

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09828

研究課題名（和文）発生工学的トレーシングを基盤とした全脳領野の味覚機能地図の構築

研究課題名（英文）Genetic tracing to reveal the whole brain mapping of taste information processing

研究代表者

杉田 誠（SUGITA, Makoto）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：50235884

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）：本研究では、苦味受容味細胞にトレーサーを発現させ、トレーサーにより標識される苦味経路ニューロンの脳内局在・細胞機能を解明し、味覚経路ニューロンの脳内局在・細胞機能・役割が表出される味覚機能地図の構築を進めた。特に苦味経路ニューロンの網様体・橋結合腕傍核・扁桃体での局在と細胞機能を解析した。橋結合腕傍核において、苦味経路ニューロンは二領域に分離して局在し、それら二領域の苦味経路ニューロンではニューロン種と味覚・内臓感覚刺激への応答性に差異が観察された。また扁桃体内側核の苦味経路ニューロンは味覚嫌悪学習の獲得前後で味覚条件刺激に対する興奮性応答を変化させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生工学的トレーシングを用い、特定の味細胞に選択的に経ニューロン性トレーサーを発現させることにより、特定の味細胞を起始点とする味覚経路ニューロンを上行性経路に沿って標識・可視化することが可能となる。それにより特定の味覚経路ニューロンを可視化限定して、細胞機能を解析することができ、特定の味覚経路ニューロンに選択的に作用する薬剤を選出することが可能となる。そして特定の味覚経路ニューロンが保有する細胞機能・分子機能を標的として、味覚異常、味覚誘発行動の異常、情動障害、拒食・過食への新しい治療法が創出される。

研究成果の概要（英文）：Genetic tracing was combined with immunohistochemistry to functionally characterize bitter taste-relaying neurons in the PBN and the amygdala, which were labeled by the transneuronal tracer tWGA-DsRed originating from T2R-expressing taste receptor cells. In the PBN, the tWGA-DsRed-labeled neurons were located rostrally in the external lateral PBN, and caudally in the medial PBN. The tWGA-DsRed-labeled neurons in the medial and the external lateral PBN exhibited the distinct immunoreactivity to CGRP and substance P, suggesting differences in the neuron types between the neurons in the medial and external lateral PBN. The tWGA-DsRed-labeled neurons were also located in the medial amygdala. Subsets of tWGA-DsRed-labeled, bitter taste-relaying neurons in the medial amygdala enhanced their excitatory responses to the conditioned stimulus saccharin after conditioned taste aversion learning.

研究分野：口腔生理学

キーワード：味覚 ニューロン 発生工学的トレーシング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

苦味受容味細胞は T2R ファミリーを共発現して苦味を感知し、それとは異なる味細胞のうちで T1R3 を発現する味細胞が、甘味・うま味を感知する。これまでの自身の研究で、トランスジェニックマウスの作製を通じて、苦味受容体の一種(mT2R5)もしくは甘味・うま味受容体のサブユニット(mT1R3)を発現する味細胞に、それぞれ選択的に味覚受容体-GFP 融合タンパク質と経ニューロントレーサー(WGA-DsRed 融合タンパク質)を発現させた。そして味細胞から分泌され経ニューロン性に輸送される WGA-DsRed の脳内局在を上行性経路に沿って追跡可視化することにより、苦味および甘味・うま味を伝導する神経経路の脳内での三次元空間配置を解明した。苦味経路を標識するマウス(mT2R5-WGA マウス)と甘味・うま味経路を標識するマウス(mT1R3-WGA マウス)において、トレーサートランスジーン(WGA-DsRed)は味細胞から順行性に輸送され、神経節ニューロンを経由し、上行性経路に沿って、延髄孤束核ニューロン、橋結合腕傍核ニューロン、視床後内側腹側核ニューロン、および大脳皮質味覚野・扁桃体中の一部のニューロンで観察された。また網様体および視床下部の一部のニューロンにおいても観察された。延髄孤束核・橋結合腕傍核・視床後内側腹側核において、甘味受容味細胞からの入力を受けるニューロン群は、苦味受容味細胞からの入力を受けるニューロン群に比べ、より前方に配置していた。したがって苦味経路ニューロンと甘味経路ニューロンの脳内局在の異なりが可視化され、この二種の神経経路の異なりが苦味と甘味の識別の基盤になると考えられた。

