

<令和3年度助成>

代謝シグナル分子の嗅覚行動に対する機能と作用機序の解明

山口 正洋

(高知大学 教育研究部 医療学系基礎医学部門)

研究の背景・目的

食行動は様々な要因によって制御されているが、その本質はからだの代謝状態に対応した食欲に基づいて食べることであり、脳（食欲）とからだ（代謝状態）の協調が極めて重要である。近年ますます増加している摂食障害の背景にこの協調機構の破綻があると考えられるが、脳とからだの協調の生理・病態メカニズムは未だよく分かっていない。

食行動には嗅覚系が深く関わっており、食べ物の匂いは食欲を強力に促進する。また嗅覚機能は代謝状態に影響され、空腹時と満腹時では食べ物の匂いの食欲への影響は大きく異なる。嗅覚系は、代謝状態に応じて食欲を調節する重要な脳領域と考えられる。

マウスの研究から、嗅覚系の一次中枢「嗅球」への代謝シグナルによって匂いの感度が変わることが知られている。我々は近年、その上位中枢「嗅結節」の「前内側部」が、匂いの食欲促進に働いていることを明らかにした¹⁾。また、この特定領域には代謝シグナルの受容機構が発達しており²⁾、食欲促進ホルモン性シグナルを薬理的に抑制すると、匂いの誘引作用が阻害されることを見出した。以上のことから我々は、代謝シグナルを受容する嗅覚脳領域として「嗅球」と「嗅結節前内側部」に着目した(図1)。

また、からだ由来の分子は血液脳関門によって脳への移行が制限されているが、嗅覚系は血液脳関門がルーズであることが指摘されている。嗅覚系はからだの代謝状態を効率よくモニターしている可能性があるが、嗅覚系への分子移行の体系的な検討は成されていない。

本研究では、からだの代謝シグナルを受けて食欲

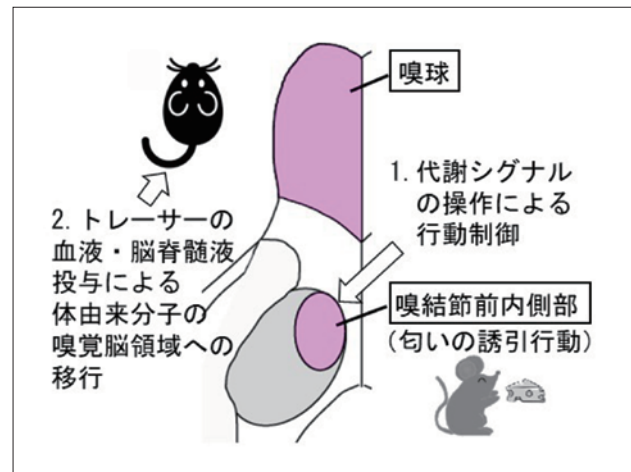


図1 本研究の背景・目的

を制御する嗅覚神経機構を明らかにするため、1. マウス嗅覚脳領域における代謝シグナル操作が嗅覚行動に与える影響を解析し、2. マウスの血液中および脳脊髄液中にトレーサーを投与して嗅覚脳領域への移行を解析した。

方法および結果

1. マウス嗅覚脳領域における代謝シグナル操作の嗅覚行動への影響

我々はRT-PCR解析によって嗅結節前内側部に多数の代謝シグナル受容体が発現していることを明らかにしている²⁾。その発現パターンから、摂食促進作用を持つオレキシン受容体、摂食抑制作用を持つメラノコルチン4受容体の役割を検討した。

<方法>

- ・マウスの嗅結節前内側部、その他の領域に薬剤投与カニューラを留置した。そのマウスに匂い（オイゲノール、丁子の香り）と餌を同時提示して匂

いへの誘引行動を学習させた。

- ・学習マウスの嗅結節前内側部に対照液、受容体アンタゴニスト・アゴニストを局所注入し、匂いに対する行動を行動解析ソフトを用いて解析した。

<結果>

a) 摂食促進に働くオレキシン受容体の役割解析

- ・嗅結節前内側部へのオレキシン受容体アンタゴニスト注入により、匂いの誘引行動が抑制された。興味深いことに、同時に匂いに対する忌避行動が誘導された（図2）。
- ・嗅結節外側部や側坐核にアンタゴニストを注入しても行動変化は観察されなかった。

