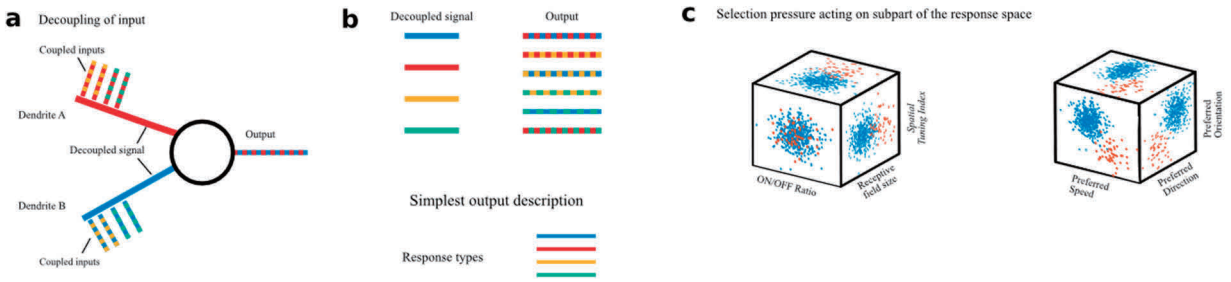
49　マウス上丘神経細胞種の生理学的・遺伝学的包括的同定	米原　圭祐

【目的】神経回路の機能単位を理解することを目的とした現代の神経回路研究において、細胞種の離散的な集合を同定することは大きな目標となっている。この考え方は、網膜などの感覚領域では、刺激 X に対するある細胞型の応答が刺激 Y に対する応答を予測するという低次元の神経表現が前提となっている。しかし、近年、高次視覚野で高次元の神経表現が発見されたことから、細胞種の定義に関する論争が起きている。我々はマウスにおいて主要な視覚中枢である上丘の応答空間の次元性を調べ、この次元性が上丘細胞を機能的に分類する能力に影響を与えるかどうかを調べた。

【方法】本研究では、覚醒マウス上丘表層部のカルシウムイメージングを行い、6,872 個の神経細胞から輝度変化刺激（ON-OFF 刺激）および運動刺激に対する光応答を記録した。シリコンプラグを上丘の上部に挿入することで上丘に覆い被さった大脳皮質を脇に押しやって上丘を露出させて、大脳皮質を傷つけることなく上丘のイメージングを行った。機械学習である教師なしクラスタリングを行い、上丘細胞の機能的多様性を明らかにした。個々の細胞について輝度変化刺激および動き刺激に対する光応答の相互情報量を求めた。

【結果】驚いたことに、相互情報量の解析から、輝度と動きに対する個々の神経細胞の応答が統計的に独立していることから、細胞の機能的多様性が最大化されていることとともに、上丘においては従来の 1 次元の細胞タイプ分類は不可能であることを明らかにした。一方、応答空間において近接する機能応答（例えば、ON 応答と OFF 応答）は、依然として相互依存的であった。そこで、神経応答の大域的な高次元性と局所的な低次元性を捉えるために、局所的な低次元構造においてのみ機能分類が意味を持つ多次元応答型モデルを提案した。上丘が行う高次の認知課題は、高次元の応答空間構造を必要とすると考えられるため、本モデルは上丘の役割に適していると考えられた。1 次元の細胞タイプ分類が行われている網膜から多次元応答型モデルの上丘への情報変換を司ると考えられるシナプス接続モデルを立てた。

網膜から上丘の情報変換に関する仮説



49. マウス上丘神経細胞種の生理学的・遺伝学的包括的同定

米原　圭祐

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 遺伝形質研究系

Key words：視覚情報処理，上丘，細胞種，2 光子カルシウムイメージング，マウス

緒　言

神経細胞を遺伝子型や機能型に分類することは、神経系の機能構成を理解するための強力なアプローチであり、標的記録や遺伝子治療のための重要な知識を提供する。従来、細胞型分類の目的は、各細胞がいずれかの型にのみ属するような、単一の型のセットを明らかにすることであった［1］。これは、すべての特徴を網羅するメタ構造が存在し、それを特定できることが前提となっている。低次元の応答空間では、このアプローチはうまく機能する。特徴に相関がある場合、特徴 x に基づく分類は特徴 y に基づく分類と類似しており、両方の特徴を用いた圧縮分類を生成することができる。一方、高次元の応答空間では、異なる特徴に基づく分類は無相関となり、圧縮することができない。