延髄孤束核の後方部(尾側部)に集積する苦味経路ニューロンの微細形態を WGA-DsRed 標識ニューロン内に蛍光色素を注入することにより解析すると、延髄孤束核の苦味経路ニューロンの多くは樹状突起を二方向へ伸展させる単純な形態を呈していた。WGA-DsRed で標識される延髄孤束核の苦味経路ニューロンは口腔内の苦味刺激によってのみ活性化され、口腔内甘味刺激や内臓感覚不快感を呈する腹腔内 LiCl 注入刺激によっては活性化されなかったため、苦味情報を選択的に伝導・処理することが示唆された。延髄孤束核の苦味経路ニューロンは神経伝達物質グルタミン酸の入力を AMPA 受容体により受容し、その神経伝達は cholecystokinin により増強された。グルタミン酸入力を AMPA 受容体により共通して受け取る延髄孤束核の苦味経路ニューロンのニューロン種は、発現分子の免疫組織学的解析により、少なくとも tyrosine hydroxylase を発現する catecholamine ニューロン、pro-opiomelanocortin ニューロンとそれら以外の少なくとも 3 種類に分類された。延髄孤束核の苦味経路ニューロンは複数のニューロン種から構成されていることが明らかとなった。

苦味と甘味受容は対照的な行動・情動応答を誘発するが、対照的な応答を可能にするために、いかに各脳領野に局在する苦味ニューロン同士、及び甘味ニューロン同士が選択的に連結し、異なる苦味経路と甘味経路を構築するかは不明である。各脳領野の苦味・甘味経路ニューロンのニューロン種は何でありいかなる神経伝達を行うか、さらに各脳領野の苦味・甘味経路ニューロンが味覚誘発行動・情動応答にいかなる役割を果たすかには不明な点が多い。

2. 研究の目的

口腔内の味細胞で感知される苦味と甘味の情報は脳内の特定ニューロンに伝達され、識別され、対照的な行動・情動応答が惹起される。それらの神経機構を解明するためには、苦味と甘味の情報を伝導する神経経路を全脳領野で可視化し、苦味・甘味経路を構成するニューロンの細胞機能を解析し、各脳領野に局在する苦味・甘味経路ニューロンの識別や行動・情動応答に果たす役割を証明する必要がある。これまでの研究で発生工学的トレーシングを用い苦味経路ニューロンと甘味経路ニューロンの脳内局在を全脳領野で可視化した。本研究では、可視化された苦味・甘味経路ニューロンの細胞機能を解明する。また特定の苦味・甘味経路ニューロンの役割を探究し、苦味・甘味経路ニューロンの脳内局在・細胞機能・役割が表出される「味覚機能地図」を構築する。

3. 研究の方法

(1) 発生工学的トレーシングと味覚経路ニューロンの脳内局在の可視化
mT2R5 を発現する苦味受容味細胞もしくは mT1R3 を発現する甘味・うま味受容味細胞に選択的に経ニューロン性トレーサー(WGA-DsRed)を発現するトランスジェニックマウスにおいて、網様体・橋・扁桃体等の各脳領域で苦味受容味細胞もしくは甘味・うま味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味・甘味経路ニューロンの三次元的空間配置を比較解析した。トランスジェニックマウスの脳の前頭断連続切片(30 μm)もしくは水平断連続切片(30 μm)をフィルムトランスファー法により得て、WGA-DsRed を受け取るニューロンの脳内局在を蛍光顕微鏡下で DsRed 蛍光をもとに検出し明らかにした。そして苦味経路ニューロンもしくは甘味・うま味経路ニューロンが網様体・橋・扁桃体等の各脳領域でどのような三次元的空間配置を示すかを単一細胞レベルで解析した。

