

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06949

研究課題名(和文) マーモセット発声修飾神経基盤の解明：1次運動野・前運動野の機能解析

研究課題名(英文) Elucidating the neural bases of marmoset vocalizations: functional analysis of the primary and premotor cortices

研究代表者

節家 理恵子(市原理恵子)(Setsuie, Rieko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：30532535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、マーモセットの随意的発声に寄与する、一次運動野・前運動野の神経細胞の同定と、その投射先を明らかにすることである。そこで(1)マーモセットに随意的な発声を促すための発声課題の構築、(2)1次運動野・前運動野の口腔顔面領域に対して、電気刺激を用いたマッピング、(3)運動課題を遂行中のマーモセットを用いた、一次運動野・前運動野を対象にした広域2光子イメージング計測系の構築を行った。今後は発声課題を遂行中の個体を用いて一次運動野・前運動野を対象とした広域2光子イメージング計測を行い、随意的発声に寄与する神経細胞群の同定を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト以外の哺乳動物で、随意的発声を促すための発声課題の構築はこれまで、マカクサルとマーモセットで行われておらず、マーモセットを対象とした発声課題の遂行は世界でも1例しか報告がない。本研究によって、随意的発声における前頭葉神経活動計測の研究基盤を整えたことにより、今後随意的発声に寄与する神経回路を明らかにすることが可能になり、ヒトにおいて喉頭筋等の発声器官に損傷が見られないにもかかわらず、発声障害がみられる疾患等の神経基盤の解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify neurons in the primary and premotor motor cortices that contribute to volitional vocalization in marmosets and clarify their anatomical projection targets. Therefore, I (1) constructed a vocalization task to encourage volitional vocalization in marmosets, (2) mapped the orofacial area of the primary and premotor cortex using electrical stimulation, and (3) constructed a wide-field two-photon imaging system to identify a set of neurons in primary and premotor cortices responsible for volitional control of forelimb movements using marmosets conducting a forelimb movement task. I plan to perform wide-field two-photon imaging using marmosets performing a vocalization task and to identify neuronal groups that contribute to volitional vocalization.

研究分野：神経生理学

キーワード：マーモセット 発声

## 1. 研究開始当初の背景

マーモセットは、多種多様な発声をコミュニケーションの手段として用い、その発声が発生的な学習によって成熟することが、ヒト以外の霊長類で初めて示されている (Takahashi DY et al, Science 2015)。耳が聞こえない状態や、学習すべき育て親から隔離された状態で育った個体においては、発声の成熟に異常が観察されている (Takahashi DY et al, Science 2015, Gultekin YB and Hage SR, Nat. Commun. 2017)。また、マーモセットに発声課題を遂行させることで、随意的な発声制御が可能であることも明らかになっている (Romberger T et al, Nat. Commun. 2019)。一方ヒトのスピーチの発声制御には、感情的運動経路 (emotional motor pathway) と随意的運動経路 (volitional motor pathway) の2つの神経経路の関与が提唱されている。前者はヒト以外の哺乳動物を対象とした鳴き声発声の神経基盤として同定され、ヒトの笑い声や泣き声の発声もこの経路で制御されると考えられている。感情的運動経路の中核をなす中脳水道周囲灰白質の損傷は、哺乳動物の無音症を引き起こす。一方、後者は学習によって獲得されるヒトのスピーチへの寄与が想定されており、一次運動野から脳幹運動ニューロンへの投射がその中核をなすと考えられている。ヒトでは一次運動野から喉頭筋関連運動ニューロンへの直接投射がみられるものの、これまでのところ、ヒト以外の霊長類においてはこの直接投射は確認されていない。申請者は本研究の申請当初、マーモセットの一次運動野・前運動野に、発声責任領域が存在し、その領域の神経細胞が脳幹の喉頭筋関連運動ニューロンに直接投射することで、ヒトのスピーチと同様の神経基盤のもと、学習後の発声の制御に寄与している可能性を推定した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、霊長類であるマーモセットを用いて、その多種多様な発声を可能とする発声修飾の神経基盤、すなわち、感情的運動経路あるいは随意的運動経路の寄与を明らかにすることである。本研究開始後、Cerkevichらによるマーモセット喉頭筋への Rabies Virus 投与と組織学的解析によって、4野・6V野から脳幹喉頭筋関連運動ニューロンへの直接的な投射は見られないものの、間接的な投射は確認されることが明らかになっている (Cerkevich CM et al, PNAS 2022)。そこで、マーモセットの随意的な発声に伴ってみられる4野・6V野の神経細胞の同定と、マーモセットの4野・6V野から感情的運動経路の上流に位置する前帯状皮質 (ACC) 等神経核への投射経路を確認することを本研究の目的とした。これにより、学習によって獲得された発声 (成熟発声) における随意的運動経路と、感情的運動経路との相互作用を明らかにするだけでなく、ヒトのスピーチの発声制御における寄与の詳細が明らかになりつつある1次運動野・前運動野神経細胞の機能との比較を行うことで、両者の違いを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

随意的発声課題の確立:

