

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19629

研究課題名(和文)ソングバードを用いた発話コミュニケーション障害「吃音」の神経行動学的研究

研究課題名(英文) Neurobehavioral study for a vocal communication disorder, stuttering, using songbirds

研究代表者

和多 和宏 (Wada, Kazhiro)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70451408

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)：「吃音」の動物モデルとしてソングバードを用い、音声繰り返し異常の神経メカニズムの解明を目標に研究を行った。DlxプロモータによるGABAergic interneuronに限定した遺伝子発現制御を可能し、介在ニューロン特異的なアポトーシスを誘導した。その結果、成鳥においても、繰り返し音素の異常増加が誘導された。これに対して、pan-cell typeプロモータのCMVプロモータを用いた場合、音素繰り返しの軽微な増加が観察されたのみであった。これは大脳基底核内の細胞タイプ特異的な機能異常による運動パターンの時系列制御の困難さが誘導されるとする『大脳基底核ループ機能異常』仮説を強くサポートする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

思考したことを言葉として表出できない、会話が流暢にできないといった障害がある。発話コミュニケーション障害と呼ばれるものである。その一つに「吃音(どもり stuttering)」がある。しかし、現在吃音の発症原因は明らかにされておらず、治療方法も十分に整備されていない。本研究によるソングバードを用いた研究により、大脳基底核内の細胞タイプ特異的な機能異常による運動パターンの時系列制御の困難さが誘導されるとする『大脳基底核ループ機能異常』仮説を強くサポートする結果を得た。また、鳥類と哺乳類で保存された神経回路における機能異常と考えることができる。

研究成果の概要(英文)：Stuttering is a vocal communication disorder presenting abnormal repetition of vocalization. Here, we adapted songbirds as an animal model to examine the contribution of the basal ganglia nucleus Area X to regulate the repetitive sequence of songs at the cellular level. We induced the specific ablation of GABAergic neurons in bilateral Area X of Bengalese finch (BF) by injecting AAV containing Cre-FLEX system and expressing dtA driven by Dlx promoter. The frequency of syllable repetition significantly increased after injection compared to pre-injection. Such increasing of syllable repetition did not occur in the other BFs that were injected AAV which would express dtA driven by the pan-cellular promoter CMV in Area X. The results suggest that the specific ablation of GABAergic neurons in the basal ganglia may induce excitatory/inhibitory imbalance, which in turn, causes dysregulation of syllable repetitive regulation.

研究分野：行動神経科学

キーワード：コミュニケーション障害 ソングバード 大脳基底核 アデノ随伴ウイルス 時系列制御 くり返し異常 吃音 発声学習

1. 研究開始当初の背景

会話によるコミュニケーションは、人間として生きていく上で重要な行為である。しかし、発話コミュニケーション障害「吃音(stuttering)」では、思考したことを言葉として表出することが状況依存的に困難になることが起こる。吃音は発話コミュニケーション障害として、あらゆる言語・文化圏において人口1%でみられ、その潜在的患者数は、1千万人を越える。現在、医療・理学療法・幼児発達教育の現場から多くの関心を向けられているが、吃音に関わる研究は、症例・認知療法報告やPET等の非侵襲的画像解析を主とするものであり、吃音の原因解明・統一的な治療方法は確立していない。

吃音の多くの症例が、幼児期の言語獲得時に付随した症状(発達性吃音)として顕在化する。その発症には遺伝・環境要因と共に、言語獲得という音声パターンの学習生成の過程での発達過程での異常が影響を与えていると考えられている(Comings and Comings 1987)。しかし、音声発声学習能は、ヒトの言語獲得や鳴禽類ソングバードの囀り学習といった非常に限られた動物種のみで確認されている学習様式である。従来より用いられているマウスなどの実験動物は、生得的な発声のみしか行わない。そのため、これまでにおいて吃音の動物モデルの作成を試みることにさえ取り組まれてこなかった。そのため、吃音研究においては、実験動物モデルを用いた発症機序の検証実験や、有効な薬剤開発を目指した大規模スクリーニングが進まず、他の神経精神疾患と比べて発症原因・治療法の理解が大きく立ち遅れているのが現状である。

