

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830020

研究課題名(和文)2光子イメージングと光操作による運動学習過程での大脳神経細胞の可塑性誘導機構解明

研究課題名(英文)Revelation of the induction mechanism of plasticity during motor learning with the two-photon imaging and optical manipulation

研究代表者

正水 芳人(MASAMIZU, Yoshito)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：90608530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：まずアデノ随伴ウイルスの逆行性感染様式を利用して、マウス一次運動野第5層の神経細胞の中で、線条体に投射している皮質-線条体投射神経細胞、もしくは脊髄に投射している皮質-脊髄投射神経細胞のみに蛍光カルシウムセンサーを遺伝子発現させた。次に、これらの投射経路特異的に蛍光カルシウムセンサーを遺伝子発現させたマウスに、2週間、自発的なレバー引き課題をおこなわせ、2光子カルシウムイメージングによって、神経活動を計測した。解析の結果、投射経路によって、運動学習で、発火頻度が上昇する神経細胞の集団が異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：First, fluorescence calcium sensor was expressed in only corticostriatal neurons or corticospinal neurons of mouse primary motor cortex by the retrograde gene transfer of adeno-associated virus. Next, I performed two-photon calcium imaging during a self-initiated lever-pull task for two weeks. These imaging data revealed that, during motor learning, the population which increased firing rate in corticostriatal neurons was different from that in corticospinal neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：2光子イメージング 2光子励起顕微鏡 運動学習 アデノ随伴ウイルス 逆行性感染

1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質は、哺乳類のみに存在する大脳の表面を覆う領域で、多くの認知機能に関わる。6層構造からなる大脳新皮質は、各層の神経細胞が異なる入出力を持ち、記憶や学習が関与する認知課題を行う際には、様々な領域とネットワークを形成し、情報処理を行っている。運動技能は、繰り返し練習して身につけた動作で、運動学習が重要な役割を果たす。学習は段階的に進行し、初期は動きが未熟でぎこちないが、練習により行動の正確さや速度が増し、後期に運動は自動化される。これまでの研究では、*in vivo* 2光子カルシウムイメージングで、げっ歯類の運動野の浅層第2/3層および深層第5層の神経細胞の活動を解析し、レバー引き運動学習によって、第2/3層よりも第5層の神経細胞の方が、運動課題実行時、発火頻度が上昇するようになるタイプ (increase type) の神経細胞が多いことを明らかにした。

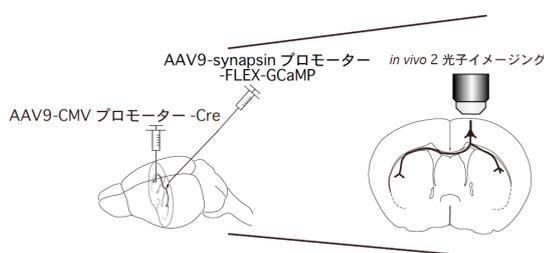
2. 研究の目的

本研究では、運動野第5層の神経細胞の中で、線条体に投射している皮質-線条体投射神経細胞、もしくは脊髄に投射している皮質-脊髄投射神経細胞のみに蛍光カルシウムセンサーの GCaMP を発現させ、それらの神経細胞の活動を *in vivo* 2光子イメージングで観察することによって、投射細胞特異的に運動学習時の神経活動遷移を解明することを目的とする。

