

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05927

研究課題名(和文) 連合学習を可能とする大脳皮質神経回路基盤の解析

研究課題名(英文) Elucidation of neocortical circuits underlying associative learning

研究代表者

山下 貴之 (Yamashita, Takayuki)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：40466321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物がいかにして特定の感覚刺激と報酬とを関連付けるかは未だ不明である。本研究では、感覚情報の初期分岐点である大脳皮質一次感覚野において情報分別する役目を果たす皮質-皮質間長距離投射細胞に着目し、その解剖・生理学的性質を調べた。その結果、(1)連合学習に伴い、第2/3層の投射細胞が報酬に関連した感覚刺激に対する応答性を投射部位依存的に双方向に変化させるということや、(2)背側投射経路と腹側投射経路の投射部位がかなりの部分でオーバーラップしていることが明らかになった。さらには、(3)第5層では第2/3層とは異なる計算原理で洞毛運動時の活動パターンが形成されている可能性を示唆する結果も得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス大脳皮質一次体性感覚野をモデルとした本研究により、大脳皮質一次感覚野の第2/3層より皮質内に投射する長距離投射細胞の解剖・生理学的性質の主要部分が明らかになった。本成果は、投射部位の異なる長距離投射細胞は機能的に異なる役割を持つという概念の形成に大きく貢献した。また、本研究の結果から第5層では第2/3層とは異なる計算原理で洞毛運動時の活動パターンが形成されている可能性が示唆され、今後のさらなる研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：How animals learn an association between certain sensory stimuli and a reward remains unclear. In this study, we focused on cortico-cortical projection neurons in the primary sensory cortex which is the early branch point of the signal pathway that conveys reward-related sensory stimuli. We revealed that, upon learning, layer 2/3 neurons bi-directionally change their sensitivity to reward-associated sensory stimuli in a projection-specific manner. We further analyzed the anatomical patterns of layer 2/3 projection neurons and revealed that the projection targets of dorsal and ventral pathways are significantly overlapped at this early stage. In addition, our recordings from layer 5 neurons suggested that synaptic computation by layer 5 neurons during active behavior is different from that of layer 2/3 neurons. Thus, our data uncovered the basic properties of cortico-cortical projection neurons of primary sensory cortex.

研究分野：神経生理学

キーワード：大脳皮質 パレル 投射ニューロン 電気生理学

## 1. 研究開始当初の背景

動物にある種の感覚刺激と報酬とを連合させる課題を学習させると、感覚刺激によって報酬を得るための目標指向行動を引き起こすことができる。この刺激-報酬連合学習は、パブロフによる古典的条件付け実験以来良く知られており、動物の適応的行動と意思決定の基礎を成し、統合失調症や薬物依存症など様々な精神疾患にも関わる。連合学習の神経基盤として、中脳腹側被蓋野など様々な脳領域が関与していることが明らかになってきているが、末梢での感覚入力から目標指向運動出力に到る神経シグナルの全体像はほとんど未解明である。末梢の感覚器官から中枢へ送られた感覚情報は、まず大脳皮質一次感覚野に到達する。大脳皮質一次感覚野は6つの細胞層に分かれており、感覚入力は主に第4層に到達して、そこから第2/3層と第5層・第6層へ情報が送られる。そして、それらの層から他の脳領域に情報が送出される。情報送出の際には、入力された感覚情報から異なる特徴が抽出され、複数の脳領域に異なる情報が選別されて送出される (Felleman and van Essen, *Cerebral Cortex*, 1991)。したがって、一次感覚野は連合学習に関わる感覚情報シグナル経路の最初の分岐点であり、一次感覚野から送出されるシグナルを軸索投射経路ごとに網羅的に記述し、基本モデルを構築することが、連合学習の神経基盤を知る上で不可欠な第一段階である。

## 2. 研究の目的

大脳皮質一次体性感覚野 (S1) をモデルとして、一次感覚野から異なる脳領域に送出されるシグナルの解剖・生理学的特質と連合学習における機能について、細胞・シナプスレベルでの理解と基本モデルの構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 連合学習前後のマウス S1 第 2/3 層投射細胞の電気生理学的解析