本研究は、他個体から発声パターンを学ぶ鳴禽類ソングバードの発声行動発達の観察を行っていた過程で、「状況依存的な吃音発症をするソングバード」を全くの偶然から発見したことと、これまで当研究室で独自に蓄積してきた「ウイルス発現系による選択的な神経細胞における遺伝子発現操作技術応用」を着想の土台とした。「吃音ソングバード」は、疾患動物モデルの表面妥当性を満たすのみならず、これまで吃音発症の仮説の一つである『吃音発症と大脳皮質-基底核-視床ループ経路の関連性を実験検証可能』にすると考えた。これまで医学研究に用いられてこなかった新規動物モデル・ソングバードとそのユニークな発声学習行動に着目することで、吃音研究のブレイクスルーを目指した研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発話コミュニケーション障害「吃音」の動物モデルを用いた吃音発症の神経メカニズムの解明である。特に本研究では、吃音を「音素時系列配列の制御異常」が発症の一因と捉え、その原因が大脳基底核ループ経路から発声運動経路への出力異常にあるとする『大脳基底核ループ経路出力異常』仮説を検証した。この『大脳基底核ループ経路出力異常』仮説は、状況依存的(別個体に対して)発声行動時に大脳基底核ループ経路を構成する神経核の神経興奮が通常発声時よりも弱まることから支持される。また、ヒト吃音患者を対象としたfMRI研究によっても、大脳基底核機能異常と吃音との関連が示唆される報告が近年増えつつある(Krishnan et al., 2016)。しかし、これらは関連研究に留まっており、実際の因果関係を検証する必要があった。

近年の研究において、ヒトを含めた哺乳類と鳥類では、神経解剖レベルで脳の基本的な構造は共通性が高く、遺伝子発現レベルでも多くの相同性が保存されている(Wada et al. 2013, Jarvis et al. 2014) [図1]。このため、ソングバードを動物モデルとして得られた知見は、ヒトの言語習得・発話コミュニケーション障害における脳内分子基盤の理解へと直接に還元できる。

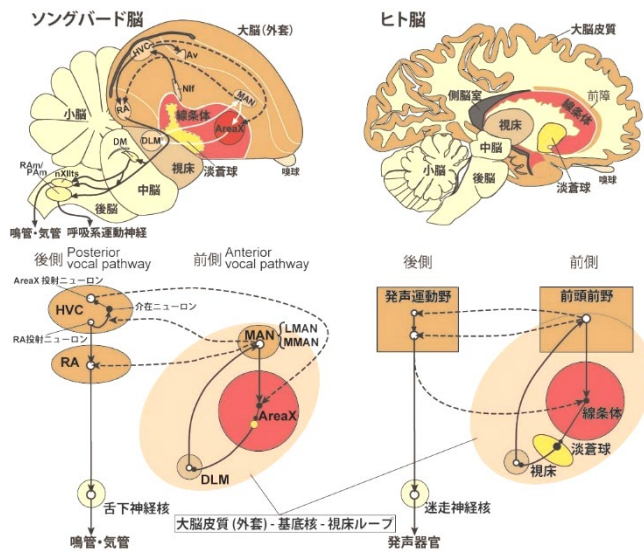


図1 ソングバード脳とヒト脳の発声制御に関わる神経回路

3. 研究の方法

本研究戦略として、実験(1): 発声学習臨界期中の発声学習環境操作による、「吃音ソングバード」の効率的な作出と実験、(2): ウイルス発現系による「選択的な神経細胞での遺伝子発現操作技術」を融合し、『吃音ソングバードの大脳皮質-基底核-視床ループ経路特異的な遺伝子操作』を行なった。これらの実験により、『どの脳部位』『どの神経細胞』が吃音発症に関わるのか明らかにすることを目指した。

具体的には、実験(1)では、Bengalese finch (BF: ジュウシマツ) 若鳥個体に、繰り返し音素構造をもつカナリア歌を学習モデルとして提示し、音素繰り返し構造の程度に個体差が出現する生育環境の確立を行った。

実験(2)においては、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて、細胞タイプ特異的発現プロモーター(CMV, CaMKII, Dlx プロモーター)と Cre-Flex システムにより、歌神経回路の大脳基底核領域

