

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22698

研究課題名（和文）光遺伝学fMRIを用いた体性感覚野活動時の動的機能的結合の解明

研究課題名（英文）Dynamic functional connectivity during the activation in somatosensory cortex by optogenetic fMRI

研究代表者

釣木澤 朋和 (Tsurugizawa, Tomokazu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員

研究者番号：10716210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：動的機能的結合の解析パイプラインを確立し、麻酔下と覚醒下で動的なネットワークの出現頻度が異なることを明らかにした。本研究により、麻酔下での意識レベルの低下のメカニズム解明が期待される。次に光遺伝学fMRIのセットアップを行い、大脳皮質感覚野の神経活動を増強させた時の視床-感覚野の機能的結合の動的変化がBOLD信号変化とは違うことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、活動中の動的な機能的結合を動物モデルでも計算することが可能となった。これまでは、安静時の機能的結合が主として調べられていたが、行動異常をどこまで説明できるかは不明である。精神神経疾患では、行動異常が認められることから、精神神経疾患患者の行動中の機能的結合を直接調べることができるように、今後の疾患と脳の研究に貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：An analytical pipeline of dynamic functional connectivity was established. Our results demonstrate that the frequency of appearance of dynamic networks is different between light anesthetized state and awakened state. These results are expected for the mechanisms of reduced levels of consciousness under anaesthesia. Next, we conducted an optogenetic fMRI and showed that the dynamic changes in thalamo-sensory functional connectivity during enhanced neural activity in cortical sensory cortex are different from BOLD signal changes.

研究分野：医療物理学、神経科学

キーワード：MRI 動的機能的結合 マウス optogenetics fMRI

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

安静時の機能的 MRI (fMRI) によって計測される機能的結合 (FC) とは、離れた脳領域間の神経活動パターンの同期の程度であり、脳機能ネットワークの程度を反映している。2012 年に FC を短時間で解析する方法が発表され、数十秒という短い時間幅でこの FC がゆらぐことが報告され、我々の脳ネットワークは一定ではなく動的に変化していることが示唆された(1)。これを動的 FC とよぶ。これまでの研究では、安静時 fMRI による脳の基底状態における動的 FC を計測しており、タスクベース fMRI で行われる感覚情報入力に対する動的 FC については、比較的研究されていない。しかし、我々の覚醒時の脳は感覚情報入力を処理している状態なので、感覚情報処理時の動的 FC を計測することは今後の脳ネットワーク研究に必要である。タスクベース fMRI でよく用いられる刺激の一つである体性感覚においては、これまでに体性感覚野の神経細胞が活性化した時の脳ネットワークは基底状態からどのように変遷し、どのような振舞いをするか明らかではない。また、マウスこれまで用いられてきた安静時 fMRI では、当然ながらこの問いを明らかにすることはできない。

2. 研究の目的

- (1) マウスモデルで動的 FC の解析方法を確立するため、無麻酔および麻酔下のマウス安静時 fMRI データを使って解析する。
- (2) 体性感覚野の神経細胞の活動時の動的 FC を解析するため、光遺伝学的手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 動的 FC の解析

安静時 fMRI データは、Bruker 11.7T MRI システムで計測したデータを用いた。同一のマウスで、無麻酔下で計測した後、イソフルラン 0.8%のみ、もしくはイソフルラン 0.5% + メドミジン 0.05 mg/kg/h の 2 種類の麻酔下で計測を行った。各条件の撮像パラメータは、repetition time/echo time = 1500/14 ms、解像度 = 100 × 100 × 500 μm^3 /voxel、matrix size = 150 × 92、15 スライス、400 画像(合計 10 分間)、とした。

得られたデータは、SPM12 (Wellcome Trust Center for Neuroimaging, UK) を用いて時空間補正を行い、その後 Conn toolbox (<https://web.conn-toolbox.org/>)(2) を用いてドリフト補正、白質・脳脊髄液・頭の動きの補正を行った後、0.01-0.08 Hz のバンドパスフィルターをかけた。その後、Group ICA of fMRI Toolbox (<http://trendscentre.org/software/gift/>) を用いて、動的 FC の計算を行った。動的 FC を計測するため、デフォルトモードネットワーク、感覚皮質間結合、聴覚野 - 視覚野間結合、海馬、視床、視床下部の 7 つの代表的なネットワークを、独立成分分析を用いて抽出した。それぞれのネットワークを ROI として、45 秒 (30 TR) の Window size と 1.5 秒 (1 TR) の step を使用した。各 window について、L1 ノルム制約を備えた LASSO 法を使用して、正則化逆共分散行列の形式で FC を推定した。全個体で発生した FC の状態を特定するために、ウィンドウ化された FC 行列に k-means クラスタリング手順を適用した。結果として得られた k 個のクラスター重心は、全個体のすべてのウィンドウの FC 行列をクラスター化するためのテンプレートとして使用されました。状態の滞留時間は、時間ウィンドウと時間 + 1 ウィンドウの間で変化しない頻度として計算され、発生頻度は各状態のウィンドウの数として計測した。

