

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04982

研究課題名（和文）霊長類脳の2光子カルシウムイメージングで解明する運動学習の記憶機構

研究課題名（英文）Revelation of the neuronal mechanism of motor learning in non-human primates with the two-photon calcium imaging

研究代表者

正水 芳人 (Masamizu, Yoshito)

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・副チームリーダー

研究者番号：90608530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,000,000円

研究成果の概要（和文）：げっ歯類を対象としたin vivo 2光子カルシウムイメージングでは、行動や認知機能に関連する神経細胞の活動を単一細胞レベルで明らかにすることができる。この技術を課題実行時の霊長類に応用するために、コモンマーモセットに上肢の運動課題を訓練する方法を開発した。頭部固定状態のマーモセットは、上肢でポールを操作し、スクリーン上のターゲットにカーソルを移動させることができた。我々は、この運動課題の実行中に、大脳新皮質・運動野第2/3層神経細胞のin vivo 2光子カルシウムイメージングをおこない、細胞体、樹状突起、軸索から運動課題に関連した活動を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、霊長類コモンマーモセットで、課題実行時に脳のin vivo 2光子カルシウムイメージングをおこなう系を確立した。今後、この系を用いて、様々な精神・神経疾患モデルの遺伝子改変コモンマーモセットの神経基盤を解明することによって、疾患における神経ネットワーク変容の理解に役立てることで、新たな治療方法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Two-photon calcium imaging has revealed neuronal activities related to behavioral and cognitive functions in rodents at a single-cell resolution. To apply this technique to behaving non-human primates, we developed protocols to train head-fixed common marmosets to perform upper-limb movement tasks. Head-fixed marmosets could control a pole with an upper limb to move a cursor to a target on a screen. We conducted two-photon calcium imaging of layer 2/3 neurons in the motor cortex during this motor task performance, and detected task-relevant activity from neuronal somata, dendrites and axons.

研究分野：神経科学

キーワード：in vivo カルシウムイメージング 運動学習 マーモセット

## 1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質は、哺乳類のみに存在する大脳の表面を覆う領域で、多くの認知機能に関わる。6層構造からなる大脳新皮質は、各層の神経細胞が異なる入出力を持ち、学習・記憶が関与する認知課題をおこなう際には、様々な脳領域とネットワークを形成し、情報処理をおこなう。

これまでの研究で我々は、報酬をともなう運動学習の記憶過程における、げっ歯類のマウス大脳新皮質・一次運動野（以後、運動野と表記）の浅層第2/3層（脳表から200  $\mu\text{m}$  付近）と深層第5層（脳表から500  $\mu\text{m}$  付近）の神経細胞の活動に着目した。具体的には、*in vivo*カルシウムイメージングによって、第5層の神経細胞が、学習による運動記憶を神経活動パターンとしてコードするようになることを明らかにした (Masamizu<sup>#</sup>, Tanaka<sup>#</sup> *et al.*, *Nature Neuroscience*, 2014, <sup>#</sup> co-first authors)。一方、霊長類ではどのような神経基盤であるのかは明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、小型霊長類のコモンマーモセットを対象とし、*in vivo*カルシウムイメージングによって、霊長類での運動学習の神経基盤を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