網膜神経細胞の分類は比較的進んだ段階にあるが、下流の視覚野では遥かに遅れている。網膜神経節細胞（RGC）では、機能的特徴、形態的特徴、分子的特徴が高度に一致する［2］。よく知られている例としては、ON-OFF 方向選択性（DS）細胞や、速いスピードと遅いスピードにそれぞれ同調する ON DS 細胞などがある。これらの細胞型特異的な反応は、樹状突起の層状の深さや、遺伝的プログラムによって定義される内網状層のさらに微細なシナプス特異性によって規定されている。これらの知見は、網膜の応答空間が低次元で構成されていることを示唆している。一方、視覚野の応答空間は高次元であることが知られている［3］。

上丘は中脳に存在する主要な視覚中枢で、感覚 - 運動変換を行い、定位行動や逃避行動などの視覚依存性の生得的行動を仲介する。マウスでは、約 90%の RGC から組織化された視覚入力を受けている。しかし、上丘では、わずか 4〜5 種類の形態生理学的タイプが確認されている［4］。この数は、RGC の 30〜タイプに比べ、際立って少ない。網膜と同様に単一の包括的な機能分類システムを構築する試みがいくつかなされているが、大脳皮質応答空間のような高次元の応答空間が存在するのかは不明である。

このため、我々は上丘の応答空間次元を調べ、この次元が上丘細胞の機能的分類能力に影響を与えるかどうかを調べた。我々は、覚醒したマウスの上丘から 2 光子カルシウムイメージングを行い、6,872 個の上丘細胞の光応答を記録した。その結果、輝度変化と運動の 2 種類の視覚刺激に対する応答の間に統計的な独立性があることが明らかとなり、マウスの上丘応答空間は少なくとも多次元であることが示唆された。さらに、この多次元性は、多刺激に基づくクラスタリングにおいて、既知の反応タイプの分離性を低下させることを見いだした。この結果は、マウス視覚中枢における細胞タイプのクラスタリングに関する概念的な枠組みを提供するものである。

方　法

1. 動物の手術

すべての実験手順は、国立遺伝学研究所動物実験委員会（ライセンス番号：R5-2）の承認を得ている。12〜18 週齢の野生型マウス C57BL/6J（Janvier Labs 社）21 匹（雄雌とも）を使用した。AAV1.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40（#100837-AAV1、Penn Vector Core）2.13×10^{13} vg/ml を歯科ドリルで開けた穴からガラスピペットにより注入し、上丘への感染を行った。

2. 2光子カルシウムイメージング

手術の少なくとも7日後、覚醒2光子イメージングを実施する前に、マウスは、4日間にわたってイメージングセットアップで落ち着いていられるように訓練された。イメージングには、SciScanバージョン1.2により制御されたレゾナントスキャナー顕微鏡（VivoScope、Scientifica）を使用し、500×500μmの領域を512×512ピクセルの分解能で1秒あたり30.9フレームを走査した。分散補償された940 nmの光は、モードロックされたチタンサファイアレーザー（MaiTai DeepSee、Spectra-Physics）により、16倍の水浸対物レンズ（0.8 NA、ニコン）経由で供給された。マウス1匹につき10深度まで撮像し、表面下30μmから30μm間隔で、細胞が2回記録されないように、十分な信号対雑音比が得られる最深位置である300μmまで撮像した。

マウスには、以下の刺激バッテリーを提示した。1. 疎なノイズ：視野の10×10度をカバーする黒または白の正方形を、20×10グリッドのすべてのxy位置で0.1秒ずつ、5度刻みで疑似ランダムに点滅させ、受容野位置を決定した。グリッドのサイズは、視野内のすべての応答細胞の受容野を完全にカバーする最小のサイズに設定された。2. ドリフトグレーティング（Drift）：全視野正弦波格子（コントラスト100%、1度あたり0.08サイクル）を毎秒5度または40度の速度でドリフトさせ、それぞれ等間隔に12個の角度で提示した。3. チャープ刺激：直径10度の円形スポットをスクリーン上に提示した。この刺激には3つの段階がある。1）黒と白を切り替えるステップフェーズ、2）黒と白の間の正弦波シフトがステップで周波数が増加しながら発生するチャープフェーズ、3）コントラストが増加しながら正弦波シフトが発生するコントラストフェーズ。4. Spatio- Temporal Gratings（SpaTemp）：空間周波数8種（0.04～0.32 cycle／度、線形増分）と時間周波数6種（0.5～16 Hz、対数増分）のすべての組み合わせで漂うフルスクリーンの正弦波グレーティングを4等分された角度で提示する。

