

発達期の小脳活動異常による ASD 病態形成過程の解明

—発達期の小脳活動による「社会脳」の形成—

上條 諭志¹⁾、山田 光彦^{1),2)}、三輪 秀樹¹⁾

1) 国立精神・神経医療研究センター 2) 東京家政学院大学

<要 旨>

自閉症スペクトラム障害 (ASD) の病態形成メカニズムはよくわかっていないが、その 1 つのメカニズムとして、発達期の小脳活動異常が ASD の原因であるという「発達期小脳機能異常仮説」が注目を集めている。本研究では 11-15 日齢マウスの小脳プルキンエ細胞の活動を抑制し、成体での行動、回路機能、組織構築について調べた。抑制操作により小脳の組織構築に影響はなかったものの、オス特異的に社会性の低下が見られた。協調運動学習においてもオス特異的に成績の低下が見られ、発達期の一過性の小脳機能異常でも成体での行動異常をひきおこすのに十分であること、そして発達期の小脳活動異常に対する感受性が性により異なることが示唆された。一方で、この操作により、常同行動や感覚異常といった他の ASD 様表現型は観察されなかった。また、感覚情報の処理過程を直接調べるため、大脳皮質の活動を網羅的に測定できるマクロスコプを作製し、広視野イメージングを行った。今後、小脳活動と感覚異常との関係を精査する予定である。

<キーワード> ASD 小脳 発達期 性差 広視野カルシウムイメージング

【はじめに】

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、社会的相互作用やコミュニケーションの欠如、活動・行動・興味の限局、行動の反復性を特徴とする神経発達疾患である。本邦での 5 歳児の調整有病率は 3%前後であり、社会的なインパクトが大きいものの (Saito, 2020)、その病態形成メカニズムはよくわかっていない。

ASD の発症要因として様々な仮説が提唱されているが、周産期に小脳損傷を受けた患者で ASD 発症率が 36 倍に上昇するという疫学データから (Limperopoulos, 2007)、発達期の小脳機能異常が ASD 発症の原因であるという発達期小脳機能異常仮説が注目を集めている。ASD と小脳異常との関連は他の研究でも示されており、

ASD 患者の剖検脳検体で小脳プルキンエ細胞密度が減少していること (Fatemi, 2012)、ASD 患者の症状の重症度と小脳 (虫部、右下腿 1) の体積減少とが相関することなどが報告されている (D'Mello, 2015)。これらのデータは ASD 患者が小脳の異常を併存するという相関にすぎないが、Tsai らによるモデルマウス研究では、発達期の不可逆的な小脳機能異常が ASD 様の表現型をひきおこすのに十分であることが示されている。

Tsai らは、高率に ASD を合併する結節性硬化症の原因遺伝子である *Tsc1* を小脳プルキンエ細胞特異的に欠損させて実験を行った (Tsai, 2012)。このマウスでは、生後 10 週以内にプルキンエ細胞が徐々に失われ、社会性の低下、常同行動の

増加、思考の柔軟性の欠如といった ASD 様の表現型が観察された。しかしながら、この研究はプルキンエ細胞の細胞死という不可逆的な過程を伴っており、どの時期の小脳活動の異常が ASD 様の表現型をひきおこすか（時期特異性）、観測された表現型は可逆か（回復可能性）といった疑問に答えることが困難であった。ASD 様表現型が生じる時期の決定は治療のタイミングを選択する上で重要であり、表現型の可逆性を決定することは治療可能性の判断に必要であると考えられる。本研究では、小脳プルキンエ細胞の活動を時期特異的かつ可逆的に抑制できるモデルマウスを用いて、上記の疑問に答えることを目指した。これが第一の研究課題である。

ASD 患者の9割以上に感覚過敏・鈍麻などの感覚異常が併存すると報告されているが（Crane, 2009）、感覚異常が生じる機序は明らかになっていない。前述の小脳プルキンエ細胞が失われるマウスでは、視床から内側前頭前皮質への興奮性伝達が増強しており（Kelly, 2020）、小脳活動の異常により、視床が関与する感覚異常が生じる可能性がある。本研究では、発達期の小脳活動抑制により感覚異常が生じるかについて、聴覚性驚愕反射試験およびプレパルス抑制試験を用いて調べた。また、小脳活動抑制マウスにおける感覚情報処理過程を直接明らかにする目的で、広視野カルシウムイメージングによる脳活動測定を行った。これが第二の研究課題である。

