

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02385

研究課題名(和文) 先天的恐怖臭による致死的な低酸素環境での生存能力の誘導原理

研究課題名(英文) Principle of induction of the ability to survive in lethal hypoxic conditions by innate fear odour.

研究代表者

小早川 高 (Kobayakawa, Ko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60466802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：チアゾリン類恐怖臭(tFOs)は、低体温、低代謝を統合誘導し、致死的低酸素下での生存を可能にする。我々は、これらの生理応答の誘発にはTrpa1を介する三叉/迷走神経経路が主要な役割を果たすことを明らかにした。また、Trpa1リガンドのうち、これらの保護的生理作用を誘発するリガンドの満たす条件を明らかにし、その知見に基づき強力な低酸素抵抗性を誘導する新規分子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、tFOが低体温、低代謝、低酸素抵抗性などの保護的生理応答を誘発するメカニズムが明らかになるとともに、メカニズムを研究する過程で極めて強力な低酸素抵抗性を誘導する新規分子を発見し、低酸素関連疾患に対する新たな治療法の可能性を拓いた。

研究成果の概要(英文)：Thiazoline-related innate fear odors (tFOs) orchestrate hypothermia, hypometabolism, and anti-hypoxia, which enable survival in lethal hypoxic conditions. Here, we show that most of these effects are severely attenuated in transient receptor potential ankyrin 1 (Trpa1) knockout mice. tFO-induced hypothermia involves the Trpa1-mediated trigeminal/vagal pathways and non-Trpa1 olfactory pathway. tFOs activate Trpa1-positive sensory pathways projecting from trigeminal and vagal ganglia to the spinal trigeminal nucleus (Sp5) and nucleus of the solitary tract (NTS), and their artificial activation induces hypothermia. tFO presentation activates the NTS-Parabrachial nucleus pathway to induce hypothermia and hypometabolism. TRPA1 activation is insufficient to trigger tFO-mediated anti-hypoxic effects; Sp5/NTS activation is also necessary. Accordingly, we find a novel molecule that enables mice to survive in a lethal hypoxic condition ten times longer than known tFOs.

研究分野：神経科学

キーワード：先天的恐怖臭 低酸素抵抗性 Trpa1

## 1. 研究開始当初の背景

生命が脅かされるような状況において、生物は潜在的な生体防御能力を用いて身を守る。溺死寸前の寒冷浸漬による三叉神経の活性化によって誘導される潜水反射や、恐怖知覚によって誘導される迷走神経反射は、ヒトの恒常性状態に大きな変動をもたらす。これらの反射は生命を守る能力として進化してきたと考えられているが、これらの効果を臨床応用することはまだ確立されていない。

先天的な恐怖は生命の維持に深く関わっている。しかし、その効果的な誘導物質が存在しないため、潜在的な防御能力を明らかにすることができない。我々は、ネズミの捕食動物由来化合物であり、自然恐怖誘導物質である 2,4,5-トリメチル-3-チアゾリン (TMT) の化学構造を最適化することにより、2-メチル-2-チアゾリン (2MT) など、マウスに強力な自然恐怖反応を誘導する人工化合物、チアゾリン関連恐怖誘導化合物 (tFOs) を開発した。われわれは最近、tFO が頑健な低体温、嫌気性代謝、抗低酸素反応を組織化し、致死的低酸素条件下での生存期間を延長し、虚血・再灌流モデルの重症度を低下させることを発見した。従って、tFO によって誘導されるこれらの生理学的反応の原因となる受容体遺伝子を同定することは、この現象を医療応用に利用できるかどうかを評価する上で重要である。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、tFO の知覚における受容体遺伝子と神経経路の候補がいくつか同定されている。背側嗅覚経路とその匂い受容体は、TMT や警報フェロモン 2-sec-ブチル-2-チアゾリン (SBT) によって誘導される回避行動や恐怖関連行動を制御している (Kobayakawa et al., *Nature* 450, 503-508, 2007; Matsuo et al., *PNAS* 112, E311-320, 2015; Saito et al., *Nat Commun* 8, 16011, 2017)。一方、マウスのフォワードジェネティクススクリーニングにより、2MT や TMT などの tFO によって誘導されるすみ行動や回避行動は、三叉神経細胞の transient receptor potential ankyrin 1 (*Trpa1*) 遺伝子によって制御されていることを同定していた (Wang et al., *Nat Commun* 9(1), 2041, 2018)。さらに、*Trpa1* ノックアウトマウスでは、天然物、例えばヘビ由来化合物に対する恐怖関連行動も抑制されていた。このように、tFO に対する恐怖関連行動は、三叉神経細胞における *Trpa1*、および嗅覚系における嗅覚受容体という、少なくとも 2 つの異なるシステムによって制御されていると考えられる。しかし、tFO による生理作用に関与する遺伝子や神経経路は不明である。ここでは、これらの作用の制御における *Trpa1* の寄与を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