に相当する Area X 神経核内の細胞タイプ特異的な細胞死誘導実験を行った。この大脳基底核 Area X 内の細胞死誘導実験には、実験(1)により作出した成鳥 Bengalese finch 個体と共に、発声学習臨界期中の幼鳥も用いた。ウイルスインジェクション後の発声行動、及び発声パターンの変化を音素音響特性と時系列制御の観点から解析を行った。

4. 研究成果

実験 (1) : Bengalese finch (ジュウシマツ) 若鳥個体への音素繰り返し構造の学習誘導

Bengalese finch (BF)雄雛を孵化後 8~15 日までの間に父親をケージから移動させ、父親歌の代わりに孵化後 41~60 日までにカナリア歌をスピーカーより再生し、歌モデルとした[図 2A]。その結果、一般的な BF 歌よりも平均で約 2 倍多い音素繰り返し構造(repetition structure)をもつ BF を作出することができた[図 2B, C]。

この音素繰り返し構造を多くもつ BF 雄個体は、雌に対する求愛歌を歌う状況下において、更なる音素繰り返しの程度が増大することは観察されなかった。これは、発声学習過程において音素繰り返し構造を多く獲得した個体において、状況依存的な繰り返し発声制御異常に直接的な影響を与えるのではないことを示唆する。

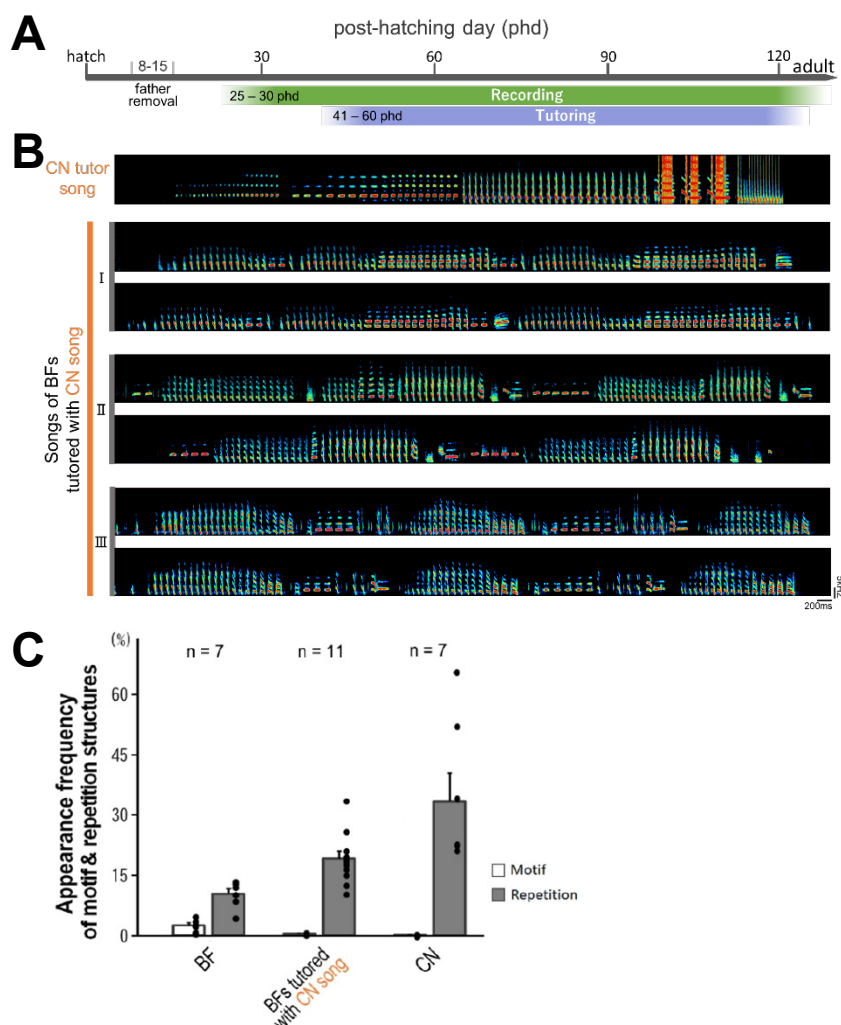


図 2 (A) Bengalese finch (BF)の発声学習感受性期における歌モデル提示実験の概略、(B)カナリア (canary: CN)歌を学習モデルとして提示された BF 個体(3 例分)が獲得した歌パターンの例、(C) 正常 BF, CN 歌提示 BF, 正常 CN の歌における音素定型(motif)構造と繰り返し(repetition)構造の出現率の比較。

