

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09732

研究課題名(和文) 連合学習における脳領域間ニューラルネットワーク可塑的变化の可視化

研究課題名(英文) Visualization of associative learning-related plastic changes in neural network between brain regions

研究代表者

根本 正史(Nemoto, Masahito)

創価大学・公私立大学の部局等・その他

研究者番号：80370980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、学習・記憶のメカニズムを脳領域間のニューラルネットワークの可塑的变化として捉え、その基盤の上に出現する脳活動の変化をmesoscopicなレベルで可視化することである。脳活動は、げっ歯類大脳皮質においてヘモグロビン濃度変化に由来する内因性光信号で描出した。その結果、二つのモダリティ(体性感覚と視覚)の感覚刺激を時間的に接近して与えると、脳領域間で活動の相互作用が生じていた。次いで、後肢に二種類の振動刺激与え、標的刺激を弁別しレバーを押すオペラント条件づけを行い、学習前後で脳活動を描出した。学習後に賦活領域の縮小が観察されたが、麻酔深度等の影響もあり今後覚醒下実験が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢期を迎えても、心身ともに健康な社会生活を営む為に、認知症を予防し、学習能力・記憶力を保持することは、個人においてのみならず、超高齢化社会に突入した我が国においても喫緊の社会的課題である。このような背景の中で、学習・記憶のメカニズムを解明し、その障害の治療法を確立することは、医学における最重要テーマの一つである。本研究は、学習・記憶が脳領域間のニューラルネットワークの可塑的变化を基盤として成立すると捉え、この変化をmesoscopicレベルで可視化する。これらのテクノロジーは、学習・記憶のメカニズム解明のみならず、これに影響を与える薬物や行動、睡眠、運動等の効果判定に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand the mechanism of learning and memory as a plastic change of neural network between brain regions, and visualize the change of regional activities at the mesoscopic level. The activities were imaged on the rodent cortex by intrinsic optical signals derived from changes in hemoglobin concentration. The results showed that when bimodal (somatosensory and visual) sensory stimuli were applied at close timing to each other, we observed a certain pattern of interaction between regional activities. Then, operant conditioning (a type of associative learning) was conducted. Two patterns of vibration stimuli were applied to the hind paw, the rodent discriminated the target stimulus followed by pushing the lever with reward, and brain activity was imaged before and after the learning. Although a contraction of the active area was observed after the learning, the experiment under awakening is necessary in the future to exclude the influence of anesthesia.

研究分野：神経機能画像学 脳循環代謝学 神経科学

キーワード：脳活動イメージング 神経可塑性 連合学習 ニューラルネットワーク

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢期を迎えても、心身ともに健康な社会生活を営む為に、認知症を予防し、学習能力・記憶力を保持することは、個人においてのみならず、超高齢化社会に突入した我が国においても喫緊の社会的課題である。このような背景の中で、学習・記憶のメカニズムを解明し、その障害の治療法を確立することは、医学における最重要テーマの一つといえる。

近年、様々な蛍光染色法と顕微鏡技術の進歩により、学習に伴って、シナプス、神経細胞とその細胞集団において、可塑的变化が可視化されるようになった(Matsuzaki M, 2004; Okamoto K, 2004; Peters AJ, 2014)。さらに、その microscopic な変化と行動学的に観察される macroscopic な変化を橋渡しする中間的なレベル(functional area/ columnar resolution)で脳活動の変化を捉える研究も、我が国で始まっている。これらの代表的な研究方法として、新潟脳研 澁木らのグループが行うフラビン F1b 蛋白の内因性蛍光イメージング法がその一つである(Shibuki K, 2003; Thoni M, 2006; Takahashi K, 2006; Yoshitake K, 2013)。