(2) 味覚経路ニューロンのニューロン種の免疫組織化学的解析

mT2R5 を発現する苦味受容味細胞もしくは mT1R3 を発現する甘味・うま味受容味細胞に選択的に経ニューロン性トレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにおいて、脳の前頭断連続切片 (30 μm) もしくは水平断連続切片 (30 μm) をフィルムトランスファー法により得て、DsRed の蛍光検出により同定された WGA-DsRed 標識ニューロン (苦味経路ニューロンもしくは甘味・うま味経路ニューロン) に発現する分子を免疫組織化学的に明らかにし、味覚経路ニューロンのニューロン種を解析した。

(3) 味覚経路ニューロンの各種刺激応答性の c-fos 発現に基づく検出

各種口腔内味刺激後もしくは内臓感覚不快感を呈する腹腔内 LiCl 注入刺激後に、網様体・橋結合腕傍核領域の WGA-DsRed で標識される味覚経路ニューロンが c-fos (活性化したニューロンで発現誘導される最初期遺伝子) を発現するか否かを免疫組織化学的に検出し、味覚経路ニューロンがいかなる刺激時に活性化されるかを明らかにした。口腔内に蒸留水、苦味溶液 (1 mM cycloheximide)、甘味溶液 (1 M Sucrose)、および腹腔内にリン酸緩衝液 (ip PBS) もしくは内臓感覚不快感を惹起する LiCl (ip LiCl : 150 mM LiCl を体重の 2% 量) を投与後、45 分後に脳を摘出し、網様体・橋結合腕傍核を含む脳領域の水平断連続切片 (30 μm) をフィルムトランスファー法により得て、抗 c-fos 抗体を用い、c-fos 発現を免疫組織化学的に検出した。そして WGA-DsRed で標識される味覚経路ニューロン中において、各種刺激により c-fos 発現が誘導されるニューロンの割合を解析し、WGA-DsRed 標識ニューロンを活性化させる刺激条件を明らかにした。

(4) 味覚嫌悪学習獲得時の味覚経路ニューロンの味覚条件刺激応答性の変化解析

生得的に嗜好性を示す甘いサッカリン溶液 (味覚による条件刺激 (CS)) を飲ませた直後に内臓不快感を生じさせる LiCl を腹腔内投与 (内臓感覚による無条件刺激 (US)) することにより、両刺激を連合させると、その後サッカリン溶液 (CS) に忌避性を示す。この味覚嫌悪学習の獲得の前後で、扁桃体内の味覚経路ニューロンが、味覚による条件刺激 (CS) への反応性に変化を生じさせるか否かを解析した。方法として、嫌悪感を惹起する苦味の情報を受け取る、WGA-DsRed により標識された扁桃体苦味経路ニューロンに限定し、そのニューロン中で味覚嫌悪学習の獲得前後で、サッカリン甘味刺激 (CS) により活性化されるニューロンの割合が変化するか否かを、最初期遺伝子 Zif268 の発現誘導を指標にして検出した。またその後の味覚嫌悪学習の消去過程においても、サッカリン甘味刺激 (CS) により活性化されるニューロンの割合の変化を解析し、WGA-DsRed により標識された扁桃体苦味経路ニューロンの味覚嫌悪学習の獲得と消去過程における機能的変化を抽出した。

4. 研究成果

苦味受容味細胞に選択的にトレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにおいて、味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味経路ニューロン細胞体の網様体・橋結合腕傍核・扁桃体における局在を DsRed の蛍光検出により明らかにし、それらの局在と保有する細胞機能との関係性を探究した。

