様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月　２ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ１９４９６

研究課題名（和文）マウスの表情を生み出す神経回路機構

研究課題名（英文）Neuronal basis of facial expression in mice

研究代表者
山下　貴之（Yamashita, Takayuki）

名古屋大学・環境医学研究所・客員教授

研究者番号：４０４６６３２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：動物の表情を生み出す神経回路機構やその進化については理解が遅れている。そこで、行動タスクや特定神経活動の操作を用いてマウスの内的状態を人為的に操作し、その結果表出する様々な顔面筋の運動の変化を調べたところ、報酬予期と報酬獲得に伴い、マウスの洞毛や鼻に特徴的な運動が現れることが示された。報酬予測時と報酬獲得時の顔運動を司る神経回路は異なり、側坐核ドーパミンD1受容体発現細胞は報酬獲得時の顔運動には関わるが報酬予測時の運動には関わらない。ところが、大脳皮質一次運動野の神経細胞は両者の運動を司っており、報酬関連の顔運動を司る神経回路のより出力に近いノードを形成していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ヒトでは感情が顔に表れることはよく知られている。ヒト同士のコミュニケーションにおいて顔表情認知は重要であるが、そもそも顔による感情表現がどのような進化的過程によって形成されてきたかについての確立された学説はない。痛みにより顔を歪めるなどの一部の表情はヒト以外の動物にも広く観察されるものの、動物の表情を生み出す神経回路機構やその進化については理解が遅れていた。本研究によってマウスの表情を司る重要な神経回路が明らかにされたことにより、新たな研究分野が創成され、動物の表情の制御機構のより詳細な理解や病態・進化についての研究が広く進展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The neural mechanisms underlying facial expressions of animals are poorly understood. In this study, we manipulated the internal state of mice using a behavioral task or manipulation of specific neural activities to examine the subsequent orofacial movements in mice. Our results suggest that characteristic movements in the whiskers and nose of mice are evoked by reward anticipation and reward acquisition. Distinct neural circuits control facial movements during reward anticipation and reward acquisition: dopamine D1 receptor-expressing cells in the nucleus accumbens are involved in facial movements during reward acquisition but not during reward anticipation. On the other hand, neurons in the primary motor area of the cerebral cortex are involved in both types of movements, forming a key node of the neural circuit that drives reward-related facial movements.

研究分野：神経生理学

キーワード：表情　マウス　報酬　ドーパミン　運動野　大脳皮質　光遺伝学

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトでは、嬉しそうな顔や悲しそうな顔などといったように、感情が顔に表れる。ヒト同士のコミュニケーションにおいて顔表情認知は重要であるが、そもそも顔による感情表現がどのような進化的過程によって形成されてきたかについての確立された学説はない。痛みにより顔を歪めるなどの一部の表情はヒト以外の動物にも広く観察されるものの、動物の顔面筋による感情表現については長い進化的時間軸に沿った体系的な研究がほとんどなされておらず、表情を生み出す神経回路機構やその進化については理解が遅れている。

研究代表者の山下は、これまでの研究の過程で、マウスに洞毛（whisker）刺激－水報酬の連合学習タスクを学習させる前後において、課題遂行中のマウスの洞毛刺激後の洞毛の動きが変化することを見出しており、この洞毛の動きはマウスにとって報酬を予期する顔運動、つまり、表情ではないかという仮説を持っていた。しかし、洞毛刺激－水報酬の連合学習タスクは、洞毛刺激を行うため、報酬に関連した洞毛運動が仮に存在したとしても、刺激に対する反射的な洞毛運動との区別が難しい。そこで、洞毛感覚とは無関係な音刺激と水報酬の連合学習タスクをマウスに学習させ、報酬タイミングに相関する洞毛運動変化が観察されるかを確かめたところ、報酬予測・報酬獲得・報酬省略のそれぞれのタイミングにおいて、やはり洞毛が特徴的な動きを示すことを発見した。したがって、報酬予測時の期待感、報酬獲得時のポジティブな感情、報酬省略時のネガティブな感情といったようなマウスの内的状態が洞毛運動として表現されている可能性がある。この仮説が真であれば、課題の学習に伴う報酬期待値の変化により、特徴的な洞毛運動の発生確率が変化するはずである。また、報酬を司る神経回路の活動操作により、課題遂行中のマウスに見られるものと同様な洞毛運動が観察されるかもしれない。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえて、本研究では、行動タスクや特定神経活動の操作を用いてマウスの内的状態を人為的に操作し、その結果表出する様々な顔面筋の運動の変化を調べることにより、感情が表情として顕在化するための神経回路機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