結　果

1. チャープ特徴とドリフト特徴の独立性

チャープとドリフトの特徴は独立している4つの視覚刺激に対する機能応答を収集した（図1a）。1. 10度の円形チャープ刺激、2. 12方向に5 d/sで動くフルスクリーンの正弦波ドリフト格子、3. 12方向に40 d/sで動くフルスクリーンの正弦波ドリフト格子、4. 10度の円形チャープ刺激。4方向に6つの時間周波数と8つの空間周波数のすべての組み合わせで提示されるフルスクリーンの正弦波ドリフトグレーティング。また、ONとOFFはそれぞれ輝度の増加と減少に対する細胞の反応を示し、On、Off、On／Offはそれぞれ有意なON、OFF、またはONとOFFの反応を持つ細胞を示す。チャープ刺激とドリフト刺激は、それぞれON／OFF反応と方位／方向選択性を検出する機能を持つ機能的な視覚細胞タイプの分離によく使われる刺激である。以前の研究［5］で細胞タイプの分離に有効であることが示唆されていたSpaTemp刺激も加えた。チャープからはスパース主成分分析（sPCA）を用いて20個の特徴を抽出し、ドリフトからは特異値分解（SVD）後にsPCAを用いて16個の特徴を抽出した。相互情報量（Mutual Information：MI）［6］を用いて、ドリフトとチャープ応答の依存性の度合いを評価した。一方、2つの特徴量の間にMIがない、あるいは偶然のレベルである場合、それらは独立しており、2つの特徴量に基づいて定義されたグループ間の重複は偶然のもので、予測可能である。ドリフトとチャープの依存性の程度を調べるために、まず20個のチャープ特徴と16個のドリフト特徴のすべての組み合わせの間のMIを計算し、チャープ特徴とドリフト特徴の間のMIが偶然のレベルであることを発見した（320回の順列検定、Wilsons Harmonic Mean p＝0.11、Bonferroni-Holm correction後の最小p値＝0.64）。検定数が多い場合、ボンフェローニ補正は有意な結果を見落とす危険性が高くなる。チャープとドリフトのMIが偶然のレベルであったことが過補正によるものでないことを確認するため、各チャープとそのMIが最も高いドリフトの特徴間のMIも計算した。これらの特徴間のMIも偶然のレベルであった（20回のt-tests、Wilsons Harmonic Mean p＝0.094、Bonferoni-Holm補正後すべてのp値は1以上）（図1b）。