b) 摂食抑制に働くメラノコルチン4受容体の役割解析

- ・嗅結節前内側部へのメラノコルチン4受容体アゴニスト注入により、匂いの誘引行動が抑制され、同時に匂いに対する忌避行動が誘導された。

以上のことから、嗅結節前内側部が食に関わる誘引行動のみならず忌避行動にも関与していると考えられた。

2. マウスの血液中・脳脊髄液中に投与したトレーサーの嗅覚脳領域への移行

トレーサーとして汎用されている Evans Blue（蛍光色素、分子量 961 Da）、蛍光デキストラン（多糖類、分子量 10 kDa）を用いた。

a) 血液中に投与したトレーサーの移行解析

<方法>

- ・2% Evans Blue 溶液をマウス尾静脈より 4 μ l/g 体重の液量で注入した。
- ・24 時間後にパラホルムアルデヒドにて還流固定し、脳の薄切切片を作成し、蛍光顕微鏡下で Evans Blue の移行を観察した（Evans Blue は約 630 nm の蛍光波長を持つ）。
- ・嗅神経障害性の薬剤（Dichlobenil）を腹腔内投与し、障害が顕著になる 2 週間後に Evans Blue 溶液を投与して同様の解析を行った。

<結果>

- ・嗅球において Evans Blue の移行が観察された。特に嗅神経への移行が顕著であり、嗅球の主要ニューロンである僧帽細胞への移行も観察された（図3上段）。
- ・嗅結節、特に脳表付近への Evans Blue の移行が観察された（図3下段）。
- ・トレーサーが嗅神経を介して嗅球に移行している可能性が考えられたため嗅神経障害の影響を調べたところ、更に顕著な移行がおこり多くの僧帽細胞に移行した（図3上段）。

b) 脳脊髄液投与したトレーサーの移行解析

上記 a) の結果から、血液投与したトレーサーが脳脊髄液に移行して脳実質に浸透する可能性が考えられたため、トレーサーを脳脊髄液中に直接投与して移行を検討した。

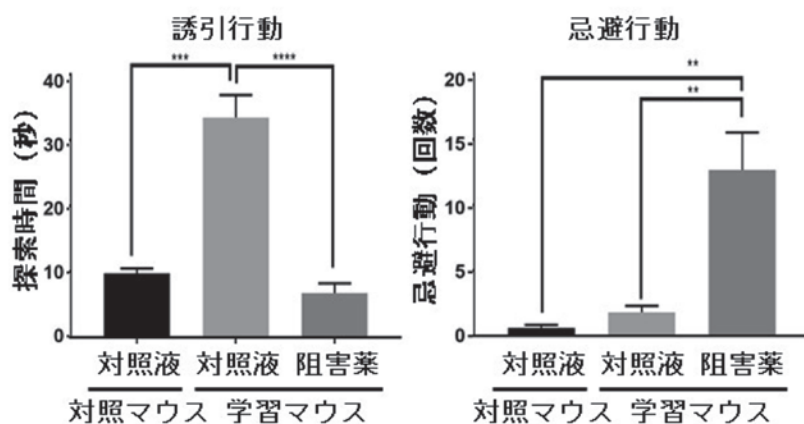


図2 嗅結節前内側部の代謝シグナル操作の行動への影響
匂いの誘引行動を学習したマウスの嗅結節前内側部にオレキシン受容体阻害薬を投与すると誘引行動が減弱し忌避行動が促進する

