

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K16252
研究課題名（和文）神経細胞・アストロサイト・脳血流の活動計測による安静時機能結合の神経基盤の解明

研究課題名（英文）Research of resting state functional connectivity by neural, astrocyte and hemodynamic activity measurements

研究代表者
松井 鉄平（Matsui, Teppei）

岡山大学・自然科学学域・准教授

研究者番号：10725948
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では神経活動と脳血流の計測については、覚醒状態のイメージングを行うシステムを構築した。また、自発的脳活動の状態において、自発的神経活動に引き続いてアストロサイト活動が惹起されること、さらにアストロサイト活動によりその後の自発的神経活動が抑制されている様子が観察された。また安静時脳活動について、薬剤投与の影響は神経活動においても脳血流においても機能的結合の変化として認められたが、神経活動や脳血流の信号そのものの変化に見られたような部位特異性は明確には生じていないことが分かった。これらの結果は安静時脳活動の神経基盤を理解する上で重要な結果だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的磁気共鳴画像法（fMRI）による安静時脳活動の計測（RS-fMRI）は、ヒト大脳皮質ネットワークの機能構造の解明や、精神・神経疾患による大脳ネットワークの変性を検出する技術として臨床応用も視野に入れた研究開発が進んでいる。しかしながらfMRIは脳血流を計測する技術であるため、RS-fMRIで計測される機能的結合がどの程度まで実際の神経活動を反映したものであるかは未だ良く分かっていない。本研究で得られた成果は、fMRIで計測できる安静時における神経細胞とアストロサイトの相互作用、および脳血流との関係性を明らかにした点で臨床応用に不可欠な基礎的知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We constructed a system for imaging the arousal state for the measurement of neural activity and cerebral blood flow. In addition, in the state of spontaneous brain activity, it was observed that astrocyte activity was induced following spontaneous neural activity, and that astrocyte activity suppressed the subsequent spontaneous neural activity. Regarding resting state brain activity, the effect of drug administration was observed as a change in functional connection in both neural activity and cerebral blood flow, but difference was seen in the change in neural activity and cerebral blood flow. It was found that the spatial specificity did not occur clearly in the cerebral blood flow. These results are considered to be important results for understanding the neural basis of resting brain activity.

