

# 研究報告書

## 「霊長類の高次脳機能を担う大脳皮質神経回路の可視化と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年9月～平成27年3月

研究者: 佐藤 隆

### 1. 研究のねらい

我々の行動や認知機能を理解するために、脳内における感覚、運動情報変換の神経機構を理解することが重要である。眼球運動は感覚と運動を結びつける最も重要な現象のひとつである。「ものを見る」ためには、眼に入ってくる視覚情報を処理するだけでなく、眼を動かすことで、能動的に必要な視覚情報を収集する必要がある。また、眼球運動は注意などの認知機能とも密接に関係しており、例えば統合失調症の患者では眼球運動の異常が頻繁に見られることが知られている。

近年、視覚情報処理や認知機能のモデル系としてマウスが広く使われている。これは、光遺伝学、二光子顕微鏡によるイメージング、各種センサーおよびレポーター、Cre-LoxPなどの分子生物学的手法などのさまざまな技術がマウスを主な対象として開発されてきた結果であるが、その一方でマウスの行動課題は極めてプリミティブであり、ヒトの認知機能を調べる際に用いられるような行動課題はほとんど使用されてこなかった。とりわけ、ヒトで頻繁に用いられる眼球運動課題をマウスに用いた例はなく、その結果としてマウスの眼球運動に関わる神経回路およびその視覚や認知機能との関連は全くわかっていない。わずかに人間の衝動性眼球運動(サックード)に似た動きを自発的に行うことがあるという報告が存在するのみであった。

本研究では、眼球運動が大脳皮質によってどのように制御されているかをマウスと霊長類で比較することを目的として研究を進めた。そのために、まずマウスに、ヒトや他の霊長類で使われる眼球運動課題を遂行させた。そして、光遺伝学、二光子イメージング、Cre-LoxP システムを用いることにより、神経回路レベルでの眼球運動制御メカニズムの解明を目指すと共に、霊長類研究にこれらの技術を導入することを目指した。この研究は、ヒトや霊長類の認知機能の研究とマウスを用いた神経科学を結びつける重要な一歩となると考えられる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

我々は周囲の視覚情報を獲得するために、常に眼を動かしている。さらに、対象物に高速で視線を向けるサックード(衝動性眼球運動)を行うことで、効率よく情報処理を行うことが可能になる。近年マウスの視覚系がシステム神経科学のモデル系として注目を集めているが、眼球運動に関する研究はほとんど行われていない。ヒトと同様にマウスもサックードを行うことが知られているが、その神経回路網は未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、マウスのサックードに関連する神経メカニズムを、電気刺激、行動実験、光遺伝学、二光子顕微鏡イメージング、Cre-LoxP システムなどを用いて回路レベルでの解明を試みた。その結果以下のことが明らかになった。

第一に、電気刺激を用いて眼球運動制御に関わる領域(前頭眼野<sub>マウス</sub>)が前頭葉にあることを発見した。この領域を刺激すると、霊長類と同様に contraversive な(左半球刺激なら右方向、右半球刺激なら左方向)サッケードを両眼で同時に起こすことができた。

第二に、マウスに眼球運動課題を遂行させ、眼球の動きを解析した。その結果、左眼の動きに追従して、右眼も同じ方向に動くことがわかった。ヒトと同様、マウスでも随意運動下では両眼が同時に動くことからマウスの眼球運動はヒトの眼球運動のモデルになりうることを示唆する。

第三に、前頭眼野<sub>マウス</sub>の機能的意義を調べるため、光遺伝学を用いて片側の前頭眼野<sub>マウス</sub>を抑制し、眼球運動に与える影響を調べた。課題遂行中に、光遺伝学を用いて片側の前頭眼野<sub>マウス</sub>を抑制すると、contraversive な眼球運動が抑制された。

第四に、眼球運動課題中の前頭眼野<sub>マウス</sub>の神経活動を、二光子カルシウムイメージング法により記録した。前頭眼野<sub>マウス</sub>の細胞は眼球運動前に活動が上昇し、概して contraversive な眼球運動を行うときのほうが ipsiversive な眼球運動を行うときよりも活動レベルが高かった。

これらの結果から、マウスにおける眼球運動に関係する領域の同定(前頭眼野<sub>マウス</sub>)、神経細胞活動、機能的役割を明らかにすることができた。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「マウスにおける眼球運動領域(前頭眼野<sub>マウス</sub>)の同定」

