

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06934

研究課題名（和文）広視野2光子励起顕微鏡による皮質神経伝播の機序と生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism and physiological significance of cortical neural propagation using wide-field two-photon microscope

研究代表者

太田 桂輔（Ota, Keisuke）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：40610382

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）：脳は異なる役割を担う部位の集合体であり、各脳領域の神経細胞がシナプスを介して神経回路を形成し、その神経回路に高次脳機能が生まれると考えられている。しかしながら、多領域を越えて単一細胞の解像度で神経回路の活動を計測する観測系は確立しておらず、広域に渡る神経回路の機能的構造は不明であった。本研究では広視野2光子励起顕微鏡FASHIO-2PMにより覚醒マウスの大脳皮質2層から1万6000個以上の興奮性細胞の活動を計測し、ネットワークを解析した。大脳皮質の機能的ネットワークはスモールワールドネットワークの特性を有し、100以上の細胞と協調的に活動する非常にレアなハブ細胞の存在が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた動物の脳から単一神経細胞の活動を大規模に計測し、100以上の神経細胞と協調的に活動する機能的ハブ細胞を発見した。ハブ細胞の存在率は極めて低く、これは各神経細胞の活動が脳システム全体に与える影響力は一樣ではなく、細胞ごとに偏っている可能性を示唆している。またスモールワールドネットワークの特性は、大脳皮質は局所的な細胞間だけではなく、物理的距離が離れた細胞であっても、神経活動の情報を効率的に共有していることを意味している。すなわち脳は、情報処理においてコストがかかりにくいエコなシステムであること示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：The brain is a collection of parts that play different roles, and neurons in each brain region form neural circuits through synapses, and higher brain functions are thought to arise in these neural circuits. However, no observational system has been established to measure neural activity with single-cell resolution across multiple regions, and the functional structure of neural circuits over a wide area has remained unknown. We used a wide-field two-photon excitation microscope, FASHIO-2PM, to measure more than 16,000 neural activities of L2 excitatory neurons in an awake mouse and analyzed functional networks defined by the neural activity. It was revealed that the functional networks of the cortex have the propensity of a small-world network and the presence of rare hub cells that are cooperatively active with more than 100 neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：広視野2光子励起顕微鏡 カルシウムイメージング 大脳皮質 機能的ネットワーク スモールワールドネットワーク ハブ細胞 自動細胞検出 アデノ随伴ウイルス

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

脳機能局在論に基づけば、脳の異なる部位はそれぞれ異なった機能を担う(局所的な情報処理モデル)。一方、大脳皮質を対象としたマクロイメージングでは、感覚刺激によって誘起された神経活動が異なる脳領域に時空間方向に連続的に伝播する(全体的な情報処理モデル)。本課題ではこのような神経活動を神経伝播と呼ぶ。神経伝播は麻酔下の動物に感覚刺激を与えた場合でも生じることから、動物の行動や内的状態に依らない神経回路そのものに備わる情報伝達機構と言える。本研究では、この神経伝播を従来の局所的な情報処理モデルを拡張した新たな情報処理モデルとして捉える。

げっ歯類の大脳皮質 2/3 層の神経細胞は外界刺激(視覚刺激・音刺激・体性感覚刺激など)に対して反応する頻度が少ない。しかし、大脳皮質 2/3 層のわずか数%の神経細胞は外界刺激に対して高頻度に反応する(O'Connor et al., Neuron, 2010)。一方、神経活性化のマーカーである c-fos タンパク質が発現した皮質細胞は、互いに強いシナプス結合を形成することが知られている(Yassin et al., Neuron, 2010)。これら 2 つの先行研究は、外界刺激に高頻度で応答する神経細胞は互いに強いシナプス結合を形成することを示唆する。本研究ではこのような神経細胞を大脳皮質の神経伝播においてハブの役割を果たすという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

大脳皮質の神経伝播においてハブの役割を果たす細胞が存在するという仮説を検証するためには、広視野かつ高解像度観察が必須である。そこで、申請者らが開発した広視野・高解像度・高速撮像・高感度・無収差を同時に満たす 2 光子励起顕微鏡「FASHIO-2PM (fast-scanning high optical invariant two-photon microscopy)」を用いて生きたマウスにおいて 1 つ 1 つの神経細胞の活動を広視野観察する。ハブとなる細胞を同定し、仮説の検証と神経伝播の生理学的意義を解明する。