【方法】

発達期小脳活動抑制モデルの樹立

発達期の小脳活動を可逆的かつ時期特異的に操作するため DREADD-hM4Di を用いた（Roth,

2016）。DREADD-hM4Di は薬剤で活性をコントロールする人工受容体で、細胞膜上に発現し、CNO（clozapine N-oxide）の結合により、細胞膜の過分極を介して活動電位の発生を抑制する。小脳プルキンエ細胞特異的に組み換え酵素 Cre を発現する L7-Cre ヘテロマウス（国立精神・神経医療研究センター・病態生化学・堀啓博士から分与）と Cre 依存的に抑制性 DREADD-hM4Di および mCitrine を発現する DREADD-hM4Di ホモマウス（Jackson Laboratory, #026219）を交配し、小脳プルキンエ細胞特異的に抑制性 DREADD-hM4Di を発現するマウス仔（Cre 陽性、小脳活動抑制群）および同腹のコントロールマウス仔（Cre 陰性、以下 WT と表記、対照群）を得た。生後 11-15 日の間、40v/v%の練乳で風味付けした CNO 溶液を、マイクロピペットを用いて 5 mg/kg の用量で経口投与後、8 週齢まで飼育した（Schalbetter, 2021）。

行動実験バッテリー

8 週齢以上の両性マウスを用い、引用文献を参考に一連の行動実験を行った（Fujihara, 2015）。行動データは ANY-maze（ANY-maze 社）を用いて自動的に解析した。代表的な実験のプロトコルについては以下に記載する。

3 チャンバー試験

照度を 20 lux に調整した部屋に、20 cm 幅の三区画に分かれた 40 cm × 60 cm の長方形チャンバーを置き、両端の区画に金属製のワイヤーケージを伏せて配置した（Yang, 2011）。実験は各 10 分間の 3 ステージから成り、第一ステージの habituation ではワイヤーケージに何も入れず、第二ステージの pre-test では丸めたキムワイプを入れて物体の存在に慣らした。第三ステージの social preference では、一方のケージに物体刺激と

して積み木を、もう一方のケージに社会刺激として今までに会ったことのない同性マウスを入れた。第三ステージにおいて、被験マウスがワイヤーケージの近傍で物体を探索する時間を object investigation time (OI)、マウスを探索する時間を social investigation time (SI)と定義し、social preference index を算出した。Social preference index が大きいほどマウスを選好している。

$$\text{Social preference index} = (\text{SI}-\text{OI}) / (\text{SI}+\text{OI})$$

グルーミング試験

照度 40 lux の部屋に空ケージを置き、マウスの行動を See3CAM_CU55_MHL_TC (e-con Systems) で 10 分間記録した。両前足をすり合わせ、顔から尾側へ至る一連の行動をグルーミングと定義し、ストップウォッチで時間を計測した。

ビー玉覆い隠し試験

照度 25 lux の部屋に、縦 44 cm × 横 30 cm の半透明ケージを置き、厚さ 5 cm となるように紙製床敷 Alpha-dri (Shepherd specialty papers) を敷き詰めた。直径 12.5 mm のビー玉を 25 個、5×5 の配置で等間隔に並べ、マウスを放って 30 分後に埋められていたビー玉の個数を数えた。真上から見てビー玉全体の 2/3 以上隠れているときに埋まっていると判定した。

Rotarod 試験

Rotarod 装置 RRAO3002 (小原医科産業) にマウスを乗せ、回転速度を 5 分間で 4 rpm から 40 rpm まで漸増させて落下に至るまでの時間を記録した。各トライアルの間隔は 2 時間、1 日 4 トライアルを 2 日連続の計 8 回テストを行った。最大計測時間は 5 分とした。

聴覚性驚愕反射試験およびプレパルス抑制試験

引用文献を参考に行った (Fujihara, 2015)。装置は SR4010 (小原医科産業) を用い、チューブ

に拘束したマウスを加速度センサーの上に固定した。背景ノイズを 65 dB に設定し、音圧 S (dB) の音響刺激を提示したときに足下のセンサーで計測された加速度の平均を音圧 S に対する驚愕反応の大きさ R_s と定義した。刺激の長さは 40 ms に統一した。

