

# 脳皮質機能構造研究チーム

## Laboratory for Cortical Organization and Systematics

チームリーダー ROCKLAND, Kathleen S.

システム論に基づいた解剖学的アプローチは、大脳皮質領域間の関連を調べる数少ない方法の1つである。過去数十年に渡り、おおまかな“wiring diagram”（何と何が結合しているか）に関する知見には著しい進展が見られた。それにより複雑な行動にはどのような神経構造が関与するかについてのアイデアが提出され、またさらに解像度のあがった微小回路の研究の礎が得られた。当研究チームは下側頭葉連合皮質に焦点をあて、細胞およびネットワークレベルにおける機能的アーキテクチャーの領域特異性、トレンド的特長を研究する。メインのトピックスは領域内外結合、そしてそれらがモジュール構造、層構造および細胞タイプに関連しているか調べることである。当研究チームはサルに力点をおいているが、系統発生的な特長を調べるために、齧歯類も並行して研究している。

昨年度、我々は昨年版の研究年報で報告した3つのラインの研究を継続した。すなわち、側頭皮質、モジュール構造と分子的アーキテクチャーである。さらに本年度は、2つの顕著な変化が起こった。聴覚皮質の機能構造プロジェクトは、その研究を担当していた小島が、他の研究機関に移り、そこでそれを継続することとなり、当研究チームでは終了した。局所回路研究パートはいくつかの重要な進捗がみられ、活発に発展しつつある。

すべてのプロジェクトは来年度へも継続される予定である。さらにその上、(1) 齧歯類における扁桃体皮質投射の機能的アクセスシステムとしての実験的パラダイムの確立が行われる予定であり、(2) 側頭皮質の局所回路解析のためのサルへのウィルスベクターの注入が行われる予定であり、(3) 齧歯類における発生学的研究が行われる予定である。これらは、preliminary な短期的重鉛発現データの発展である。

### 1. 側頭皮質

(1) 領域内結合 (Rockland; 谷川, 谷藤 (BSI 脳統合機能研究チーム))

下側頭皮質 (TE 領野) において、視覚物体刺激により活性化される神経細胞集団ないしモジュール間の相互結合を調べる。内因性信号の光学的イメージング法を用いてモジュールを同定 (BSI 脳統合機能研究チームの報告を参照) 後、トレーサーを微量注入する。単一軸索を解析 (6例) すると、分枝の広がり直径 400 から 700  $\mu\text{m}$  あり、この大きさは光学的記録したスポットの大きさと一致する。ピオチン化デキストランアミン (BDA) の注入部位に由来する終末分枝は、同一刺激により共に活性化される2つのスポットに対応する部位に達した。このことは一次視覚野での匹敵する実験、即ち機能的に類似する細胞群は相互結合する (“like-to-like”), に一部基づく作業仮説に一致する。しかし再構築した6本の軸索の内3本は、複数の分枝を持ち、これらは活性化スポットを超えて分布した。“like-to-like” 的な結合とは異なる性質を持つこのような結合は、終末パッチのレベルでの解析によって確認されている。視覚刺激の様々なレベルの複雑さに関連した領域内線維結合が存在するという仮説をもとに、谷川・谷藤両博士は種々の異なった刺激セットを試している。この結果に基づき、トレーサー注入実験を組み合わせる予定である。

(2) 領域外結合 (鐘, 靱負, 宮下, Rockland)

TE 領野は通常腹側視覚経路の最終ステージとみなされているが、その結合プロフィールは複雑である。初期段階の視覚領野からの結合に加えて、TE 領域は上側頭回, TF 領

野および前頭前野にある部位からの結合を含む。前中側頭溝周囲の領域は下頭頂小葉の中部から幾らかの結合を受ける。腹側の垂区分 (TEav) および隣接する周嗅皮質は海馬 CA1 との結合を持つ。我々は CA1 に順行性のトレーサーを注入してこの領域への結合を継続して調べている。これにより初めて単一の海馬-皮質軸索の大きさと形状を解析できるようになる。これによりモデル研究および皮質-皮質間結合の比較のための有益なパラメーターを見いだせる可能性がある。

