

<平成 28 年度助成>

匂いで食欲を惹起させる脳内回路メカニズムの解明

眞部 寛之¹⁾・村田 航志²⁾

(¹⁾ 同志社大学 研究開発推進機構、²⁾ 福井大学 医学部脳形態機能学分野)

1. 目的

街中でふと漂ってくるうなぎのかば焼きの匂いやカレーの匂いを嗅ぐと食欲が惹起され、積極的な摂食行動を取りたくなるのは誰しもが経験する現象である。本研究は、匂いによって食欲を惹起し、摂食行動を引き起こす脳内回路とその機構を見いだすことを目的とした。特に、嗅覚受容体から最短経路で摂食行動まで至る神経回路を明らかにするのが狙いである。この経路を見つけることは、特定の感覚入力と出力される行動とを結びつける、いわゆる「ゾンビ経路¹⁾」を発見することにつながり、食欲を強力に惹起させる匂い分子の探索等につながるだけでなく、我々の複雑な脳機能を理解するため、また、脳の進化を考える上でも非常に重要であると考えられる。

我々はこれまで、嗅覚系情報処理機構の解析を行ってきた。特に、嗅覚二次中枢である嗅皮質の機能解析を積極的に進めており、匂いで惹起される摂食行動モチベーションを担当する領域などを見いだしてきた²⁾。嗅皮質は、嗅覚受容体からの情報が脳に入力される最初の領域である嗅球から直接投射を受ける領域であり、嗅皮質から摂食行動に関わる視床下部領域に直接投射する嗅皮質垂領域を見いだせば、匂いを摂食行動に変換する最短経路を見いだすことにつながる。

2. 方法と結果

2-1. 逆行性トレーサーを用いた、

視床下部に直接投射する嗅皮質垂領域の探索
視床下部外側野は摂食関連ペプチド分泌ニューロンなどが局在し、摂食行動の出力に重要な領域と考えられている。視床下部外側野に直接投射する嗅皮質垂領域を同定するため、軸索末端から逆行的にニューロンに取り込まれるトレーサーである、コレラトキシンサブユニット B (CTB-Alexa555) を視床下部外側野に投与し、逆行的に染色される嗅皮質垂領域を蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡を用いて探索した。

CTB-Alexa555 を視床下部外側野に注入し (図 1 a, b)、1 週間待ったのち灌流固定、20 μ m 厚の冠状断切片を作成した。その結果、嗅皮質の最も rostral 部、前嗅核下部、テニアテクタと前梨状皮質に挟まれた領域のニューロン群が染色された (図 1 c, d 黄丸)。嗅結節の直上にあるため、線条体の一部の可能性があり、これを確かめるために線条体のマーカーである DARPP32 の免疫染色を同時に行ったが陰性であった (図 1 e)。この垂領域はこれまでに報告がなく、新しい嗅皮質垂領域として、「嗅皮質 X」と名付けた。

2-2. 嗅皮質 X ニューロンの投射先の検証

嗅皮質 X のニューロンが、視床下部外側野のどの領域に出力しているのかを確かめた。嗅皮質 X ニューロンを染色するため、視床下部外側野に Cre 組換え酵素を搭載した逆行性レンチウイルス (FuG-E MSCV-nCre) を注入し、嗅皮質 X に Cre 存在下チャ

