

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06922

研究課題名（和文）イメージングとグラフィカルモデリングによる睡眠中大脳皮質動態の解明

研究課題名（英文）Understanding of dynamics of the sleeping cortex using imaging and graphical modeling

研究代表者

上田 壮志（Kanda, Takeshi）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00599821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：多様な機能的意義をもつ睡眠だが、その特殊な脳状態において、大脳皮質局所ネットワークがどのような機能的ネットワークを構成しているかは未解明であった。本研究では、2光子カルシウムイメージングによる神経活動計測と機械学習による多変量時系列データ解析を融合することで、その複雑な様相に潜在する機能的構造の抽出を実現した。局所ネットワーク解析は、ノンレム睡眠で疎に、レム睡眠で密になった。この局所ネットワーク動態がシナプス伝達を変動させ、睡眠時特有の情報伝達様式への切り替えを促すと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では睡眠・覚醒に伴い大脳皮質局所ネットワークのダイナミクスを解明した。脳の状態に依存した内部ネットワークの切り替えの実態は未解明な部分が多かったが、神経生理学と機械学習の統合によって新しい側面を発見することができた。この発見は睡眠時特有の脳機能の解明に大きく貢献する。脳の状態に依存した内部での処理様式の変化は睡眠に限らない。その大きな異常は統合失調症などの精神疾患として表れる。本研究の開発した手法は脳が内部でどのような機能的ネットワークを構築するかを捉え、精神疾患の病態解明ひいては治療法開発にも貢献すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Sleep has diverse functions, but it has not yet been clarified what kind of functional networks emerge in the cerebral cortex during sleep. In this study, we combined the measurement of multiple neural activity with two-photon calcium imaging and multivariate time series data analysis with machine learning to extract the functional network structures. Cortical local network was sparse in non-REM sleep and dense in REM sleep. This cortical local network dynamics could change synaptic efficacy and promote a switch to a sleep-specific mode of information transmission.

研究分野：神経生理学

キーワード：睡眠 イメージング 機械学習

1. 研究開始当初の背景

脳は情報の入力、処理、出力を実行する情報処理に特化した生体器官である。その情報処理様式はコンピュータのように一定ではなく、内部状態に依存して切り替わる。例えば、覚醒時は外界からの刺激を速やかに認識し鋭く反応できる。同じ外界刺激でも睡眠時はその応答が鈍化する。つまり、睡眠時は外界からの情報の処理を制限している。ただし、その時、脳は単純にオフになっているのではなく、内部に蓄積済みの情報の処理を優先しており、学習や記憶のような情報の取捨選択や保存が睡眠中に実行される。このような内部状態に依存して脳の情報処理様式が切り替わる特性は、コンピュータと異なる脳の大きな特徴であり、脳が生体器官にも関わらず高いエネルギー効率と高度な情報処理性能を実現できるのはこのおかげである。この特徴は脳機能を支える根幹の一つだが、どのような仕組みでつくられているか未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は脳がその状態に依存して情報処理様式を切り替えるメカニズムの解明である。脳の情報伝達とはニューロン間のシナプス伝達である。そのシナプス伝達の効率の変化が、情報のフローを決定する。要は情報伝達様式の切り替わりとはシナプス伝達効率の増減である。睡眠・覚醒状態はシナプスの構造変化に影響を与えることが知られているが、その変化を促す原因は不明であった。シナプス伝達効率はニューロンの共活動に依存して変化が起こる。あるシナプスを構成する2つのニューロンが同時に活動すれば伝達効率が増加し、活動がバラバラならば伝達効率は減少する。本研究ではこのニューロン間の共活動、つまりは局所ネットワークのダイナミクスに着目した。次に標的とすべき脳領域だが、大脳皮質とした。脳の情報統合の場であり、脳状態の変化に最も強く影響を受けるからである。さらに、睡眠・覚醒状態における大脳皮質の局所ネットワークレベルの挙動は未探索であり、その解明には重要な意義がある。

