

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00381

研究課題名(和文) 感性における先天的な価値判断基準を改変するための脳内抑制システムの解析

研究課題名(英文) Analyzing the brain's inhibitory system to modify the innate value criteria of KANSEI

研究代表者

松川 睦 (MATSUKAWA, Mutsumi)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：90318436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳内における抑制システムを含む調節系としては拡散型で、広範囲の脳領域をまとめて調節する神経回路もしくは局所的な抑制系神経回路の大きく2種類あることが知られている。そこで実験動物に先天的にストレス反応を惹き起こす捕食者の匂いを用いて、まず広範囲に影響を及ぼすアミン系の変動を調査した結果、脳内ノルアドレナリン濃度の変化が確認され、海馬におけるノルアドレナリン濃度の増加がストレス反応の発現とその調節に重要であることが示唆された。続いて局所的な抑制システムの関与を検討するため、脳内で最初に匂い情報を受け取る嗅球で遺伝子発現の解析を行ったが、選択的な抑制機構は嗅球には見られないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that there are two distinct mechanisms in the regulation system in the brain. One is the diffusion system, which can regulate wide brain regions, and the other is the local and restricted inhibitory networks. We used the predator odor to induce innate stress responses in experimental animals. We demonstrated that the concentration of noradrenaline, which is one of the monoamines known as diffusion system, was increased in the hippocampus, and was involved in inducing the stress responses. On the other hand, we concluded that there were no selective inhibitory local networks to modify the innate stress responses in the olfactory bulb, which is the first region to receive the olfactory information in the brain, with the results of gene expression analyses.

研究分野：感性脳科学

キーワード：感性形成機構 個体差形成 ストレス反応 ノルアドレナリン 局所抑制回路

1. 研究開始当初の背景

ラットやマウスなどのげっ歯類に捕食者である猫やフェレットや狐などの匂いを嗅がせると恐怖・ストレス反応が惹起されることが報告されている (Morrow et al., Brain Res., 2000; Masini et al., Physiol. Behav., 2006; Fendt and Endres, Neurosci. Biobehav. Rev., 2008)。一方で、動物においても落ち着く・リラックス効果のある匂い物質 (緑の匂いや柑橘臭、ラベンダー臭など) がある事も報告されている (Brauchli et al., Chem. Senses, 1995; Umezu, Pharmacol. Biochem. Behav., 1999; Bradley et al., J. Ethnopharmacol., 2007)。

我々はこれまでにバラ臭が先天的にストレスを緩和する効果を持ち、捕食者臭とバラ臭を同時に嗅がせることで、捕食者臭によって惹起される恐怖・ストレス反応が選択的に抑制されることを示してきた (Matsukawa et al., Brain Res. 1381: 117-123, 2011)。また、バラ臭以外の匂い物質についても研究を行っており、ヒノキ臭も先天的なストレス緩和効果をしめすものの、バラ臭とヒノキ臭とでは、ストレス緩和に関わる神経回路が異なっている可能性を示した (Murakami et al., NeuroReport 23: 1071-1076, 2012)。これらの結果から、各種匂い物質を少なくとも3群 (合成キツネ臭やネコ臭など実験動物に対して先天的にストレス反応を生じる匂い、

バラ臭や木の香りなど先天的にストレスを緩和することができる匂い、キャラウェイ臭や人工臭など先天的には何ら影響を示さない匂い) に分類できることを示している。さらにこの群のように、先天的には何ら影響を及ぼさないような匂い (例えば人工臭) であっても授乳期に生育環境臭とすることで、成体の時点でストレス緩和作用を示すようになること、つまり生来の価値判断基準を生後の匂い経験によって変化させることが可能であることを明らかにし、その際の作用機序がバラ臭と同様にストレス関連神経活動の選択的かつ直接的な抑制によるものである可能性を示してきた (日本解剖学会, 2014; 日本感性工学会, 2014)。

