

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05775

研究課題名（和文）脳状態毎の超広域神経活動記録とクラスター/ハブ細胞の選択的操作法の開発

研究課題名（英文）Recording and manipulating hub/cluster neurons depending on brain states

研究代表者

村山 正宜（Murayama, Masanori）

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・チームリーダー

研究者番号：30578901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 48,300,000円

研究成果の概要（和文）：触覚の固定化に関わる睡眠中の神経活動を記録するため、研究室ですでに確立した触覚記憶課題を用い、広視野2光子顕微鏡を用いて神経活動をイメージングした。広視野2光子顕微鏡を用いた実験フローと関連手法についての詳細をまとめ、プロトコル論文として発表した（Oomoto et al., STAR protocols, 2021）。ハブ細胞が記憶の固定化に関連するかを調べるため、触覚記憶課題前後におけるハブ細胞集団の構成が時々刻々と変容するかどうか調べた。その結果、マウスが知覚記憶を形成すると、ハブ細胞集団の構成が不安定化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々は、脳内において100以上の他のニューロンと協調的に活動する非常にレアなハブ細胞を報告していたが、これら細胞が脳機能と関連するかは不明のままであった。今回の研究では、マウスが知覚記憶を形成すると、ハブ細胞集団の構成が不安定化することを見出した。我々は、この結果は、ハブ細胞を含む従来のネットワークに脳が新しい情報を書き込んでいる過程を捉えていると推察する。

研究成果の概要（英文）：In order to capture neural activity associated with the consolidation of tactile perceptual memories during sleep, we conducted experiments utilizing a texture recognition task developed in our laboratory. To visualize the neural activity, we utilized fast and wide-field two-photon microscopy. A detailed account of the experimental workflow and relevant methodologies employing this microscopy technique was summarized and published as a protocol paper (Oomoto et al., STAR protocols, 2021). To investigate the potential involvement of hub cells in memory consolidation, we examined whether the composition of the hub cell population undergoes dynamic changes before and after the tactile perception memory task. Our findings revealed that the composition of the hub cell population becomes destabilized when mice form perceptual memories.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶の固定化 大脳新皮質 ハブ細胞 広視野2光子顕微鏡 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

脳機能の発現に必要な最小単位は何だろうか？大脳皮質は、様々な内外情報に対して、選択的に情報処理を行う局所領域の集合体である。各領域には機能的順位の高い細胞が存在すると考えられており、ハブ細胞と呼ばれる。ある局所回路内のハブ細胞の活性化は、周辺の細胞を賦活し、脳機能を発現させることが知られている。では、こうした局所回路の活性化は脳機能発現の必要十分条件となりうるのだろうか。近年では、領域間相互作用により脳機能が発現すると考えられている。ハブ細胞の特性から推測すると、領域間相互作用にはハブ細胞が関連しているとだろう。本領域では、ハブ細胞を軸とした領域相互作用メカニズムの解明が、脳機能発現の謎を解き明かすヒントになると考える。しかし、これを検証するためには単一細胞レベルで多領域を観察する必要があるが、顕微技術の限界のため、革新的な問いは手つかずのままであった。すなわち、情報伝達の要となるハブ細胞がどのように領域間相互作用に関連するのか、関連するとしたらどのような形態的、遺伝子発現の要因によってハブ細胞と運命づけられるのか。こうした、細胞をハブたらしめる活動・形態・遺伝子発現特徴は全く未知のままであった。

### 2. 研究の目的

生体脳における広視野 2 光子顕微観察技術の発展により、大規模神経活動記録が可能になった。単一細胞レベルでのネットワーク解析の結果、多数の細胞と協調的に活動する細胞（ハブ細胞）の存在が明らかになってきている。この細胞は、その活動特徴より、脳機能本計画研究では、世界で唯一の超広視野 2 光子顕微鏡 (FASHIO-2PM) を用いた生体脳における大規模カルシウム ( $Ca^{2+}$ ) イメージングを実施し、ハブ細胞が有する発火特性とハブ決定因子を解明するため、超広視野 2 光子顕微鏡を中心に据えた新規技術基盤を開発すること目的とする。