## 3. 研究の方法

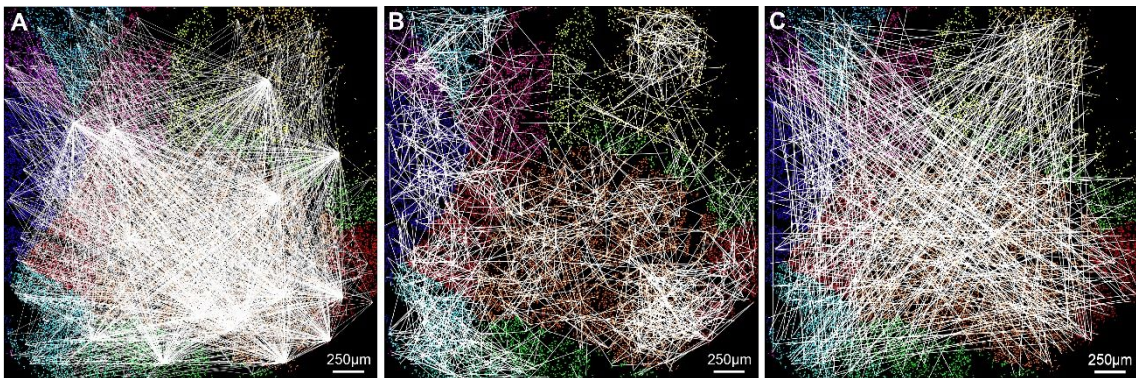
広範囲の神経細胞にカルシウムセンサーを発現させる手法、大規模な撮像データから短時間かつ正確に単一神経細胞を検出するアルゴリズムを開発し、生きた動物の大脳皮質 2 層において 10,000 個以上の神経細胞の活動を計測した。

この脳領域を隔てた単一神経細胞の同時活動計測は、複数の脳領域を跨いだ単一神経細胞の機能的ネットワークを明らかにできる。ただし、マウス大脳皮質の神経細胞は、体の動きによって広範囲に渡って活性化することが知られている(Musall et al., 2019)。体の動きによって生じた神経活動の相関を考慮して機能的な結合強度を定めるために、(1) カルシウムイメージングと同時に小型ジャイロセンサー、もしくは筋電位によりマウスの体の動きも計測し、(2) 計測した動きを制御変数として神経活動の偏相関係数を計算した。ある閾値以上の偏相関係数を示す神経細胞ペアには機能的結合(リンク)があると定義して、マウス大脳皮質 2/3 層の機能的ネットワークを定め、次数分布の特性、クラスター係数、平均経路長を調べた。

## 4. 研究成果

機能的ネットワークの次数分布は裾の重い分布であることが分かった。これは大脳皮質の機能的ネットワークがランダムネットワークではないことを示すと同時に、分布の裾には機能的なハブ細胞が存在することを意味する。100 個以上の神経細胞と結合している機能的ハブ細胞の存在確率は 1%未満と極めて稀であった(図 1A)。そして、このとき次数分布は統計的有意にベキ分布に従わないことも明らかになったことから、マウス大脳皮質 2/3 層の機能的ネットワークはスケールフリーネットワークではないという結論に至った。

機能的ネットワークのリンクを描いてみると細胞間距離が 500  $\mu\text{m}$  以下となる機能的結合は同一脳領域内で密度高く存在しており(図 1B) 興味深いことに 2,500  $\mu\text{m}$  以上離れた細胞間においても機能的結合が存在することが明らかになった(図 1C)。そこで同程度のノードとリンクを有するレギュラーネットワークとランダムネットワークを模擬的に生成し、大脳皮質の機能的ネットワークを含め 3 種類のネットワーク間でクラスター係数と平均最短経路長を比較した。大脳皮質の機能的ネットワークのクラスター係数はレギュラーネットワークとほぼ等しく大きな値を示し、平均最短経路長はランダムネットワークとほぼ等しく小さい値となった。さらにクラスター係数と平均最短経路長から Small-world propensity (Muldoon et al., 2016) を計算したところ、全マウス (n=4) において 0.6 以上と大きな値を示した。この結果から、我々はマウス大脳皮質 2/3 層の機能的ネットワークはスモールワールドネットワークの特性を有しているという結論に至った。



(A) 120 個以上の神経細胞と機能的結合を形成するハブ細胞とその機能的結合(白線)。 (B), (C) 2 つの神経細胞間距離が 500  $\mu\text{m}$  以下、2,500  $\mu\text{m}$  以上となる機能的結合の例。すべての図において脳領域ごとに異なる色で 1 つ 1 つの神経細胞を描いている。

本研究では大規模な神経活動記録とその活動に基づいたネットワーク解析により、仮説で述べた機能的ハブを見つけることができた。ハブ細胞の存在率は稀であり、この細胞が神経伝播(神経情報伝播)においてどのような役割を果たしているかを明らかにすること今後の課題である。また、大脳皮質の機能的ネットワークがスモールワールドネットワークの特性を有することを明らかにした。これは大脳皮質において cost-effective な情報処理が行われていること示唆する。

#### 引用文献

- (1) O' Connor et al., (2010). Neural activity in barrel cortex underlying vibrissa-based object localization in mice. *Neuron*. 67, 1048-1061.
- (2) Yassin et al., (2010). An embedded subnetwork of highly active neurons in the

neocortex Neuron. 68, 1043-1050.

