

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		ISA TADASHI					
①研究代表者名 氏名		伊佐 正		②所属研究機関・ 部局・職		生理学研究所・発達生理学研究室 ・教授	
③研究課題名	和文	眼球運動系を手がかりとする精神機能の脳内メカニズムの解明					
	英文	Probing the cognitive brain functions with the oculomotor system					
④研究経費 金額単位：千円		平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
		30,100	24,000	15,600	12,400	12,400	94,500
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
伊佐 正	生理学研究所・発達生理学 研究室・教授	神経生理学	研究全体の統括				
吉田 正俊	生理学研究所・発達生理学 研究室・助手	神経生理学 認知神経科学	霊長類を用いた慢性記録実験の遂行				
遠藤 利朗	生理学研究所・発達生理学 研究室・助手	神経生理学	脳スライス標本を用いた局所神経回路の解析				
小林 康	大阪大学・大学院生命機能 研究科・助教授	神経生理学 計算機科学	霊長類を用いた慢性記録実験の遂行				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>眼球のサッケード運動は、その制御に関わる神経回路の概要が既によく理解されている。さらにその反応時間や正確さ、速度といった指標が注意・動機付けなどのヒトの様々な精神機能をよく反映する。またサッケード課題を用いて短期記憶や意思決定などの神経機構を調べる様々な実験パラダイムが開発されている。これらの利点を活用し、これら精神機能がサッケード運動の上記の様々なパラメータにどのように作用するかを実験遂行上の手がかりとして、これらの精神機能をサッケード運動を制御する神経回路に対する修飾機構として捉えなおし、その脳内における実体を追究する。</p> <p>具体的にはスライス標本を用いた電気生理実験、マウスの急速眼球運動の制御機構に関わる分子機構の解明、さらには様々なサッケード運動を用いた心理課題を訓練したサルにおける単一ニューロン記録法を組み合わせる。このようにして神経回路の動作とその修飾機構という局面から、高次精神機能の脳内におけるシステム機構、分子機構の実体を解明することを目指す。</p>							

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

脳スライス上丘標本を用いた上丘局所神経回路の研究

サッカーボール運動を制御する中脳上丘におけるサッカーボール関連高頻度発火(バースト)活動の生成機構や局所神経回路での信号伝播機構を、げっ歯類のスライス標本においてwhole cell patch clamp法や多チャンネル(64ch)フィールド電位同時記録法を用いて解析した。その結果、上丘中間層固有の神経回路における興奮性神経回路によってNMDA受容体依存性に多くのニューロンが同期発火する機構が存在すること(Saito & Isa, 2003, 2004, 2005)、コリン作動性入力では中間層においては出力細胞にニコチン受容体やM3型ムスカリン受容体を介して興奮性作用を及ぼすこと(Sooksawate & Isa, in preparation)、また抑制性神経伝達をM1, M3型受容体を介してシナプス前性に抑制する(Li et al. 2004)、といったメカニズムを介してサッカーボールを含む指向運動を促進する作用があると考えられるのに対して、浅層においては主にシナプス前性のニコチン受容体を介して抑制性シナプス伝達を増強し、コントラストの検出をより鋭敏にする作用がある(Endo et al. 2005)ことが明らかになった。また、柳川らによって開発されたGABA作動性ニューロンが選択的にGFPを発現するGAD67-GFPノックインマウスを用いて、上丘浅層(Endo et al. 2003)及び中間層(Sooksawate et al. in preparation)におけるGABA作動性ニューロンの形態学的、電気生理学的特性を明らかにした。