### 3. 研究の方法

広視野 2 光子顕微鏡を用いて睡眠/覚醒中のマウスから大規模数の神経活動を記録する。その後、睡眠覚醒や記憶固定化に関連するハブ細胞の生理学的特徴を抽出する。ハブ細胞の形態や遺伝子発現プロファイルを解析するためには、ハブ細胞を標識する。

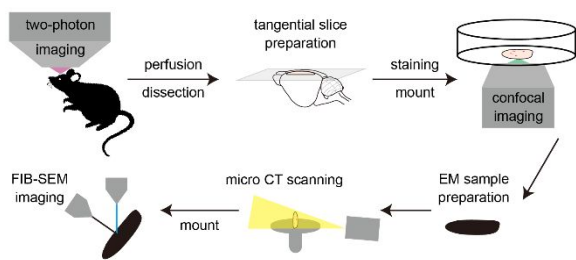
### 4. 研究成果

触覚の固定化に関わる睡眠中の神経活動を記録するため、研究室ですでに確立した触覚記憶課題を用い、広視野 2 光子顕微鏡を用いて神経活動をイメージングした。睡眠中の神経活動を記録し、睡眠ステージに対応したネットワーク変遷を解析するには、数時間以上の連続した撮影が必要となる。そこで記録ソフトを長時間記録用に改良して、3 時間以上に及ぶ長時間のイメージングを実施した。長時間記録することで、睡眠中において割合の少ない REM 睡眠中の神経活動も安定して記録できるようになった。こうした広視野 2 光子顕微鏡を用いた実験フローと関連手法についての詳細をまとめ、プロトコル論文として発表した (Oomoto et al., STAR protocols, 2021)。ハブ細胞が記憶の固定化に関連するかを調べるため、触覚記憶課題前後におけるハブ細胞集団の構成が時々刻々と変容するかどうか調べた。その結果、マウスが覚覚記憶を形成すると、ハブ細胞集団の構成が不安定化することを見出した。また、この不安定度はマウスの記憶成績と負の相関にあることを見出した。記憶の固定化には皮質 M2 から S1 へのトップダウン入力が必要であることから (Miyamoto et al., Science 2016) この投射経路を選択的に抑制し、ハブ細胞集団の動態とトップダウン入力の因果関係を調べた。その結果、マウスの記憶固定化は阻害され、ハブ集団の不安定化も抑制された。

次に、ハブ細胞の遺伝子発現の特性を調べるため、ハブ細胞に PA-Cre(photo-activatable Cre) を導入する実験を行った。具体的には、光刺激によって遺伝子組み換えを操作できる PA-Cre (photo-activatable Cre) と、Cre 依存的に赤色蛍光たんぱく質である tdTomato を発現する遺伝子組み換えマウスである Ai9 を組み合わせ、光刺激依存的に標的細胞において tdTomato を発現させる手法 (Schindler et al., Sci. Rep., 2015) を応用した。この手法と広視野顕微鏡とを組み合わせるため、複数種類の AAV を混合してマウスに投与する必要がある。観察領域で均一・高密度に複数遺伝子を発現させることのできる AAV 濃度の条件検討を実施し、現在も条件検討中である。

最後に、ハブ細胞の形態的特徴を調べるため、生体内で広視野観察した細胞から電子顕微鏡観察を行う実験系、CLEM (Correlative light and electron microscopy, 光-電子相関顕微鏡法) の確立を目指した。上述した方法で細胞に tdTomato を発現させ、生体内イメージング後に脳スライスを作成し、これを共焦点顕微鏡観察や CT 観察してスライス内での細胞の場所を特定した。その後、特定した領域の電顕顕微鏡観察を行った。生体観察で標的とした複数の細胞から電子顕微鏡観察を行うことができた (図 1)。今後は、ハブ細胞を標的として形態観察を行い、非ハブ細胞との差異を検討する。