プレパルス抑制試験では、120 dB の本刺激の 100 ms 前に 20 ms のプレパルスを提示して、驚愕反応がどの程度抑制されるかを定量した。プレパルスの音圧を P (dB) としたときのプレパルス抑制の指標 PPI\%_PdB は下記の式により計算した。なお、本刺激の音圧が 120 dB、プレパルスの音圧が P である場合の驚愕反応を $R_{120, P}$ と定義している。

$$\text{PPI\%_PdB} = 100 - (R_{120, P} / R_{120, 0}) \times 100$$

免疫組織染色

4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液で灌流固定したマウス脳をリトラトーム (大和工機) で 50 μm に薄切して免疫染色を行った。5% 標準ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミン、0.3% Triton X-100 を含むブロッキング溶液中、室温で 2 時間ブロックした後、1% 標準ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミン、0.3% Triton X-100 を含む溶液で希釈した一次抗体を 4℃、オーバーナイトで反応させた。0.3% Triton X-100/リン酸緩衝液で洗浄した後、蛍光二次抗体を室温で 1 時間反応させた。使用した抗体は以下のリストの通りで、濃度はすべて 1:1000 で用いた。

抗体リスト:

一次抗体: mouse anti-calbindin (CB300, Swant), chicken anti-GFP (ab13970, abcam), guinea pig anti-VGLUT2 (135404, Synaptic Systems)

二次抗体: anti-chicken IgY H&L Alexa Fluor 488 (abcam), Alexa Fluor 555 anti-guinea pig IgG, Alexa 633 anti-mouse IgG (Thermo Fisher)

組織解析

免疫組織染色をした小脳矢状断切片の lobule IX 領域から、1 個体あたり 3 枚の画像を共焦点顕微鏡 SpinSR10 (Olympus) で取得した。Calbindin で標識されたプルキンエ細胞のカウント、分子層の厚みの定量、VGLUT2 陽性登上線維終末のカウントは ImageJ を用いて行った。

イメージング用手術

先行研究にしたがって手術を行った (Couto, 2021; Ren, 2021)。全脳に緑色蛍光型カルシウムプローブ GCaMP6s を発現する SNAP25-GCaMP6s マウス (Jackson Laboratory, #025111) を用い、頭部固定用プレートを後頭骨に接着した。接合をユニファスト II 樹脂 (GC) で強化し、頭蓋骨上部に ZAP a GAP CA+ (Robart manufacturing) の層を重ねて、光学ウインドウ兼保護剤とした。

広視野カルシウムイメージング装置の作製

先行研究を参考に、市販のカメラレンズ 2 個を逆向きに組み合わせてマクロスコープを作製した (Couto, 2021)。赤色の蛍光取得にも対応するため黄色の励起チャンネルを追加し、紫、青、黄色の励起光源には Thorlabs 社 LED 光源を用いた (M405L4, M470L5, M565L3)。励起光はフィルター (ET405/10x, ET470/40x, ET572/35x; Chroma) を通過させた後、二種のダイクロイックミラーにより (T425lpxr, T495lpxr; Chroma) 共通の光路へと導いた。サンプルへの励起光反射には 59022bs (Chroma) を用い、サンプルからの蛍光は 59022m (Chroma) および赤外線カットフィルター (#84-728, Edmund optics) を透過した後、CMOS カメラ (CS895MU, Thorlabs) で画像として取得した。行動モニター用の赤外線カメラ (BFS-U3-16S2-CS, FLIR) および運動状態を記録するためのランニングホイールも実装した。

感覚刺激提示装置の作製

感覚刺激の提示は python および Arduino プログラムにより、蛍光画像の取得と同期して行った。視覚刺激には青色 LED を、聴覚刺激にはスピーカー (Vifa, Avisoft) から提示される正弦波音源を、触覚刺激には air puff を使用した。

広視野カルシウムイメージングおよび画像解析

GCaMP6s 発現マウスをマクロスコープ下に頭部固定し、覚醒状態で *in vivo* イメージングを行った。青、紫の励起光を交互に照射し、各チャンネルあたり 10 Hz のサンプリングレートで撮像した。取得した蛍光画像は python wfield モジュールの preprocess で前処理した (Couto, 2021)。前処理した画像に LocaNMF 法を適用した (Saxena, 2020)。

統計解析

統計解析には Prism 9 (Graphpad) を用いた。

倫理的配慮

本研究の動物実験は当施設の倫理委員会の承認を得た上で行った。

【結果 - 研究課題 I -】

発達期の小脳活動抑制は身体発育および小脳の基本的な組織構築に影響しない

生後 11-15 日の CNO 投与により、オス、メスともに小脳活動抑制群および対照群間での成体重に有意差はなかった。また、単位長さあたりのプルキンエ細胞数 (Purkinje neurons per 100 μm : male WT 3.0 ± 0.5 , $n=9$, male Cre 3.1 ± 0.3 , $n=9$, male Cre-WT 95% CI: -0.3 to 0.5, $P=0.5574$, female WT 3.0 ± 0.3 , $n=10$, female Cre 3.0 ± 0.2 , $n=9$, female Cre-WT 95% CI: -0.4 to 0.2, $P=0.4790$, unpaired t test)、小脳分子層の厚さ (ML thickness: male WT 101.7 ± 8.8 μm , $n=9$, male Cre 103.1 ± 6.4 μm , $n=9$, male Cre-WT 95% CI: -6.2 to 9.2 μm , $P=0.6909$, female WT $104.9 \pm$

