

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05842

研究課題名(和文)MRIを用いた匂い・フェロモンと行動等の嗅覚応答を関連づける情報処理機構の解明

研究課題名(英文)MRI-based analyses of olfactory information processing mechanism underlying relationships between odor/pheromone substances and olfactory responses such as behaviors

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) 3,400,000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、嗅覚刺激による脳活性化の位置情報と時間情報を得るMRI基盤技術を開発した。コンピュータプログラム制御の匂い曝露装置を用いて高精度で周期的に嗅覚刺激を与え、独立成分解析を組み合わせることにより、高い時間分解能の解析条件の検討、ならびに、動物麻酔条件の最適化を実施し、機能的MRIを用いて、異なる行動・情動を引き起こす匂い物質に応じて活性化される脳領域が明確に異なることを示す実験データの取得に成功した。

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集積することにより、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ことを期待される。

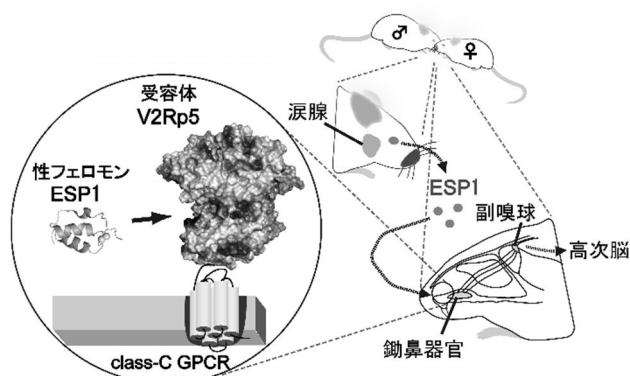
研究成果の概要(英文)：Olfaction is one of the most important perceptions for animals to receive information from their environments, such as in case of species preservation and danger avoidance. The information is transmitted through odor and pheromone substances, resulting in emotional, behavioral or physiological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

研究分野：Preclinical MRI

キーワード：匂い フェロモン 脳・神経 MRI 嗅覚

1. 研究開始当初の背景

研究協力者である東原ら(東大院・農学生命)は、オスマウスの涙腺から新規なペプチド性フェロモン ESP1 を単離した (*Nature*, 2005)。ESP1 は鋤鼻器官上の受容体 V2Rp5 と結合し、メスマウスの性行動などを引き起こす。研究代表者は、溶液 NMR 法を用いて ESP1 の立体構造を決定し、受容体結合部位を同定した。これらの情報に基づいて性フェロモンと受容体との複合体モデルを提唱した(図1)(*J. Biol. Chem.*, 2013; 化学と生物, 2014)。本成果は、哺乳類のペプチド性フェロモンの受容体認識に関する初の構造的知見である。