網様体において、WGA-DsRed により標識される苦味経路ニューロンは孤束核後方部に局在する苦味経路ニューロンに近接して、それらの腹側後方の lateral 側に集積して観察された。網様体の苦味経路ニューロンが苦味情報を選択的に受け取り処理するか、他の味覚情報や内臓感覚情報も受け取り情報処理を行うかを、各種刺激後の c-fos 発現を指標として検出した。無刺激時に比較し、口腔内苦味刺激は、網様体の苦味経路ニューロン中で c-fos を発現するニューロンの割合を増加させた。低濃度塩味刺激および内臓感覚不快感を惹起する LiCl 腹腔内投与によっても c-fos を発現する苦味経路ニューロンが高頻度に観察された。網様体の苦味経路ニューロンは口腔内への苦味刺激、低濃度塩味刺激および内臓不快感を惹起する刺激に共通した応答を誘発することが考えられた。この網様体の苦味経路ニューロンの活性がいかなる行動応答に関与するかを探究する必要がある。

橋結合腕傍核において、WGA-DsRed により標識される苦味経路ニューロンは後方 medial 側と前方 external lateral 側に局在する。橋結合腕傍核の苦味経路ニューロンが苦味情報を選択的に受け取り処理するか、他の味覚情報や内臓感覚情報も受け取り情報処理を行うかを、同様に各種刺激後の c-fos 発現を指標として検出した。後方 medial 側の苦味経路ニューロンにおいては口腔内苦味刺激により観察される c-fos 発現ニューロンの割合は、甘味刺激時や腹腔内 LiCl 注入刺激時に比較し、高い値を示した。前方 external lateral 側に局在する苦味経路ニューロンにおいては、口腔内水刺激、口腔内苦味刺激、腹腔内 LiCl 注入刺激時の 3 群において、c-fos 発現ニューロンの割合が高値を示し、口腔内甘味刺激では苦味経路ニューロンに c-fos 発現は観察されなかった。後方 medial 側の苦味経路ニューロンは口腔内苦味刺激により選択的に活性化される傾向を示した。一方で、前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンは口腔内水刺激、口腔内苦味刺激および内臓不快感を惹起する刺激に共通した応答を誘発する可能性が考えられた。後方 medial 側と前方 external lateral 側に局在する苦味経路ニューロンでは、味質選択性や内臓感覚不快感との情報統合の様式に差異がみられた。ゆえに、後方 medial 側と前方 external lateral 側に局在する苦味経路ニューロンでは、識別もしくは行動・情動応答へ果たす役割が異なることが示唆された。

苦味受容味細胞に選択的にトレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにお

いて、橋結合腕傍核の後方 medial 側と前方 external lateral 側に局在する WGA-DsRed を受け取る苦味経路ニューロンに関して、発現分子を免疫組織化学的に検出し、ニューロン種を比較した。前方 external lateral 側に局在する苦味経路ニューロンの 19%は CGRP を発現し、22%は substance P を発現することが観察された。後方 medial 側の苦味経路ニューロンからは CGRP 陽性細胞や substance P 陽性細胞はほぼ観察されなかった。後方 medial 側と前方 external lateral 側に局在する苦味経路ニューロンの双方において、tyrosine hydroxylase を発現するニューロンは観察されなかった。後方 medial 側と前方 external lateral 側に局在する苦味経路ニューロンでは、ニューロン種に差異があることが示唆された。

