

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23788

研究課題名（和文）大規模単一神経活動記録による自発活動と触知覚神経活動の関連の探索

研究課題名（英文）Investigation of the influence of spontaneous activity on activity during somatosensory perception by large-scale recording of neural activity

研究代表者

上森 寛元 (Uwamori, Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90845900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、自発活動中の広域でのマウス大脳皮質2/3層の神経活動が後肢刺激知覚時の神経活動に対して与える影響を調査することである。広視野2光子顕微鏡を用いて知覚課題中の広視野カルシウムイメージングによる大規模神経活動記録を行った。後肢刺激時に活動が生じる神経細胞群（アンサンブル）を検出するそのような解析を行った結果、知覚課題においてHit時（知覚時）にアンサンブルの活動が強く見られ、Miss時には活動が見られなかった。また主成分分析による解析によって、HitとMissそれぞれにおける刺激直前の自発活動の状態が異なることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人や動物は外界からの刺激を五感を通して知覚するが、同一の刺激に対しても知覚する場合とそうでない場合がある。知覚は脳の高次機能と考えられ、知覚時には脳内の様々な脳領域の活動が見られるが、知覚する・しないを決定づけるような刺激時の脳内の状態に関しては未だ明確な知見は存在しない。刺激直前の自発活動状態が直後の刺激に対する知覚に何らかの影響を持つと考えられる。本研究によって、大脳皮質広域において知覚する・しないの2状態で神経活動が大きく異なることを見出した上で、刺激直前の活動状態が2状態間で異なることを示唆する結果を得た。知覚の脳内メカニズムの根本原理の理解への端緒を開く結果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the influence of spontaneous activity on activity during perception of tactile stimulus by recording neural activity in mouse cortex using a wide-field two-photon microscope. Wide-field calcium imaging was performed when mice were engaged in a tactile stimulus detection task. By analyzing ensemble activity during the task, it was found that ensemble activity was strong in hit trials and weak in miss trials. Additional analysis using principal component analysis (PCA) revealed that spontaneous activity just before the stimulus was different in three-dimensional PC space between hit trials and miss trials.

研究分野：神経科学

キーワード：2光子カルシウムイメージング 触知覚 広視野2光子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

人間や動物は、外界の事物や刺激を五感により知覚する。従来研究において、外部からの刺激の知覚時には、例えば視覚刺激であれば視覚野、触覚刺激であれば体性感覚野に属する神経細胞が安定して応答することが報告されている。つまり、刺激のモダリティに対応する脳領域(例えば視覚刺激に対しての視覚野、など)での応答が知覚時に安定して生じる。一方で、知覚時には単一の脳領域に留まらず様々な脳領域が神経活動を生じることも報告されている。その際の多数の脳領域間での情報伝達様式に関しては未だ不明であり、知覚時に広域における脳領域間の情報伝達がどのように行われているのかはわかっていない。外部からの刺激を知覚する際の脳領域間の情報伝達を明らかにするためには、広く様々な脳領域での神経活動を同時に記録する必要がある。その上で、知覚の有無に対して脳領域間の情報伝達がどのように異なるのかを明らかにする必要がある。また、外部からの刺激への知覚に着目するにあたり、その直前における自発活動にも着目する必要がある。脳は外部からの刺激に関係なく常に自発活動を生じており、内部状態が常に変動している。つまり、その内部状態によって外部からの入力に対する応答が変化すると考えられている。自発活動もまた脳内で広く行われているため、広く様々な脳領域での活動を同時に捉えることが重要となる。そこで本研究では、新たに開発された広視野 2 光子顕微鏡を用い、マウス大脳皮質の多数の脳領域の神経活動を同時記録する。マウスが外部からの刺激を知覚する際の自発活動と知覚の有無に着目し、自発活動と知覚との関係について調査する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、自発活動中の広域でのマウス大脳皮質 2/3 層の神経活動が後肢刺激に対する知覚時の神経活動に対して与える影響を調査することである。

## 3. 研究の方法

神経活動の記録には広視野 2 光子顕微鏡を用いる(Ota et al., Neuron, 2021)。本顕微鏡は、観察視野 3mm × 3mm、サンプリングレート 7.5Hz、2048 × 2048 pixel の高解像度での 2 光子撮像が可能である。本顕微鏡によってマウスの大脳皮質の 2/3 層を撮像した場合、およそ 16000 個程度の神経細胞群の活動を同時記録することが可能である。観察視野に含まれる脳領域は、マウスの大脳皮質の場合、体性感覚野の後肢領域を含め計 14、15 領域程度が含まれる。このような顕微鏡によって大規模な神経活動データを取得する。