これらの結果は、動物は匂いに関して先天的に何らかの価値判断基準を保有しており、それが生後の体験や経験などによって影響を受け、修正や改変、また新規の物質に対する反応の追加などが起こることで、感性における個体差が生じてくる可能性が高いことを示唆していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、感性における個体差の形成に及ぼす経験の影響について調べるために、経験が先天的な価値判断基準の修正・改変を行う際に参与していると考えられる脳内の選択的な抑制システムについて調査すること

を目的とし、げっ歯類において見られる捕食者臭 (キツネ臭や猫臭) によって惹起される恐怖・ストレス反応を指標として以下の研究を執り行った。

脳内における抑制系を含む調節系としては、大きく2種類、つまりアミン系およびアセチルコリンなど拡散型の広範囲を制御する回路およびアミノ酪酸 (GABA) システムを主体とする局所的な回路が知られているが、このうち、広範囲に影響を及ぼすアミン系、特にカテコールアミンの一種であるノルアドレナリンが、実験動物 (ネズミ) に先天的に恐怖反応を惹き起こす捕食者の匂い (キツネ臭) を嗅がせた際に、前頭葉および海馬において有意に増加することが最近になって (PLoS One (2014); Brain Research (2015)) 報告されてきている。そこで、何ら先天的な反応を示さない人工臭を若齢期に経験させることで、成獣における捕食者臭誘発ストレス反応が変化する際に見られる、脳内の分界条床核における活性化神経細胞数の変化、およびその際の前頭葉および海馬におけるノルアドレナリン濃度の変化を調査した。

一方で、脳内の局所的な神経抑制機構としてはアミノ酪酸 (GABA) を用いた抑制系が一般的であるが、この系には GABA と共に共存する神経伝達物質の違い (例えばパルプアルブミン、ソマトスタチン、血管作用性小腸ポリペプチド、カルピンディン、カルレチニン、コレシストキニンなど) による抑制機構の差異が知られており、より詳細に解析する必要があるため、匂い情報を最初に受け取る脳部位である嗅球を対象として、先天的な反応を抑制することで生じる変化を遺伝子発現の解析という手法を用いて比較・検討した。

3. 研究の方法

本研究における動物実験は全て、動物の愛護および管理に関する法律などを遵守し、「日本大学動物実験運営内規」に則り、「日本大学動物実験マニュアル」に則り遂行した。実験動物としては遺伝的に同一性が保たれている近交系のマウス (C57BL/6J) を用いた。捕食者臭としては、マウスに対してストレス反応を誘発することが知られているキツネ臭 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) を用いた。

また実験動物がストレス様反応を生じたかどうかの判定は、ストレスの指標として知られているホルモン濃度を計測することで行うこととし、体幹部より採取した血清中に含まれる副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 濃度を測定した。

実験 1

何ら先天的な反応を示さない匂い物質としては、人工臭として新聞紙臭を用い、この

人工臭環境下で飼育するために、新聞紙は切断した上で滅菌処理を行った。比較対照群として、通常の床敷きで飼育する群を用いた。それぞれの生育環境臭を出生時から嗅がせるため、妊娠動物を導入し、出生の1週間前よりそれぞれの匂い環境で生育し、出生後の授乳期間(3週間)同じ匂い環境を維持した。離乳時に床敷きのないケージに移動させ、さらに3週間、何の匂いもないケージで飼育し、生後6週の時点で実験を行った。

実験動物(マウス)に捕食動物の匂いと新聞紙臭をそれぞれ単独で、もしくは捕食者臭と新聞紙臭との組合せで嗅がせ、その後、脳内の前頭葉および海馬を摘出し、それぞれの脳部位におけるノルアドレナリン濃度を計測した。

実験2

先天的にストレス反応を緩和する効果があり、かつそれが脳内の選択的な抑制系による可能性が高い匂い物質としてバラ臭を用い、捕食者臭単独で、もしくは捕食者臭とバラ臭を同時に嗅がせ、その後、脳内の嗅球を摘出し、嗅球における匂い刺激後の遺伝子発現の変化(発現増加もしくは発現抑制)を次世代シーケンス法にて解析した。

