J Neurosci 2011)を明らかにした。さらにそれらのサルの視覚認知機能について、一部のボトムアップ的注意の障害と残存(Ikeda et al. 2011)、視覚的顕著性(サリエンシー)の検出能力(Yoshida et al. Curr Biol 2012)、短期記憶の保持と上丘の関与(Takaura et al. J Neurosci 2011)などを明らかにした。そして盲視におけるサックード制御にかかわる脳領域について、PETによる脳賦活データを得ていたが未解析であった。一方、サルにおいて特定回路の機能を解明するための選択的操作技術として、我々は、世界で初めてウィルスベクターを、標的細胞の投射先から逆行性に、さらに細胞体の位置から順行性に感染させることで2重感染した標的細胞に対し、Tetシステムによって可逆的に破傷風毒素を発現させてシナプス伝達を止め、行動に影響を与えることに成功していた(Kinoshita et al. Nature 2012)。また、サルの大脳皮質に多チャンネルの皮質脳波(ECoG)電極を慢性的に留置して神経活動の記録を行い、そのデータからGranger因果を計算し、記録部位がもつ情報とその流れを解析する手法を確立していた。

2. 研究の目的

片側一次視覚野損傷サルの両側大脳皮質外側面に多チャンネルのECoG電極を慢性的に留置して、電気生理学的に視覚入力から運動遂行までの大規模神経回路での信号処理過程を解析する。

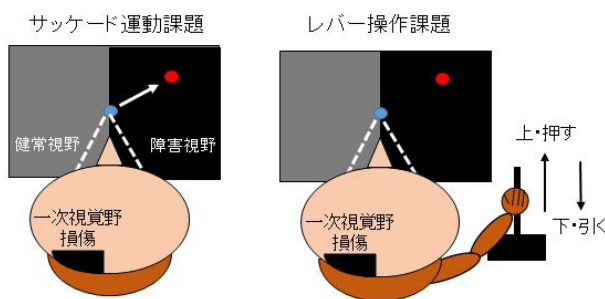
さらに重要な脳部位に対するGABAアゴニストであるムシモル注入による可逆的機能障害、特定経路に対するウィルスベクターによる経路選択的伝達障害を行い、盲視の回路を解明する。

同じ視覚刺激条件において、サルが「見えた」と答えた場合と「見えなかった」と答えた場合で脳全体の活動がどう異なるのか?特に視覚手がかりが与えられる前後の脳活動の違いを比較することで、「視覚的意識」が生じる機構を明らかにする。

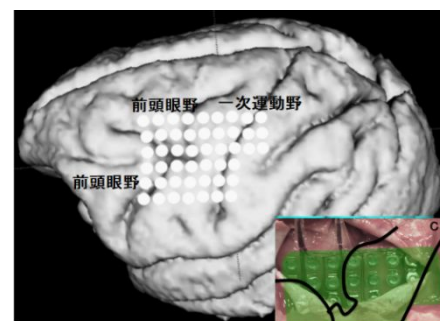
3. 研究の方法

モンキーチェアに座り、かつ頭部が固定された状態で、正面のスクリーンに提示された指標に対して視覚誘導性サックード運動(図1左)ないしは手によるレバー操作課題(図1右)さらに後述する複雑な認知行動課題を行うように訓練したニホンザルにおいて、片側一次視覚野を吸引除去し、術後1-2週間で、状態が安定した段階で訓練を再開した。すると1-2カ月で視覚誘導性サックードの成功率が回復、行動が安定した段階で以下のような様々な実験を行った。尚、眼球運動は一部の実験では眼球に装着したコイルに磁場をかけて眼球の回転角を計測、他の盲視における部分的意識の生成に関わる回路を解析する実験においては、関係すると考えられる部位にマイクロシリッジを用いてGABAアゴニストであるムシモルを微量注入し、サックード運動などの行動に対する影響を解析した。一部、経路選択的伝達遮断操作を行う実験においては、2種類のウィルスベクターを、標的とする細胞の投射先と細胞体の部位に注入し、8週間以上経過した後に経路遮断実験を開始した。

盲視における視覚情報の処理過程と部分的視覚的意識に対応する神経活動を記録する実験では、当初計画では脳全体をカバーする100チャンネル以上の皮質脳波(ECoG)電極を配置するとしていたが、埋入したサルにその後さらに一次視覚野の除去手術を行うことのリスクが高すぎると判断し、両側の前頭葉に48チャンネルの電極を置くことに留めた(図2)。研究進捗報告書の段階では、所属機関の異動に伴い、研究の進捗に若干の遅れがあったことを報告したが、研究期間内に成果を確実に出すという観点からも、今回の研究においては、知覚から行動決定に至るプロセスに関わる前頭葉各領域からの活動計測に注力することとした。



