

# 研究報告書

## 「大脳皮質の微小回路の学習に関連した可塑性」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 小宮山 尚樹

### 1. 研究のねらい

我々の行動は、個々の神経細胞の調和の取れた活動の下に成り立っている。神経細胞の活動を決定する重要な単位の一つは、神経細胞同士が数百  $\mu\text{m}$  の中で複雑な回路を形成する、微小回路である。しかし、微小回路が行動中、特に学習中にどのように活動し、どのように変化するのは、ほとんどわかっていない。研究者は、マウスがタスクを学習する間に、リアルタイムで微小回路の活動を二光子顕微鏡で可視化する方法を開発し、学習に関連して微小回路の活動が変わっていく様子を可視化することに成功した。本研究では、この系を用いて、微小回路の可塑性の細胞レベルでの機構の解明、そして学習行動との関連の解明を目指している。特に、嗅覚系の嗅球の微小回路に注目し、細胞のタイプごとの結合特異性、反応特異性並びに可塑性の違いを明らかにしている。また、大脳皮質運動野での長期間の運動学習中に見られる変化を解明している。これらの研究によって、経験ならびに学習が脳神経回路をどのように調節しているのかという重要な問いに対する答えを追求している。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

覚醒中の、頭を固定したマウスにおける嗅球からの二光子機能的イメージングをセットアップした。トランスジェニックマウスを用い、嗅球のいくつかの主要な細胞タイプそれぞれに特異的に Ca センサーを発現させ、数週間にわたって同じ細胞群から匂い反応をイメージングすることが可能になった。この手法を用いて、嗅球の主要出力である Mitral cell のにおい反応の、経験による可塑性を明らかにした。また、この可塑性は麻酔下では見られず、麻酔下と覚醒中の嗅球の活動は大きく異なることがわかった。(論文 5) また、嗅球の抑制系回路に着目し、その中でも特定のマーカー分子を発現する細胞群のにおい情報処理に対する寄与を詳細に調べた。(論文 4)

また、運動学習中の大脳皮質運動野の活動並びにシナプス結合の変化を調べた。これにより、運動野の活動と運動パターンの関係が、学習によって変化することが分かった。(論文 3) そして、学習中に、運動野の神経細胞が、場所特異的にシナプスの変化を起こすことが分かった。このシナプスの変化が、抑制細胞のタイプによる可塑性によって制御されていることを示した。(論文 2)

これらに加えて、大脳皮質視覚野の情報処理方法が、経験及び学習によって変化することを発見した。これは、長距離のフィードバックの入力と、局所的な抑制系細胞による制御によって制御されていることが分かった。(論文 1)

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「嗅球のにおい反応の可塑性」

トランスジェニックマウスを用い、嗅球の主要出力細胞である Mitral cell に Ca センサーを発現させ、数週間にわたって同じ細胞群から匂い反応をイメージングすることが可能になった。この手法を用いて、マウスに数種のにおいを一日数回、数秒ごと嗅がせていく間に Mitral cell のにおい反応をイメージングしたところ、Mitral cell のにおい反応は経験につれて徐々に弱まった。この可塑性はにおい特異的であり、同一の Mitral cell は、未経験のにおいへの反応は強く保たれていた。この可塑性は数週間にわたって維持される一方、麻酔下では見られないことも分かった。これらの結果は、覚醒中の動物における Mitral cell の活動が、過去の経験によってダイナミックに調節され、嗅球の反応の強さは刺激の新規性に大きく影響されていることを示している。(論文 5)

また、Mitral cell と、嗅球の主要な抑制系神経である Granule cell の活動を麻酔下と覚醒中で比べたところ、Mitral cell は覚醒中にはにおい反応が麻酔下に比べてかなり弱く、粗であることがわかった。Granule cell は逆に、覚醒中では活動が高いが、麻酔科では活動が非常に弱くなっていた。これらの結果は、麻酔下における嗅球のレコーディングでは Granule cell の寄与を過小評価してしまい、覚醒中には匂い情報の表現は Granule cell の活動によって粗になる、という可能性を示唆している。(論文 5)

### 研究テーマ B 「嗅球の抑制系神経のサブタイプ」

嗅覚情報の処理の仕組みを解明するため、嗅球における微小回路が匂い刺激の入力をどのように処理しているのか調べている。その第一歩として、External plexiform layer に局在する、Parvalbumin (PV) を発現する抑制性神経の結合性並びに機能を調べた。PV cell は、External plexiform layer にまばらに局在している。PV cre のマウスラインを用いて、特異的に PV cell を特定することができる。スライスでの実験で、PV cell は主要興奮性細胞である Mitral cell と非常に密に高い確率で結合していることがわかった。In vivo で匂い刺激に対する反応をカルシウムイメージングで見ると、個々の PV cell は様々な種類の匂い刺激に幅広く反応することが示された。この結果は、Mitral cell との高い結合率 (Convergence) と一致しており、PV cell は Mitral cell や Granule cell よりもかなり広い tuning を示す。PV cell の活動を特異的に抑制すると、Mitral cell の匂い刺激に対する反応が線形的により強くなることから、PV cell は Mitral cell の匂い反応の Gain を制御していることが示唆された。今までの嗅球の抑制性細胞の研究はおもに Granule cell と Periglomerular cell に注目しているが、今回の結果は嗅球において様々な種類の抑制性細胞が複雑に匂い情報の表現を制御していることを示唆している。(論文 4)