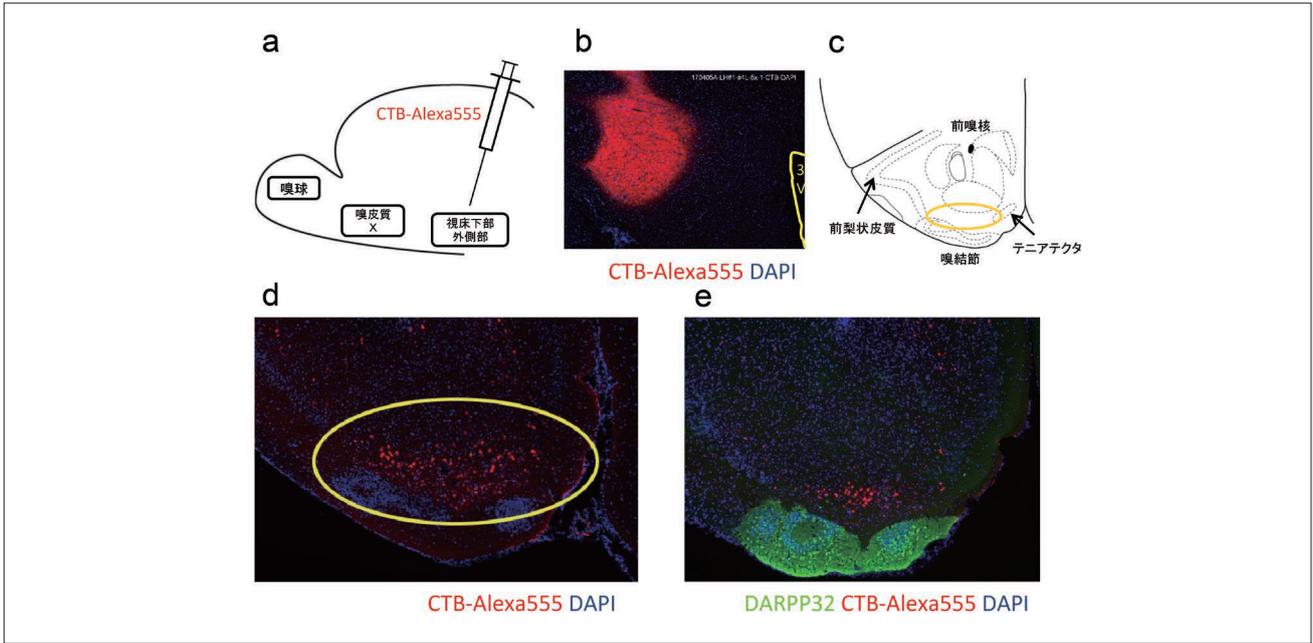


図 1：嗅皮質 X

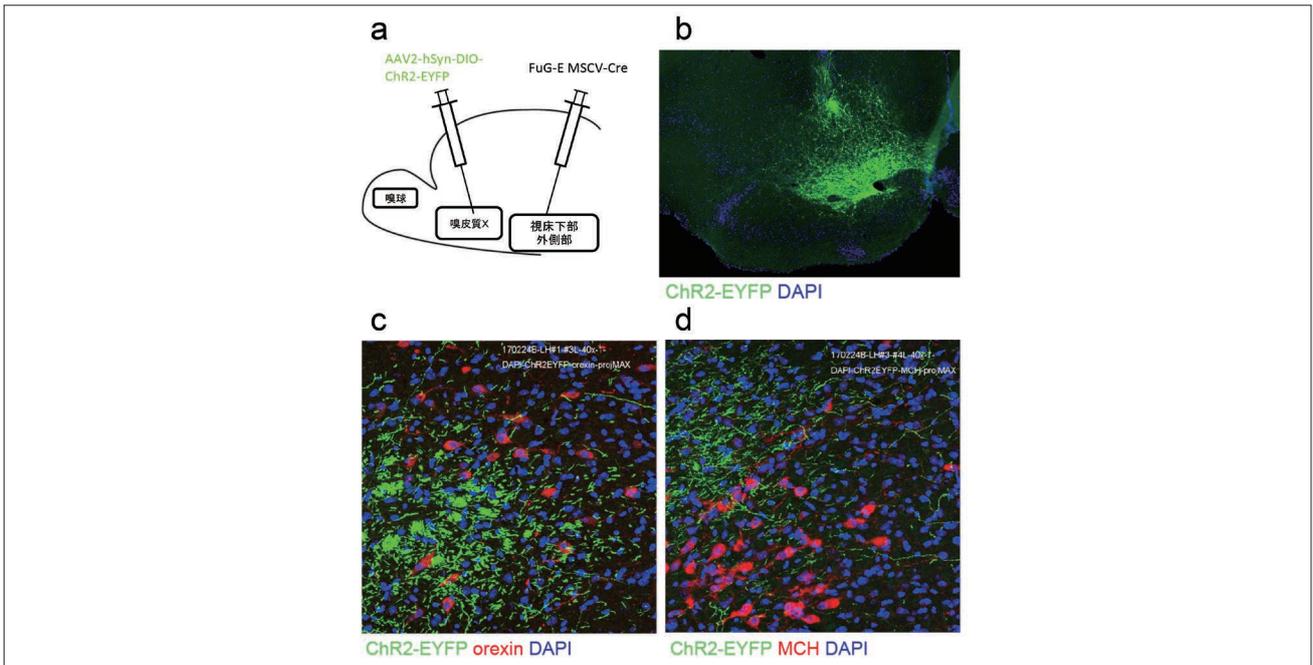


図 2：嗅皮質 X ニューロンの視床下部外側野への投射

ネルロドプシンと蛍光タンパクである EYFP が結合したタンパク質を発現する、アデノ随伴ウイルス (AAV2-hSyn-DIO-ChR2-EYFP) を注入した (図 2 a)。この操作により、視床下部外側野に投射する嗅皮質 X ニューロンだけが選択的に蛍光を発するようになった (図 2 b)。注入 1 週間後灌流固定し、20 μm 厚脳切片を作成し、EYFP と摂食関連ペプチドであるオレキシン (Orexin) とメラニン凝集

ホルモン (MCH) の蛍光抗体染色を行った (図 2 c <orexin>、2 d <MCH>)。嗅皮質 X ニューロンの軸索は、orexin ニューロン、MCH ニューロン近傍に達していた。