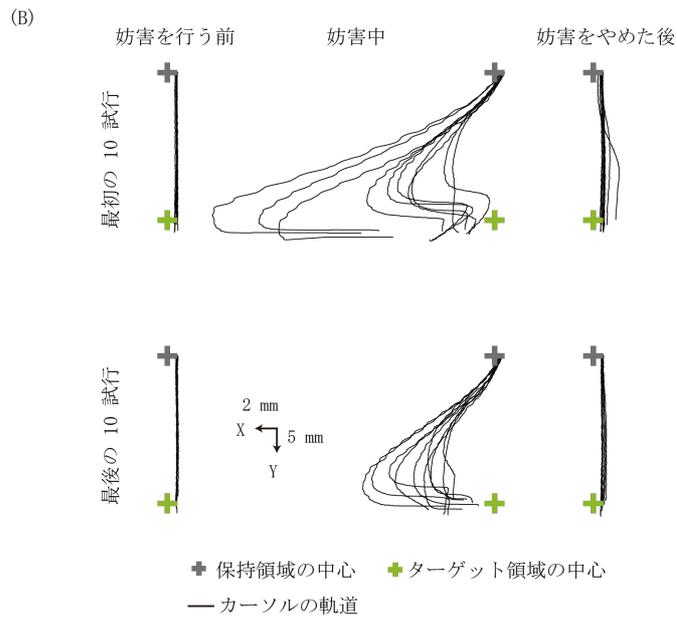
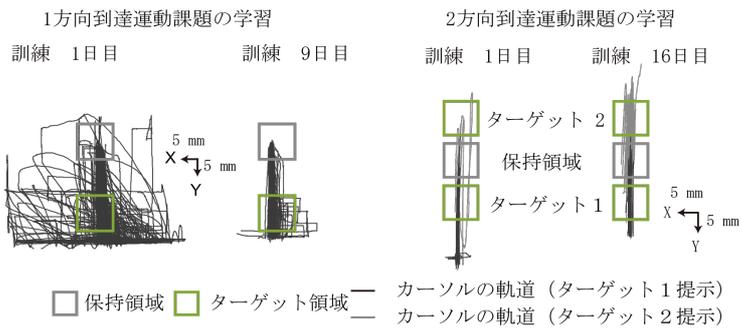
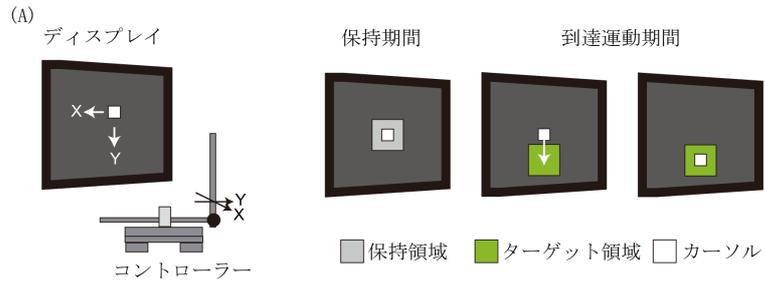
我々は、課題実行時のコモンマーモセット・大脳新皮質で、*in vivo*カルシウムイメージングをおこなう系を確立した (Ebina<sup>#</sup>, Masamizu<sup>#</sup> *et al.*, *Nature Communications*, 2018, <sup>#</sup> co-first authors)。具体的には、手を使った運動課題実行時の神経細胞の細胞体、軸索、樹状突起の活動を *in vivo* 2光子カルシウムイメージングによって計測することに成功した。はじめに、コモンマーモセットのための手を使った運動課題装置の開発をおこなった。しかし、これまでにコモンマーモセットでは頭部固定状態で、運動課題を成功した例がなく、その訓練は難しいと考えられていた。

2光子励起顕微鏡下でイメージングをおこなうためには、コモンマーモセットの頭部と胴体を固定した状態で行動課題をおこなわせる必要がある。従来のアクリル板による固定方法では、コモンマーモセットがストレスを感じて行動課題をおこなわない。このため、これまで用いられていた頭部と胴体を固定する装置の胴体部分を改良し、ストレスを低減させるためにジャケットを着させて胴体を拘束する方法に変更した。

## 4. 研究成果

コモンマーモセットを数ヶ月訓練すると、コモンマーモセットが課題装置のコントローラーを操作して、画面上のカーソルを特定の位置に移動させることができるようになった (1方向/2方向到達運動課題) (図 1A)。さらに、このカーソル移動を妨害するようにコントローラーの動きに垂直の力を加え続けると、この力を打ち消すようにカーソル軌道を修正できることを示した (運動適応課題) (図 1B)。

図1 頭部固定状態での運動課題



次に、コモンマーモセット大脳新皮質の運動野で神経細胞に、アデノ随伴ウイルスを用いて、蛍光カルシウムセンサーGCaMP6f を発現させた。このコモンマーモセットが運動している時に2光子カルシウムイメージングをおこなうことで、到達運動に関連する神経活動を検出することに成功した。

運動適応課題では、運動の妨害によってカーソルの軌道が変化すると、それに合わせて個々の神経細胞の活動が変化することを示した(図2)。力を加えている時のみに活動する神経細胞や、力を加えた後で活動が大きくなり、その影響が

妨害をやめた後でも残っている神経細胞が存在した。妨害をやめた後でも活動する神経細胞は、運動適応学習の記憶をコードしている可能性を示唆している。

さらに、神経軸索や樹状突起など、細胞体よりも微小な構造の活動を課題実行時にイメージングし、行動に関連した活動を検出する事にも成功した(図3)。今後、この系を用いることによって、様々な脳領域間での入出力のやりとりを、霊長類でも明らかにすることが可能となる。

