

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290006

研究課題名(和文) 霊長類聴覚視床 - 皮質間神経回路の全容解明と新奇概念の創出

研究課題名(英文) Marmoset auditory cortex and auditory thalamus

研究代表者

宋文杰 (SONG, WEN-JIE)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：90216573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マーモセットを霊長類のモデルに、聴覚皮質の領野区分と視床との神経結合を調べた。聴覚皮質に関して、コア-ベルト-パラベルトのモデルが提案されている。本研究では、まずコア領域の領野構成を確認できた。一方、ベルトにおいて、新奇な領野を二つ発見した。その一つはトノトピーを持ち、MAL野と名付けた。もう一つは明確なトノトピーを持たず、NT野と名付けた。NT野は周波数情報を統合し、時間情報の処理に関わる可能性が考えられる。一方、聴覚視床と聴覚皮質結合の解剖学的特徴の一部も明らかにした。本研究の結果は霊長類聴覚野モデルを修正する必要性を示している。

研究成果の概要(英文)：A prevailing model of the primate auditory cortex proposes a core-belt-parabelt structure. The lateral belt region in the model has three auditory areas, but this region has been mapped only at limited spatial resolution, and thus may contain more areas. Here we examined the auditory areas in the lateral belt region of the marmoset, using a high-resolution imaging technique. The three areas in the core region were readily identified from their tonotopy. Three known belt areas were also identified. Further, we found two novel areas; one was caudoventral to the core area R with a frequency gradient towards a ventrocaudal direction, and we named this area medial anteriolateral area (MAL); the other was a small area with no obvious tonotopy (NT), positioned lateral to MAL. Our results call for refinement of the current model of primate auditory cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：マーモセット聴覚皮質 光イメージング

1. 研究開始当初の背景

霊長類の聴覚皮質に関して、現在コアベルト-パラベルトのモデルが提案され、広く受け入れられている (Kaas & Hackett, 2000). マーモセットに関して、同様なモデルが提案されている (de la Mothe et al. 2006a, b; Paxinos et al. 2012). コア領域には、一次聴覚野の A1 と R 野と RT 野の存在が報告されており、そのいずれにも明確なトノトピーが見られる。ベルト領域には 8 個の領野の存在が報告され、そのいずれにもトノトピーが存在する (Petkov et al. 2006, 2008). コア領域に関しては、詳細に研究されてきたが (Aitkin et al. 1986; Wang et al. 1995; Lu et al. 2001; Wang and Kadia 2001; Nagarajan et al. 2002; Lu and Wang 2004; Philibert et al. 2005; Bendor and Wang 2005, 2008; Feng and Wang 2017), ベルト領域に関する研究は少ない (Kajiwara et al. 2005; Rauschecker et al. 1995; Bieser and Muller-Preuss 1996; Recanzone et al. 2000; Tian et al. 2001; Rauschecker and Tian 2004; Tian and Rauschecker 2004; Sweet et al. 2005; Petkov et al. 2006, 2008). また、これまでのベルト領域に関する研究は低い解像度でのマッピングしか行われていない。例えば、Rauschecker のグループがマカクザルを使って盛んに研究を行ってきたが、そのいずれも一本の線に沿ったマッピングしか行っていない (Rauschecker et al. 1995; Tian et al. 2001; Rauschecker and Tian 2004; Tian and Rauschecker 2004). また、Petkov らが fMRI の研究を行って、Kaas & Hackett (2000) のモデルを支持する結果を報告しているが、fMRI の解像度は高いものではない。従って、ベルト領域の領野構成に関しては果たして現在のモデルが正しいのか、高い解像度で検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、高い時間・空間分解能を有する光イメージング法を用いて、マーモセットの外側ベルト領域を調べ、その領野構成を明らかにすることを第一の目的とした。また、同定したコア領域やベルト領域の領野に神経トレーサを用いて、視床皮質間の結合様式を明らかにする。

3. 研究の方法

3.1. 動物・手術 実験には 20 - 22 ヶ月令のマーモセットを 3 頭用いた。マーモセットを用いたのは、そのコア領域の大部分と外側ベルト領域の全てが上側頭回にあって (de la Mothe et al. 2006a, b), イメージングに適しているためである。外耳道、鼓膜に異常のないことを確認した後、ケタミンとキシラジンの筋肉内注射による全身麻酔下で、頭蓋骨に頭部固定用の治具を取り付けた。左聴覚野を覆う頭蓋骨を除去し、外側溝、上側頭回、および上側頭溝を露出させた。血管

系の損傷を極力避けながら同部の硬膜を開き、聴覚野を露出した。聴覚野を速応答性の膜電位感受性色素 RH795 に約 120 分間さらして、組織を染色した。実験中、保温パッドを用いて、直腸温を 37 度前後に維持した。