（1） 聴覚 Go/No-Go タスク遂行中のマウスの表情

野生型マウス頭蓋に頭部固定用金具を貼付した後、飲水制限を施し、頭部固定下で水報酬と連合した音刺激（Go CS）と水報酬とは関係ない音刺激（No-Go CS）を区別するよう訓練した。1 日 1 回の訓練によりマウスはこの聴覚 Go/No-Go タスクを 3－4 日程度で習得した。本タスク遂行中のマウス頭部をハイスピードカメラ（HAS-L1、ディテクト社）にて高速撮影（200 fps）し、洞毛や鼻の運動パターンの学習変化を追跡した。また、運動の時系列データからタスク行動出力を予測する機械学習モデルを作出した。

（2） 中脳ドーパミン神経刺激により誘導されるマウスの表情

ドーパミン神経にチャネルロドプシン2が発現する遺伝子改変マウス（DAT-Cre;LSL-ChR2 マウス）の中脳腹側被蓋野（VTA）をターゲットとして光ファイバーカニューレを留置し、頭部固定金具を貼付した。頭部固定下で、光ファイバーから 10 ms の青色光パルスを 5 Hz・5 回、10 Hz・10 回、または 20 Hz・20 回与えて VTA ドーパミン神経を刺激（oDAS）し、同時に洞毛や鼻の動きをハイスピードカメラにて高速撮影（500 fps）した。また、音刺激と oDAS の連合刺激（oDAC）を学習させ、学習前後の洞毛と鼻の動きの変化を追跡した。さらに、下記成果に示すように、ドーパミン D1 受容体（D1R）の薬理的阻害、ウイルスベク

ターを介したゲノム編集による側坐核 D1R ノックアウト、大脳皮質一次運動野の薬理学的阻害を行い、上記顔運動に対する効果を調べた。また、側坐核におけるドーパミン神経軸索の光遺伝学的刺激によって上記顔運動が誘発されるか否かも検討した。

（3） **表情と相関する神経活動の測定**

上記（2）の実験に使用した DAT-Cre;LSL-ChR2 マウスの大脳皮質一次運動野から、32 Ch シリコンプローブにより記録を行い、oDAC を行った。同時に洞毛運動を高速撮影し、oDAC 中の洞毛運動と相関する神経活動があるか否かを検討した。

4. 研究成果

（1） **聴覚 Go/No-Go タスク遂行中のマウスの表情**

① **課題学習後のマウスの表情：** タスク学習が成立したマウスの課題成功時（Hit トライアル[Go 音提示後にリックして水報酬を獲得したトライアル]および Correct Rejection トライアル[No-Go 音提示後にリックをしなかったトライアル]）の洞毛運動を解析したところ、Hit 時には Go 音提示直後に洞毛の前方運動（cue-locked protraction）が表出し、直後に 5-8Hz の周期的運動が見られた。また、報酬獲得により洞毛の前後運動(whisking)が高頻度で観察された。一方、Correct Rejection 時はランダムな洞毛運動しか観察されなかった。5-8Hz の周期的洞毛運動はリックと同期していたため、リックに伴って顔面筋がそろって活動することが確認された。一方、鼻の動きはマウスによるばらつきが大きく、どんなマウスでも観察されるような動きはなかったが、Go 音提示後に鼻を引っ込める運動が複数のマウスで見られた。

② **課題学習前後の表情変化：** タスク学習成立前のマウスの洞毛運動を解析したところ、Hit 時の cue-locked protraction は学習成立後よりも振幅が低く、Hit 時と Correct Rejection 時の cue-locked protraction の振幅の差が課題学習の習熟度に相関することが分かった。一方、報酬獲得時の whisking の出現確率は課題学習の習熟度に相関せず、いつでも見られることが分かった。

③ **表情から運動出力を予測するアルゴリズム：** タスク学習後のマウス洞毛の時系列データと課題時の行動結果（Hit または Correct Rejection）から、教師あり機械学習によってモデルを作成した。このモデルにより、洞毛運動から正しい行動結果が予測できる精度は 82％（n = 7）であり、チャンスレベル（50%）よりも有意に高かった（P <0.0001）であった。リックに伴う洞毛運動（5-8 Hz）を排除すると、予測精度は有意に減少した（73%, n = 7, P = 0.0003）ものの、チャンスレベル（50%）よりは有意に高かった（P = 0.0002）。また、本モデルを用いてタスク学習前のマウス洞毛運動データからタスク運動出力の予測を試みたところ、予測精度は 53%（n = 9）であり、チャンスレベル（53%）と同等であった(P = 0.9)。これらのことから課題学習に伴って表出する cue-locked protraction によって行動出力を予測することが可能であることが示された。

（2） **中脳ドーパミン神経刺激により誘導されるマウスの表情**

① **VTA ドーパミン神経刺激により誘発される顔運動：** VTA ドーパミン神経の光遺伝学的な刺激(oDAS)により洞毛の whisking と鼻の引っ込み・横振り運動が誘発された。これらの運動は刺激頻度・回数が大きいほど高頻度になり、運動自体も刺激頻度・回数が大きいほどより大きくなった。これらの運動は D1R アンタゴニストの腹腔内注射や側坐核 D1R のノックアウトによりほぼ完全に消失した。また、側坐核に投射するドーパミン神経軸索を直接光遺伝学的に刺激しても同様の顔運動が観察された。これらの結果から、oDAS により