金属電極を用いてマウスの前頭葉を網羅的に刺激することで、サッケード(衝動性眼球運動)を制御する領域を同定した。前頭葉の特定の領域を刺激することで、短時間の潜時で両眼を同時に動かすことに成功した。さらに左半球を刺激した場合は両眼とも右方向に(左目は鼻側に、右目は耳側に)、右側を刺激した場合は両眼とも左方向に(左目は耳側に、右目は鼻側に)動くことが明らかとなった。この結果、電気刺激は Contraversive なサッケードを引き起こすことがわかった。

次に、この領域に赤い蛍光タンパク質を発現するウイルスを注入し、領域内にある神経細胞の投射経路を調べた。その結果、上丘や脳幹の眼球運動関連核へ投射していることがわかった。さらに高次視覚野への投射も見られた。これらの投射パターンが、霊長類で眼球運動を司る前頭眼野と呼ばれる領域と似ていることから、この領域を前頭眼野<sub>マウス</sub>と名付ける。

### 研究テーマB「マウスの眼球運動課題の確立」

マウスの眼球運動制御機構を明らかにするために、眼球運動課題の訓練を行った。眼球運動課題には、ヒトや他の霊長類でも使われている視覚誘導性サッケード課題を用いた。具体的には、中心に提示される視覚刺激を注視した後、鼻側か耳側に次の視覚刺激が提示され、その方向に眼を動かすと報酬(水)がもらえるという課題である。マウスは2~3週間でこの課題を8割以上の成功率で遂行することが出来るようになった。

この課題遂行中の眼球運動を解析した結果、ヒトのサッケードに似た動きをすることがわかった。さらに、両眼が連動して、同じ方向にサッケードを行っていることがわかった。つまり、左眼が右方向(鼻側)に動くときは、右眼も同時に左方向(耳側)に、左眼が左方向(耳側)に動くときは、右眼も同時に左方向(鼻側)に動いた。このことから、マウスでもヒトと同様に随意運

動の際には両眼は同方向に同時に動くことが明らかになった。このことはマウスの眼球運動がヒトのそのモデルとなりうることを示唆している。

#### 研究テーマ C「光遺伝学を用いた前頭眼野マウスの抑制実験」

眼球運動における前頭眼野<sub>マウス</sub>の役割を調べるため、光遺伝学を用いて眼球運動課題遂行中の前頭眼野<sub>マウス</sub>の神経細胞活動を抑制し、眼球運動に与える影響を調べた。実験には、パルブアルブミン陽性な神経細胞に特異的にクレレコンビナーゼを発現したマウスを用いた。このマウスの片半球の前頭眼野にクレレコンビナーゼ依存的に光感受性タンパク質(チャンネルロドプシン)を発現するウイルスを注入した。これによりチャンネルロドプシンを片側の前頭眼野<sub>マウス</sub>の介在細胞特異的に発現させることが出来る。このマウスの前頭眼野<sub>マウス</sub>に青色光を照射することで、介在細胞に活動電位が引き起こされ、周囲の錐体細胞の活動を抑制する。これにより、片側の前頭眼野<sub>マウス</sub>の活動を空間・時間特異的に抑制することが出来る。この手法を課題遂行中のマウスに適用したところ以下の知見が得られた。

(1) 左半球の前頭眼野<sub>マウス</sub>を抑制すると、マウスは左目を右方向(鼻側)に動かすことは出来ないが、左方向(耳側)に動かすことは可能であった。これに伴って、右目も右方向(耳側)には動いたが、左方向(鼻側)には動かなかった。

(2) 右半球の前頭眼野<sub>マウス</sub>を抑制すると、マウスは左目を左方向(耳側)に動かすことは出来ないが、右方向(鼻側)に動かすことは可能であった。これに伴って、右目も左方向(鼻側)には動いたが、右方向(耳側)には動かなかった。

これらの結果と、電気刺激のデータ(実験テーマ A)を総合的に考えると、前頭眼野<sub>マウス</sub>は contraversive な眼球運動を制御していると考えられる。

#### 研究テーマ D「2光子イメージングを用いた前頭眼野マウスの活動の研究」

眼球運動課題遂行中の前頭眼野<sub>マウス</sub>における神経細胞活動を調べるために、二光子顕微鏡を用いてカルシウムイメージングを行った。ウイルスを用いて遺伝子コード型のカルシウムセンサーを前頭眼野<sub>マウス</sub>に導入し、2週間後に、この領域から二光子顕微鏡を用いてイメージングを行った。この結果、前頭眼野<sub>マウス</sub>には眼球運動の前に活動レベルが上昇する細胞が多くあることがわかった。さらに、それらの細胞の多くは、contraversive な眼球運動前の方が高い活動レベルを示すことがわかった。この知見は、前頭眼野<sub>マウス</sub>が contraversive な眼球運動を制御していることを強く示唆する。