3.2. 光計測 CMOS イメージングシステム (100 × 100 pixels; MiCAM Ultima, BrainVision) を用いて、聴覚応答に伴う蛍光変化を 0.5 kHz のサンプリングレートで検出した。計測は、心電の R 波をトリガーにして開始させた (Song et al., 2006)。

3.3. 聴覚刺激 実験はすべて防音室で行った。聴覚刺激には 60 dB SPL の多数の純音 (持続時間: 50 ms, 10 ms onset and offset cosine ramps, 30 ms plateau) をシーケンスとして使用し、両耳に提示した。順応を避けるために、シーケンスにおける純音の周波数間隔を 1 オクターブ以上にした。刺激に対する応答は、すべて単一試行で記録し、50-80 試行記録した。

3.4. データ解析 心拍の揺らぎにより、純音のシーケンスに対する F/F に、強くゆっくりと変化する成分が見られた。それを除去するために、その微分信号を求めた ( $(F/F)'$ ) (Nishimura & Song, 2014)。50-80 の試行 (記録) があるため、各ピクセルの各時刻に関して、t-score を計算し、統計的に有意な ( $F/F$ ) 信号 ( $p < 0.01$  または  $p < 0.001$ ) を画像化した。

4. 研究成果

図 1a1 にイメージングを行った部位を示している。外側溝 (LS) と上側頭溝 (STS) の間の上側頭回 (STG) 部位から記録を行った。現在のマーモセット聴覚野のモデルでは、図 1a2 に示している領野構成となっている (de la Mothe et al. 2006a, b)。まず、コア領

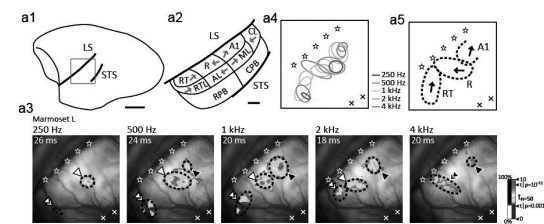


図 1 コア領域の全領野の同定  
a1 マーモセット脳の左半球側面を表す模式図。四角の部分はイメージング部位を示している。a2 マーモセット上側頭回にある聴覚領野のモデル。a3 マーモセット L から得られた記録。a4 a3 の活動部位輪郭の重ね書き。a5 a4 から同定した A1, R と RT 野。それぞれのトノトピーは従来の報告と一致する。スケールバー: a2 = a3 = 1 mm, a1 = 5 mm。

域にある領野の同定を試みた。そのために、A1 野と R 野の境界は低周波の音で定義できるため、低周波に対する応答を調べた。マーモセット L から得られた結果を図 1 a3 に示した。1kHz などの純音に対して、3 ヶ所に反応が見られた。それぞれの反応部位を楕円で近似し、

重ね書きしたのは図 1a4 である。そこから、3つの周波数勾配と、2つの周波数勾配反転部位が確認でき、従来のモデルと比較すると、コア領域の全領野、即ち、A1, R, RT を同定できる(図 1a5)。特に A1 と R の周波数勾配の方向はマーモセットとマカクザルの両方に一致する。

一方、ベルト領域はコアに比べて、純音によって駆動されにくいと報告されている(Rauschecker et al. 1995; Petkov et al. 2006)。ベルトにある領野を可視化するために、反応の有意水準を図 1 の 0.001 から 0.01 に変えた。その結果、図 2 の矢じりに示されているような応答が見られた。それらの応答の輪郭を重ね書きすると、2つの周波数勾配

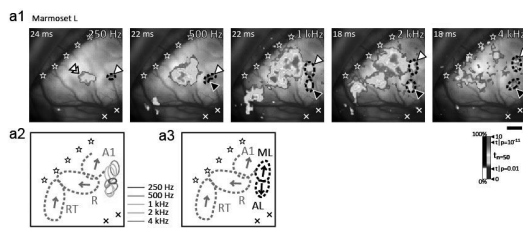


図 2 外側ベルト領域の領野の同定  
a1 マーモセット L から得られた純音に対する応答。図 1 に比べ、応答の有意水準を 0.001 から 0.01 に変えた。矢じりで示すベルト領域の応答を新たに確認できた。a2 a1 の活動部位輪郭の重ね書き。a3 a2 から同定した ML 野と AL 野。それぞれのトノトピーは従来の報告と一致する。スケールバー = 1 mm。

