

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14558

研究課題名(和文) 情動と体温を結ぶ分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms linking emotion and body temperature

研究代表者

小早川 令子 (KOBAYAKAWA, Reiko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40372411

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)：恐怖は強力な情動であり、生存に必須となる危険からの回避や防衛行動を強力に誘発する。恐怖情動は先天的と後天的なメカニズムによって誘発され、先天的恐怖行動と後天的恐怖行動は異なる神経メカニズムによって誘発されることが示唆されているが、両者によって誘発される生理応答の違いやその制御メカニズムに関しては不明な点が多かった。報告者らは自らが独自に開発したマウスに極めて強力な先天的恐怖情動を誘発する匂い分子を用いることで、後天的恐怖情動は体温と心拍数の上昇を誘発するのに対し、先天的恐怖情動が低体温・徐脈を誘発するという正反対の生理応答を誘発することを明らかにし、両者が異なる情動状態であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後天的恐怖がいわゆる闘争逃走反応に必要な体温および心拍数の上昇を引き起こすことは知られていたが、本研究により強力な先天的恐怖が体温低下と心拍数の顕著な低下を引き起こすことが示された。また、先天的恐怖刺激を長時間作用させることでtorporのような低体温状態を引き起こせるものの、先天的恐怖と冬眠/torporによる低体温誘発メカニズムは異なることが示唆されたことから、今後先天的恐怖の低体温誘発メカニズムを明らかにすることで、新たな温度制御メカニズムや生理学的意義が明らかにされることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Fear is a powerful emotion that induces avoidance and defensive behaviors from the danger essential for survival. It has been suggested that both innate and learned mechanisms elicit fear emotions and that different neural mechanisms elicit innate and learned fear behaviors; however, the differences in their physiological responses and control mechanisms remain unclear. We have developed a series of odorants that induce potent innate fear emotion in mice. Using these odors, we showed that learned fear induces increases in body temperature and heart rate, while innate fear induces hypothermia and bradycardia, which are opposite physiological responses, indicating that the two are different emotional states.

研究分野：神経科学

キーワード：情動

1. 研究開始当初の背景

恐怖は強力な情動であり、生存に必須となる危険からの回避や防衛行動を強力に誘発する。また、恐怖情動はヒトにおいて、うつ、恐怖症などの様々な精神疾患の発症や症状に深く関与する。精神疾患は先天的和後天的なメカニズムによって発症すると考えられる。恐怖情動も先天的和後天的なメカニズムによって誘発できる。様々な報告によって、両者の恐怖は異なる神経経路によって分離して制御されることが明らかになっている。しかし、両者の神経経路の間にどのような相互作用があるのかは明らかになっていない。先天的和後天的な情動や行動制御メカニズムの相互作用の解明は、精神疾患の理解や、性格や能力の決定における「氏と育ち」論争に対して新たな視点を与えると考えられる。

嗅覚はマウスにとって危険を感知する最も重要な感覚である。また、他の感覚系とは違い、異なる種類の匂い分子を用いることで、先天的和後天的な恐怖を誘発できるという特徴を有す。そこで、私たちは独自に開発した「嗅覚入力による先天的恐怖 vs 後天的恐怖モデル」を活用して、先天的和後天的な恐怖回路は相互作用するのか？もし、相互作用するのであれば、どの脳領域でどのような細胞メカニズムによってなされるのか？そして、相互作用の結果どのような行動が誘発されるのか？という基本的な疑問に答えることを目指した研究を実施してきた。この目的を達成するため、自ら発見した極めて強力な先天的恐怖を誘発する匂い分子である **thiazoline-related fear odors(tFOs)**、自由行動化のマウスの脳深部の神経活動の観察を可能にした光ファイバー束を用いた内視鏡、**Cre-loxP** 系と薬理遺伝学的手法を組み合わせた研究を実施した結果、先天的恐怖行動と後天的恐怖行動は扁桃体中心核の **Htr2a** 陽性細胞により逆方向に制御され、その結果、先天的恐怖刺激と後天的恐怖刺激をマウスに同時に与えた場合には先天的恐怖行動が優先されるということを見出した (**Isosaka et al., Cell 2015**; 恐怖の階層性制御)。しかし一方で先天的恐怖と後天的恐怖の誘発する生理応答の違いやその制御メカニズムに関しては、これまで効率的に先天的恐怖を誘発する実験系がなかったことから殆ど研究が行われていなかった。