一次運動野・前運動野における発声責任領域を同定するためには、神経活動の計測中に、より多くの随意的発声を個体に促す必要がある。自発的な Antiphonal calling 発声時のマーモセット前頭葉において、発声に伴った活動を示す神経細胞群の存在が明らかになっている (Miller CT et al, J. Neurophysiol 2015, Roy S et al, J Neurosci 2016, Nummela SU, J Neurosci. 2017) ことから、マーモセット間において高頻度で観察される、応答発声 (Antiphonal calling) は随意的に行われていると推定される。そこで、隔離された実験室内で、あらかじめ録音しておいた他個体の Phee Call を再生することで、実験個体に応答発声を促す。また、より高頻度に随意的な発声を誘発するために、発声課題の構築を行う。この課題では、視覚 Cue を実験個体用 LED モニターに提示し、Cue が提示されている時間内に任意の鳴き声を発声した場合には報酬飲料を与えることで、随意的な発声を促す。

### 4野・6V野の口腔顔面領域に対するマッピング

自発的発声時のマーモセット前頭葉において、発声に伴い活動変化がみられる神経細胞群の局在領域や (Miller CT et al, J. Neurophysiol 2015, Roy S et al, J Neurosci 2016, Nummela SU, J Neurosci. 2017)、電気刺激を用いたマーモセットの4野・6V野における口腔顔面領域機能的マッピング (Burman KJ et al, J. Comp. Neurol. 2008, Burish MJ et al, J. Comp. Neurol. 2008)、マカクを対象とした6V野・44野の喉頭筋責任領域の機能的マッピング (Hage SR and Nieder A, Trends in Neurosci. 2016) 等を参考に、カルシウムイメージングの観察対象領域となる口腔顔面領域 (喉頭筋領域含む) のマッピングを、電気刺激を用いて行う。なお、喉頭鏡を用いた喉頭筋反応の検出は非常に困難であることが判明した。よって、喉頭筋責任領域のマッピングにおいては、喉頭筋に筋電図電極を装着し、筋電図計測を実施することで喉頭筋の応答を確認する。

#### 1 次運動野・前運動野の口腔顔面領域に対する発声時の 2 光子イメージング：

申請者は、運動課題遂行中のマーモセットの前頭葉皮質の 2 光子イメージングを行う系を確立することを目的として、前肢の運動を用いた 2 方向レバー課題を頭部固定下のマーモセットに遂行させ、その 1 次運動野・前運動野を含む広域 (3x3mm) の神経活動を、2 光子カルシウムイメージング法を用いて検出することに成功した (投稿準備中)。そこで、本研究課題においても、広域 2 光子カルシウムイメージング法を用いて随意的発声に寄与する 4 野・6V 野の神経細胞の同定を行う。電気刺激によるマッピングで同定した口腔顔面領域に GCaMP をエンコードする AAV ウイルスを投与し、広域 2 光子カルシウムイメージングを行う。イメージングの際には、実験個体の鳴き声の録音と顎口部分を含む顔の動画の撮影を同時に行い、これらデータの同期解析を行うことで、発声に伴った活動のみられる神経細胞の同定を行う。また、報酬を飲むことに伴った活動のみられる神経細胞の同定も行き、発声のみ、飲水のみ、あるいは両方でその活動に変動がみられる神経細胞を分類する。

#### 4 . 研究成果

複数の実験個体に Antiphonal calling の誘発を試みたところ、録音済み Phee Call を聞かせた際に、鳴き返しが起こる頻度には、個体差が存在し、鳴き返しをほぼ行わない個体も存在すること、繰り返し録音を聞かせることで、鳴き返しの頻度が低下する傾向にあることが明らかになった。一方で、発声課題の構築については、世界で唯一その構築に成功している Hage SR らのアドバイスを受けることで、その構築に成功した。視覚 Cue 提示時間内に発声できなかった試行、あるいは Cue 提示時間外に発声してしまった試行を失敗試行とし、全試行における Cue 提示内発声成功率が 8 割以上となるようにトレーニングを重ねた。複数の個体で発声課題の遂行が確認できている。次に、マーモセットの 4 野・6V 野における口腔顔面領域機能的マッピングを、電気刺激を用いて行った。喉頭鏡を用いた喉頭筋の応答も一部の個体においては確認できた。さらに、運動課題遂行中の個体の広域 2 光子イメージング法の実験系を確立する目的で、前肢の運動を用いた 2 方向課題を対象を遂行しているマーモセット個体を対象に、1 次運動野・前運動野の広域 2 光子イメージングを行い、前肢運動に伴って活動する神経細胞の同定にも成功しており、現在論文投稿に向けて準備中である。今後、発声課題遂行中のトレーニング個体を用いてカルシウムイメージングを行い、随意的発声に寄与する神経細胞の同定を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyamoto Kentaro, Setsuie Rieko, Miyashita Yasushi	4. 巻 38
2. 論文標題 Conversion of concept-specific decision confidence into integrative introspection in primates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110581 ~ 110581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Setsuie Rieko, Tamura Keita, Miyamoto Kentaro, Watanabe Takamitsu, Takeda Masaki, Miyashita Yasushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Off-Peak 594-nm Light Surpasses On-Peak 532-nm Light in Silencing Distant ArchT-Expressing Neurons In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101276 ~ 101276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rieko Setsuie
2. 発表標題 Vocalization of Common Marmoset
3. 学会等名 Sound Analysis Workshop Fall 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------