

令和 6 年 6 月 15 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：21H02599

研究課題名（和文）先天的恐怖情動が持つ生命保護作用の解明

研究課題名（英文）The life-protective effects of innate fear emotions.

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） 13,400,000 円

研究成果の概要（和文）：生得的恐怖は危機における生命維持に密接に関係しているが、この関係は完全には解明されていない。今回我々は、先天的恐怖臭(TF0)の提示により、強固な全身性低体温・低代謝が誘導され、ピルビン酸デヒドロゲナーゼのリン酸化を介して好気性代謝が抑制されることで、致死的低酸素環境下での長期生存が可能になることを解明した。これらの反応は、皮膚および脳虚血/再灌流障害モデルにおいて強力な治療効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冬眠とは対照的に、TF0刺激は脳内のグルコース取り込みを促進し、血液中の酸素飽和度を抑制した。全脳マップと化学遺伝学的活性化により、TF0の感覚表現が脳幹Sp5/NSTから中脳PBN経路を介して生理的反応を制御していることが明らかになった。TF0は、先天的恐怖の超正常刺激として、マウスに強力な潜在的な生命保護作用を誘導することから新たな治療法のシーズとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Innate fear intimately connects to the life preservation in crises, although this relationships is not fully understood. Here, we report that presentation of a supernormal innate fear inducer 2-methyl-2-thiazoline (2MT), but not learned fear stimuli, induced robust systemic hypothermia/hypometabolism and suppressed aerobic metabolism via phosphorylation of pyruvate dehydrogenase, thereby enabling long-term survival in a lethal hypoxic environment. These responses exerted potent therapeutic effects in cutaneous and cerebral ischemia/reperfusion injury models. In contrast to hibernation, 2MT stimulation accelerated glucose uptake in the brain and suppressed oxygen saturation in the blood. Whole-brain mapping and chemogenetic activation revealed that the sensory representation of 2MT orchestrates physiological responses via brain stem Sp5/NST to midbrain PBN pathway. 2MT, as a supernormal stimulus of innate fear, induced exaggerated, latent life-protective effects in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：先天的恐怖 生命保護

## 1. 研究開始当初の背景

冬眠動物は、低体温・低代謝の状態下で生存する能力を持ち、虚血・再灌流 (I/R) 傷害に対する抵抗性も持っている。したがって、ヒトのような非冬眠動物に人工冬眠を誘導できれば、血流停止による不可逆的な脳障害を軽減できると期待される。治療的低体温療法が脳機能に保護作用を及ぼすことはよく知られている。しかし、物理的な冷却法だけでは、外部冷却システムによる体温低下と、体温を維持するための恒常性維持機能による発熱との間に生じる矛盾を解決することはできない。

マウスの脳には低体温誘導システムが内在している。標準的な周囲温度で数日間絶食またはカロリー制限を行うと、マウスに体温低下が誘導される。内側視索前野 (MPA) の Pacap 陽性ニューロンは torpor 状態で活性化され、これらの細胞を人為的に活性化すると低体温が誘導される。このような脳内低体温誘導システムは、救急医療に応用できる可能性が指摘されている。そのため、内在性の低体温誘導システムを迅速に駆動できる感覚刺激が有用である。

我々は、生物は低体温・低代謝を特徴とする未発見の潜在的な生命保護モードを進化させてきており、それは生命の危機的状況において脳によって誘導されうるという仮説を立てた。この考えを実証するためには、モデル動物やヒトに危機認識を誘発する技術が必要である。恐怖は、脳が生命を脅かす危険を察知したときに誘発され、個体の生存確率を高める行動的・生理的反応を誘発するように進化してきた。しかし、恐怖によってもたらされる防御効果については、いまだ不明な点が多い。これらの効果を解明することは、恐怖の進化を理解するだけでなく、これらの潜在的な保護効果を医療に応用するためにも重要である。

