

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23041

研究課題名(和文) 味覚嫌悪学習における扁桃体中心核の役割

研究課題名(英文) The role of the central nucleus of the amygdala in conditioned taste aversion

研究代表者

乾 賢 (Inui, Tadashi)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40324735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：味覚嫌悪学習の中枢神経機序を明らかにすることを目標とした。本研究課題では、これまでの知見に基づいて、扁桃体中心核の役割を調べることを目的とした。微細行動分析システムを構築し、化学遺伝学的手法による神経活動の制御が摂取行動に及ぼす影響を調べた。興奮性人工受容体を扁桃体中心核ニューロンに導入した後、甘味溶液に対する条件づけを行った。テストにおいて人工リガンドを投与したところ、溶媒を投与した対照群に比べて甘味溶液の摂取が増加した。この増加は不味と不安の減弱によるものであることがわかった。したがって、扁桃体中心核は味覚嫌悪学習においてみられる不味・不安による摂取抑制に関わ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

摂食障害の一つである神経性食欲不振症は食事制限や過剰な運動が契機となって発症し、栄養失調や長期に渡る痩せを引き起こす。場合によっては死に至る深刻な疾患であるが有効な治療法はない。罹患者は食物に対する不味や不安を感じる傾向にある。したがって、食物摂取後の体調不良が契機となる味覚嫌悪学習は発症機序が異なるものの、不味や不安による摂取の抑制という点で、神経性食欲不振症と症状が共通している。本研究によって扁桃体中心核が味覚嫌悪学習における不味と不安による摂取抑制に関わることが示唆された。したがって、扁桃体中心核を対象として神経性食欲不振症の新たな治療法を開発する意義が本研究によって示された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the neural mechanisms underlying conditioned taste aversion (CTA), this project aimed to investigate the role of the central nucleus of the amygdala (CeA) in the retrieval of CTA. We developed a microstructural behavioral analysis system and examined the effect of manipulation of the neuronal activities in the CeA on ingestive behavior. Mice induced with inhibitory designer receptors in the CeA neurons were conditioned aversion to a sweet taste solution. The mice were injected with a designer ligands (Experimental group) or vehicle (Control group), and then exposed to the sweet taste solution. The Experimental group drank larger volume of the solution than the Control group. The behavioral analysis showed that the increased intake was caused by attenuation of disgust and anxiety to the solution. Therefore, it is suggested that the CeA neurons mediate disgust and anxiety during the retrieval of CTA.

研究分野：行動生理学

キーワード：味覚嫌悪学習 扁桃体中心核 神経性食欲不振症 行動 化学遺伝学的手法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔機能の最も重要な役割は摂食にある。口腔の感覚情報が中枢へ入力し、最終的に摂食という行動として表出する。この口腔から摂食行動へと至る生理的メカニズムを明らかにするために、本研究の開始までに味覚嫌悪学習の中枢神経機序を調べる研究を行ってきた。その結果、本研究に関わる4つの知見を得た。1) 扁桃体基底外側核は条件刺激に対する不味と不安に関与している (Inui et al., 2019)。2) 扁桃体基底外側核のニューロンは条件刺激の情報を遠心性に伝達している。その投射先は側坐核、分界条床核、扁桃体中心核である (Inui et al., 2013)。3) 側坐核は条件刺激に対する不味に関与している (Inui et al., 2011)。4) 分界条床核は条件刺激に対する不安に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

扁桃体中心核は脳幹の一次・二次味覚中継核から入力を受ける。Inui et al. (2013) において味覚嫌悪学習への関与が示唆されたが、その詳細な役割は不明であった。そこで、化学遺伝学的手法による扁桃体中心核ニューロンの制御が条件刺激に対する不味や不安にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

研究期間の前半では、先行研究 (Inui et al., 2019) で開発したラット用の微細行動分析システムをマウス用に設計し直し、作製することとした。研究の後半で、作製した装置を用いて扁桃体中心核の神経活動制御の影響を調べることにした。

3. 研究の方法

実験1: 微細行動分析システムの再構築

先行研究と同様に摂取行動と接近行動の経時的変化を検出できるように設計した。汎用性の高い装置とするため、市販品を用いて作製した。装置が正常に作動することを確認するために、味覚嫌悪学習による行動の変化を分析した。16匹の雄性マウス (C57/BL6, 日本クレア) を用いた。行動実験の初日は微細行動分析システムのチャンバー内にマウスを15分間滞在させ環境に馴化させた。その日の夕方16時に給水ボトルをホームケージから取り除いて給水制限を行った。翌日の9時~10時の間にマウスをチャンバーに移動させ、イオン交換水を15分間呈示した。終了直後にマウスをホームケージに戻した。正午から16時までホームケージに給水ボトルを戻して補給を行った。この飲水訓練を5日間行った。最後の飲水訓練の翌日に条件づけをおこなった。半分の8匹の個体(条件づけ群)には条件刺激として0.2%サッカリン溶液を15分間呈示し、直後に無条件刺激として体重の2%量の0.3M塩化リチウムを腹腔内投与した。残りの8匹(非条件づけ群)には無条件刺激として生理食塩水を投与した。条件刺激呈示の3時間後から給水ボトルを戻して回復させた。条件づけの翌々日の16時に再び給水ボトルを取り除いた。翌日の9時から10時の間にイオン交換水を15分間呈示して、動物が正常な飲水行動を示すことを確認した。その後同様のスケジュールで、2日おきに条件刺激を呈示するテストを3回行った。

