

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06760

研究課題名(和文) 新生仔期の刷り込み記憶が先天的忌避行動を抑制する神経回路の解析

研究課題名(英文) How does positive memory suppress innate avoidance behavior?

研究代表者

香取 将太 (Katori, Shota)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号：50562394

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)：生きていく上で意思決定から逃れることはできない。しかし、意思決定のメカニズムは不明な点が多い。本研究では、意思決定のメカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究では、授乳期の仔マウスを用いて匂い学習の実験系を構築した。通常、忌避臭に対して忌避行動を示すが、学習によって忌避行動を抑制し、接近行動を示すよう意思決定を切替させることができた。意思決定を切り替えた個体では、忌避行動に関連する脳領域の神経活動の抑制が見られた。さらに、親離れを後押しする現象についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

授乳期後期では母親の育仔放棄(あるいは隔離)がトリガーとなって、その時に嗅いだ匂いに対して接近行動を示すという非常に興味深い現象を本研究で見つけた。仔マウスは授乳期後期の時点で自発的に巣を出るという行動がしばしば見られるので、母親不在は報酬となり得るのかもしれない。そのような視点で本研究の結果を捉えると、上記の現象は親離れをサポートする性質の一端を示している可能性が高い。離乳は腸の発達に関連していることが報告されているが、親から精神的な自立、親離れのメカニズムについての研究は進んでいない。本研究の結果はそれに対して一石を投じることができたと思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to reveal the mechanism of decision-making. Here, I designed and constructed a new experimental system: odor learning system in mouse pups during the lactation period. Although unlearned pups avoided an aversive odor, learned pups switched the behavior from avoidance to approach for the odor. In the learned pups, neuronal firing of brain regions that are related to avoidance behavior and stress responses was suppressed for the exposure of the aversive odor. I also revealed a phenomenon that may support independence of pups from their dam.

研究分野：神経科学

キーワード：匂い学習 マウス 忌避行動 接近行動 ストレス抑制 親離れ

1. 研究開始当初の背景

人生は意思決定の連続である。しかし、意思決定のメカニズムは不明な点が多い。意思決定には、好き(快)か嫌い(不快)かが重要な要素となる。さらに、その好き嫌いが本能に基づくか、学習に基づくかという側面がある。意思決定のメカニズムを明らかにする上で、匂いを用いることには大きなメリットがある。匂いには好き嫌い(あるいは中立)があり、それは本能による場合も学習による場合もある。匂いは容易に混ぜることができるので、好きな匂いと嫌いな匂いを混ぜて選択させたり、本能的に嫌いな匂いと学習によって嫌いになった匂いを選択させたりする解析が可能となる。だが、複数の匂いを用いた実験は脳の神経活動が複雑でノイズが多くなり、脳の神経活動と出力の関係性を解析することは容易ではない。この関係性を明らかにするためには、よりシンプルな実験系の構築が必要であった。

2. 研究の目的

本研究ではシンプルな実験系を構築するために入力を1種類の匂いとし、好き嫌いの行動出力が変化する実験系の構築を目指した。この実験系が構築できれば、脳の神経活動と行動出力との関係性を解析する上で大きなメリットとなる。この実験系を用いて脳の神経活動を解析し、選択のメカニズムを神経回路レベルで明らかにすることを本プロジェクトの目的とした。

3. 研究の方法

[母体塗布条件付け] 匂い物質をオイルに染み込ませて調製し、それを母親に塗布するという方法で、条件付けを行った。オイルは植物性で無害であり、このオイルに対してマウスは忌避行動も接近行動も示さない。対照群は、オイルのみを母親に塗布した。

[匂い行動解析] 条件付け終了の翌日、滅菌洗浄したケージにマウスを入れて一定時間慣らした後、ケージの両端それぞれに匂い物質を染み込ませた濾紙とオイルのみを染み込ませた濾紙を置き、ケージの上部からビデオカメラで撮影した。マウスの重心をトレースし、その軌跡を解析した。

[ストレスホルモン解析] 行動解析の翌日、匂い物質を嗅がせ、その後断頭し、体躯から採血した。血漿中のコルチコステロンをELISAによって定量した。

[c-fos マッピング法] 神経活動に応じて *c-fos* の遺伝子発現が一時的に増加する性質を利用し、神経活動が亢進した脳領域を細胞レベルで解析する方法である。行動解析の翌日、匂い物質を嗅がせてから抜脳し凍結した。脳の新鮮凍結切片を作製し、*c-fos* アンチセンスプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