3. 研究の方法

実験動物はマウスを用い、観察領域は一次運動野の2/3層とした。ここは層内のシナプス接続が密で、局所ネットワークの研究に適している。局所ネットワークを捉えるために複数ニューロンの活動を計測可能なカルシウムイメージング法を採用した。カルシウムプローブはGCaMP6sを用い、アデノ随伴ウイルスベクターで発現させた。後述する解析には高いS/N比のデータが必須だったため、2光子励起顕微鏡でイメージングを行った。イメージングを用いた理由のもう一つは、蛍光標識によってニューロンタイプがin vivoで分類可能な点である。本研究では大脳皮質において抑制性ニューロン特異的にtdTomatoが発現する遺伝子改変マウスを既存のマウスラインの交配により作製した。その特異的発現は組織学的に確認した。頭部固定下でマウスが自然な睡眠状態に遷移するトラックボール型トレッドミルと馴化法は独自開発を行った。睡眠・覚醒状態は脳波・筋電図解析で判定した(覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の3分類)。断眠はマウスへのランダムなエアパフ刺激で行った。局所ネットワークの挙動解明のために、複数ニューロンのカルシウムイメージングデータの機械学習による多変量時系列解析を行った。ガウス型グラフィカルモデルを用い、ニューロン間の共活動はグラフィカルlassoで推定した。スパース性を決めるグラフィカルlassoの正則化パラメータはカルシウムイメージングデータを直接確認してノイズを回避できる値とした。グラフィカルlassoが推定する精度行列はその時間のニューロン間の共活動を反映する。精度行列で非ゼロ成分を示すニューロンペアを機能的結合性あり(共活動あり)と判定した。あるニューロンペアにおいて非ゼロ成分が出現する確率を機能的結合性成立確率(共活動の起こりやすさ)とした。この確率が高いと密で、低いと疎なネットワークとなる。

4. 研究成果

大脳皮質の個々のニューロンの平均的活動レベルは、レム睡眠>覚醒>ノンレム睡眠の順であり、興奮性と抑制性ニューロンで差異はなかった。これは従来の電気生理学的手法と同じ結果であった。局所ネットワーク解析では、機能的結合性成立確率がノンレム睡眠で低下し、レム睡眠で上昇した。これは局所ネットワークがノンレム睡眠で疎に、レム睡眠で密になったことを示す。前述のシナプスの特性を鑑み、シナプス伝達効率がノンレム睡眠に減弱し、レム睡眠で増加する原因の一つがこのネットワーク動態と考えられる。さらに、断眠実験を行った。断

眠中の覚醒は認知能力が低下し、断眠後に深い睡眠である回復睡眠が起こることが知られている。断眠中と回復睡眠は自然な覚醒と睡眠と比較して、個々のニューロンの活動レベルでは影響を与えなかった。局所ネットワークレベルでは、断眠中に過密（自然な覚醒より密）回復睡眠中に過疎（自然なノンレム睡眠より疎）となった。これは局所ネットワーク動態にも恒常性があり、断眠によるシナプスの過剰な増加を回復睡眠で元に戻す作用があると考えられる（参考文献8）。

このような神経生理学と機械学習の統合はグラフィカルモデリング以外にも行った。非負値行列因子とモデル平均化法によって大脳皮質ニューロンのクラスター解析を行い、ノンレム睡眠中には大きなクラスターが出現することを発見した（参考文献5）。本期間中には、睡眠による個々のニューロンのバースト発火とカルシウム上昇（参考文献7）従来法では難しかった睡眠による発火パターン変化のHawkes過程での検出（参考文献1）も報告した。また、本研究の過程で得た実験手法や解析手法は、身体状態と相互に関わる脳内の生理現象の発見にも貢献した（参考文献2、3、4、6）、研究を継続することができた。本研究の目標の一つであった学習過程と局所ネットワークとの関係に関しては、期間の途中に研究拠点の移動があったため、今後継続する課題とした。本研究は数多くの研究者との共同研究で成せたものであり、特に宮崎峻弘（東京医科大学）と日野英逸（統計数理研究所）の両氏には深い謝辞を申し上げたい。