実験 (2) : 大脳基底核 Area X 歌神経核内の細胞タイプ選択的除去実験による音素繰り返し構造の異常増加

鳴禽類ソングバードの大脳基底核 Area X 歌神経核内には、種々のタイプの細胞群が存在することが知られている[図 3A]。これまでの研究においては、電気破壊や ibotenic acid 注入による非選択的な破壊実験が主になされており、Area X 構成細胞タイプごとに着目した機能破壊実験は行われてこなかった。

[ここに入力]

本研究では、アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus, AAV)で鳴禽類の脳内神経細胞群にも高い感染効率を示すセロタイプ 9 型 AAV9 を用いた。この AAV9 をベクターとして、pan-cell タイププロモーターの CMV プロモーター、GABA 作動性神経細胞特異的な Dlx プロモーター、medium spiny neuron(中型有棘神経細胞)選択的 CaMKII プロモーターの 3 種の細胞選択的プロモーターを用いた。これら各プロモーターによって DNA 相同組換え酵素である Cre リコンビナーゼの発現誘導させるウイルス液を作製し、BF 雄成鳥の Area X 内に注入した。その結果、歌神経核 Area X 内において観察された Cre+細胞が、各プロモーターごとに細胞サイズ及び、細胞密度が異なることを確認した[**図 3B**]。

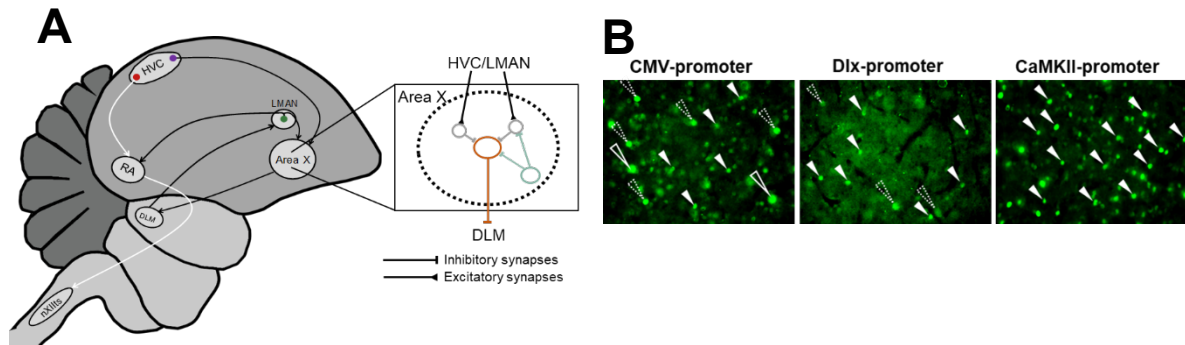


図 3 (A) ソングバード脳内の歌神経回路、及び大脳基底核歌神経核 Area X 内の構成細胞タイプ、**(B)** 歌神経核 Area X 内の AAV9-CMV, DLX, CaMKII プロモーターによる Cre タンパク質発現

次に Cre-Flex システムによりジフテリア毒素 A(dtA)を CMV, DLX, CaMKII プロモーターにより選択的に発現させ、各々の発現細胞においてアポトーシス誘導を Area X 歌神経内で行った。その結果、ウイルス液中注入後 2 週間目までに、Area X において特異的な細胞除去が起こっていることを確認した[**図 4**]。

