

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06913

研究課題名（和文）マウス大脳皮質における機能的マルチモーダル感覚統合の機構解明

研究課題名（英文）Functional mechanism of multimodal sensory integration in the mouse cortex

研究代表者

吉田 崇将 (Yoshida, Takamasa)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：50525904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：複数の異なる感覚情報を統合する多感覚統合は脳の基本的な機能の一つであるが、その神経メカニズムはわかっていない。本研究では、視覚と聴覚の刺激を組み合わせて感覚統合を引き起こす課題をマウスに学習させ、多感覚統合の瞬間の大脳皮質全体の神経活動を一度に撮影することを目指し、そのイメージングおよびタスクシステムの開発と皮質神経ネットワークの構造解析の検討を行った。脳領域間の関係性を機能的結合性とグレンジャー因果性で解析したところ、麻酔や覚醒条件で脳状態を変化させた際に皮質ネットワーク構造も変化する可能性が示唆された。さらに、同様の解析で精神疾患モデルマウスにおいて皮質ネットワーク構造の異常を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、視覚・聴覚の組み合わせを併用して感覚統合を引き起こす課題を実行している最中のマウスの大脳皮質全体の神経活動を捉えるためのシステムを開発した。さらに、脳の状態に依存した皮質神経ネットワーク構造の変化を検出する解析手法も検討した。これらの技術は、基本的な脳機能の一つである感覚統合の神経メカニズムの解明へのブレイクスルーになりうるという学術的な意義に留まらず、感覚統合の異常が見られる統合失調症や自閉症などの病態メカニズムの理解に対しても一助となり、治療の難しい神経・精神疾患に対する重要な手がかりを与える研究への展開が見込まれるという点で社会的意義やインパクトが大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Multisensory integration, which integrates multimodal sensory information, is one of the fundamental functions of the brain, but its neural mechanisms are poorly understood. In this study, we trained mice to perform a task that combines visual and auditory stimuli to induce sensory integration, and aimed to capture the neural activity of the entire dorsal cortex at the moment of multisensory integration at once. An imaging and task systems were developed for this purpose, and structural analysis of cortical neural networks was examined. Analyses of the relationships between brain regions in terms of functional connectivity and Granger causality suggested that cortical network structure may also change when brain states are altered under anaesthetic or arousal conditions. Furthermore, the same analysis detected abnormalities in cortical network structure in a mouse model of psychiatric disease.

研究分野：神経科学

キーワード：感覚統合 大脳皮質 マウス 広域カルシウムイメージング 皮質神経ネットワーク 機能的結合性
グレンジャー因果性 視聴覚弁別課題

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 感覚統合は、生物が進化の過程で獲得してきた基本的な機能であると考えられるが、脳のどこで、どのように行われているかについては未だ不明である。感覚統合に関連したマルチモーダルな神経活動は最初に中脳にある上丘で見出され、その後大脳皮質の一次感覚野や連合野でも発見されてきた(Choi et al., 2018)。特に頭頂連合野でマルチモーダル感覚統合に関連する活動が観察され、神経ネットワークのハブ的な領域であることが示唆されている(Olcese et al., 2013; Raposo et al., 2014; Song et al., 2017; Nikbakht et al., 2018)。さらに、局所神経回路レベルでは、抑制性の GABA 作動生ニューロンが感覚統合に重要な役割を果たしていることもわかってきている(Iurilli et al., 2012; Olcese et al., 2013; Gogolla et al., 2014; Ibrahim et al., 2016; Song et al., 2017)。これまでの研究は、疑わしい脳部位を限定し局所的な神経活動を電気生理学的手法や2光子顕微鏡などによって記録する方法で行われてきた。しかし、感覚統合に関連する脳領域は広く散在していると考えられ、この計測スキームを用いる限りは感覚統合の全体像を掴むことは困難である。したがって、感覚統合の本質を捉えるためには脳全体の神経活動を一度に観察する必要がある。