一方、我々は、電気的な神経活動(多ユニット活動 MUA, 局所電場電位 LFP, 脳波のガンマ帯活動 EEG- γ)と同時に、mesoscopic なレベルでの脳循環代謝反応を血液ヘモグロビン Hb 由来の内因性信号で光学的に描出し、神経活動に伴う微小循環系の制御(脳血液量の変化)が、中心的カラム構造の精細さで行われること(columnar resolution)を明らかにした(Sheth S, Nemoto M, 2004, J Neurosci)。また、神経活動と血液量変化の線形性は、賦活法に依存する神経活動のパターンによって大きな相違がみられ、神経活動の異なるパターンが混在する複合的脳活動においては、単純な線形性は保証されないことを確認した(Nemoto M, 2004, J Neurosci; Sheth S, Nemoto M, 2004, Neuron; Nemoto M, 2012, NeuroImage)。これらの研究により、fMRI, PET, fNIRS など脳循環代謝反応を基礎に置いた Neuroimaging 技術の正当性と適用限界とを明らかにした。

このような背景において、機能的カラムの解像度をもつ内因性信号を用いて、低侵襲に脳活動を描出することで、学習・記憶のメカニズムに接近しようと考えた。

2. 研究の目的

さて、大辞林(三省堂)によれば、学習とは「生後の反復した経験によって、個々の個体の行動に環境に対して適応した変化が現れる過程」あるいは、「過去の経験によって行動の仕方がある程度永続的に変容すること」とある。一方、記憶は、過去の経験を記録・保持・再生する過程であり、学習は、必然的に記憶を基盤として実現される適応的な行動の変化と考えられる。本研究は、この学習の基本となる連合学習の神経生理学的メカニズム解明を目指して、内因性光学信号を用いて、脳領域に生じると推測される可塑的变化を mesoscopic なレベルで可視化することである。

3. 研究の方法

(1) はじめに、連合学習理論について若干ふれると、最新心理学辞典(平凡社)によれば、連合学習理論とは、事象(出来事)の間の結びつき(連合)を学習の原理と考える理論である。一般に、この連合学習は、パブロフの犬の実験で知られる古典的条件づけ学習と、ソーンダイクやスキナーにより始められたオペラント条件づけ学習に分類される。

本研究では、A. 連合学習の前提実験として、2種類の異なるモダリティによる刺激が時間的に接近して与えられた場合、脳活動領域間でどのような相互作用が生ずるかを可視化する実験 B. オペラント条件づけ学習を行い、手がかりとなる刺激を弁別し強化刺激(報酬)を求めて行動変容を起こした際、手がかりに関わる脳活動にどのような可塑的变化が生ずるかを可視化する実験 とを行った。C. これらの脳活動の可視化は、本研究においては麻酔下で行われたが、本来、学習の可塑的变化は、覚醒下でこそ明確になると推測されるので、並行して、マウス(ラット)で、覚醒下で脳活動を内因性信号で描出する技術開発を試みた。

(2) A. B.の実験では、12時間の明暗サイクルで飼育した8~14週齢のSprague-Dawleyラットを用いた。

4. 研究成果

上記 A. B. C. の実験内容について詳細は以下の通りである。

A. 体性感覚刺激を先行刺激として、視覚刺激を時間的に接近して与えた場合の各領域の脳活動相互作用を可視化する実験

イソフルランと α クロラロースの麻酔下で、体性感覚野と視覚野の領域の頭頂・後頭葉の頭蓋骨をドリリングした。イソフルランを中止し、体性感覚刺激を先行して片側後肢に1 mA, 1 ms, 5 Hz, 2 secの電気刺激を、後行する視覚刺激として同側の片眼に白色フラッシュライトを同様の頻度と間隔で与えた。体性感覚刺激と視覚刺激を単独で提示する場合、両者を同時に提示する場合、体性感覚刺激の後に視覚刺激を20 ms, 40 ms, 60 msまで遅延させて提示する6種類の刺激パターンを疑似ランダムに与えて二つの感覚領域を賦活した。両領域の脳活動の描出は、神経活動に伴う血液量変化と強く相関するヘモグロビン Hb 組織内濃度変化に由来する内