麻酔下ラットを用いた上丘浅層-中間・深層間信号伝播機構の研究

麻酔・非動化したラットにおいて視覚刺激によって誘発されるフィールド電位を上丘の異なる層において記録・解析したところ、通常は上丘の浅層において網膜のY線維とW線維由来の興奮性のフィールド電位が記録され、それらが反転した電位が中間層においては記録されるのみであるのに対して、bicucullineを中間層に微量注入してGABA作動性抑制を減弱させると、中間・深層において浅層の興奮に引き続いて数百ミリ秒持続する興奮を反映する陰性フィールド電位が記録されたことから成熟ラット固体においても幼弱動物でのスライス標本での実験(Isa et al. 1998)と同様、浅層から中間層への興奮性信号伝達経路が存在し、GABA作動性抑制が減弱している状況においてその間の信号伝達が促進されることが明らかになった(Katsuta & Isa, 2003)。

麻酔下サルを用いた上丘浅層-中間・深層間信号伝播機構の研究

上記の麻酔下ラットにおける実験と同様な標本を用い、麻酔・非動化したマカクザルにおいても浅層から中間層への興奮性信号伝達経路が存在し、GABA作動性抑制が減弱している状況においてその間の信号伝達が促進されることが明らかになった(Nikitin et al. in preparation)。

マウスのサッカーボール運動記録系の開発とそれを用いたサッカーボール生成神経回路の分子機構

高速ビデオカメラを用いてマウスの急速眼球運動を240Hzのsampling frequencyで記録・解析するシステムを自作し(Sakatani & Isa, 2004)、マウスの自発性サッカーボール運動及び上丘電気刺激によって誘発されるサッカーボールの性質を解析した(Sakatani & Isa, in preparation)。さらに抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD65のノックアウトマウスで上丘電気刺激による誘発サッカーボールの性質を解析したところ、サッカーボールの終止が不安定であった。この症状をサッカーボール制御の神経回路モデルを用いて計算機シミュレーションで解析したところ、サッカーボール生成に関わる内部フィードバック回路の利得が上昇していることが推論された(Sakatani & Isa, in preparation)。またNMDA受容体2Dサブユニットのノックアウトマウスでは自発サッカーボールの速度が遅く、サッカーボール開始の機構に障害があることが推論された(Sakatani & Isa, in preparation)。

脳幹コリン作動性システムによる「報酬期待」信号の符号化について

脚橋被蓋核(PPTN)は脳幹由来のコリン作動性投射の起始核でありドーパミン細胞(DA細胞)に投射している。サッカーボール課題遂行時に動物の動機付けを反映する持続的発火を示すことが明らかになった(Kobayashi et al. 2003)。PPTNからの興奮性入力がDA細胞における報酬予測誤差信号の生成に重要な役割を果たすと予想される。そこで、サルに手がかり刺激で報酬量を予測させるサッカーボール課題を行わせ、PPTNのニューロン活動を記録した。そして、報酬予測によって活動が変化する短潜時応答と、報酬予測の度合いに無関係に、一定の大きさの報酬反応を得た。これらの信号は計算理論で予言されている報酬予測誤差生成の主要な要素である報酬信号と、価値関数に相当すると推論された(Kobayashi et al. in preparation)。

一次視覚野一側性損傷サルにおける「盲視野」へのサッカーボールの性質

大脳皮質一次視覚野を損傷した患者において、視野の障害部位に提示された刺激が何であるかは答えられないが、それに対して手を伸ばす、目で見るといった行為が可能である、という「盲視」という現象が知られている。この「盲視」の神経機構を明らかにするため、視覚誘導性サッカーボール課題を用いた様々な認知課題を訓練したサルを用いて様々な検討を行なった。

一次視覚野一側性損傷後、障害側へのサッカーボールは健常側の検出閾値付近の明るさの指標へのサッカーボールより不正確で軌道の制御にも障害が見られたことから、障害側の残存視覚は単なる検出閾値が上昇しただけでなく、健常側視野における視覚とは質的な違いがあることが明らかになった(Yoshida & Isa, in preparation)。

