

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03359

研究課題名（和文）新皮質運動野におけるトップダウン入力と局所振動の機能連関

研究課題名（英文）Functional linkages between top-down inputs and local oscillation in the motor cortex

研究代表者

川口 泰雄（KAWAGUCHI, Yasuo）

玉川大学・脳科学研究所・研究員

研究者番号：40169694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：大脳皮質運動野は運動学習に必要なだと知られているが、学習に関連した活動・回路変化はよく分かっていない。運動野錐体細胞は、1層で高次野と視床からの軸索と、5層では抑制性細胞と結合を作る。本研究では、運動野錐体細胞の1層と5層のシナプス回路機能を探索した。1層では、高次野から投射する細胞を同定し、運動学習において高次野入力の一時的変化に従って視床入力の再編が決まり、学習記憶は新生・持続した視床入力スパインで伝えられることを明らかにした。5層では、錐体細胞サブタイプである錐体路細胞と抑制性細胞サブタイプであるFS細胞の相互結合によって、学習促進に必要な局所振動が起きることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質の運動制御機構を理解するには、運動野における局所振動の発生機構と機能的役割や、運動野への高次皮質入力と視床入力の構造的・機能的違いを知る必要がある。本研究は、運動野振動の回路構造と学習への関与、および高次皮質と視床から運動野への投射様式・可変性規則を明らかにしたことで、前頭皮質の運動学習における同期的・階層的処理の理解に貢献した。

研究成果の概要（英文）：Motor cortex is known to be necessary for motor learning, but its activity and circuit changes are not well understood. In layer 1 of the motor cortex, pyramidal cells make synapses with axons from both higher cortical areas and the thalamus, and in layer 5 with local inhibitory neurons. This research project investigated the function of synaptic circuits in layer 1 and 5 of the motor cortex. We identified pyramidal cell subtypes in higher-order areas that innervate layer 1 of the motor cortex. We found that newly-formed inputs from the higher-order areas specify changes in thalamic inputs during motor learning, and that the motor memories are transmitted by newly-formed, persistent thalamic input synapses. In layer 5, the local oscillatory activity required to facilitate motor learning was found to be generated by reciprocal synaptic interactions between a subtype of pyramidal cells (pyramidal tract cells) and a subtype of GABAergic cells (fast spiking cells).

研究分野：神経科学

キーワード：前頭皮質 運動野 皮質間投射 錐体細胞 FS細胞 スパイン 運動学習 振動

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

齧歯類が新しい行動パターンを獲得するには、一次運動野(M1)の活動が必要なことが知られている。M1への主要な外部入力の前頭皮質高次野の二次運動野(M2)と、大脳基底核から入力を受ける視床核から来ている。基底核は有用な行動を選択するのに必要だと考えられており、その出力は視床を経由し、M1の1層へ入る。一方、M2からM1への軸索はトップダウン投射と呼ばれる支配様式で1層や5層に分布し、それが行動結果の予測情報を伝えるという仮説が提案されている。従って、これらの1層入力群は経験したことの無い状況での新規行動の学習に必要な不可欠な情報を与える可能性があるが、高次野・視床入力の機能的関係は殆ど分かっていなかった。

大脳皮質のパルブアルブミン陽性FS(fast spiking)細胞はGABA細胞の主要なサブタイプであり、感覚系皮質では、FS細胞が興奮/抑制バランスを調節することによってシナプス可塑性を誘発/終了させることや、ガンマ振動によって情報を同期的に伝える機能が提唱されている。しかし、運動野では、FS細胞の運動学習や振動生成への関与は殆ど分かっていなかった。

そこで、私たちは運動制御・学習を理解するために、M1におけるM2からのトップダウン入力と基底核からの視床経由入力の相互作用、および局所振動の発生条件・メカニズムを明らかにする必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

前頭皮質高次野であるM2の錐体細胞の軸索はトップダウンと呼ばれる投射様式で、M1の1層や5層に分布する。一方、M1の5層錐体細胞は、1層で樹状突起タフトを発達させ、そこでM2錐体細胞だけでなく大脳基底核の出力を受ける視床からの軸索とシナプス結合を作るので、二種類の入力が相互作用する可能性がある。5層錐体細胞は5層内では、抑制性のパルブアルブミンFS細胞と結合を作り、その相互結合性・伝達特性から局所振動を作る可能性がある。M1は、新規の運動を学習する際に必要だと考えられている。本研究では、M2からM1へのトップダウン投射の回路実体を明らかにするとともに、1層では皮質間トップダウン・視床入力の運動学習における機能分担を探索するとともに、5層では錐体細胞・FS細胞の相互結合によって起きる振動の特性・生成機構を解明することを目標にした。これらの解析に必要な二光子・共焦点・電子顕微鏡像の相関解析手法の開発も目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 錐体細胞サブタイプの同定とシナプス結合解析