因性信号によって描出した。具体的には 酸素化 Hb 脱酸素化 Hb の一つの等吸収点である 586nm の狭帯域光を照射して、pixel-by-pixel に、反射光強度 $I(t)$ の刺激開始 t 秒後の変化率 $\Delta ratio(t)$ を算出、total Hb 組織内濃度変化のサロゲートとして mapping した。すなわち、

$$ratio = I(t) / I(0) \quad \Delta ratio(t) = ratio(t) - ratio(0)$$

実際には、覚醒下・非拘束のイメージングの第一歩として、ねずみへの装着を想定して、WiFi で遠隔操作が可能な GoPro 社製 Hero4 black のウェアブルカメラにて画像を取得した。取得された画像は、カラーの動画(MPEG4-AVC/H.264)であり、MATLAB を用いて Green Channel のデータのみ Gray Scale で抽出し $\Delta ratio$ を加算平均、関数 colormap を用いて疑似カラー表示した。

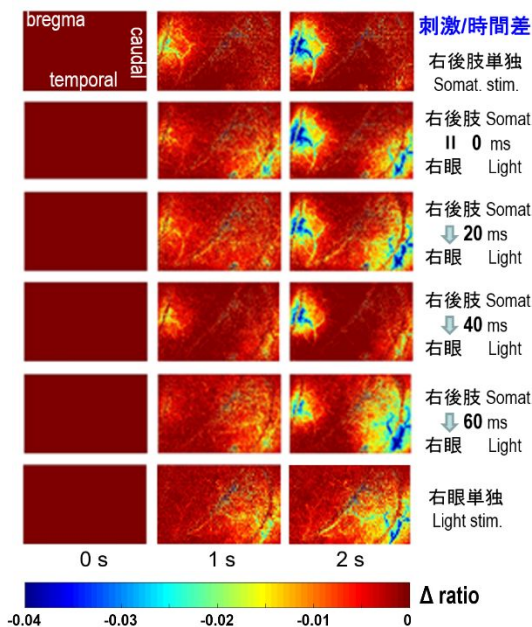


図 1. 体性感覚と視覚のペア刺激の脳活動

代表的な脳活動を図 1 に示す。左頭頂-後頭部を同一視野内におさめ、右後肢と右眼を刺激した。後肢体性感覚野(吻側)と視覚野(尾側)の脳活動は Hb 由来の内因性信号で良好に描出され、刺激提示のわずかな時間差による相互作用を観察できる。すなわち、先行する右後肢の体性感覚刺激によって左視覚野の脳活動が 40 ms の時間差で強く抑制されている(4 段目)ことがわかる。

これらの結果は、反対側後肢刺激の先行で(おそらく脳梁を介して)抑制を受ける time window 40 ms と同様であり(Nemoto, NeuroImage 59, 2012), おそらく皮質間でのニューラルネットワークの存在を示唆し、そのネットワークを介した抑制と推測された。

B. オペラント条件づけ学習

片側後肢足関節部に振動子を装着、特定の振動パターンの刺激があった直後にレバーを押すと餌の報酬が得られるオペラント学習を行った。その前後に、麻酔下で脳活動の変化を内因性信号で描出した。オペラント学習の 5-7 日前に、イソフルラン麻酔下に、振動刺激を予定している後肢と反対側の頭頂部頭蓋を脳表が透見できるまで薄くドリリング、頭窓を作製して閉創した。弁別刺激として振動刺激を用いたレバー押しのオペラント学習を行った。すなわち、学習させる 7~10 時間前から水のみを与えて絶食させ、特定の振動刺激を手がかりとしてレバーを押すと報酬(餌)が得られるようにした。学習は以下の手順で段階的に進めた(図 2)。