### 研究テーマ C 「運動学習中の運動野の可塑性」

運動学習が脳のどのような変化を伴うのかという問いに着目して、マウスが頭を固定された状態で運動行動を学習する実験系を開発した。マウスは、前肢でレバーを特定の

方向に動かすことで報酬（水）がもらえることを、1日1時間（100回）ほどの訓練を2週間続けることで覚えた。マウスがレバーの動かし方を覚えるまでの期間中、レバーの動きを高解像度で記録し、運動パターンを詳しく解析した。また、この2週間に及ぶ学習期間中、運動野の神経細胞群の活動を細胞単位で、運動学習の全過程を通してイメージングしたところ、1）学習の初期では、レバーを動かす方向や速度がほとんど同じ場合であっても、神経細胞の活動パターンは全く異なっていた。しかし、2）学習が進むに連れ、徐々に神経細胞の活動パターンが安定化し、最終的には、神経活動のパターンと運動のパターンが一致するようになった。3）学習後期の運動パターンは、元々学習初期にも一部観察されていたが、神経活動のパターンは学習初期に見られたものと後期のものとは異なっていた。これらの結果から、ある1つの運動パターンはさまざまな神経活動パターンから生み出され得ること、運動学習によって初めて運動野の神経細胞の活動と運動パターンとが1対1の関係ができることが示された。（論文3）

次に、上記のように神経活動パターンが柔軟に変化し得るメカニズムを調べるため、運動学習中の運動野内の神経細胞同士のシナプス結合の動性を、高解像度イメージングを用いて経時的に観察した。この結果、学習期間中にのみ、新たなシナプス結合が、古いシナプス結合と入れ替わる形で形成されることが分かった。この結果は、運動学習が運動野内の神経回路を変更することを示し、新たな神経回路の形成が、学習後に見られる安定した神経活動パターンの再現に重要な役割を担っていると考えられる。（論文3）

運動学習中のシナプス結合の動性を詳しく解析したところ、樹状突起のうち、細胞体から遠位な部分のシナプス結合は学習によって変化するものの、近位のシナプス結合は変化しないことが分かった。これらの樹状突起の部位はそれぞれ別々の抑制系神経のタイプから抑制を受けていることが知られている（遠位=SOM-IN、近位=PV-IN）。そのため、PV-IN と SOM-IN に注目し、それらのシナプスを継時的に追ったところ、学習中にPV-IN のシナプスは増え、SOM-IN のシナプスは減ることが分かった。SOM-IN を学習中にOptogenetics を用いて活性化させたところ、興奮性シナプスの可塑性並びに学習が阻害された。これらの結果は、SOM-IN のシナプスの減少による興奮性細胞の樹状突起の活性化が興奮性シナプスの可塑性およびに運動学習に重要であることを示唆している。（論文2）

#### 研究テーマD「視覚野の可塑性」

次に、学習による脳の感覚情報処理形態の変化を観察するために、視覚情報による能動回避学習課題注をマウスに与え、大脳視覚野における個々の同一神経細胞群の活動を2光子顕微鏡で数日に渡り評価した。興奮性神経細胞や抑制性神経細胞を個別に観測できる遺伝子改変マウスを利用し、またトップダウン入力の起点となる高次脳領域で遺伝子を導入する手法を組み合わせ、それらの神経細胞の活動を大脳視覚野で観測することで、脳内における個々の神経細胞群種の活動を体系的に、そして長期的に観測することに成功した。その結果、脳内部モデルからの予測、期待または注意といった情報を伝えるとされるトップダウン入力を可視化できるようになり、学習を通じて大脳視覚野に対するトップダウン入力の影響が強まることが示された。また外部世界からの情報処理に関わるとされるボトムアップ入力は学習が進むにつれて次第に減少することも分かり、

