

令和 2 年 4 月 2 6 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成30年度

受付番号 201860082

氏 名 千歳 雄大

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： サンフランシスコ （国名： アメリカ合衆国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

記憶の想起が初期視覚野に及ぼす影響の局所回路機構の解明

3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 3 日 ～ 令和 2 年 4 月 2 日

4. 受入機関名及び部局名

Department of Physiology, University of California San Francisco, School of Medicine

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

高次大脳新皮質における経験や記憶の情報が感覚野での活動をどのように変えるかについての局所回路レベルでの知見は乏しく、その理解は十分ではない。本研究では記憶の想起が高次視覚野からのフィードバック入力を通じて一次視覚野の活動を修飾する回路機構を解明することが目的である。この目的を達成するために本研究ではまず、(a) 連合記憶を必要とする行動課題の確立を行い、それを基に (b) 想起が一次視覚野の神経活動パターンに及ぼす影響の局所回路レベルでの解析を行う計画であった。またこの局所回路レベルでの解析を行うために、(c) 高密度電極を用いた電気生理学記録の詳細な解析により、一次視覚野での層構造や細胞種の同定を精密に行う手法の開発を行った。連合記憶を必要とする行動課題の確立 (a) に関しては初期の思惑通りに行かずに幾つかの課題の開発を試した。その過程で脳での場所情報表現に関して予想外の結果が見られた。しかしその一方、想起が一次視覚野の神経活動パターンに及ぼす影響の局所回路レベルでの解析 (b) に関しては (a) が思惑通りに行かなかったことより当初の計画通りには遂行できなかった。(c) に関しては一定の成果が得られ、Neuron 誌に 2019 年 2 月に掲載された。

以上を鑑みて、本稿では (1) 連合記憶を必要とする行動課題の確立の試み、(2) 視覚情報が場所情報の表現に及ぼす影響、そして (3) 高密度電気生理記録の解析による一次視覚野層構造・細胞種の同定、の三点に関して記述する。

(1) 連合記憶を必要とする行動課題の確立の試み

視覚情報と他の感覚情報の連合記憶学習をマウスに行わせることにした。課題申請時には、匂いと視覚の連合学習に基づく視覚刺激探索課題の確立を計画していたが、より簡便であると思われた sensory-preconditioning task を用いることにした。

この課題の第一段階ではマウスは聴覚刺激 (トーン) と視覚刺激 (moving grating) の連合学習を行った。具体的には、頭部固定されたマウスに 10 秒間トーンが与えられたすぐ後に 10 秒間一定方向に動く縞模様が視覚刺激提示用のモニターに提示された。この連合学習が 1 週間毎日行われた後に、第二段階ではマウスは視覚刺激と眼への air puff の連合学習が行われた。具体的には頭部固定されたマウスに第一段階で使われた視覚刺激を 1 秒間提示し、その最後の 100 ミリ秒の間に Air Puff が眼球の角膜に向けて発出した。この操作が 1 日 50 回繰り返され、それが 1 週間続けられた。学習の達成は air puff 提示前の eye closure の度合いを指標とした。第二段階の学習の達成後、第三段階では、マウスは聴覚刺激の提示だけが行われ、eye closure の度合いを指標として聴覚刺激—視覚刺激、視覚刺激—air puff の連合により、聴覚刺激—air puff の連合がなされたかを確かめた。この課題では聴覚刺激—視覚刺激の連合学習の際に報酬や罰を用いる必要がないので、想起の純粋な影響を確かめられるのではないかと考えた。最初の実験として第一段階での学習を行っている間に一次視覚野からの高密度電気生理記録を行った。この実験では聴覚刺激と視覚刺激のペアを提示する 10 回に 1 回の割合で聴覚刺激のみの提示、10 回に 1 回の割合で視覚刺激のみの提示を行った。聴覚刺激のみの提示による一次視覚野への影響を解析したところ、活動の全般的な抑制が見られたが、聴覚刺激と連合された視覚刺激をコードする細胞群に関しては特筆すべき活動パターンは見られなかった。

このパラダイムに関してパラメーターの探索や Habituation の改善などを試みたが、この第一段階において電気生理学的に興味深い結果は得られなかった。この理由としては主に 3 つの可能性が考えられる。1 つ目の可能性としては、そもそも一次視覚野においては高次視覚野において見られるような想起に関するシグナルは見られないのではないかと考えることができる。2 つ目の可能性としては、sensory preconditioning task は想起が一次視覚野に及ぼす影響を調べる上で最適なパラダイムではないと考えることができる。これまでの研究では sensory

preconditioning task の第一段階における連合学習は弱く比較的不安定であることが示されている。3つ目の可能性としては、パラメーターの最適化などが十分になされなかったことが考えられる。このような状況で、3つ目の可能性を考えてさらにパラダイムの最適化を模索する選択肢もあったが、その労力と成功確率のバランスを考えて、連合記憶を必要とする行動課題として別の方向性を模索した。その別の方向性として、場所情報と視覚情報の連合に焦点を当てることにした。