- (1) 頭窓作製の手術 2~3 日後に初回のレバー押し学習を行った(1 session: 1 h)。スキナーケージにラット入れ、レバーに近づけば餌を出すようにし、レバーと餌を関連づけた。次にレバーに触れると餌を出すようにし、レバーに触れることで餌が出るという認識をさせた。最後にレバーに触れても餌を出さないようにすることで、ラットはレバーを調べ始め、そのときに偶発的にレバーを押すと餌を出すようにし、レバー押しと餌の報酬を関連づけた。
- (2) レバー押しを学習させたラットにジャケットを着せ、ジャケットに刺激装置(参照)を取り付け、振動子(LA4-503AC2, Nidec 社)を片側後肢足関節外側部に取り付けた。スキナーケージ(MSK-001R, 室町機械)に入れ、ラットがレバーを押すタイミングと同時に振動刺激(1 回の振動持続時間 100 ms, 刺激間隔 100 ms, 5 Hz, 2 秒間)を与えた。次に振動刺激を与えるタイミングを徐々に早め、振動刺激とレバー押しを関連づけた。
- (3) 振動刺激-レバー押し-報酬の学習を達成したラットに、(2)で用いた振動刺激(1 回の振動持続時間 100 ms, 刺激間隔 100 ms, 5 Hz, 2 秒間)に加え、別の振動刺激(1 回の振動持続時間 400 ms, 刺激間隔 100 ms, 2 Hz, 2 秒間)を与え、5 Hz の振動刺激を与えたときにレバーを押すように訓練し、2 種類のパターンの感覚刺激を区別させる弁別学習を行った。

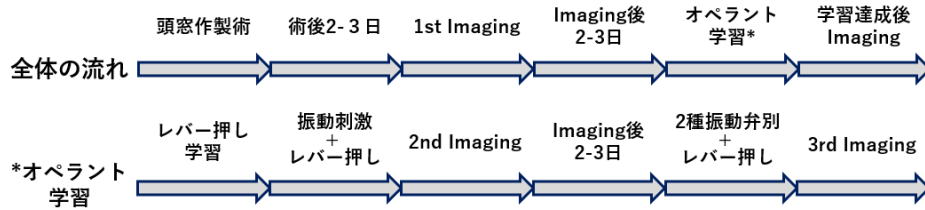


図 2. オペラント条件づけと脳活動イメージングのスケジュール

オペラント学習の為の振動刺激装置, スキナーボックス餌出し器, カメラの同期的制御は以下のように行った。自由行動下で学習させるには, 刺激装置は遠隔で操作でき, 動物のジャケットに搭載できるよう小型でなければならない。そこで刺激装置は ATmega328P (ATMEL 社)を用いて作製し, Bluetooth(RN42)を通じて遠隔で制御ボード(Arduino)から刺激を出せるようにした。具体的な刺激装置の回路は図 3 に示す。Arduino には Power1401(D/A-A/D converter, CED 社)から電気信号を送れるように接続。一方で, Power1401 を PC に接続し, 電気信号の大きさやタイミングを制御できる Spike2 software 用いて電気信号をプログラムした。刺激装置は Power1401 から送られてくる信号と同様の周波数で行えるようプログラムした。また, 学習初期は餌のタイミングや振動刺激は任意のタイミングで行う必要がある為, Power1401 からの信号だけではなく, Arduino を PC につなげた。すなわち, Arduino IDE(Arduino 総合開発環境)から特定の文字信号をシリアル通信で送り, 任意のタイミングで送られてきた文字に対応した各周波数の刺激を行えるようプログラムした。