(図1)性フェロモン ESP1 の認識と嗅神経回路

以上の独自の成果と蓄積した技術に基づいて、嗅覚受容から脳内活性化を経て、情動や行動、生理的变化の誘起に至る嗅覚シグナリングの全貌解明を計画した。

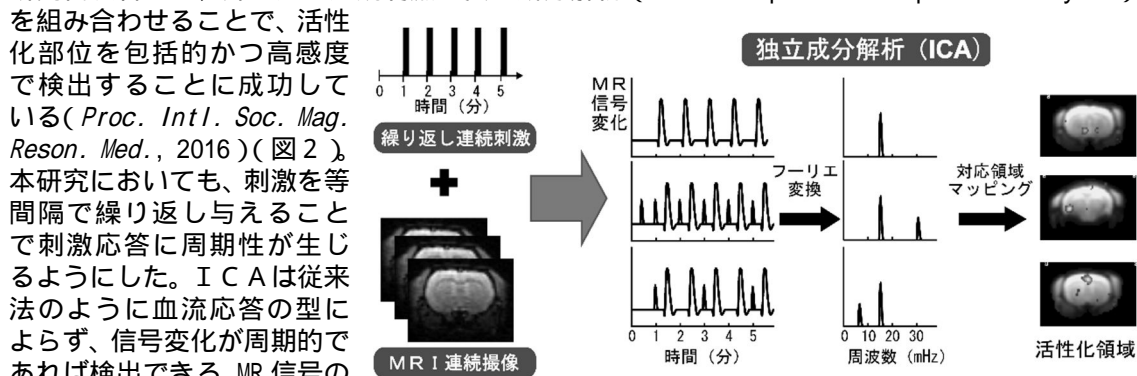
2. 研究の目的

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、嗅覚刺激による脳活性化の位置情報および時間情報を得る MRI 解析基盤技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、fMRI を用いて嗅覚刺激によってネットワーク状に活性化される複数の部位を包括的かつ高時間分解能で解析する必要がある。現在汎用されている fMRI である BOLD 法は、刺激によって生じる MR 信号の変化が一般的な血流応答の型に適合していないと検出が難しい。研究代表者は、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、活性化部位を包括的かつ高感度で検出することに成功している (*Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 2016) (図2)。



(図2) 繰り返し連続刺激と ICA を用いた高感度検出

の周波数と一致する成分を抽出するため、ノイズの影響を排除して見落としがない。さらに、繰り返しの積算効果によって S/N 比が向上するため、高感度で活性化を検出できる。

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 社製)を用いた。マウスは、7 ~ 10 週齢の C57BL/6N 雄マウスを使用した。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。麻酔は、動物固定時にはイソフルラン、fMRI 撮像時にはメドトミジン単独、あるいは、メドトミジンとケタミンの併用麻酔とし、腹腔内より、急速投与ならびに維持投与を行った。マウスに対して、自動制御された匂い曝露装置を利用してムスコあるいはイソアミルアセテートの飽和蒸気を曝露した。T₂* 強調画像の撮像中に、匂い刺激を 5 秒 ON 5 秒 OFF のサイクルにて 12 回繰り返した。取得した撮像データについて、T₂* 強調画像を介してマウス標準脳に対して変形して標準化を行った。その後、グループ ICA 解析を適用して検出した活性化領域の中から、匂い刺激と同周期で信号強度が変動したものを選別し、明らかに擬陽性であるものを目視で除外した。

4 . 研究成果

嗅覚刺激物質の飽和蒸気を封じ込めたシリンジと接続したチューブラインに設けた電磁弁、および、シリンジポンプをコンピュータプログラムにより制御することにより、嗅覚刺激を自動で与える実験システムの開発を進めた。自動化により、刺激のタイミング誤差を 0.1 秒以下に抑えることで、高時間分解能を達成した。

一方、マウスの機能的 MRI における問題点として、撮像中に頭が動かないように動物ベッドへ固定するために用いる麻酔による脳神経活動への影響が挙げられる。近年、覚醒時の脳状態と近い麻酔条件として、メドミジンとイソフルランの低用量同士の併用麻酔が標準条件として提唱され、世界中で用いられている。しかし、嗅覚刺激実験においては、イソフルランは匂いのあるガス麻酔であるため、利用が出来ない。そのため、メドミジンの単独麻酔で実験が実施されることも多い。近年、麻酔利用時と比較して低用量のケタミンが神経伝達に対して脱抑制効果を示すことが報告された。

本研究において、メドミジン単独麻酔と、メドミジンとケタミンの低用量同士の併用麻酔の条件の間で、ムスコ刺激応答を機能的 MRI により比較した。その結果、ケタミン併用麻酔において、有意に脳活性化が高く見られた。ケタミン併用麻酔は、高感度に嗅覚応答を捉えるために有用であると考えられる。

メドミジンとケタミンの併用麻酔の条件のもとで、上記のように開発したコンピュータプログラム制御の匂い曝露装置を用いて、高精度で周期的に嗅覚刺激を与えて、独立成分解析を組み合わせるにより、BOLD-ICA の実験と解析を実施した。

