

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02350

研究課題名(和文) 大脳皮質運動野における運動学習回路の階層的研究

研究課題名(英文) Study of motor cortical circuits for motor learning

研究代表者

松崎 政紀 (MATSUZAKI, Masanori)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：50353438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：2光子カルシウムイメージング法を用いてマウス大脳皮質運動野に投射する視床皮質軸索のシナプス前部の神経活動を計測することで、前肢レバー引き運動課題を学習する際、視床から運動野へ送られるシグナルが2種類あり、互いに異なる時間変化(ダイナミクス)を示すことを明らかにした。これら2種類のシグナルは「運動課題の成功率」あるいは「運動の安定性」と、それぞれ関連していた。また、シグナルは大脳皮質のどの層に入力するかによってダイナミクスが異なり、それぞれが大脳基底核あるいは小脳に強い影響を受けることがわかった。その一方で、どちらのシグナルを作り出すにも大脳基底核と小脳の両方の活動が必要であることも見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、脳全体の理解に不可欠な脳領域間ネットワークの視点から運動学習や運動制御のメカニズムの一端を明らかにしたという点で非常に重要であり、パーキンソン病やジストニアなどの運動失調・運動障害疾患の病態理解に将来的に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted two-photon calcium imaging of thalamocortical axonal activity in the motor cortex of mice learning a self-initiated lever-pull task. Layer 1 (L1) axons came to exhibit activity at lever-pull initiation and termination, while layer 3 (L3) axons did so at lever-pull initiation. L1 population activity had a sequence structure related to both lever-pull duration and reproducibility. Stimulation of the substantia nigra pars reticulata activated more L1 than L3 axons, whereas deep cerebellar nuclei (DCN) stimulation did the opposite. Lesions to either the dorsal striatum or the DCN impaired motor learning and disrupted temporal dynamics in both layers. Thus, layer-specific thalamocortical signals evolve with the progression of learning, which requires both the basal ganglia and cerebellar activities.

研究分野：神経科学

キーワード：2光子顕微鏡 カルシウムイメージング 運動学習 大脳皮質運動野 大脳基底核 小脳 視床 軸索

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動学習はヒトを含め多くの動物で見られ、哺乳類では大脳皮質一次運動野(M1)だけでなく、前頭前野、線条体、小脳など脳の広域に渡る神経ネットワークの再編(可塑性)を引き起こす。マウスを用いて、運動学習に伴い、M1でのシナプス密度の変化や細胞集団活動の変化が明らかにされてきたが、線条体、小脳の出力がどのような活動変化をM1で示すのかは不明であった。本研究代表者は研究開始当初までに、マウス前肢レバー引き課題を独自に開発して、課題実行中のM1細胞活動を2光子カルシウムイメージング法によって明らかにしてきた。そこで、この方法をより高い空間解像度を必要とするシナプス活動計測に応用することとした。

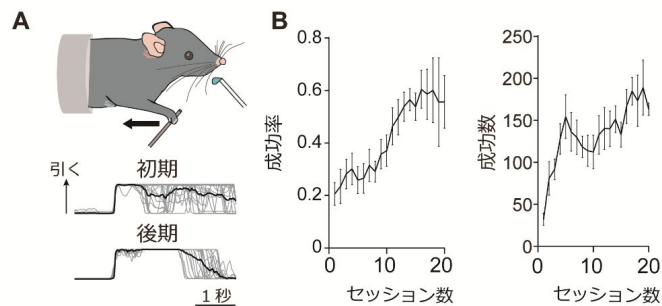
2. 研究の目的

繰り返し練習して生ずる比較的永続的な行動の変容は学習と定義される。学習がどのような脳内変化によって獲得されるのかは動物の環境適応性を理解するうえで本質的な問いである。本研究は、マウス大脳皮質M1において、線条体の信号を担う視床皮質(TC)軸索活動と、小脳の信号を担うTC軸索活動がどのように運動学習中に運動パターンを細胞活動パターンとして記憶するようになり、運動学習に影響を与えるかを明らかにすることを主たる目的とした。

3. 研究の方法

内発的に右前肢を用いてレバーを一定時間引けば報酬として水がもらえるという運動課題を約2週間、マウスに学習させた。

右図にあるように、訓練の回数を重ねると次第にマウスは上手にレバーを引ける(成功率、成功数、レバー軌道の再現性が上昇する)ようになる。この課題中にどのようなシグナルが視床から運動野へ送られているのか