(図1)盲視モデルサルの行動課題



(図2)前頭葉への皮質脳波(ECoG)電極の配置

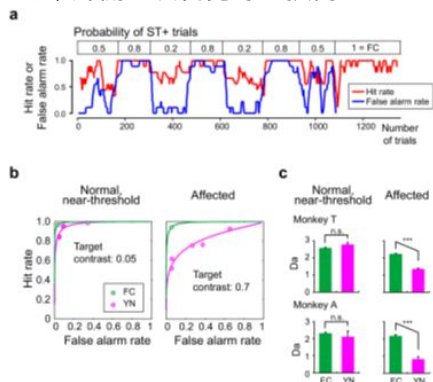
4. 研究成果

盲視における部分的意識 信号検出理論による解析(Yoshida & Isa, Sci Rep, 2015)

盲視の患者においては意識的知覚の有無を言語的報告として問うことができるがサルにおいては、行動によって評価しなくてはならない。古くはCowey & Stoerig (1995)は、サルに「見えたか、見えなかったか」を問い、手の運動で答えさせる「Yes-No課題」で視覚的意識の消失を

主張した。しかし、この課題は、強制選択条件と Yes-No 条件の間で異なる視覚刺激を使っていること、サルが少しでも報酬を得ようとして勘で応答してしまう "economical decision" を排除できない、という問題があった。そこで今回、我々は盲視のサルの視覚的意識がヒトの患者と同様に部分的意識として障害されていることを示すために以下の実験を行った。

まず、片側一次視覚野を損傷したサルに視野中心の注視点を注視後、健常視野ないしは障害視野



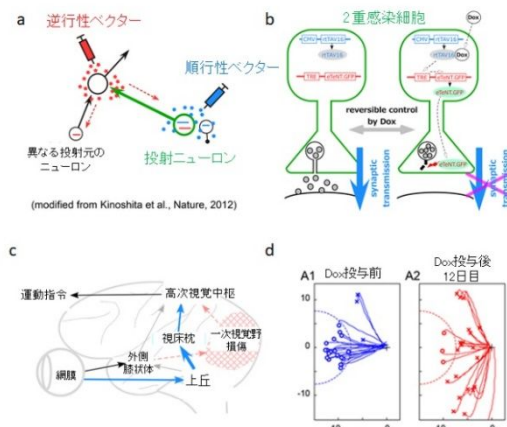
(図3) 盲視サルのYes-No課題での行動の信号検出理論による解析。指標あり試行の割合を変えてHitとFAの割合が変わり(a)、それによってROC曲線を描くことができる(b)。それによって2頭のサルそれぞれについて感度(Da)を求めることができ、盲視で低下していることが明らかに(c)(Yoshida & Isa, 2015より)。

の周辺上方または下方に提示される視覚刺激に対してサッケードを行う、ないしは行わないことで「見たかどうか」の報告を行わせた(図3a)。するとこの実験に用いた2頭のサルはいずれも Yes-No 条件において正解率が大きく低下した。しかし、正解率はゼロではなく、約半数の試行で正解していた。これが「見えていた」せいなのか、単なる economical decision の結果なのかを知るために、指標を提示する試行の割合を全試行の20%から100%(強制選択)までの異なる割合で系統的に変化させることで、Hit率とFalse Alarm(FA)率を変化させ、ROC曲線を描き、信号検出理論によって、被験者であるサルの、biasに依存しない指標検出の感度(Da)を求めた(図3b)。その結果、Daは図3c右のように健常視野に(図3c左)おけるより優位に低下していることから、視覚的意識が障害されていること、一方でゼロにはなっていないことから「部分的意識」が残存していることが示唆された。

盲視に関わる神経回路の解析

(1) 上丘 視床枕経路の関与 (Kinoshita et al. Nat Comm, 2019)