強いバナナ臭を発するイソアミルアセテートの刺激時には、嗅球、嗅皮質、および、それ以外の大脳領域にわたって、計 3 2 箇所 of 活性化領域が検出された。主嗅球では、背外側および腹内側に活性化領域が検出され、先行研究の結果と一致した。

一方、嗅覚刺激として比較的弱いムスコの刺激時には、計 2 1 箇所 of 活性化領域が、嗅球、嗅皮質、および、それ以外の大脳領域に検出された。嗅球については、腹側に活性化領域が検出され、嗅皮質に検出された活性化領域も含めて、研究協力者が実施した免疫組織化学的解析の結果と一致した。さらに、嗅覚野以外の領域に広範囲に活性化領域が新たに検出された。特に、報酬系の領域である側坐核における活性化はムスコ特有であった。そのため、ムスコのオスマウス誘因作用により惹き起こされたものであると考えられた。

以上により、本研究において、嗅覚刺激による脳活性化の位置情報および時間情報を得るための MRI 解析基盤技術の開発を進めることができた。

本技術を利用して、個々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ことも期待される。

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 0件）

1. 著者名 Yoshinaga, S., Tsubakihara, Y., Fukumoto, T., Maita, S., Takeda, M., and Terasawa, H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Whole-brain fMRI study of mice under medetomidine/ketamine anesthesia to identify brain regions activated by musk odors.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 4022
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 Tsubakihara, Y., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Functional MRI study of olfactory responses evoked by musk odor in the mouse whole brain under medetomidine anesthesia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 2929
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., Takeda, M., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Muscone-evoked activations in the whole brains of mice, studied by the BOLD method using periodic stimulation and independent component analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.	6. 最初と最後の頁 3946
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9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 楢原 由美子, 武田 光広, 吉永 壮佐, 寺沢 宏明
2. 発表標題 機能的 MRI によるマウス嗅覚応答の研究：ムスク臭応答の独立成分解析
3. 学会等名 第16回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋原由美子, 武田光広, 吉永壮佐, 寺沢宏明
2. 発表標題 匂いと行動を関連づける脳活性化経路の機能的MRI : ムスク臭により誘因刺激したマウスの脳活性化部位の解析
3. 学会等名 第49回日本磁気共鳴医学会大会 前臨床MRIスタディグループ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsubakihara, Y., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 fMRI study of brain activation pathways connecting odor stimulation and behaviors: Analysis of activations evoked by attractive odor, muscone
3. 学会等名 第49回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeda, M., Tsubakihara, Y., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Whole brain functional MRI study of mice olfaction: from perception to behaviors
3. 学会等名 ISMAR-APNMR 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋原由美子, 武田光広, 吉永壮佐, 寺沢宏明
2. 発表標題 周期的匂い刺激とグループ独立成分解析を利用したマウス嗅覚応答の機能的 MRI 解析
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsubakihara, Y., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Functional MRI study of olfactory responses evoked by musk odor in the mouse whole brain under medetomidine anesthesia
3. 学会等名 2021 ISMRM & SMRT Annual Meeting & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田光広、椿原由美子、吉永壮佐、寺沢宏明
2. 発表標題 機能的MRIを用いた匂い刺激と行動を結びつけるマウスの脳活性化経路の解明：誘引性匂い物質ムスコンによる刺激と独立成分解析の適用
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsubakihara, Y., Takeda, M., Hayashi, F., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Functional MRI studies of mouse whole brain stimulated by mouse odor with independent component analysis
3. 学会等名 第48回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayashi, F., Takeda, M., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.
2. 発表標題 Muscone-evoked activations in the whole brains of mice, studied by the BOLD method using periodic stimulation and independent component analysis
3. 学会等名 2020 ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) & SMRT (Society for MR Radiographers & Technologists) Virtual Conference & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2020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	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)	
研究 分担者	武田 光広 (Takeda Mitsuhiro) (90508558)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教 (17401)	

	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 協力者	白須 未香 (Shirasu Mika)		
研究 協力者	東原 和成 (Touhara Kazushige)		

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