13.6 μm , $n=10$, female Cre 100.4 \pm 12.8 μm , $n=9$, female Cre-WT 95% CI: -17.4 to 8.3 μm , $P=0.4673$, unpaired t test)、といった小脳の基本的な組織構築は、小脳活動抑制群と対照群との間で有意な差を認めなかった。登上線維終末の数、分布パターンについても有意な変化を認めなかった。

発達期の小脳活動抑制により、オス特異的に社会性の低下が生じる

マウスの社会性を評価するとされている 3 チャンバー試験において、オス特異的に発達期の小脳活動抑制による social preference index の低下を認めた (図 1 左: social preference index: male WT 0.62 \pm 0.19, $n=17$, male Cre 0.52 \pm 0.20, $n=20$, $P=0.0417$, Mann-Whitney test)。一方で、メスマウスでは小脳活動抑制操作による social preference index の有意な変化を認めなかった (図 1 右: social preference index: female WT 0.58 \pm 0.16, $n=18$, female Cre 0.57 \pm 0.19, $n=18$, $P=0.9875$, Mann-Whitney test)。

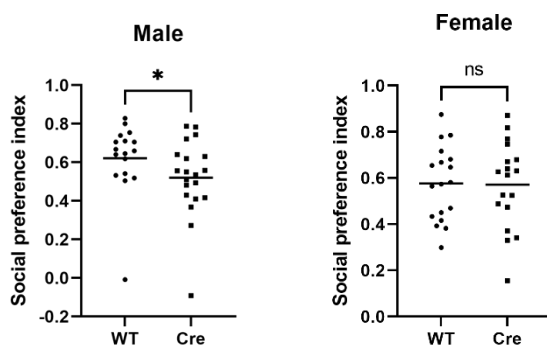


図 1：発達期の小脳活動抑制によるオス特異的な社会性の低下 (横棒は mean)

常同行動の評価指標であるとされるグルーミング試験では、オス、メスともに小脳活動抑制によるグルーミング時間の変化を認めず (grooming time: male WT 31.0 \pm 11.7 s, $n=16$, male Cre 31.9 \pm 14.0 s, $n=16$, male Cre-WT 95% CI: -8.4 to 10.3 s, $P=0.8340$, female WT 25.5 \pm 14.2 s, $n=16$, female Cre 34.2 \pm 27.1 s, $n=14$, female Cre-WT 95% CI: -7.2 to 24.6 s, $P=0.2706$, unpaired t test)、一部の ASD モデ

ルマウスで埋めるビー玉の数が増加することが報告されているビー玉覆い隠し試験でも、30 分間に埋められたビー玉の数に有意な差はなかった (buried marbles: male WT 9.7 \pm 5.3, $n=16$, male Cre 9.1 \pm 4.9, $n=16$, male Cre-WT 95% CI: -0.6 to 1.8, $P=0.7320$, female WT 6.3 \pm 3.7, $n=16$, female Cre 6.4 \pm 4.8, $n=14$, female Cre-WT 95% CI: -3.1 to 3.2, $P=0.9772$, unpaired t test)。

発達期の小脳活動抑制により、オス特異的に協調運動学習が障害される

協調運動学習を評価する rotarod 試験では、オスの小脳活動抑制群でのみ、試行前半での成績低下が見られた (latency to fall in trial 2: male WT 117.8 \pm 53.5 s, $n=16$, male Cre 58.1 \pm 43.3 s, $n=16$, adjusted $P=0.0167$, multiple unpaired t test)。一方、メスでは有意な差は認めなかった (latency to fall in trial 2: female WT 91.9 \pm 57.5 s, $n=16$, female Cre 116.2 \pm 66.0 s, $n=14$, adjusted $P=0.8910$, multiple unpaired t test)。

