

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32639

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06311

研究課題名(和文)脳情報動態を規定する前頭皮質局所回路構造

研究課題名(英文)Cortical local circuits for multi-area interconnectivity and parallel processing

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) 87,500,000円

研究成果の概要(和文): 私たちは前頭皮質が、感覚系皮質とは異なり、基底核と視床を介した閉ループ結合を作ることや、トップダウンと呼ばれる投射様式で他の皮質領域に影響を与えることから、固有の局所回路構造を持つと考え、この皮質に特異的な細胞間結合・細胞種機能の探索と、この解析に必要な光学・電子顕微鏡相関解析の技術開発を行なった。その結果、テープ自動回収型連続切片切削 走査型電子顕微鏡システムを確立し、両側・片側皮質投射系に特異的な結合サブネットワーク、両側皮質へ投射する錐体細胞の多様性、錐体細胞サブタイプに依存した振動による運動学習制御、運動学習におけるシナプス再編過程の入力タイプ選択性を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前頭皮質は行動の結果予測や、その修正に関与することが示唆されている。この皮質の細胞・回路異常は行動学習を阻害し、動物は適切な行動を実行できなくなる。しかし、この仕組みを理解するのに必須な前頭皮質に特有のニューロン構成や、シナプス結合・変更のルールは、感覚系皮質と比べると未だに分かっていないことが多い。本研究で開発した、生体二光子/光学/電子顕微鏡相関解析の手法は、前頭皮質の神経回路解析を促進させることが期待される。本研究で解明した、前頭皮質細胞のサブタイプ構成とシナプス結合則や、皮質間入力と視床入力の可塑的動態は、行動学習に関与する前頭皮質の回路実体の理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文): Since the frontal cortex, unlike the sensory cortex, makes connecting loops with the basal ganglia and influences other cortical regions by top-down corticocortical projections, we thought it had a unique circuit structure and investigated the connectivity rules between neuron subtypes and the functions of individual subtypes. For this analysis, we developed techniques for correlating two-photon, light, and electron microscope images. As a result, we have established an automated tape collecting ultramicrotome/scanning electron microscope system for cortical circuit analysis. In the frontal cortex, we found that differentially connected subnetworks between bilaterally and unilaterally projecting corticocortical pyramidal cells, diversity of bilaterally projecting pyramidal cells, motor learning control by local oscillations dependent on a specific subtype of pyramidal cells, and synaptic input type-dependent connection reconstruction during motor learning.

研究分野：神経科学

キーワード：前頭皮質 皮質間投射 局所回路 錐体細胞 GABA細胞 運動学習

## 1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまでに、前頭皮質を構成するニューロンの同定と、それらの投射・結合法則を明らかにする探索的研究を行ってきた。それまでの整理されていなかった多様なニューロンを、形態・電気生理学的特性や遺伝子発現によって丁寧に分類することにより、神経回路研究のブレークスルーをもたらした。前頭皮質の抑制性細胞において、多種類のカルシウム結合蛋白質・ペプチドの発現と生理特性、細胞形態の相関解析を行い、基本的なサブタイプをほぼ全て同定し、初期の体系的なサブタイプ分類を確立した。さらに、そのシナプス標的構造や伝達物質作用の違いを明らかにした。前頭皮質の投射ニューロンである錐体細胞に関しては、多様な皮質間・皮質下投射先を同定した上で、シナプス結合解析を行い、投射サブタイプごとに固有の結合・伝達様式を持つことを明らかにし、皮質の局所回路が脳のシステム回路の多様性に対応して細分化していることを証明した。前頭皮質の情報フローの基本は、大脳皮質間、および皮質外部からの大脳皮質への入力投射マップによって定められる。そこで、私たちがこれまでに得た知見を進展させ、前頭皮質の情報フローの理解に必要な基本的局所回路構築(標準回路)を提示したいと考えた。

