

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06938

研究課題名(和文) 快・不快の味覚反応と相関のある活動を示し、さらにその反応を誘導する神経機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the neural mechanisms that show activity correlated with pleasant and unpleasant taste responses and induce these responses

研究代表者

田中 大介 (Tanaka, Daisuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：90456921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：活動した神経細胞を特異的に蛍光タンパク質で標識する方法や、脳を透明にしてその蛍光を観察しやすくする方法を用いることで、快感や不快感と深く関連のある活動を示す神経細胞を、マウスの脳全域に亘って単細胞レベルの解像度で同定した。また、注射した化合物やLEDライトから出る光によって活動させる技術を用いてそれら細胞を人為的に活動させると、マウスにおける快感や不快感の指標となる行動の一部が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、一般に「心脳問題」や「意識のハードプロブレム」として知られている、「意識経験と神経機構の関係性の問題」の解明に寄与する可能性がある。また、快・不快の情動的意識経験(快・不快経験)は、近年増加傾向にある統合失調症やうつ病、麻薬中毒などの様々な精神疾患において異常を呈していることが知られている。本研究の成果は、それら意識経験の異常に対する治療法の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：By using methods to specifically label active neurons with fluorescent proteins and by making the brain transparent to facilitate observation of their fluorescence, I identified neurons with activity closely related to pleasant or unpleasant sensations at the single-cell level of resolution across the entire mouse brain. I also found that artificially activating those cells using an injected compound or a technique in which they are activated by light emitted from an LED light induced some behaviors that indicate pleasantness and unpleasantness in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：感情 快 不快 嫌悪 味覚

1. 研究開始当初の背景

摂食に伴う快・不快経験の強度は、先天的な口腔顔面の動きを元に判定され、ヒトからげっ歯類まで進化的に広く保存されている快・不快の味覚反応(快・不快反応)の強度と高い相関を示す(Berridge, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2000)。さらにその口腔顔面の動きは、味覚という原始的な感覚に伴う意識経験のみならず、道徳的違反といった社会的・文化的認識に伴う意識経験をも反映している(Chapman *et al.*, *Science*, 2009)。従って、摂食に伴う味覚反応を生み出す神経機構の解明は、摂食行動に限定されない、快・不快経験の一般的な発生機構の解明につながると考えられる。

これまで、主に脳領域単位の破壊的手法や薬理学的手法により、ラットの味覚反応に関わる脳領域として腹側淡蒼球や側坐核、島皮質などが同定されてきた(Reynold and Berridge, *J. Neurosci.*, 2002; Shimura *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, 2006; Castro and Berridge, *PNAS*, 2017)。しかしこれら脳領域に存在する多様な神経細胞のうち、どのサブタイプが味覚反応に関わっているのかは不明であった。また、これまで脳全域に亘った広域的な解析が行われていなかったため、これら脳領域以外にも味覚反応に関わっている脳領域があると考えられた。近年申請者らは、主に神経活動の直後に特異的に発現する最初期遺伝子(*c-fos*, *Arc*)の転写機構を利用することで特定のタイミングに活動している細胞を特異的に標識する方法(TRAP法)(Guenther *et al.*, *Neuron*, 2013)(後述)を用いて、前交連後脚介在核の一部の神経細胞が、不快反応と相関のある活動を示すことを明らかにした(Tanaka *et al.*, *Neuroscience*, 2019)。しかしこれまでのところ、これら細胞の活動の、不快反応に対する因果的効果の有無は明らかになっていない。また、TRAP法を適用した脳のうち未だ前脳の一部を解析しただけであるため、前交連後脚介在核以外にも不快反応と相関を示す脳領域があると思われる。さらに申請者らは、絶水後に水を口腔内に注入するとこれまでに報告がないほど強烈な快反応が表れる傾向を見いだした。この快反応についても不快反応の場合と同様に上記 TRAP 法を用いることで、快反応と相関のある活動を示す新たな脳領域が見つかる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、まず、味覚反応における快反応および不快反応それぞれと相関のある活動を示す神経細胞を脳全域に亘って単細胞レベルの解像度で同定する。次に、同定された神経細胞に加え、申請者らがこれまでに同定した不快反応と相関のある活動を示す前交連後脚介在核の神経細胞について、化学遺伝学的手法を用いて、それら神経細胞の活動により、快反応と相関のある活動を示した細胞は快反応が、不快反応と相関のある活動を示した細胞は不快反応がそれぞれ誘導されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