発達期の小脳活動抑制により、運動量、中心滞在時間などの指標は影響を受けない

基礎行動量、不安を定量するオープンフィールド試験では、オス、メスともに、発達期の小脳活動抑制による運動量および中心滞在時間の有意な変化は認めなかった。

発達期の小脳活動抑制により、聴覚過敏・鈍麻は生じず、プレパルス抑制の異常も起きない

聴覚性驚愕反射試験 (ASR) では、発達期の小脳活動抑制操作により、オス、メスのいずれにおいても、驚愕反応の大きさに有意な変化は見られなかった (図 2: 70dB から 120dB の全 9 点においてオス、メスともに WT startle response vs Cre startle response, adjusted $P>0.05$, multiple unpaired test)。また、視床の感覚ゲーティングが

関与し、統合失調症での異常が報告されているプレパルス抑制試験においても、オス、メスともに発達期の小脳活動抑制による有意な差を認めなかった (PPI%_{70dB}: male WT $12.0 \pm 21.0\%$, $n=14$, male Cre $13.7 \pm 16.6\%$, $n=16$, adjusted $P=0.9628$, female WT $10.4 \pm 21.2\%$, $n=15$, female Cre $-4.8 \pm 20.3\%$, $n=14$, adjusted $P=0.1905$, PPI%_{75dB}: male WT $21.8 \pm 23.6\%$, male Cre $29.3 \pm 21.0\%$, adjusted $P=0.7576$, female WT $20.1 \pm 23.1\%$, female Cre $8.6 \pm 23.8\%$, adjusted $P=0.2977$, PPI%_{80dB}: male WT $40.3 \pm 27.5\%$, male Cre $39.2 \pm 23.4\%$, adjusted $P=0.9628$, female WT $46.3 \pm 19.7\%$, female Cre $34.1 \pm 24.6\%$, adjusted $P=0.2977$, Holm-Sidak test)。

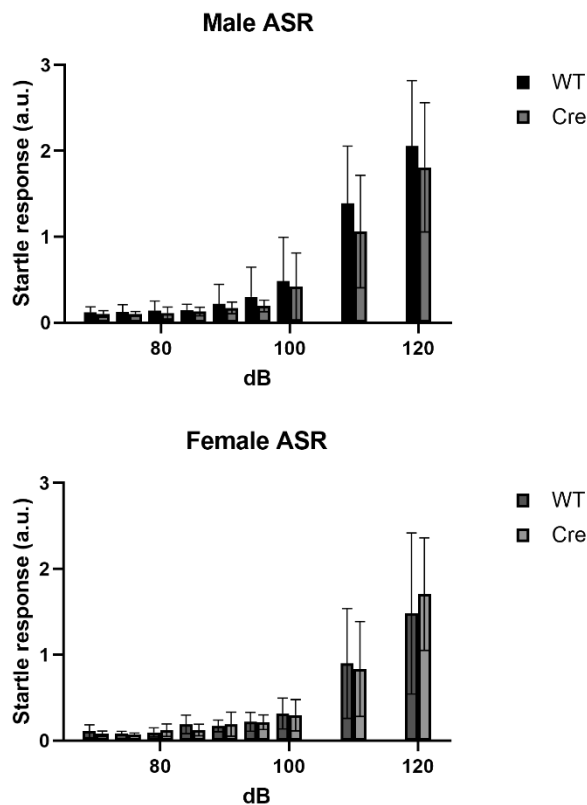


図 2：発達期小脳活動抑制による聴覚性驚愕反射への影響 (上：オス、下：メス、mean \pm SD)

【考察 -研究課題 I-】

以上の結果から、発達期の一過性の小脳活動異常によりひき起こされる ASD 様表現型は、永

続的な小脳活動異常を有するマウスが示す表現型のうち一部であることが明らかになった。今回の操作により、一部の表現型しか観察されなかった原因として、次の 4 つの可能性を考えている。①抑制の期間、強度が不足していた。②抑制の時期と表現型が生じるための臨界期が一致していなかった。③潜在的な異常は生じていたが、発達中に代償された。④そもそも小脳非依存的な表現型であった。以下、それぞれの項目について考察する。

①について、本研究の小脳活動抑制期間は 5 日間と短く、抑制の程度が CNO 濃度に依存するため、プルキンエ細胞の活動を完全には抑制できなかったと考えられる。先行研究はプルキンエ細胞の細胞死を伴っており、活動異常の程度が強く、持続期間も長い。現在、生後 11-20 日の 10 日間小脳活動を抑制したマウスで実験を行い、新たな表現型が出現するか検討している。