前頭皮質5層の終脳内投射(IT: intratelencephalic)細胞の同定のために、このサブタイプ選択的にCreを発現する遺伝子改変マウス(Tlx3系統)を利用した。錐体細胞の投射先は、運動・体性感覚・聴覚・嗅周皮質への逆行性蛍光トレーサー注入で同定した。錐体細胞の遺伝子サブタイプを、転写因子に対する抗体の免疫組織化学で同定した。錐体細胞サブタイプが逆行性トレーサーで蛍光標識された前頭皮質から作成した脳切片標本で、2個の標識細胞から同時ホールセル記録することで、錐体細胞サブタイプのシナプス結合解析を行った。

#### (2) 錐体細胞サブタイプの光操作

三種類の錐体細胞サブタイプ(2/3層錐体細胞、5層IT細胞、5層錐体路(PT: pyramidal tract)細胞)は発生時期が異なるので、発生時期特異的の子宮内電気穿孔法を使って、サブタイプ選択的にChannelrhodopsinを導入した。これらの動物から作成した脳切片標本で、錐体細胞サブタイプ選択的な光刺激を実施した。

#### (3) 投射経路選択的な化学遺伝学的抑制

巧緻運動学習におけるM1への皮質間・視床入力の役割を比較するために、それぞれの入力を化学遺伝学的に操作した。そのために、M1へCreを発現する逆行性ウイルス注入と、M2または視床へのCre依存的に化学抑制受容体を発現するウイルス注入を行った動物にCNO投与して、皮質間または視床入力を選択的に抑制した。

#### (4) 運動学習に伴うスパイン形態・入力の変化

5層錐体細胞が蛍光標識された遺伝子改変動物(Thy1系統)を用いて、M1錐体細胞の1層樹状突起で運動学習に伴って起きるスパイン新生を、二光子顕微鏡を使って観察した。二光子顕微鏡観察したスパインへの入力タイプ(皮質または視床由来)同定やシナプス構造観察のために、二光子・共焦点・電子顕微鏡相関解析の手法を開発した。皮質・視床入力は、それぞれの特異的の化学マーカーに対する免疫組織化学で同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) M2(二次運動野)からM1(一次運動野)へ投射するIT(終脳内投射)細胞のサブタイプ

マウスにおいてM2からM1の1層への軸索終末が錐体細胞樹状突起タフトへシナプスすることや、M2からM1へトップダウン投射する錐体細胞は主に2/3層と5層にあることを確認した(Sohn et al. 2022)。その上で、M2の5層IT細胞のM1の1層投射様式を解析した(Im et al. 2023)。5層IT細胞に選択的にCreを発現する遺伝子改変マウスを用いて蛍光標識したM2-5層IT細胞の軸索は、M1の1層に分布していた。M1皮質表面に逆光性トレーサーを適用すると、M2

の5層IT細胞の6割ほどが標識され、5層IT細胞軸索の層分布に多様性があることが考えられた。転写因子の一つであるER81(ETV1)が5層IT細胞の一部に発現していたので、1層投射とER81発現の関係を調べた。その結果、M1の1層へ投射する5層IT細胞がER81を発現していた。

M2の5層はM1だけでなく、一次体性感覚皮質(S1)、聴覚皮質、嗅周皮質にも投射する。そこで、S1、聴覚皮質、嗅周皮質に逆行性トレーサーを適用して、M2の5層IT細胞(転写因子Ctip2陰性)の皮質間投射先とER81発現の関係を調べた(Im et al. 2023)。S1投射細胞はM1投射細胞と同様に、6割程がER81陽性だったのに対して、聴覚皮質・嗅周皮質投射細胞の多くがER81陽性だった。S1投射細胞でも、その1層投射細胞の殆どがER81陽性だった。皮質間投射を同定した細胞をホールセル記録で調べると、5層IT細胞のサブタイプである嗅周皮質投射細胞はIT細胞全体より入力抵抗が低く、IT細胞間よりシナプス結合確率が高かった。M2の5層IT細胞は1層投射が強く、遠隔皮質まで投射するER81陽性細胞と、1層にあまり投射せず、M1やS1によく投射するER81陰性細胞のサブネットワークから成ることが分かった。