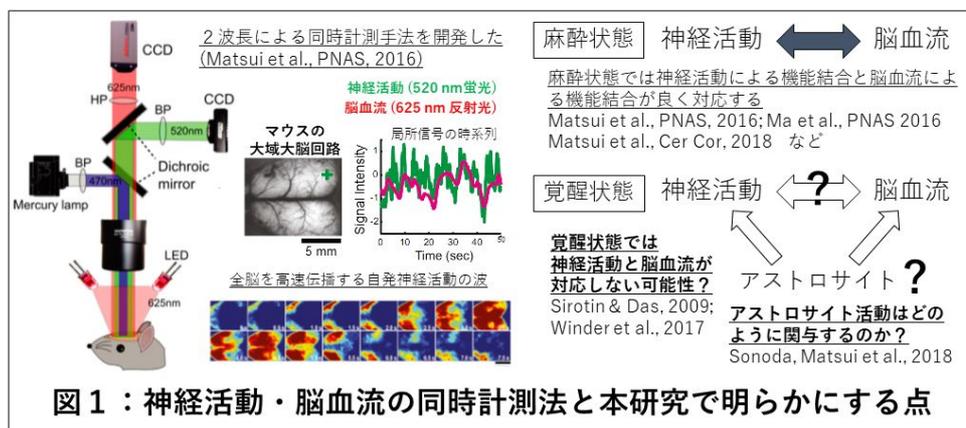
研究分野：神経科学

キーワード：カルシウムイメージング 安静時脳活動 機能結合 機能的MRI

1. 研究開始当初の背景

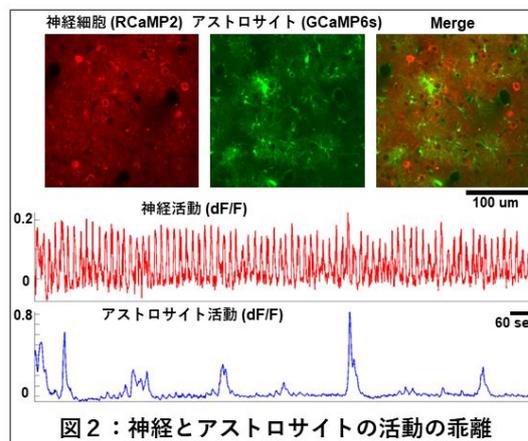
本研究の核心となる問いは、覚醒状態の大脳皮質において、安静時の自発的な神経活動・アストロサイト活動・脳血流が、どの程度まで精密に相互に関係しているか、という点である。この問いは、fMRI を用いた安静時の自発的脳活動計測(RS-fMRI)の神経基盤に相当するものである。近年、RS-fMRI により精神疾患が引き起こす脳のネットワークレベルでの異常を検出し、診断技術へと応用する試みが始まっているが(Woodward et al., 2012)、fMRI は神経活動そのものではなく脳血流を反映した BOLD 信号を計測する技術であるため、信頼できる診断技術を開発するには RS-fMRI が計測する機能的結合の神経基盤を確立することが必要不可欠である。最近、申請者を始めとしたいくつかのグループが、神経活動の光学的レポーターを用い、神経回路集団の神経活動と脳血流信号とをマウスの大脳皮質全体に渡って計測する新規技術を開発した(図1) (Matsui et al., PNAS, 2016; Matsui et al., Cerebral Cortex, 2018; Matsui et al., Communicative and Integrative Biology, 2018; Ma et al., PNAS, 2016; Vazquez

et al., NeuroImage, 2018)。また、これらの研究により、麻酔下の動物では、RS-fMRI の機能的結合が実際に自発的な神経活動に由来することを示された(図1)。



しかしながら、未解決の重要な論点として、いくつかの研究では、覚醒下の動物においては自発的神経活動と脳血流が大きく乖離する可能性が指摘されている(Sirotnin and Das, Nature, 2009; Winder et al., Nat. Neurosci, 2017)。これに関連して、申請者自身の2色2光子イメージングを用いた研究でも、覚醒状態の大脳皮質では自発的な神経活動と自発的なアストロサイト活動が大きく乖離することが観察された(図2; Sonoda, Matsui et al., Biochemical and Biophysical Research Communication, 2018)。この結果は覚醒状態では神経活動と脳血流が大きく乖離している可能性を示唆していると考えられるが、最近の研究ではアストロサイト活動と脳血流の関係が複雑であることが分かって来ているためは明らかではないため(Hillmann et al., Ann. Rev. Neurosci., 2014)、この可能性は実験的に検証する必要がある。

このような背景のもと本研究では、申請者がこれまでに開発した光学イメージング技術を駆使して、覚醒状態の大脳皮質における、安静時の自発的な神経活動・アストロサイト活動・脳血流の関係を明らかにする。本研究により、RS-fMRI



の神経基盤を覚醒状態の大脳皮質で確立されることで、精神疾患の診断技術開発などに繋がる知見を得る事ができると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、覚醒時の大脳皮質における RS-fMRI の機能的結合の神経基盤を、自発的神経活動・アストロサイト活動・脳血流の関係から明らかにすることである。本研究の学術的独自性は、先行研究が麻酔下の動物を主に用いて機能的結合の神経基盤を調べて来た事に対して、覚醒下の動物を使用することである。また、先行研究が感覚刺激に対する神経活動・アストロサイト活動・脳血流の関係を調べて来た事に対して、安静時の自発的活動に着目する点も本研究の独自性である。最後に、神経活動と脳血流の2つの関係だけでなく、そこにアストロサイト活動の観察を組み込む事が本研究の創造的な部分である。先行研究では、安静時の自発的な神経活動と脳血流が大きく乖離するという現象報告はあるものの、そのメカニズムについては明らかにされていない。これは、近年のカルシウムセンサーの開発までアストロサイト活動が観察できなかったことによる。申請者は最新のセンサーによる神経活動とアストロサイト活動の観察がメカニズムの解明に重要な役割を果たすと考えている。

