

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09761

研究課題名（和文）大脳皮質味覚野における空間的な恒常性維持機構の探求と味覚障害の病態解明

研究課題名（英文）Exploration of the underlying mechanisms of spatial homeostasis in the gustatory cortex and elucidation of the pathology of taste disorders

研究代表者

田中 康広（YASUHIRO, TANAKA）

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：40266648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：実地臨床において最も一般的な味覚障害は亜鉛低下によるものであるが、今回マウスにD-ペニシラミンを投与することで亜鉛欠乏性の味覚障害モデルを作製することに成功した。また、大脳皮質味覚野における情報処理機構を解明するために、味覚刺激に暴露した際の大脳の誘発反応をアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入を用いカルシウムイメージングによりリアルタイムかつ繰り返し観察できる実験系を構築した。さらに、舌表面を生きたまま高分解能で形態観察できる実験系を構築できた。同実験系を用いて、亜鉛欠乏性味覚障害モデルマウス、老化や全身性疾患モデルマウスによる大脳皮質味覚野の神経動態を観察することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚障害を呈する患者数は年々増え続けているものの、実地臨床では原因がわからないことも多い。その理由は大脳を含めた味覚の情報処理のメカニズムが未解明であることが挙げられる。今回の成果により、生体マウスにおいて味覚刺激による大脳の反応が単一細胞レベルで観察できるようになり、味覚情報処理のメカニズムの一端を解明することができた。今後、様々な病態モデルマウスを用いて味覚情報処理の恒常性が破綻した際の大脳の変容過程を解析することが可能となる。以上から、味覚障害に対する新しい検査法や治療手段を提案できる基礎データが蓄積され、今後の応用研究につながる可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We created a model of zinc-deficiency taste disorder, which is the most common in clinical medicine, administering D-penicillamine to wild-type mice. In addition, to elucidate the mechanisms of taste processing in the gustatory cortex, we established an experimental system that enables real-time and repetitive spatial response evoked by taste stimuli using two-photon calcium imaging. We injected adeno-associated virus in layer 2/3 in the gustatory cortex to visualize neuronal activity. Furthermore, we also established an experimental system that enables high-resolution morphological observation of the surface on tongue in vivo. Therefore, it has become possible to observe the neuro-dynamics in the gustatory cortex in zinc-deficiency taste disorder, in ageing, and in systemic disease model mice.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：大脳皮質味覚野 味覚障害 味覚情報処理 神経回路 2光子顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

味覚刺激の伝搬は、舌における味蕾で受容され末梢神経を通り延髄孤束核・視床を経て大脳で「味」として受容・認知される。その中で大脳皮質味覚野は、脳に蓄積された味覚情報の想起や情動にも関与しており味覚伝導路の中でも重要な領域である。しかし、同領域の各味質の分布 (Gustotopic Map) や味覚中枢の神経回路についての知見は少なく、味覚情報処理を行うメカニズムはいまだ解明されていない。一方で、味覚障害の原因は亜鉛欠乏や薬物副作用、全身疾患に伴うものなど多岐にわたるが、実地臨床では味覚異常の訴えがあっても明らかな検査異常がみられないことをよく経験する。さらに、今後超高齢社会に伴い高齢者に多発する味覚障害患者は増加するものと推測されている。

われわれは、味覚障害において神経回路様式が明らかにされていない大脳皮質味覚野に注目した。末梢から味覚野への味覚伝導路を一つの感覚器のシステムととらえ、外的負荷および内的負荷が低下・消失することで大脳皮質味覚野の神経回路がどのように代償することで生体の恒常性を維持しているのか、この恒常性が維持できず破綻することにより大脳皮質味覚野の神経回路様式はどのように変容し味覚障害として表出されるのかについて研究を推進する。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、味覚伝導路を固有の感覚システムとみなし、その恒常性維持機構と破綻における大脳皮質味覚野の神経回路様式の変容過程に対し新規イメージング技術を用いて解明する。大脳皮質味覚野の恒常性維持をつかさどる味覚情報処理のメカニズムの一端を明らかにすることで、末梢から味覚中枢までの味覚伝導路の各領域特異的に作用するドラッグデリバリーシステム、皮質刺激型味覚器、新規の味覚リハビリテーションの提案といった味覚障害に対する革新的医療介入につながる基礎データを蓄積することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 味覚障害モデルマウスの作製