4. 研究成果

(1) 母体塗布条件付けで、忌避臭に対する忌避行動は接近行動へ切り替えられる。

酢酸イソアミル(IAA)あるいはオイルを用いて母体塗布条件付け(授乳期の母親マウスに出産後から連日塗布)を行った。オイル母体塗布条件付け群の子マウスは、IAA に対して忌避行動を示した(図1上)。一方、IAA 母体塗布条件付け群の子マウスは、IAA に対して接近行動を示した(図1下)。次に、この IAA 条件付けが刷込学習に相当するののかを確かめるために、条件付けの期間を変えて実験を行った。すると、IAA 条件付けは授乳期間(3週間)中で1週間程度行えば、条件付けが成立するが、条件付けを止めてから1週間後には接近行動は見られなかった。刷込学習は、幼若期に短期間で学習し、長期的にその記憶が持続する場合を指すので、本研究で対象とする学習は、刷込学習ではなかった。

IAA 条件付けが成立した個体について、IAA に対する脳の活動の変化を見るために *c-fos* マッピングで解析した。ストレス情報が集約する視床下部の室傍核において、IAA 条件付け群は IAA に対する神経活動の増加が抑制されていた。匂い物質は、鼻腔の嗅細胞(嗅神経)で受容された後、嗅球の神経細胞を介して脳の各領域に情報が伝えられる。IAA 条件付け群では、IAA に対する嗅球における神経活動の顕著な低下が見られた。IAA は IAA 条件付けの有無に関わらず、扁桃体中心核といった恐怖に関わるとされる脳領域での神経活動を引き起こさなかった。以上の結果から通常 IAA が忌避行動を引き起こす経路、IAA 条件付けによって IAA に対して接近行動を示すようになる経路は不明であった。

IAA は忌避行動との関連が脳の神経活動レベルでは不明であるので、条件付けに用いる匂い

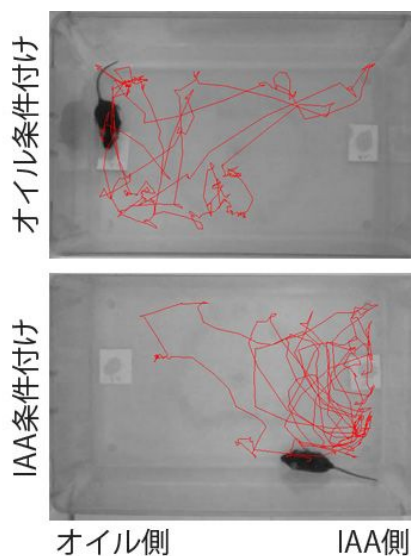


図1) 条件付け後の匂い行動実験
赤線は水平移動の軌跡を示す。

物質を 4-メチルチアゾール (4MT)に変更した。オイル条件付け群は、4MT に対して忌避行動を示し、扁桃体中心核や室傍核の神経活動が亢進した。一方、4MT 条件付け群は、4MT に対する忌避行動が接近行動へと切り替わった。また、扁桃体中心核や室傍核の神経活動が、4MT 条件付け群は、オイル条件付け群に比べ、有意に抑制されていた。また、ストレスの指標である血漿コルチコステロン濃度の増加が、有意に 4MT 条件付けによって抑制されていた。以上の結果から、仔マウスにおいて何らかの報酬が忌避臭と結びつく連合学習が成立し、その行動を切り替えている可能性が考えられた。

我々のグループは、忌避臭トリメチルチアゾリン(TMT)に結合する嗅覚受容体は olfr1019 であることを同定し、olfr1019 遺伝子の下流でチャネルロドプシン(ChR)を発現する olfr1019-ChR マウスを既に作製している(Saito et al., *Nature Communications*, 2017)。このマウスでは、光刺激によって olfr1019 を発現する嗅細胞を発火させることができ、すくみ行動を引き起こすことができる。Olfr1019-ChR マウスを光刺激で条件付けを行うことができれば、匂い物質を用いるよりも不要な感覚入力を抑制でき、神経回路の解析が容易になると考えられた。しかし、授乳期の仔マウスに光ファイバーを取り付け、光刺激を与え続ける実験系を構築することは難しかった。そこで、忌避臭の嗅覚受容体の遺伝子の下流で皮膚を透過しやすい波長によって光刺激可能なマウスの作製を CRISPR-Cas9 システムで試みたが、目的の個体は得られなかった。