実際にこれらのニューロンとコンタクトしているかどうかは、電子顕微鏡による解析等、さらなる解析が必要であるが、本研究でも実際にコンタクトしていると思われる像が確認されており、嗅皮質 X とこれら摂食関連ペプチド含有ニューロン

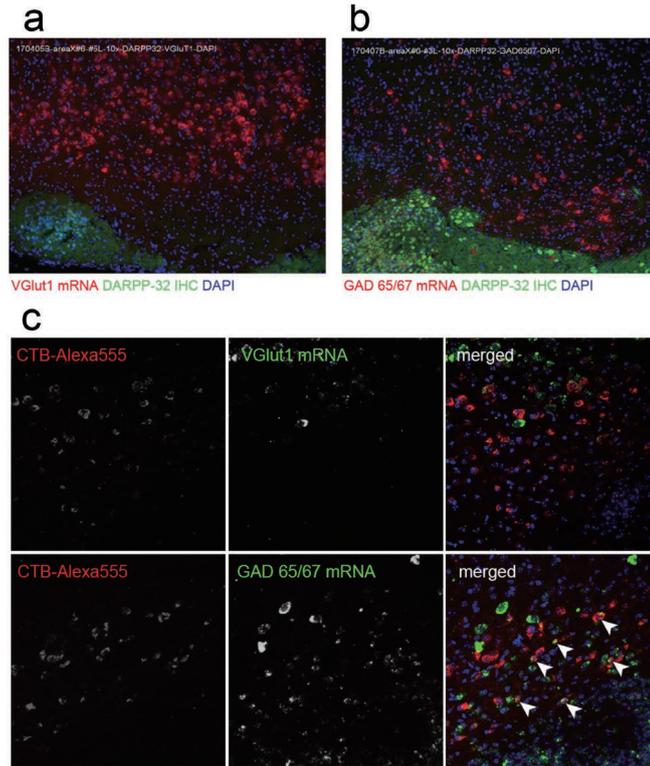


図3：嗅皮質 X ニューロンの細胞種

が作る回路が、嗅覚入力から最短経路で摂食行動を惹起する回路である可能性がある。

2-3. 嗅皮質 X ニューロンの細胞種の解析

嗅皮質 X は今回初めて同定された新規領域であり、嗅皮質 X ニューロンがどのような特徴を持つニューロンであるかは不明である。視床下部外側野へ投射する嗅皮質 X ニューロンが興奮性ニューロンなのか、抑制性ニューロンなのかを確かめるために、興奮性ニューロンのマーカーである VGlut1 および、抑制性ニューロンのマーカーである GAD65/67 の in situ ハイブリダイゼーションと逆行性トレーシング、抗体染色を組み合わせた多重蛍光標識を行った。