広視野で神経活動を記録する場合、カルシウムセンサーを広域に発現させる必要がある。本研究では、生後 1 日の仔マウスにアデノ随伴ウイルスによるウイルスベクターをインジェクションする。カルシウムセンサーは様々検討を行なった結果、G-CaMP7.09 が S/N 比がよく像を取得できることがわかったため、採用した。インジェクションから 4 週後に経頭蓋で発現を確認し、広域に GCaMP が発現していることを確認した後、さらに 1 か月 adult になるのを待った上で開口窓手術を行い、その後の実験に使用する。なお、広域に GCaMP を発現させる本手法に関してはチーム内の他研究員とともに論文として投稿した(Oomoto et al., STAR Protoc., 2021)。

本研究では知覚時の神経活動の解析を行うため、手術後のマウスに知覚課題を行わせる。具体的には、マウスの後肢に微弱な電気刺激を与える。マウスがその刺激を知覚した場合には、Lick という舐める行為を行うよう学習させる。マウスが刺激に対して適切に Lick した場合は、センサーによってそれを検出し、Hit として報酬の水を与える。刺激に対して Lick しなかった場合は Miss とする。刺激を与えないトライアルも用意し、刺激がないにも関わらず Lick した場合は FA(False Alarm)を鳴らし、Lick をしなかった場合(適切に我慢した場合)は CR(Correct Rejection)とする。つまり、Hit・Miss・FA・CR という 4 つのトライアル結果がある。なおトレーニングに要する期間は 1 か月程度であり、Hit 率が 90%以上かつ FA 率が 10%未満となった個体をエキスパートとし、広視野 2 光子顕微鏡下での実験及び神経活動記録に使用する。神経活動の記録前に予備実験として刺激強度に対する Hit 率のサイコメトリックカーブを取得する。広視野 2 光子顕微鏡下で神経活動を記録する際は Hit と Miss のトライアルがある程度均等に含まれることが解析的に望ましいため、サイコメトリックカーブにおいて Hit 率が 50%となる刺激強度を用いて知覚課題を実行し、広視野 2 光子顕微鏡によって神経活動を記録する。

広視野 2 光子顕微鏡によって取得した 2 光子像の連続画像データから神経細胞を検出し、個々の神経細胞の活動を波形として抽出する一連のアルゴリズムは既に開発済の手法を用いる(Ito et al., Neurosci. Res., 2022)。最終的に得られた神経活動波形をもとに、Hit と Miss の比較解析を行う。

## 4. 研究成果

広視野 2 光子顕微鏡によって得られた知覚課題中の大規模神経活動データに対し、まずは後肢刺激に対する個々の神経細胞の応答に関して、刺激直後のカルシウム波形の立ち上がりを見出し、Hit/Miss それぞれのトライアル種で評価した。その結果、Miss トライアルでは応答に関する分布の平均が 0 付近にあり、分散の小さい分布となった。つまり、Miss 時にはほとんどの細胞で

応答が見られないことを示唆する。一方で、Hit 時は分布の平均が負に傾き、分散も Miss 時より顕著に大きくなった。つまり、後肢刺激時には多数の神経細胞の活動が全体としては抑制傾向にあり、かつ一部の細胞は後肢刺激によって強い応答を示し、また一部の細胞は強く抑制されていることを示唆する。この結果を広視野における脳領域毎に評価したが、特に顕著な特徴は見られなかった。ただ、Hit 時の応答性の高い細胞は体性感覚野に多い傾向が若干見られた。

この結果を受け、脳領域に捉われず広域において特定のアンサンブル(神経細胞集団)によって情報表現が行われているのではないかと考え、記録した神経活動データから類似するポピュレーション活動を検出するようなアンサンブル解析を行った。なおこの解析のベースは既存研究を参考にし、データの性質に合わせて適宜パラメータを調整して解析を行った(Ortega et al., eLife, 2021)。この解析によって、数百個~1000 個程度の細胞集団から構成されるようなアンサンブルが 6 つ検出された。この解析は教師なしで共に活動しやすい神経細胞集団を検出するような解析方法であるが、アンサンブルによっては Hit 時によく活動し、Miss 時には活動しないものもあった。検出されたアンサンブルの活動は Miss 時と比較して Hit 時に高いことが分かった。しかし、Hit 時と FA 時(後肢刺激がないにも関わらず Lick している場合)を比較すると、多くのアンサンブルでは同程度の活動状態であったため、Hit 時と FA 時(ともに Lick をしているトライアル)の情報表現が類似していることが示唆された。言い換えると、教師なしでアンサンブルを検出した場合、運動情報のある程度含んだものであることが示唆された。