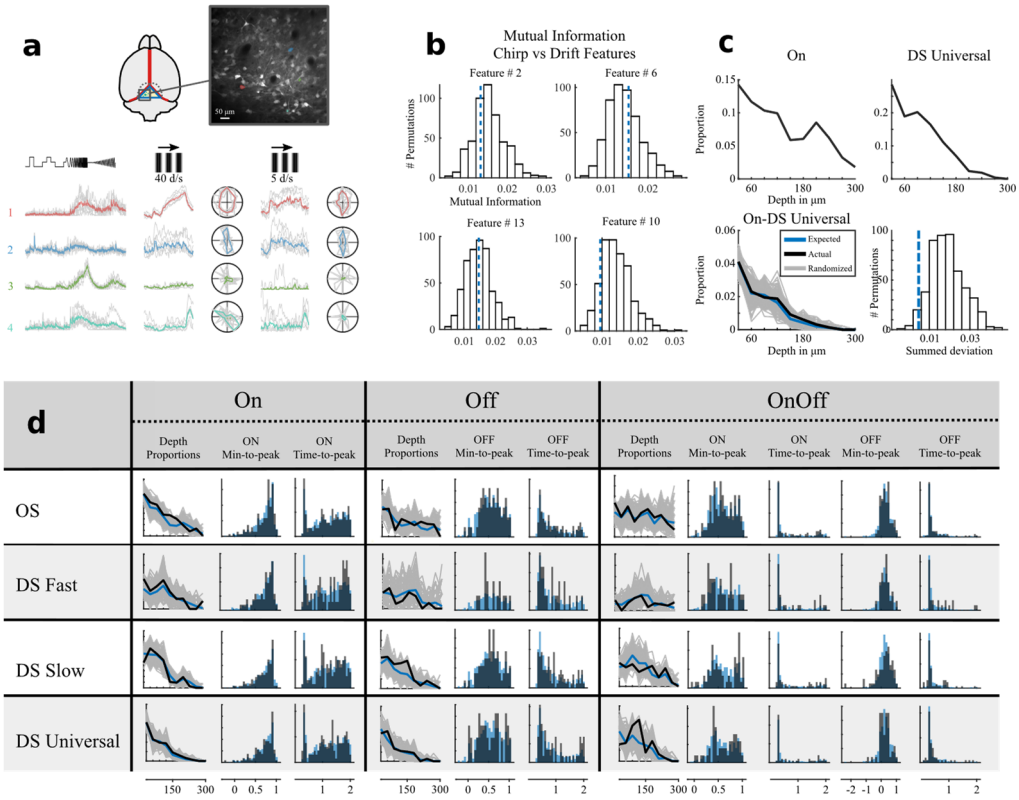


図 1. チャープ特徴とドリフト特徴の独立性

a) 上段：透明なシリコーンプラグ（青）を装着することで、マウスの脳の静脈洞（赤）を変位させ、上丘細胞の光学的アクセスを可能にした。挿入図：2 光子顕微鏡の視野の拡大図。下段：チャープ刺激の輝度変化に反応する 4 つの細胞（上図の輪郭）のトレース。

b) チャープ特徴の順番に対してドリフト特徴の順番をランダムにした後、MI を 500 回計算したヒストグラムの上に、4 つのチャープ特徴の相互情報に対して、それらが最も MI の高いドリフト特徴（青の破線）をプロットした。

c) 反応タイプ間の線形予測関係の例。左上：深さ方向の On 細胞の割合。右上：DS ユニバーサル細胞の深さ方向の割合。左下：深さ方向の実際の On-DS Universal の割合（黒）と期待される割合（青）およびランダムな順列（グレー）。右下：各ランダム順列の期待比率からの偏差の合計のヒストグラムと、実際の偏差の合計を青の破線で示す。

d) すべてのサブタイプの組み合わせの深度比率、最小 - ピーク比、ピークまでの時間を示す表。列を示す：On／Off のサブタイプ、行：OS／DS のサブタイプ。深さ方向の比率は 1c と同じ。反応の Min-to-peak 比と Time-to-peak は、結合グループ（濃いグレー、例：On-OS）と親グループの残りのセル（青、例：On-non-OS）の分布を比較する正規化ヒストグラムで示す。x 軸：Min-to-peak 比と Time-to-peak（それぞれ秒）、y 軸：細胞の割合。OnOff 細胞については、min-to-peak と time-to-peak は ON と OFF の両方の位相を測定した。

また、chirp と SpaTemp の特徴量の間の MI を計算したところ、偶然のレベルであった（100 回の順列検定、Wilsons Harmonic mean p=0.27、Bonferroni-Holm 補正後の p 値はすべて 1 以上）。また、ドリフトやチャープと同様に、SpaTemp の特徴とそれが最も高い MI を持つチャープを比較した（5 回の t 検定、Wilsons Harmonic 平均 p=0.5、Bonferroni-Holm 補正後すべての値が 1 以上）。これらの結果は、チャープ刺激に対する細胞の反応の形状は、ドリフト刺激や SpaTemp 刺激に対する細胞の反応を予測するものではないことを示唆している。sPCA に基づく特徴に加え

