

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07761

研究課題名(和文) MRIを用いた匂いやフェロモンに応答する嗅神経ネットワークの時空間解析

研究課題名(英文) MRI-based spatiotemporal analyses of olfactory neural networks that sense odors and pheromones

研究代表者

吉永 壮佐 (YOSHINAGA, Sosuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・講師

研究者番号：00448515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物は、種の保存や生命の危機回避において、嗅覚を通じて外界から様々な情報を得ている。フェロモンや匂い物質といった化学物質がその情報の担い手であり、情動や行動、生理的变化を引き起こす。本研究は、MRIを用いて、嗅覚刺激に応じた脳活性化を検出する基盤技術を確認し、活性化する脳領域、および、その脳領域間の機能的なつながりを可視化することを目的とした。コンピュータ制御の嗅覚刺激装置を開発し、嗅覚刺激を精密に時間制御することにより、MRIによる検出感度の向上に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、それぞれのフェロモンや匂い物質により誘起される性行動や生理的变化と、活性化される嗅神経ネットワークとの関係性を明らかにするための基盤技術の開発に成功した。この技術を利用して実験データを蓄積することにより、性行動に影響する物質の同定および開発、さらには、実験用マウスの作製の促進や野生ネズミの繁殖制御につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Olfaction is one of the most important perceptions for animals to receive information from their environments, such as in case of species preservation and danger avoidance. The information is transmitted through odor and pheromone substances, resulting in emotional, behavioral or physiological changes. Here, we aimed to develop MRI-based fundamental technologies to detect odor-evoked brain activations and reveal the activated brain regions and their connectivities. We successfully developed a computer-based odor stimulation system to give precisely time-regulated odor stimulations, resulting in sensitivity improvement of MRI detection of odor responses.

研究分野：磁気共鳴

キーワード：匂い フェロモン 脳・神経 MRI 嗅覚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物は、嗅覚を通じて外界から様々な情報を得ている。特に、外界の情報収集の多くを化学感覚に依存する動物では、種の保存や生命の危機回避において、嗅覚の果たす役割は大きい。フェロモンや匂い物質といった化学物質がその情報の担い手であり、情動や行動、生理的变化を惹き起こす。

連携研究者の東原(東大院・農学生命)らは、オスマウスの涙腺からフェロモン活性物質を単離・精製した。その結果、分子量約7千のペプチド性の物質を同定し、ESP1と命名した(Kimoto *et al.*, *Nature*, 2005)。また、鋤鼻器官に発現する数百種類のGタンパク質共役受容体(GPCR)のうち、細胞外領域の長いクラスCタイプに属するV2Rp5によってESP1が選択的に受容されることを明らかにした(Haga *et al.*, *Pure Appl. Chem.*, 2007)。さらに、ESP1がメスマウスの性行動を誘発する性フェロモンであることを実証した(Haga *et al.*, *Nature*, 2010)。ESP1は、リガンド~受容体~性行動という一連のシグナルの流れが明らかになった哺乳類において唯一のペプチド性フェロモンである。近年には、ESP1がオスマウスの攻撃性を増強する、つまり、性特異的に異なる活性をもつことも明らかにした(Hattori *et al.*, *Curr. Biol.*, 2016)。

研究代表者は、連携研究者らとの共同研究のもと、核磁気共鳴法(NMR)を用いてESP1の立体構造決定に成功した(Yoshinaga *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2013; 谷口ら, *化学と生物*, 2013)。また、変異体解析により、受容体結合部位を明らかにし、受容体との複合体モデルを提唱した。本研究成果は、哺乳類のペプチド性フェロモンと受容体の構造的知見を初めて提供した。

2. 研究の目的

本研究課題において、これまで培ってきた研究成果を発展させ、匂い物質やフェロモンの情報が、受容体の発現する嗅上皮・鋤鼻器官から嗅球・副嗅球を経て、脳深部へと至る嗅神経ネットワークの中で、活性化される脳領域とその脳領域間の機能的なつながりを可視化することを考えた。脳内の各領域は、安静時においても自発的に神経活動を同期させた神経ネットワークを構築していることが分かっている(Raichle *et al.*, *PNAS*, 2001)。外部からの刺激や精神病態により、個々の神経ネットワークが活性化される、あるいは逆に鎮静化されることが知られている(Fox and Raichle, *Nature Rev. Neurosci.*, 2007)。これらの知見は、磁気共鳴イメージング法(MRI)の一種であり、神経活動の同期性を脳血流変化の同期性を通じて検出するresting-state functional MRI(rsfMRI)法(Biswal *et al.*, *Magn. Reson. Med.*, 1995)を用いて主に明らかにされてきた。マウスは脳が小さくMR信号値が低いためrsfMRI法を長らく適用できなかったが、近年、小動物用高磁場MRI装置の普及にともない、マウスに対する適用例が報告された(Jonckers *et al.*, *PLoS ONE*, 2011)。しかしながら、マウスの嗅覚研究へrsfMRI法を適用した報告例は無かった。