②について、今回の介入期間は生後 11-15 日であったが、生後 21-30 日に小脳ゴルジ細胞の活動を抑制した研究では (Badura, 2018)、本研究とは異なった ASD 様表現型が観察されている。ゴルジ細胞の抑制はプルキンエ細胞の活性化につながるため、変調の向きが逆という違いはあるものの、表現型ごとの臨界期の差異を反映していると考えられる。特記すべき事項として、一部の ASD 様表現型は急性の小脳活動変調でも起こることが報告されており、ASD 様の表現型には、(a)発達中の小脳活動が重要である表現型、(b)タスク中の小脳活動が重要である表現型の少なくとも二種類があると考えられる。(a)については、一過性の小脳活動異常が小脳内外の回路に痕跡を残すことにより、(b)については小脳活動の異常がリアルタイムの情報処理に影響していると

推測される。今回の操作では(b)に属する表現型は観察することができない。

③について、Tsai らは小脳プルキンエ細胞が徐々に失われるマウスに rapamycin を投与し、細胞死を遅らせることで ASD 様表現型のうち一部が回復することを報告している (Tsai, 2018)。小脳の組織構築に大きな変化が見られず、小脳プルキンエ細胞の機能が比較的保たれていると考えられる本研究では、CNO の投与を中止した生後 15 日以降、急速に代償反応が進むと推測される。今回観察されなかった ASD 様表現型の一部は、異常が起きた後に発達過程で代償されたもの、つまり発達の途中で治ったものであると予想される。逆に言えば、今回の操作でも観察された表現型は、代償反応が起きにくい、治療の臨界期の閉鎖が早い表現型だと考えられる。

④について、本研究はターゲットを小脳にしぼっているが、ASD の原因として、セロトニン仮説、興奮・抑制バランスの異常など、小脳が直接的には関係しないと思われる仮説も多く提唱されている。今回の小脳活動抑制操作により、ある ASD 様表現型が観察されなかったとしても、その表現型が単に小脳とは関係のない機序で生じる可能性も十分に考えられる。

本研究では、小脳機能の異常が感覚過敏をひき起こすと予想して実験を開始したが、聴覚性驚愕反射試験およびプレパルス抑制試験の結果には有意な差を認めなかった。感覚情報処理には、②(b)で考察したようなリアルタイムでの小脳活動が重要である可能性があり、今後の検討課題である。

本研究で観察された ASD 様表現型は、同一の操作を行ったにもかかわらず、オスに集中しており、ヒト ASD 患者の男女比が 4:1 と男児に大き

く偏っている疫学データと符合する。ASD 患者の男女比の偏りが、発達期の小脳活動異常に対する小脳内外の神経回路の感受性の違いに起因するとすれば興味深い。また、ASD 患者では ASD 関連症状が重いほど運動の巧緻性が低いという報告があり (Moruzzi, 2011)、ASD 様表現型と協調運動学習の障害が同時に出現したことは、発達期の小脳機能異常が両者の共通の病因となっている可能性を示唆する。小脳の高次脳機能への関与が近年注目されているが、小脳の計算ユニットとしての役割は共通で、コードする情報が運動性であれば協調運動の障害に、より高次の情報であれば今回見られたような ASD 様の表現型が現れるのではないかと予想している (Schmahmann, 2019; Van Overwalle, 2020)。

最後に本研究の限界について述べる。モデルマウスを用いた ASD 研究に共通することであるが、ASD の中核的な症状である言語を用いたコミュニケーションの障害に対してアプローチすることが困難である。また、CNO による活動抑制は時期特異性、可逆性の検証には適しているが、ASD 患者剖検脳ではプルキンエ細胞の数が減少していることを考えればきわめて人工的な状況である。最後に技術的な問題として、性周期のないオスは行動のばらつきが小さいため、表現型の差が検出されやすかった可能性がある。

【結果 -研究課題 II-】

発達期の小脳機能を抑制したマウスでは予想に反して、感覚異常の表現型が見られなかったことから、全脳に緑色蛍光型カルシウムプローブ GCaMP6s を発現する SNAP25-GCaMP6s マウスを用い、マクロスコプの動作確認および感覚刺激提示時の反応の取得を行った。

広視野カルシウムイメージングにより背側大脳皮質の脳活動を網羅的に記録できる

マウスを頭部固定し、マクロスコープを用いて視覚、聴覚刺激下、*in vivo* 広視野カルシウムイメージングを行った。作製したマクロスコープを示す（図 3）。GCaMP6s の発する緑色蛍光は、局所のヘモグロビン濃度に大きく影響を受けるため、血流効果の補正が不可欠である。本研究では、紫色励起による GCaMP6s の蛍光強度がカルシウム濃度非依存的であることを利用して蛍光データを補正した（Lerner, 2015）。得られた蛍光データはブレ補正、特異値分解による次元削減を行い、 $\Delta F/F$ の蛍光変化率に変換した後、解剖学的構造と対応付けられるように、Allen CCF（common coordinate framework）にマップした。実際の活動の例を示す（図 4）。

