

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450129

研究課題名(和文)MRIに基づく匂いやフェロモンを識別する嗅神経回路の解析

研究課題名(英文)MRI analysis of olfactory neurocircuits that discriminate odor and pheromone signals

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) 3,900,000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。匂い物質やフェロモン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。

本研究において、マウス脳内における匂い物質やフェロモン様物質に対する応答を、機能的MRI手法により捉えることに成功した。繰り返しの嗅覚刺激に呼応して周期的に信号変化が生じる脳内部位を抽出する解析手法を確立し、これを適用することにより、応答部位を同定した。刺激物質に応じて異なる脳領域に応答が見られた。

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 successfully observed odor responses that were evoked by odor and pheromone-like substances in the mouse whole brain, using functional MRI methods. Our developed analytical procedure efficiently identified mouse brain regions in which MR signal changes were synchronized with the periodic odor stimulations. Unique brain regions were activated by each odor and pheromone-like substance.

研究分野：NMR, MRI

キーワード：匂い フェロモン 脳・神経 MRI 嗅覚 嗅球

## 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。

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、これまでに得られた研究成果を進展させ、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、脳深部へと至る神経伝達経路を明らかにし、可視化することを考えた。磁気共鳴イメージング法(MRI)は、非侵襲的に生体深部を観測できるという利点を持つため、ヒトをはじめ、様々な生物種の医療診断や基礎研究に用いられており、本研究に適した手法である。しかしながら、マウスは脳が小さいこと、および、脳血が末梢血の動態変化の影響を受けやすいことにより、MRIによるマウスの嗅覚刺激応答の先行研究は、嗅球・副嗅球を合わせて数例あるのみで、全脳領域における研究の報告は無かった。

本研究は、MRIを用いて、匂い物質やフェロモンを識別するマウスの嗅球・副嗅球~全脳の嗅神経回路を明らかにし、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 $37 \pm 1$ を保持した。

### (1) Manganese-Enhanced MRI (MEMRI)

マンガン造影剤は活性化した細胞に取り込まれMR信号を増強させる(Lin & Koretsky, *Magn. Reson. Med.*, 1997)。高い空間分解能で撮像することができるため、マウス嗅球における嗅覚刺激応答について先行研究があり、本研究課題においても採用した。

予め、イソフルラン麻酔下において、マウスの右鼻腔内にマイクロシリンジを用いて塩化マンガン溶液を点鼻した。その後、マウスが覚醒したことを確認し、嗅覚刺激を行った。飼育ケージの四隅に、DMSO溶媒で希釈した匂い物質octanal、または、フェロモン様物質musconeの溶液を滴下し、覚醒状態において20分間の嗅覚刺激を与えた。参照実験では、DMSOのみを滴下した。刺激後に、マンガンイオンによる嗅球の造影効果を見るため、塩化マンガン投与2時間後から、イソフルラン麻酔下において約30分間のT1強調画像の撮像を経時的に5回撮像した。

得られた画像について、ソフトウェアSPM8のRealign機能を用いて各画像間の座標のずれを補正した。各ボクセルの信号値をマンガンイオンによる信号の増強が見られない嗅球深部の信号値で補正した。各ボクセルの時間経過の信号値の変化量の積分値を神経細胞活性化の指標とし、活性化部位の同定を行った。

### (2) Blood Oxygenation Level-Dependent MRI (BOLD)

脳活性化に伴い、酸素供給のためオキシヘモグロビンを含む血量が増加し、デオキシヘモグロビン量が低下することでMR信号が増強する(Ogawa *et al.*, *PNAS*, 1990)。リアルタイムに撮像することができるため、マウス嗅球・副嗅球における嗅覚刺激応答について先行研究があり、本研究課題においては、全脳領域における応答を見るために用いた。

Urethane麻酔下において実施し、導入麻酔としてマウス体重1kg当り1.5gを腹腔内に急速投与、維持麻酔としてマウス体重1kg当り1時間につき0.1gを尾静脈投与した。15~80分間のT2\*強調画像の連続撮像中に1~24回の嗅覚刺激(匂い物質isoamyl acetate (IAA)、または、フェロモン様物質muscone)を与えた。

