

## 論文の内容の要旨

論文題目

Spatiotemporal Dynamics of Functional Clusters of Neurons in Mouse

Motor Cortex During a Voluntary Skilled Movement

(随意運動中のマウス運動皮質における神経細胞機能クラスターの時空間ダイナミクス)

氏名

平 理一郎

### 序論

類似した運動に関係する神経細胞のクラスター化は、大脳皮質運動野の神経細胞構築上の主要な特徴である。例えば腕や手指による到達運動や描画運動の選好方向は空間的近傍の神経細胞で似ている傾向がある。そうした類似の選好方向を有する運動野の近傍細胞同士は神経活動の相関が大きく、共通入力および再帰的シナプス結合を反映していると考えられる。これらの知見のほとんどは電気生理学的実験によって得られたものであるが、この方法ではクラスターを構成する神経細胞の数や空間的なサイズを単一神経細胞の解像で明らかにすることは難しい。

近年、2光子カルシウムイメージング法によって、走行、グルーミング、舌運動、ヒゲ運動関連活動が、覚醒マウスの運動野に適用され、ファインスケール (<100 $\mu$ m) の神経細胞の機能的分布が明らかになってきた。分布の多くはソルトペッパー状でクラスターを持たないが、走行とグルーミングにおいては 100 $\mu$ m 程度のクラスター化が観察された。しかし、例えば到達運動、描画運動、レバー引き運動などの前肢運動課題関連細胞のファインスケールの分布は2光子カルシウムイメージングを用いては調べられていない。また、課題関連細胞の活動の空間的分布がどのように時間的に変化するかもわかっていない。さらに、もしファインスケールの機能クラスターがあるならば、それらの前肢運動における役割は何か？機能クラスターが運動実行に決定的に影響しているならば、クラスターを構成する神経細胞集団はクラスター外のそれよりも正確な運動情報を有している可能性がある。

これらの問題を解決するため、我々は頭部固定マウスでの自己誘導性レバー引き課題を開発し、課題遂行中に *in vivo* 2光子カルシウムイメージングを用いてマウス大脳皮質運動野を観察した。ムシモール注入実験によりこの課題に関連することを確かめた吻側前肢運動野(Rostral Motor Area, RFA) と尾側前肢運動野(Caudal Motor Area, CFA)の二つの領域において、運動時に機能クラスターが存在することがわかった。さらにクラスター内に存

在する運動関連細胞はクラスター外のそれよりも正確な運動情報を有することが示された。

## 方法

実験には野生型マウスおよび ChR2 トランスジェニックマウスを用いた。頭部固定用チャンバーを装着したマウスを課題訓練開始前日からイメージング実験までの間、体重が通常の 85%を下回らないように一日 1ml を上限として給水制限した。課題の訓練は、1 日あたり 1 時間とし合計 8-9 セッション行った。マウスはレバーを 3 秒間以上待機位置に維持しその後自発的に設定時間の間レバーを引き続けると水報酬 4 $\mu$ l を得た (図 1)。設定時間は成功率とともに段階的に長くなるようにプログラム化され、訓練終了日およびイメージング実験時には平均 600ms 程度となった。報酬の直後には強いソレノイドの力によってレバーは強制的に待機位置に戻され、2 秒間固定された。待機位置維持時間が 3 秒未満あるいはレバー引き時間が設定時間未満の場合には報酬は与えられず、ソレノイドの力も与えられなかった (図 1)。課題制御には LabVIEW を使用した。イメージング実験の当日には、イソフルレン麻酔下マウスの観察領域直上の頭蓋骨除去手術を施し、カルシウム蛍光指示薬 OGB-1 (Oregon-Green 488 BAPTA-1) 1mM を大脳皮質 2/3 層に注入した。ガラス窓を設置し、1 時間の回復期間後、課題遂行中のイメージングを開始した。2 光子励起にはチタンサファイアレーザー(830nm、2-40mW)を用いた。平均 313 ms/frame のスキャンスピードで 1 領域あたり 10-30 分間画像を取得した。観察領域である RFA と CFA は ChR2 トランスジェニックマウスを用いた光刺激と微小電気刺激で前肢領域であることを別個体のマウスにおいて同定した領域であり、フラビン蛍光イメージングによって前肢感覚領域との重複の無い領域とした。データ解析は ImageJ と Matlab を使用した。取得した XYT 画像の揺れを取り除くため、ImageJ プラグイン Turboreg によるフレーム単位の補正と隠れマルコフモデルを用いた各ラインの補正を行った。半自動的な ROI 抽出後、ROI 中の蛍光強度の平均を算出し、ゆるやかな蛍光強度変化の影響を除くため各値から周辺 30 秒の値の 8 パーセンタイル値を除き、画面上の血管位置の蛍光強度をバックグラウンド値として、 $\Delta F/F_0$  を算出した。この値の歪度が 0.3 より大きい ROI を活動的な神経細胞とみなし、それ以降の解析対象とした。課題関連細胞はこのうち、課題関連期間 (成功トライアルのレバー引き開始 1.5 秒前から 2 秒後までの期間) の  $\Delta F/F_0$  値が待ち期間 (レバーがセット位置に戻って 2 秒後から、レバー運動が再び始まる時間の 2 秒前までの期間) の  $\Delta F/F_0$  値よりも有意に高い細胞とした ( $p < 0.05$ ; ウィルコクソンの符号順位和検定)。課題関連細胞を、成功時レバー引き運動中に蛍光強度のピークがあるもの (Pull 細胞)、成功時レバー引き運動の終了後にそれがああるもの (Post-Pull 細胞) とその他 (Other 細胞) に分類した (図 2)。ただし、より正確なピーク時間の評価のため、20 Hz にリサンプリングする際、ROI 位置のフレーム内の位置を考慮に入れ、また OGB-1 の減衰時定数 1 秒を差し引いた。神経活動の空間的なクラスターの指標として、 $E_g$  (Geometric Energy) を導入した。