もう1つの側頭葉への重要な入力扁桃体である。ファーストステップとして、我々は単一アクソン解析を行い、他の入力との比較しノーマルのベースラインの確立をしつつある。現在の所、我々は扁桃体・側頭葉結合を機能的回路を調べる手法とみなしている。少なくとも齧歯類では GFP を発現するトランスジェニックマウスにおいて扁桃体・皮質投射を簡単に可視化することができ、この結合は、恐怖条件付けのような実験的パラダイムにより、マニピュレートできると考えられる。この系を用いて我々はマニピュレートの結果としてのシナプス終末、シナプスを受容するスパインおよび関連ファクターの変化を解析可能と考えている。

(3) 視床枕皮質領域外結合 (井村, Rockland)

従来の研究において側頭皮質領野と視床枕との間には密な双方向性の結合が報告されている。しかし視床枕皮質 (PC) 結合はどのように皮質結合と関連するか、あるいはさらには PC 結合がモジュール構造として投射するかに関してほとんど知られていない。これらの疑問点に答えるため、我々は視床枕核の垂区分に BDA の注入を開始した。予備的な

結果から、PC結合は1と3層に層分布することを確認し、またこのことは2個の異なるサブシステムがあることを示唆している。我々は3層に終止する軸索は生理学的に同定したコラムと同一のサイズの広がりを持つ分枝を複数投射すると予想している。しかし1層に終止する軸索は複数のコラムを貫いて分布すると推定している。我々は初期視覚野同様に、1層と3層の両方に終止する第3の集団があるかどうかを引き続き調べている。我々は、1層への視床からの入力線維と他の1層への投射入力を比較した。比較対象は扁桃体入力と視覚関連皮質からの入力である。これらはすべて遠位の尖頭樹状突起につくと考えられるが、どのニューロンへの入力なのか？ どのような分布をしめすのか？ それを確認する必要がある。我々はアデノウイルスを用いた逆行性のトレーサの注入により後シナプスニューロンを可視化する計画を立てている。

#### (4) 化学構築的特徴 (一戸, Rockland)

様々な種類の領域を超えた傾向がしばしば報告されている。例えばカルビンディン陽性錐体細胞は一次視覚野からTE野へ向かいその密度が増加し、また錐体細胞の樹状突起は高次領域においてその密度を増す。我々はzincに富みパルプアルブミン免疫陽性(PV-ir)の軸索終末が、いくつかの領域で異なる密度に分布することを見いだしている。TE-周嗅皮質-ECにかけては、これら2種の物質は逆方向の勾配を示す。我々はこれら特徴を相関づけ、またzinc(活動依存性の、可塑性関連の神経モジュレーター)の機能的な特性を探ることによりこれら皮質領域を特徴付けようとしている。

#### 2. モジュール構築と亜鉛陽性結合 (一戸, Rokland)

皮質コラムはしばしば軟膜から白質におよぶ均一な小領域としてみなされているが、高度に特殊化している一次視覚野においてさえ、スケールが異なりまた層が異なることから、複数のマップの存在が示されている。このことに注目して最近再調査をしたところ、1層と2層の境界にスケールの小さいモジュール構築を我々は見いだした。このモジュール構築は視床皮質投射と皮質および扁桃体由来と思われる亜鉛陽性入力の入れ子状のパッチからなる。もっともよく調べられているラットの一次視覚野においては、パルプアルブミン陽性の抑制性の終末が亜鉛陽性パッチと重なるパッチを作る。さらなるコンポーネントとしては2つに分けられるアピカルデンドライトの群である。2層の錐体細胞の樹状突起はパルプアルブミンと亜鉛のパッチと共存し、視床皮質パッチは深層からの樹状突起と共存する。興味深いことに、このモジュール構築はステレオタイプではなく、領域特異性がある。たとえば、サルでは亜鉛のモジュール構築は辺縁皮質および運動皮質において一次および初期視覚野で強いことが分かった。