マウス S1 第 2/3 層から異なる皮質領域へと軸索を投射する興奮性神経細胞 (長距離投射細胞) は、物体に触ったタイミングや触った物体の位置情報を伝える背側投射細胞群 (M1 投射細胞) と触った物質のテクスチャを伝える腹側投射細胞群 (S2 投射細胞) に分けられる (Yamashita et al., *Neuron*, 2013)。そこで、S1 に依存した連合学習前後において、S1 第 2/3 層の M1 投射細胞や S2 投射細胞が送出するシグナルの強度が投射経路ごとに変化するか否かを、*in vivo* パッチクランプ記録法により検討した。逆行性蛍光トレーサーにより M1 投射細胞と S2 投射細胞を蛍光標識した後、マウスに摂水制限を施し、洞毛 (ひげ) への感覚刺激と水報酬とを連合させた。この洞毛触覚 水報酬の連合学習の成立の前 (トレーニング開始直後) と学習成立後 (十分にトレーニングを積んだ状態) の 2 群のマウスを 2 光子励起顕微鏡下に置いて、予め蛍光標識しておいた投射細胞を同定しながら、課題遂行中のマウスから whole-cell パッチクランプ記録を行った。

### マウス S1 第 2/3 層投射細胞の解剖学的解析

マウス S1 の第 2/3 層細胞の長距離投射の解剖学的性質を調べるため、皮質第 2・3 層にのみ Cre 組換え酵素を発現する遺伝子改変マウス (Rasgrf2-dCre マウス) の S1 第 2・3 層に Cre 依存的に蛍光タンパク質 td-Tomato を発現するアデン随伴ウイルスベクターを注入して、皮質第 2・3 層細胞を標識した。さらに、個々の投射細胞がどのような投射パターンを有するかを調べるため、上記と同様に 2 光子励起顕微鏡下に同定した M1 投射細胞あるいは S2 投射細胞の中から、マウス 1 匹につき 1 個の細胞のみに単一細胞電気穿孔法により GFP プラスミドを注入し、発現後に染色して、個々の長距離投射細胞の細胞形態を調べた。

### マウス S1 第 5 層投射細胞の電気生理学的解析

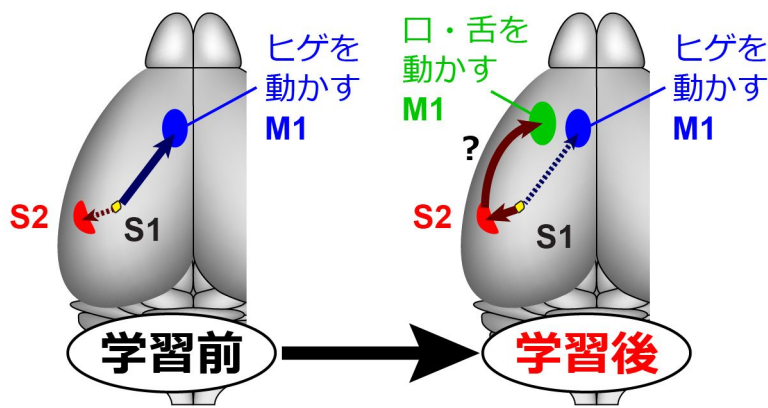
マウス S1 第 2/3 層での検討結果から、第 5 層の長距離投射細胞にも投射部位により性質が異なる可能性が生じた。第 5 層細胞に特異的に Cre を発現する遺伝子組換えマウス (Rbp4-Cre マウス) と Cre 依存的にチャンネルロドプシン 2 を発現する遺伝子組換えマウス (Ai32 マウス) とを掛け合わせ、バイジェニックマウス (Rbp4-Cre; LSL-ChR2 マウス) を作製した。Rbp4-Cre; LSL-ChR2 マウスの S1 第 5 層細胞より、細胞外記録法により活動電位を測定しながら、M1 に光刺激を行い、逆行性の活動電位を検出して M1 投射細胞を同定した。ところが、多くの場合、M1 の光刺激により誘発される S1 細胞の活動電位は順行性の興奮性入力を反映するものと判断されたため、M1 細胞から強い興奮性入力を受ける S1 第 5 層細胞の電気活動を調べ、洞毛運動との相関など生理学的性質を調べることにした。