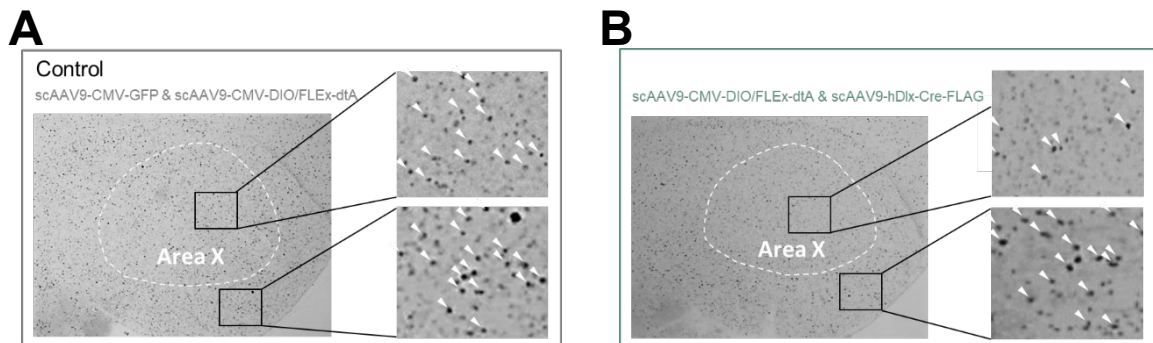


図 4 Cre-Flex システムと細胞タイプ特異的プロモーターを組み合わせた選択的細胞除去の実際。GABA 作動性神経細胞(GAD2+)の染色像。**(A)** コントロールインジェクション：AAV9-CMV-GFP+CMV-Flex-dtA **(B)** GABA 作動性神経細胞の選択的除去：AAV9-CMV-Cre+Dlx-Flex-dtA.

大脳基底核 Area X 歌神経核内において、この Cre-Flex システムと細胞タイプ特異的プロモーターを組み合わせた選択的細胞除去を実施し、ウイルス液注入後の歌パターン変化を検証した。この選択的細胞除去実験においては、実験(1)において作出した音素繰り返し構造をもつ多い個体を用いた。注入後から 1 週間においては、Cre リコンビナーゼの発現、及び dtA の誘導が十分でないためにアポトーシス誘導がまだ十分に起こっていないと考えられ、実際明らかな歌構造変化も観察されなかった。しかし、その後、Dlx プロモーターによる GABA 作動性神経細胞選択的除去を行った個体においては、ウイルス液注入後 2~3 週間後において、音素繰り返し構造部のみ更なる繰り返し数の増大が誘導された。この異常繰り返し増大は注入後 1~2 カ月まで続いた[**図 5A**]。また、この間において、生成される構成音素群の音響特性には大きな変化は観察されなかった。これに対して、CMV プロモーター、CaMKII プロモーターを用いた Area X 内構成細胞の選択的除去実験では、**図 3B** に示したように Dlx プロモーターによる細胞除去よりも、さらに多くの数の細胞が除去されることが想定されたにも関わらず、顕著な歌構造変化は観察されなかった[**図 5B**]。

これらの結果は、大脳基底核 Area X を構成する細胞数の単なる現象ではなく、GABA 作動性神

[ここに入力]

経細胞選択的な現象によって、時系列行動の繰り返し異常増加が誘引されることを示唆する。また、この音素繰り返し異常増加は、歌構造のランダムな場所で起こるのではなく、もともとから繰り返し構造が存在する箇所でも起こり、音素音響特性には影響を与えなかった。このことは、大脳基底核内の興奮・抑制性バランス異常が、運動時系列制御という特定行動パラメータ制御に選択的に影響を与えることを強く示唆する。現在、幼鳥個体にも同様の実験を施行しており、発声学習途中における音素繰り返し頻度生成への影響を検証中である。