実地臨床で最も頻度の高い末梢の味覚障害の原因は亜鉛欠乏性の味覚障害である。われわれは、より臨床に近いモデルとして薬剤による亜鉛欠乏モデルマウスの作製を試みた。8-12週齢の野生型マウスに対して、血清中の亜鉛と結合して可溶性キレートを形成するD-ペニシラミン(10mg/ml)を1日当たり200 $\mu$ l腹腔内投与し、その後の味覚障害の有無を二瓶弁別法を用いて解析した。

#### (2) マウス味覚野イメージング同期リッキングシステムの構築

味覚刺激に対するマウス大脳皮質味覚野の神経誘発反応を取得する実験系を構築するために、以下の3つのセッティングを行った。1つ目は、顕微鏡ステージ上においてマウスの頭部を固定するための固定装置を準備した。マウス頭蓋骨にT字型オーダーメイドのチャンパープレートを接着し固定装置と組み合わせることで、マウスの心拍や呼吸の揺れがイメージング画像におよぼす影響を最小限にした。2つ目は、味覚刺激を行うための行動学的な装置を準備した。絶水させたマウスの口元に給水スパウトを固定し、マウスがリッキングすると赤外線センサーで感知できるように設計した(つまり、リッキング開始時を味覚刺激時とする)。また、給水はランダム関数を用いることにより、マウスが給水時間

間隔を学習せずにリッキングを行うことが可能な実験系とした。3つ目に、生体マウス味覚刺激と大脳皮質味覚野のイメージングの時間的同期を行った。リッキングしたシグナルをイメージング記録装置にパルスとして入れることで味覚刺激時の神経誘発反応をミリ秒単位の時間分解能で計測できるように準備した。

### (3) マウス大脳皮質味覚野の興奮性神経細胞活動の可視化

マウス大脳皮質味覚野において多光子レーザー顕微鏡を用いて神経細胞の活動を可視化するため緑色カルシウム感受性タンパク質 GFP-based Calcium Calmodulin probe(GCaMP: 細胞や生体分子を蛍光標識する緑色蛍光タンパク質である GFP を遺伝子工学的に改変させた緑色蛍光  $Ca^{2+}$ センサー)をコードする遺伝子をアデノ随伴ウイルスを用いて大脳皮質味覚野に注入し発現させた。また、長期で繰り返しイメージングを行うため大脳皮質味覚野の直上に頭蓋窓の作製を試みた。長期でのイメージングを行う理由は、同一個体かつ同一神経細胞集団で味覚障害の前、後、治療後の評価を行い、それぞれの時期の活動が病態および医療介入によりどのように変容するか、その活動を表現型として明らかにするためである。ウイルスの注入から 2 - 3 週間後に同マウスに対し、多光子レーザー顕微鏡を用いて神経細胞の応答を  $Ca^{2+}$ の蛍光輝度の変化としてとらえ、大脳皮質味覚野における神経活動を可視化した。

### (4) マウス大脳皮質味覚野の神経回路の可視化

マウス大脳皮質味覚野において興奮性神経回路の編成を可視化するために(3)と同様に多光子レーザー顕微鏡を用いた系を構築した。Thy1-EGFP マウス(大脳皮質第5層の興奮性神経細胞に発現する Thy1 遺伝子プロモーターの制御下に GFP を発現させた遺伝子改変マウス)を使用し、同時期のシナプス後部の構造物であるスパイン数の増減をカウントすることで神経回路編成の変化を可視化した。