3. 研究の方法

神経活動と脳血流の計測については、既に麻酔下のマウスで実績のある手法を用いた (Matsui et al., 2016; Matsui et al., 2018)。更に、高感度のカルシウムセンサーである GCaMP6 あるいは GCaMP7 を使用することで、頭蓋骨越しに神経活動と脳血流の両方を観察できるため、訓練したマウスを繰り返し実験に用いる事で

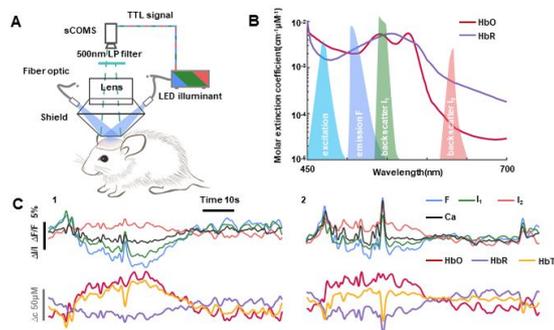


図3：多波長計測法

効率的にデータ取得をすることが出来た。神経活動とアストロサイト活動については、既に開発した2色2光子カルシウムイメージングによる手法を使用した (Sonoda, Matsui et al., 2018)。具体的には、アストロサイトには GFAP プロモーターにより GCaMP6s を発現させ、神経細胞には hSyn プロモーターにより赤色のカルシウムセンサーである R-CaMP2 (Inoue et al., 2014) を発現させた。最後に、アストロサイト活動と脳血流の同時計測については、新規計測技術を導入する。脳血流の信号は2光子顕微鏡で同時観察を行うことが難しい。一方、アストロサイトの活動は神経活動と比較して遅く脳血流に近いダイナミクスを持つため、GCaMP 信号と脳血流の信号を正確に分離するための特別な工夫が必要である。そこで本研究では、1光子でのマルチスペクトル顕微鏡を用いた方法を導入し、GCaMP 信号と脳血流由来の信号を正確に分離できるようにした。この手法では、GCaMP の吸光・蛍光スペクトル、および酸化・還元型ヘモグロビンの吸光スペクトルの事前知識を使い、更に多波長での観察を行うことで、GCaMP 信号と脳血流由来の信号とを波長方向に分離することを可能にする (図 3)。

4. 研究成果

先ず、神経活動と脳血流の計測については、覚醒状態のイメージングを行うシステムを構築した。覚醒状態ではマウスの体動によるノイズが計測の問題になる可能性が心配されたが、実際にイメージングを行ったところ体動によるノイズは軽微であった。マウスには高感度のカルシウムセンサーである GCaMP6 を大脳皮質神経細胞に発現する遺伝子改変マウスを使用し、頭蓋骨越しに神経活動と脳血流の両方を、多波長顕微鏡により観察した(図 3)。また、2光子顕微鏡を用いてアストロサイト活動と神経活動の同時観察を行った。その結果、自発的脳活動の状態において、自発的神経活動に引き続いてアストロサイト活動が惹起されること、さらにアストロサイト活動によりその後の自発的神経活動が抑制されている様子が観察された。

次に、神経活動と脳血流の同時イメージング装置を用いて薬剤投与かのマウス大脳皮質における神経活動の異常が脳血流の変化へどのように変換されているかを調べた。その結果、神経活動の異常のうち高周波の成分が脳血流ではほとんど見えていないことが明らかになった。一方、脳血流では神経活動には見られない定常的な変化が起きることが確認された。このことは、薬剤投与による大脳ネットワークの活動異常が、神経活動と脳血流で大きく異なる仕方で見られることを実証するものである。

本年度は、昨年度までに得られた成果をもとに正常時、薬剤投与時のマウス大脳皮質における機能的結合解析を行った。その結果、薬剤投与の影響は神経活動においても脳血流においても機能的結合の変化として認められたが、神経活動や脳血流の信号そのものの変化に見られたような部位特異性は明確には生じていないことが分かった。現在、これらの成果を論文としてまとめている以上の結果は 2020 年度の神経科学大会において発表した(Li et al., 2020)。また、現在査読付き論文誌への投稿を準備中である(Li et al., in preparation)。