米国 NIH の Schmid や Leopold らは、一次視覚野損傷サルにおいて外側膝状体を機能阻害すると、fMRI で計測された高次視覚野の視覚応答が消失すること、視覚誘導性サッケードが障害されることから、盲視には視床枕ではなく、外側膝状体が重要であると発表した (Schmid et al., Nature 2010)。しかし、彼らの論文では視床枕の可能性については直接検証されていなかったため、今回我々は視床枕の関与を調べてみた。まず視床枕を記録電極でマッピングし、上丘の電気刺激に応答するニューロンの分布域を探索したところ、短潜時で応答するニューロンは主に腹外側視床枕に分布することが明らかになり、この部位にムシモルを注入した。尚、ムシモルは事前に Gd を混ぜたものを注入し、注入後 MRI 画像を撮像し、実験に用いた注入量では外側膝状体には拡散していないことを確認している。すると視床枕の機能阻害はサッケードの成功率を顕著に低下させ、さらに成功したサッケードにおいても反応時間が遅延した。以上の結果から腹外側視床枕が盲視に関与することが示唆された。しかし、視床枕には大脳皮質連合野も含めた中枢神経系の様々な部位からの入力があるので上記の結果からは必ずしも上丘から視床枕に至る経路が関与しているとは言えない。そこで、以下のように我々が開発したウィルスベクター2重感染法を用いて上丘 視床枕経路を選択的に阻害する実験を行った。ここでは一次視覚野損傷側の視床枕に逆行性ベクター NeuRet にテトラサイクリン反応性配列 TRE と増強型破傷風毒素 eTeNT を搭載した NeuRet-TRE-eGFP..eTeNT を注入、その後上丘に AAV-CMV-rtTAV16(rtTAV16 は高感度 Tet-on 配列) を注入した (図4a,b)。そして6-8週間後にドキシサイクリンを投与することで上丘 視床枕経路を遮断したところ、図4dのように、サッケード運動が障害された。以上の結果は、上丘 視床枕経路が少なくとも一部は盲視に関与していることを示している。一方、これら一次視覚野損傷サルの外側膝状体を CAMKII に対する抗体で免疫染色し、Schmid らが盲視に関与すると主張している konio 細胞を調べたところ、損傷後3-8年経過したサルにおいて健常側に比して18-34%にまで、おそらく一次視覚野損傷による逆行性変性により減少していたものの、少なからず残存していることがわかり、これらが盲視に関与する可能性が残された。



(図4) 盲視モデルサルにおける上丘-視床枕経路の選択的伝達遮断法とそれによる眼球サッケード運動の障害

(2) 視床枕と外側膝状体の比較 (Takakuwa et al., in preparation)

前述の Schmid らの実験では、一次視覚野は灰白質のみの部分的損傷で、さらにサルは損傷後比較的短期で調べられていたと考えられるのに対して我々は一次視覚野を白質も含めて大規模の

比較的短期で調べられていたと考えられるのに対して我々は一次視覚野を白質も含めて大規模の

吸引除去し、さらにその後3-8年後と時間が経過した段階で調べていることから、その盲視モデル作製法の違いが視床枕と外側膝状体の関与に違いを与えている可能性があると考え、同一個体で、さらに損傷後1年以内という短期のサルも含めてこれら2つの核のムシモルを局所注入する機能障害を試みた。すると、健常側では、外側膝状体の機能障害はサッケードを顕著に障害するのに対し、視床枕の機能障害は影響がなかった。それに対し、損傷側では視床枕の機能障害はサッケードを顕著に障害し、そして外側膝状体の機能障害もサッケードを障害するが、ムシモルが効果を発揮するのにより長時間を要した。以上の結果は、一次視覚野の損傷によって上丘視床枕経路に可塑的变化が起きて視覚運動変換に関与するようになったこと。それによって外側膝状体への依存度はやや低下していたことが示唆された。いずれにしても、図5のように、外側膝状体と視床枕の両方が盲視に関与することが明らかになった。このことは最近 Tamietto & Morrone の最近の総説(Curr Biol, 2016)で「盲視には複数の経路が関与し、それぞれが異なる無意識の視覚情報処理に関わる」と述べていることを支持している。

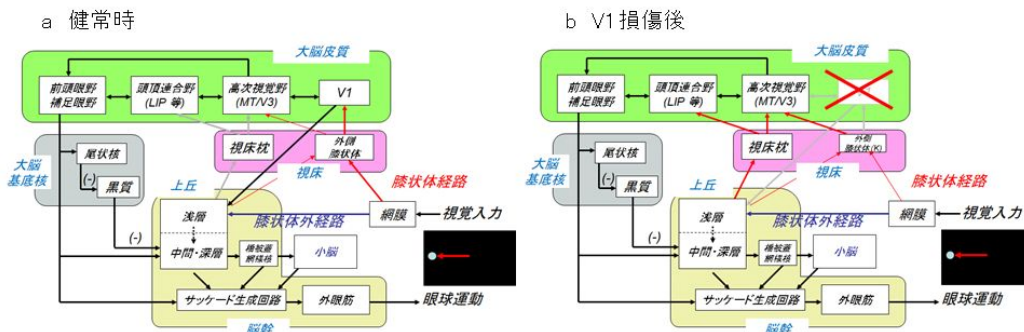
(3) 頭頂連合野 LIP 野の関与 (Kato et al. in preparation)