- (3) Musall et al., (2019). Single-trial neural dynamics are dominated by richly varied movements. Nat. Neurosci. 22, 1677-1686.
- (4) Muldoon et al., (2016). Small-World Propensity and Weighted Brain Networks. Sci. Rep. 6, 22057.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Omoto Ikumi, Uwamori Hiroyuki, Matsubara Chie, Odagawa Maya, Kobayashi Midori, Kobayashi Kenta, Ota Keisuke, Murayama Masanori	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for cortical-wide field-of-view two-photon imaging with quick neonatal adeno-associated virus injection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101007 ~ 101007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.101007	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 Shun Kimura, Keisuke Ota, Koujin Takeda	4. 巻 2021
2. 論文標題 Improved neuronal ensemble inference with generative model and MCMC	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment	6. 最初と最後の頁 63501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aonishi Toru, Maruyama Ryoichi, Ito Tsubasa, Miyakawa Hiroyoshi, Murayama Masanori, Ota Keisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Imaging data analysis using non-negative matrix factorization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	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） 10.1016/j.neures.2021.12.001	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 K. Ota, Y. Oisi, T. Suzuki, M. Ikeda, Y. Ito, T. Ito, H. Uwamori, K. Kobayashi, M. Kobayashi, M. Odagawa, C. Matsubara, Y. Kuroiwa, M. Horikoshi, J. Matsushita, H. Hioki, M. Ohkura, J. Nakai, M. Oizumi, A. Miyawaki, T. Aonishi, T. Ode and M. Murayama	4. 巻 -
2. 論文標題 Fast, cell-resolution, contiguous-wide two-photon imaging to reveal functional network architectures across multi-modal cortical areas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuron	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） 10.1016/j.neuron.2021.03.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ota Keisuke, Ode Takahiro, Murayama Masanori	4. 巻 27
2. 論文標題 Wide Field Two-photon Excitation Microscope for In Vivo Calcium Imaging with Single Cell Resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Brain & Neural Networks	6. 最初と最後の頁 55 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3902/jnns.27.55	査読の有無 無
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 Ito Tsubasa, Ota Keisuke, Ueno Kanako, Oisi Yasuhiro, Matsubara Chie, Kobayashi Kenta, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi, Murayama Masanori, Aonishi Toru	4. 巻 179
2. 論文標題 Low computational-cost cell detection method for calcium imaging data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 39 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.02.008	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 Ota Keisuke, Uwamori Hiroyuki, Ode Takahiro, Murayama Masanori	4. 巻 179
2. 論文標題 Breaking trade-offs: Development of fast, high-resolution, wide-field two-photon microscopes to reveal the computational principles of the brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 3 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.03.010	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 太田桂輔, 村山正宜	4. 巻 54
2. 論文標題 大脳新皮質の機能的ネットワーク特性を明らかにする広視野高速2光子顕微鏡	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 24-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上森寛元, 太田桂輔, 村山正宜	4. 巻 73
2. 論文標題 広視野2光子顕微鏡FASHIO-2PMの開発とその高機能化に向けて	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 426-427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Keisuke Ota, Yasuhiro Oisi, Muneki Ikeda, Yoshiaki Ito, Hiroyuki Uwamori, Kimura Shun, Kenta Kobayashi, Yoshinori Kuroiwa, Masaru Horikoshi, Junya Matsushita, Hiroyuki Hioki, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Koujin Takeda, Masafumi Oizumi, Atsushi Miyawaki, Toru Aonishi, Takahiro Ode, Bito Haruhiko, Masanori Murayama
2. 発表標題 Fast and wide field-of-view two-photon imaging with a single-cell resolution to reveal functional network proprieties.
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田桂輔
2. 発表標題 広視野2光子顕微鏡によって明らかにされた大脳皮質の機能的ネットワーク
3. 学会等名 第13回 数理モデリング研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田桂輔
2. 発表標題 広視野2光子顕微鏡による単一細胞解像度 in vivo カルシウムイメージング
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 K. Ota, Y. Oisi, T. Suzuki, M. Ikeda, Y. Ito, T. Ito, H. Uwamori, K. Kobayashi, M. Kobayashi, M. Odagawa, C. Matsubara, Y. Kuroiwa, M. Horikoshi, J. Matsushita, H. Hioki, M. Ohkura, J. Nakai, M. Oizumi, A. Miyawaki, T. Aonishi, T. Ode, M. Murayama
2. 発表標題 Fast, cell-resolution and wide field-of-view two-photon imaging to reveal functional small-world networks of the cortex
3. 学会等名 EMBL Symposium: Seeing is Believing (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Ota
2. 発表標題 Cortical functional network properties revealed by “FASHIO-2PM”, a fast scanning and wide-field two-photon microscope with single-cell resolution
3. 学会等名 第64回 日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田桂輔、村山正宜
2. 発表標題 広視野高速2光子顕微鏡 FASHIO-2PM による脳神経ネットワークのin vivo イメージング
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第46回関東支部講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳の宇宙を捉える顕微鏡 - 世界初、多領域にまたがる神経ネットワークのエコ特性を発見 -  
[https://www.riken.jp/press/2021/20210420\\_1/](https://www.riken.jp/press/2021/20210420_1/)  
 脳はハブ細胞が存在するエコなシステムであった  
<https://www.jnss.org/news-topics?id=210608-01&u=fcf8a291ba5411489505b1a8200ca45b>  
 脳の宇宙を捉える顕微鏡  
[https://www.riken.jp/press/2021/20210420\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2021/20210420_1/index.html)



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
---------	---------