$$E_g = - \sum_{j>i} J_{ij} F_i F_j, \quad J_{ij} = \frac{1}{\sum_{n>m} \frac{1}{r_{mn}}}$$

ここで  $F_i$  は 0-1 の間の値に規格化された各細胞の蛍光強度であり、添え字は課題関連細胞の

それぞれに与えられた番号である。さらに、 $\Delta E_g$  を  $E_g - \hat{E}_g$ 、ただし、 $\hat{E}_g = -\langle F_i F_j \rangle$  ( $\langle \rangle$ は細胞ペアについての平均)と定義した。この値は活動している細胞が空間的近傍にあるほど値はマイナス値を取る。Pull 細胞のクラスターを評価するため、イメージング領域中で、Pull 細胞 5 個以上を含み、Pull 細胞以外の課題関連細胞や非課題関連細胞を含まない円領域をクラスター領域と定義した。さらにクラスター領域のうち、内部に含まれる Pull 細胞数が最大で直径も最大であるような円を Primary Cluster と定義した。Primary Cluster に含まれる Pull 細胞を Primary-Clustered 細胞 (図 4、黒色)、それ以外のクラスター領域に含まれる細胞を Other-Clustered 細胞 (図 4、緑色)、クラスター領域に含まれない Pull 細胞を Non-Clustered 細胞 (図 4、青色)と定義した。単一神経細胞あるいは神経細胞集団がレバーの位置情報を有しているかどうかを調べるため、以下の線形モデルを使用した。

$$\mathbf{L}(t) = \mathbf{b} + \sum_{u=0}^3 \mathbf{a}(u)\mathbf{X}(t-u) + \boldsymbol{\varepsilon}(t)$$

ここで $\mathbf{L}$ はレバーの位置、 $\mathbf{a}$ は係数、 $\mathbf{b}$ は切片、 $\mathbf{X}$ は 3 フレーム過去までの情報を含む神経細胞集団の活動、 $\boldsymbol{\varepsilon}$ はノイズである。これによりレバーの位置を神経細胞集団の活動により予測し (Cross-Validation)、予測されたレバーとの相関係数を神経細胞集団が持つレバーの位置情報として比較に用いた (図 5)。