## 4. 研究成果

### 連合学習前後のマウス S1 第 2/3 層投射細胞の電気生理学的解析

連合学習後の S2 投射細胞においては、洞毛触覚により誘発される脱分極が 2 相性となり、感覚応答を反映する速い脱分極と報酬獲得と相関のある遅い脱分極が存在することが明らかとなった。しかしながら、連合学習後の M1 投射細胞においては、速い脱分極は見られたが遅い脱分極については S2 投射細胞と比較すると振幅が小さかった。ところが、連合学習前の S2 投射細胞

胞では、報酬獲得時にも洞毛刺激により速い脱分極のみが観察され、遅い脱分極は出現しなかった。一方、学習成立前の M1 投射細胞は、感覚応答を反映する速い脱分極と報酬獲得と関連のある遅い脱分極の 2 相性反応を示した。したがって、洞毛触覚 水報酬の連合学習が成立すると、総じて S1 から S2 を経て口や舌を動かす運動野領域への情報の流れが増強し、他のシグナルが減弱していると考えられる。つまり、連合学習に伴って、大脳皮質一次感覚野から情報を送出する神経細胞の反応性が変化し、結果として広範囲の脳内情報の流れをダイナミックに変化させていると考えられた。



### 連合学習により変化する大脳皮質シグナル経路

#### マウス S1 第 2/3 層投射細胞の解剖学的解析

蛍光標識された S1 第 2/3 層細胞の軸索投射部位を網羅的に探索したところ、同側皮質内の多くの領野や反対側 S1 および同側の背側線条体に投射を持つことが明らかとなった。また、合計 9 個の M1 投射細胞と 6 個の S2 投射細胞の微視的形態を 3 次元再構築することに成功し、M1 投射細胞も S2 投射細胞も多くの場合に複数の皮質領野に投射することが明らかとなった。また、3 次元再構築した M1 投射細胞の中には S2 にもわずかな投射を持つ細胞があった一方で、S2 投射細胞は M1 への投射は持たなかった。このようなことから、S1 からの一次的な情報送出においては、背側投射と腹側投射の両経路は、かなりのオーバーラップがあるということになる。この 2 つの経路の機能的な差異は、投射先における情報処理とさらに続く不均一な情報送出によって増幅すると考えられる。

#### マウス S1 第 5 層投射細胞の電気生理学的解析

覚醒状態で頭部固定下の Rbp4-Cre;LSL-ChR2 マウスの M1 上から光刺激を行いながら、3 2 Ch シリコンプローブにより S1 細胞の活動電位を記録したところ、潜時が短く自発発火とのコリジョンが見られる逆行性の活動電位を持つ細胞群と、潜時が長く自発発火とのコリジョンが見られない順行性の興奮性入力を反映する活動電位を示す細胞群の 2 種類が同定され、多くの場合は後者であった。ガラス電極を用いて後者の細胞群の活動の中には、正負関わらず洞毛運動との相関が見られる細胞が多く存在することが明らかとなった。