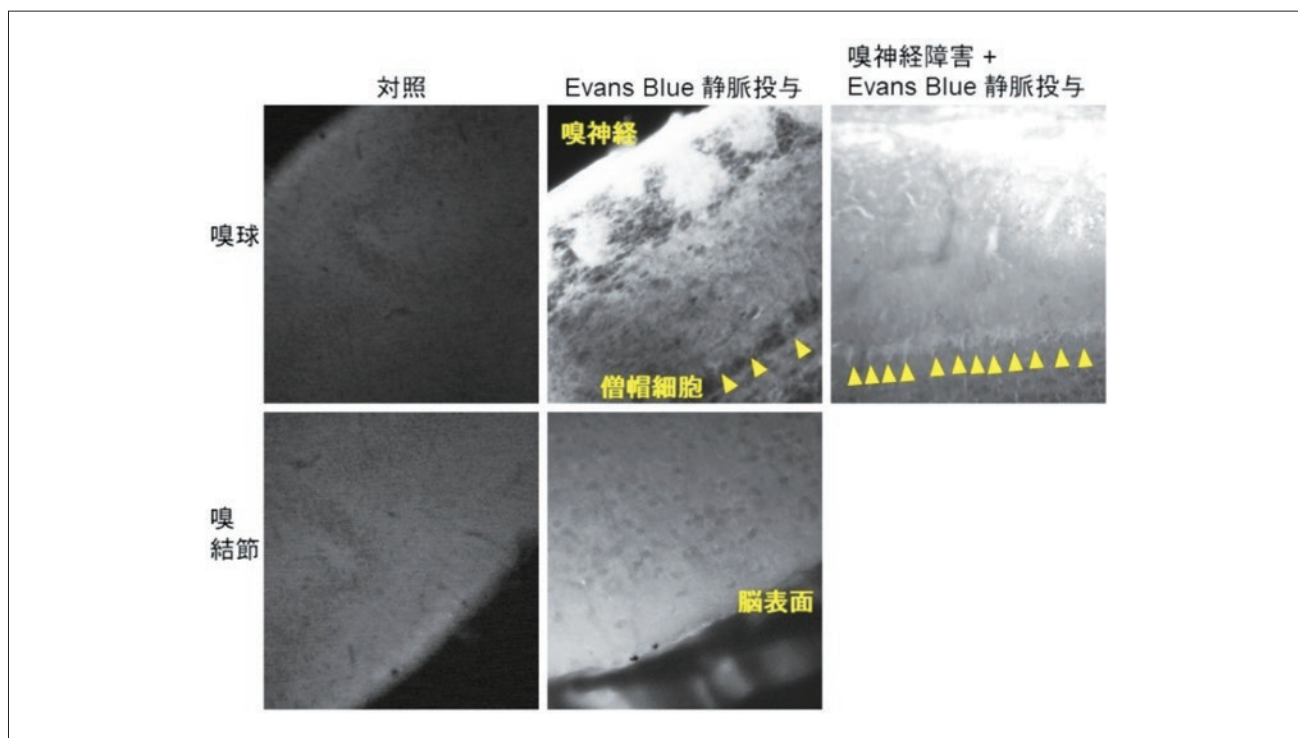


図3 血液中に投与した Evans Blue の嗅覚脳領域への移行
上段：嗅球。嗅神経、僧帽細胞に移行しており嗅神経障害で移行が促進する。下段：嗅結節。脳表近くに強い移行が観察される。

<方法>

- ・蛍光デキストラン約10 μ l をマウスの大漕 (Cisterna magna) から注入した。
- ・1 時間後に還流固定し、脳切片の蛍光シグナルを観察した。