と 1 つの勾配反転が見られ、コアの領野との位置関係も鑑みると、ベルト領域の ML 野と AL 野として、同定できる(図 2a3)。

高い周波数に対する応答を調べたところ、予期しないことに、R 野と AL 野の間に、トノトピーを示す領野とトノトピーを示さない領野を新たに同定できた(図 3)。

図 3a1 に示しているように、高周波の純音に対して、上側頭回の中央部分に活動する部

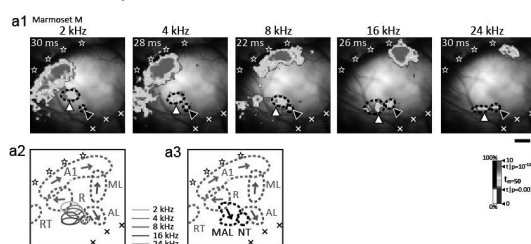


図 3 外側ベルト領域の新奇領野の同定  
a1 マーモセット M から得られた、高周波純音に対する応答。矢じりで示すベルト領域の応答を新たに確認できた。a2 a1 の活動部位輪郭の重ね書き。同一動物から同定した他の領野も点線で示した。a3 a2 から同定した MAL 野と NT 野。スケールバー = 1 mm。

位が 2ヶ所認められた(矢じり)。白の矢じりで示している部位は周波数に応じて位置がシフトし、トノトピーを示した。この部位

をその位置から medial anteriolateral area (MAL) と名付けた。一方、黒の矢じりが示している活動部位は周波数に応じて変化することはなかったため、non-tonotopic area (NT) と名付けた。MAL 野と NT 野のいずれも広い周波数範囲(1-24 kHz)の純音に反応した。

同定した皮質領域に一次野に、逆行性神経トレーサである Alexa-CTB555 と Alexa-CTB488 を注入した結果、内側膝状体腹側核内にラベルが見られ、特徴的な帯状の分布を示した。しかし、イメージング後に注入を行うため、動物へのストレスが強く、サバイバルが困難なケースが多かった。

本研究では、電位感受性色素を用いた光イメージング法を初めて霊長類の聴覚皮質に適用し、領野の同定を行った。その結果、ベルト領域に MAL 野と NT 野を新たに見出した。これらの領野の発見は、皮質活動を時間・空間において、高い分解能で解析して初めて可能となった。

現在の霊長類聴覚野モデルでは、ベルト領域のすべての領野にトノトピーがあるとされている(図 1a2 参照)。本研究の結果は、新たなトノトピーを持つ領野 MAL を加えるのみならず、ベルト領域においてトノトピーを持たない領野として初めて NT 野を提示した。コア領域の機能については、研究が進んでいるが(Wang et al. 1995; Bendor and Wang 2005, 2008; Feng and Wang 2017)、ベルト領域の機能は不明なままである。NT 野は広い範囲の周波数に反応し、トノトピーを示さないことから、その機能は周波数統合を行い、時間情報の処理に関わると推測することができる。その証明は今後の研究を待たねばならない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Wu MK, Takemoto M, Taniguchi M, Takumi T, Okazaki T, Song W-J. Regulation of membrane KCNQ1/KCNE1 channel density by sphingomyelin synthase 1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 査読有, 311(1), 2016, C15-23. doi: 10.1152/ajpcell.00272.2015.

Nishimura M, Sawatari H, Takemoto M, Song W-J. Identification of the somatosensory parietal ventral area and overlap of the somatosensory and auditory cortices in mice. *Neurosci Res*, 査読有, 99, 2015, 55-61. doi: 10.1016/j.neures.2015.06.001.

Nishimura M, Song W-J. Greenwood frequency-position relationship in the primary auditory cortex in guinea

pigs. *NeuroImage*, 査読有, 89, 2014, 181-191.

doi:10.1016/j.neuroimage.2013.12.014

Takemoto M, Hasegawa K, Nishimura M, Song W-J. The insular auditory field receives input from the lemniscal subdivision of the auditory thalamus in mice. *J Comp Neurol*, 査読有, 522(6), 2014, 1373-1389.

DOI:10.1002/cne.23491

[学会発表](計 19件)

Masataka Nishimura, Makoto Takemoto, Wen-Jie Song, Optical imaging-based parcellation of the marmoset auditory cortex. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016年07月20日~2016年07月22日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Huan Luo, Kayoko Hasegawa, Wen-Jie Song, Morphological and electrophysiological characteristics of a subgroup of layer 2 neurons in mouse temporal cortex. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016年07月20日~2016年07月22日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Meng Sun, Makoto Takemoto, Wen-Jie Song, Patchy organization of thalamocortical axons in layer II of the mouse auditory cortex. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016年07月20日~2016年07月22日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Meikui Wu, Makoto Takemoto, Makoto Taniguchi, Toru Takumi, Toshiro Okazaki, Wen-Jie Song, Sphingomyelin synthase 1 modulates KCNQ1/KCNE1 channel surface expression. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016年07月20日~2016年07月22日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Chi Wang, Masataka Nishimura, Wen-Jie Song, Guinea pigs can learn to change behavioral response latency to report their sensation difference to three different sounds. The 3rd annual meeting of the society for bioacoustics, 2016年12月10日~2016年12月10日, 伊良湖シーパーク&スパ(愛知県・田原市).