モジュール構築形成メカニズムへの理解への第1歩として、我々はラットの顆粒性脳梁膨大後皮質の1層にある樹状突起束の発生学的研究を行った。ラットのこの領域の樹状突起束とモジュール構築は有用なモデルと思われる。理由としては、モジュール構築の顕著さとイメージングテクニックにより可視化可能な領域であるからである。この研究のフォローアップとして皮質構築に障害のあるミュータント齧歯類(Shaker rat および reeler mouse)のモジュール

構造と樹状突起の集合との関連を調べている。この研究においてはGFPを選択的に発現するトランスジェニックマウスも用いている。

さらに亜鉛陽性終末の働きの理解への第1歩として、我々は亜鉛陽性ニューロンを選択的に可視化しうる逆行性のトレーサを皮質に注入して研究している。標識細胞は扁桃体、そして一部の皮質投射ニューロンに見いだされる。皮質標識ニューロンは主として2, 6層に見られ、領域特異的に3層浅層, 5層にも見られる。このパターンはフィードバック投射ニューロンのパターンに一致する。我々はこれらのサブセットのニューロンの研究を継続し、さらに亜鉛陽性ニューロンの特性を検討する。

我々はさらに亜鉛陽性投射の機的重要性も検討する。シナプスのターゲットはなにか？ いかんにかはシナプス後膜にあるレセプターにニューロモジュレーターとして働きえるのか？ たとえば、周嗅皮質においては亜鉛陽性終末と $\mu$ -opioid receptorが高く、なんらかの特異的相互作用が考えられる。

#### 3. 分子構築 (宮下, Rockland)

領域、層、細胞特異的遺伝子発現は皮質構築を研究するための有望な新しい手法である。このようなデータ解析は領域および動物種間での比較を標準化する際に役立つと思われる。このアプローチはまた機能動態を可視化する1つの方法となる可能性がある(極初期遺伝子によりある程度すでに可能であるように)。

当研究チームでの予備的な研究では、Netrin-G1およびG2のサル相同体に焦点をあわせた。これら2種類の遺伝子は仲柴と同僚(2000)により同定され、胚期および新生仔期のマウス脳で相補的な様式で発現されるNetrin-G1は視床皮質(TC)でNetrin-G2は皮質皮質間結合で発現。BSI内の他の研究チームはマウスのミュータント(糸原重美博士)とヒト遺伝学(吉川武男博士)に関連してこれらの遺伝子を調べていて、それゆえ経験と討論を容易に得ることが可能である。

サルでの*in situ*ハイブリダイゼーションによる初期スクリーニングではマウスでの相補性と同様な分離が示唆された。一部の皮質領域はNetrin-G1とG2の両方を発現していたが、たとえば、一次視覚野と内嗅皮質ともに層が異なっていた。これら類似分子が異なる層でどのように利用されるのかを探ろうとしている。さらに、Netrin-G1とパルプアルブミンに対する2重染色を視床にて行うと、相補的なパターンと重複発現のパターンが認められた。このような視床核また小領域特異的なサブポピュレーションをTC結合の観点から、さらに探索しようとしている。

PKC $\gamma$ は顕著な領域特異的層特異的発現をしめす遺伝子である。一次皮質において、PKC $\gamma$ は2, 6層の抑制性のニューロンに発現する。しかし、連合皮質においては、発現は錐体細胞にシフトする。この結果は、一次皮質の別な機能的特異性を示唆する。

我々は層特異的マーカーに対する*in situ*ハイブリダイゼーションと組み合わせ、逆行性に標識されたポピュレーションの分布を調べようとしている。これは部分的に皮質結合構築の再評価的色彩を持つ(基礎生物学研究所 山森哲雄博士らとの共同研究)。