図2 運動適応課題中の *in vivo* 2光子カルシウムイメージング

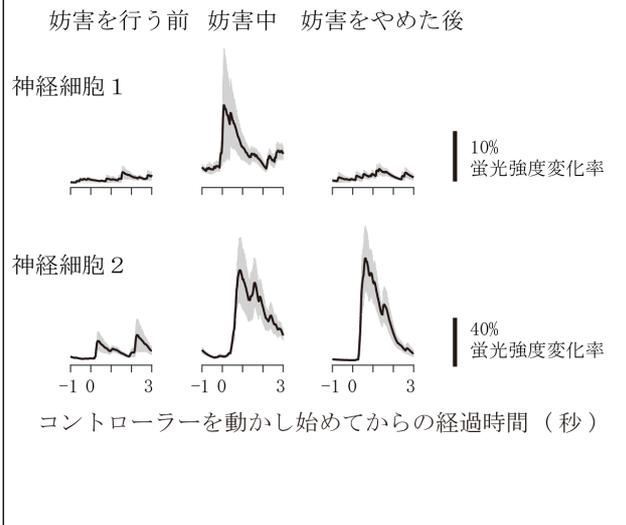
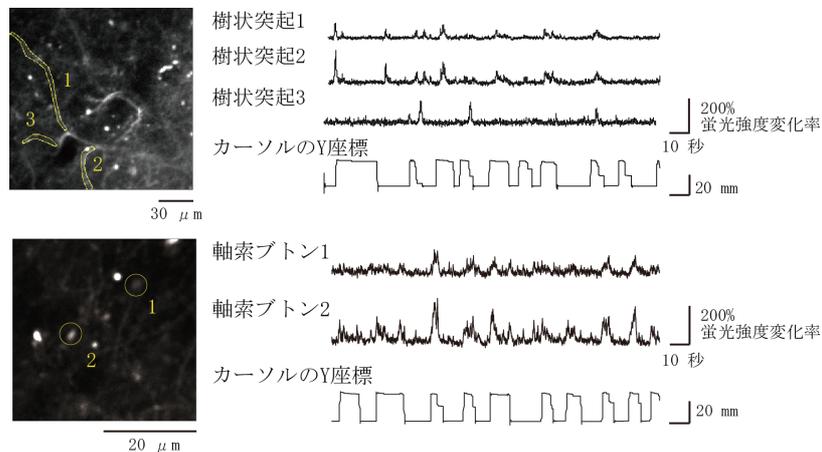


図3 神経細胞の樹状突起、軸索から記録した運動関連の活動



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ebina Teppei, Obara Keitaro, Watakabe Akiya, Masamizu Yoshito, Terada Shin-Ichiro, Matoba Ryota, Takaji Masafumi, Hatanaka Nobuhiko, Nambu Atsushi, Mizukami Hiroaki, Yamamori Tetsuo, Matsuzaki Masanori	4. 巻 116
2. 論文標題 Arm movements induced by noninvasive optogenetic stimulation of the motor cortex in the common marmoset	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 22844 ~ 22850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1903445116	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 Ebina Teppei #, Masamizu Yoshito #, Tanaka Yasuhiro R., Watakabe Akiya, Hirakawa Reiko, Hirayama Yuka, Hira Riichiro, Terada Shin-Ichiro, Koketsu Daisuke, Hikosaka Kazuo, Mizukami Hiroaki, Nambu Atsushi, Sasaki Erika, Yamamori Tetsuo, Matsuzaki Masanori (#equal contribution)	4. 巻 9
2. 論文標題 Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of marmosets during upper-limb movement tasks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04286-6	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 正水 芳人
2. 発表標題 構成的アプローチによって脳の情報処理機構を解明するための基盤技術開発
3. 学会等名 行動の多様性を支える神経基盤とその動作様式の解明
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 正水 芳人
2. 発表標題 Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of marmosets during upper-limb movement tasks.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正水 芳人
2. 発表標題 Two-photon calcium imaging in the motor cortex of non-human primates during movement task
3. 学会等名 The 9th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 正水 芳人(担当:分担執筆, 範囲:霊長類脳のin vivo 2光子カルシウムイメージング)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 クバプロ	5. 総ページ数 20
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー 2020	

1. 著者名 正水 芳人、松崎 政紀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 6
3. 書名 マーマセツトラボマニュアル、6.2 2光子顕微鏡を用いた脳のin vivoカルシウムイメージング	

〔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