1. [快反応] TRAP法を用いた機能的全脳探索

最初期遺伝子 *Arc* の遺伝子座に誘導型遺伝子組換え酵素 CreERT2 を組み込んだノックインマウス(*Arc* マウス)(Guenther *et al.*, *Neuron*, 2013)、または *c-fos* 遺伝子の下流に CreERT2 を組み込んだノックインマウス(*c-fos* マウス)(Allen *et al.*, *Science*, 2017)と、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するレポーターマウス(Ai14 マウス)を掛け合わせたマウスを用いる。これらマウスの脳では、4-hydroxy tamoxifen(4-OHT)存在下で活動した神経細胞で特異的に遺伝子組換えを誘導することができ(TRAP法)、その結果 tdTomato が発現する。申請者らのこれまでの研究により、マウスに対し絶水後に水を口腔内に注入すると、著しい快反応を示す傾向があることが分かっている。その快反応の後に 4-OHT を腹腔内投与することで、快反応が発動している時に活動した神経細胞を特異的に tdTomato で標識する。それら tdTomato 陽性細胞の分布を単細胞レベルで脳全域に亘り解析するために、脳の透明化と光シート顕微鏡を用いた解析を行う。ここまでの解析で、快反応を示した個体でより多くの tdTomato 陽性細胞が分布している脳領域が見つかったら、その領域に Cre 依存的に人工受容体 hM3Dq を発現する配列をもつアデノ随伴ウイルス(AAV-DIO-hM3Dq-mCherry)を感染させ、絶水後の水刺激で快反応を誘導した後に 4-OHT を投与することで、快反応時に活動している当該領域の神経細胞で特異的に hM3Dq を発現させる。神経細胞で発現した hM3Dq は、clozapine N-oxide(CNO)の結合により神経活動を誘導するため、このマウスに CNO を腹腔投与することで hM3Dq 発現細胞を活動させ、それにより快反応が誘導されるかを調べる。尚、全脳探索には *Arc* マウスと *c-fos* マウスの両方を用い、それらのうち tdTomato 陽性細胞の分布に有意な差がみられたマウスを活動誘導実験に用いる。

2. [快反応] 正中視索前核を起点とした機能的投射先探索

c-fos マウスの正中視索前核に AAV-DIO-hM3Dq-mCherry を感染させ、絶水後に 4-OHT を投与することで、絶水時に活動している正中視索前核の神経細胞(絶水細胞)で特異的に hM3Dq を発現

させる。このマウスに CNO を投与し絶水細胞を活動させると摂水量が増加する(Allen *et al.*, *Science*, 2017)が、快反応が誘導されるのかは不明である。本研究ではまずこれを調べ、予想通り快反応が誘導された場合、次に絶水細胞の投射先を、hM3Dq に融合している赤色蛍光タンパク質 mCherry の発現を利用して解剖学的に調べる。同定された投射先において、まず快反応と相関のある活動を示す細胞がいることを TRAP 法により確認する。次にそれら細胞を、上記 1.と同様の方法で活動させた時に快反応が誘導されるかを調べる。

3. [不快反応] TRAP 法を用いた機能的な全脳探索

苦味刺激により不快反応が誘導されているときに活動している神経細胞を、上記 1.と同様の方法で特異的に tdTomato で標識し、その分布を単細胞レベルで全脳的に解析する。不快反応を示した個体で tdTomato 陽性細胞の多い脳領域が見つかったら、上記 1.と同様の方法で、当該領域の不快反応と相関のある活動を示す細胞を特異的に活動させた時に不快反応が誘導されるかを調べる。

4. [不快反応] 前交連後脚介在核の神経細胞群の機能的役割

申請者らのこれまでの研究により、大脳基底部にある前交連後脚介在核には、不快反応を誘導する苦味刺激、および同じく不快反応を誘導する、内臓不快感との連合記憶を成立させた甘味刺激により活動する神経細胞があることが分かっているが、これら細胞の活動の不快反応に対する因果的効果は不明である。本研究ではこれら神経細胞を、上記 1.と同様の方法で活動させた時に不快反応が誘導されるかを調べる。