マウス S1 をモデルとした以上の研究により、大脳皮質一次感覚野の第 2/3 層より皮質内に投射する長距離投射細胞の解剖・生理学的性質の主要部分が明らかになった。本成果は、投射部位の異なる長距離投射細胞は機能的に異なる役割を持つという概念の形成に大きく貢献した。また、第 2/3 層では M1 からの投射は洞毛運動時の S1 細胞の活性化に寄与するとの考えが一般的であるが、本研究の結果から第 5 層では M1 から強い興奮性の入力を受ける細胞であっても洞毛運動時に活動を減弱する場合があることが示唆された。したがって、第 5 層では第 2/3 層とは異なる計算原理で洞毛運動時の活動パターンが形成されている可能性がある。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) Toh Miyazaki\*, Srikanta Chowdhury\*, Takayuki Yamashita\*, Takanori Matsubara, Hiromu Yawo, Hideya Yuasa, Akihiro Yamanaka. Large timescale interrogation of neuronal function by fiberless optogenetics using lanthanide micro-particles. *Cell Reports* 26, 1033-1043, 2019. (\*, 第一著者) 査読有
- 2) Takayuki Yamashita\*, Angeliki Vavladeli\*, Aurélie Pala\*, Katia Galan\*, Sylvain Crochet, Sara S.A. Petersen and Carl C.H. Petersen. Diverse long-range axonal projections of excitatory layer 2/3 neurons in mouse barrel cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* 12, 33, 2018. (\*, 第一著者) 査読有
- 3) Laura Busse, Jessica A. Cardin, M. Eugenia Chiappe, Michael M. Halassa, Matthew J. McGinley, Takayuki Yamashita, and Aman B. Saleem. Sensation during active behaviors. *The Journal of Neuroscience* 37, 10826-10834, 2017. 査読有
- 4) Takayuki Yamashita, and Akihiro Yamanaka. Lateral hypothalamic circuits for sleep-wake control. *Current Opinion in Neurobiology* 44, 94-100, 2017. 査読有
- 5) 山下 貴之(2017)「触覚の腹側系と背側系」*Clinical Neuroscience*, 35, 166-168. 査読なし

- 6) 山下 貴之、山中章弘 (2016) 「オレキシン受容体の生理的および薬理的機能」 *Clinical Neuroscience*, 34, 612-613. 査読なし
- 7) Takayuki Yamashita #, and Carl C.H. Petersen #. Target-specific membrane potential dynamics of neocortical projection neurons during goal-directed behavior. *eLife* 5, e15798, 2016. (#, 責任著者) 査読有

[学会発表](計 25 件)