(2) 上記背景を鑑み、研究代表者らは、大脳皮質広域イメージングの先端技術を開発してきた。Cre-loxP システムに基づきカルシウム感受性蛍光タンパク質を脳部位特異的かつ細胞種特異的に発現させるマウスのシステムを開発した(Kuroki et al., 2018)。これと広域カルシウムイメージングを組み合わせ、大脳皮質の興奮性または抑制性ニューロンの集団的神経活動を大脳皮質全体で捉え、皮質領域間の神経結合性を解析した。その結果、大脳皮質ネットワークにおいて連合皮質領域が情報のハブ的な性質をもっていること、連合皮質領域における徐波振動の位相がマルチモーダル感覚入力の際に揃うこと、その性質は興奮性ネットワークで見られるが、抑制性ネットワークでは見られないこと、などを明らかにした。これらの結果は、皮質連合野における徐波振動の位相同期が感覚統合の基盤であることを示唆しているが、それが実際に機能的な感覚統合においても共通して現れるかどうかは分かっていない。

2. 研究の目的

感覚統合を惹起するようなオペラント課題をマウスに学習させ、その課題を実行している最中の大脳皮質における神経活動を広域カルシウムイメージングによって観察し、研究代表者らが先行研究で発見した徐波神経振動における位相同期現象に着目しながら、機能的な感覚統合と徐波位相同期の関連を詳しく調べる。具体的には、タスクシーケンスの「どのタイミング」で、大脳皮質の「どの領域」が「どの程度」位相同期を示すのか？さらに、行動出力に依存して位相同期がどのように変化するのか？について調べ、機能的感覚統合のメカニズムについて迫る。

3. 研究の方法

(1) タスクシステムの開発： Song ら(2017)によってデザインされた視聴覚弁別課題(Go/No-go タスク)を応用して、マルチモーダル感覚統合を誘発させるタスクシステムを構築した。この課題では、マウスは視覚刺激(縦縞/横縞)の弁別と、聴覚刺激(低音/高音)の弁別をそれぞれ個別に(ユニモーダルに)学習し、十分に学習が成立した後に視覚と聴覚の刺激を組み合わせたマルチモーダル刺激を与えて反応性の変化を調べる。具体的には、マウスは頭部固定装置に十分に馴化した後、例えば縦縞パターンが提示されたら報酬であるジュースが出るスポイトを舐め(Go) 横縞パターンが提示されたら舐めない(No-go)ように学習し、それとは別に高音が提示されたら舐め(Go) 低音が提示されたら舐めない(No-go)よう学習する。学習の成立後、それらの視聴覚刺激を組み合わせることで、Go/Go 刺激(Congruent)パターンとGo/No-go 刺激(Incongruent)パターンに対する応答を調べる(テストパラダイム)。Congruent パターンでは感覚統合の効果により刺激に対する反応パフォーマンスが上がり、Incongruent パターンではその曖昧性により葛藤が生じるため、逆に反応パフォーマンスが下がることが期待される。

(2) タスク遂行中の広域カルシウムイメージング： 研究代表者らが先行研究において開発したカルシウム感受性蛍光タンパク質(YC2.60)を大脳皮質の興奮性神経細胞に特異的に発現する遺伝子改変マウス(Emx1-YC2.60 マウス)を用いて、前述の視聴覚弁別課題を学習させ、学習成立後にマクロ顕微鏡下でテストパラダイムを実施し、タスク遂行中の大脳皮質全体における広域カルシウムイメージングを行う。マウスはタスク学習前に麻酔下において頭蓋骨の透明化処理を施し、ヘッドプレートを固定した。仮説として、前述のCongruent 条件で反応パフォーマンスが上がり、かつ位相同期性が上がった場合、機能的な感覚統合の効果と位相同期の間の関連性があることが推測される。当初の計画には含んでいなかったが、最近の研究で大脳皮質の連合野における抑制性ニューロンのはたらきと感覚統合の関連が示唆されており(Choi and Lee, 2022)、興奮性および抑制性ニューロンの両方の活動を同時に測定できる広域カルシウムイメージングが必要であると考え、これを実現するための多波長蛍光イメージングシステムを設計し、