#### 4. 局所回路 (福岡, Rockland)

海馬における数十年の研究は、シナプス前・後構造の定量的データを提出し、結果として統合的原理、たとえば入力層分離、が得られた。それに比して、大脳皮質に関して(とりわけ連合皮質)の情報はほとんどない。これは部分的に大脳皮質の本来の複雑さに由来すると同時に、技術的困難さの存在がある。基本的要請としてはシナプス後要素である神経細胞と同時に2, 3種のシナプス前性入力を可視化・ラベルすることであるが、これは困難であるとされてきた。

齧歯類において、近年、同時可視化の手法が発達して来ている。ウイルスベクターを用いて、神経細胞をラベルし、同時に別のウイルスベクターまたは順行性のトレーサーを用いシナプス前性入力をラベルするというものである。我々は現在、ラットで神経要素と PSD-95 のように機能的に有用な分子をラベルする種々のアデノウイルス、レンチウイルスベクターを開発中である。このシステムは直接的に以下のような疑問に答えを与えるであろう。あるニューロンにおける興奮性シナプスの総数、さらには層別、領域別、入力特異的マーカーとの関係についてシナプス数の定量化。ある特定の入力の分布および比率の定量化。本手法を用いて、すでに解剖学的、生理学的データがあり、同様の構造がサルで同定しうるラットの周嗅皮質において解析を行う。

#### 5. 定量的ボタンの解析 (鐘, Potapov, Rockland)

いまや形態的に可変的な樹状突起スパインへの興味が増している。同様の問題はシナプス前性のボタンにおいても検討されている。この研究課題では、順行性に標識された V2 から V1 (n = 10), V4 から V1 (n = 10), V4 から V2 (n = 10) および TEO から V1 (n = 10) にフィードバック投射する軸索の長さ 600  $\mu\text{m}$  以上のセグメントを NeuroLucida ファイルに貯えた。フィードバック結合はそれらの形態が視床皮質および皮質皮質結合の分枝より単純であることから、近位-遠位の軸索部分が判定しやすいゆえに選ばれた。ボタン数とボタン間平均間隔は NeuroExplorer と Excel ソフトウェアを用いて得た。主たる結果として、近位から遠位部に移行するにつれて、フィードバック結合のセグメントはボタン密度が増加する傾向を示した。これは小脳の平行線維とは逆である。ちなみに平行線維ではボタン間間隔の増加は遠位端でみとめられ、恐らく分岐ポイントから離れたプルキンエ細胞上の接合部位での弱いシナプス作用と相関すると推定される。近年、“ポテンシャル・シナプス”とランダム・ノンランダム結合に関する、少なくとも3つの論文が現れた。我々は、コンフォーカル顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、この“ポテンシャル・シナプス”とシナプス前要素・後要素近接の関係を確認しつつ、シナプス前要素の構築の検討を続けていく予定である。

Inferotemporal (IT) cortex is an interesting and potentially powerful model for association cortical organization and anatomical substrates of higher functions. IT cortex comprises several areas, including area TE, a unimodal visual area, and perirhinal cortex, a polymodal area closely linked to the hippocampus. This laboratory focuses on area-specific and trendwise features of the functional ar-

chitectures at both the cellular and network level. We are using a battery of techniques to identify presynaptic inputs concurrently with postsynaptic targets in order to identify area-specific features that might be associated with functional specializations. Neuromodulators, such as synaptic zinc, are also of interest. Emphasis is on the monkey cortex, with parallel studies in rodents in order to investigate phylogenetic specializations.

#### Research Subjects

1. Intrinsic and extrinsic connectivity of temporal cortex
2. Modular organization and zinc-positive connections
3. Molecular architectures of association cortex
4. Microcircuitry of association cortex

#### Staff

##### Laboratory Head

Dr. Kathleen S. ROCKLAND

##### Deputy Laboratory Head

Dr. Hisayuki OJIMA (Up to December, 2004)

##### Research Scientists

Dr. Noritaka ICHINOHE

Dr. Kosuke IMURA

Mr. Toshio MIYASHITA

Dr. Yong-Mei ZHONG (Up to October, 2004)