Masataka Nishimura, Wen-Jie Song, Impacts of Millisecond-order Onset Timing Difference of High Frequency Component in Spectrally Complex Sounds on Cortical Activity and Sensation. ARO 40th annual midwinter meeting, 2017年02月11日~2017年02月15日, Baltimore(米国).

Masataka Nishimura, Yuta Shiromi, Wen-Jie Song. Mating related interactive vocal communication with sub-centisecond precision in guinea pigs. 39th Annual Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, 2016年02月20日~2016年02月24日, San Diego(米国).

Makoto Takemoto, Wen-Jie Song, Anatomical study on thalamocortical and corticocortical connections of the mouse auditory insula, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015年07月28日~2015年07月31日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

Huan Luo, Kayoko Hasegawa, Wen-Jie Song, Characterization of a group of neurons with specific location in layer 2 of mouse temporal cortex, The 2nd Annual Meeting of the Society for Bioacoustics, 2015年12月12日~2015年12月13日, 九州大学(福岡県・福岡市).

Masataka Nishimura and Wen-Jie Song, A binaural compensatory mechanism in the auditory system: enhanced cortical response to a sound to the ipsilateral ear in a stream of binaural sounds, The 2nd Annual Meeting of the Society for Bioacoustics, 2015年12月12日~2015年12月13日, 九州大学(福岡県・福岡市).

Meikui Wu, Makoto Takemoto, Makoto Taniguchi, Toru Takumi, Toshiro Okazaki, Wen-Jie Song, Regulation of Membrane KCNQ1/KCNE1 Channel Density by Sphingomyelin Synthase 1, The 2nd Annual Meeting of the Society for Bioacoustics, 2015年12月12日~2015年12月13日, 九州大学(福岡県・福岡市).

Takemoto M, Hasegawa K, Song WJ, Anatomical study on neural circuits of the mouse insular auditory field. The

92th annual meeting of the physiological society of Japan, 2015年03月21日~2015年03月23日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

竹本誠、宋文杰, マウス島皮質聴覚領域の視床-皮質間および皮質-皮質間神経連絡の解析, 第38回日本神経科学大会, 2015年07月28日~2015年07月31日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

Wen-Jie Song, Masataka Nishimura, Greenwood frequency-position relationship as revealed by optical imaging in guinea pig primary auditory cortex. International conference on auditory cortex, 2014年09月13日~2014年09月17日, Magdeburg(Germany).

Wu MK, Takemoto M, Okazaki T, Song W-J. Regulation of KCNQ1/KCNE1 Channels by Sphingomyelin Synthase 1. Inner ear biology workshop. 2014年11月01日~2014年11月04日, 京都国際会館(京都府・京都市).

Wen-Jie Song, Functional organization of the auditory cortex revealed by application of in vivo voltage-sensitive dye imaging. 第91回日本生理学会大会, 2014年03月16日~2014年03月18日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市).

Huan Luo, Kayoko Hasegawa, Wen-Jie Song, Characterization and synaptic connections of a new class of neurons in layer II of the cerebral cortex. 第91回日本生理学会大会, 2014年03月16日~2014年03月18日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市).

Chi Wang, Makoto Takemoto, Wen-Jie Song, Cortico-cortical connections of the insular auditory field in mice. 第91回日本生理学会大会, 2014年03月16日~2014年03月18日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市).

Wen-Jie Song, Masataka Nishimura, Quantitative frequency-position relationship in the primary auditory cortex in guinea pigs. 第91回日本生理学会大会, 2014年03月16日~2014年03月18日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市).

宋文杰(訳) MEDSi社、カンデル神経科学(Principles of Neural Science, Fifth Edition) 第31章 聴覚中枢神経系、2014, 672-700.

宋文杰、脳科学辞典、周波数地図、<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E5%91%A8%E6%B3%A2%E6%95%B0%E5%9C%B0%E5%9B%B3>.

宋文杰、脳科学辞典、聴覚野、<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E8%81%B4%E8%A6%9A%E9%87%8E>.

#### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

#### [その他]

ホームページ等  
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/physiol2/physiol2.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宋文杰 (SONG, Wen-Jie)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 90216573

##### (2) 研究分担者

竹本誠 (TAKEMOTO, Makoto)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 20543408

[図書](計3件)