多波長マクロ顕微鏡システムおよび多波長励起 LED 照明システムを試作した。

(3) 皮質ネットワーク解析： 大脳皮質の広域神経ネットワークを可視化するために、シードピクセル相関マッピングを用いた機能的結合性解析を行う。また、グレンジャー因果性解析によって皮質領域間の情報流に対する因果関係を推定する。複数の大脳皮質領域間における多変量グレンジャー因果性を、自己回帰モデルによる時系列予測により導出した。ここで、自己回帰モデルの最適化は容易ではないため、モデル次数を最尤推定法で求める手法(Barnett and Seth, 2009)と、先験的にモデル次数を与えて得られる回帰係数のうち統計学的に有意な係数のみを用いる手法を組み合わせ、それぞれの問題点を補償する独自のモデル最適化法を考案し使用した。皮質領域はマウスのブレイン・アトラスを基準として、複数の領域を特定し、領域内の ROI におけるピクセル平均時系列を抽出して解析に用いた。これら自発活動ベースの解析手法の妥当性を検証するために、 麻酔の有無・種類に依存した脳状態の変化と皮質ネットワークの関係、および 統合失調症モデルマウスと健常マウスの皮質ネットワークの違いを調べた。誘発応答ベースの解析では、徐波振動帯域の位相同期性指標で大脳皮質全体をマッピングし、機能的感覚統合の神経相関を詳しく調べる。

4. 研究成果

研究計画の 2~3 年目にあたる令和 2~3 年度は COVID-19 パンデミックの影響により、研究の遂行が著しく阻害されたため、研究期間の 2 年延長を行った。さらに、令和 4 年度には所属研究機関の異動があり、研究環境の立ち上げ直しのため当初の計画通りには進められなかった。

(1) タスクシステムの開発： タスクシステムのハードウェアの開発を行い概ね完成させた。タスクシステムの構成は、 頭部固定ステージ、 保定筒、 リッキング検出用光電センサー、 報酬輸液ポンプシステム、 エアパフ用圧搾空気ポンプ、 ディスプレイモニター、 スピーカー、 各種ポンプ駆動回路、 光電センサーアンプ回路、 音刺激生成回路、 コンピューターである。さらに、それらをコントロールするためのプログラム、ディスプレイ上にガボールパッチ状のグレーティング刺激を提示するプログラム、およびタスクシーケンスを制御するプログラムを作成した。ハードウェアに関しては、マウスをステージに固定してリッキングの検出が可能か検証した。さらに、マウスがタスクシステムに対して十分に馴化することを確認した。マウスにタスクを学習させる直前までの準備は整ったものの、学習以降のプロセスは完遂できなかった。それに伴い、タスク遂行中のイメージングも実現できなかった。

(2) 皮質ネットワーク解析： 最終的な目標として挙げた「大脳皮質神経ネットワークの解析手法の確立」の検討を既に取得済みのイメージングデータを用いて進めた。

麻酔の有無・種類に依存した脳状態の変化と皮質ネットワークの関係： 異なる種類の麻酔や睡眠・覚醒によって脳状態が大きく変化し、それに伴い皮質ネットワーク構造も変化すると仮定した(Alkire et al., 2008; Reimann and Niendorf, 2020)。シードピクセル相関マッピングによる機能的結合性(FC)と新たに考案した自己回帰モデル最適化法により導出したグレンジャー因果性(GC)を用いて、2つの異なる麻酔状態：イソフルラン/デトミジン・ミダゾラム・フェンタニル混合(MMF)および覚醒状態のマウス大脳皮質(左半球)における徐波振動帯域の自発神経活動から、脳状態に依存した皮質ネットワーク構造の違いを検出することを試みた。FCでは、いずれの脳状態でも結合性の大きな変化は見られなかった(Fig.1A)。一方で、GCではイソフルラン麻酔時と覚醒時で同様の構造を示したが、MMF麻酔時の構造とは異なっていた(Fig.1B)。このことから、GCを用いて麻酔の種類および覚醒に依存した脳状態の変化と皮質ネットワーク構造の変化の関連性が示唆された。