また、嗅球内における匂い刺激後の活性化神経細胞数の変化を調査するため、最初期遺伝子(c-fos)に対する選択的な抗体を用いた免疫組織化学的手法により、活性化した神経細胞を可視化して、その数を計数し、比較した。

4. 研究成果

まず、TMTによるストレス反応とそれに対する新聞紙臭の影響を血中ACTH濃度で確認したところ、新聞紙臭で生育した動物群(グレーバーで示す)のみ、TMTと新聞紙臭を同時に嗅がせること(TN群)による有意なストレス反応の緩和が生じていることが示された(図1)。

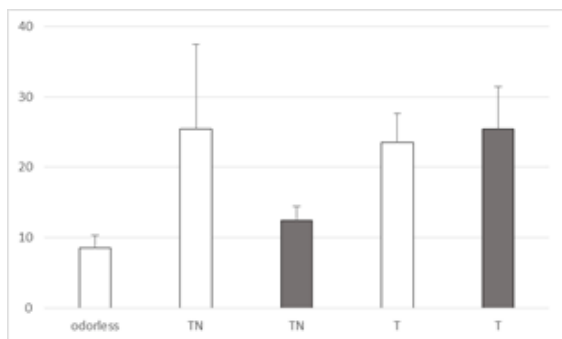


図1

そこで、これらのマウス脳内の前頭葉および海馬を摘出し、それぞれの脳部位におけるノルアドレナリン濃度を計測した。その結果、前頭葉(図2上のグラフ)および海馬(図2下のグラフ)ともにTMTと新聞紙臭を同時に

嗅がせること(TN群)によって対照群と同程度までノルアドレナリン濃度の上昇が抑制されたが、前頭葉では生育環境臭の違い(バーの色の違い)による有意な変化は見られなかった。また、ストレス反応の変化と合致するような変化は海馬でのみ関連性が認められた。これらの結果から、海馬におけるノルアドレナリンの増加が生命の安全を脅かされた際のストレス反応の発現とその調節に重要である可能性が高いことが示唆された。つまり、経験によるストレス反応の改変には、海馬内のノルアドレナリン濃度の変化が関与している可能性がある事が推察された。

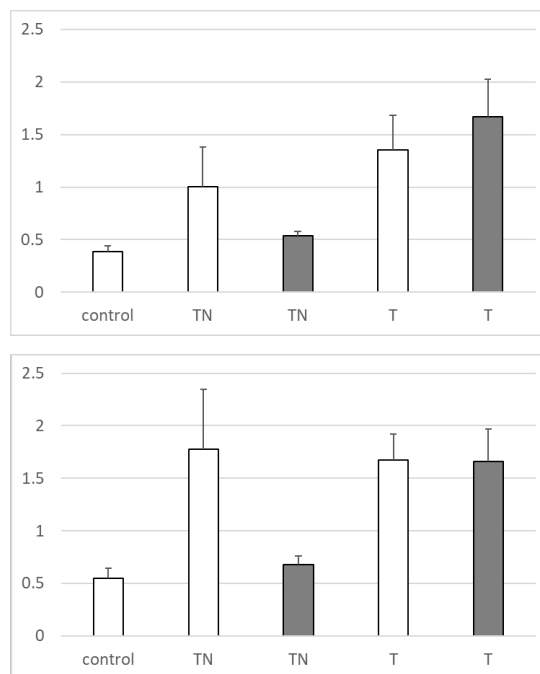


図2

次に、経験に伴う先天的な反応を改変する局所抑制系として、脳内におけるアミノ酪酸(GABA)を代表とする選択的かつ直接的な抑制システムについて調査するために、脳内で匂い情報を最初に受け取る部位である嗅球を対象として、先天的な反応を抑制することで生じる変化に伴って変動する(発現増加もしくは発現抑制する)遺伝子発現の変化を解析するために次世代シーケンス法を用いて比較・検討した。