本研究は、嗅覚刺激に応じたマウスの脳血流変化の同期性をrsfMRI法により検出するための基盤技術を確立し、匂い物質やフェロモンにより活性化される脳領域、および、その脳領域間の機能的なつながりを可視化することを目的とする。

本研究の成果は、マウスの性行動に影響する物質の同定および開発、さらには、実験用マウスの作製の促進や野生ネズミの繁殖制御につながることを期待される。

3. 研究の方法

すべてのMRI撮像には、マウス脳を高空間分解能かつ高感度で撮像する必要があるため、高磁場7テスラMRI装置とマウス脳用極低温信号検出器(ともに、Bruker BioSpin社製)を用いた。マウスは、8~10週齢のC57BL/6Nを使用した。すべての実験において、マウスの呼吸数をモニタリングし、直腸体温は 37 ± 1 を保持した。

(1) 従来の機能的MRI法を用いた嗅覚刺激応答の解析システムの最適化

rsfMRIでは、刺激に応じた一過性の脳活動を計測する従来の機能的MRI(fMRI)と比較して、マウスの生理状態をより長期間安定に維持した撮像が要求される。そのため、ラジオ波の連続照射による傾斜磁場コイルの温度上昇に起因するMR信号変化が顕著に生じないように、rsfMRIに用いられるGRE-EPI法による撮像のパラメータを最適化した。マウスの体温維持のため、MRIボア内におけるマウス固定ベッド周辺の保温環境を改善した。また、マウスの麻酔条件について、近年、rsfMRIへの適用が増加してきたメドトミジンを用いて、弱い鎮静条件下において検討した。さらに、コンピュータ制御の嗅覚刺激装置(図1)を開発し、撮像に対する嗅覚刺激のタイミングと曝露時間を検討した。解析には、繰り返し連続刺激と独立成分解析(ICA: Independent Component Analysis)を組み合わせることで、高感度に刺激応答部位を検出することを試みた。

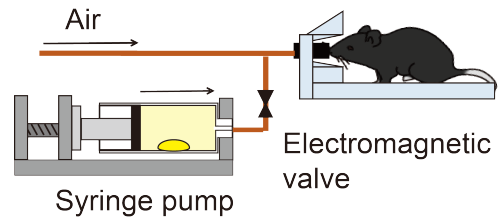
(2) 覚醒下マウスにおけるrsfMRI法の適用

MRI撮像対象の動きによる画像ぶれを防ぐため、従来、動物のMRIでは、麻酔と固定具を用いて動きを抑制するのが常法である。しかしながら、麻酔にともなう脳機能の鎮静化の影響により、知りたい脳機能情報を正確に得ることが難しいため、近年、覚醒下のマウスにおいてMRI撮像を実施する手法が脚光を浴びている。本研究では、マウス服を用いた動物固定法(図3)を開発し、覚醒下のマウスにおけるrsfMRI法の適用の検討を進めた。

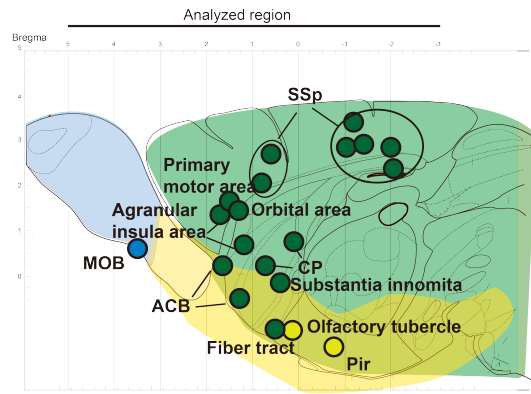
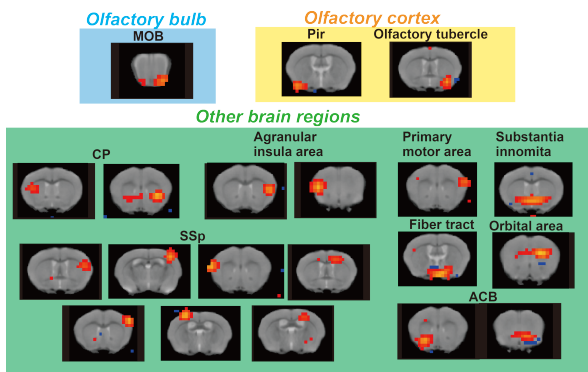
4. 研究成果