### (2) 前頭皮質の振動生成回路の同定

新皮質では興奮性錐体細胞とGABA作動性のパルブアルブミンFS細胞との相互結合が局所振動の生成に必要なと想定されている。前頭皮質5層錐体細胞には、IT細胞とPT(錐体路)細胞という二種類のサブタイプがあるが、振動現象への関与の違いは知られていない。5層錐体細胞への主要な局所入力である2/3層細胞にチャンネルロドプシンを発現させ、脳切片標本で強度が漸増する、振動成分のない光刺激すると、5層錐体細胞にベータ/ガンマ帯域の膜電位振動(約30Hz)が観察された(Otsuka and Kawaguchi 2021)。膜電位振動はIT細胞よりPT細胞で大きかった。FS細胞にも膜電位振動が起きたが、振動位相が錐体細胞と異なっていた。FS細胞間の電気結合を薬理的に抑えると、この振動も小さくなった。5層のPT細胞を漸増光刺激で選択的に興奮させると、ベータ/ガンマ帯域の振動が引き起こされたのに対して、5層IT細胞刺激では誘発されなかった。

この振動が5層局所のPT細胞とFS細胞の相互作用で作られることを更に確認するために、私たちがこれまでに明らかにした、前頭皮質5層のPT、IT、FS細胞の内因的特性、同種間・異種間の化学シナプス特性、2/3層錐体細胞からの入力特性と、FS細胞の電気結合特性を使って、局所回路モデルを作った(Otsuka and Kawaguchi 2021)。このモデル回路で2/3層錐体細胞を漸増興奮させると、PT細胞とFS細胞にベータ/ガンマ振動が誘発された。前頭皮質の振動誘発におけるPT細胞の重要性が実験的にも計算論的にも明らかになった。

### (3) 前頭皮質間トップダウン投射の巧緻運動学習への関与

マウスが片方の前肢を使って、スリットの先に置いた餌を採れるようになる行動学習の時間経過を定量化した(Sohn et al. 2022)。この学習に関与するM1前肢領域へ出力するM2錐体細胞に、M1からの逆行性ウィルスとM2での局所ウィルス注入の手法を組み合わせることで抑制性受容体を発現させ、その活動を化学的遺伝学的に抑制したところ、学習の進捗が阻害された。

形態的にはM2からM1へのトップダウン投射の軸索終末は1層に多く分布する。興奮性シナプス後部マーカー標識を組み合わせ、M2からM1の1層への終末が、蛍光標識された5層錐体細胞樹状突起タフトのスパインへシナプスすることを確認した。M1の5層錐体細胞の1層樹状突起では、マウスの巧緻運動学習に伴って、スパインの新生が増強する。新生スパインの学習に伴う形態変化を解析した結果、皮質入力スパインは存続したものでも、頭部が縮小する傾向があったのに対して、視床入力スパインは増大することが分かった。また、学習形成に必要なM2からの皮質入力を、学習後に化学遺伝学的に抑制しても習熟した動作に影響を与えなかったのに対して、視床入力を抑制すると学習した運動が阻害された。これらの結果から、巧緻運動学習においてはM2からM1へのトップダウン投射の一時的改変によって、視床からM1への入力の再編の仕方が決まり、学習記憶は新生・存続した視床入力スパインによって伝えられると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sohn Jaerin, Suzuki Mototaka, Youssef Mohammed, Hatada Sayuri, Larkum Matthew E., Kawaguchi Yasuo, Kubota Yoshiyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Presynaptic supervision of cortical spine dynamics in motor learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abm0531	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 該当する
1. 著者名 Tsuboi Daisuke, Otsuka Takeshi, Shimomura Takushi, Faruk Md Omar, Yamahashi Yukie, Amano Mutsuki, Funahashi Yasuhiro, Kuroda Keisuke, Nishioka Tomoki, Kobayashi Kenta, Sano Hiromi, Nagai Taku, Yamada Kiyofumi, Tzingounis Anastasios V., Nambu Atsushi, Kubo Yoshihiro, Kawaguchi Yasuo, Kaibuchi Koza	4. 巻 40
2. 論文標題 Dopamine drives neuronal excitability via KCNQ channel phosphorylation for reward behavior	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111309	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 Im Sanghun, Ueta Yoshifumi, Otsuka Takeshi, Morishima Mieko, Youssef Mohammed, Hirai Yasuharu, Kobayashi Kenta, Kaneko Ryosuke, Morita Kenji, Kawaguchi Yasuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Corticocortical innervation subtypes of layer 5 intratelencephalic cells in the murine secondary motor cortex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 50 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhac052	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 該当する
1. 著者名 Morita Kenji, Shimomura Kanji, Kawaguchi Yasuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Opponent Learning with Different Representations in the Cortico-Basal Ganglia Circuits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0422-22.2023	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 Otsuka T, Kawaguchi Y	4. 巻 4
2. 論文標題 Pyramidal cell subtype-dependent cortical oscillatory activity regulates motor learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02010-7	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 Kubota Y	4. 巻 169
2. 論文標題 Morphological and neurochemical characterization of electrophysiologically identified cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuromethods	6. 最初と最後の頁 353- 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1522-5_24	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 Fang L, Monroe F, Novak SW, Kirk L, Schiavon CR, Yu SB, Zhang T, Wu M, Kastner K, Latif AA, Lin Z, Shaw A, Kubota Y, Mendenhall J, Zhang Z, Pekkurnaz G, Harris K, Howard J, Manor U	4. 巻 18
2. 論文標題 Deep learning-based point-scanning super-resolution imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Methods	6. 最初と最後の頁 406-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-021-01080-z	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 該当する