#### 研究テーマ E「前頭眼野の神経活動の可塑性の研究」

上述したテーマ A-D の結果から、前頭眼野<sub>マウス</sub>における神経回路は contraversive な眼球運動を制御していると考えられる。しかし、この半球のラテラルリティと眼球運動の方向の関係は固定されたものか、可塑的なものかは明らかでない。この疑問に答えるために以下の実験を行った。

(1) 左半球の前頭眼野<sub>マウス</sub>を抑制すると、その期間中、左眼が右方向に動かなかった。

(2) 同じ実験を数日続けると左眼は右方向に動けるようになった。

この学習に反対側(右半球)の前頭眼野<sub>マウス</sub>が関与しているという仮説を検証した。この為

に学習前と後での反対側(右半球)の前頭眼野<sub>マウス</sub>の細胞活動を調べた。すると、学習前では多くの細胞が左方向の眼球運動に高い活動を示していたのに対して、学習後には右方向の眼球運動に高い活動を示す細胞が多数現れた。また、左右の両前頭眼野<sub>マウス</sub>を抑制すると左眼は再び右方向には動けなくなった。このことは右半球が右方向への運動を制御できるようになったことを示唆する。

### 3. 今後の展開

今回の研究で、マウスの大脳皮質における眼球運動制御機構はヒトや霊長類のものと似ていることがわかった。今後は、霊長類で同様の課題を遂行し、神経回路の活動様式の違いを調べ、マウスと霊長類の感覚認知機構や運動制御の違いを回路と言う観点から調べていきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

短期間に効率よく、予算増額の必要もなくインパクトの高い仕事を成し遂げることが出来たと考えている。また、本研究で得られた結果は、今後の高次機能研究の方向性に大きな影響を与える可能性が高いと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究はもともと霊長類の前頭眼野に着目して、眼球運動の意志に関わる神経回路が様々な情報を統合して運動指令を出す様子を解明しようとする提案であったが、準備中に所属研究機関のサル施設が感染事故により停止したため、マウスの眼球運動に関わる大脳皮質回路の解析に向かったものである。ところが、両眼視の比重が小さいと見られ眼球運動研究から顧みられなかったマウスを解析してみると霊長類と類似した特性が続々と発見され、新たな分野を単独で開拓する成果となった。本研究により、マウス大脳皮質にも霊長類の前頭眼野に相当する部位が存在すること、その刺激で霊長類と同様なサッケード眼球運動が惹起されることなどを明らかにし、またいくつかの特性を解析できた。これらの成果は光遺伝学、二光子顕微鏡イメージング、Cre-LoxP システムなどが適応できるマウスにおいても、ヒトの眼球運動の基本原理に迫る研究ができる可能性を示すものであり、事実数ヶ所からセミナーに呼ばれるなどその研究が注目されている。今後はこの領野の感覚認知系統などの入力や眼球運動制御様式などを含め興味深い進展が期待できる。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

論文投稿準備中

(2)特許出願

研究期間累積件数:なし

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

Sato TR. Application of GCaMP6 to in vivo calcium imaging. Janelia Farm Research Campus Conference, Fluorescent Proteins and Biological Sensors IV, Sep 28<sup>th</sup> – Oct 1<sup>st</sup>, 2014 (口頭発表).

招待講演

Neural circuits underlying motor control in mouse frontal cortex. (2014) Caesar, Max Planck Institute in Bonn, Germany. April 29th, 2014

Dynamic representation of saccades in mouse frontal cortex. (2014) National Institute for Physiological Sciences, Japan. June 3<sup>rd</sup>, 2014.

Neural Circuits underlying motor control in mouse frontal cortex. (2014) Humboldt University, Berlin, Germany. Nov 11<sup>th</sup>, 2014.

Dynamic representation of saccades in mouse frontal cortex. (2014) Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Switzerland. Nov 13<sup>th</sup>, 2014.

Optical approach to the cortical circuits underlying behavior. (2013) Neuroscience course, Distinctive educational program. Nagoya University School of Medicine, Japan. Nov 27<sup>th</sup>, 2013