- 1) Matsubara T., Horigane S-I., Ueda S., Takemoto-Kimura S., Kawaguchi N., Yanagida T., Yamanaka A., Yamashita T. “Remote control of neuronal function using X-ray” 9th FAOPS congress 神戸、2019年3月30日 (ポスター)
- 2) 山下 貴之. 「脳神経機能の計測・操作法の現在と未来」 『秋田大学大学院生理学セミナー』秋田、2019年2月15日 (招待講演)
- 3) Yamashita T. “Remote control of neuronal function using X-ray-induced scintillation” Japan-UK Neuroscience Symposium 2019 木更津、2019年2月9日 (ポスター)
- 4) 山下 貴之. 「神経回路機能の遠隔操作法の現在と未来」 『第2回 これからの神経回路研究会』吹田、2019年1月26日 (招待講演)
- 5) 山下 貴之. “Remote control of deep brain function using scintillation” 『遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」』三島、2018年12月20日 (招待講演)
- 6) 松原 崇紀、堀金 慎一郎、上田 修平、竹本-木村 さやか、河口 範明、柳田 健之、山中 章弘、山下 貴之. 「X線を用いた新規光遺伝学の開発」 『次世代脳：冬のシンポジウム 2018』2018年12月13-14日 (ポスター)
- 7) 水谷 晃大、尾崎 隼平、吉本 潤一郎、山下 貴之. “Characteristic whisker movements reflect the internal state of mice related to reward anticipation” 『日本神経回路学会 第28回全国大会』沖縄、2018年10月25日 (口頭発表)
- 8) 山下 貴之. 「ヒゲにまつわるエトセトラ：マウス洞毛の感覚と運動から探る脳機能」 『大阪大学蛋白質研究所 高次脳機能学セミナー』吹田、2018年10月16日 (招待講演)
- 9) Yamashita T. “Remote control of neuronal function using inorganic phosphor absorbing electromagnetic waves” CSH-Asia Conference: Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits 淡路、2018年9月28日 (一般講演)
- 10) 山下 貴之. 「行動中のマウス感覚・運動皮質における投射特異的な神経シグナル」 『第41回日本神経科学大会』神戸、2018年7月27日 (招待講演)
- 11) 山下 貴之. “Anatomy and physiology of layer 2/3 projection neurons in mouse barrel cortex” 『第95回日本生理学会大会』高松、2018年3月30日 (招待講演)
- 12) 水谷 晃大、山中 章弘、山下 貴之. “Whisker movement as a possible index of internal states of mice” 『第95回日本生理学会大会』高松、2018年3月28日 (口頭発表)
- 13) 山下 貴之. 「マウス洞毛の感覚と運動から脳機能を探る」 『第1回 これからの神経回路研究会』吹田、2018年1月27日 (招待講演)
- 14) 山下 貴之. 「投射ニューロンに着目した大脳皮質神経回路研究の最前線」 『次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム』東京、2017年12月22日 (招待講演)
- 15) Yamashita T. “Projection-specific signals of somatosensation in mouse barrel cortex during active behavior” Society for Neuroscience 2017 米国・ワシントン DC、2017年11月14日 (招待講演)
- 16) 山下 貴之. 「電磁波を利用した新しい光操作法の実現可能性」 『日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2017』東京、2017年11月1日 (招待講演)
- 17) Matsubara T, Yamanaka A, Yamashita T. “Whisking-related activity in motor cortex-connected neurons in layer 5 of mouse barrel cortex” 9th Optogenetics Research Society Japan International Symposium 仙台、2017年10月21~22日 (ポスター)
- 18) 山下 貴之. 「連合学習課題の習得に伴うマウス大脳皮質一次感覚野の変化」 『平成 29年度生理学研究所研究会「記憶・学習の統合的理解に向けたアプローチ」』岡崎、2017年10月11日 (招待講演)
- 19) 松原 崇紀、山中 章弘、山下 貴之. “Whisking-related activity of cortico-cortical projection neurons in layer 5 of mouse barrel cortex” 『第40回日本神経科学大会』千葉、2017年7月20日 (ポスター)
- 20) Yamashita T. “Projection-specific sensorimotor signaling in mouse cortex” EPFL Synapse and Circuit Seminar スイス・ローザンヌ、2017年7月4日 (招待講演)
- 21) 山下 貴之. 「脳内情報の流れを支配する長距離投射ニューロンの機能」 『第二回・名古屋大学医薬系3部局交流シンポジウム/名古屋大学環境医学研究所・群馬大学生体調節研究所合同シンポジウム』名古屋、2017年6月16日 (招待講演)
- 22) 山下 貴之. “Projection-specific regulation of large-scale sensorimotor signaling

in the neocortex” 『5th CiNet Monthly Seminar』 吹田、2017年3月6日（招待講演）

- 23) 山下 貴之. 「動物行動の神経基盤解明に向けた重要神経経路の探索と新規技術開発」 『名古屋大学環研カンファレンス』 名古屋、2017年2月22日（招待講演）
- 24) 山下 貴之、湯浅 英哉、八尾 寛、山中 章弘. 「近赤外光を利用した低侵襲的神経活動操作法の開発」 『第6回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科 合同シンポジウム』 名古屋、2016年9月24日（口頭・ポスター）
- 25) Yamashita T., Yuasa H., Yawo H., and Yamanaka A. " Low-invasive optogenetical stimulation of neurons using near infra-red light" 『第39回日本神経科学学会』 横浜、2016年7月22日（ポスター）

〔図書〕(計1件)

- 1) 山下 貴之 (2018) 「投射ニューロンに着目した大脳皮質神経回路研究」ブレインサイエンス・レビュー 2018 ブレインサイエンス振興財団・廣川信隆（編）(クバプロ),

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yamashitalab.org>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当なし

### (2) 研究協力者

該当なし