C57BL/6Ncr マウスは日本エスエルシー株式会社から購入した。*Trpa1* ノックアウトマウス (ストック番号 006401)、*Trpv1* ノックアウトマウス (ストック番号 003770) は、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入した。*Trpa1*-Cre+マウスは、ES 細胞の CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集 55 を用いて、内在性 *Trpa1* 遺伝子座の開始コドンに improved-Cre54 を挿入することにより作製した。D マウスは、以前に報告したように、OMACS-Cre マウスと *Eno2*-STOP-DTA マウスを交配して作製した (Kobayakawa et al., *Nature* 450, 503-508, 2007)。マウスは、室温  $23 \pm 2$ 、湿度 30-70%、12 時間明暗サイクルの標準的な環境下で飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。実験開始時、マウスは 9 週齢以上であった。実験プロトコールは関西医科大学動物実験委員会の承認を得た。これらのマウスを用いた生理学的および分子神経科学的解析の方法の詳細は以下の URL から参照可能である。

<https://www.nature.com/articles/s41467-021-22205-0#Bib1>

## 4. 研究成果

2MT によって誘導される先天的恐怖に関連した回避行動やリスク評価行動は、*Trpa1* によって制御されていることを既に報告していた (Wang et al., *Nat Commun* 9(1), 2041, 2018)。しかし、2MT は恐怖関連行動のみならず、低体温や徐脈などの恐怖に関連した強い生理的反応を誘導することを我々は見出した。そこで、*Trpa1* ノックアウトマウスを用いて、これらの生理反応が *Trpa1* によって制御されているかどうかを調べた。*Trpa1* ノックアウトマウスでは、ベースライン時の体温に有意な変化は見られなかったが、2MT による低体温は大きく抑制された。ほとんどの *Trpa1* 発現細胞は *Trpv1* を共発現しているが、*Trpv1* ノックアウトマウスでは、2MT による低体温は影響を受けなかった。低体温は tFO 刺激だけでなく、狭い空間での拘束にも反応して観察されるが、これも生得的恐怖刺激の一種である。もし *Trpa1* が 2MT の末梢センサーとして働いて低体温を誘導するのであれば、他のタイプの生得的恐怖刺激による低体温誘導は *Trpa1* ノックアウトマウスでは影響を受けないことが予想される。予想通り、狭い場所での拘束は *Trpa1* ノックアウト

トマウスの低体温を誘導した。同様に、コントロール状態での心拍数に変化はなかったが、2MT 提示後の迅速かつ強固な徐脈は、Trpa1 ノックアウトマウスではほぼ完全に抑制された。一方、Trpa1 ノックアウトマウスでは、狭い空間での拘束による心拍数の低下が観察された。従って、Trpa1 遺伝子は、先天的な恐怖に関連した体温 / 心拍数の抑制の開始に寄与していることが示唆される。