統合失調症モデルマウスと健常マウスの皮質ネットワークの違い： 合成 RNA である poly(I:C)は自然免疫の Toll 様受容体(TLR3)のリガンドであり、生体内に導入するとウイルス感染を模した免疫応答を速やかに誘導し、妊娠マウスに投与した場合、その仔に統合失調症様の行動表現型が発現する。雄の YC2.60-flox マウス(Kuroki et al., 2018)と交配し妊娠した雌の Emx1-Cre マウスに、妊娠 9.5 日目に poly(I:C)を尾静脈注射した(Meyer et al., 2005)。こうして生まれたダブルトランスジェニックマウス(Emx1-YC2.60 マウス)の大脳皮質興奮性ニューロンには YC2.60 が特異的に発現しており、これを用いて行動表現型テスト(オープンフィールド試験およびプレパルス抑制試験)を行い異常が見られたマウスを統合失調症モデルとして広域カルシウムイメージングに使用した。大脳両半球を正中線で折り返して反転したミラー領域間の同所性相関係数をピクセルごとにマッピングしてホモトピック相関マップを描画したところ(Fig.2) デフォルト・モード・ネットワークに含まれる二次運動野(M2c)と後脳梁膨大部(RSD)は、左右半球間で高い相関を示した。一次視覚野両眼視領域(V1B)は同様に相関が高か

ったが、一次体性感覚野パレル領域 (S1BF)、一次体性感覚野前肢領域 (S1FL)、一次視覚野単眼視領域 (V1M) は相関が低かった。特に、V1M では poly(I:C) 群では対照群よりも相関が有意に低く、統合失調症患者を対象とした fMRI 研究の結果と一致した (Hoptman et al., 2012)。

さらに、大脳両半球における皮質領域間の FC および GC のリンクマップを描画したところ、FC では右半球でリンクが変化し、poly(I:C) マウスではその対称性が崩れた (Fig.3A)。GC では左 V1 がソース、右 V1B がシンクで、左右の領域が広くつながっており、対照群と poly(I:C) 群のグローバルな構造は同様であった (Fig.3B)。これらの結果は、解釈が難しくさらなる検証が必要であるが、FC は poly(I:C) 処理による変化を識別でき、FC と GC は異なるネットワーク構造を抽出できる可能性があることを示唆している。

