

博士論文

空腹に伴う味覚嗜好・忌避性の調節を担う視床下部神経回路の同定

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 平成 28 年度進学
生物機能開発化学研究室
傳 欧

指導教員 東京大学大学院准教授
三坂 巧

目次

第1章 序論	1
第2章 空腹を誘引する視床下部 AgRP 神経活動が味覚嗜好・忌避性に与える影響	
2.1 序論	5
2.2 材料・方法	6
2.3 結果	10
2.4 考察	12
第3章 光遺伝学を用いた味覚嗜好・忌避性変化を引き起こす AgRP 神経の投射先の特定	
3.1 序論	15
3.2 材料・方法	16
3.3 結果	20
3.4 考察	22
第4章 外側視床下部 LH における AgRP 神経の下流神経の探索	
4.1 序論	25
4.2 材料・方法	26
4.3 結果	29
4.4 考察	32
第5章 外側視床下部 Vglut2 神経の投射先の特定と投射先活動が味覚嗜好・忌避性に与える影響	
5.1 序論	33
5.2 材料・方法	34
5.3 結果	38
5.4 考察	39
総合討論	40
参考文献	47
論文要旨	54
謝辞	58

第 1 章

序論

食物は栄養・味覚・生体調節の3つの機能を併せ持つ。脳内で食物の栄養情報と味覚情報は別々の経路を介し、統合処理され、摂食行動が制御されていることが最近の研究によって明らかになった(Cansell et al., 2012)。空腹になると、栄養不足の情報が末梢から脳へ伝わり、脳内の摂食中枢神経を活性化し、摂食行動を誘引する。また、おいしい味の食物はよく摂取されるのに対し、忌避される味は感知された瞬間に摂食行動が中止される。しかし、これまで脳内における栄養と味覚の認知メカニズムは独立に研究され、それらの情報を統合しなければ分からない課題が多く存在している。その一例として、満腹・空腹時に、脳がどのように味覚情報を認知し、栄養状態や体調に応じて味の感じ方・嗜好性を調節しているのかについては未だに不明である(図 1-1)。

序論では、脳における摂食行動調節と味覚認知・嗜好性に関する知見や課題について概説する。

<摂食行動と味覚認知>

摂食は動物にとって、自身の生存や子孫の繁殖のために重要な行動である。この際味覚は食物の価値の判断基準として機能する。糖質、アミノ酸、脂質など好ましい味の食物は基本的に高栄養価であり多く摂取され、腐敗物や毒物は強い酸味や苦味を呈し有害であり忌避される。摂取された栄養因子は末梢の臓器や脳で受容され、恒常性が維持される。

しかし、こういった基準は常に一定ではなく、生理状態によって味覚の嗜好・忌避することが知られている。例えば、ヒト(Hanci and Altun, 2016)やジョウジョウバエ(Inagaki et al., 2014)の研究では、空腹になると、甘味に対して敏感になることが明らかになった。しかし、満腹・空腹といった生理状態の変化により味の感じ方や食物の好みが変わる仕組みは未だに不明なままである。その原因は、空腹時には、栄養因子が非常に多くの臓器や神経の活動レベルを変化させる(Dietrich and Horvath, 2012)ので、脳内で味覚と栄養の情報の統合・評価に重要な部位の活動と機能を正確に把握することが困難なためである。

<末梢から脳内での味覚伝達路>

味覚は、味物質が口腔内上皮層に分布する味蕾中の味細胞に受容されることにより生じる感覚で甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の5基本味からなる。甘味と旨味は嗜好性味として認識され、栄養価値があるため好まれ、多く摂取される。5基本味の受容機構については分子レベルでの解析が進み、味蕾において各味の受容細胞は基本的に異なることが示されている(Chandrashekar et al., 2006; Yarmolinsky et al., 2009)。

味蕾で受容された味の情報は味神経を介して延髄孤束核(NST)へと入力している。NSTからは、ヒトでは直接に、ラットなどの齧歯類では橋結合腕傍核(PBN)を介して、前脳に味覚情報が伝達される。ヒトや齧歯類の脳を介した味覚伝達経路はNSTやPBNから2方向に分岐する。1つはNST、PBNを経由して視床後内側腹側核(Ventral posterior medial nucleus of the thalamus, VPMpc)に投射、最終的には大脳皮質味覚野(Gustatory cortex, GC)に繋がって