マウスが環境を navigate している時に場所情報が脳でコードされていることが知られている。海馬における場所細胞が有名な例であるが、内側嗅内野皮質、視覚野や体性感覚野などでも場所のコードがされていることが示されている。場所というものは視覚や触覚、歩き始めてからの距離など様々な情報が統合されたものである。それゆえ場所情報と視覚情報の連合を基にして、場所情報のみを得られる時に視覚野において視覚情報の“想起”が行われるかということをも明らかにすることを目的とした。より具体的には、直線状の迷路を真っ暗の状態と光のある状態の両方において経験したマウスは、真っ暗の状態でのみ経験したマウスに比べて、この二つの状態での活動パターンの差が小さくなっているかどうかを検証しようとした。両方の状態で経験したマウスは真っ暗の状態のみで経験したマウスに比べてこの二つの状態での活動パターンの差が小さくなっているのではないかという仮説を立てた。

そのために、最初の実験として、直線状の迷路を真っ暗の状態と光のある状態の両方で経験したマウスを用意し、そのマウスの一次視覚野からの慢性電気生理記録実験を行った。その結果、真っ暗の状態と光のある状態でマウスの走る速度などは変わらなかったにも関わらず、一次視覚野ではこの二つの状態での活動パターンは全く違ったものであった。一次視覚野は視覚入力の大きな影響を受けているのでこれ自体は不思議なことではないとも思われたが、興味深いことに真っ暗の状態でも一次視覚野における場所による神経活動の修飾はある程度の安定性をもって確認された。これは、一次視覚野においては明るい状態と真っ暗の状態で異なった場所情報表現が別の脳領域から入力されている可能性を示唆した。そこで、より高次の視覚野である Postrhinal Cortex (POR) からの記録を同じ迷路にて行った。そうしたところ、POR においても明るい状態と真っ暗の状態で全く異なった場所表現が見られた。そしてその場所情報のコードは一次視覚野におけるものよりも安定である傾向が見られた。以上の結果は、初期の仮説を検証するには都合が良いものではなかった。というのも、明るい状態と真っ暗の状態の両方を経験したマウスにおいて、二つの状態で同じような場所情報表現を行う細胞がほとんど見られなかったために、二つの状態を経験したことによる場所と視覚情報の連合の影響の定量が難しいと考えられたからである。

しかしその一方、以上の結果は明るい状態と真っ暗の状態で、脳での場所情報表現が全く違ったものになっているのではないかという可能性を提起した。

(2) 視覚情報の有無が場所情報の表現に及ぼす影響

脳での場所情報表現は視覚情報に大きくよっていることは知られている。例えば、同じ迷路でもその周りにある視覚環境を変えるだけで場所情報表現は大きく変わる。しかしその一方、特に海馬や POR においては神経細胞による場所情報表現は明るい状態と暗い状態で変わらないということも報告されている。このことから、以上で見られた一次視覚野や POR における情報表現が明るい状態と真っ暗の状態と全く異なっているのは、これらの領域がより視覚情報の影響を受けやすいからではないかと考えた。しかし、同じ課題においてより場所情報の表現に“特化した”と考えられる海馬からの記録を行いこのことを確かめようとした。その結果、驚いたことに海馬 CA1 における錐体細胞による情報表現は明るい状態と真っ暗の状態と全く違ったものになっ

た。さらに、迷路の明るさを徐々に暗くしていき海馬での場所情報表現を見た時、非常に薄暗いような状態でも海馬での場所情報表現は保たれたが、真っ暗になった状態では海馬での位置情報のコードは全く違うものになった。このことは、真っ暗な状態では海馬を含め多くの脳領域で場所情報の表現が全く違うものになってしまっていることを示唆する。過去の文献との違いに関しては、2つの理由が考えられる。一つ目の理由としては、過去の文献では真っ暗の状態ではなく、非常に薄暗い状態での実験であった可能性がある。もう一つの理由として、過去の文献では直線状の迷路ではなく、二次元のオープンフィールドを用いているものがあり、その違いが今回の結果の違いにつながっている可能性がある。これらの可能性を探索するために、2次元のオープンフィールドを用いて同じ実験を行うことを考えている。

(3) 高密度電気生理記録の解析による一次視覚野層構造・細胞種の同定

初期の目的を達成するためには、電気生理記録のみの情報からより多くの精密な情報、つまり層構造や細胞種の詳細かつ精密な同定が必要となる。この目的を達成するためのプロジェクトを、上記のプロジェクトとは並行して行った。その結果は幸いにも2019年2月にNeuron誌にて掲載された。以下には英語にてその概要を説明する。

A characteristic feature of the neocortex is its laminar organization. The cortical columnar microcircuitry is viewed as a stack of interconnected yet distinct neuronal networks in which each lamina possesses somewhat unique patterns with different specific inputs, projection targets, and feedback connections. How the laminar structure relates to mesoscopic physiological patterns, such as local field potential (LFP) oscillations and physiological interactions of single neurons across layers, is not well understood. Numerous oscillatory and transient LFP patterns of functional relevance have been described in various neocortical regions. However, their relationship to afferents, intracortical connectivity, and the firing patterns of individual neurons has been largely unexplored.