## 2. 研究の目的

大脳皮質の局所情報処理の特徴として、他の皮質領野および視床からの入力間の相互作用と、多様な脳部位への出力並列性がある。私たちは前頭皮質が大脳基底核と視床を介した閉ループ結合(基底核視床ループ)を作ること、さらにトップダウン様式の皮質間投射に強く関与することから、感覚系皮質とは異なる固有の局所回路を持つと考え、その錐体細胞と抑制性細胞のニューロン構成と、同定したサブタイプ間のシナプス結合法則を明らかにしてきた(Kawaguchi 2017)。これらの研究結果を利用して、本研究課題では、多様な皮質下・皮質間入出力を処理する前頭皮質機能に本質的な基本局所構造(標準回路)を抽出する。そのために、出力細胞である錐体細胞が投射先に依存して作る特異的シナプス結合・伝達、抑制性細胞が錐体細胞サブタイプに依存して作る局所結合選択性や振動活動特性、運動学習の進展に伴って起きる局所活動やシナプス構造の変化を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 大脳皮質のシナプス結合解析

電子顕微鏡を従来のシナプス構造同定に用いるだけでなく、局所回路の結合解析に適用させるために、テープ自動回収型連続切片切削装置(ATUMtome)-走査型電子顕微鏡(SEM)システムを構築した。このシステムでテープに載せた超薄切片を、走査型電子顕微鏡で連続的・自動的に撮像することで、大規模にシナプス結合を解析することが可能になった(Kubota et al. 2018)。

観察試料への電荷蓄積が走査型電子顕微鏡の解像度・像質を悪くするので、切片を載せるテープを導電性の高いものにするので、透過型電子顕微鏡に近い画質を得ることができた。

走査型電子顕微鏡で観察する組織切片の重金属染色・組織処理法を改善した結果、興奮性シナプスに比べて同定しにくい、抑制性対称型シナプスの微細構造の解析も十分可能になった。

### (2) 光学・電子顕微鏡相関構造解析

生体イメージング法で前頭皮質細胞を観察した動物から灌流固定して作成した組織切片で、細胞核・血管の蛍光染色を行った。これらの蛍光像と電子顕微鏡像の対応をとることで、光学顕微鏡で観察したのと同じ樹状突起・スパインの電子顕微鏡画像を取得できるようにした。

### (3) 錐体細胞サブタイプの同定

外部投射が異なる錐体細胞は機能や局所結合も異なると想定されるので、出力先を同定した錐体細胞サブタイプごとに形態・結合解析を行う必要がある。本研究では、逆行性蛍光標識法、発生時期依存的標識法(子宮内電気穿孔法)、免疫組織化学(細胞種選択的発現転写因子)を組み合わせて錐体細胞サブタイプを同定して、形態・生理・行動実験を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 前頭皮質2層における両側・片側皮質投射系の分離とその局所回路

齧歯類の前頭皮質高次野である二次運動野(M2; 内側無顆粒皮質)の主要な皮質間出力先である対側M2および同側嗅周皮質への投射様式を、細胞構築・分子発現に基づいて区分した2層、3層、5層上部の間で比較した(Ueta et al. 2019)。3層と5層上部では2つの出力先に分枝して同時に投射する細胞が多く見られたのに対して、2層細胞は出力先ごとに異なる細胞グループを形成していた。さらに樹状突起の形態と電気的性質も異なっていた。2層の興奮性シナプス結合は同種・異種サブタイプ間で作られていたが、異種間での結合は対側M2に投射するサブタイプから、同側嗅周皮質に投射するサブタイプへの一方向性結合であった。前頭皮質では5層と同じく、2層においても外部投射に依存して局所で結合サブネットワークを形成することや、両側投射細胞から片側投射細胞への一方向性結合があることが明らかになった。

## (2) 前頭皮質 5 層の終脳内投射錐体細胞 (IT 細胞) の皮質間投射多様性

前頭皮質 5 層の IT 細胞が電氣的・生理的には多様であることは知られていたが、投射する皮質領野との関係は不明であった。この点を明らかにするために、Janelia Research Campus の公開データベースにある、単一 IT 細胞の皮質内軸索分布を定量解析した (Im et al. 2023)。その結果、M2 の 5 層 IT 細胞の中で、前頭皮質内外の複数の皮質領野を支配するものは 1 層支配が強く、前頭皮質だけを支配するものは 1 層に軸索をあまり出さないことが分かった。同じ 5 層 IT 細胞の中でも、皮質間情報伝達が異なるサブグループがあることが明らかになった。