恐怖刺激は様々な生理的反応を引き起こす。条件づけられた恐怖刺激の提示は、マウスの心拍数と体温の上昇を引き起こす。対照的に、恐怖症患者に恐怖刺激を与えると、心拍数は 50% 減少する。恐怖は、生得的なメカニズムと学習されたメカニズムによって誘発される。われわれは以前に、生得的な恐怖情報と学習された恐怖情報が脳の恐怖中枢で拮抗的に統合され、生得的な恐怖行動が学習された恐怖行動よりも優先されるという上下関係を制御していることを示した。生得的な恐怖と学習された恐怖によって誘発される行動反応が拮抗的に制御されていると仮定すると、これら 2 種類の恐怖感情によって誘発される生理的反応も拮抗的である可能性がある。しかしながら、動物モデルにおいて生得的恐怖を誘発する有効な刺激が存在しないことが、生得的恐怖によって誘発される生理的反応を明らかにしようとする試みの大きな障害となっている。さらに、生得的な恐怖刺激によって誘導される生理的応答が、生体防御効果の生成にどのように寄与するのか、そのメカニズムはほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

初期のエソロジー研究から、生得的行動は自然な刺激よりも人工的で誇張された刺激 (すなわち超常的刺激) によってより強く誘導されることが明らかになった。例えば、ヒナは親のくちばしの形や色を誇張した棒を、本物のくちばしよりも頻繁につつく。捕食動物の匂い物質、例えばキツネの分泌物である 2,4,5-トリメチル-3-チアゾリン (TMT) や猫の首輪は、げっ歯類に生得的な恐怖反応を誘導する。しかし、これらの匂い物質によって誘発される恐怖行動は、以前に電気足ショック (FS) と対になった条件付き匂い物質によって誘発された学習恐怖反応に比べるとはるかに弱い。そこで我々は、TMT の化学構造を最適化し、これまでに同定された他の生得的恐怖臭と比較して、先天的すくみ行動を誘導する活性が 10 倍以上高い人工チアゾリン関連恐怖臭 (tFO) を開発した。また、tFO は三叉神経の transient receptor potential ankyrin type1 (TRPA1) 受容体タンパク質に結合し、恐怖行動を誘導することも明らかにした。2-メチル-2-チアゾリン (2MT) のような TFO は、他の既知の感覚刺激と比較して、マウスの最も強固な自然恐怖反応 (例えば、すくみ行動) を誘導するユニークな超常刺激として働く。したがって、tFO を利用すれば、これまでの実験モデルでは明らかにできなかった、生得的な恐怖に内在する潜在的な生命保護作用を発見できるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

雄性 C57BL/6Ncr マウスを株式会社日本エスエルシーから購入した。Ucp1-/- (ストック番号 17476) は The Jackson Laboratory から購入し、標準的な 12 時間明暗サイクル下で飼育し、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 9~13 週齢であった。実験プロトコルは関西医科大学動物実験委員会の承認を得た。

#### 4. 研究成果

恐怖は、すくみ行動、ストレスホルモンの血清レベル、頸部筋電図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 によって誘発される自然恐怖と、以前に FS とペアにしたアニソール(Anis)によって誘発される学習恐怖は、既知の恐怖指標に基づくと同様であった。しかしながら、この2種類の恐怖によって誘発される皮膚温には明らかな違いが観察された。生得的な恐怖刺激を受けたマウスは、学習された恐怖刺激を受けたマウスとは異なり、背骨に沿って約3の皮膚体温の低下を示した。恐怖はさまざまな言語で「背筋が凍る」と表現されるが、生得的な恐怖はこの表現と一致する。次に、埋め込み型テレメトリーシステムを用いて、中核体温と心拍数を分析した。生得的な恐怖の刺激に反応して、中核体温もまた~3 低下した。これとは対照的に、学習性恐怖刺激にさらされると、中核体温は~0.5 上昇した。興味深いことに、そして重要なことに、2MT への長時間曝露により、体温は~5 時間後に常温近くまで低下し、運動活性は~2 時間後にほぼ完全に低下した。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した。学習性の恐怖刺激では心拍数の増加はわずかであったが、生得的な恐怖刺激では数分以内に強い変化(最大 50%減少)を引き起こし、これは恐怖症患者で観察される生理的反応と同様であった。

