

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 平 理一郎

本研究はマウスの大脳皮質運動野第 2/3 層における神経細胞の機能的クラスターの有無とその運動に対する意義を明らかにするため、2 光子カルシウムイメージング法と頭部固定マウスの運動課題を構築・開発し、神経集団活動の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ChR2 遺伝子導入動物を用いた光刺激法によってマウスの大脳において 2 つの運動野 (RFA および CFA) が同定された。また、この二つの領域は皮質内微小電気刺激法 (ICMS) によって確かめられた。
2. 頭部固定マウスのレバー引き運動課題を構築した。課題は、3 秒以上の待機時間後に、約 0.6 秒間レバー引き運動を持続すると報酬である 4 μ l の水が与えられるというものである。課題訓練期間中 (8 - 9 セッション)、マウスはレバー引き運動の継続と 3 秒以上の待ち時間を学習した。RFA あるいは CFA のムシモール注入によって成功数が減少することが示された。
3. レバー引き運動課題中にカルシウム蛍光指示薬 OGB-1 を用いた 2 光子カルシウムイメージングを行い、マウス運動野 (RFA および CFA) の神経活動を得た。歪み補正と半自動的 ROI 取得によって、50 個程度の神経細胞蛍光変化を同時に記録することに成功した。
4. カルシウムイメージングと電気生理学的記録 (cell-attached recording) を同時に行うことによって、蛍光上昇率が神経発火活動とよく相関することが示された。
5. レバー引き運動課題において、課題関連活動を示す細胞が見出された。レバー引きに同期して蛍光を上昇させる神経細胞 (Pull 細胞) と、レバー引き直後に蛍光を上昇させる神経細胞 (Post-pull 細胞) が分類された。
6. Pull 細胞の蛍光上昇率は運動の継続時間と有意な相関を示すものが割合が多く、Post-pull 細胞のそれは、感覚関連活動、リッキングと有意な相関を示すものの割合が多いことが示された。
7. 近傍の細胞が同時に活動する程度を示すパラメータである「幾何学的エネルギー」を導入し、これを用いた解析によって、約 40% のイメージング領域における課題関連細胞が運動実行中に近傍細胞の活動を有意に上昇させることが示された。またこれにより Pull 細胞がクラスターを構成していることが予想されるが、実際に、Pull 細胞の最近傍細胞が Pull 細胞である確率が細胞の位置をシャッフルしたものと比較して有意

に高いことが示された。

8. 5つ以上の Pull 細胞の円状の集積の程度を解析したところ、約 8 個の細胞からなる直径 70 μm 程度のクラスターが指定された。個々のイメージング領域で最大数の Pull 細胞を含むクラスター内の Pull 細胞と、クラスター内に存在しない Pull 細胞がそれぞれ Primary clustered 細胞、Non-clustered 細胞と分類された。Primary clustered 細胞は Non-clustered 細胞よりも、同等の細胞体間距離においても高い相関を有していた。
9. 線形モデルおよび Treebagger を用いて、細胞集団がレバーの軌道をどの程度予測できるかを検討したところ、同じ細胞数間の比較で、Primary clustered 細胞集団の方が、非 Primary clustered 細胞集団よりも、予測の精度が高いことが示された。これは一つ一つの細胞で比較しても同様であった。
10. Primary clustered 細胞は ATR (活動を示すトライアルの割合) が Non-clustered 細胞よりも大きく、ATR とレバー軌道の予測の精度の関係に正の相関関係があることが示された。すなわち、クラスターの内部は各トライアルにおいて頻繁な活動を示すことによってレバー情報をより正確に有していると考えられた。

以上、本論文はマウスの運動野第 2/3 層において、運動中の 2 光子カルシウムイメージング法を開発することにより、機能的クラスターの存在が示された。さらに、クラスター内に存在する細胞がレバーの軌道情報をより正確に有することが示された。この実験系は光遺伝学的手法やパッチクランプ法等との融合によりさらなる発展が見込まれ、哺乳類の大脳皮質運動野における局所回路研究に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。