Using multisite recording silicon probes that span all cortical layers, I sought to characterize layer-specific physiological patterns and neuronal cross-talk between layers in the primary visual cortex (V1) of freely behaving mice. The well-characterized anatomical connectivity and the diverse neuronal types of V1 make this cortical area ideal to investigate how the different cell types in different layers interact during physiological operations, such as sensory processing and offline states, such as sleep. Previous recordings in the hippocampus, using a similar approach, have led to a solid understanding of the relationship between extracellular signals and anatomical connectivity. LFP patterns can identify layers in vivo with $<25\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$ precision and have been used to identify the unique relationship between upstream activity levels and hippocampal spike outputs and relate such input-output transformation to behavior. Similar strategies have been followed in the V1 of waking monkeys and other cortical areas in rodents, mostly under anesthesia. In these previous studies, layer boundaries were estimated mainly by depth criteria, and the relationship among LFP depth profiles, neuronal activity, and interlayer interactions in different behavioral states was not addressed quantitatively.

Our goal was to define layers functionally in V1 of the mouse and relate them to classical anatomical layers. Because spontaneous mesoscopic patterns in the primate V1 are characterized by gamma, alpha, and slow oscillations, I searched for their corresponding patterns in the mouse. Finally, I examined the brain state-dependent spike transmission probabilities among putative principal cells and inhibitory interneurons across cortical layers in waking and sleep to quantify their brain state dependence.

Depth profiles of unit power and sink-source distributions of slow oscillations of non-REM sleep provided consistent physiological landmarks in V1 across animals. I report the following

findings: (1) Coherence and ICA of gamma oscillations (30–100 Hz) and spike-gamma LFP coupling identified six physiological layers and distinguished further sublayers. (2) Firing rates, burstiness, and other physiological features of neurons displayed distinct layer and brain state dependence. (3) Monosynaptic connections, quantified by a spike transmission probability method, revealed highly structured distributions within and across layers. Connection strengths were skewed, with a minority of highly connected hubs. Spike transmission between E-E pairs and E-I pairs from layer 2/3 to layer 5 was stronger during waking compared with non-REM sleep but stronger among deep-layer excitatory neuron pairs during non-REM sleep. (4) The most prominent LFP pattern during waking was a 3–6 Hz rhythm with characteristic phase preferences of spikes across layers. (5) Spiking of a small subset of neurons in deep layers was anticorrelated with all other neurons, and these neurons were most active in the DOWN state of slow oscillations. Our findings link mesoscopic LFPs and single-neuron interactions with multilayered anatomical organization in V1.

In the following I will explain further about the physiological identification of functional layers in the neocortex:

The term “layer” has been used differently in different structures. For example, in the hippocampus, apical and basal dendritic layers are distinguished from somatic layers of the same neurons. In contrast, “layer” in the neocortex traditionally refers to histologically distinct somatic layers. However, a given somatic layer (e.g., layer 2) is also the apical dendritic layer of other neurons (e.g., layer 3 and layer 5 neurons). Afferents from different upstream regions can preferentially target neurons of a given layer or multiple layers. For example, although the highest density of thalamocortical afferents is present in layer 4, collaterals of these axons also innervate both superficial and deep layers, contacting several types of neurons. Nevertheless, afferents from different sources typically segregate on different segments of dendrites. Similarly, inhibitory interneurons of the same class converge on the same neuronal domains, whereas different types converge on distinct somadendritic domains of their targets. In addition, biophysical experiments demonstrate that different segments of pyramidal neurons are electrically isolated, and each functional class of inputs is initially processed in relative independence of the other. Our experiments identified these physiologically distinct layers.

Previous work in the hippocampus has shown that coherence in the gamma frequency range, measured across electrodes in the same layer innervated by the same afferents, is high over long lateral distances, whereas coherence across electrodes placed just 100 μm apart but in different layers is low. Similar segregation by coherence has been described between superficial and deep layers in the V1 of the monkey. I hypothesize that segregation of excitatory and inhibitory inputs on the orderly arranged principal cell populations may be responsible for the observed layer-specific extracellular gamma currents.

Both the gradient-descent algorithm performed on gamma oscillation and ICA identified six strata, which can be regarded as functionally distinct layers. Spike-gamma LFP phase-coupling, in turn, allowed us to relate these physiological layers precisely to the depth distribution of neuronal somata. This additional step effectively separated layer 6 neurons into deep and superficial groups and divided layer 5 neurons into three subgroups. By depth criteria, two of these three groups may be classified as layer 5A (cortico-cortical with thin apical dendrites) and 5B (cortical-subcortical with thick apical dendrites) neurons, respectively. Our third, most superficial group may represent a transitional form between layer 4 and layer 5 neurons. Our clustering method also identified two groups in layers 2/3, possibly corresponding to layer 2 and layer 3 neurons. Our physiology-based classification of principal neurons will require confirmation by future optogenetic experiments using available genetic markers of layer and sublayer-specific pyramidal neurons. Overall, our findings demonstrate that physiological properties of neurons, especially their relationship to gamma LFP, can be exploited to relate them to classical anatomy-based layer segregation. In turn, the spiking activity of the classified groups can be examined for their contribution to brain state-dependent collective network patterns.