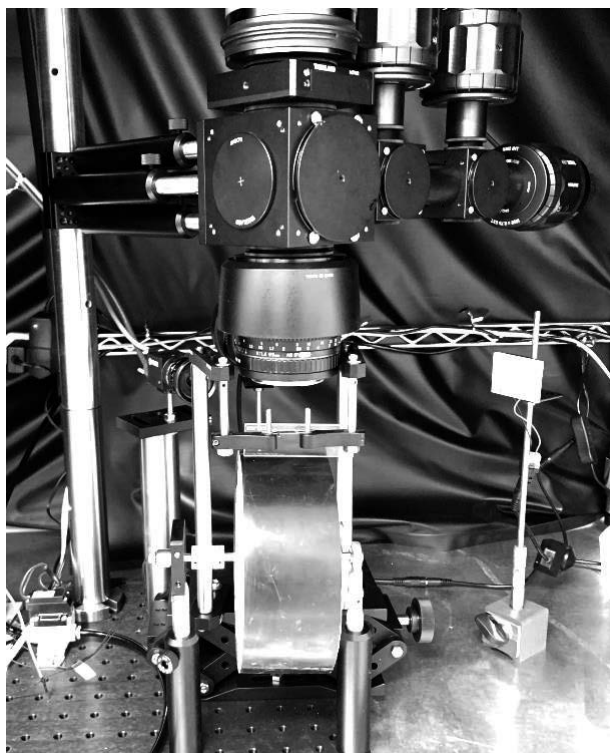


図 3：二色型マクロスコープ（右上部：励起光源、中央上部：画像取得装置への光路、中央：対物レンズ、中央下部：マウス固定および運動状態測定用のホイール、右前方：視覚刺激装置、画面外上部：聴覚刺激装置、左下方：触覚刺激装置、中央左方：赤外線カメラ）

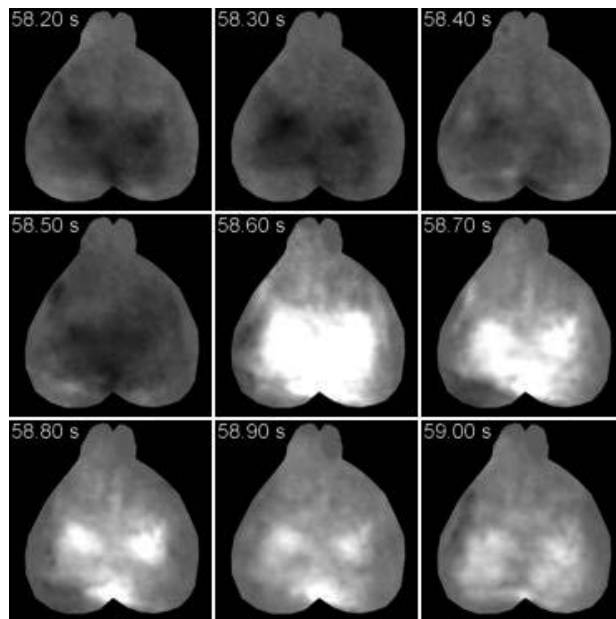


図 4：背側大脳皮質の GCaMP6s 蛍光変化（自発運動前後、各画像は 100 ms 間隔）

脳活動の解釈可能性を上げる LocaNMF 法の適用

感覚刺激のタイミングで整列して、大脳皮質の活動を平均するという手法は直観に沿っており、依然有用性が高い。しかしながら、広視野カルシウムイメージングで取得したマウスの脳活動のうち、およそ 70%程度がマウスの自発行動に由来することがわかっており（Musall, 2019）、運動情報を利用せずに活動を平均することはデコーディングを困難にする。また、計測される脳活動は多くの場合、背側大脳皮質全体に分散しており、意味のある解釈が困難であった。

その困難を解決する手法として Saxena らにより LocaNMF 法が開発された（Saxena, 2020; Abe, 2022）。この手法を用いると、脳活動を解剖学的に同定される脳領域の活動に分解することができるため、広視野カルシウムイメージングデータの解釈可能性が飛躍的に高まり、トライアル間、個体間での比較が可能となった。