通常、マウスは低酸素環境では生存できないが、硫化水素 (H<sub>2</sub>S) が低酸素環境での生存時間を延長させることが報告されている。高濃度の H<sub>2</sub>S は、酸素呼吸に不可欠なミトコンドリア内の電子伝達鎖<sup>23</sup>の活性を阻害することにより、個体を死に至らしめる。低濃度の H<sub>2</sub>S はミトコンドリアの呼吸活性を部分的に阻害し、低酸素環境での生存能力を高めると考えられている。一方、2MT にはミトコンドリアの呼吸鎖を阻害する作用はない。それにもかかわらず、2MT 刺激は低酸素代謝と低酸素耐性を誘導する。ミトコンドリア呼吸鎖を阻害することなく、2MT がどのようにして低酸素抵抗性を誘導するのだろうか？先に報告したように、酸素消費は 2MT の提示によって抑制された。重要なことは、2MT を事前に提示することで、致死的な 4% 酸素条件下での生存時間が延長することを見出した。そこで、酸素代謝に対する 2MT 提示のこうした影響が、Trpa1 遺伝子によっても制御されているのかどうかを調べた。Trpa1 ノックアウトマウスでは、2MT 提示による酸素消費抑制は完全に抑制された。さらに、Trpa1 ノックアウトマウスでは、2MT による 4% 酸素条件下での生存時間延長効果が抑制された。これらの結果は、2MT が Trpa1 を介して低代謝を引き起こし、抗低酸素効果を発揮していることを示唆している。これらの結果は、tFO 以外の Trpa1 アゴニストが抗低酸素作用を誘導する可能性も提起している。この可能性を検証するため、これまでに報告されている Trpa1 アゴニスト、すなわち大麻の成分であるトランス- $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール、AITC、鎮痛解熱剤であるアセトアミノフェンの効果を解析した。低酸素条件下での生存時間は、これらのリガンドによって延長され、アセトアミノフェンが最も強い効果を引き起こしたが、Trpa1 ノックアウト-マウスでは見られなかった。総合すると、多様なリガンドによる TRPA1 の活性化は、低体温、低代謝、および抗低酸素作用を組織化する。

主嗅覚ニューロンと三叉神経ニューロンはともに、捕食動物由来の化合物や tFO によって誘発される恐怖行動を制御している。しかし、tFO による生理学的反応の制御におけるこれらのニューロンの寄与は不明であった。嗅球摘出 (OBx) マウスでは、2MT 曝露に反応した皮膚温の低下が対照マウスに比べて抑制された。嗅球 (OB) の外科的摘出は、鼻腔に神経を支配する三叉神経の一部を傷つける可能性がある。この可能性を排除するため、捕食者のにおい物質に対する回避行動を制御する嗅覚ニューロン (OSN) の背側ゾーンを遺伝的に欠損させた  $\Delta D$  変異マウスを解析した。その結果、2MT 提示に対する皮膚温低下が抑制されていることが観察された。Cyclic nucleotide-gated channel 2 (Cnga2) チャネルは、OSN が匂いで誘導される活動電位を発生させるのに重要である。我々は、Cnga2 チャネルを OSN 背側で欠損させた  $\Delta D(cng)$  マウスについても解析した。これらの動物では、皮膚温の低下が抑制された。次に、皮膚温調節における三叉神経系の寄与を解析した。両側三叉神経節 (TG) 電気焼灼を受けたマウスは、術後数日で死亡した。片側三叉神経節電気焼灼 (ulTGx) を受けたマウスでは、対側の TG と OB は無傷であったが、2MT に対する皮膚温の低下が抑制されていた。両側迷走神経を頸部で切断したマウスも、手術直後に死亡した。ulTGx とは対照的に、片側切断を受けたマウスでは、2MT 提示に対する皮膚温の低下は影響を受けなかった。次に、両側の横隔膜下迷走神経 (VNS) を切断したところ、やはり 2MT による皮膚温低下の抑制が観察された。これらの結果を総合すると、tFO 誘発性低体温には、主に嗅覚系、三叉神経系、迷走神経系が関与していることが明らかになった。

Trpa1 を発現する末梢神経細胞は、その軸索を脳幹の Sp5 と NTS の特定の領域に投射しており、そこでは tFO 投与によって c-fos の発現が誘導された。そこで、これらの Trpa1+ニューロンを人為的に活性化することで、低体温を誘導できるのではないかと考えた。まず、Sp5 に投射している Trpa1+ニューロンの効果を調べた。mCherry と融合した hM3Dq をコードする Cre 依存性逆行性アデノ随伴ウイルス (AAVrg-DIO-hM3Dq) を、Trpa1-Cre マウスとコントロールマウスの Sp5 背側と腹側に両側注射した。注入 3 週間後、Trpa1-Cre マウスの TG で mCherry の発現が検出された。クロザピン-N-オキシド (CNO) の腹腔内 (IP) 注射によって Sp5 に投射している Trpa1+ニューロンを活性化すると、Sp5 の背側および腹側領域で c-fos mRNA の発現が増加した。CNO 投与によるこれらのニューロンの活性化は、Trpa1-Cre マウスでは低体温を誘導したが、対照動物や生理食塩水投与ではそのような効果は観察されなかった。次に、NTS に投射している Trpa1+ニューロンの人為的活性化の影響を解析した。Trpa1-Cre マウスとコントロールマウスの NTS に AAVrg-DIO-hM3Dq を注射した。感染から 3 週間後、VG で mCherry の発現を確認した (図 6b)。CNO 投与により、NTS に投射している Trpa1+ニューロンを人工的に活性化すると、NTS で c-fos の発現が誘導された。CNO 投与により、NTS に AAVrg-DIO-hM3Dq を感染させた Trpa1-Cre マウスでは低体温が誘導されたが、対照マウスでは誘導されなかった。これらの結果は、Trpa1+ニューロンからの軸索投射を受ける Sp5 と NTS の人為的活性化が低体温を誘導することを示している。