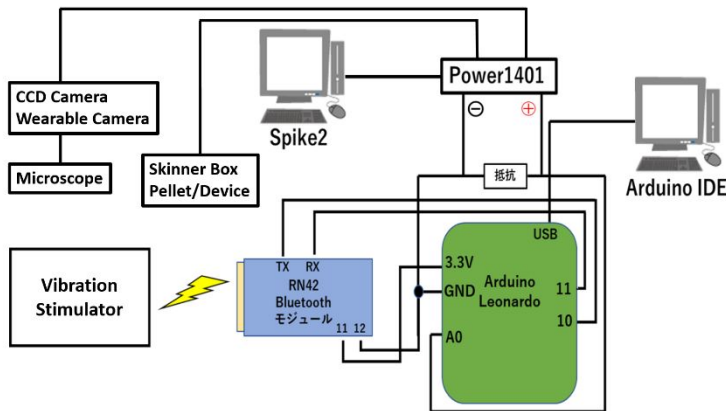


図 3. 機器制御のスキーマティクス

オペラント学習におけるラットの行動変化の経過は以下の通りであった。レバー押しの学習はおおよそ 2~4 session で学習した。学習後は動物が任意のタイミングでレバーを押していた。弁別刺激とレバー押しを組み合わせさせた学習では初めのうちは弁別刺激を無視し, レバーを押す行動が観察され, 餌がでないのにも関わらず, food dispenser に顔を突っ込み, 餌が出たか確認していたが, 次第にレバーを押す前, または同時に弁別刺激を行ったときのみ餌を確認する動作が見られた。繰り返すうちに, 最終的に 7~10session で弁別刺激に対して素早く反応し, レバーを押すよう学習した。

代表的な学習前後の脳活動を図 4 に示す。後肢の振動刺激で賦活された脳領域は, 同部の電氣的刺激で賦活される領域とほぼ等しかった。初回の脳活動と 2 種類の弁別刺激学習達成後に, 餌の出る標的刺激時の脳活動を比較すると, 当初推定していた反応とは逆に, 信号強度の低下と領域の縮小が認められることが観察された。しかし一方で, 再現性を確認する実験において, 活動強度と領域の変動が大きく, 慎重な解釈が必要と考えられた。

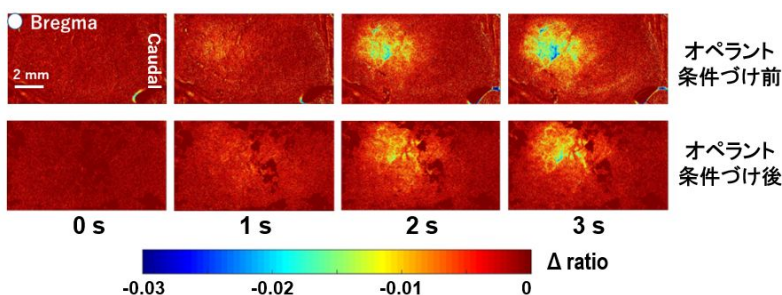


図 4. オペラント学習前後の標的信号による脳活動の比較

活動依存性に感覚野・運動野が拡大したり、末梢の障害により脳活動領域が移動したりすることはしばしば報告されているが、図4で示すように、脳活動関連信号の強度が低下し、領域が縮小するという報告も散見される。Polley, Frostig ら(Neuron, 1999; Nature, 2004; Curr. Opin. Neurol., 2006)は、ラットの Whisker Barrel 野の脳活動を内因性信号で描出した。ラットを通常のケージから出し、自然に近い環境下で探索活動を行えるように飼育すると、活動領域の縮小と信号強度低下を観察している。彼らは、第IV層とII/III層の電気生理学的信号の層別解析を加えて、第II/III層の活動が抑制されることで、特異的脳活動へと鋭利化し受容野が収縮すると説明した。我々の結果は類似した要因の可能性もあるが、イソフルランの麻酔深度の変動や繰り返す刺激への順応や馴化等の様々な要因も考えられる為、電気生理学的信号の同時計測や、覚醒下での実験が必要と考えられた。

C. マウスの麻酔下，覚醒下での脳活動イメージング

これまでの経緯から、学習に関わる脳活動の可塑的变化を覚醒下で描出すること計画し、最終年度にマウス(C57BL/6 など)を用いて、麻酔下/覚醒下での実験を行った。ナリシゲに特注した頭部固定器を用いて、頭蓋骨に接着した金属棒で頭部を固定、脳活動を内因性信号で描出した。これまでの実験では、Prakash ら(NeuroImage, 2007)がマウスの特異的な反応として報告した、賦活領域の逆転反応、すなわち deoxy-Hb の増大と oxy-Hb の減少は、明瞭には確認できず、逆転反応の原因は、麻酔による呼吸抑制や血圧低下による非生理的な反応と推測された。図5は、ラットのアペラント学習で使用された振動刺激(1回の振動持続時間 100 ms, 刺激間隔 100 ms, 5 Hz, 2秒間)をマウス右後肢に与え、左頭頂骨下に透視された脳活動のパターンを示す。図6は、別のマウスで施行されたフラビン F1b 蛋白の内因性蛍光イメージングで、刺激後1秒以内で観察される蛍光強度の増大と、その後観察される Hb 濃度変化に伴う蛍光強度の低下を示す。