VGlut1 陽性細胞は前嗅核に主に発現しており、嗅皮質 X はほぼ陰性であった (図 3 a, c 上段)。GAD65/67 陽性細胞は前嗅核とその下部である嗅皮質 X が陽性であった (図 3 b, c 下段矢印)。CTB-Alexa555 陽性ニューロンの約半数が GAD65/67 陽性であり、視床下部に直接投射する嗅皮質 X ニューロンの多くが抑制性ニューロンであることが分かった。

2-4. 嗅皮質 X が嗅球から直接入力を受けているかどうかの検証

視床下部外側野に投射する嗅皮質 X ニューロンが直接嗅球ニューロンから投射を受けていれば、嗅覚入力から視床下部外側部に至る最短経路を見いだしたことになる。この検証のため、遺伝子改変狂犬病ウイルスを用いた TRIO (Tracing the relationship between input and output) 法³⁾を用いて、視床下部外側野に直接投射する嗅皮質 X ニューロンの一つ上流のニューロンを同定した。この手法は、狂犬病ウイルスがシナプスを逆行的に飛び越えて上流のニューロンに感染することを利用する方法で、4種類のウイルスを組み合わせることで、目的のニューロンの一つ上流のニューロンを同定できる方法である。視床下部外側野に Cre 組換え酵素を搭載した逆行性レンチウイルス (FuG-E MSCV-nCre) を注入し、嗅皮質 X に改変型狂犬病ウイルス受容体 TVA (AAV2-CAG-Flex-TVA-mCherry)、および狂犬病ウイルス増殖に必要な rabies glycoprotein を搭載した Cre 依存型アデノ随伴ウイルス (AAV2-CAG-Flex-rabiesG) を注入した。2週間後、エンベロップ

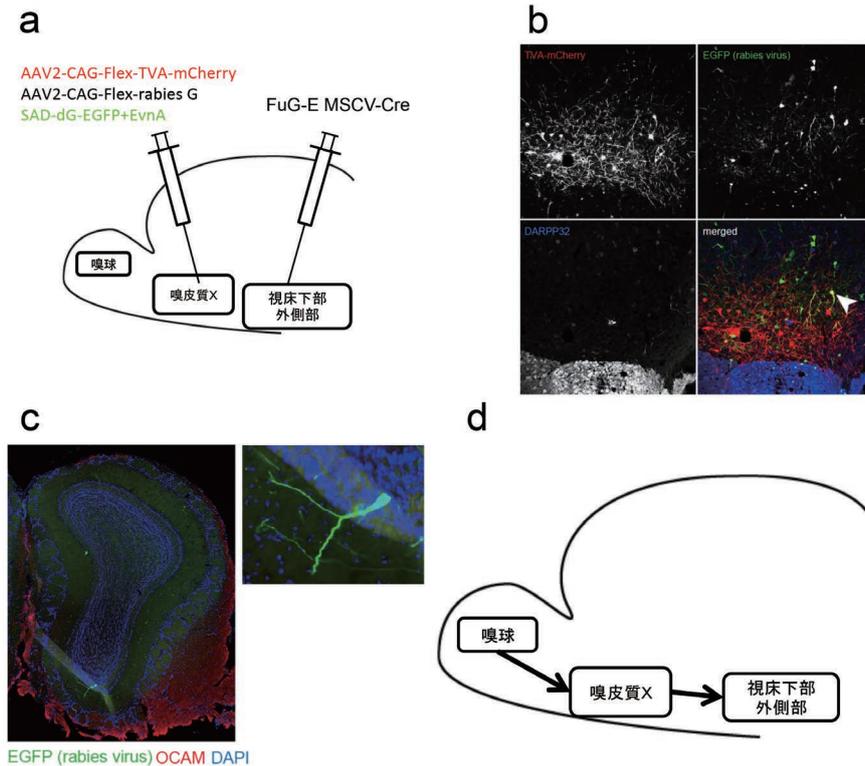


図4：嗅球から嗅皮質Xニューロンへの直接投射

を EnvA に偽型し、増殖遺伝子 G を欠損し、代わりに EGFP を搭載した改変型狂犬病ウイルス (SAD-dG-EGFP+EnvA) を嗅皮質 X に注入した (図 4 a)。