我々のモデルでは、TF0 による TG または VG の TRPA1 活性化が、Sp5 または NTS に危険情報を伝達し、複数の生理学的作用を誘導する。このことから、TRPA1 の分子活性化と TG/VG および Sp5/NTS の神経細胞活性化に着目することで、より強力な作用を誘導する新規化合物が同定される可能性がある。我々は、既知の TRPA1 リガンド（シンナムアルデヒド[CNA]および AITC）と、抗低酸素活性が知られていない、化学構造が 2MT に類似した化合物（4-メチル-2-エチル-2-チアゾリン [4E2MT]、5-メチル-チアゾール[5MT]、チオモルホリン[TMO]、チオフエン[T0]、2-メチル-2-オキサゾリン[2MO]）を用い、この可能性に取り組んだ。2MO と T0 は、TRPA1 のパッチクランプ解析、TG/VG のカルシウムイメージング、TG の RNAseq 解析、Sp5/NTS の c-fos 発現解析という 4 つのアッセイのいずれにおいても、TRPA1 や Trpa1+ニューロンの投射標的である Sp5/NTS を活性化しなかった。対照的に、既知の TRPA1 リガンド、2MT、およびそれらの構造的に関連する化合物に対する反応には明らかな違いがあった。TRPA1 に関連する生理学的効果を最も予測できるアッセイ法を決定するため、これらの化学物質を IP 注射し、4%酸素中で 30 分までの生存時間をモニターすることにより、これらの化学物質の抗低酸素効果を解析した。重要なことに、CAN は培養細胞および TG/VG 細胞で TRPA1 を活性化したが、TG の IEG 遺伝子や Sp5/NTS の c-fos をアップレギュレートしなかった CNA は生存時間を延長しなかったが、他のすべての化合物は生存時間を有意に延長した。一方、本研究は、tFO 誘発低体温の制御に嗅覚系が関与していることを示している。さらに、2MT、TMT、SBT に加えて、例えばユキヒヨウの尿など、天然の捕食者由来の化合物に対する恐怖関連行動は、嗅覚系によって制御されている。したがって、OB における c-fos mRNA の発現も、抗低酸素活性を予測できる可能性がある。この可能性を検証するため、OB における c-fos mRNA 発現を解析した。2MT、4E2MT、および 2MO は、OB における c-fos mRNA 発現を大きく増加させた。これらの化合物に比べ、T0、CNA、TMO による c-fos mRNA 発現の増加は弱かった。従って、TG/VG における c-fos mRNA 発現の増加と比較して、OB における c-fos mRNA 発現の増加は低酸素に対する抵抗性との相関が弱かった。これらの結果は、培養細胞システムや TG/VG ニューロンにおける TRPA1 の活性化では不十分であり、抗低酸素効果を誘導するには Sp5/NTS の活性化も必要であることを示している。さらに、特に高い抗低酸素活性を示す新規リガンドとして、4E2MT と TMO を解析した。