## (3) 前頭皮質 5 層の出力サブネットワークに対応した抑制結合分化

前頭皮質 5 層の主要な GABA 作動性細胞である、ソマトスタチン陽性の LTS (low threshold spike) 細胞と、5 層錐体細胞の主要な投射サブタイプである、橋核投射 (CPn, corticopontine) 細胞と交叉性線条体投射 (CCS, crossed corticostriatal) 細胞との間の結合選択性とシナプス伝達特性を比較解析した (Morishima et al. 2017)。LTS 細胞グループは、電氣的・形態的性質が多様な細胞から成っていた。LTS 細胞は CCS 細胞より CPn 細胞から興奮性入力を受ける確率が高かった。CCS 細胞が、入力抵抗が低く、リバウンド発火が弱く、樹状突起が垂直方向に広がる LTS 細胞と相互結合するのに対して、CPn 細胞は高抵抗、強いリバウンド発火、狭い樹状突起領域の LTS 細胞と結合していた。これらの興奮性入力の時間的促進様式も LTS 細胞の種類に依存していた。ソマトスタチン細胞は 5 層錐体細胞を出力依存的に抑制することが明らかになった。

## (4) 前頭皮質 5 層の FS 細胞による興奮性サブネットワークの同期制御

前頭皮質 5 層の錐体細胞サブタイプ間の結合は CCS 細胞から CPn 細胞への一方向性で、階層が異なる二つの興奮性サブネットワークが作られている。これらのサブタイプの結合様式・伝達特性の解析結果から、CPn 細胞と GABA 作動性 FS 細胞間の結合がガンマ振動生成において重要であると推測した (Kawaguchi et al. 2019)。更に、FS 細胞の電気シナプスに関連した結合選択性も取り入れて、一部の FS 細胞と 5 層下流の CPn 細胞がガンマ振動で同期し、その活動が 5 層上流の CCS 細胞へ逆行性に伝搬することで、同時に活動する CCS 細胞と CPn 細胞のサブグループが作られることを提唱した。

## (5) 前頭皮質の錐体細胞サブタイプに依存した皮質振動活動による運動学習制御

ラットが不規則間隔で並んだ横棒の上を踏み外さないで歩くことで報酬を得られるようになる運動学習の初期に、一次運動野 (M1) 電場電位のベータ/ガンマ帯域パワーが一過性に上昇することを見つけた (Otsuka and Kawaguchi 2021)。脳切片標本解析から、この振動は 5 層終脳投射 (IT) 細胞の光刺激では起きないのに対して、5 層錐体路 (PT) 細胞や 2/3 層 IT 細胞の刺激で誘発されることが分かった。生体での 2/3 層 IT 細胞や PT 細胞の光刺激によって、ベータ/ガンマ帯域増強や運動学習の促進が見られた一方、5 層 IT 細胞刺激では振動や学習の促進は見られなかった。錐体細胞の光抑制では、PT 細胞抑制だけがベータ/ガンマ帯域の減弱や学習遅延を起こした。運動学習の初期段階では PT 細胞と FS 細胞の相互作用によって作られる、一過性のベータ/ガンマ振動の増強が重要であることが明らかになった。

## (6) 運動学習におけるシナプス再編過程の入力タイプ依存性

マウスの M2 から M1 前肢領域への皮質間活動を化学遺伝学で抑制すると、前肢を細い隙間に通して餌を掴む運動学習が阻害された (Song et al. 2022)。M2 からの軸索が分布する M1 の 1 層で、この学習に伴って新生するスパインを生体イメージングで同定した後、その固定脳切片標本で皮質と視床からの興奮性軸索が作るシナプスを、それぞれの特異的マーカーの免疫組織化学で同定し、新生スパインへの入力タイプを同定した。その結果、学習初期の 1 層では視床より皮質入力スパインが増加するものの、これら増加した皮質入力スパインは後期になると消失する。ところが、初期に作られた視床入力スパインは後期に入っても安定して存続していた。前頭皮質高次野から M1 への入力は、巧緻運動学習に際しての M1 のシナプス再編を管理することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計26件（うち査読付論文 24件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 21件）