一次視覚野一側性損傷サルの「盲視野」に提示された視覚信号による誘起される認知機能について

一次視覚野を一側性に損傷したサルは、障害側に提示された手がかり刺激に対する記憶誘導性サッカーボールを正しく遂行できることが明らかになった。また、注視点に提示された手がかりを用いて障害側に対するtop down attention行使することによって、障害側視野に提示された刺激に対するサッカーボールの反応時間を短縮させたり、検出閾値付近の明るさの指標に対するサッカーボールの成功率を上昇させることができることが明らかになった。これらの結果は一次視覚野を迂回する視覚経路を経由して中枢に届いた信号がworking memoryを駆動できること、また一次視覚野を迂回する視覚経路も注意のシステムによって制御され得ることが明らかになった。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

上丘の局所神経回路の基本構造の解明

げっ歯類の上丘のスライス標本及び麻酔下個体標本、さらには麻酔下サルを用いて中脳上丘の局所神経回路の基本構造と信号伝達の修飾機構を明らかにする一連の研究を展開した。この分野では世界を最もリードしている研究であり、現在も主要国際雑誌にreviewの執筆を依頼されている。

マウスの眼球サッケード運動記録系の開発

従来、マウスの眼球運動については前庭動眼反射や視機性眼球運動などの緩徐な眼球運動を対象とした研究が主流でサッケードのような急速眼球運動を対象とした研究はほとんど行なわれていない。今回の一連の研究で優れた記録・解析システムを構築し、さらに遺伝子改変マウスの症状を計算機モデルのシミュレーションで理解しようとする研究パラダイムを構築できたことから、今後数年は少なくとも世界をリードする研究が展開できると確信している。この研究が評価されて、昨年より、innovativeな動物実験系の開発に関するNIHのグラント審査員を依頼されている。

脚橋被蓋核ニューロンによる「報酬期待」信号の符号化

過去約10年間、Schultzらによって明らかにされた、ドーパミン細胞が強化学習の成立に必要な報酬誤差信号を有しているという研究が世界を席捲した感があるが、この報酬誤差信号がどのような機構で作られるかについては、いくつかのモデルが考案されてきたがいずれも多く研究者が納得するものではなかった。今回の一連の研究で、ドーパミン細胞に興奮性入力を送る主要な起源である脚橋被蓋核のニューロンが報酬期待信号と報酬自体の信号を有していることを見出したことは今後脳による強化学習理論を大きく進展させるものと期待される。

一次視覚野一側性損傷サルのサッケード運動と認知機能に関する研究

大脳皮質一次視覚野損傷患者の一部に見られる「視覚認知と視覚誘導性の行動の乖離」として報告されてきた「盲視(blindsight)」は意識に関して重要な問題を提起している現象であるとして神経科学者のみならず心理学者や哲学者も含めた多くの人々の興味の対象となってきた。しかし盲視の神経機構を明らかにしようとするれば、サルを用いて盲視のモデル動物を作成し、神経活動記録や局所機能ブロック法や脳活動イメージング法などを用いてシステムティックに研究を進める必要がある。これまで一次視覚野を破壊したサルの行動実験はいくつか行なわれてきているが、上記のような実験手法と心理物理学の実験を組み合わせたような研究は行なわれてこなかった。我々のこれまでの研究では、一次視覚野を一側性に破壊したサルにおいて障害視野へ向けたサッケード運動の遂行能力や注意、短期記憶などの認知機能、残存視覚について基本的な行動実験データが蓄積された。今後上記のような様々な実験手法を組み合わせることで、これまで誰もなしえなかった研究が展開できると期待している。

以上のように過去5年間の基盤研究Sによってサポートされた研究によって、局所回路レベル、分子レベル、サルを用いた個体レベルといった様々な階層において世界をリードする、また今後リードできる研究が軌道に乗ってきたと考えている。主要な論文の発表は今後1-2年の間にかなりまとまってできる状況にある。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

(英文原著論文)