2. 研究の目的

報告者らの研究により、先天的恐怖行動と後天的恐怖行動は、異なる神経メカニズムによって誘発される異なる行動であることが示唆された (**Isosaka et al., Cell 2015**; 恐怖の階層性制御)。もしそうであれば、先天的恐怖情動と後天的恐怖行動は異なる生理応答を誘発する可能性が考えられる。先行研究により、後天的恐怖刺激は体温上昇・心拍数上昇などのいわゆる **Fight-or-flight** に適した生理応答を誘発することが報告されている。

一方で、先天的恐怖により誘発される生理応答に関しては、これまで先天的恐怖を効率的に誘発する実験系が開発されていなかったことから不明な点が多かった。本研究では、報告者が見出した、マウスに極めて強力な先天的恐怖情動を誘発する匂い分子群 **tFOs** を用いて先天的と後天的恐怖情動によって誘発される生理応答を比較解析し、その誘発メカニズムを明らかにするための研究を行った。

3. 研究の方法

マウスは日本 SLC から購入した雄の C57BL/6Ncr マウス又は Jackson Laboratory から購入した UCP1 ノックアウトマウスを用い、標準的な 12 時間の明暗サイクルのもと、自由に餌と水を摂取できる条件で飼育した。マウスを用いた実験のプロトコルは、関西医科大学の動物実験委員会の承認を得て行った。

2-Methyl-2-thiazoline は東京化成から、Anisole はナカライテスクから購入し、生理応答の解析の際には 271 μ mol の匂い分子を濾紙に染み込ませ、テストケージ内に設置する方法で匂い提示を行った。

匂いを用いた恐怖条件付けは、C57BL/6 Ncr マウスを conditioning chamber に入れ、3 分間の自由探索をさせた後、2 種類の匂い物質 (Anisole または eugenol) のうち 1 種類を匂い提示装置を用いて 30 秒間提示し、Anisole を提示した場合のみ、電気ショックを与え、Eugenol の匂いを提示した場合には電気ショックを与えないという条件で、それぞれの匂いを 6 回ずつランダムにマウスに対して提示した。恐怖条件付けは、生理応答を解析する前日に行った。

体表面温度の計測は赤外線カメラ (H2640, NEC Avio) を用いて行い、体深部温度および心拍数は予めマウスの体内に埋め込んだ無線式テレメトリー装置 (TA11ETA-F10, DataSciences International) を用いて自由行動下で計測した。

4. 研究成果

恐怖は、**Freezing** 行動、血清中のストレスホルモン濃度、頸部筋の筋電図などに代表される指標に基づいて定量的に測定することができる。2MT によって誘発した先天的恐怖と、あらかじめ電気ショックと恐怖関連学習させた Anisole の匂いを嗅がせることで誘発した後天的恐怖は、上述した既知の恐怖指標からは同等であった。しかし、先天的恐怖刺激(2MT)と後天的恐怖刺激によって誘発される皮膚温には明らかな違いが見られた。先天的恐怖刺激を受けたマウスは、後天的恐怖刺激を受けたマウスとは異なり、背骨に沿って皮膚体温が約 3°C 低下した。恐怖は様々な言語で「背筋が凍る」と表現されるが、先天的恐怖はこの表現に一致した生理応答を誘発することが明らかになった。このような体表面温度の変化は後天的恐怖刺激によっては誘発

されず、後天的恐怖刺激を与えることで体表面温度に有意な変化は認められなかった。次に、埋め込み型のテレメトリーシステムを用いて、体深部温度と心拍数を解析した。その結果、先天的恐怖刺激を提示することで、体表面温度の低下に伴い、体深部温度も $\sim 3^{\circ}\text{C}$ 低下することが明らかになった。一方、後天的恐怖刺激を提示したマウスでは、体温は 0.5°C 上昇した。この結果は、これまでの後天的恐怖刺激に伴う体温変化を解析した先行研究と一致する結果であった。興味深いことに、先天的恐怖刺激(2MT)を長時間作用させると、5 時間後には体温が環境温度近くまで低下し、2 時間後には運動量がほぼ完全に減少した。これは、一過性の冬眠のような状態である torpor の状態に類似していた。その後、2MT を除去すると、体温は回復し、マウスは正常に行動するようになった。一方で心拍数に関しては、後天的恐怖刺激ではこれまでの先行研究と同様にわずかな心拍数上昇が検出されたが、先天的恐怖刺激では数分以内に心拍数が大きく変化し(最大 50%低下)、恐怖症患者で観察される生理的反応と同様の現象が見られた。

後天的恐怖は電気ショックに加えて、塩化リチウム(LiCl)の腹腔内(IP)注射によっても誘発することができる。そこで、LiCl の IP 注射によって恐怖関連学習を行った匂い(anisole)により後天的恐怖を誘発した際の生理応答を解析した。その結果、LiCl の IP 注射は体温と心拍数の両方の低下を誘発した。これに対し、LiCl の IP 注射によって恐怖関連学習を行った匂い(anisole)により後天的恐怖を誘発した際には体深部温度の上昇が検出された。