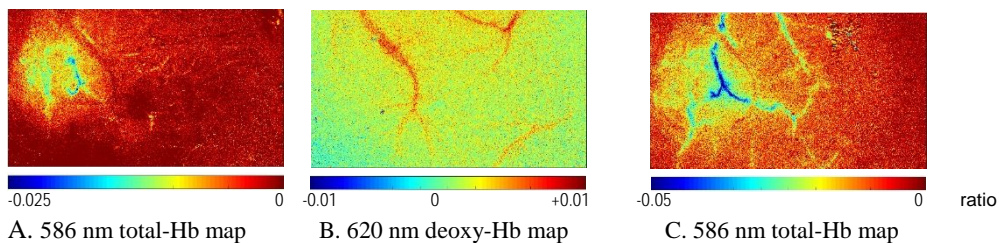


図5. マウス後肢への振動刺激開始3秒後の brain mapping. A, B: ウレタン麻酔下で 586 nm の oxy-Hb/deoxy-Hb 等吸収点の内因性信号(A)と 620 nm の deoxy-Hb 優位波長の内因性信号(B)。線状に濃く描出されているのは、それぞれ動脈(A)と静脈(B)。C: 覚醒下での同じマウスの 586 nm の内因性信号。反応強度の増大と領域の拡大を認める。

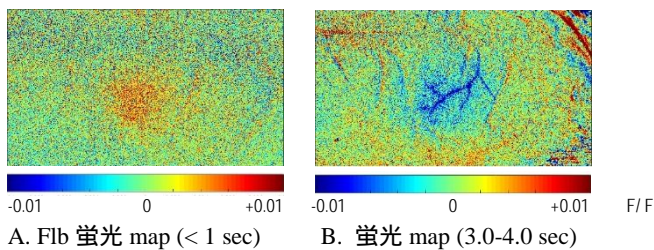


図6. 蛍光顕微鏡キット SFA-RB(バイオリサーチ)を装着し、マウスに同じパターンの振動刺激を与えた時のフラビン F1b 由来の蛍光強度変化で脳活動を描出した。刺激後1秒以内に脳活動に伴う蛍光強度の増大が観察され(A)、その後、Hb 濃度上昇に関わる蛍光強度の低下(B)を認める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. Hoshi, Y. Tanikawa, E. Okada, H. Kawaguchi, M. Nemoto, K. Shimizu, T. Kodama, M. Watanabe	4. 巻 9:9165
2. 論文標題 In Situ Estimation of Optical Properties of Rat and Monkey Brains Using Femtosecond Time-Resolved Measurements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45736-5	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 H. Shin, H. D. Kawai
2. 発表標題 Oligodendrocyte progenitor cells during development and upon sensory loss in mouse visual cortex
3. 学会等名 Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 播磨勇気, 木暮信一, 根本正史
2. 発表標題 連合学習における皮質脳血液量解析
3. 学会等名 第21回日本ヒト脳機能マッピング学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 播磨勇希 根本正史 川井秀樹 木暮信一
2. 発表標題 ウェアラブルカメラを用いたラット感覚野における光学的脳活動イメージング
3. 学会等名 第94回日本生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 播磨勇希 條大地 井上尚也 福崎由美 木暮信一
2. 発表標題 iPS細胞へのLED照射効果
3. 学会等名 第37回日本レーザー医学会
4. 発表年 2016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	木暮 信一 (Kogure Shinichi) (10133448)	創価大学・理工学部・教授 (32690)	
研究分担者	川井 秀樹 (Kawai Hideki) (90546243)	創価大学・理工学部・教授 (32690)	
連携研究者	星 詳子 (Hoshi Yoko) (50332383)	浜松医科大学・メディカルフォトリクス研究センター・教授 (13802)	
連携研究者	精山 明敏 (Seiyama Akitoshi) (70206605)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	