(2) 母親不在時に嗅いだ匂いに対して接近行動を示す。

授乳期前期では、母親のケアと匂いを結びつける連合学習が成立することがラットの実験で報告されている。本研究で確立した実験系では、授乳期後期でも匂いの学習が可能であったことから、既に報告されている学習とは異なる学習である可能性があった。授乳期の報酬として最も有力なのが、母親の世話、母親の匂い、母乳の匂い、母親の体温など、母親に関連する感覚入力である。母親に関連する感覚入力が報酬であるか否かを確認するために、母親から隔離して 4MT を嗅がせる実験を行った。興味深いことに、隔離して嗅がせた場合でも 4MT に対して接近行動を示すことが明らかになった。それを裏付けるように、母親に 4MT を塗布したとき、母親は育児放棄していることが明らかになった。本プロジェクト開始初期から中立的な匂いによる母体塗布条件付けも行っていたが、条件付けは成立していなかった。その理由は長らく不明であったが、母親から隔離した時に匂いを嗅がせることで接近行動を示すことが明らかになった。以上の結果から、授乳期後期では母親の育児放棄(あるいは隔離)がトリガーとなって、その時に嗅いだ匂いに対して接近行動を示すという非常に興味深い現象を見つけた。仔マウスは授乳期後期を過ぎれば自活できるが、授乳期後期の時点で自発的に巣を出るといった行動がしばしば見られる。巣から出る行為は野生下ではリスクがあるが、外界に対する興味が高まってくる時期なので、母親から離れることや母親がいないことは報酬となり得るのかもしれない。そのような視点で本研究の結果を捉えると、上記の現象は親離れをサポートする性質の一端を示している可能性が高い。離乳、つまり母乳から通常食への変化は、腸内の免疫系の発達が関与していることが報告されているが、精神的な自立、親離れのメカニズムについての研究は進んでいない。本研究の結果はそれに対して一石を投じることができたと思われる。

(3) 4MT 条件付けは非嗅覚系の回路を抑制する。

匂い物質は、嗅神経 嗅球を介した嗅覚系のみで受容されると考えられがちであるが、そうではない。一部の匂いは、鼻腔に注射した三叉神経から延髄に至る経路(痛みの経路)でも受容される。チアゾール系の物質(TMT, 4MT が含まれる)は、嗅覚系だけでなく三叉神経でも受容されることが小早川らのグループによって報告されている。本研究でも 4MT が三叉神経脊髄路核を発火させること確認した。4MT 暴露は恐怖に関わる扁桃体中心核を発火させるが、これが嗅覚系からの入力によるものか確認するために、嗅球を除去したマウスまたは Cre-loxP システムにより嗅神経のみを特異的に除去したマウスを作製した。両者とも 4MT 暴露によって扁桃体中心核の発火が見られた。この結果から、嗅覚系以外、つまり三叉神経系を介して 4MT 暴露が扁桃体中心核の発火を引き起こした可能性が高い。また、4MT 条件付けが成立した個体の嗅球を除去した場合でも、4MT 暴露による扁桃体中心核の発火は抑制されていた。この結果は、4MT 条件付けにより、三叉神経から扁桃体中心核に至る経路を途中で抑制する回路が形成された可能性を示唆する。今後これらの経路について詳細に解析する予定である。また、4MT 条件付けされたマウスが 4MT に対して特異的に行動が変化するのかを明らかにするために、プロピオン酸(PPA)で行動実験を行った。オイル条件付け群は PPA に対して忌避行動を示したが、4MT 条件付け群は PPA に対して中立的な行動を示した。PPA は三叉神経系を発火させるという報告があるので、4MT 条件付けにより 4MT 以外の匂いの三叉神経由来の入力を抑制する学習が起きている可能性が高い。

5. まとめ

本研究で、単一の匂いを用いて「嫌い」を「好き」にさせる実験系を構築した。神経回路の解析は道半ばであるが、親離れの促進や三叉神経系の入力抑制といった非常に興味深い研究の入口に立つことができた。今後の研究の発展が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------