(1) 従来の機能的 MRI 法を用いた嗅覚刺激応答の解析システムの最適化

本研究において開発した嗅覚刺激装置をパーソナルコンピュータ上のソフトウェアを用いて操作し、オスマウスに対して、誘因作用をもつムスコン(ジャコウジカ由来のフェロモン様物質)にて、24回の繰り返しの連続刺激を与えた(図1)。得られたMRIデータにおいて、刺激周期とMR信号変化の周期が同期する脳領域をICAにより抽出した(図2)。その結果、嗅覚刺激に対する応答が想定される嗅覚伝導路に含まれる主嗅球(青色)や嗅皮質(黄色)において応答が観測された。さらに、これらの領域に加えて、高次脳における複数の脳領域(緑色)において応答が観測された。本研究により、嗅覚刺激を精密に時間制御することが、検出感度の向上に必須であることが示された。



(図1)コンピュータ制御の嗅覚刺激装置
電磁弁とシリンジポンプをコンピュータにより制御することにより、嗅覚刺激物質の飽和蒸気をマウスへ精密な時間制御(誤差0.1秒)の下で与えることができる。



(図2)ムスコンにより応答したマウス脳領域

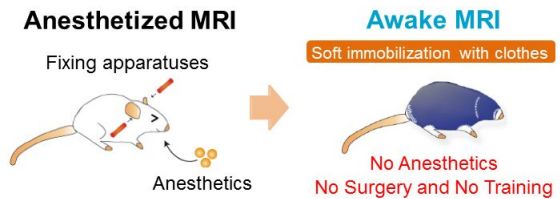
(左)ICAにより抽出した刺激周期とMR信号変化の周期が同期する20か所の脳領域の活性化マップを表示した。有意差が大きい順に、黄色~橙色で示した。背景はマウスのMRI標準画像とした。

(右)(左)において示した脳領域を、マウスのアトラス(矢状断面)にマッピングした。脳領域の色分けは(左)と対応させた。

(2) 覚醒下マウスにおける rsfMRI 法の適用

覚醒下におけるマウスの脳機能画像を取得するため、無麻酔状態でマウスをMRI装置内に固定する手法の開発を行った。マウス脳用極低温信号検出器に適合したマウス服をデザインして用いた(図3)。服のデザイン改良の結果、麻酔下の画像のSNRには及ばないが、高品質な画像を取得することに成功した(図4)。本固定法を用いてrsfMRI解析を行った結果、大脳皮質間の活性化ネットワーク、および、大脳辺縁系の脳領域間の活性化ネットワークに相当するものを捉えることができた(図5)。

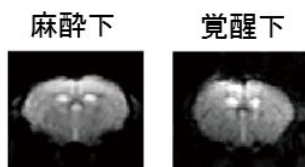
本研究により、覚醒下における嗅覚刺激応答を観測する基盤技術を整えることができた。