誘発される運動は側坐核 D1R を介することが明らかとなった。また、whisking の開始を司る大脳皮質一次運動野洞毛領域（wM1）を GABA アゴニストであるムシモールの注入により抑制すると、この運動が完全に消失した。

② 音提示と VTA ドーパミン神経刺激の連合により誘発される顔運動： マウスに音提示と VTA ドーパミン神経刺激の連合（oDAC）を学習させたところ、音提示直後に洞毛の cue-locked protraction と鼻の引っ込み・横振り運動が表出し、VTA ドーパミン神経刺激により洞毛の whisking と鼻の引っ込み・横振り運動が表出した。oDAC 学習後のマウスに D1R アンタゴニストの腹腔内注射し、同連合刺激を行ったところ、VTA ドーパミン神経刺激により誘発される運動は消失したが、音提示直後の運動には変化がなかった。また、wM1 をムシモール注入により抑制すると、音提示直後の運動と VTA ドーパミン神経刺激により誘発される運動の両者が完全に消失した。

（3） **表情と相関する神経活動の測定**

上記の結果から、wM1 が報酬関連の顔運動を制御する中心的な役割を持つことが明らかになったことから、oDAC 学習後のマウスの wM1 からシリコンプローブ記録を行い、音提示直後の運動と VTA ドーパミン神経刺激により誘発される運動に相関する神経活動が見られるか否かを検討した。すると、音提示直後の運動と VTA ドーパミン神経刺激により誘発される運動の両者に相関する活動を示す細胞の他、各運動のみに相関する細胞やどの運動にも相関しない細胞が見つかった。

以上の結果から、報酬予期と報酬獲得に伴い、マウスの洞毛や鼻に特徴的な運動が現れることが示された。報酬予測時と報酬獲得時の顔運動を司る神経回路は異なり、側坐核 D1R 細胞は報酬獲得時の顔運動には関わるが報酬予測時の運動には関わらない。ところが、wM1 の神経細胞は両者の運動を司っており、報酬関連の顔運動を司る神経回路のより出力に近いノードを形成していると考えられる。今回、光遺伝学を用いて報酬関連の顔運動のみを誘発したが、水報酬を組み合わせた課題遂行時には、リッキングによって顔運動が再構成されて鼻運動などの一部の報酬関連の顔運動は見えにくくなるようである。しかし、報酬関連の洞毛運動はリッキングの影響を排除してもロバストに出現することから、マウスの洞毛運動は報酬関連表情の主要部分であることが推測される。これらの研究成果については、現在投稿準備中である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　3件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 山下貴之
２．発表標題 神経科学におけるドーパミン濃度測定の意義
３．学会等名 電気化学会第88回大会（招待講演）
４．発表年 2021年

１．発表者名 Wanru Li、中野　高志、河谷　昌泰、　松原　崇紀、向井　康敬、山中　章弘、山下　貴之
２．発表標題 中脳ドーパミン神経が駆動するマウスの表情とその神経機構
３．学会等名 第67回中部日本生理学会
４．発表年 2020年

１．発表者名 山下貴之
２．発表標題 Midbrain dopamine neurons drive whisker movements associated with reward processing
３．学会等名 第97回日本生理学会大会
４．発表年 2020年

１．発表者名 山下貴之
２．発表標題 報酬関連行動を司るドーパミン神経系回路メカニズム
３．学会等名 電気化学会第87回大会（招待講演）
４．発表年 2020年

１．発表者名
山下貴之

２．発表標題
報酬系に駆動される洞毛運動とその機能

３．学会等名
第3回これからの神経回路研究の会

４．発表年
2020年

１．発表者名
水谷　晃大、中野　高志、疋田　貴俊、山中　章弘、吉本　潤一郎、山下　貴之.

２．発表標題
Midbrain dopamine neurons drive reward-associated whisker movements

３．学会等名
第42回日本神経科学大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
山下貴之

２．発表標題
ヒゲにまつわるエトセトラ：　マウス洞毛の感覚と運動から探る脳機能

３．学会等名
大阪大学蛋白質研究所高次脳機能学セミナー（招待講演）

４．発表年
2018年

１．発表者名
水谷晃大、尾崎隼平、吉本潤一郎、山下貴之

２．発表標題
Characteristic whisker movements reflect the internal state of mice related to reward anticipation

３．学会等名
日本神経回路学会 第28回全国大会

４．発表年
2018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
連携研究者	吉本　潤一郎 (Yoshimoto Junichiro) (10403346)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授 (14603)	

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