知覚課題中の神経活動を記録した場合でも、広視野で観察している大規模な神経細胞群は多様な神経活動を生じていると考えられる。その中で課題中にもし特定の神経活動のパターンが繰り返し生じているとすると、神経活動の次元を削減した際にそのパターンを抽出できる可能性がある。そこで、主成分分析を用いた解析を行った。その結果、課題中のそれぞれのトライアルにおいて、Hit トライアルでは主成分分析による上位 3 次元の神経空間において、神経活動の時間方向の軌道が類似し、ループ様構造をとることがわかった。つまり、Hit トライアル中は類似した神経活動が繰り返し生じていることが示唆される。一方で、同一の神経空間において Miss トライアルの神経活動の軌道を可視化すると、軌道の遷移がほとんど見られなかった。このことは、Miss 時の活動レベルが全体として低いか、もしくは Hit トライアルにおいて活発になる神経細胞群は Miss 時には活動しない、ということを示唆している。つまり先ほどのアンサンブル解析の結果と対応が見られる。また面白いことに、この上位 3 次元の神経空間におけるトライアル内の後肢刺激直前のタイミングのポピュレーション活動のプロットが、Hit トライアルと Miss トライアルで分かれることが分かった。このことは、後肢刺激直前の神経活動の状態によって Hit と Miss の結果が分かれることを示唆している。なお、Hit トライアルと FA トライアルを主成分分析を用いて解析した場合、Hit トライアルで見られるようなループ様の神経活動の軌跡に類似した軌道が FA トライアルでも見られた。しかし必ずしも一致するわけではなかったため、ポピュレーション活動としては異なるものであると考えられる。Hit トライアルと FA トライアルでは刺激情報の有無という違いがあるため、その違いによる神経活動の差異が現れている可能性がある。今回行った知覚課題の場合、後肢刺激直後にマウスが Lick を行うため、Hit トライアルと FA トライアルで共通する運動成分を分離して解析することは難しい。分離して考える際には後肢刺激後に遅延時間を挟んだうえで Lick をさせるような知覚課題を行う必要があると考えられる。

本研究で得られた成果を簡単にまとめ、今後の展望について述べる。本研究では知覚課題中の大規模神経活動を広視野カルシウムイメージングによって記録した。その結果、Hit 時には全体として神経細胞の活動が抑制されつつも一部の細胞が特に活性化もしくは特に抑制されることがわかった。一方で Miss 時には全体として活動レベルが低いことがわかった。アンサンブルに着目すると、Hit 時にアンサンブル活動を生じやすいことがわかった。主成分分析によって全体としての活動パターンを抽出すると、Hit トライアルで安定した神経活動の軌道が見られることがわかり、また後肢刺激直前の神経活動の状態が Hit と Miss で異なることがわかった。本研究の目的として、後肢刺激直前の自発活動の状態が知覚に与える影響を調査することが挙げられる。少なくとも本研究によって後肢刺激直前の自発活動の状態がその後の知覚の有無に対応して異なることが分かった。メカニズムに関してさらに検証していくためには、特定の神経細胞群において顕著に後肢刺激直前の活動状態が異なるのか、それとも毎トライアルにおいて神経細胞群としては異なっても、何かしらの法則に基づいて後肢刺激直前の活動状態が異なるのか、を明らかにする必要がある。どちらの場合においても、活動状態が後肢刺激直前に変わりうる細胞をターゲットとして光遺伝学的手法を用いて神経活動を操作し、その操作によって知覚状態が変わりうるか否かを検証する必要がある。そのためには広視野 2 光子顕微鏡下で単一神経細胞レベルでのレーザーによる光刺激を実現させなければならない。その導入に関しては既に進めており、ソフト・ハードともに開発はほぼ完了している。そのため、解析的に重要な神経細胞群を抽出した上で、光遺伝学的手法を用いた検証を今後進めていく。それにより、後肢刺激直前の自発活動状態が知覚に対してもたらず影響のさらなるメカニズムを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ota Keisuke, Oisi Yasuhiro, Suzuki Takayuki, 他19名	4. 巻 109
2. 論文標題 Fast, cell-resolution, contiguous-wide two-photon imaging to reveal functional network architectures across multi-modal cortical areas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1810 ~ 1824.e9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2021.03.032	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Omoto Ikumi, Uwamori Hiroyuki, Matsubara Chie, Odagawa Maya, Kobayashi Midori, Kobayashi Kenta, Ota Keisuke, Murayama Masanori	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for cortical-wide field-of-view two-photon imaging with quick neonatal adeno-associated virus injection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101007 ~ 101007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.101007	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

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

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