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 3件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hou X, Morishima M, Sugi J, Sakimura K, Kawaguchi Y, Sugiyama S
2. 発表標題 Experience-dependent actin organization specifies dendritic properties in cortical interneurons
3. 学会等名 SFN Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田芳之, 畑田小百合, 山口登, Alsayed A. Mohamed, 田中康裕, 川口泰雄
2. 発表標題 ラットの大脳皮質細胞へのシナプス入力特性
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 任翔フン, 植田禎史, 大塚岳, 田中康裕, 川口泰雄
2. 発表標題 前頭皮質5層錐体細胞の皮質間投射多様性
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口泰雄
2. 発表標題 Corticocortical innervation diversity and plasticity of pyramidal cells in rodent frontal cortex
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 (2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田芳之, 孫在隣, 川口泰雄
2. 発表標題 学習に伴う大脳皮質一次運動野の神経回路構築のリモデリング
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 孫在隣, Mohammed Y, 川口泰雄, 窪田芳之
2. 発表標題 皮質 - 皮質間連絡・視床 - 皮質投射の入力依存的な運動学習時回路動態
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田芳之, 孫在隣, 倉本恵梨子, Mohammed Y, 日置寛之, 川口泰雄
2. 発表標題 大容量電顕データセットを使った視床-大脳皮質神経終末のシナプスターゲット解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田芳之
2. 発表標題 導電性カーボンナノチューブコートPETテープに乗せた神経組織の高解像度電子顕微鏡撮影とその解析法
3. 学会等名 第59回 フラレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田芳之, 川口泰雄
2. 発表標題 非錐体細胞の樹状突起へのシナプス入力特性
3. 学会等名 第10 回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sohn J, Suzuki M, Mohammed Y, Hatada S, Larkum ME, Kawaguchi Y, Kubota Y
2. 発表標題 Synaptic reconfiguration in motor cortex underlies acquisition of proficient motor skill
3. 学会等名 第10回 生理研-豊長研-新潟脳研合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田芳之, 川口泰雄
2. 発表標題 ラットの大脳皮質細胞へのシナプス入力特性
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 孫在隣, 川口泰雄, 窪田芳之
2. 発表標題 運動学習時の皮質 - 皮質間連絡・視床 - 皮質投射の神経回路再編成
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田賢治, 下村寛治, 川口泰雄
2. 発表標題 二つの皮質基底核経路で異なる状態表現が使用される場合の理論的検討
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 大塚岳, 川口泰雄
2. 発表標題 学習を制御する運動野の機能的回路
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 孫在隣, 川口泰雄, 窪田芳之
2. 発表標題 運動学習による大脳皮質運動野での入力依存的なシナプス可塑性
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井 大輔, 大塚 岳, 下村 拓史, Md.Faruk Omar, 山橋 幸恵, 天野 睦紀, 佐野 裕美, 永井 拓, 山田 清文, Anastasios V. Tzingounis, 南部 篤, 久保 義弘, 川口 泰雄, 貝淵 弘三
2. 発表標題 ドーパミンは KCNQチャネルのリン酸化を介して神経細胞の興奮性を高めることで報酬行動を促進させる
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sohn J, M. Suzuki M, Larkum ME, Y. Kawaguchi Y, Kubota Y
2. 発表標題 Cortical spine dynamics during a single seed grasp motor learning
3. 学会等名 SFN Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawaguchi Y
2. 発表標題 Top-down instructions in motor learning
3. 学会等名 3rd International Symposium on Brain Information Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sohn J, Kawaguchi Y, Kubota Y
2. 発表標題 Cortical spine dynamics and microcircuit remodeling during motor learning
3. 学会等名 3rd International Symposium on Brain Information Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田芳之、孫在隣、川口泰雄
2. 発表標題 一次運動野運動野神経回路で運動学習時に生じるリモデリング
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田芳之、川口泰雄
2. 発表標題 大容量電子顕微鏡画像データとコネクトミクス
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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	窪田 芳之  (KUBOTA Yoshiyuki)  (90192567)	生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授   (63905)	

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			
ドイツ	Humboldt University of Berlin			
エジプト	South Valley University			