トップダウン入力とボトムアップ入力は非対称な変化を示した。次に、学習におけるトップダウン入力とボトムアップ入力という2つの情報処理機構の非対称な変化の仕組みを明らかにするため、さまざまな抑制性神経細胞の活動を個別に評価したところ、トップダウン入力を制御していると考えられる特定の抑制性神経細胞群 (SOM-IN) の活動が下がることも分かりました。これにより、トップダウン入力による大脳視覚野への影響がさらに高まるのではないかと考えられる。本研究から、学習によって特定の視覚情報に対する脳の情報処理形態が変化することが明らかになった。このような学習における脳の個別の神経回路素子の体系的かつ長期的な観測は世界で初めて行われ、今まで実験で立証されることがなかった理論への理解を深めることに成功した。(論文1)

### 3. 今後の展開

本研究の技術的な目標であった、学習中の脳回路の機能と構造を細胞単位あるいは細胞以下の解像度で長期的に可視化することは達成された。今後は、これらの手法を用い、様々な種類の学習での変化を継時的に追うことで、普遍的な学習の機構を明らかにしていきたい。また、これらの手法は学習以外の論題にも有効であり、脳の高次機能の機構を突き詰めることにも使していきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究の技術的な目標であった、学習中の脳回路の機能と構造を細胞単位あるいは細胞以下の解像度で長期的に可視化することは達成され、この手法を用いて学習の機構を追求した研究結果をトップジャーナルに5報発表することができた。また、領域会議での活発な議論を通じてアイデアの交換、また、共同研究も始めることができた。さきがけの支援のおかげと大変感謝している。

本研究の結果から、遺伝学的に定義された神経細胞の種類、特に抑制系神経のサブタイプが、学習並びに柔軟な行動に特異的かつ重要な役割を持つことが示唆されている。将来的にこれらのサブタイプを制御することが神経疾患の治療法として使われる可能性が出てきた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

大脳皮質等の局所微小回路の作動特性において学習に伴って生じる変化はこれまでは主に電気生理学的解析で単一の神経細胞について解析されてきたが、近年イメージング技術などの進歩により微小回路全体を対象とする解析が可能になってきた。本研究は、マウスの頭蓋を二光子顕微鏡下に固定し、多数の神経細胞からなるセットの活動を無麻酔で長期間にわたって経時観察できる系を立ち上げることに成功し、遺伝子改変動物、スライス培養技術、カルシウムイメージングなどを用いて、抑制性介在ニューロンのサブタイプに着目しながら、学習にともなう微小回路の変化を解析したものである。まず嗅覚系で学習におけるシナプスの変化がにおい特異的・覚醒下特異的に起こり、その調節にパルブアルブミン陽性抑制性介在ニュー

一ロンが関わることを明らかにした。またレバー押し学習系を工夫して、2週間の訓練中に起きる大脳皮質運動野微小回路の活動変化を解析し、特定の運動パターンへの収束が神経活動パターンの収束によること、その変化においてソマトスタチン及びパルブアルブミン抑制性神経細胞から錐体細胞樹状突起へのシナプスが変化することなどを見いだした。さらに視覚学習にともなう視覚野の情報処理におけるトップダウン入力とボトムアップ入力の変化を解析して、ソマトスタチン細胞の関与を見いだしている。これらは高く評価される成果であり、いずれも論文発表している。今後より詳細な解析を経て学習にともなう大脳皮質に普遍的な回路機構とそこにおける抑制性神経細胞の役割が解明されることが期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Makino, H. and Komiyama, T. (2015) “Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex.” Nature Neuroscience, 18(8), 1116–22. PMID: 26167904
2. Chen, S.X., Kim, A.N., Peters, A.J. and Komiyama, T. (2015) “Subtype-specific plasticity of inhibitory circuits during motor learning.” Nature Neuroscience, 18(8), 1109–15. PMID: 26098758
3. Peters, A.J., Chen, S.X. and Komiyama, T. (2014) “Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning.” Nature, 510(7504), 263–7. PMID: 2480523
4. Kato, H.K., Gillet, S.N., Peters, A.J., Isaacson, J.S.# and Komiyama, T. # (2013) “Parvalbumin-expressing interneurons underlie a local inhibitory circuit regulating the gain of olfactory bulb output.” Neuron, 80, 1218–31. PMID: 24239124
5. Kato, H.K., Chu, M.W., Isaacson, J.S. # and Komiyama, T. # (2012) “Dynamic sensory representations in the olfactory bulb: modulation by wakefulness and experience.” Neuron, 76(5), 962–75. PMID: 23217744

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 受賞

2015	BRAIN Initiative Grant Awardee, National Institute of Health
2014	Kavli Fellow, Kavli Foundation and National Academy of Sciences
2014	Highlighted as a ‘Scientist to Watch’, The Scientist Magazine
2014–17	McKnight Scholar, McKnight Foundation
2012–16	NYSCF–Robertson Neuroscience Investigator, New York Stem Cell

Foundation  
2011-16 Packard Fellow, David & Lucile Packard Foundation  
2011-15 Pew Scholar, Pew Charitable Trusts  
2011-12 Sloan Fellow, Alfred P. Sloan Foundation