アストロサイトの活動計測については、新型コロナウイルス蔓延の影響や代表者の機関異動があった関係で1年間の延長を行った。しかしながら、RCaMP-2を用いる検討を行ったが、多波長顕微鏡で信号を得るには RCaMP-2 は信号強度が不足している懸念があることが分かった。また、ウイルスでの発現を必要とする影響で空間的に限られた部位にしかセンサーを発現させられないため、この点でも皮質の広範囲をカバーできる多波長顕微鏡のメリットを生かせないことが懸念された。そこで現在は RCaMP1.07 を神経細胞に発現する遺伝子改変マウスを使用する方向で検討を進めた。これは新型コロナウイルス蔓延による緊急事態宣言の影響で実験室での作業が制限されたため、現在も継続して検討中である。一方その間に、緊急事態宣言下で継続できる本課題に関連した研究として、ヒト fMRI のデータを利用した研究を推進し、3報の査読付き論文として公開した。特に安静時脳活動の機能的結合解析の解析手法の統計的な妥当性についてヒト fMRI データを使用して検討を行った。これらのヒト fMRI データから得られた知見は、本研究の成果および本研究の成果物である多波長顕微鏡により得られたモデル動物での実験結果を有効活用する上で重要な役割を果たすことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsui Teppei, Hattori Yoshiki, Tsumura Kaho, Aoki Ryuta, Takeda Masaki, Nakahara Kiyoshi, Jimura Koji	4. 巻 249
2. 論文標題 Executive control by fronto-parietal activity explains counterintuitive decision behavior in complex value-based decision-making	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NeuroImage	6. 最初と最後の頁 118892 ~ 118892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroimage.2022.118892	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 Matsui Teppei, Pham Trung Quang, Jimura Koji, Chikazoe Junichi	4. 巻 249
2. 論文標題 On co-activation pattern analysis and non-stationarity of resting brain activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NeuroImage	6. 最初と最後の頁 118904 ~ 118904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroimage.2022.118904	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 Matsui Teppei, Taki Masato, Pham Trung Quang, Chikazoe Junichi, Jimura Koji	4. 巻 15
2. 論文標題 Counterfactual Explanation of Brain Activity Classifiers Using Image-To-Image Transfer by Generative Adversarial Network	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroinformatics	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fninf.2021.802938	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8件（うち招待講演 5件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 T. Matsui, T. Hashimoto, T. Murakami, M. Uemura, K. Kikuta, T. Kato, K. Ohki
2. 発表標題 Multiscale calcium imaging of spontaneous activity in the primate visual cortical network.
3. 学会等名 生理学研究所研究会「意思決定研究の新展開, (生理学研究所) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Matsui, T. Hashimoto, T. Murakami, M. Uemura, K.Kikuta, T. Kato, K. Ohki
2. 発表標題 Multiscale calcium imaging of spontaneous activity in the primate visual cortical network
3. 学会等名 日本神経科学大会国際公募シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 R. Li, T. Matsui, K. Ohki
2. 発表標題 Coupling and decoupling between neural activity and hemodynamics revealed by multispectral imaging
3. 学会等名 日本神経科学大会(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsui, T., Hashimoto, T., Uemura, M., Murakami, T., Kikuta, K., Kato, T., Ohki, K.
2. 発表標題 Development and Application of Multi-Scale Ca ²⁺ Imaging in the Primate Visual Cortical Network
3. 学会等名 The 8th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsui, T., Hashimoto, T., Uemura, M., Murakami, T., Kikuta, K., Kato, T., Ohki, K.
2. 発表標題 Spatiotemporal structure of spontaneous activity in the primate visual cortex
3. 学会等名 神経ダイナミクスミニワークショップ(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui T
2. 発表標題 新しい神経活動イメージング法の開発による脳のマルチモーダル・マルチスケール動作原理の解明
3. 学会等名 高知工科大学招待講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui, T., Hashimoto, T., Uemura, M., Murakami, T., Kikuta, K., Kato, T., Ohki, K.
2. 発表標題 Spatiotemporal structure of spontaneous activity in the marmoset visual cortex
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsui, T., Hashimoto, T., Uemura, M., Murakami, T., Kikuta, K., Kato, T., Ohki, K.
2. 発表標題 Structured spontaneous activity in the marmoset visual cortex studied with in vivo calcium imaging
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松井鉄平、大木研一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 230
3. 書名 脳の半分を占める グリア細胞	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------