PET による視覚誘導性サッケード課題遂行時の脳血流計測のデータを解析した。これらの実験では、セッションごとのサッケードの回数を 1:2:3:4:6 と系統的に変化させて、このサッケードの回数に比例して血流が増加する voxel をサッケード関連領域として抽出した cluster 解析によってサッケード関連領域を抽出したところ、実験を行った2頭のサルで共通して損傷後にサッケードへの関与が最も強まった部位が、両側の頭頂連合野 LIP 野だった。(上丘や視床枕は1頭のサルでは関与が示唆されたが他方では弱かった)そこで LIP の関与をより深く理解するため、両側の LIP 野から遅延性サッケード課題中のニューロン活動を記録したところ、健常側と同様に、損傷側の LIP においても指標が受容野に提示された場合に 100ms 程度の短潜時での視覚応答とそれに引き続くサッケード準備活動がサッケード開始時点まで持続的に観察された。一方、指標が受容野外にある場合はむしろ若干活動が抑制される傾向があった。次に、両側の LIP 野にそれぞれムシモルを注入し、可逆的機能障害を行ったところ、いずれの場合も、健常視野に向かうサッケードは影響を受けなかったが、損傷側視野へ向かうサッケードは顕著に障害された。これまでの研究から、通常 LIP 野は注意のリマッピングなど、より複雑な視覚情報処理に関わっており、単純な視覚誘導性サッケードの制御には関わらないとされてきたが、今回の結果は、一次視覚野損傷後においては視覚情報のリソースが減少したことを補うために LIP 野が単純な視覚運動変換に両側性に関わるように機能を変えたことを示唆しており、大変興味深い。

盲視の機能 他の認知行動課題の遂行とそれに関与する神経システム

(1) 古典的条件付けについて (Takakuwa et al. eLife, 2017; Sci Rep, 2018)

盲視の機能を単純な視覚誘導性サッケード以外の、より複雑な行動課題でより深く検証するため、古典的条件付け課題を訓練したニホンザルにおいて一次視覚野損傷を行い、行動と関与する回路機構を解析した。この課題では、視野中心の注視点を注視している際に指標が視野上方に提示された場合には 0.7-1.3s 後に多量(0.17ml)のジュースが与えられるのに対し、下方に提示された場合にはさらに 2s 近く待って、注視点消灯から 1.5s 後に少量(0.06ml)のジュースしか与えられないという条件を与えると、サルは前者の場合はすぐに吸い口のリッキング行動を行うのに対し、後者の場合は指標の提示が終わり、少量のジュースが与えられる直前に若干のリッキングを行うだけ、という形で古典的条件付け学習が成立した。これは手がかり刺激が盲視野に提示されても同様で、さらに指標の位置と報酬との連合を逆転させた場合にも逆転学習が可能であった。その際にこのような報酬による連合学習に重要な役割を果たすとされる黒質緻密部のドーパミン細胞から神経活動の記録を行うと、大きな報酬を予測させる手がかり刺激に 100ms 程度の短い潜時で応答すること、そしてこの報酬期待信号が中脳上丘を記録中にムシモルによって機能障害すると消失すること、そして同時に学習された課題行動が遂行できなくなることが明らかになった。以上の結果は盲視野に提示された報酬を予測させる視覚信号が上丘を介して黒質ドーパミン細胞に伝達され、盲視における古典的条件付けを成立させることが明らかになった。一方、健常視野に提示された手がかり刺激によってドーパミン細胞に誘発される短潜時の



(図5)一次視覚野損傷前(a)と損傷後(b)の眼球サッケード運動制御回路

報酬予測信号は上丘の機能障害によっては消失せず、また連合学習行動にも影響を与えなかったことから、健常視野での古典的条件付けは視覚皮質を介してドーパミン細胞に伝えられる報酬予測信号によって成立していることが明らかになった。これらの結果もまた、一次視覚野損傷後、上丘を巡る経路に生じた可塑性が盲視を生じさせていることを支持している。