1. Endo T, Isa T (2001) Functionally different AMPA-type glutamate receptors in morphologically identified neurons in superficial layer of rat superior colliculus. *Neuroscience*, 108: 129-141.
- ② Kobayashi Y, Inoue Y, Yamamoto M, Isa T, Aizawa H (2002) Contribution of pedunculo-pontine tegmental nucleus neurons to performance of visually guided saccade tasks in monkeys. *Journal of Neurophysiology*, 88:715-731.
3. Endo T, Isa T (2002) Postsynaptic and presynaptic GABA_B receptor-mediated inhibition in rat superficial superior colliculus neurons. *Neuroscience Letters* 322: 126-130.
- ④ Saito Y, Isa T (2003) Local excitatory network and NMDA receptor activation generate a synchronous and non-linear bursting command from the superior colliculus. *Journal of Neuroscience*, 23:5854-5864.
5. Katsuta H, Isa T (2003) Release from GABA_A receptor-mediated inhibition unmasks interlaminar connection within superior colliculus in anesthetized adult rats. *Neuroscience Research*, 46:73-83.
6. Yamashita T, Isa T (2003) Fulfenamic acid sensitive, Ca²⁺-dependent inward current induced by nicotinic acetylcholine receptors in dopamine neurons. *Neuroscience Research*, 46:463-473.
7. Endo T, Yanagawa Y, Obata K, Isa T (2003) Characteristics of GABAergic neurons in the superficial superior colliculus. *Neuroscience Letters*, 346:81-84.
8. Yamashita T, Isa T (2003) Ca²⁺-dependent inward current induced by nicotinic receptor activation depends on Ca²⁺/calmodulin-CaMKII pathway in dopamine neurons. *Neuroscience Research*, 47: 225-232.
9. Saitoh K, Hattori S, Song W-J, Isa T, Takakusaki K (2003) Nigral GABAergic inhibition upon cholinergic neurons in the rat pedunculo-pontine tegmental nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 18: 879-886.
10. Alstermark B, Ogawa J, Isa T (2004) Lack of monosynaptic corticomotoneuronal excitation in the adult rat: fast disynaptic excitation is mediated via reticulospinal neurones and slow polysynaptic excitation via segmental interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 91:1832-1839.
11. Yamashita T, Isa T (2004) Enhancement of excitatory postsynaptic potentials by preceding application of acetylcholine in mesencephalic dopamine neurons. *Neuroscience Research* 49: 91-100.
12. Sakatani T, Isa T (2004) PC-based high-speed video-oculography for measuring rapid eye movements in mice. *Neuroscience Research*, 49:123-131.
13. Tanaka H, Ono K, Shibasaki H, Isa T, Ikenaka K (2004) Conduction properties of identified neural pathways in the central nervous system of mice in vivo. *Neuroscience Research*, 49:113-122.
14. Saitoh K, Isa T, Takakusaki K (2004) Nigral GABAergic inhibition upon mesencephalic dopaminergic cell groups in rats. *European Journal of Neuroscience*, 19:2399-2409.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

15. Sasaki S, Isa T, Pettersson L-G, Alstermark B, Naito K, Yoshimura K, Seki K, Ohki Y (2004) Dexterous finger movements in primate without monosynaptic corticomotoneuronal excitation. *Journal of Neurophysiology*, 92:3142-3147.

16. Saito Y, Isa T (2004) Laminar specific distribution of lateral excitatory connections in the rat superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, 92:3500-3510.

17. Li F, Endo T, Isa T (2004) Presynaptic muscarinic acetylcholine receptors suppress GABAergic synaptic transmission in the intermediate gray layer of mouse superior colliculus. *European Journal of Neuroscience*, 20:2079-2088.

18. Sasaki S, Naito K, Yoshimura K, Isa T, Seki K, Pettersson LG, Alstermark B & Ohki Y (2004) Cortico-motoneuronal system and dexterous finger movements. *Journal of Neurophysiology* 92:3601-3603.

① Watanabe M, Kobayashi Y, Inoue Y, Isa T (2005) Effects of local nicotinic activation of the superior colliculus on saccades in monkeys. *Journal of Neurophysiology*, 93: 519-534.