図 1 : CLEM 法の実験パイプライン



生体脳からイメージング後、脳を固定化し、イメージング面に平行になるように脳スライスを作成する。その後、共焦点顕微鏡でスライスを観察し、生体脳で記録した細胞を同定する。次に脳スライスを電子顕微鏡用に染色し、CT 顕微鏡で血管などを確認する。ここで確認した血管と共焦点顕微鏡で確認した血管を一致させ、特定の細胞の位置を推定する。最後に、推定した場所を電子顕微鏡観察する。

## 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 0件/うちオープンアクセス 7件）

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 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 Murayama Masanori, Wake Hiroaki	4. 巻 179
2. 論文標題 Lighting up cosmic neuronal networks with transformative in vivo calcium imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.04.007	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 Ota Keisuke, Uwamori Hiroyuki, Ode Takahiro, Murayama Masanori	4. 巻 179
2. 論文標題 Breaking trade-offs: Development of fast, high-resolution, wide-field two-photon microscopes to reveal the computational principles of the brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 3~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.03.010	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 Ito Tsubasa, Ota Keisuke, Ueno Kanako, Oisi Yasuhiro, Matsubara Chie, Kobayashi Kenta, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi, Murayama Masanori, Aonishi Toru	4. 巻 179
2. 論文標題 Low computational-cost cell detection method for calcium imaging data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 39~50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.02.008	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 Aonishi Toru, Maruyama Ryoichi, Ito Tsubasa, Miyakawa Hiroyoshi, Murayama Masanori, Ota Keisuke	4. 巻 179
2. 論文標題 Imaging data analysis using non-negative matrix factorization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 51 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.12.001	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 Goto Akihiro, Bota Ayaka, Miya Ken, Wang Jingbo, Tsukamoto Suzune, Jiang Xinzhi, Hirai Daichi, Murayama Masanori, Matsuda Tomoki, McHugh Thomas J., Nagai Takeharu, Hayashi Yasunori	4. 巻 374
2. 論文標題 Stepwise synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 857 ~ 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abj9195	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 Ota Keisuke, Oisi Yasuhiro, Suzuki Takayuki, 、 、 Murayama Masanori	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 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10件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 Fast, cell-resolution, contiguously-wide two-photon imaging for understanding functional cortical network architectures
3. 学会等名 第11回 新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 Fast, cell-resolution, contiguously-wide two-photon imaging for understanding functional cortical network architectures
3. 学会等名 日中脳研究分野 ハイレベル研究者交流会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 体性感覚野の大規模ネットワーク構造
3. 学会等名 第4回 感覚研究フロンティア シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 Fast, cell-resolution, wide field-of-view two-photon microscopy to reveal functional network architectures across multimodal cortical areas
3. 学会等名 SPIE High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy VI（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 広視野 2光子顕微鏡による脳神経ネットワークの in vivo イメージング
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 Thalamo-cortical circuit for expectation moderation in sensory processing of external stimuli
3. 学会等名 Picower Institute Fall 2021 Symposium Dendrites: Molecules, Structure, and Function (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 予期抑制に関わる視床-皮質回路
3. 学会等名 生理研研究会 運動・行動から紐解く脳神経回路発達メカニズムの異分野融合研究による解明 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 A non-primary thalamocortical circuit controls cortical expectation modulations
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 広視野 2 光子顕微鏡で拓くネットワーク生理学
3. 学会等名 電気通信大学 脳・医工学研究センターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山正宜
2. 発表標題 広視野 2 光子顕微鏡による脳神経ネットワークの in vivo イメージング
3. 学会等名 レーザー顕微鏡研究会第46回講演会・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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1件

国際研究集会 クラスタ/ハブダイナミズムの決定剛軟因子 国際シンポジウム	開催年 2023年～2023年
---	--------------------

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