

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06313

研究課題名（和文）認知・運動における多領域脳情報動態の光学的計測と制御

研究課題名（英文）Optical Measurement and Control of Multiareal Brain Information Dynamics in Cognition and Movement

研究代表者

喜多村 和郎（KITAMURA, Kazuo）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60423159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 116,400,000円

研究成果の概要（和文）：大脳と小脳は、様々な神経核を介して連携してはたらくことで、運動制御や運動学習を実現している。また、大脳-小脳連関は高次機能にも重要な働きをしている。これらの神経回路メカニズムを明らかにするため、認知運動課題を実行中のマウスにおいて2光子イメージングを用いた神経活動観察を行い、感覚や運動、報酬に関わる情報表現を明らかにした。また、これまでにない精度で神経活動を計測できるカルシウムセンサーやデータ解析法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小脳は運動に関わる脳領域として長年研究が進められてきたが、その詳細な神経回路メカニズムについては未だ不明な点が多い。さらに、最近では報酬や判断など運動とは直接関係ない情報が小脳にも伝えられていることが明らかとなって注目を集めている。本研究では、これらの情報表現がどのようなものかを認知運動課題を実行中のマウスにおいて明らかにした。素早く正確な運動や判断を実現するための脳メカニズムとその獲得原理の解明に貢献する。

研究成果の概要（英文）：The cerebrum and cerebellum communicate each other to achieve sophisticated motor control and motor learning. The cerebro-cerebellar loop also plays an important role in higher-order functions. To elucidate neural circuit mechanisms for these functions, we used two-photon imaging to observe neural activity in mice performing cognitive-motor tasks, and revealed the neural representations regarding sensation, movement, and reward. We also developed novel calcium sensors that can measure neural activity with unprecedented accuracy and a data analysis method.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経科学 大脳小脳 運動 学習 2光子イメージング

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

大脳と小脳は、様々な神経核を介して連携してはたらくことで、内部モデル獲得による運動制御や運動記憶を実現している。小脳は機能と構造の関係を調べるのに適した高度にモジュール化された構造を有し、大脳との関係もよく研究されている。大脳-小脳連関が円滑な運動の実現と運動学習に極めて重要なはたらきをしていることはよく知られており、実験結果を基にした神経回路モデルについてもすでに多くの研究がなされている。しかしながら、古典的な単一細胞記録や形態学の結果を基にした理解では、大脳-小脳間の連関動態の結果として実現される運動表出および運動学習メカニズムを完全に描出することはできていない。さらに、高次機能における小脳の役割については、それを示唆する研究は数多くあるものの、その機能を回路レベルで明らかにした例は皆無である。

## 2. 研究の目的

多脳領野間の情報動態によって創発される現象を解明するモデルとして、モジュール構造が明確な小脳と大脳の連関に着目し、大脳-小脳モジュール内およびモジュール間における情報動態が、認知行動における創発現象(内部モデルの形成とそれによる司令の生成)を実現するメカニズムを解明することを目的とする。そのために、(1)大脳-小脳間の機能的結合の網羅的なマッピング、(2)大脳-小脳連関における情報動態の解明、(3)大脳-小脳間の連関による内部モデル獲得機構、高次脳機能の情報動態の解明、に取り組む。これまでの脳科学における基本概念である脳機能局在論から脱却し、脳機能が多領野間の動的な連関により生み出されることを細胞レベルで証明するために、本計画研究では、多領野間の活動連関や広範囲の活性化アンサンブルを可視化する方法を確立する。これらの方法を用いて得られる結果を、神経解剖学や数理モデル解析と組み合わせることで、最終的に、運動や高次機能に関する情報が、大脳-小脳間でどのように転送・変換・統合され、内部モデルとして貯蔵されるのかを明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

(1)大脳-小脳間結合の機能マッピング：大脳皮質ニューロンにチャンネルロドプシンを発現する **Thy1-ChR2** マウスにおいて、小脳プルキンエ細胞からスパイク記録を行いながら、大脳皮質をレーザーにより刺激する。光刺激に対して誘発されるプルキンエ細胞の単純スパイク発生を苔状線維入力、複雑スパイクを登上線維入力として、大脳の様々な領域から小脳へどのような経路で入力があるかを網羅的に調べる。