20. Saito Y, Isa T (2005) Organization of interlaminar interactions in the rat superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, 93:2898-2907.

21. Sooksawat T, Saito Y, Isa T (2005) Electrophysiological and morphological properties of identified crossed tecto-reticular neurons in the rat superior colliculus. *Neuroscience Research*, 52:174-184.

22. Endo T, Yanagawa Y, Obata K, Isa T (2005) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes involved in facilitation of GABAergic inhibition in mouse superficial superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, 94:3893-3902.

23. Isa T, Ohki Y, Seki K, Alstermark B (2006) Properties of propriospinal neurones in the C3-C4 segments mediating disynaptic pyramidal excitation to forelimb motoneurons in the macaque monkey. *Journal of Neurophysiology*, in press.

（英文総説）

1. Isa T, Saito Y (2001) The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. *Neuroscience Research*, (update article) 41: 107-113.

2. Isa T, Sasaki S (2002) Brainstem control of head movements during orienting; organization of the premotor circuits. *Progress in Neurobiology*, 66: 205-241.

3. Alstermark B, Isa T (2002) Premotoneuronal and direct corticomotoneuronal control in the cat and macaque monkey. In "Movement and Sensation" (eds. Gandevia S, Proske U), *Adv Exp Med Biol*. 508:281-297.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

4. Kobayashi Y, Isa T (2002) Sensory-motor gating and cognitive control by the brainstem cholinergic system. *Neural Networks* 15:731-741.
5. Isa T (2002) Intrinsic processing in the mammalian superior colliculus. *Current Opinion in Neurobiology*, 12:668-677.
6. Isa T, Kobayashi Y, Saito Y (2003) Dynamic modulation of signal transmission in the local circuit of mammalian superior colliculus. In "The Superior Colliculus: New Approaches for Studying Sensorimotor Integration." (eds. W.C. Hall & A. K. Moschovakis), CRC Press, pp159-171.
7. Isa T & Kobayashi Y (2004) Switching between cortical and subcortical sensorimotor pathways. In *Progress in Brain Research "Brain Mechanisms for the integration of posture and movement"*. (eds. Mori S, Stuart DG, Wiesendanger M) 143:295-301.
8. Kobayashi Y, Inoue Y & Isa T (2004) Pedunculo-pontine control of visually guided saccades. In *Progress in Brain Research "Brain Mechanisms for the integration of posture and movement"*. (eds. Mori S, Stuart DG, Wiesendanger M) 143:439-445.
9. Isa T, Inoue Y, Kobayashi Y (2004) Cognitive function of the brainstem cholinergic system. In *International Congress Series 1250 "Cognition and Emotion in the Brain"* (eds. Ono t, Matsumoto G, Llinás R, Berthoz A, Norgren R, Nishijo H, Tamura R), pp397-406.
10. Isa T & Sparks D (2005) Microcircuit of the Superior Colliculus: A Neuronal Machine that Determines Timing and Endpoint of Saccadic Eye Movements. Background paper for 93rd Dahlem Workshop on Microcircuits; The interface between Neurons and Global Brain Function, in press.

国際シンポジウムへの招待・講演：

- 2002年12月ワークショップ"Cognitive impact on Sensory Motor Integration"（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）にて講演
- 2004年3月 国際シンポジウム"Multiple disciplinary Approaches to Sensorimotor Integration"（生理学研究所）において講演
- 2004年4月 ドイツ・ベルリン市でのDahlem Workshopに招待・Program Advisory Committeeのメンバーとして参加
- 2004年12月 タイ国神経科学学会で招待講演

海外研究機関での招待講演：

- 2001年5月 スウェーデン王国カロリンスカ医科大学ノーベル研究所で講演
- 2003年6月 フランス・College de Franceで講演
- 2004年11月 米国Duke大学で講演
- 2005年11月 カナダ国Western Ontario大学で講演
- 2005年11月 カナダ国Queens大学で講演
- 2005年12月 米国Wisconsin大学で講演