T2\*強調画像の撮像は、マウスの嗅覚刺激応答を見る先行研究において採用されていたFLASH法に加えて、高い時間分解能が達成できるGRE-EPI法の検討を行った。

得られた画像について、ソフトウェアSPM8のRealign機能を用いて各画像間の座標のずれを補正した。嗅覚刺激前後の各ボクセルの信号変化の有意差をSPM8のt検定機能を用いて解析し、脳活性化部位の同定を行った。また、新たな試みとして、繰り返しの嗅覚刺激に呼応して周期的に信号変化が生じる脳内部位を抽出するため、ソフトウェアFSL-MELODICの独立成分解析法(ICA)を適用し、脳活性化部位の同定を行った。

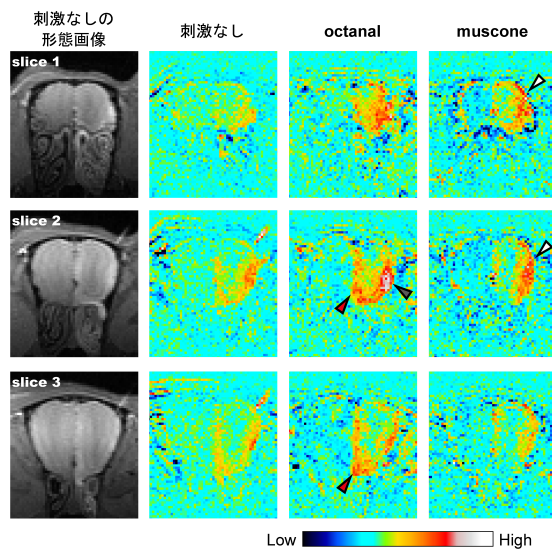
#### 4. 研究成果

##### (1) Manganese-Enhanced MRI (MEMRI) (図1)

嗅覚刺激なし、octanal刺激、muscone刺激の三者ともに、右鼻腔内に塩化マンガン溶液を点鼻していたため、右側の嗅球に信号強度変化が見られた。また、嗅球の縁の領域が主に変化したが、これは、嗅上皮において活性化した神経細胞に取り込まれたマンガンイオンが神経軸索を通過して、まず、嗅球の球状層にある糸球体に投射されるため、球状層において信号強度変化を生じたと考えられる。

octanal刺激では、特にslice 2の球状層の外側から腹側にかけての領域(黒矢頭)とslice 2および3の球状層の腹側から内側にかけての領域(赤矢頭)において、刺激なしの場合と比較して、信号強度の増強が大きかった。muscone刺激では、slice 1と2の球状層の背側から外側にかけての領域(白矢頭)において、刺激なしの場合と比較して、信号強度の増強が大きかった。

嗅覚刺激物質に応じて異なる領域に信号強度の増強が観測されたため、嗅球における刺激物質の活性化部位の違いを捉えることができたと考えられる。



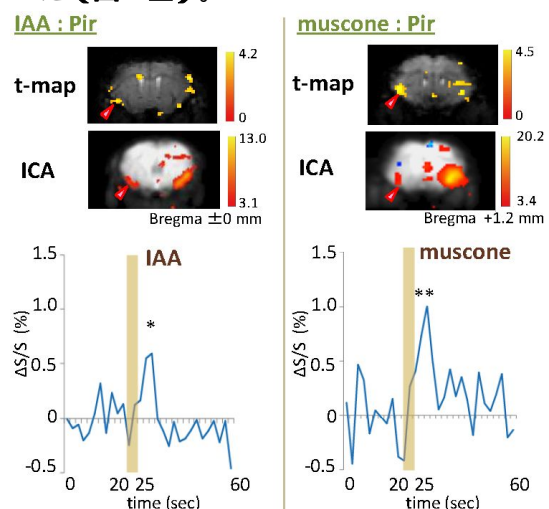
(図1) MEMRIによる嗅覚刺激応答部位の同定  
1列目のモノクロ: マンガン投与4時間後の嗅球のT1強調画像(参照実験)、2~4列目のカラー: マンガン投与2~4時間半後のT1強調画像の信号値の変化量の積分値をカラーバーに従い嗅球画像上へマッピングした。