(2)大脳-小脳連関における情報動態の解析：認知運動課題実行中のマウスにおいて、大脳や小脳から 2 光子イメージングにより神経活動を記録し、運動や課題、報酬に関する神経情報表現を明らかにする。このために、頭部固定マウスによる **Go/No-go** 課題、レバー引き運動課題を確立する。また、ニューロン活動を 2 光子イメージングで高感度かつ高速に捉えることのできるカルシウムセンサーやカルシウムイメージングの解析法を新たに開発し、大脳-小脳連関の情報動態解析に資する。

(3)大脳-小脳連関による内部モデル獲得機構、高次脳機能の情報動態の解明：(2)で開発した方法を用い、大脳や小脳において、運動情報や非運動情報の神経表現が学習に伴ってどのように変化するかを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1)大脳-小脳間結合の機能マッピング

高次運動野 (**M2**)、運動野 (**M1**)、体性感覚野 (**S1**) を含む **Thy1-ChR2** マウス大脳皮質背側面の広い領域に、ガルバノミラーにより青色レーザーを照射して刺激を行ったところ、小脳虫部第 1 ~ 小葉および半球第 1 ~ 小葉の広い範囲に渡ってプルキンエ細胞の単純スパイクと複雑スパイクが誘発された。これらのスパイクのマップは、小葉ごとに特徴的な大脳入力マップが形成されていることを示していた。運動系、感覚系、高次機能系など機能別に分かれていることが明らかとなり、感覚運動系は主に反対側から、高次機能系は両側から入力を受けていた。また、登上線維および苔状線維を介した入力の多くはオーバーラップしていた。しかし個々の細胞レベルで見ると同じ小脳領域でも対側入力優位な細胞と同側入力優位な細胞が混在していることに加え、刺激に対する応答の潜時も異なることから様々な経路を介した入力が存在しており、組織学的な検討から推定されている単純化された結合スキーマよりも複雑な結合様式を示唆する (**Choo et al., in prep**)。

### (2)大脳-小脳連関における情報動態の解析

#### ① **Go/No-go** 課題を実行中のマウス小脳における情報表現

小脳の運動機能および非運動機能について、大脳との連関を明らかにするために、音弁別 **Lick/No-lick** 課題を行っているマウス小脳における情報表現を調べた。この課題は、手がかり音の高低によって **Go** か **No-go** かを判断して、給水口を舐めると水報酬が得られるという課題で、感覚や運動だけでなく、判断や報酬といった非運動機能を含んでいるため、小脳の多様な機能を調べるのに適している。また、全ての被検体マウスは 1 週間以内にこの課題を学習して熟練レベルに達し、課題成績とともに運動開始タイミングの精度や運動速度が向上した。

課題を十分に学習したマウス小脳での情報表現を明らかにするために、2 光子イメージングを行った。カルシウムセンサーを小脳プルキンエ細胞に発現し、その活動を観察する。プルキンエ細胞で観察されるカルシウム活動は、複雑スパイクによる細胞内カルシウム上昇であることがわかっており (Kitamura and Häusser, 2011) この方法によって登上線維入力による情報を調べることができる。小脳の機能モジュールであるゾーン構造ごとの機能を調べるために、この実験には以前の研究で開発した、ゾーンを蛍光で確認できるマウス (**Aldoc-tdTomato** マウス、**Tsutsumi et al., 2015**) を用いた。マウスの舐め運動に関連しかつ大脳小脳ループに含まれる小脳半球第 脚を対象としてイメージングを行った。まず、行動中のマウスにおいて各ゾーンが機能単位となっているかどうかを確認するためにゾーンの境界において 2 光子イメージングを行ったところ、ゾーンごとに明確に異なる反応パターンが見られたことから、各ゾーンにおける複雑スパイクが課題実行中のマウス行動に関する異なる情報を表現すると考えられた。各ゾーンにおける複雑スパイクが行動の何をどのように表現しているのかをより詳細に明らかにするために、各ゾーンにおけるプルキンエ細胞集団の複雑スパイク活動を運動パラメーターや試行 (**Go or No-go**)、報酬を説明変数とした線形モデルで調べた。その結果、内側のより感覚運動機能に関わるゾーンでは、主に運動の準備や実行、開始時間、速度などの運動パラメーターを表現し、大脳-小脳ループを形成している外側部のゾーンにおいては、**Go/No-go** シグナルや報酬といった非運動情報も表現されていることが明らかとなった。また、ゾーンごとに表現する情報の内容は異なっているが、それぞれのゾーンは単一の情報を表現しているわけではなく、複数の情報の組み合わせでその活動が説明されることがわかった (**Tsutsumi et al., 2019**)。