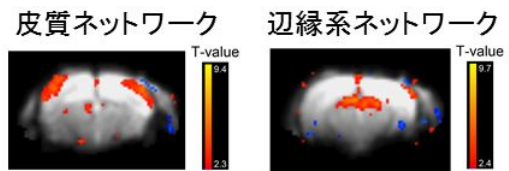
(図3)麻酔下MRI法とマウス服を用いた覚醒下MRI法

(左)従来の動物のMRIでは、麻酔と固定具を用いて動きを抑制する。

(右)本研究の覚醒下MRIでは、マウス服を用いて固定し麻酔を用いない。



(図4)麻酔下および覚醒下のMRI画像
従来の麻酔下(左)および、本研究の覚醒下(右)のマウス脳のGRE-EPI画像を示した。



(図5)覚醒下rsfMRIにおける活性化領域
rsfMRIにおいて見出された活性化ネットワークを示した。色分けは、図2と同じ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi, F., Takeda, M., Yuzuriha N., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Odor stimulation by automated syringe pumps in combination with independent component analysis for BOLD-fMRI study of mouse whole brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 3685-3685
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 Yoshinaga, S., Fujiwara, S., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., and Terasawa, H.	4. 巻 27
2. 論文標題 An awake mouse MRI method using mouse clothes for fMRI applications.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 3689-3689
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 Toyoda, H., Yoshinaga, S., Takeda, M., and Terasawa, H.	4. 巻 27
2. 論文標題 A novel reconstruction method using regional constraints, designed for the dual-band EPI scanned with four-channel receiver coil elements.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 2440-2440
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 Hayashi, F., Yoshinaga, S., Yuzuriha N., Takeda, M., and Terasawa, H.	4. 巻 26
2. 論文標題 BOLD-fMRI comparison of olfactory responses in the mouse whole brain, with different odors and anesthesia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 2309-2309
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 Funatsu, H., Hayashi, F., Yoshinaga, S., Takeda, M., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., and Terasawa, H.	4. 巻 25
2. 論文標題 A BOLD analysis of the olfactory perception system in the mouse whole brain, using independent component analysis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 5363-5363
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 Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Takeda, M., and Terasawa, H.	4. 巻 25
2. 論文標題 An optimized slice-GRAPPA reconstruction method to reduce leakage artifacts in small-animal multiband imaging.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 3844-3844
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18件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Hayashi, F., Takeda, M., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Odor stimulation by automated syringe pumps in combination with independent component analysis for BOLD-fMRI study of mouse whole brain
3. 学会等名 27th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshinaga, S., Fujiwara, S., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 An awake mouse MRI method using mouse clothes for fMRI applications
3. 学会等名 27th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyoda, H., Yoshinaga, S., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 A novel reconstruction method using regional constraints, designed for the dual-band EPI scanned with four-channel receiver coil elements
3. 学会等名 27th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujiwara, S., Yoshinaga, S., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 An awake mouse MRI method using mouse clothes for functional MRI
3. 学会等名 第47回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda, M., Hayashi, F., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., Terasawa, H.
2. 発表標題 Machine-controlled rigorously periodic odor stimulation and group independent component analysis for functional MRI studies of odor responses in mice
3. 学会等名 第47回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda, M., Hayashi, F., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., Terasawa, H.
2. 発表標題 Odor-evoked responses in mouse whole brain as detected by BOLD-fMRI analyses with periodic stimulation and independent component analysis
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田光広、林 芙優、杠 直哉、吉永壮佐、寺沢宏明
2. 発表標題 周期的刺激と独立成分解析を用いたマウス嗅覚応答の機能的MRI研究
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda, M., Hayashi, F., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., Terasawa, H.
2. 発表標題 BOLD-fMRI study of muscone-evoked activations in the whole brain of mice using periodic stimulation and independent component analysis
3. 学会等名 ISMRM日本支部第4回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi, F., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 BOLD-fMRI comparison of olfactory responses in the mouse whole brain, with different odors and anesthesia.
3. 学会等名 Joint annual meeting ISMRM-ESMRMB 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi, F., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Machine-controlled rigorously periodic odor stimulation and independent component analysis for detecting odor responses in the mouse whole brain.
3. 学会等名 第46回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田光広, 林芙優, 杠直哉, 吉永壮佐, 寺沢宏明
2. 発表標題 周期的匂い刺激と独立成分解析を利用したマウス全脳の嗅覚応答の検出
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Funatsu, H., Hayashi, F., Yoshinaga, S., Takeda, M., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 A BOLD analysis of the olfactory perception system in the mouse whole brain, using independent component analysis.
3. 学会等名 25th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 An optimized slice-GRAPPA reconstruction method to reduce leakage artifacts in small-animal multiband imaging.
3. 学会等名 25th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hayashi, F., Funatsu, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Detection of the odor response in the mouse whole brain using periodic odor stimulations and independent component analysis (ICA).
3. 学会等名 第45回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakata, E., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Improvement of an awake mouse MRI method using mouse clothes for a cryogenic coil system.
3. 学会等名 第45回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Funatsu, H., Hayashi, F., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Detection of the odor BOLD response in the mouse whole brain, using independent component analysis (ICA).
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hayashi, F., Funatsu, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., Takeda, M., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Evaluation of anesthesia conditions for detecting odor responses in the mouse whole brain.
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 芙優、吉永 壮佐、杠 直哉、武田 光広、寺沢 宏明
2. 発表標題 BOLD法を用いた異なる匂い刺激および麻酔下におけるマウス高次脳の嗅覚応答の比較
3. 学会等名 ISMRM日本支部第2回学術集会
4. 発表年 2018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
連携研究者	寺沢 宏明 (TERASAWA Hiroaki) (10300956)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授 (17401)	
連携研究者	東原 和成 (TOUHARA Kazushige) (00280925)	東京大学・農学生命科学研究科・教授 (12601)	