図 1

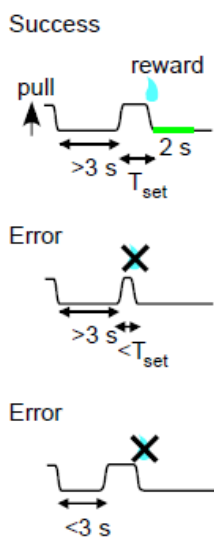


図 2

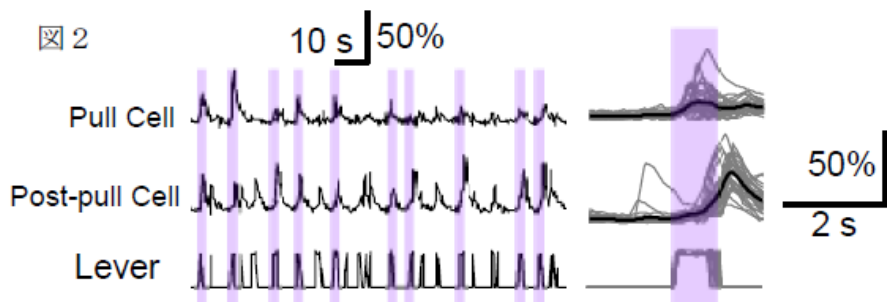


図 3

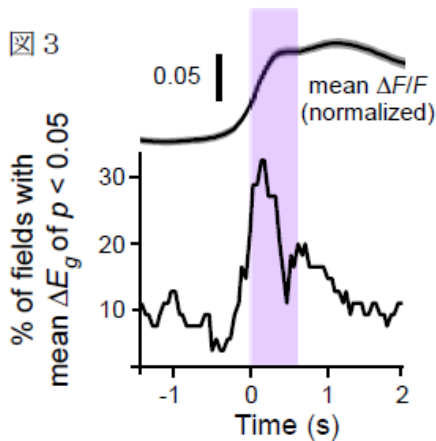
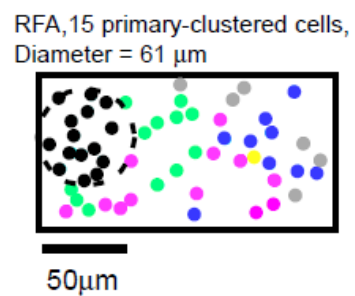


図 4

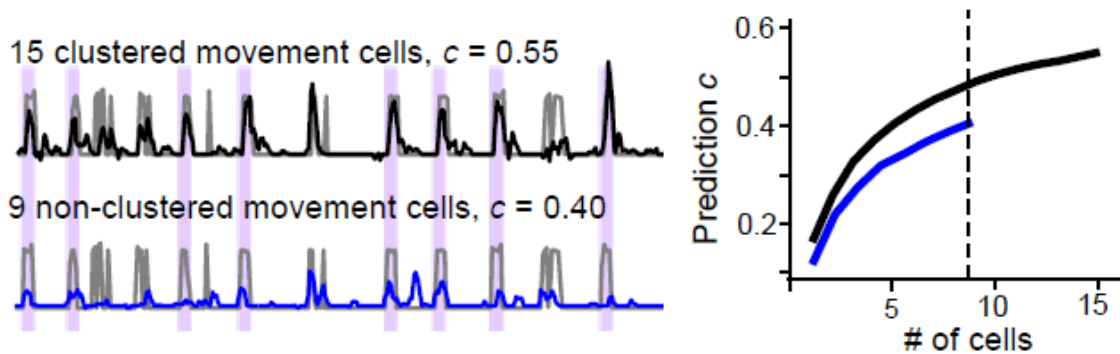


## 結果

課題遂行中の 2 光子カルシウムイメージングにより、マウス大脳皮質運動野の神経活動を可視化することに成功した (図 2)。Pull 細胞と、Post-Pull 細胞が同一画面上に存在することがわかった (図 2、右)。クラスターに関する解析については RFA と CFA には大きな質的差を認めなかったため、解析結果はまとめて示した。機能クラスターの有無を調べるために、 $\Delta E_g$  を計算し、ROI の位置でシャッフルしたデータとの比較により、下位 5 パーセント以下を有意水準とした場合、30% 程度のイメージング領域において  $\Delta E_g$  が引き運動時に有意に低い値となった (図 3)。これは引き運動時に神経細胞の活動がクラスター化していることを示す。

この結果により引き運動時にピークを有する Pull 細胞がクラスター化していることが予想される。実際、Pull 細胞間の距離は有意に小さかった。クラスター化している Pull 細胞がレバーの位置情報を正確に反映しているか検討するため、Pull 細胞をクラスター化傾向にしたがって分類した (方法を参照)。Primary Cluster の直径は  $70\mu\text{m}$  程度であり、平均 8.3 個の Pull 細胞から構成された。Primary Clustered 細胞は Non-Clustered 細胞と比較して、単一細胞レベルでも複数細胞レベルでもレバーの位置情報をより正確に持っていた (図 5)。

図 5



## 考察

本研究では自己誘導性のレバー引き運動時に機能クラスターが存在することが示され、クラスター内に存在する神経細胞集団がレバーの位置情報をより正確に有していることが初めて明らかにされた。レバー引き運動時に見られた機能クラスター内の神経細胞集団がレバーの位置情報をより正確に持つのはなぜか？クラスター内神経細胞の方が、クラスター外神経細胞よりも、神経活動が有意にみられるトライアルの割合 (ATR; Active Trial Rate) が高かった。また、ATR は神経活動の相関と正の相関があることも示された。本研究ではシナプス結合の有無までは調べていないが、こうした高い ATR と相関をもつ機能クラスターは、多くの共通入力あるいは再帰的シナプス結合を有していることが予想される。クラスターを構成する神経細胞集団はそうした密な相互作用によって随意的な運動をより正確に反映すると考えられる。