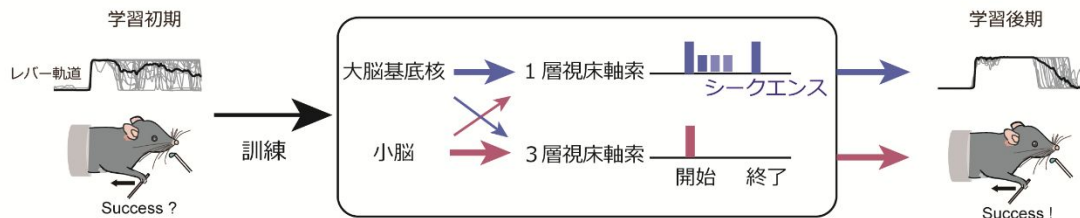


を、2光子カルシウムイメージング法によって計測した。得られた画像データから体動揺れを除去する新たなアルゴリズムを構築し、個々のシナプス前終末の活動を定量化し、これと運動に関わる各種パラメータとの対応を数理解析を用いて調べた。また光遺伝学的手法や破壊実験を行い、操作または破壊した細胞の活動と前肢運動との対応を調べた。カルシウムプローブやチャンネルロドプシン2 (ChR2)等はアデノ随伴ウイルスを用いて標的部位に発現させた。

4. 研究成果

M1へ投射するTC軸索にChR2を発現させ、M1を光照射すると前肢運動が誘発された。アーキロドプシンTを視床細胞に発現させ、レバー引き学習後に、視床を光刺激するとレバー引きの成功率が有意に減少した。このことから視床からM1へ投射する経路は前肢運動に関連していることがわかった。次に、GCaMP6fを視床細胞に発現させて、レバー引き運動学習中のTC軸索活動をM1の1層と3層で2光子イメージングによって計測した。M1に赤色蛍光タンパク質を同時に発現させ、さらに深さ方向に4 μmごとの3平面でイメージング画像を取得し、赤色蛍光輝度をもとにオフラインで3次元の揺れ補正を行った。その結果、体動揺れによるアーチファクトを最小限に抑えてイメージング画像を解析することに成功した。レバー引き中のTC軸索活動を学習の前期と後期で比較した。レバー引き中の1層と3層のTC軸索活動からレバー引き軌道の予測を行い、その精度を比較してみると学習を経てどちらも予測精度が高くなった。また1日内の活動の再現性も学習を経て高くなった。これは学習によってTC軸索活動がレバー引き

の情報を持つようになることを意味する。さらにレバー引き時の活動のタイミングを解析した。学習後期には1層のTC軸索ではレバー引きの開始時と終了時に活動するものが増え、3層ではレバー引きの開始時に活動するものが増えた。また、レバー引き時の軸索シナプス前終末集団の活動のシーケンス構造に着目し、これを定量化する解析法を新たに構築することで、1層の軸索シナプス前終末が3層の軸索シナプス前終末よりも長いシーケンス構造を示すことがわかった。これらの結果より、レバー引き学習に関係する1層と3層の軸索シナプス前終末がレバー引き時に異なるダイナミクスを示すことが明らかになった(下図)。次に、軸索



シナプス前終末の活動とレバー引き行動との関係を調べた。一般化線形モデルを立て、最適なモデルを赤池情報量基準を用いて選んだ結果、1層の軸索シナプス前終末の神経活動はレバーの引きの速度や引き時間、および軌道の再現性、つまりレバーのキネマティクスに関係し、3層の軸索シナプス前終末の神経活動は成功率に関係することがわかった。黒質網様部に ChR2 を発現させ光刺激したときに TC 軸索を 2 光子カルシウムイメージングすると、1層の軸索シナプス前終末が3層のそれよりも高率に応答し、反対に、小脳核に ChR2 を発現させ光刺激したときでは3層の軸索シナプス前終末が1層のそれよりも高率に反応した。さらに線条体または小脳核を破壊したマウスでレバー引き課題を行わせ、その時の TC 軸索活動を計測した。その結果、どちらの破壊においてもレバー引き運動学習は正常に行われず、軸索シナプス前終末活動のダイナミクスにおいても1層と3層の両方で際立った特徴は現れなかった。このことからレバー引き運動学習を通して TC 軸索シナプス前終末のダイナミクスが現れるには大脳基底核と小脳の両方の活動を必要とすることがわかった。