### (5) マウス舌表面の形態観察(生体)

マウスの舌表面の形態をミリメートル以下の分解能、かつ生体で観察するための顕微鏡装置の構築を行った。舌表面を観察する際には、三種混合麻酔を用いて麻酔下で行う実験系とした。

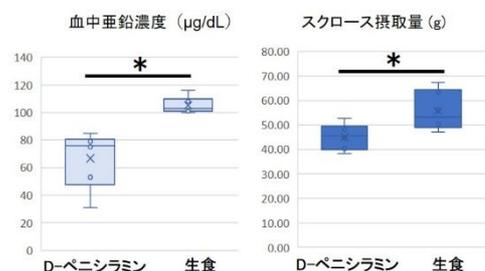
## 4. 研究成果

### (1) 味覚障害モデルマウスの作製

研究方法で示した手順で味覚障害モデルマウスの作製を試みたところ、D-ペニシラミン(10mg/ml)を腹腔内投与すると有意に血清中の亜鉛濃度は低下し、かつ甘味水(スクロース)の飲水量は有意に少なかった。以上から、D-ペニシラミンを用いて甘味の味覚障害モデルマウスを作製できることが明らかとなった(穂吉ら, 第56回日本味と匂学会, 2022)。また、その原因として薬剤による亜鉛欠乏が原因であることが示唆された。

この味覚障害モデルマウスは、実地臨床において味覚障害の原因として頻度の多い亜鉛欠乏性味覚障害であることから臨床に即した味覚障害モデルとしての今後の使用が期待される。

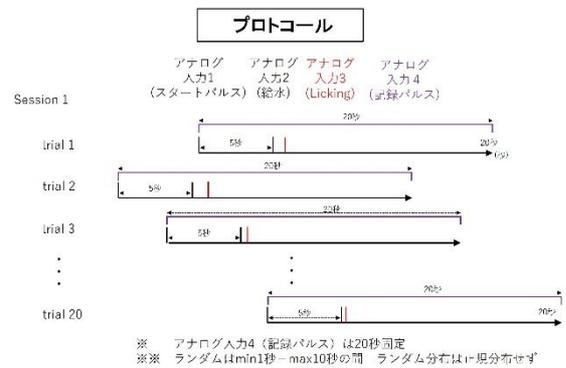
血中亜鉛濃度が低下するとスクロース摂取量が減少する(自験例)



穂吉ら: 亜鉛欠乏による味覚障害モデルマウス作製の試み, 第56回日本味と匂学会, 2022

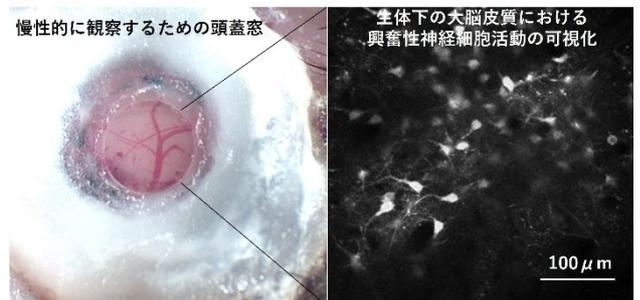
## (2) マウス味覚野イメージング同期リッキングシステムの構築

生体マウスにおいて、リッキング時の脳活動を観察するための顕微鏡下イメージング同期リッキングシステムを構築することができた。リッキング(味覚刺激)と顕微鏡の撮像タイミングを同期させることで味覚刺激の潜時の測定が可能であることが明らかとなった。また、非刺激時の味覚野の活動動態および潜時の時間依存的に発火する神経細胞群を正確に解析できることが明らかとなった。1回の味覚刺激に対する神経誘発反応を1つの trial とし、同 trial を20回繰り返したものを1 Session とする。味覚刺激時の大脳皮質の神経細胞活動をより正確に把握するために、スタートパルスからの神経細胞活動のタイムラプスイメージ画像の相加平均を解析することが可能になった。