その結果、対照群と捕食者臭を単独で嗅がせた動物群および捕食者臭とバラ臭の混合臭を嗅がせた動物群の3群間の比較でいずれかの群に有意差が認められた遺伝子のヒートマップが図3である。さらにこれらの遺伝子のパスウェイ解析を行ったものが図4である。49の遺伝子にのみ若干の優位差がみられるものの、一般的に神経系で発現されている遺伝子群、特にGABAを含む神経系の抑制に関与するものについては、それぞれのグループ間でほぼ変化がみられないという結果が得られた。

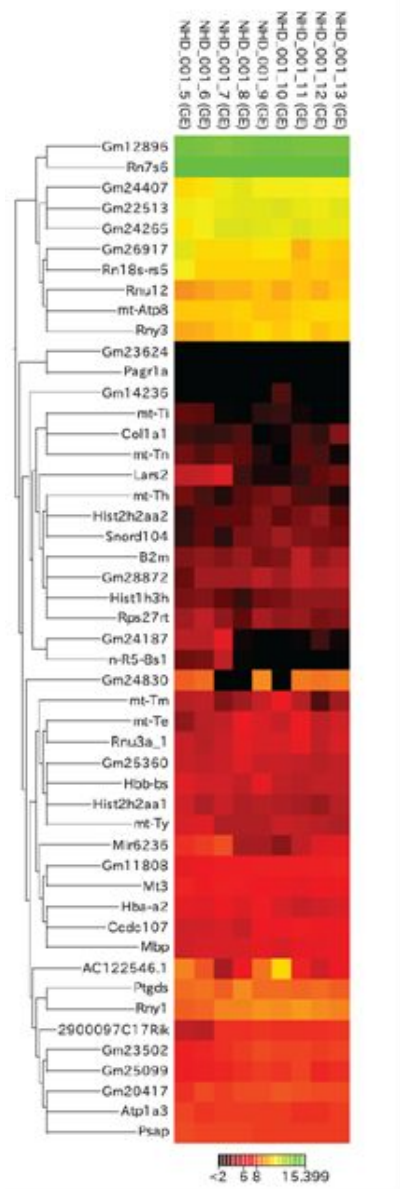


図 3

Pathway name	Enrichment Score	Enrichment Total	Enrichment Z-score	Enrichment P-value	Reactions Total	Reactions Enriched	Reactions Depleted	Reactions Ratio
Defective CD206 causes pulmonary surfactant metabolism dysfunction 5 (SMC4F5)	2	9	0.005	2.9E-4	7.23E-2	1	1	0
Defective CD206 causes pulmonary surfactant metabolism dysfunction 6 (SMC4F6)	2	9	0.005	2.9E-4	7.23E-2	1	1	0
Defective MCF3 causes pulmonary surfactant metabolism dysfunction type 3 (SMC3F3)	2	9	0.005	3.0E-4	7.23E-2	1	1	0
Disease associated with surfactant metabolism	2	18	0.005	3.6E-3	3.75E-2	3	7	0.002
Rigid regulatory protein (RRP) family interactions	2	18	0.005	3.6E-3	3.75E-2	1	17	0.002
ABC transporter disorders	3	102	0.006	3.0E-3	1.8E-2	4	27	0.002
Regulation of TCR by intracellular signal	2	35	0.007	4.1E-3	2.8E-2	2	17	0.002
Toll Like Receptor TLR3:TLR3 Cascade	3	111	0.008	4.0E-3	1.8E-2	13	94	0.008
Toll Like Receptor 2 (TLR2) Cascade	3	111	0.008	4.0E-3	1.8E-2	13	94	0.008
Defective CD206 causes surfactant pulmonary fibrosis (SPF)	2	2	0	0.12E-2	1.8E-2	1	1	0
Toll Like Receptor 4 (TLR4) Cascade	3	143	0.011	6.0E-3	1.8E-2	17	104	0.008
Surfactant metabolism	2	92	0.004	1.1E-2	1.8E-2	7	26	0.003
Toll Like Receptors Cascade	3	192	0.014	1.6E-2	1.8E-2	26	163	0.016
Amplified Interferon	2	30	0.008	3.0E-2	1.8E-2	7	20	0.003
Disease of metabolism	3	217	0.017	2.6E-2	1.8E-2	4	66	0.008
Signaling by MET	2	37	0.007	3.0E-2	1.8E-2	4	10	0.008
Downregulation of SIRT6 signaling	3	13	0.005	3.0E-2	1.8E-2	2	8	0
RNA polymerase II transcription control genes	2	66	0.007	3.0E-2	1.8E-2	11	11	0.002
Not essential downregulation of HMC class I complex cell surface expression	2	11	0.005	3.0E-2	1.8E-2	0	8	0
PTEN Regulates PI3K and TSK Effectors, KCTD and DOCK1	3	11	0.005	3.0E-2	1.8E-2	1	8	0.002