参考文献

- (1) **Takeshi Kanda**, Toshimitsu Aritake, Kaoru Ohyama, Kaspar E Vogt, Yuichi Makino, Thomas McHugh, Hideitsu Hino, Shotaro Akaho, Noboru Murata. Hawkes process modeling quantifies complicated firing behaviors of cortical neurons during sleep and wakefulness.. bioRxiv. DOI:10.1101/2023.07.29.550297
- (2) Ai Miyasaka **Takeshi Kanda** Naoki Nonaka Yuka Terakoshi Yoan Cherasse Yukiko Ishikawa Yulong Li Hotaka Takizawa Jun Seita Masashi Yanagisawa Takeshi Sakurai Katsuyasu Sakurai Qinghua Liu. Sequential Transitions of Male Sexual Behaviours Driven by Dual Acetylcholine-Dopamine Dynamics. bioRxiv. DOI:10.1101/2023.12.21.572798
- (3) Nakatsuka D, **Kanda T**, Sato M, Ishikawa Y, Cherasse Y, Yanagisawa M. A novel GABAergic population in the medial vestibular nucleus maintains wakefulness and gates rapid eye movement sleep. iScience. 2024 Feb 21;27(3):109289. doi: 10.1016/j.isci.2024.109289.
- (4) Takahashi TM, Hirano A, **Kanda T**, Saito VM, Ashitomi H, Tanaka KZ, Yokoshiki Y, Masuda K, Yanagisawa M, Vogt KE, Tokuda T, Sakurai T. Optogenetic induction of hibernation-like state with modified human Opsin4 in mice. Cell Rep Methods. 2022 Nov 14;2(11):100336. doi: 10.1016/j.crmeth.2022.100336.
- (5) Nagayama M, Aritake T, Hino H, **Kanda T**, Miyazaki T, Yanagisawa M, Akaho S, Murata N. Detecting cell assemblies by NMF-based clustering from calcium imaging data. Neural Netw. 2022 May;149:29-39. doi: 10.1016/j.neunet.2022.01.023.
- (6) Tsai CJ, Nagata T, Liu CY, Suganuma T, **Kanda T**, Miyazaki T, Liu K, Saitoh T, Nagase H, Lazarus M, Vogt KE, Yanagisawa M, Hayashi Y. Cerebral capillary blood flow upsurge during REM sleep is mediated by A2a receptors. Cell Rep. 2021 Aug 17;36(7):109558. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109558.
- (7) Ohyama K, **Kanda T**, Miyazaki T, Tsujino N, Ishii R, Ishikawa Y, Muramoto H, Grenier F, Makino Y, McHugh TJ, Yanagisawa M, Greene RW, Vogt KE. Structure of cortical network activity across natural wake and sleep states in mice. PLoS One. 2020 May 29;15(5):e0233561. doi: 10.1371/journal.pone.0233561.
- (8) Miyazaki T, **Kanda T**, Tsujino N, Ishii R, Nakatsuka D, Kizuka M, Kasagi Y, Hino H, Yanagisawa M. Dynamics of Cortical Local Connectivity during Sleep-Wake States and the Homeostatic Process. Cereb Cortex. 2020 Jun 1;30(7):3977-3990. doi: 10.1093/cercor/bhaa012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakatsuka Daiki, Kanda Takeshi, Sato Makito, Ishikawa Yukiko, Cherasse Yoan, Yanagisawa Masashi	4. 巻 27
2. 論文標題 A novel GABAergic population in the medial vestibular nucleus maintains wakefulness and gates rapid eye movement sleep	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109289 ~ 109289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.109289	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 Miyasaka Ai, Kanda Takeshi, Nonaka Naoki, Terakoshi Yuka, Cherasse Yoan, Ishikawa Yukiko, Li Yulong, Takizawa Hotaka, Seita Jun, Yanagisawa Masashi, Sakurai Takeshi, Sakurai Katsuyasu, Liu Qinghua	4. 巻 0
2. 論文標題 Sequential Transitions of Male Sexual Behaviours Driven by Dual Acetylcholine-Dopamine Dynamics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0 ~ 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.12.21.572798	査読の有無 無
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 Kanda Takeshi, Aritake Toshimitsu, Ohyama Kaoru, Vogt Kaspar E., Makino Yuichi, McHugh Thomas J., Hino Hideitsu, Akaho Shotara, Murata Noboru	4. 巻 0
2. 論文標題 Hawkes process modeling quantifies complicated firing behaviors of cortical neurons during sleep and wakefulness	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0 ~ 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.07.29.550297	査読の有無 無