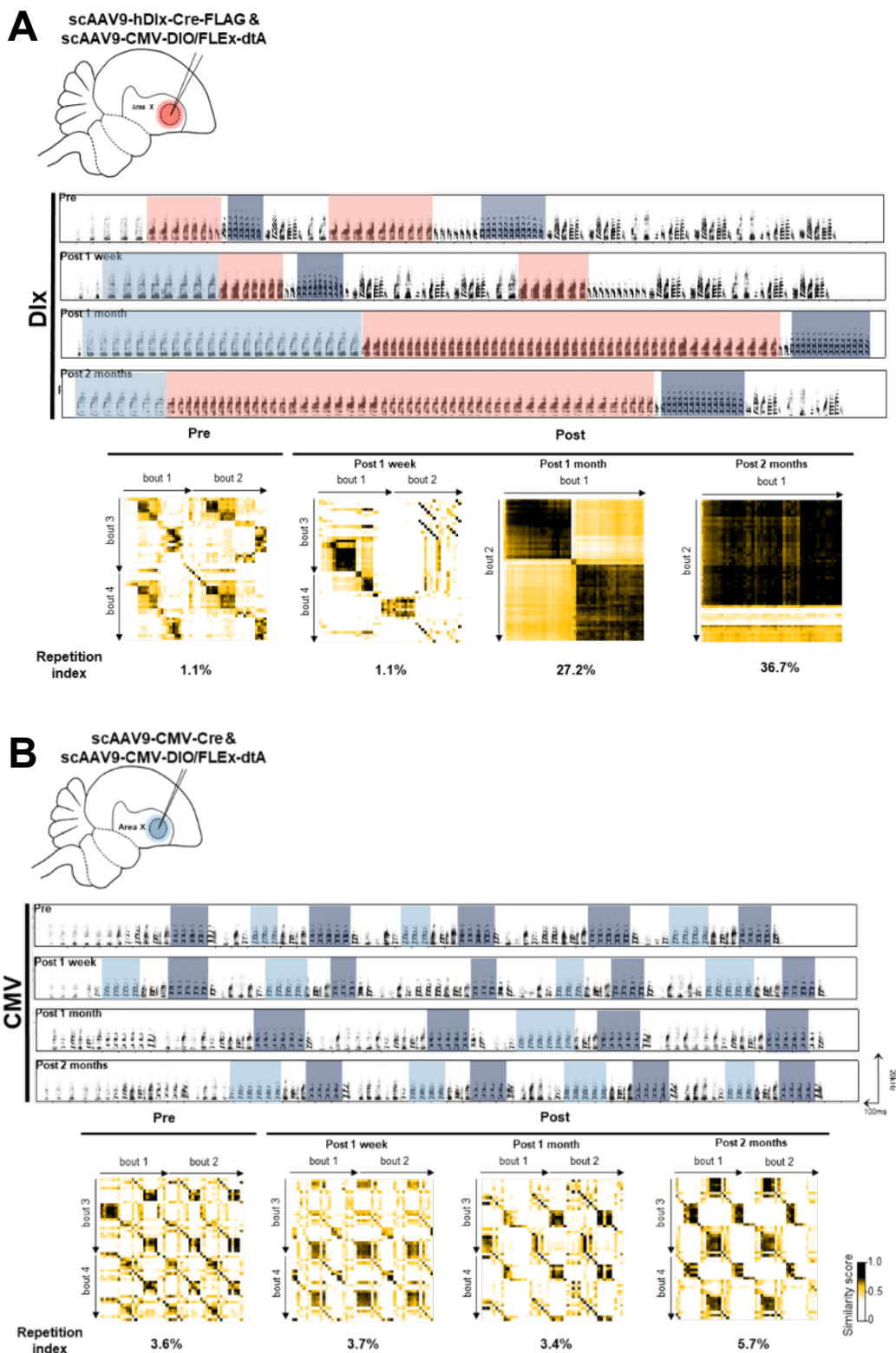


図 5 Cre-Flex システムと細胞タイプ特異的プロモーターを組み合わせた選択的細胞除去後の歌パターンの変化。(A) Dlx プロモーターによる GABA 作動性神経細胞選択的除去後の歌パターン変化、(B) CMV プロモーターによる汎細胞選択的除去後の歌パターン変化。(各上段) 音声スペクトログラム(Pre: ウイルス注入前、Post 1 week, 1 month, 2 month)。(各下段) ウイルス注入後の歌時系列構造変化 (音素繰り返し構造を黒色四角として視覚化している)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hayase Shin, Wang Hongdi, Ohgushi Eri, Kobayashi Masahiko, Mori Chihiro, Horita Haruhito, Mineta Katsuhiko, Liu Wan-chun, Wada Kazuhiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Vocal practice regulates singing activity-dependent genes underlying age-independent vocal learning in songbirds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2006537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pbio.2006537	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 該当する
1. 著者名 Asogwa Norman C., Mori Chihiro, Sanchez-Valpuesta Miguel, Hayase Shin, Wada Kazuhiro	4. 巻 526
2. 論文標題 Inter- and intra-specific differences in muscarinic acetylcholine receptor expression in the neural pathways for vocal learning in songbirds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2856 ~ 2869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/cne.24532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayase Shin, Wada Kazuhiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Singing activity-driven Arc expression associated with vocal acoustic plasticity in juvenile songbird	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1728 ~ 1742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/ejn.14057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Chihiro, Liu Wan-chun, Wada Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Recurrent development of song idiosyncrasy without auditory inputs in the canary, an open-ended vocal learner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-27046-4	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 該当する