図 4

また、嗅球における活性化神経細胞数の変化も、これらのグループ間で差が見られず、すべての個体が同じように活性化されており、遺伝子発現の変化に差が見られなかった結果を裏付けるものと考えられた (図 5)。

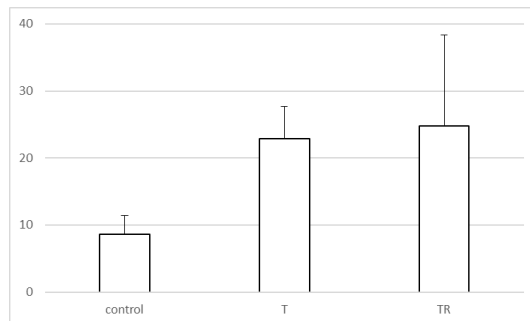


図 5

これらの結果から、嗅球のレベルにおいては、匂いによって惹起される反応を匂いによって抑制する際の選択的な制御機構は見られない可能性が高いことを示唆している。

以上の結果から、動物が生来持っている価値判断基準が生後の経験によって改変される際に脳内で関与する抑制システムのうち、広範囲に影響を及ぼす拡散系としては、ノルアドレナリンが特に海馬において変動することが重要である可能性が示唆されたが、局所的な選択的抑制回路は、少なくとも嗅球内には見られないことが明らかとなった。つまり、嗅球以外の嗅覚関連脳部位のいずれかに存在するものと考えられた。

これらの知見は経験による匂い物質に対する感受性の変化、つまりは感性における個体差の形成を明らかにするために重要であるだけでなく、ストレスを緩和する機序や、嗅覚情報処理過程の解明の礎となるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Matsukawa, M., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. (2016)

Habitat odor can alleviate innate stress responses in mice. 査読有

Brain Res. 1631: 46-52

DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.020

〔学会発表〕(計 3 件)

吉川雅朗, 松川 睦, 大島秀規, 今田正人, 相澤 信. (2018)

ALS モデルマウスを用いた感覚ニューロンの解析.

第 123 回 日本解剖学会総会・全国学術集会.

松川 睦, 今田正人, 相澤 信, 佐藤孝明. (2017)

天敵臭によって誘発されるストレス反応は生育環境臭によって緩和される.

第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会.

Matsukawa, M., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. (2016)
Predatory odor induced stress responses can be allayed by habitat odor.
17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016).

〔図書〕(計 1 件)

佐藤孝明, 松川 睦, 古殿雄一, 廣野順三, 江村 誠. (2016).
嗅覚を介するストレス緩和神経路と嗅覚代替センサの基盤技術.
外池光雄 編 香りと五感 香りで五感の機能と有用性を増進する
フレグランスジャーナル社, pp.164-182

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松川 睦 (MATSUKAWA, Mutsumi)
日本大学・医学部・助手
研究者番号：90318436