MEMRIにより、覚醒状態において嗅覚刺激を与えた応答を捉えることができた。しかしながら、マンガン造影剤を投与して数時間経過してからでないと検出できないため、その間にマウスが嗅いだすべての嗅覚刺激物質への応答が同時に見られ、信号増強が実験環境に大きく依存することが分かった。また、嗅球のみならず全脳領域における活性化を見る場合、マンガン造影剤を投与して数時間の間にマウスが体験したすべての環境への応答が同時に見られてしまうことが予想され、リアルタイムに脳応答を見ることの可能な手法が必要であると考えた。

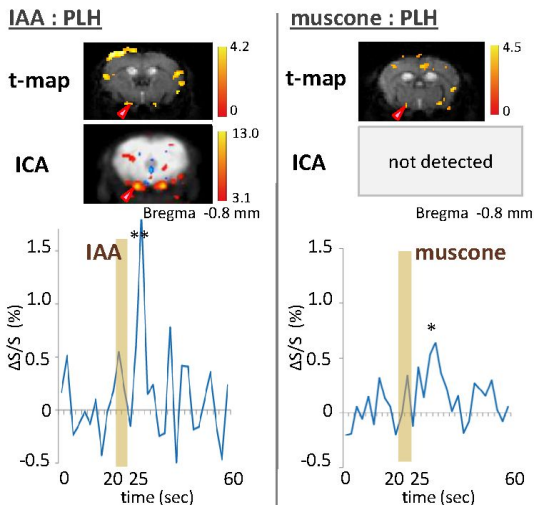
##### (2) Blood Oxygenation Level-Dependent MRI (BOLD)

全脳領域における応答をリアルタイムに観測するため、BOLD法を採用した。当初、マウス嗅球・副嗅球における嗅覚刺激応答を観測した先行研究に従って、1回の嗅覚刺激における応答をFLASH法のT2\*強調画像により検出することを試みたが、有意な応答を捉えることができなかった。そこで、複数回の刺激における応答を解析することにより、有意差の検出能を統計的に高めることを試みた。具体的には、以下2点の改良を行った。嗅覚刺激における曝露期間を数分間から5秒間へと短縮し、刺激物質の量を嗅覚受容体が脱感作しない程度に最適化すること。1回の撮像に20~30秒かかるFLASH法を、高い時間分解能が達成できるGRE-EPI法に変更し4秒とすること。以上により、約30分間の連続撮像中に24回の刺激を与える実験系の確立に成功した(図2~4)。

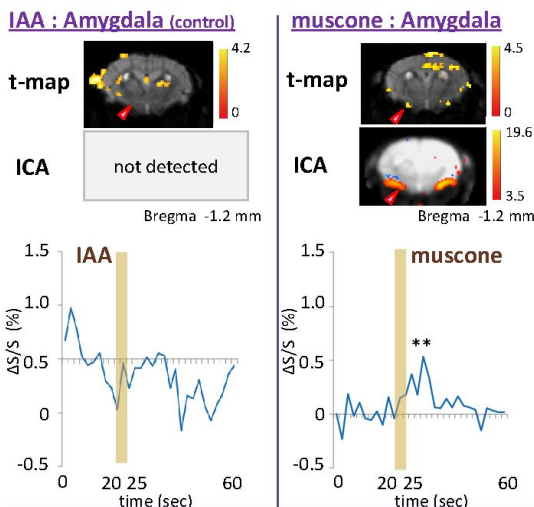
isoamyl acetate (IAA)刺激では、梨状皮質(Pir)(図2左)と外側視床下部(PLH)において、刺激に応じた信号増強が見られ(図3左)、扁桃体(Amygdala)では信号増強が見られなかった(図4左)。



(図2) BOLDによる嗅覚刺激応答部位の同定  
梨状皮質(Pir)における刺激に応じた信号増強の有意差をT値のカラーバーに従い画像上へマッピングした。IAA(左)とmuscone(右)についてt検定(t-map)およびICAにより解析した。24回分の信号変化の合算を表示した。