て、細胞を On、Off、OnOff、方向選択的 (OS)、方向選択的 (DS) 細胞に分離するのに必要な特徴も手動で抽出した。さらに、細胞の ON／OFF 反応に関連する 2 つの特性、すなわち、位相のオンセットからどれだけ早く反応振幅のピークに達するかを定量化する time-to-peak と、反応の持続性を定量化する min-to-peak ratio を抽出している。なお、大文字の ON／OFF は応答振幅そのものを指し、小文字の On／Off は当該位相の応答振幅が設定した閾値以上のセル群を指す（方法参照）。さらに、2 つの異なる速度のグレーティングを用いたので、DS 細胞を DS Fast（速いグレーティングに対してのみ方向選択的）、DS Slow（遅いグレーティングに対してのみ方向選択的）、DS Universal（両方の速度で方向選択的）に細分化した。次に、ON／OFF 反応振幅と手動で定義した OS／DS 特徴量 (DSi、OSi、優先方向、優先方向) の間の MI を計算したところ、偶然レベルであった (16 回の Wilcoxon's Rank Sum test、Wilsons Harmonic Mean＝0.32、Bonferroni-Holm 補正後すべての p 値は 1 以上)。

もしチャープ刺激に対する細胞の反応と、ドリフト刺激や SpaTemp 刺激に対する細胞の反応が相互依存性のない独立したものならば、それらは予測通りに重なり合うはずである。上丘の On／Off と OS／DS の反応タイプが独立しているかどうかを調べるために、我々は複合グループ（例えば On-DS Universal と名付けた、速い動きおよび遅い動きに対して DS 応答を持つ On 細胞）の分布が、別々のグループ（例えば On 細胞と DS Universal 細胞）（図 1c、d）の深さ分布から予測できるかどうかを調べた。On／Off と OS／DS のすべてのサブタイプの組み合わせについて、予想通りに重複は予測可能であることがわかった（12 回の並べ替え検定、Wilson Harmonic Mean p＝0.08、Bonferroni-Holm 補正後の最低 p 値＝0.10)。

なお、時間の制約によりイメージングを行った細胞の遺伝学的同定を行うことができなかったが、イメージングの結果から、上丘において遺伝学的特徴と生理的特徴の完全な一致は期待されないため、そのような実験を行う意義は当初期待されていたほどは無いと考えられる。

考　察

1. 上丘における多次元性の意義

現在、上丘細胞は少数のタイプに分類され、低次元の応答空間を示唆しているが、我々は、ドリフト応答とチャープ応答が特徴、応答タイプ、クラスターレベルで独立していることを実証することにより、上丘応答空間が少なくとも多次元であることを発見した。これまでの RGC 分類研究では、網膜のドリフト応答とチャープ応答は相互に依存していることが示唆されていることから、網膜 - 外側膝状体シナプスで観察される局所的な樹状突起の機能クラスタリング [7] と同様のデカップリングが網膜 - 上丘シナプスで起こっているはずであるとの仮説を提案する（図 2a)。応答の非相関性は、他の脳領域で次元を高めることが実証されている、より一般的なパターン分離や混合選択性のプロセスの準備段階として機能する可能性もある。高次元の反応空間は、いくつかの点で上丘における情報処理に有益であると考えられる。まず、次元を上げると、下流の線形デコーダが実行できるパーティションの数が増え、計算能力が高くなる。第 2 に、相関関係を減らすと、ニューラルコードの冗長性が低くなるため、効率が向上する。第三に、細胞機能多様性を最大化した集団符号化は、細胞型符号化よりも表現力が高い。最後に、過去数十年にわたる上丘研究により、上丘が複雑な行動や高次の認知過程に関与していることが実証されている。複雑な行動には高次元の応答空間構造が必要であると考えられ、そのためには低次元の網膜入力の変換が必要である。今回の結果は、このようなプロセスの少なくとも一段階が網膜 - 上丘シナプスで行われる可能性を示している。

2. 細胞型分類に関する新たな概念的な枠組み

独立した反応の重なりが偶然である反応空間では、低次元表現の存在を前提とするため、機能的な細胞型を定義することはできない。細胞型の起源は選択圧であるとされ、「つまり、細胞型は独立した進化的変化の可能性を持つ進化単位である」という定義が提案されている。独立した反応の存在は、そのような圧力が反応空間においてグローバルに作用しないことを意味するが（図 2c 左)、以前から言われている形態的な細胞タイプ間の機能差や、今回発見した細胞の好む速度と好む方向や向きとの間の依存性は、選択圧力が局所的に複数の軸に影響を与えることを示唆している（図 2c