(2) 光遺伝学的手法による体性感覚野神経細胞の活性化

本実験では、9.4T MRI を用いた。イソフルラン麻酔下 (2%) において、マウス大脳皮質感覚野神経細胞にチャネルロドプシン (ChR2) をアデノウイルス (AAV.EF1a.DIO.hChR2(H134)-EYFP.WPRE.hGH) 投与により発現させた。発現の有無は、MRI 計測後に脳を灌流固定し、EYFP の発現により確認した。アデノウイルス投与から 3 週間後に、イソフルラン麻酔下 (2%) において、光刺激用のプローブを大脳皮質感覚野に刺入し、デンタルセメントで固定した。手術から 1 週間以上経過した後に、光刺激により fMRI 計測を行った。MRI 計測には、Bruker 9.4T MRI システムを用いた。光刺激は青色光 (473 nm、2mW) を用いて、最初の 30 秒の刺激なしの後、30 秒間刺激あり、30 秒間刺激なしを交互に 5 回行った。得られた画像は、空間補正を SPM12 を用いて行い、光刺激により賦活された脳領域を検出した。さらに、有意に賦活した感覚野の一部を ROIs とし、ROI 内の BOLD (blood oxygenation level-dependent) 信号を計算した。さらに、視床の ROI t を用いて視床の BOLD 信号変化を計算し、ROIs と ROI t の相関件数の時間変化を計算した。計算に用いた Window size は、7.5s とした。

4. 研究成果

(1) 動的 FC の解析

麻酔下と無麻酔下の FC を比較したところ、イソフルラン単独 (ISO)、イソフルラン+メドミジン (ISO + Med) とともに、麻酔下で全体的に有意に低下していた (図 1、tsurugizawa et al., NeuroImage, 2021 より引用) (3)。さらに、動的計算の出現頻度を計測したところ、状態 1-4 にクラスターにネットワークが分類され、麻酔下と覚醒下では出現頻度が異なることが明らかになった。麻酔下では、局所的なネットワーク (State1) の出現頻度が多くなり、覚醒下では、離れた距離をつなぐグローバルなネットワークを含むクラスター (State2, 4) の出現頻度が多くなった (図 2、tsurugizawa et al., NeuroImage, 2021 より引用)。

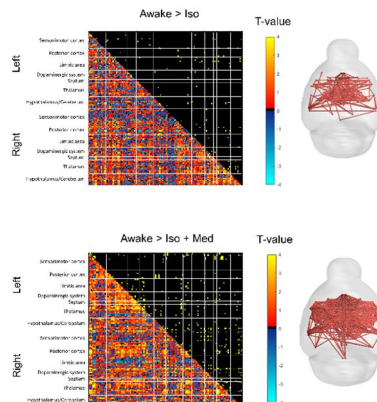


図 1 麻酔により低下した FC

(2) 光遺伝学的手法による体性感覚野神経細胞の活性化

次に大脳皮質感覚野神経細胞に ChR2 を発現したマウスで光刺激中の FC の変化を計測した (n = 2)。光刺激中に、大脳皮質感覚野に有意な賦活が認められた (p < 0.01, uncorrected, 図 1A)。MRI 計測後に、ChR2 の発現は確認済みである (図 1B) 感覚野の賦活部位の平均の BOLD 信号変化を 図 3C に示す。刺激開始後 6 秒程度してから、信号が増強し、刺激終了後にベースラインに戻った。視床と感覚野の FC の時間変化を調べたところ、光刺激開始直後に FC が 0.5 まで大きくなり、その後は 0.2 の付近を維持しづらつきが小さくなった。刺激終了後には、-0.4 から 0.2 の間でばらついていった。本研究結果により、BOLD 信号変化とは異なるタイムコースで FC が変動することが示唆された。しかし、ChR2 の発現と光プローブ留置の手術手技習得に時間がかかり、統計解析に必要なサンプル数を確保できていない。今後は、サンプル数を増やし、視床 - 感覚野の FC のタイムコースおよび、(1) で開発した動的 FC の計算を行う予定である。本研究ではファイバーフォトメリーのセットアップに時間がかかり、データ計測までたどり着かなかったが、BOLD 信号変化から神経活動が惹起されているものと考えられる。これからデータ計測を行う予定である。また、よりクオリティの高いデータを得るための今後の課題として、頭部に挿入した光ファイバーと送受信コイルが当たらないようなコイルを設計する必要がある。