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 Takahashi Tohru M., Hirano Arisa, Kanda Takeshi, Saito Viviane M., Ashitomi Hiroto, Tanaka Kazumasa Z., Yokoshiki Yasufumi, Masuda Kosaku, Yanagisawa Masashi, Vogt Kaspar E., Tokuda Takashi, Sakurai Takeshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Optogenetic induction of hibernation-like state with modified human Opsin4 in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100336 ~ 100336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100336	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 Nagayama Mizuo, Aritake Toshimitsu, Hino Hideitsu, Kanda Takeshi, Miyazaki Takehiro, Yanagisawa Masashi, Akaho Shotaro, Murata Noboru	4. 巻 149
2. 論文標題 Detecting cell assemblies by NMF-based clustering from calcium imaging data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Networks	6. 最初と最後の頁 29 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neunet.2022.01.023	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 Tsai Chia-Jung, Nagata Takeshi, Liu Chih-Yao, Suganuma Takaya, Kanda Takeshi, Miyazaki Takehiro, Liu Kai, Saitoh Tsuyoshi, Nagase Hiroshi, Lazarus Michael, Vogt Kaspar E., Yanagisawa Masashi, Hayashi Yu	4. 巻 36
2. 論文標題 Cerebral capillary blood flow upsurge during REM sleep is mediated by A2a receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109558 ~ 109558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109558	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 Ohyama Kaoru, Kanda Takeshi, Miyazaki Takehiro, Tsujino Natsuko, Ishii Ryo, Ishikawa Yukiko, Muramoto Hiroki, Grenier Francois, Makino Yuichi, McHugh Thomas J., Yanagisawa Masashi, Greene Robert W., Vogt Kaspar E.	4. 巻 15
2. 論文標題 Structure of cortical network activity across natural wake and sleep states in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0233561	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 Miyazaki Takehiro, Kanda Takeshi, Tsujino Natsuko, Ishii Ryo, Nakatsuka Daiki, Kizuka Mariko, Kasagi Yasuhiro, Hino Hideitsu, Yanagisawa Masashi	4. 巻 30
2. 論文標題 Dynamics of Cortical Local Connectivity during Sleep/Wake States and the Homeostatic Process	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 3977 ~ 3990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhaa012	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田壮志
2. 発表標題 Similar functional network structures in the primary motor cortex during quiet wake and slow-wave sleep revealed by calcium imaging and graphical modeling.
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田壮志
2. 発表標題 マウス成体脳ネットワーク動態の可視化、ウイルスベクターによる遺伝子導入から機械学習解析まで
3. 学会等名 Neuro2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田壮志
2. 発表標題 Similar functional network structures emerge in the primary motor cortex during quiet wake and slow-wave sleep revealed by calcium imaging and graphical modeling
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田壮志
2. 発表標題 カルシウムイメージングと機械学習による脳状態依存的に遷移する 皮質機能的ネットワークの定量化
3. 学会等名 第4回サル脳新技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田壮志、宮崎峻弘、坂本航太郎、日野英逸、柳沢正史
2. 発表標題 一次運動野の機能的ネットワークはquiet wake とnon-REM 睡眠時に類似構造をもつ
3. 学会等名 第15回 Motor Control 研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Kanda, Takehiro Miyazaki, Kotaro Sakamoto, Hideitsu Hino, Masashi Yanagisawa
2. 発表標題 Similar structures emerge in local cortical networks during quiet wake and NREM sleep
3. 学会等名 第31 回日本神経回路学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Kanda, Takehiro Miyazaki, Kotaro Sakamoto, Hideitsu Hino, Masashi Yanagisawa
2. 発表標題 Distinct network structures emerge in the primary motor cortex during active and quiet wake
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田壮志、宮崎 峻弘、日野英逸、柳沢正史
2. 発表標題 カルシウムイメージングと統計的機械学習によるノンレム睡眠中の大脳皮質に現れるスパースネット ワークの可視化
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 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本睡眠学会	4. 発行年 2024年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 700
3. 書名 睡眠学の百科事典	

〔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	日野 英逸 (Hino Hideitsu) (10580079)	統計数理研究所・モデリング研究系・教授 (62603)	

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