体温の低下は、体表面での熱交換を促進する方法と、熱産生を抑制する方法のいずれかによって達成される。熱交換は末梢血流量の増加によって達成される。そこで、レーザードップラー血流計を用いて末梢血流量を測定したところ、生得的恐怖刺激は学習恐怖刺激よりも強く末梢血流量を抑制することが観察された。この結果は、2MT による低体温が熱産生の抑制によって引き起こされる可能性を示唆している。マウスでは、褐色脂肪組織(BAT)が体温恒常性に大きく寄与しており、uncoupling protein 1 (UCP1) がBATにおける熱産生に重要な役割を果たしている。したがって、UCP1 の阻害が、生得的な恐怖刺激によって誘発される低体温の根底にある可能性がある。サーモニュートラル条件下(30 )では、体温維持のためのエネルギー消費は最小限に抑えられ、UCP1 依存的な熱産生はほとんど抑制される。このような条件下でも、2MT は低体温を誘導した。さらに、2MT による低体温は、UCP1 ノックアウト(KO)マウスでも観察された。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、通常状態では一定と考えられる基礎代謝を抑制していることを示唆している。この仮説と一致して、2MT は呼吸数、血中酸素飽和度、酸素消費量を抑制した。冬眠/トルポルムは酸素飽和度を低下させないが、2MT 刺激は明らかに酸素飽和度を低下させた。通常の状態では、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、酸素飽和度の低下にもかかわらず呼吸数は増加しなかった。このことは、2MT 刺激がHVRを抑制することを示唆している。ジリスでは、冬眠期には酸素飽和度が上昇するが、冬眠からの覚醒時には酸素飽和度が低下する。したがって、2MT 刺激は低体温を誘導するが、冬眠の誘導期よりも冬眠からの覚醒期に近い生理状態を誘導する可能性がある。

われわれの発見は、2MT 刺激が心拍数と体温の低下と全身の酸素消費量の抑制を誘導することを示した。同様の反応は自然界の危機的状況でも観察される。仮死は、捕食動物が捕食者に物理的に拘束されたときに誘発される防御反応であり、この反応は昆虫から哺乳類まで幅広い動物で一般的に観察される。オポッサムでは、擬死時に呼吸数と酸素消費量の減少が観察される。ヘビによる締め付けの際、ラットは呼吸が抑制されるため、死亡する前に体温と心拍数の低下を示す。もし被食動物が酸素消費量を減らすことで狭窄に反応することができれば、狭窄とそれに伴う低酸素状態後の生存確率が高まる可能性がある。我々は低酸素の実験モデルを用いてこの可能性を検証した。4%の酸素を含む低酸素環境下での対照条件では、マウスは20分以内に死亡した。驚いたことに、あらかじめ2MT を投与しておく、低酸素条件下でもほとんどすべてのマウスが30分以上生存した。このような抗低酸素作用は、もう一つの生得的恐怖刺激である拘束を事前に受けることによっても誘導されたが、その効果は2MT によって誘導される効果よりも弱かった。前述の観察結果とは逆に、学習性恐怖刺激やコルチコステロン注射は抗低酸素作用を示さなかったことから、抗低酸素作用は生得的恐怖刺激に関連するが、学習性恐怖刺激やストレスホルモン分泌には関連しないことが示唆された。

脳梗塞・心筋梗塞や外傷によって誘導される虚血再灌流(I/R)傷害では、再灌流中の過剰な活性酸素発生が細胞・組織の損傷を増大させる。生得的な恐怖刺激によって誘導される危機反応代謝では、TCA サイクルの活性低下を介してミトコンドリアの活性酸素発生が抑制されると考えられる。治療的低体温療法がI/R 傷害に対する保護効果を発揮することはよく知られているから、2MT の効果を検討した結果、2MT 刺激は、皮膚および脳虚血モデルを用いて検討した結果、皮膚および脳虚血モデルにおける2MT の治療効果が確認された。

## 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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小早川 令子
2. 発表標題 Principle of the sensory medicine: inducing the artificial hibernation/life-protective state using innate fear odors
3. 学会等名 日本生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2023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 令子
2. 発表標題 先天的恐怖臭が誘導する人工冬眠・生命保護作用
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------