(図3) BOLDによる嗅覚刺激応答部位の同定  
外側視床下部 (PLH) における結果を (図2) と同様に表示した。



(図4) BOLDによる嗅覚刺激応答部位の同定  
扁桃体 (Amygdala) における結果を (図2) と同様に表示した。

一方、muscone刺激では、梨状皮質 (Pir) (図2右)、外側視床下部 (PLH) (図3右) 扁桃体 (Amygdala) (図4右) において、刺激に応じた信号増強が見られ、IAA刺激とは、信号増強の程度が異なった。

嗅覚刺激物質に応じて異なる脳深部領域に信号増強が観測されたため、脳深部における刺激物質による活性化の違いを捉えることができたと考ええる。

なお、解析において、先行研究において実施されていた t 検定を適用し、結果を脳領域にマッピングしたもの (t-map, 図2~4) では、実際には有意に信号変化が見られない偽陽性の領域が含まれた。今回、1分間隔の繰り返し嗅覚刺激に呼応して周期的に信号変化が生じる脳内部位を、独立成分解析 (ICA) により抽出する解析手法を確立し、これを適用することにより、正確に応答部位を同定することに成功した (ICA, 図2~4)。

梨状皮質は嗅覚伝導路に含まれる領域で、あらゆる匂い刺激に対し共通して応答が想定される領域であり、IAA と muscone を用いた

本研究においても、実際に共通して活性化が見られた (図2)。外側視床下部は摂食中枢を含むため、バナナに含まれる匂い物質である IAA により食欲が惹起され、活性化したことが考えられた (図3左)。muscone 刺激においては、外側視床下部 (図3右) に加えて扁桃体 (図4右) が活性化されていることから、不安な情動が高まった可能性がある。

以上、本研究により、MRI を用いて匂い物質やフェロモンを識別するマウスの嗅神経回路を明らかにする手法を確立することができた。特に、マウスは、様々な遺伝子改変および遺伝子欠損の解析モデルとして最も多く用いられているため、これらを利用した嗅覚研究において、本手法は基盤技術として極めて重要な貢献をすると考える。

今後、マウスの性行動を誘発する匂い物質やフェロモンを識別する嗅神経回路の解析をさらに進め、可視化することにより、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。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計8件)

Funatsu, H., Hayashi, F., Yoshinaga, S., Takeda, M., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., and Terasawa, H.

A BOLD analysis of the olfactory perception system in the mouse whole brain, using independent component analysis.

*Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **25**, 5363 (2017), 査読有り

<http://cds.ismrm.org/protected/17MPresentations/abstracts/5363.html>

Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Takeda, M., and Terasawa, H.

An optimized slice-GRAPPA reconstruction method to reduce leakage artifacts in small-animal multiband imaging.

*Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **25**, 3844 (2017), 査読有り

<http://cds.ismrm.org/protected/17MPresentations/abstracts/3844.html>

Nakata, E., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.

Development of an awake mouse MRI method using soft immobilization for a cryogenic probe system.

*Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **24**, 1757 (2016), 査読有り

<http://indexsmart.miramart.com/ISMIR>



M2016/PDFfiles/1757.html

Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., and Terasawa, H.

An iterative reconstruction method for dual-band EPI in small-animal studies. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **24**, 3242 (2016), 査読有り

<http://indexsmart.miramart.com/ISMRM2016/PDFfiles/3242.html>

Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., and Terasawa, H.

Image-based phase correction for dual-band EPI with slice-GRAPPA using point-by-point procedures in k-space. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **24**, 4315 (2016), 査読有り

<http://indexsmart.miramart.com/ISMRM2016/PDFfiles/4315.html>

Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., and Terasawa, H.

A novel reconstruction method for multi-band EPI in animal scanners with iterative point-by-point procedures in k-space.

*Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **28**, S134-S135 (2015), 査読有り

doi: 10.1007/s10334-015-0487-2

Funatsu, H., Yoshinaga, S., Goto, H., Hirakane, M., Iwamoto, S., and Terasawa, H.

MEMRI and BOLD analyses of the olfactory perception system in response to odorant stimuli in mice. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **23**, 2033 (2015), 査読有り

<http://indexsmart.miramart.com/ismrm2015/PDFfiles/2033.pdf>

Toyoda, H., Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., and Terasawa, H.

Pre-scan with half-sized phase encoding blips reducing ghost and slice leakage artifacts in dual-band EPI.

*Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **23**, 2406 (2015), 査読有り

<http://indexsmart.miramart.com/ismrm2015/PDFfiles/2406.pdf>

[学会発表](計18件)

Funatsu, H., A BOLD analysis of the olfactory perception system in the mouse whole brain, using independent component analysis., 25<sup>th</sup> ISMRM annual meeting, Honolulu (U.S.A.), 2017.4.22-27

Toyoda, H., An optimized slice-GRAPPA reconstruction method to reduce leakage artifacts in small-animal multiband imaging., 25<sup>th</sup> ISMRM annual meeting, Honolulu (U.S.A.),

2017.4.22-27

林芙優, 独立成分解析を利用したマウス嗅覚受容システムの BOLD 解析, ISMRM 日本支部第 1 回学術集会, 脳情報通信融合研究センター(大阪府吹田市) 2017.2.23-24

Funatsu, H., Detecting the olfactory responses in the mouse whole brain using a cryogenic probe., 第 4 4 回日本磁気共鳴医学会大会, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市) 2016.9.10

Nakata, E., Optimization of the awake mouse MRI method using mouse clothes for a cryogenic coil system., 第 4 4 回日本磁気共鳴医学会大会, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市) 2016.9.10

Takeda, M., fMRI analyses of the mouse olfactory perception system using a cryogenic probe., The XXVII<sup>th</sup> ICMRBS, Kyoto International Conference Center (京都府京都市) 2016.8.22-25

Nakata, E., Development of an awake mouse MRI method using soft immobilization for a cryogenic probe system., 24<sup>th</sup> ISMRM, Singapore (Singapore), 2016.5.9-12

Toyoda, H., An iterative reconstruction method for dual-band EPI in small-animal studies., 24<sup>th</sup> ISMRM annual meeting, Singapore (Singapore), 2016.5.9-12

Toyoda, H., Image-based phase correction for dual-band EPI with slice-GRAPPA using point-by-point procedures in k-space., 24<sup>th</sup> ISMRM annual meeting, Singapore (Singapore), 2016.5.9-12

吉永壮佐, BOLD 法を用いた匂い刺激によるマウス脳活性化の検出, 第 5 4 回 NMR 討論会, 千葉工業大学津田沼キャンパス(千葉県習志野市) 2015.11.8

Toyoda, H., A novel reconstruction method for multi-band EPI in animal scanners with iterative point-by-point procedures in k-space., ESMRMB 2015 32<sup>nd</sup> annual scientific meeting, Edinburgh (U.K.) 2015.10.1-3

草薙俊輔, 極低温プローブに適用可能なマウス服を用いた awake MRI 測定法の開発, 第 4 3 回日本磁気共鳴医学会大会, 東京ドームホテル(東京都文京区) 2015.9.11

船津大嗣, BOLD 法を用いた匂い刺激によるマウス嗅球の活性化の検出, 第 4 3 回日本磁気共鳴医学会大会, 東京ドームホテル(東京都文京区) 2015.9.10

Kusanagi, S., Development of an awake mouse MR imaging method using soft immobilization for a cryogenic probe system., WMIC 2015, Honolulu (U.S.A.),

2015.9.2-5

Toyoda, H., A robust Nyquist ghost suppression for high-resolution echo planar imaging of small animal brains., OHBM annual conference 2015, Honolulu (U.S.A.), 2015.6.14-6.18

Funatsu, H., MEMRI and BOLD analyses of the olfactory perception system in response to odorant stimuli in mice., 23<sup>rd</sup> ISMRM annual meeting, Toronto (Canada), 2015.6.1-6.4

Toyoda, H., Pre-scan with half-sized phase encoding blips reducing ghost and slice leakage artifacts in dual-band EPI., 23<sup>rd</sup> ISMRM annual meeting, Toronto (Canada), 2015.6.1-6.4

後藤はるな, MRI を用いた匂い物質の識別メカニズムの解析, 第42回日本磁気共鳴医学会大会, ホテルグランヴィア京都 (京都府京都市) 2014.9.19

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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・講師  
研究者番号：00448515

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

寺沢 宏明 (TERASAWA, Hiroaki)  
熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授  
研究者番号：10300956

東原 和成 (TOUHARA, Kazushige)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：00280925

### (4) 研究協力者

( )