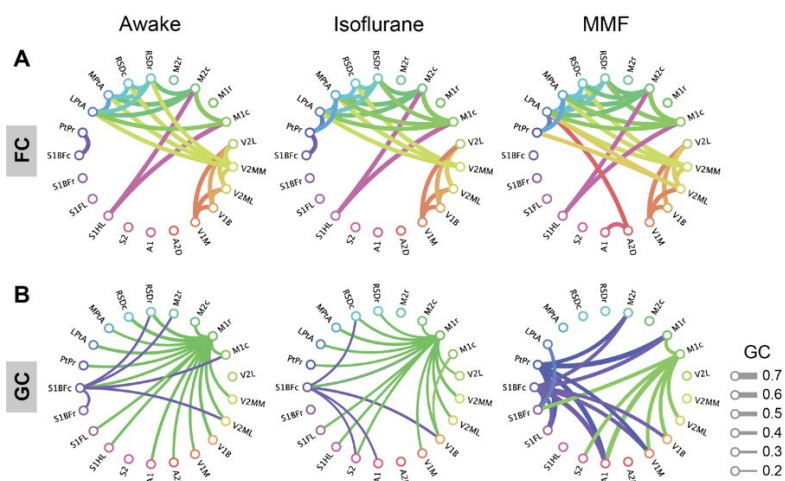


Fig.1 Functional connectivity and Granger causality under different brain states

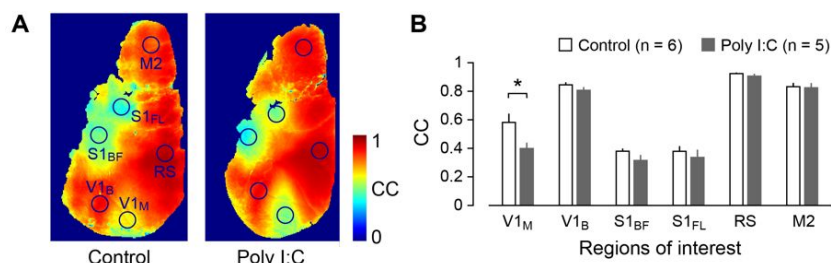


Fig.2 Homotopic correlation map in schizophrenia model and control mice

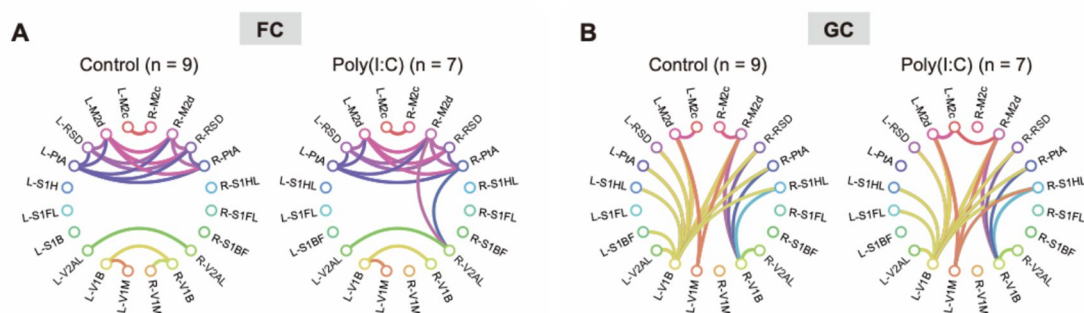


Fig.3 Functional connectivity and Granger causality in schizophrenia model and control mice

<引用文献>

- Alkire et al., 2008, *Science* 322:876-880.
Barnett and Seth, 2009, *J.Neurosci.Methods* 201:404-419.
Choi et al., 2018, *Curr.Opin.Neurobiol.* 52:115-122.
Choi and Lee, 2022, *Mol.Brain* 15:82
Gogolla et al., 2014, *Neuron* 83:894-905.
Hoptman et al., 2012, *Schizophr.Res.* 141:1-7.
Ibrahim et al., 2016, *Neuron* 97:640-655.
Iurilli et al., 2012, *Neuron* 73:814-828.
Kuroki et al., 2018, *Cell Rep.* 22:2873-2885.
Meyer et al., 2005, *Neurosci.Biobehav.Rev.* 29:913-947.
Nikbakht et al., 2018, *Neuron* 97:1-14.
Olcese et al., 2013, *Neuron* 79:579-593.
Raposo et al., 2014, *Nat.Neurosci.* 17:1784-792.
Reimann and Niendorf, 2020, *Front.Syst.Neurosci.* 14:8.
Song et al., 2017, *Neuron* 93:940-954.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Michikawa Takayuki, Yoshida Takamasa, Kuroki Satoshi, Ishikawa Takahiro, Kakei Shinji, Kimizuka Ryo, Saito Atsushi, Yokota Hideo, Shimizu Akinobu, Itohara Shigeyoshi, Miyawaki Atsushi	4. 巻 37
2. 論文標題 Distributed sensory coding by cerebellar complex spikes in units of cortical segments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109966	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田崇将, 黒木暁, 佐野千枝, 安藤れい子, 仲柴俊昭, 糸原重美, 田中尚樹, 林俊宏
2. 発表標題 統合失調症モデルマウスにおける大脳皮質機能的ネットワークの変容
3. 学会等名 第101回 日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 吉田崇将, 黒木暁, 糸原重美, 田中尚樹
2. 発表標題 麻酔下および覚醒下のマウス大脳皮質における因果性ネットワークの推定
3. 学会等名 第49回 可視化情報シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田崇将, 黒木暁, 佐野千枝, 安藤れい子, 糸原重美
2. 発表標題 Decreased Interhemispheric Connectivity in the Visual Cortex of Schizophrenia Model Mouse
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020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
---------	---------