また、学習によって獲得された M1 細胞集団活動は、その後、長期に保持されることを明らかにした。学習中に TC 軸索シナプス前終末から M1 細胞へのシナプス入力を計測することも可能とし、シナプス入力在学习中によって変化するかどうかを調べる実験系を確立した。

本研究において、運動学習を経て視床から運動野へ少なくとも2種類のシグナルが層依存的に入力されていることを明らかにした。それらは大脳基底核と小脳からのシグナルの影響を強く受けるものであり、行動と神経活動との関係も明らかになった。運動学習中に大脳基底核と小脳からそれぞれ視床を介して入力してくるシグナルが運動野で統合され、その結果が脊髄へ出力されると同時に再び大脳基底核と小脳に送られる。そしてまたそれぞれのシグナルが視床を通して運動野へと送られる。これらのループ構造を通じた協調的な細胞活動によって運動スキルが習得されることが強く示唆された。これらの研究成果をより発展させることで、運動疾患の病態理解にも貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Terada SI, Kobayashi K, Ohkura M, Nakai J, Matsuzaki M. Super-wide-field two-photon imaging with a micro-optical device moving in post-objective space. *Nat Commun*. 査読有, 9, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-06058-8.

Tanaka YH, Tanaka YR, Kondo M, Terada SI, Kawaguchi Y, Matsuzaki M. Thalamocortical Axonal Activity in Motor Cortex Exhibits Layer-Specific Dynamics during Motor Learning.

Neuron. 査読有, 100 : 244 ~ 258.e12, 2018.

doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.016.

Yoshida E, Terada SI, Tanaka YH, Kobayashi K, Ohkura M, Nakai J, Matsuzaki M. In vivo wide-field calcium imaging of mouse thalamocortical synapses with an 8 K ultra-high-definition camera. *Sci Rep*. 査読有, 8, 2018.

doi: 10.1038/s41598-018-26566-3.

Ebina T, Masamizu Y, Tanaka YR, Watakabe A, Hirakawa R, Hirayama Y, Hira R, Terada SI, Koketsu D, Hikosaka K, Mizukami H, Nambu A, Sasaki E, Yamamori T, Matsuzaki M. Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of marmosets during upper-limb movement tasks. *Nat Commun*. 査読有, 9, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-04286-6

Kondo M, Kobayashi K, Ohkura M, Nakai J, Matsuzaki M. Two-photon calcium imaging of the medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion. *Elife*. 査読有, 6 : e26839, 2017. doi: 10.7554/eLife.26839.

[学会発表](計12件)

Matsuzaki M. Wide-field imaging of neural activity with high spatial resolution. FAOPS2019, 2019

Matsuzaki M. Wide-field imaging of neural activity at cellular and subcellular resolutions. Advances in Optical Imaging of Living Cells & Organisms: Focus on the Brain, 2018 Cold Spring Harbor Asia Conference, 2018

松崎 政紀. マウス前頭皮質の深部・広域2光子イメージング. 第41回日本神経科学大会, 2018

Matsuzaki M. Dynamics of thalamocortical activity in the primary motor cortex during motor learning. 44th Naito Conference, 2017

Matsuzaki M. Dynamics of thalamocortical activity in the primary motor cortex during motor learning. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017

Matsuzaki M. Wide, deep, multi-color, subcellular-resolution imaging from any angle. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017

松崎 政紀. 覚醒小動物での大脳イメージングと光操作. 第39回日本神経科学大会, 2016

Matsuzaki M. Dynamic representation of innate and learned movements in the motor cortex. 第7回光操作研究会 国際シンポジウム, 2015

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 顕微鏡用光学モジュール、顕微鏡、顕微鏡用光学モジュール制御装置及び多光子励起顕微鏡

発明者: 松崎政紀、寺田晋一郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/072139

出願年: 平成28年

国内外の別: 外国

名称: 顕微鏡用光学モジュール、顕微鏡、顕微鏡用光学モジュール制御装置及び多光子励起顕微鏡

発明者: 松崎政紀、寺田晋一郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願2016-184497号

出願年: 平成27年

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。