##### Technical Staff

Ms. Yoshiko ABE

Ms. Hiroko KATSUNO

Mr. Adrian KNIGHT

Ms. Hiromi MASHIKO

Mr. Daniel POTAPOV

Mr. Ryohei TOMIOKA

##### Assistants

Ms. Michiko FUJISAWA

##### RIKEN/BSI Collaborators

Dr. Walther AKEMANN (Lab. Neuronal Circ. Dyn., BSI)

Dr. Tsutomu HASHIKAWA (Lab. Neural Archit., BSI)

Dr. Toshihiko HOSOYA (Hosoya Res. Unit, BSI)

Dr. Shigeyoshi ITOHARA (Lab. Behav. Genet.)

Dr. Thomas KNOPFEL (Lab. Neuronal Circ. Dyn.)

Dr. Katsuhiko MIKOSHIBA (Lab. Dev. Neurobiol.)

Dr. Masaharu OGAWA (Lab. Cell Cult. Dev.)

Dr. Toshio OOSHIMA (Lab. Dev. Neurobiol.)

Dr. Manabu TANIFUJI (Lab. Integr. Neural Syst.)

Dr. Hisashi TANIGAWA (Lab. Integr. Neural Syst.)

Dr. Yoshihiro YOSHIHARA (Lab. Neurobiol. Synapse)

## Outside Collaborators

Dr. Toshio TERASHIMA (Kobe Univ.)  
Dr. Tetsuo YAMAMORI (Natl. Inst. Physiol. Sci.)  
Dr. Masao YUKIE (Tokyo Metrop. Inst. Neurosci.)

## Visiting Scientists

Dr. Neus MIRO-BERNIE (Univ. Barcelona, Spain)  
Dr. Jeus PEREZ-CLAUSELL (Univ. Barcelona, Spain)  
Dr. Masaaki TAKAYANAGI (Toho Univ.)

---

## 誌 上 発 表 Publications

### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

- Rockland K. S.: “Connectional neuroanatomy: the changing scene”, *Brain Res.* **1000**, 60–63 (2004). \*
- Ichinohe N. and Rockland K. S.: “Region specific micro-modularity in the uppermost layers in primate cerebral cortex”, *Cereb. Cortex* **14**, 1173–1184 (2004). \*
- Miyashita T., Yeo S., Hirate Y., Segawa H., Wada H., Little M. H., Yamada T., Takahashi N., and Okamoto H.: “PlexinA4 is necessary as a downstream target of Islet2 to mediate Slit signaling for promotion of sensory axon branching”, *Development* **131**, 3705–3715 (2004). \*
- Zhong Y. and Rockland K. S.: “Connections between the anterior inferotemporal cortex (area TE) and CA1 of the hippocampus in monkey”, *Exp. Brain Res.* **155**, 311–319 (2004). \*
- Sillitoe R. V., Malz C. R., Rockland K. S., and Hawkes R.: “Antigenic compartmentation of the primate and tree shrew cerebellum: a common topography of zebrin II in *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri*”, *J. Anat.* **204**, 257–269 (2004). \*
- Akemann W., Zhong Y., Ichinohe N., Rockland K. S., and Knöpfel T.: “Transgenic mice expressing a fluorescent in vivo label in a distinct subpopulation of neocortical layer 5 pyramidal cells”, *J. Comp. Neurol.* **480**, 72–88 (2004). \*
- Yeo S., Miyashita T., Fricke C., Little M. H., Yamada T., Kuwada J. Y., Huh T., Chien C., and Okamoto H.: “Involvement of Islet-2 in the Slit signaling for axonal branching and defasciculation of the sensory neurons in embryonic zebrafish”, *Mech. Dev.* **121**, 315–324 (2004). \*
- Tomiyama M., Mori F., Kimura T., Ichinohe N., Wakabayashi K., Matsunaga M., and Baba M.: “Hypertrophy of medial globus pallidus and substantia nigra reticulata in 6-hydroxydopamine-lesioned rats treated with L-DOPA: Implication for L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson’s disease”, *Neuropathology* **24**, 290–295 (2004). \*
- Ojima H. and Takayanagi M.: “Cortical convergence from different frequency domains in the cat primary auditory cortex”, *Neuroscience* **126**, 203–212 (2004). \*