## ②個々の登上線維入力の情報表現

上記①の研究によって、ゾーンごとに異なる情報の組み合わせを登上線維入力として受け取っていることが明らかとなったが、個々の細胞に異なる情報が入力されているのか、あるいは、細胞ごとに入力する情報は単一のタイプであるのかは不明であった。そこで、行動中のマウスにおいて個々のプルキンエ細胞の複雑スパイク活動が表現する情報を解析した。①の舐め運動は、熟達すると毎試行ほぼ同一の運動となり、試行ごとのばらつきが少なく、低頻度かつ自発活動がある単一細胞の複雑スパイク活動を説明する変数としては不十分であったため、この実験にはより試行ごとのばらつきが大きい、前肢によるレバー引き運動課題を用いた。課題実行中のマウスにおいて、前肢運動に関わる小脳虫部第 1 葉のプルキンエ細胞活動の 2 光子イメージングを行い、各プルキンエ細胞の複雑スパイク活動をレバー位置、レバー速度、舐め運動、報酬を説明変数とした線形モデルで近似して調べた。その結果、半数以上のプルキンエ細胞の複雑スパイクは主にレバー引き運動によって説明されることが示された。しかし、驚いたことに、大多数のプルキンエ細胞の複雑スパイクでは、レバー引き運動だけではなく、舐め運動や報酬といった異なる情報も含んでいることが明らかとなった。また、クラスタリングにより反応タイプを分類した結果、プルキンエ細胞はいくつかの特徴的な反応パターンを示す細胞群に分けられること、同じ反応タイプを示す細胞は空間的に近接していることがわかった。さらに、それぞれのクラスタはノイズ相関から決定したクラスタと高い割合で一致し、小脳のマイクロゾーン・マイクロコンプレックス仮説を支持した (**Ikezoe, Hidaka et al., in revision**)。これまでの小脳制御理論、小脳学習理論では誤差シグナルを伝えるとされてきた登上線維が、前肢や舌など複数の運動情報に加えて、報酬といった非運動情報を同じ軸索を通して伝えていることが明らかとなった。本研究で明らかとなった、登上線維の新たな情報伝送方式の役割について、今後、実験と理論、モデル計算など多角的に検討を進めていく。

## ③脳情報動態の高品質計測に資する技術の開発

ある脳領域内の情報動態や多領域間の情報転送を、1 細胞レベルで多色高感度かつ高速に計測することが可能な新規カルシウムセンサー **XCaMP** の性能評価を行った (**Inoue, Takeuchi, Manita et al., 2019**)。まず、大脳皮質スライス標本において錐体細胞に **XCaMP** を発現させ、スパイクとカルシウムシグナルの関係を調べた。1 発のスパイクに対して、**XCaMP** は従来の **GCaMP6** と比較して **S/N** 比で 2~3 倍の蛍光変化を示した。特筆すべきは、**XCaMP** の蛍光変化の立ち上がり時間であり、**GCaMP6f** と比べて 10 倍以上速かった。実際、**XCaMP** を用いることで **80~100Hz** の連続スパイクを単一試行で検出することが可能であった。さらに、**in vivo** で 2 光子イメージングとスパイク記録の同時計測を行って性能を評価し、脳スライスと同等の結果を得た。また、カルシウムイメージングから得た神経活動がスパイク記録と一致するかどうかを検定した結果、**XCaMP** は **GCaMP** と比べて有意に高い一致を示した。**XCaMP** の高速性の利点を示すため、**fast-spiking interneuron** であるパルブアルブミン陽性細胞の活動の **in vivo** での検出能を評価した結果、**XCaMP** は **20~60Hz** の高頻度発火の検出能力が **GCaMP6f** と比較して有意に高かった。これらのことから、**XCaMP** によって、マウス脳における情報動態をより高感度

かつ正確に計測することが可能となったと言える。

カルシウムイメージングによる神経活動計測の最大の欠点は、スパイク記録と比べて時間分解能が悪いことである。この欠点を改善するため、研究分担者の **Hoang** が我々の実験データを用いて、カルシウムイメージングデータの精度を向上させるアルゴリズムを開発し (**hyperacuity algorithm**)、平均約 4 倍の時間精度でスパイクタイミングを推定できるようになった (**Hoang et al., 2020**)。