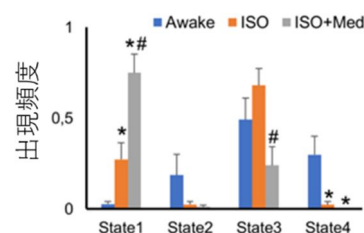


図 2 動的機能的結合

< 引用文献 >

1. Allen et al., Tracking Whole-Brain Connectivity Dynamics in the Resting State, Cerebral Cortex, 2012, 24(3), 663-676.
2. Whitfield-Gabrieli and Nieto-Castanon, Brain Connect, 2012, 2, 125-141.
3. Tsurugizawa et al., NeuroImage, 241:118413, 2021.

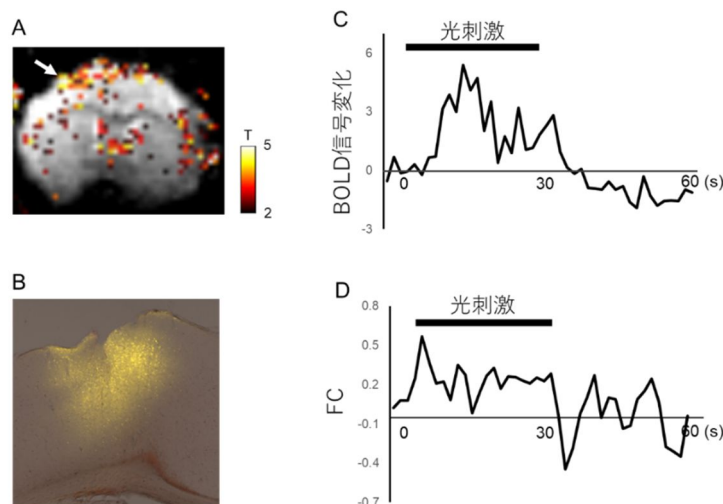


図 3 (A) ChR2 を発現したマウスに青色光刺激を行った際の BOLD 信号上昇。ChR2 の発現場所。(C) 感覚野で有意な活動を示した領域の BOLD 信号変化。(D) 光刺激中の感覚野 視床間の機能的結合の時間変化。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsurugizawa Tomokazu, Yoshimaru Daisuke	4. 巻 241
2. 論文標題 Impact of anesthesia on static and dynamic functional connectivity in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NeuroImage	6. 最初と最後の頁 118413 ~ 118413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroimage.2021.118413	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 Tokunaga Ryota, Paquette Thierry, Tsurugizawa Tomokazu, Leblond Hugues, Pich? Mathieu	4. 巻 54
2. 論文標題 Fasting prevents medetomidine induced hyperglycaemia and alterations of neurovascular coupling in the somatosensory cortex of the rat during noxious stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4906 ~ 4919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15350	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 Tsurugizawa Tomokazu, Tamada Kota, Debacker Clement, Zalesky Andrew, Takumi Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 Cranioplastic Surgery and Acclimation Training for Awake Mouse fMRI	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3972	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 釣木澤 朋和
2. 発表標題 Impact of anesthesia on static and dynamic functional network in mice
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 釣木澤 朋和
2. 発表標題 橋渡し研究を目指した高磁場小動物 MRI による脳機能計測
3. 学会等名 NMRマイクロイメージング研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 釣木澤 朋和、玉田 紘太、内匠 透
2. 発表標題 Awake functional MRI detects the neural circuit dysfunction in 15 dup autism model mouse
3. 学会等名 FENS Forum 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 釣木澤 朋和
2. 発表標題 Awake fMRI shows an impact of anesthesia on resting state functional connectivity in mice
3. 学会等名 ISMRM 2021 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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