4. 研究成果

まず、味覚反応における快反応および不快反応それぞれと相関のある活動を示す神経細胞を脳全域に亘って単細胞レベルの解像度で同定することを目指し、解析系の開発を行った。最初期遺伝子 *Arc* の遺伝子座に誘導型遺伝子組換え酵素 CreERT2 を組み込んだノックインマウス(*Arc* マウス)、または *c-fos* 遺伝子の下流に CreERT2 を組み込んだノックインマウス(*c-fos* マウス)と、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するレポーターマウス(Ai14 マウス)を掛け合わせたマウスを用い、快反応および深い反応が発動している時に活動した神経細胞を tdTomato で標識した。それら tdTomato 陽性細胞の分布を単細胞レベルで脳全域に亘り解析するために、脳を透明化し、光シート顕微鏡で観察した。結果、tdTomato のシグナル自体は明瞭に観察できた一方で、透明化処理により脳の体積が肥大したために、使用している光シート顕微鏡の観察可能領域をオーバーしてしまい、全脳はおろか、片半球すら全体を観察することができなかった。そこで過去の知見を参考に透明化液を改良した結果、透明度をほとんど損なうことなく肥大化を抑えることに成功し、片半球全体を観察できるようになった。また、単細胞レベルの解像度を維持しつつ、片半球あたりおよそ数十分で記録を完了し、データ量も 100GB 程度に抑えることができるようになったため、今後多くのサンプルを処理することが現実的になった。予定通り、快反応と不快反応、それぞれと相関のある活動を示す細胞の観察と記録、解析を進めることができた。この探索実験には *Arc* マウスと *c-fos* マウスの両方を用いたが、最終的に *c-fos* マウスが期待通りの働き方をしたため、主にこちらを用いた。特に不快反応については十分な標本数も集まり、データ解析を半自動化できた。画像データは脳領域あたりの tdTomato 陽性細胞数として数値化し、快反応および不快反応それぞれと相関のある活動を示す神経細胞の候補として同定することができた。

次に、それら候補となった神経細胞を、化学遺伝学的手法を用いて人為的に活動させた時の不快反応への影響を調べるために、人工受容体 hM3Dq を発現する配列をもつアデノ随伴ウイルスの定位的な注入方法や、clozapine N-oxide(CNO)の結合により神経活動を誘導した状態での行動実験の条件検討を進めることができた。さらに、大脳基底部にある前交連後脚介在核について、同様の方法で活動させた時の、不快反応に対する影響も予定通り調べることができた。結果、一部の脳領域において快反応や摂水行動が誘導されることを見出した。また、当該神経細胞群の投射先を、hM3Dq に融合している赤色蛍光タンパク質 mCherry の発現を利用して解剖学的に調べたところ、快反応が誘導された個体において特異的な投射を見出すことができた。さらに当該領域の細胞群の細胞種を詳細に調べたところ、特定の遺伝子を発現する細胞群の活動が、快反応や摂水行動を誘導するのに十分であることが明らかになった。また、不快反応については、候補となった神経細胞を、化学遺伝学的手法を用いて人為的に活動させた時の不快反応および絶水時の摂水行動への影響を調べた結果、当該領域の細胞の活動は、不快反応を誘導するには不十分であるが、摂水行動を抑制するには十分であることが示唆された。他方、光遺伝学的手法を用いたところ、大脳新皮質の特定の領域を活動させることで、不快反応が誘導された。さらに当該領域の細胞の活動をカルシウムイメージングを用いて測定したところ、不快反応と相関のある活動を示す細胞が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Daisuke H., Li Shusheng, Mukae Shiori, Tanabe Tsutomu	4. 巻 742
2. 論文標題 Genetic recombination in disgust-associated bitter taste-responsive neurons of the central nucleus of amygdala in male mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135456 ~ 135456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.135456	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 Tanaka Daisuke H., Li Shusheng, Mukae Shiori, Tanabe Tsutomu	4. 巻 413
2. 論文標題 Genetic Access to Gustatory Disgust-Associated Neurons in the Interstitial Nucleus of the Posterior Limb of the Anterior Commissure in Male Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 45 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.06.021	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 Tanaka Daisuke H., Tanabe Tsutomu	4. 巻 40 (3/4)
2. 論文標題 CHANGing Consciousness Epistemically (CHANCE): An empirical method to convert the subjective content of consciousness into scientific data	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Mind Behav.	6. 最初と最後の頁 177-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tanaka DH, Mukae S, Han I, Nonaka S, Tanabe T and Uesaka N
2. 発表標題 Water deprivation-active neurons in the hypothalamus induce hedonic “liking” reactions for water
3. 学会等名 2022年度 日本味と匂学会 第56回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中大介
2. 発表標題 絶水で活動する視床下部の神経細胞が水に対する快楽的な「好き」反応を誘導する
3. 学会等名 統合的脳神経科学・SIMo研究会（招待講演）
4. 発表年 2023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

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