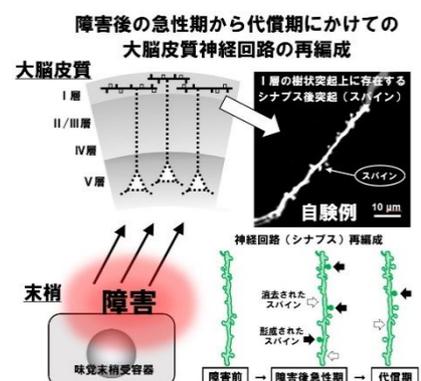
## (3) マウス味覚中枢神経活動の可視化

生体下におけるマウスの神経細胞活動を可視化し観察できることが明らかとなった。実験手技としての困難な点は、大脳皮質味覚野の位置する領域がマウス側頭部に位置しており、マウスの頬骨弓により頭蓋窓に近づける対物レンズの操作の妨げになることである。頬骨弓を摘出すると頭蓋窓からの観察は容易であったが、手術によっては成功しない個体も出てくること、また、頬骨弓を摘出すると非生理的である可能性もあることから別の手法を模索した。マウスが対物レンズ下でも安定した姿勢を維持できるように、頭蓋窓にプリズムを装備しイメージングする方法を構築している。大脳皮質味覚野は運動野や体性感覚野と異なり側頭部に位置することから、その層構造は地面に対しほぼ水平であるため頭蓋窓に三角プリズムを接着し対物レンズは上下方向の移動を行うことで注目する皮質領域が観察できるよう実験系を確立させた。



## (4) マウス大脳皮質味覚野の神経回路の可視化

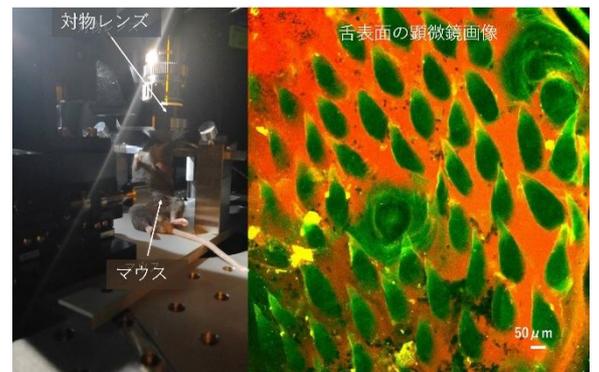
マウスの樹状突起におけるシナプス後突起(スパイン)を観察するために *Thy1*-EGFP マウスを用いた。同マウスは大脳皮質第5層の興奮性神経細胞に GFP が発現しており、その先端樹状突起を大脳皮質味覚野の第1層で観察した。ある個体では、GFP が発現している神経細胞の数が多く、スパインを高い S/N 比で観察することは困難であった。高い S/N 比で観察するためには、神経細胞は sparse に発現している必要があり、そのようなマウスではスパインを24時間、48時間、72時間後においても観察することができた。また、スパインの turnover も解析でき、スパイン数の増減をカウントす



ることで神経回路編成の変化を可視化することができた。

#### (5) マウス舌表面の形態観察(生体)

多光子レーザー顕微鏡を用いて生体下マウスで舌表面を観察する系を構築することに成功した。同実験系を用いて観察したところ自家蛍光による舌乳頭の形態を高分解能で観察できることが明らかとなった。舌表面は自家蛍光によりその形態観察が可能であり、薬剤による末梢の味覚障害や、老化モデルマウス、鼓索神経切断モデルマウスなどにおける形態変化を観察する実験系が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穠吉亮平, 富山克俊, 柘木康佑, 坂本光, 岩崎昭充, 田中康広
2. 発表標題 亜鉛欠乏による味覚障害モデルマウス作製の試み
3. 学会等名 第56回日本味と匂学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	穠吉 亮平  (Ryohei Akiyoshi)  (80572859)	獨協医科大学・医学部・准教授    (32203)	

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
---------	---------