続いて、2MT 以外の先天的な恐怖刺激でも低体温や徐脈が誘導されるかどうかを明らかにするための実験を行った。狭い空間での拘束は、食物や水を得ることができず、死に至る可能性があるため、先天的な恐怖を誘発すると考えられている。マウスに拘束刺激を加えたところ、拘束による先天的恐怖刺激も、体温と心拍数の低下をもたらすことが明らかになった。

以上の結果は、刺激の種類にかかわらず、先天的な恐怖刺激は体温の低下をもたらし、後天的な恐怖刺激は体温の上昇を引き起こすことを示している。したがって、恐怖は単一の情動状態ではなく、先天的な低体温を伴う恐怖状態と後天的な体温上昇を伴う恐怖状態という、少なくとも2つの異なる恐怖状態が存在するというモデルを示唆している。

体温の低下は、体表面での熱交換の促進、または熱産生の抑制のいずれかによって達成される。熱交換は、末梢血流を増加させることで達成される。そこで、レーザードップラー血流計を用いて末梢血流を測定したところ、先天的恐怖刺激(2MT)は後天的恐怖刺激よりも寧ろ強く末梢血流を抑制することが確認された。この結果は、2MT によって引き起こされる低体温が、熱交換の促進ではなく、熱産生の抑制によって引き起こされることを示唆していた。マウスでは、褐色脂肪組織(BAT)が体温の恒常性維持に大きく寄与しており、BAT の熱産生には Uncoupling

protein 1 (UCP1)が重要な役割を果たしていることが知られている。従って、先天的な恐怖刺激によって引き起こされる低体温の原因は、UCP1 の阻害である可能性が考えられた。室温 30°C の thermo neutral な環境下では、体温を維持するためのエネルギー消費は少なく、UCP1 依存性の熱産生はほとんど抑制されることが報告されている。しかしながら、このような条件下でも、2MT は低体温を誘導することが明らかになった。さらに、UCP1 ノックアウト(KO)マウスでも、2MT は体温低下を誘発することが明らかになった。これらの結果は、2MT が UCP1 を介した熱産生を抑制するのではなく、通常の状態では一定と考えられる基礎代謝を抑制することを示唆している。この仮説と一致するように、2MT は呼吸数、血中酸素飽和度、酸素消費量を抑制した。同じく低体温を誘導する冬眠や torpor は酸素飽和度を低下させないが、2MT の刺激は酸素飽和度を顕著に低下させた。正常な状態であれば、酸素飽和度の低下は低酸素性換気反応(HVR)を引き起こすはずである。しかし、2MT による低体温状態では、酸素飽和度が低下したにもかかわらず、呼吸数は増加しなかった。これは、2MT の刺激が HVR を抑制することを示唆している。以上の結果は、2MT による体温低下は冬眠/torpor とは異なるメカニズムにより制御されていることを示唆している。今後、先天的恐怖の低体温誘発メカニズムを明らかにすることで、新たな温度制御メカニズムや生理学的意義が明らかにされることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Wang Y, Cao L, Lee CY, Matsuo T, Wu K, Asher G, Tang L, Saitoh T, Russell J, Klewe-Nebenius D, Wang L, Soya S, Hasegawa E, Chérasse Y, Zhou J, Li Y, Wang T, Zhan X, Miyoshi C, Irukayama Y, Cao J, Meeks JP, Gautron L, Wang Z, Sakurai K, Funato H, Sakurai T, Yanagisawa M, Nagase H, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Beutler B, Liu Q. Large-scale forward genetics screening identifies Trpa1 as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nat Comm.* 9(1): 2041 (2018) 査読あり

(2) Sato T, Katsuoka Y, Yoneda K, Nonomura M, Uchimoto S, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Mizutani Y. Sniffer mice discriminate urine odours of patients with bladder cancer: A proof-of-principle study for non-invasive diagnosis of cancer-induced odours. *Sci Rep.* 7(1):14628 (2017). 査読あり

[学会発表] (計2件)

(1) Reiko Kobayakawa. Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy

between innate and learned fear. 第40回日本神経科学大会、2017年7月20～23日、千葉(2017)

(2) 小早川 令子、花尻 瑠璃、小早川 高「D9-THC, JWH-018m 5-fluoro-ADBが誘発するマウスの脳活動と行動」、日本法中毒学会第36回年会、2017年7月6～7日、東京(2017)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小早川 令子 (KOBAYAKAWA, Reiko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40372411