右)。このことと、細胞の細胞内可塑性を考慮すると、上丘反応空間における真の進化的単位は、分類研究の自然な焦点として、細胞型ではなく、応答型であると仮定する（図 2b)。応答型モデルにパラダイムシフトすることは、細胞が複数の独立した経路に関与することを可能にすることで、神経回路網の教義の枠組みで分類を使用することができるというさらなる利点がある。

3. 形態学的／遺伝学的 vs 応答タイプ

我々は、細胞の特定の役割を定義するのではなく、細胞の遺伝的・形態的特性により特定の種類の情報が運ばれる可能性が高くなるが、単一の遺伝的・形態的特性を持った細胞型が複数の独立した情報ネットワークに関与する可能性を否定するものではないという仮説を立てている。言い換えれば、情報を伝達するのは、細胞内に存在する特定の応答の組み合わせではなく、応答そのものである。今後の実験では、遺伝学的に標識された細胞において機能的な反応と網膜入力を比較することで、これらの疑問を検証する必要がある。重要なことに、細胞の機能応答と深さ方向の位置との間には明確な関係があるため、これらの実験では深さ方向の補正を行うことが重要であるということである。最後に、複数の情報ラインが独立して細胞内を通過したり、組み合わされたりすることができるかどうかを検証する必要がある。

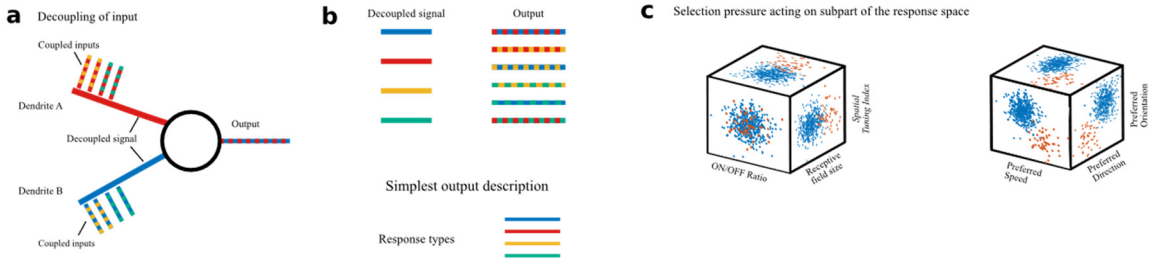


図 2. 網膜から上丘の情報変換に関する仮説

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、オーフス大学生物医学部ダンドライト研究所の Ole S. Schwartz である。マウスの飼育管理をして下さった国立遺伝学研究所多階層感覚構造研究室の皆さんに深く感謝する。

文　献

1) Zeng H, Sanes JR. Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. Nature Publishing Group [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 Aug 3;18(9):1–17. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.85

2) Goetz J, Jessen ZF, Jacobi A, Mani A, Cooler S, Greer D, Kadri S, Segal J, Shekhar K, Sanes JR, Schwartz GW. Unified classification of mouse retinal ganglion cells using function, morphology, and gene expression. Cell Rep [Internet]. 2022 Jul 12;40(2):111040. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111040 PMCID: PMC9364428

3) Stringer C, Pachitariu M, Steinmetz N, Carandini M, Harris KD. High-dimensional geometry of population responses in visual cortex. Nature [Internet]. 2019 Jul;571(7765):361–365. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1346-5 PMCID: PMC6642054

4) Oliveira AF, Yonehara K. The Mouse Superior Colliculus as a Model System for Investigating Cell Type-Based Mechanisms of Visual Motor Transformation. Front Neural Circuits [Internet]. 2018;12:59. Available from: http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2018.00059 PMID: 30140205

5) De Franceschi G, Solomon SG. Visual response properties of neurons in the superficial layers of the superior colliculus of awake mouse. J Physiol [Internet]. 2018 Dec;596(24):6307–6332. Available from: http://dx.doi.org/10.1113/JP276964 PMCID: PMC6292807

6) Shannon CE. The mathematical theory of communication. 1963. MD Comput [Internet]. 1997 Jul-Aug;14(4):306–317. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230594 PMID: 9230594

7) Liang L, Fratzl A, Goldey G, Ramesh RN, Sugden AU, Morgan JL, Chen C, Andermann ML. A Fine-Scale Functional Logic to Convergence from Retina to Thalamus. Cell [Internet]. 05 31, 2018;173(6):1343-1355.e24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.041 PMID: 29856953