実験2: 扁桃体中心核ニューロンの不活性化

化学遺伝学的手法として、アデノ随伴ウイルスによる人工受容体遺伝子の導入をおこなった。ヒト改変アセチルコリン受容体M3 (hM3Dq) の遺伝子配列を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター (AAV8-hSyn-hM3dq-mCherry, Addgene社) を雄性マウス (C57/BL6, 日本クレア) の両側の扁桃体中心核に注入した (0.3 μ l/side)。hM3dqを神経細胞に発現させるために、少なくとも2週間の回復期間を置いてから行動実験を開始した。

実験1と同様に馴化と飲水訓練を行った。条件づけでは全ての個体に対して0.2%サッカリン溶液と0.3M塩化リチウムの対呈示を行った。実験1と同様にテストを3回行った。1回目のテストで動物が味覚嫌悪学習を獲得したことを確認した。摂取量の平均値に差が生じないように動物を実験群と対照群の2群に分けた。2回目のテストにおいて、実験群には人工リガンドであるデスクロクロザピン (deschloroclozapine, DCZ; 50 ng/kg) を腹腔内投与し、90分後に条件刺激を呈示した。対照群には溶媒である1%DMSO含有生理食塩水を投与した。薬物投与の49.5時間後にテスト3として再び条件刺激を呈示した。

行動実験終了後に4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、脳を摘出した。厚さ30 μ mの切片を作製し、蛍光蛋白質mCherry (hM3Dq発現のマーカー) とNeuN蛋白質 (ニューロンのマーカー) に対する二重免疫組織化学染色を行い、hM3Dqの発現範囲を確認した。

扁桃体中心核でhM3Dqの発現が確認された個体について、微細行動分析システムを用いて条件づけとテストでの摂取行動と接近行動を解析した。

4. 研究成果

実験1

味覚嫌悪学習の実験結果について、図1に示す。条件づけ群は非条件づけ群に比べて、総リッ

ク数の減少, バーストリック (高頻度リック) の出現回数と持続時間の減少を示した。また, 飲み口へ接近してリックする行動 (Entry-Lick) の頻度が減少した。

実験 2

結果を図 2 に示す。DCZ を投与された実験群は対照群に比べて総リック数の増加, バーストサイズの増大, Entry-Stop 行動の増大を示した。バーストサイズは嗜好性の指標であるため, 実験群では条件刺激に対する不味が減弱したと考えられる。Entry-Stop 行動は接近-回避コンフリクト状態を示しており, 実験群における増大は接近傾向の上昇あるいは回避傾向の低下を示したと考えられる。これらのことから, 扁桃体中心核ニューロンは味覚嫌悪学習の想起において, 条件刺激に対する不味と不安に関与していることが示唆された。

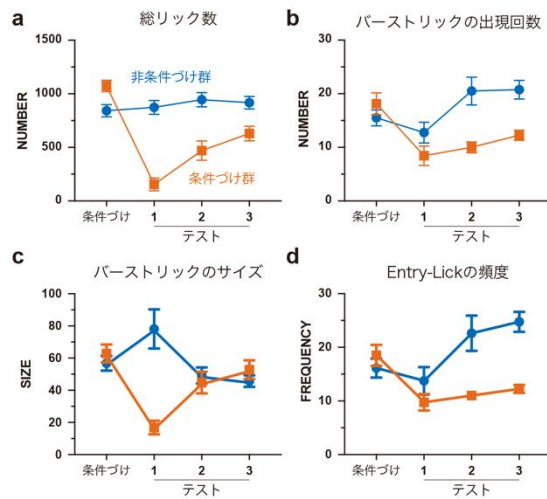


図 1 実験 1 の結果 条件づけと 3 回のテストにおける行動反応の変化 (a) 条件づけによって総リック数が大きく減少した。(b, c) 嗜好性の指標となるバーストリック (高頻度リック) の出現回数とサイズも減少した。(d) 接近行動の指標である Entry-Lick の頻度も減少した。

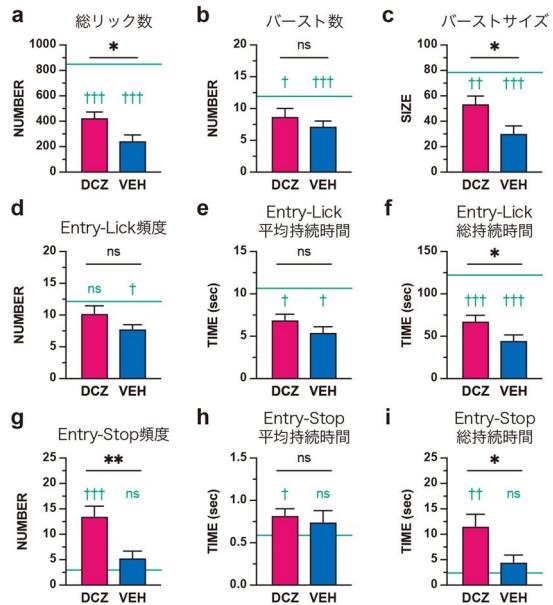


図 2 実験 2 の結果 扁桃体中心核ニューロンの活動亢進による行動反応の変化。人工リガンド (DCZ) の投与によって, 総リック数 (a), バーストサイズ (c), Entry-Lick の総持続時間 (f) が増加した。反対に, Entry-Stop の頻度 (g) と総持続時間 (i) が減少した。緑線は条件づけ時の全個体の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, †は条件づけの値との比較。† $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 乾 賢, 菊池 媛美, 船橋 誠
2. 発表標題 マウス扁桃体中心核ニューロン活動の亢進は味覚嫌悪学習における条件刺激への嫌悪を減弱し, 接近行動を増加させる
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 乾 賢, 菊池 媛美, 船橋 誠
2. 発表標題 味覚嫌悪学習の想起時における条件刺激の撮取と接近は扁桃体中心核ニューロンの化学遺伝学的活性化によって増加する
3. 学会等名 Neuro2022
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
---------	---------