1 週間後、脳を取り出し、20 μ m 切片を作成し、EGFP、TVA-mCherry、DARPP32 (嗅皮質 X)、または EGFP、OCAM (嗅球) の多重免疫染色を行った。

嗅皮質 X に狂犬病ウイルスが感染したスターター細胞が作られ (mCherry と EGFP が共発現する、図 4 b 矢印)、嗅球の僧帽細胞が EGFP 陽性となったことから (図 4 c)、嗅球の僧帽細胞から視床下部外側部に直接投射する嗅皮質 X のニューロンへ直接投射していることが明らかとなった (図 4 d)。

3. 今後の研究の展開

本研究では、視床下部外側野に直接投射する嗅皮質 X を発見し、解剖学的特徴について明らかにした。嗅球→嗅皮質 X →視床下部外側野の回路は、匂いを摂食行動に変換する最短経路である可能性がある。今後は、嗅皮質 X ニューロンの機能について明らかにする。視床下部外側野に直接投射する嗅皮質 X ニューロンをターゲットとして、遺伝薬理的

手法、光遺伝学的手法を導入し、当該ニューロンのみを選択的に刺激または抑制し、その機能を検証する。現段階で技術は確立しており、今後、この技術を用いて、匂いで惹起される摂食行動における嗅皮質 X ニューロンの機能について検証する。また、光遺伝学的手法と電気生理学的手法を組み合わせた手法を用いて、視床下部外側野に直接投射する嗅皮質 X ニューロンを in vivo のまま同定し、その回路機能に迫る研究を行っている。こちらの技術も本研究期間で確立しており、今後、研究を展開させる予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) C Koch and F Crick Nature, 411: 893 (2001)
- 2) K Murata et al. J Neuroscience, 35(29): 10581-99 (2015)
- 3) LA Schwarz et al. Nature, 524: 88-92 (2015)

Analysis of the neuronal circuits of odor-induced eating behavior in mice

Hiroyuki Manabe¹⁾, Koshi Murata²⁾

¹⁾ *Organization for Research Initiatives and Development, Doshisha University*

²⁾ *Division of Brain Structure and Function, Faculty of Medical Science, University of Fukui*

Food odors strongly induce eating behavior. To address how central olfactory neuronal circuits regulate eating behavior in mice, we performed a retrograde tracing of the lateral hypothalamus. We observed the labeled cells located in the caudo-ventral region of the olfactory peduncle. This region was located between the ventral tenia tecta and the anterior piriform cortex, and under the anterior olfactory nucleus and just rostral to the nucleus accumbens. We referred to this region as olfactory cortex area X (“area X”). Area X was distinguishable from the ventral striatum as a DARPP32 negative region. Most of the cells in area X were VGluT1 mRNA negative, whereas roughly half of the cells of area X, which project directly to the lateral hypothalamus, were GAD65/67 mRNA positive, suggesting that many of the cells in area X are GABAergic neurons. Anterograde tracing from area X confirmed that the axons of area X neurons project to the lateral hypothalamus. We observed that the axons of area X neurons were located near orexin and MCH neurons, supporting the idea that area X neurons have synaptic connections with these neurons. Rabies virus-mediated neural pathway labeling (TRIO assay) revealed that area X neurons projecting to the lateral hypothalamus have synaptic connections from projection neurons in the olfactory bulb. These results suggest that the olfactory cortex has a subregion that projects directly to the lateral hypothalamus, which might contribute to odor-induced eating behavior.