苦味受容味細胞に選択的にトレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにおいて、扁桃体領域では、味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味経路ニューロンは扁桃体内側核に集積していた。扁桃体内側核の苦味経路ニューロンについて、味覚嫌悪学習獲得の前後および味覚嫌悪学習の消去過程において、味覚条件刺激 (口腔内サッカリン甘味刺激) により活性化されるニューロンの割合に変化が生じるか否かを最初期遺伝子 Zif268 の発現検出により精査した。扁桃体内側核の前方背側、前方腹側、後方背側の苦味経路ニューロンにおいては、味覚嫌悪学習獲得前に比較し学習獲得後に味覚条件刺激で活性化されるニューロンの割合が増加し、消去記憶の獲得後にもその増加割合が維持された。一方で、扁桃体内側核の後方腹側の苦味経路ニューロンにおいては、味覚嫌悪学習獲得の前後および消去記憶獲得後において、味覚条件刺激で活性化されるニューロンの割合に差異が観察されなかった。扁桃体内側核の一部のニューロンは味覚嫌悪学習獲得の前後で味覚条件刺激に対する興奮性応答を変化させることが示唆された。扁桃体内側核の味覚応答に関連する役割については、これまで味覚関連新規性恐怖に関する報告があるが、不明な点が多い。扁桃体内側核の味覚経路ニューロンの味覚嫌悪学習獲得時における応答性変化の機構と役割を明らかにすることにより、味覚嫌悪学習の獲得機構に重要な知見をもたらす可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Shintani T, Naito M, Obayashi N, Ando T, Kawaguchi H, Yanamoto S, Kajiya M, Sugita M	4. 巻 267
2. 論文標題 Resting saliva volume as a risk factor for hypogeusia: A retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiol Behav	6. 最初と最後の頁 114224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2023.114224	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 Obayashi N, Sugita M, Shintani T, Nishi H, Ando T, Kajiya M, Kawaguchi H, Ohge H, Naito M	4. 巻 31
2. 論文標題 Taste-taste associations in chemotherapy-induced subjective taste alterations: findings from a questionnaire survey in an outpatient clinic	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Support Care Cancer	6. 最初と最後の頁 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00520-023-08013-w	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 Takeyasu M, Kozai K, Sugita M	4. 巻 194
2. 論文標題 Involvement of sodium-glucose cotransporter-1 activities in maintaining oscillatory Cl-currents from mouse submandibular acinar cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Comp Physiol B	6. 最初と最後の頁 21-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00360-024-01532-w	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 酒寄信幸, 杉田誠	4. 巻 42
2. 論文標題 栄養と脳の発生・発達	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 精神科	6. 最初と最後の頁 442-449
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 無
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 Sakayori N, Katakura M, Setogawa S, Sugita M, Kobayashi K	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of the fatty acid profile in the ventral midbrain of mice exposed to dietary imbalance between omega-6 and omega-3 fatty acids during specific life stages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Res Notes	6. 最初と最後の頁 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-022-06175-0	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 Obayashi N, Sakayori N, Kawaguchi H, Sugita M	4. 巻 131
2. 論文標題 Effect of irinotecan administration on amiloride-sensitive sodium taste responses in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eur J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 e12922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/eos.12922	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 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 杉田 誠
2. 発表標題 発生效学的トレーニングにより可視化限定された扁桃体ニューロンの味覚嫌悪学習獲得時と消去学習後における味覚条件刺激への応答
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makoto Sugita, Nobuyuki Sakayori, Hiroyuki Kawaguchi, Nami Obayashi
2. 発表標題 The chemotherapeutic agent irinotecan impairs amiloride-sensitive sodium taste responses in mice
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 杉田 誠
2. 発表標題 発生工学的トレーシングにより可視化された扁桃体内側核の苦味経路ニューロンで観察される味覚嫌悪学習後の甘味刺激への反応性変化
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto
2. 発表標題 Functional characterization of bitter taste-relaying neurons in the parabrachial nuclei
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉田 誠、Chieh-Mei Chang
2. 発表標題 発生工学的トレーシングにより表出される扁桃体ニューロン活動の味覚嫌悪学習時の可塑性変化
3. 学会等名 第73回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Sugita, Chieh-Mei Chang
2. 発表標題 Plastic changes in activities of bitter taste-relaying neurons in the medial amygdala during conditioned taste aversion learning
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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