1. 著者名 Yamaguchi S, Hayase S, Aoki N, Takehara A, Ishigohoka J, Matsushima T, Wada K, Homma KJ.	4. 巻 12
2. 論文標題 Sex Differences in Brain Thyroid Hormone Levels during Early Post-Hatching Development in Zebra Finch (<i>Taeniopygia guttata</i>)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0169643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0169643.	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 Merullo DP, Asogwa CN, Sanchez-Valpuesta M, Hayase S, Pattnaik BR, Wada K, Ritters LV.	4. 巻 Accepted
2. 論文標題 Neurotensin and neurotensin receptor 1 mRNA expression in song-control regions changes during development in male zebra finches.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Neurobiology	6. 最初と最後の頁 Accepted
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dneu.22589.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sanchez-Valpuesta Miguel, Suzuki Yumeno, Shibata Yukino, Toji Noriyuki, Ji Yu, Afrin Nasiba, Asogwa Chinweike Norman, Kojima Ippei, Mizuguchi Daisuke, Kojima Satoshi, Okanoya Kazuo, Okado Haruo, Kobayashi Kenta, Wada Kazuhiro	4. 巻 116
2. 論文標題 Corticobasal ganglia projecting neurons are required for juvenile vocal learning but not for adult vocal plasticity in songbirds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 22833 ~ 22843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913575116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Hongdi, Sawai Azusa, Toji Noriyuki, Sugioka Rintaro, Shibata Yukino, Suzuki Yuika, Ji Yu, Hayase Shin, Akama Satoru, Sese Jun, Wada Kazuhiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Transcriptional regulatory divergence underpinning species-specific learned vocalization in songbirds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000476	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 James Logan S., Sun Herie, Wada Kazuhiro, Sakata Jon T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Statistical learning for vocal sequence acquisition in a songbird	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58983-8	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 該当する

1. 著者名 Tramacere Antonella, Wada Kazuhiro, Okanoya Kazuo, Iriki Atsushi, Ferrari Pier F.	4. 巻 409
2. 論文標題 Auditory-Motor Matching in Vocal Recognition and Imitative Learning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 222 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.01.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Chinwake N. Asogwa, Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Inter- and intra-specific differences of muscarinic acetylcholine receptor expression in the neural pathways for vocal learning in songbirds
3. 学会等名 Japan Songbird Workshop 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hongdi Wang, Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Regulatory divergence of gene transcription for species-specific song production in songbirds
3. 学会等名 Japan Songbird Workshop 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類ソングバードの歌学習個体差をつくる生得的学習バイアス
3. 学会等名 日本進化学会 第20回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類ソングバードにおける自発的発声学習行動によって駆動される脳内遺伝子発現動態と神経回路成熟
3. 学会等名 日本解剖学会 第124回総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類ソングバードの種特異的発声パターン生成の神経分子基盤
3. 学会等名 日本進化学会 第19回東京大会 2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和多和宏
2. 発表標題 自発的行動に起因する発声学習表現型の個性創発の神経分子基盤
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (2017年度生命科学系学会合同年次大会) 2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asogwa Chinweike Norman, Chihiro Mori, Sanchez Miguel-Valpuesta, Shin Hayase and Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Species-specificity and Individual differences of muscarinic acetylcholine receptors expression in the song circuits
3. 学会等名 Society for Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yu Ji; Miguel Sanchez-Valpuesta; Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Regulation of repetitive syllable sequence by the excitatory and inhibitory balance in the basal ganglia song nucleus in songbirds
3. 学会等名 Society for Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和多和宏
2. 発表標題 学習によって獲得される種特異的な発声パターン生成に関わる遺伝子発現制御メカニズム
3. 学会等名 日本生化学会 第92回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shigeno S., Murakami Y., & Nomura T. 編著 Wada K, Chen C-C & Jarvis ED 担当	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 438
3. 書名 Brain Evolution by Design: From Neural Origin to Cognitive Architecture	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----