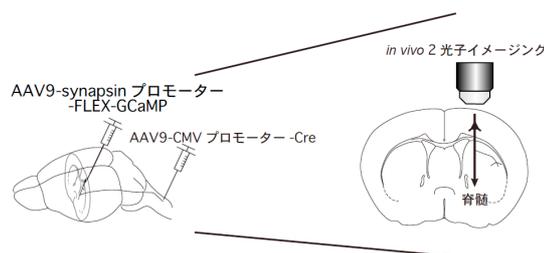
3. 研究の方法

アデノ随伴ウイルスが順行性だけでなく逆行性にも感染する様式を利用した遺伝子導入法を用いて、皮質-線条体投射神経細胞のみに (図1) もしくは皮質-線条体投射神経細胞のみに GCaMP を遺伝子発現させた (図2)。具体的には、電動シリンジポンプを用いて、左脳一次運動に「アデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 (AAV9) -CAG プロモーター-FLEX-GCaMP」を $0.25 \mu\text{l}$ 注入し細胞体から順行性に感染させ、さらに、右脳線条体、もしくは脊髄に「AAV9-CMV プロモーター-Cre」を $0.25 \mu\text{l}$ 注入し、一次運動野から線条体、もしくは脊髄に投射している神経細胞の軸索末端から、逆行性に感染させた。

(図1) 皮質-線条体投射神経細胞のみでの遺伝子発現



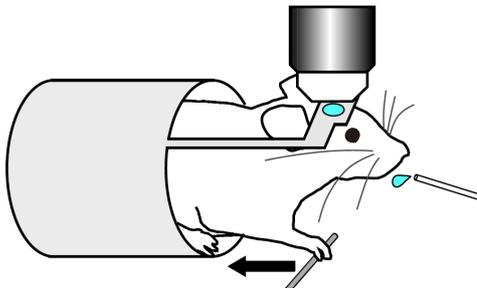
(図2) 皮質-脊髄投射神経細胞のみでの遺伝子発現



このようにして、投射経路特異的に GCaMP を遺伝子導入したマウスを用いて、2光子励起顕微鏡下、報酬をとまなう随意運動課題実行中に単一細胞レベルで多細胞の神経活動をリアルタイムに計測した (図3)。

(図3) 報酬をともなう随意運動課題装置

頭部に固定具を取り付けることによって、マウスの頭は動かない。一次運動野上の頭蓋骨を取り除き、代わりに取り付けた観察用の透明なカバーガラス窓に対物レンズを近づけ、2光子励起顕微鏡を用いて、課題中、単一細胞レベルで多細胞の神経細胞の活動をリアルタイムに計測する。なお右前肢のレバーは可動式で一定時間以上レバーを引くとノズルから報酬の水が出る。



4. 研究成果

一次運動野第5層の神経細胞の中で、線条体に投射している皮質-線条体投射神経細胞、もしくは脊髄に投射している皮質-脊髄投射神経細胞のみに GCaMP を発現させ、それらの学習過程での神経細胞の活動を観察し、投射経路によって、increase type の神経細胞になる集団が異なることを明らかにした。具体的には、学習に伴い、皮質-線条体投射神経細胞では、学習初期に運動情報量（神経活動が保持しているレバー動き情報）が低い細胞が、学習初期に高い細胞を追い越して高くなるのに対し、皮質-脊髄投射神経細胞では、学習初期に運動情報量が高い細胞が、さらに高くなる傾向を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

Masamizu Y[#], Tanaka YR[#], Tanaka YH, Hira R, Ohkubo F, Kitamura K, Isomura Y, Okada T, Matsuzaki M. ([#]equal contribution)

Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task.

Nature Neuroscience, 2014;17(7):987-94.

(査読あり) doi: 10.1038/ncomms6551.

Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M.

Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single neuron operant conditioning.

Nature Communications, 2014; 5(5551):1-12.

(査読あり) doi: 10.1038/nn.3739.

[学会発表] (計1件)

著者名/発表者名 正水 芳人

学会等名 第37回日本神経科学大会

発表場所 パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川県

年月日 2014-09-11

運動課題学習中の一次運動野第2/3および第5a層での集団および個々の細胞における神経活動変化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

〔図書〕(計1件)

運動学習は脳皮質深層の神経細胞活動パターンに記憶される

正水 芳人, 田中 康裕, 松崎 政紀

Clinical Neuroscience 33(7) 846-847、中外医学社、2015年7月

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~Matsuzaki-Lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正水 芳人 (MASAMIZU Yoshito)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号: 90608530