<結果>

- ・嗅球、嗅結節ともにトレーサーの移行が観察された(図4)。

以上のことから、嗅覚系にはからだ由来の分子が移行し得ること、その経路として嗅神経を介するもの、脳脊髄液を介するものが考えられた。

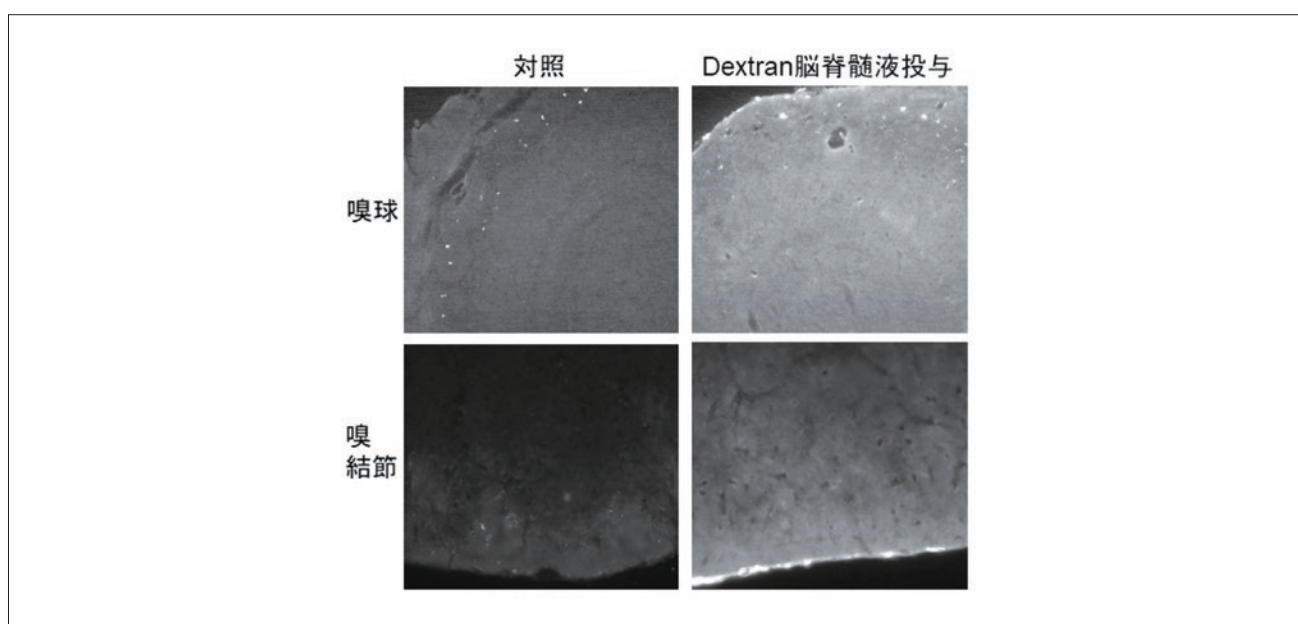


図4 脳脊髄液中に投与した蛍光 Dextran の嗅覚脳領域への移行

考 察

1. マウス嗅覚脳領域における代謝シグナル操作の嗅覚行動への影響について

嗅結節前内側部に受容体アンタゴニスト・アゴニストを局所投与する実験から、この領域が代謝シグナルに基づいて匂い行動を制御することが明らかとなった。当初、この領域は匂いの誘引行動に働くと考えていたが、オレキシン受容体の阻害によって誘引行動が抑制されるだけでなく忌避行動が誘導されたことは予想外であった。このことは、嗅結節前内側部が誘引行動のみならず忌避行動にも関与していることを示している。食欲抑制に働くメラノコルチン4受容体のアゴニスト投与によって匂いの誘引行動が抑制され、匂いの忌避行動が誘導されることもこの可能性を支持している。

この神経機構として我々は、ドーパミン受容体1型・2型をそれぞれ発現するD1細胞・D2細胞に着目している。嗅結節前内側部のD1細胞の活性化が誘引的に、D2細胞の活性化が忌避的に働く³⁾。今後この2種類の神経細胞がどのように代謝シグナルを受け取って匂い行動を制御しているかを検討する。

2. マウスの血液中・脳脊髄液中に投与したトレーサーの嗅覚脳領域への移行について

血液中の物質が脳に移行する経路として血液脳関門を経由するものがよく知られている。我々もこの経路を念頭に解析を始めたが、嗅覚系へのトレーサー移行のパターンから、他の経路も合わせて検討する必要があると考えられた。一つは嗅神経に強い移行が見られることから、血中の物質が嗅上皮の嗅神経から嗅球に移行する可能性である。嗅神経障害で嗅球への移行が促進するのは、嗅神経の比較的緩いバリアーが更に緩くなるためかも知れない。

また嗅結節は脳底部の表面にあって脳脊髄液と接している。嗅結節の表層にトレーサー移行が見られたことから、血液中の物質が脳脊髄液を経由して嗅球や嗅結節に移行した可能性が考えられた。実際、脳脊髄液に投与したトレーサーがこれらの領域に移行することが確認できた。

これら複数の経路が働いて、血液中のシグナル分子が嗅覚脳領域に到達している可能性がある。今後この経路の解析を進めながら、生理活性を持つ代謝ホルモンの移行と嗅覚行動への影響を検討する。脳とからだの協調は食行動のみならずストレス性疾患や多くの神経精神疾患を理解する上でも重要であり、今後本研究の知見を我々の健康、病態治療に結びつけていきたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Murata K, Kanno M, Ieki N, Mori K, Yamaguchi M. Mapping of learned odor-induced motivated behaviors in the mouse olfactory tubercle. *Journal of Neuroscience*. 35: 10581-10599 (2015)
- 2) Nogi Y, Ahasan MM, Murata Y, Taniguchi M, Sha MFR, Ijichi C, Yamaguchi M. Expression of feeding-related neuromodulatory signalling molecules in the mouse central olfactory system. *Scientific Reports*. 10: article 890 (2020)
- 3) Murata K, Kinoshita T, Fukazawa Y, Kobayashi K, Yamanaka A, Hikida T, Manabe H, Yamaguchi M. Opposing roles of dopamine receptor D1- and D2-expressing neurons in the anteromedial olfactory tubercle in acquisition of place preference in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 13: article 50 (2019)

Role of metabolic signals in olfactory behaviors

Masahiro YAMAGUCHI

Department of Physiology, Kochi Medical School, Kochi University

Food odors stimulate appetite strongly. An interesting feature of odor-guided appetite is that food odors promote appetite under a hunger state, but reduce appetite or even induce discomfort under a satiated state. However, the mechanism by which how metabolic state influences odor-guided appetite is not well understood. Previously, we found that the anteromedial region of the olfactory tubercle in the mouse brain plays a crucial role in odor-guided appetitive behavior, and that many receptors for metabolic signal molecules are expressed in the region. In this study, we examined the role of metabolic signals in the region through the local injection of receptor agonists and antagonists. We found that the injection of antagonists for appetite-promoting receptors or agonists for appetite-suppressing receptors attenuated odor-attractive behaviors and conversely induced odor-aversive behaviors, indicating that the anteromedial region of the olfactory tubercle regulates odor-guided appetitive behavior both positively and negatively. In addition, tracer molecules injected in the peripheral blood were efficiently transferred to olfactory brain regions, including the olfactory tubercle. The spatial distribution of tracer molecules raised the possibility that molecules in the peripheral blood may enter olfactory areas via olfactory sensory neurons and cerebrospinal fluid. Taken together, these results suggest that metabolic signals from the periphery can efficiently reach olfactory brain areas and regulate olfactory behavior. Given that many diseases are considered to originate from an imbalance between the brain and body, this study will contribute to an understanding of the diseases and therapies, from the perspective of the olfactory system.