- Ichinohe N., Watakabe A., Miyashita T., Yamamori T., Hashikawa T., and Rockland K. S.: “A voltage-gated potassium channel, Kv3.1b, is expressed by a subpopulation of large pyramidal neurons in layer 5 of the macaque monkey cortex”, *Neuroscience* **129**, 179–185 (2004). \*
- Zhong Y., Yukie M., and Rockland K. S.: “Direct projections from CA1 to the superior temporal sulcus in the monkey, revealed by single axon analysis”, *Brain Res.* **1035**, 211–214 (2005). \*
- Aizawa H., Bianco I. H., Hamaoka T., Miyashita T., Uemura O., Concha M. L., Russell C., Wilson S. W., and Okamoto H.: “Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus”, *Curr. Biol.* **15**, 238–243 (2005). \*
- (総説)
- Rockland K. S. and Ichinohe N.: “Some thoughts on cortical minicolumns”, *Exp. Brain Res.* **158**, 265–277 (2004).

## 口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Ichinohe N. and Rockland K. S.: “Distribution of vesicular zinc in the monkey amygdala”, 4th Forum of European Neuroscience (FENS Forum 2004), Lisbon, Portugal, July (2004).
- Miyashita T. and Rockland K. S.: “Cajal-Retzius neurons in adult monkey cerebral cortex”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).
- Imura K. and Rockland K. S.: “Long distance intrathalamic connections within the primate medial pulvinar”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).
- Ichinohe N., Ogawa M., Ohshima T., Terashima T., Knight A. E., Yoshihara Y., Mikoshiba K., and Rockland K. S.: “Patch-matrix organization in the retrosplenial cortex of the reeler mouse and Shaking Rat Kawasaki”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).
- Ojima H., Takayanagi M., Potapov D. O., and Rockland K. S.: “Relationships between activation zones revealed optically and anatomical axonal projections in the cat auditory cortex”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).
- Ojima H.: “Tonotopy in the auditory cortex of the cat and monkey”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).
- Rockland K. S. and Ichinohe N.: “Zinc-enriched cortical modularity and projection system”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).
- Ojima H., Takayanagi M., and Potapov D. O.: “Isosfrequency band - like zones revealed by optical imaging of intrinsic signals in the cat primary auditory cortex”,

- 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).
- Tanigawa H., Rockland K. S., and Tanifuji M.: “Relationship between horizontal connections and functional structure revealed by intrinsic signal imaging, unit recording, and anatomical tracing in macaque anterior inferotemporal cortex (area TE)”, 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).
- Akemann W., Zhong Y., Ichinohe N., Rockland K. S., and Knöpfel T.: “Transgenic mice expressing a fluorescent *in vivo* label in a distinct subpopulation of neocortical layer 5 pyramidal cells”, 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).
- Akemann W., Zhong Y., Ichinohe N., Rockland K. S., and Knöpfel T.: “Transgenic mice expressing a fluorescent *in vivo* label in a distinct subpopulation of neocortical layer 5 pyramidal cells”, Shanghai International Conference on Physiological Biophysics (Shanghai ICPB'04), (Shanghai Society of Biophysics), Shanghai, China, Nov. (2004).  
(国内会議)
- 小島久幸: “聴覚皮質での周波数構築のイメージと形態学”, 日本解剖学会第 14 回関東支部学術集会懇話会シンポジウム「神経科学の展開」, 東京, 6 月 (2004).
- 井村幸介: “Intra-pulvinar long distance intrinsic connections”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 一戸紀孝, Rockland K. S.: “Vesicular zinc distribution in the monkey amygdaloid complex”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 宮下俊雄, 西村幸子, 糸原重美, Rockland K. S.: “Gene expression analysis of Netrin-Gs in adult monkey brain”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).