(2) オペラント条件付けについて(Kato et al. in preparation)

もう一つの連合学習であるオペラント条件付けについても障害視野に提示される手がかりによって成立するかどうかを解析した。真っ暗なスクリーンの一部にゴールを決め、サルは視線を動かしながらゴールを探る。ゴールに入って230ms以上とどまったら、視野周辺に手がかりが提示され、2秒後にサルは報酬のジュースを得る。するとサルは最初は30sかかっても見つけられなかったゴールの位置を100試行前後で学習し、2-3回のサッケードで見つけ出すことができるようになった。この学習は手がかりが盲視野に提示されても可能であった。サルがこの盲視野の手がかりに気づいていないことは、健常側の場合は、手がかり刺激が提示されたサルは探索を止めるのに対し、障害側では手がかり提示後も探索を止めないことから理解できた。以上の結果から意識されない手がかりによってオペラント学習が成立することがわかった。

(3) トップダウン的注意について(Yoshida et al. Front Neurosci 2017)

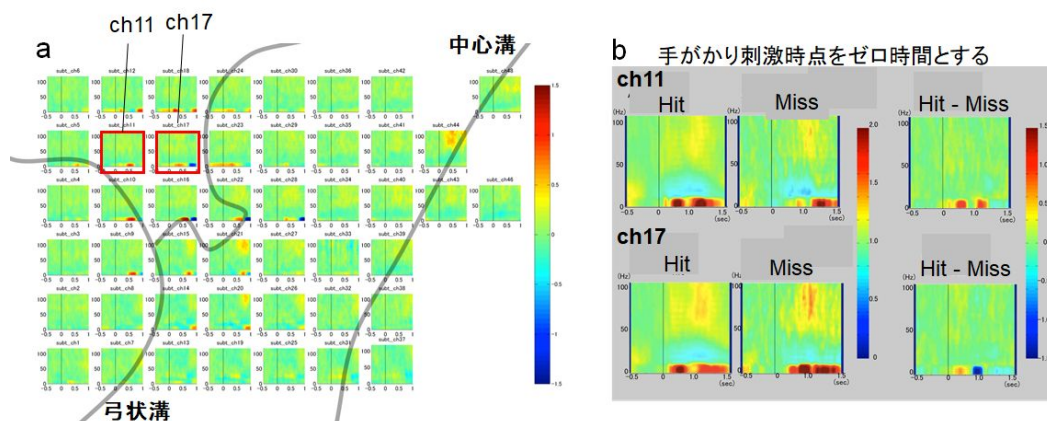
盲視野に対するトップダウン的注意を調べるため、我々はPosner cueing paradigmを用いた。視野中心の注視点の矢印やその色によって、次の指標が左右のいずれに提示されるかが教示される。ただ、実際には80%の試行でその指示通りに提示され(valid試行)、残りの20%の試行では反対側に提示される(invalid試行)。そこでvalid試行とinvalid試行のサッケードの反応時間を比較したところ、盲視野に対するサッケードも健常視野同様、valid試行の方がinvalid試行より反応時間が短いことが示された。以上の結果から、サルは盲視野に対する視覚運動変換過程にトップダウン的注意の効果を及ぼすことが可能であることが明らかになった。

「部分的意識」に関連する神経活動(Yamamoto et al. in preparation)

視覚刺激に対する応答を手による操作課題とした。ここでは視野中心を注視している際に視野の上方ないしは下方に手がかりが提示され、上であればレバーを押す、下であればレバーを引くことで視覚刺激の内容を答えるようにサルを訓練した。そしてこれらのサルの前頭眼野、運動前野、一次運動野に、両側性にそれぞれ48チャンネルのECoG電極を慢性的に留置した。そして一次視覚野を片側損傷し、機能回復過程を追跡した。その結果、損傷後50日を超えたあたりから機能回復が観察され、70-80%の成功率で手がかりの位置によるレバー操作に成功するようになった。そこで、手がかり刺激を「正しく報告したHit試行」と「気づかなかったMiss試行」における神経活動の違いを比較解析したところ、Hit-Missの差を示した図6のように、手がかり刺激に対する視覚応答、及びGo信号直前から帯域の低周波活動がHit試行において高く、逆にGo信号後のレバー操作開始時では低くなること明らかになった。後者については低周波帯域の活動は運動を抑制する機能もあることから、それを反映しているものと考えられる。このように、サルの「気づき」に対応する短潜時の視覚応答からその後のレバー操作に関わる意思決定に至る過程が、低周波数帯域の神経活動として前頭葉領域で観察された。