### (3) 大脳-小脳連関による内部モデル獲得機構、高次脳機能の情報動態の解明

前述(2) では、小脳モジュールごとに感覚運動や報酬などことなる情報が登上線維入力として伝えられていることが明らかとなったが、これが課題の学習に伴ってどのように変化するのかを調べ、各モジュールが認知・運動学習に果たす役割の解明を試みた。音弁別 **Lick/No-lick** 課題を学習中のマウス小脳において、プルキンエ細胞の複雑スパイク活動の学習による変化を 2 光子イメージングにより調べた。これにより、小脳モジュールごとに異なる学習依存的活動変化が明らかとなった。**Go/No-go** 学習の進行とともに **Hit** 試行 (**Go** 試行の正解) で活動が増強していくモジュールや、学習初期に **False Alarm** 試行 (**No-go** 試行の不正解) で高い活動を示し、学習の進行とともにその活動が減弱するモジュールが同定された。前者は運動開始のタイミング制御とその学習に関わり、後者はエラーに基づく誤差学習に関わると考えられた。このことは、小脳の機能がタイミング制御か誤差学習かという長年の論争に一つの答えを与える重要な発見である (**Hoang, Tsutsumi et al., in prep**)。

大脳-小脳連関によってどのように内部モデルを獲得し、運動学習が成立するのかを理解するには、運動学習に必要な誤差シグナルの神経表現を調べ、それが学習とともにどのように変化するのかを明らかにする必要がある。これまでに、登上線維が誤差シグナルを伝えるという実験的な証拠は数多く報告されているものの、試行ごとの誤差シグナルの神経表現やその脳内における分布はまだ明らかでないことが多い。本研究では運動学習中の誤差シグナルの表現や分布を明らかにするためにまず、運動の標的に誤差を生じさせることでマウスがその誤差に適応する過程を調べることのできる課題の構築を目指し、開発してきた音弁別 **Lick/No-lick** 課題をもとに改良したマウス行動適応課題を確立した。運動の目標位置や提示時間を変化させることで運動の結果に誤差を生じさせ、それに基づいてマウスが適応的に運動を修正していく過程を評価する。運動の目標位置を変化させる課題では、よく用いられるサッケードや追従眼球運動の適応課題などと同様に、目標位置変化に対してマウスが予測的に運動を変化させる過程が観察された。また、目標提示時間を変化させる課題においても、マウスは給水口の提示時間の変化に合わせて舐め運動の開始時間を変化させていく行動が確認された。したがって、これらの行動課題によって、誤差とそれに基づく運動適応を正しく評価できると期待された。さらに、報酬および報酬予測誤差シグナルの小脳における役割を明らかにするための課題を開発した。この課題においても、報酬の提示・不提示に応じてマウスが適応的に行動を変化させていく過程を捉えることが可能であることを確認した (**Murakami et al., in prep**)。また、マウス前肢の到達把持運動とその学習を調べる行動課題を新たに開発した (**Manita et al., 2022**)。今後、本研究で開発したこれらの課題を用い、小脳モジュールごとの誤差シグナルの表現とその学習による変化を調べるとともに、大脳や小脳の神経活動操作を行うことで、大脳-小脳連関による誤差学習のメカニズムを明らかにする。

< 引用文献 >

**Kitamura K and Häusser M, Dendritic Calcium Signaling Triggered by Spontaneous and Sensory-Evoked Climbing Fiber Input to Cerebellar Purkinje Cells In Vivo. J. Neurosci. 2011, 31:10847-58.**

**Tsutsumi S et al., Structure-Function Relationships between Aldolase C/Zebrin II Expression and Complex Spike Synchrony in the Cerebellum. J. Neurosci. 2015, 35:843-52.**

**Tsutsumi S et al., Modular organization of cerebellar climbing fiber inputs during goal-directed behavior. eLife 2019, 8:e47021.**

**Inoue M, Takeuchi A, Manita S et al., Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics. Cell 2019, 177:1346-1360.e24.**