【考察 -研究課題 II-】

今回の小脳活動抑制操作では、感覚異常の表

現型が出現しなかったため、マクロスコープの動作確認にとどまったが、現在は感覚過敏を有する別系統のマウスや急性に小脳活動を抑制したマウスを用いて実験を行っている。現状では個体数が少なく、感覚刺激に対する反応がどのように異なるかについて確固たることは言えない。今後は感覚刺激、自発行動により引き起こされる活動パターンが、感覚過敏マウスや小脳抑制マウスでどのように異なるかを調べる予定である。

また、今回はあまり活用できなかったが、本研究で用いたマクロスコープは二色型であり、興奮性細胞 vs 抑制性細胞といった異なる細胞集団の活動や、神経活動 vs モノアミンといった異なる質のシグナルを同時に記録することができる。ASD に随伴する感覚障害では抑制性神経活動の異常が存在するという報告があるため、抑制性細胞の活動を測定することは感覚障害の病態メカニズムの解明に寄与すると考えられる。

【引用文献】

1. T. Abe et al., Neuroscience Cloud Analysis As a Service: An open-source platform for scalable, reproducible data analysis. *Neuron* 110, 2771-2789.e2777 (2022).
2. A. Badura et al., Normal cognitive and social development require posterior cerebellar activity. *Elife* 7, (2018).
3. J. Couto et al., Chronic, cortex-wide imaging of specific cell populations during behavior. *Nat Protoc* 16, 3241-3263 (2021).
4. L. Crane, L. Goddard, L. Pring, Sensory processing in aults with autism spectrum disorders. *Autism* 13, 215-228 (2009).
5. A. M. D'Mello, D. Crocetti, S. H. Mostofsky, C. J. Stoodley, Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. *Neuroimage Clin* 7, 631-639 (2015).
6. K. Fujihara et al., Glutamate Decarboxylase 67 Deficiency in a Subset of GABAergic Neurons Induces Schizophrenia-Related Phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 40, 2475-2486 (2015).
7. E. Kelly et al., Regulation of autism-relevant behaviors by cerebellar-prefrontal cortical circuits. *Nat Neurosci* 23, 1102-1110 (2020).
8. T. N. Lerner et al., Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell* 162, 635-647 (2015).
9. C. Limperopoulos et al., Does cerebellar injury in premature infants contribute to the high prevalence of long-term cognitive, learning, and behavioral disability in survivors? *Pediatrics* 120, 584-593 (2007).
10. S. Moruzzi, A. Ogliari, A. Ronald, F. Happé, M. Battaglia, The nature of covariation between autistic traits and clumsiness: a twin study in a general population sample. *J Autism Dev Disord* 41, 1665-1674 (2011).
11. S. Musall, M. T. Kaufman, A. L. Juavinett, S. Gluf, A. K. Churchland, Single-trial neural dynamics are dominated by richly varied movements. *Nat Neurosci* 22, 1677-1686 (2019).
12. C. Ren, T. Komiyama, Wide-field calcium imaging of cortex-wide activity in awake, head-fixed mice.

13. B. L. Roth, DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683-694 (2016).

14. M. Saito et al., Prevalence and cumulative incidence of autism spectrum disorders and the patterns of co-occurring neurodevelopmental disorders in a total population sample of 5-year-old children. *Mol Autism* 11, 35 (2020).

15. S. Saxena et al., Localized semi-nonnegative matrix factorization (LocaNMF) of widefield calcium imaging data. *PLoS Comput Biol* 16, e1007791 (2020).

16. S. M. Schalbetter et al., Oral application of clozapine-N-oxide using the micropipette-guided drug administration (MDA) method in mouse DREADD systems. *Lab Anim (NY)* 50, 69-75 (2021).

17. J. D. Schmahmann, X. Guell, C. J. Stoodley, M. A. Halko, The Theory and Neuroscience of Cerebellar Cognition. *Annu Rev Neurosci* 42, 337-364 (2019).

18. P. T. Tsai et al., Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell *Tsc1* mutant mice. *Nature* 488, 647-651 (2012).

19. P. T. Tsai et al., Sensitive Periods for Cerebellar-Mediated Autistic-like Behaviors. *Cell Rep* 25, 357-367.e354 (2018).

20. F. Van Overwalle et al., Consensus Paper: Cerebellum and Social Cognition. *Cerebellum* 19, 833-868 (2020).

21. M. Yang, J. L. Silverman, J. N. Crawley, Automated three-chambered social approach task for mice. *Curr*