1. 著者名 Ueta Y, Sohn J, Agahari FA, Im S, Hirai Y, Miyata M, Kawaguchi Y	4. 巻 122
2. 論文標題 Ipsi- and contralateral corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2 of the rat frontal cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1461-1472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jn.00333.2019	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 Morita K, Im S, Kawaguchi Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Differential striatal axonal arborizations of the intratelencephalic and pyramidal-tract neurons: analysis of the data in the MouseLight database	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2019.00071	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 Kawaguchi Y, Otsuka T, Morishima M, Ushimaru M, Kubota Y	4. 巻 121
2. 論文標題 Control of excitatory hierarchical circuits by parvalbumin-FS basket cells in layer 5 of the frontal cortex: insights for cortical oscillations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 2222-2236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jn.00778.2018	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 Morita K, Kawaguchi Y	4. 巻 12
2. 論文標題 A Dual Role Hypothesis of the Cortico-Basal-Ganglia Pathways: Opponency and Temporal Difference Through Dopamine and Adenosine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2018.00111	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, Sohn J, Kawaguchi Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Large Volume Electron Microscopy and Neural Microcircuit Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2018.00098	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 Morishima M, Kobayashi K, Kato S, Kobayashi K, Kawaguchi Y	4. 巻 27
2. 論文標題 Segregated excitatory-inhibitory recurrent subnetworks in layer 5 of the rat frontal cortex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 5846-5857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhx276	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 Kawaguchi Y	4. 巻 27
2. 論文標題 Pyramidal cell subtypes and their synaptic connections in layer 5 of rat frontal cortex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 5755-5771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhx252	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 495
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 Kuramoto E, Tanaka YR, Hioki H, Goto T, Kaneko T	4. 巻 9
2. 論文標題 Local Connections of Pyramidal Neurons to Parvalbumin-Producing Interneurons in Motor-Associated Cortical Areas of Mice	5. 発行年 2021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.0567-20.2021	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 Sohn J, Suzuki M, Youssef, Hatada S, Larkum Matthew ME, Kawaguchi Y, Kubota Y	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 eabm0531
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 Im S, Ueta Y, Otsuka T, Morishima M, Youssef M, Hirai Y, Kobayashi K, Kaneko R, Morita K, Kawaguchi Y	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

〔学会発表〕 計74件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 26件)

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 Otsuka T, Kawaguchi Y
2. 発表標題 The role of cortical pyramidal cell subtype dependent oscillatory activities in motor learning
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sohn J, Kubota Y, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Circuit remodeling in the motor cortex during motor learning
3. 学会等名 49th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kuramoto E, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Thalamocortical synaptic network in motor cortex analyzed with large volume electron microscopy
3. 学会等名 49th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Suzuki M, Hatada S, Youssef M, Larkum ME, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Network plastic changes in the primary motor cortex as the basis of a new motor skill acquisition
3. 学会等名 2020 Gordon Research Conference, Thalamocortical Interaction (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawaguchi Y
2. 発表標題 Cortical neuron types and their synaptic connections
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Large volume electron microscopy and neural microcircuit analysis
3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morishima M, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Layer 5 sublayer-dependent excitatory-inhibitory connections in the rat frontal cortex
3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatanaka Y, Hirata T, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Labeling of neurons derived from intermediate neuronal progenitors in the mouse cerebral cortex
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Kawaguchi Y, Morishima M
2. 発表標題 Innervation differences of layer 5a and 5b Martinotti cells in frontal cortex
3. 学会等名 47th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kawaguchi Y
2. 発表標題 Local recurrent subnetworks correlated with long-distance projections in frontal cortex
3. 学会等名 International symposium on Brain Information Dynamics 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueta Y, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Ipsilateral and contralateral corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2/3 of rat frontal cortex
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018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 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（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 任サンフン, 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

〔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	大塚 岳  (OTSUKA Takeshi)  (10390692)	生理学研究所・脳機能計測・支援センター・助教   (63905)	
研究分担者	高田 美絵子 (森島美絵子)  (MORISHIMA Mieko)  (30435531)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師   (32651)	
研究分担者	孫 在隣  (SOHN Jaerin)  (40780333)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教   (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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)	
研究分担者	倉本 恵梨子 (KURAMOTO Eriko)  (60467470)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教  (17701)	
研究分担者	植田 禎史 (UETA Yoshifumi)  (00511015)	東京女子医科大学・医学部・准講師  (32653)	

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	Max- Planck Institute for Brain Research			
エジプト	South Valley University			
ドイツ	Charite Universitatsmedizin Berlin			