[成果の総括と将来展望]

サルの盲視に上丘 視床枕及び外側膝状体 高次視覚野 LIP 野 そして前頭葉皮質という



(図6)レバー操作課題における前頭葉各部位でのHit試行の活動からMiss試行の活動を差し引いたもの(time frequency plot)。手がかり刺激の時点をゼロ時間としてデータをそろえている。(a)各領域でのデータ(時間軸は-0.5から1.0s)。(b)aにおいてch11, ch17で示された運動前野の部位におけるHit試行、Miss試行のデータ、及びその差分。

回路が貢献することを明らかにできた点については、当初想定していた通りの成果が挙げられたと考えている。さらに前頭葉領域において、盲視における部分的意識とそれによる行動決定に関わる神経活動をとらえることができた。部分的意識が生じる際の神経回路動態については、現在Granger因果などについて膨大なデータを解析中である。サルはまだ実験遂行中であり、サッケード課題を用いて行った信号検出理論を用いた解析と神経活動の解析(今後は上丘などから

の同時記録も行う)を組み合わせることで、「部分的意識の生成機構」の理解を深化させたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 31 件)

1. Kinoshita M, Kato R, Isa K, Kobayashi K, Kobayashi K, Onoe H, Isa T (2019) Dissecting the circuit for blindsight to reveal the critical role of the pulvinar and superior colliculus. *Nature Communications*, 10(1):135. doi: 10.1038/s41467-018-08058-0.
2. Takakuwa N, Redgrave P, Isa T (2018) Cortical visual processing evokes short-latency reward-predicting cue responses in primate midbrain dopamine neurons. *Scientific Reports*, 8(1):14984. doi: 10.1038/s41598-018-33335-9.
3. Takakuwa N, Kato R, Redgrave P, Isa T (2017) Emergence of visually-evoked reward expectation signals in dopamine neurons via the superior colliculus in V1 lesioned monkeys. *eLife* 6. pii: e24459. doi: 10.7554/eLife.24459.
4. Yoshida M, Hafed ZM, Isa T (2017) Informative Cues Facilitate Saccadic Localization in Blindsight Monkeys. *Frontiers in System Neuroscience* 11 : 5. doi: 10.3389/fnsys.2017.00005. eCollection 2017.
5. Yoshida M, Isa T (2015) Signal detection analysis of blindsight in monkeys. *Scientific Reports*, 5:10755. doi: 10.1038/srep10755.

〔学会発表〕(計 30 件; 招待講演のみ---ポスター発表などは省略、以下代表例)

1. Tadashi Isa, Key elements for the recovery from partial spinal cord injury; propriospinal neurons and beyond. The 27th Annual Meeting of the Society for Neural Control of Movement, May 5, 2017, Dublin, Ireland.
2. Tadashi Isa, Large-scaled network reorganization for recovery after partial spinal cord injury in primates. Special Lecture, The Special Lecture, The 40th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Makuhari, Chiba.
3. Tadashi Isa, The brain is needed to cure spinal cord injury. Special Lecture, Society for Neuroscience, Nov 17, 2014, Washington DC, USA.

その他の主要な招待講演 31 件 (以下代表例)

1. Tadashi Isa, Double vector infection technology (DIT) for the pathway-selective manipulation in non-human primates. NIH Symposium on “Genetic technologies for systems neuroscience in non-human primates”, Dec 13, 2018, Bethesda, USA.
2. Tadashi Isa, Dissecting the recovery mechanism after spinal cord injury by multidisciplinary approaches. Cold Spring Harbor Asia, “Primate Neuroscience” Symposium, June 26, 2017, Suzhou, China.

〔図書〕(計 1 件)

1. Tadashi Isa (2015) Large-scaled network reorganization during recovery from partial spinal cord injury. In “Clinical Systems Neuroscience” (eds. Kansaku K, Cohen LG, Birbaumer N), Springer, pp121-138. (分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕ホームページ : <https://nscinbiol.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 小林憲太

ローマ字氏名 : (KOBAYASHI, Kenta)

所属研究機関名 : 大学共同利用機関法人自然科学研究機構

部局名 : 生理学研究所

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 70315662

研究分担者氏名 : 吉田正俊

ローマ字氏名 : (YOSHIDA, Masatoshi)

所属研究機関名 : 大学共同利用機関法人自然科学研究機構

部局名 : 生理学研究所

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 30370133

(2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。