**Hoang et al., Improved hyperacuity estimation of spike timing from calcium imaging. Sci. Rep. 2020, 10:17844.**

**Manita et al., A Novel Device of Reaching, Grasping, and Retrieving Task for Head-Fixed Mice. Front. Neural Circuits 2022, 16:842748.**

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Manita Satoshi, Ikezoe Koji, Kitamura Kazuo	4. 巻 16
2. 論文標題 A Novel Device of Reaching, Grasping, and Retrieving Task for Head-Fixed Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 842748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2022.842748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hoang Huu, Sato Masa-aki, Shinomoto Shigeru, Tsutsumi Shinichiro, Hashizume Miki, Ishikawa Tomoe, Kano Masanobu, Ikegaya Yuji, Kitamura Kazuo, Kawato Mitsuo, Toyama Keisuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Improved hyperacuity estimation of spike timing from calcium imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74672-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi Shinichiro, Hidaka Naoki, Isomura Yoshikazu, Matsuzaki Masanori, Sakimura Kenji, Kano Masanobu, Kitamura Kazuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Modular organization of cerebellar climbing fiber inputs during goal-directed behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e47021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.47021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Masatoshi, Takeuchi Atsuya, Manita Satoshi, (20名省略), Kitamura Kazuo, Bito Haruhiko	4. 巻 177
2. 論文標題 Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1360.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 20件）

1. 発表者名 Koji Ikezoe, Naoki Hidaka, Satoshi Manita, Masayoshi Murakami, Shinichiro Tsutsumi, Yoshikazu Isomura, Masanobu Kano, Kazuo Kitamura
2. 発表標題 Encoding model analysis of complex spikes of Purkinje cells in mice cerebellum during a voluntary lever-pull task
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 1st CJK International Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Huu Thien Hoang, Shinichiro Tsutsumi, Kazuo Kitamura, Mitsuo Kawato, Keisuke Toyama
2. 発表標題 Synchronicity changes of complex spike activities in cerebellar Purkinje cells during auditory go/no-go task learning studied by hyperacuity two-photon recordings
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society/The 1st CJK International Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rupprecht P, Carta S, Echizen M, Hoffmann A, Kitamura K, Friedrich RW, Helmchen F
2. 発表標題 Calibrated spike inference from calcium imaging data: generalization across datasets, imaging rates and noise levels
3. 学会等名 FENS virtual forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidaka N, Ikezoe K, Tsutsumi S, Isomura Y, Kano M, Kitamura K
2. 発表標題 Cerebellar climbing fiber signals represent voluntary forelimb lever-pull trajectories.
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitamura K
2. 発表標題 Functional connectivity between the neocortex and the cerebellum.
3. 学会等名 IBRO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidaka N, Tsutsumi S, Ikezoe K, Isomura Y, Kano M, Kitamura K.
2. 発表標題 Activity of cerebellar climbing fibers represents forelimb movements during voluntary lever-pull task in mice.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Choo M, Hira R, Matsuzaki M, Ikezoe K, Augustine GJ, Kano M, Kitamura K.
2. 発表標題 Organization of the functional inputs from the sensorimotor cortex to the cerebellum revealed by transcranial optogenetic mapping.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 喜多村和郎
2. 発表標題 小脳の運動機能と非運動機能：マウスを用いた研究．
3. 学会等名 第9回小脳研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 喜多村和郎
2. 発表標題 小脳モジュールの機能解析
3. 学会等名 次世代脳冬のシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuo Kitamura
2. 発表標題 Two-photon imaging of cerebellar activity in vivo
3. 学会等名 Two-photon functional imaging in the living brain: Theory and Practice (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	徳田 功  (TOKUDA Isao)  (00261389)	立命館大学・理工学部・教授   (34315)	
研究分担者	山崎 美和子  (YAMASAKI Miwako)  (10431305)	北海道大学・医学研究院・准教授   (10101)	
研究分担者	HOANG・THIEN HUU  (HOANG Huu)  (50772307)	株式会社国際電気通信基礎技術研究所・脳情報通信総合研究所・研究員   (94301)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	川人 光男  (KAWATO Mitsuo)  (10144445)	株式会社国際電気通信基礎技術研究所・脳情報通信総合研究所・所長    (94301)	
連携研究者	外山 敬介  (TOYAMA Keisuke)  (90090505)	株式会社国際電気通信基礎技術研究所・脳情報通信総合研究所・招聘研究員    (94301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スイス	University of Zurich			