事前に 4E2MT で刺激することで、致死的低酸素条件下でも脳内の ATP 濃度は維持された。Trpa1 ヘテロマウスでは 4E2MT 刺激により強固な（5 以上）低体温がもたらされたが、Trpa1 ノックアウトマウスではこの効果はなく、4%酸素中での生存時間の延長もみられなかった。TMO は低酸素条件下での生存誘導にも非常に有効であった：TMO を投与したすべてのマウスは、4%酸素中で 30 分以上生存した。TMO が低酸素条件下での生存をどの程度延長できるかをさらに解析するため、各マウスが低酸素条件下で生存している時間の長さを測定した。2MT 刺激は、対照条件と比較して、低酸素条件下での生存時間を有意に延長した。2MT 刺激と比較して、TMO 刺激は酸素 4%条件下での生存時間を劇的に延長した。従って、TMO 刺激は 2MT 刺激よりも顕著に酸素消費を抑制した。これらの結果から、TRPA1 と Sp5/NTS の活性を解析することで、低体温、低代謝、低酸素耐性など、TRPA1 に関連する生理作用の強力な誘導因子を同定できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Onoe Atsunori, Muroya Takashi, Nakamura Fumiko, Ikegawa Hitoshi, Kuwagata Yasuyuki, Kobayakawa Reiko, Kobayakawa Ko	4. 巻 58
2. 論文標題 EFFECTS OF 2-METHYL-2-THIAZOLINE ON CIRCULATORY DYNAMICS AND INTESTINAL VASCULAR SYSTEM IN RABBITS WITH ENDOTOXIC SHOCK	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 341 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001987	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 Asaba Akari, Nomoto Kensaku, Osakada Takuya, Matsuo Tomohiko, Kobayakawa Ko, Kobayakawa Reiko, Touhara Kazushige, Mogi Kazutaka, Kikusui Takefumi	4. 巻 16
2. 論文標題 Prelimbic cortex responds to male ultrasonic vocalizations in the presence of a male pheromone in female mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 956201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2022.956201	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 Matsuo Tomohiko, Isosaka Tomoko, Hayashi Yuichiro, Tang Lijun, Doi Akihiro, Yasuda Aiko, Hayashi Mikio, Lee Chia-Ying, Cao Liqin, Kutsuna Natsumaro, Matsunaga Sachihiko, Matsuda Takeshi, Yao Ikuko, Setou Mitsuyoshi, Kanagawa Dai, Higasa Koichiro, Ikawa Masahito, Liu Qinghua, Kobayakawa Reiko, Kobayakawa Ko	4. 巻 12
2. 論文標題 Thiazoline-related innate fear stimuli orchestrate hypothermia and anti-hypoxia via sensory TRPA1 activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22205-0	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 該当する

1. 著者名 Liu Can, Lee Chia-Ying, Asher Greg, Cao Liqin, Terakoshi Yuka, Cao Peng, Kobayakawa Reiko, Kobayakawa Ko, Sakurai Katsuyasu, Liu Qinghua	4. 巻 12
2. 論文標題 Posterior subthalamic nucleus (PSTh) mediates innate fear-associated hypothermia in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22914-6	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 該当する

1. 著者名 Nishi Masahiro, Ogata Takehiro, Kobayakawa Ko, Kobayakawa Reiko, Matsuo Tomohiko, Cannistraci Carlo Vittorio, Tomita Shinya, Taminishi Shunta, Suga Takaomi, Kitani Tomoya, Higuchi Yusuke, Sakamoto Akira, Tsuji Yumika, Soga Tomoyoshi, Matoba Satoaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Energy sparing by 2 methyl 2 thiazoline protects heart from ischaemia/reperfusion injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 428 ~ 441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.13732	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小早川 高
2. 発表標題 嗅覚刺激による恐怖情動の制御
3. 学会等名 第8回がんと代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小早川 高
2. 発表標題 先天的恐怖臭刺激で潜在的な保護作用を誘導する感覚創薬技術
3. 学会等名 日本食品免疫学会第18回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ko Kobayakawa
2. 発表標題 Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related innate fear odors via sensory TRPA1 activation
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/CJK第1回国際会議 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiko Matsuo, Tomoko Isosaka, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa
2. 発表標題 Molecular and neural mechanism of life-protective effects induced by thiazoline-related innate fear odors in mice
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/CJK第1回国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小早川 高
2. 発表標題 匂い分子による人工冬眠・生命保護状態の誘導
3. 学会等名 低酸素研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ko Kobayakawa
2. 発表標題 Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related innate fear odors
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小早川 高	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 実験医学2023年3月号	

1. 著者名 小早川高	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 Clinical Neuroscience	

〔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
---------	---------