いく。この経路を視床皮質経路と呼び、基本味の味覚の認識に関与する経路だと言われている。もう 1 つは、味神経から NST や PBN に投射したのち、そこから外側視床下部(Lateral hypothalamus, LH)や扁桃体 (Amygdala)、分界条床核(Bed nucleus of stria terminalis, BNST)などに投射し、最終的に前脳眼窩野に投射されていく。この回路は腹側前脳経路と呼ばれ、嗜好性、忌避性といった食物の味の価値評価に関わると言われている(Carleton et al., 2010)(図 1-2)。また、この経路については、PBN が LH と相互に投射をして各味物質に応答する事が報告されている(Tokita et al., 2014)。

<AgRP 神経と摂食行動>

脳基底部に存在する視床下部は摂食・睡眠・生殖など、根源的な欲求を制御する神経が密集。このうち、視床下部弓状核に存在するアグーチ関連ペプチド産生神経（以下 AgRP 神経神経と記述する）は特に摂食行動を誘引するうえで重要だと考えられている。この神経は AgRP やニューロペプチド Y(NPY)という摂食亢進ペプチドを産生する。NPY は脳室内投与を行うと数時間の間における摂食量が大きく増加する(Clark et al., 1984; Levine and Morley, 1984; Stanley et al., 1985)。一方、AgRP 脳室内投与を行うと、数日間にわたって摂食量が増加するという効果を示す(Hagan et al., 2001)。

AgRP 神経は絶食時に脳内で最初に興奮し、摂食を亢進する神経ネットワークを活性化させ、摂食行動を誘引する。また、その近傍には摂食行動を抑制する働きのあるプロオピオメラノコルチン (proopiomelanocortin: POMC) 神経も存在し両者は拮抗的に働くと考えられている(Cansell et al., 2012) (図 1-3)。

最近の研究から、AgRP 神経を人為的に活性化する事で、急性の摂食行動が誘導されることが示された(Krashes et al., 2011; Aponte et al., 2011)。また、成熟マウスでは AgRP 神経を遺伝的に除去すると、食欲不振を引き起こし、最終的に餓死に至ると考えられている(Wu et al., 2009)。また、AgRP 神経は NPY、AgRP の他に、抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA)を放出し、抑制性のインプットを投射先に行う事で摂食行動を制御していることが明らかに寝ている(Tong et al., 2008; Krashes et al., 2013)。

<摂食行動を制御する AgRP 神経回路と味覚伝達経路との関係>

AgRP 神経は、外側視床下部 (LH) や扁桃体 (Amygdala)、視床下部室傍核 (PVH)、分界条床核 (BNST) など広く投射することが分かっている(Betley et al., 2013)。AgRP 神経の投射先の一部は味覚の伝達経路視床皮質経路と腹側前脳経路を構成する部位でもあり、共通の投射先としては、PBN、LH、CEA、BNST があげられる。これらの部位では近年、摂食における役割と味受容への影響についての研究が多くなされている(Rossi and Stuber, 2018)。しかし、味情報と栄養情報がどのように統合処理され、摂食行動を制御しているのかについては未だ不明な点が多い。

<空腹状態がもたらす生理状態の変化>

空腹になると、AgRP 神経の活動だけでなく、他の部位にも様々な変化が生じる。代表的な例として、空腹時に胃で産生されるホルモンであるグレリンは脳へも伝達され、摂食を促進することが知られている(Wren et al., 2001)。反対に、満腹時には、脂肪組織からレプチンが分泌され摂食を抑制することが知られている(Myers et al., 2008)。これらホルモンのターゲットは脳内の様々な部位に加え、末梢の多くの臓器に存在し、複雑な応答パターンを示すことが知られている(図 1-4)。

したがって、空腹時に脳内で味の認知・嗜好がどのように変化するかを知るためには、味覚と栄養の情報の統合・評価に重要な神経ネットワークの活動と機能を正確に把握しなければならないという課題があった。

<神経活動を人工的に制御する神経科学ツール>

この課題に対し、摂食行動を引き起こす神経回路の中で起点といえる AgRP 神経の活動を人工的に制御することで、生理状態の変化に伴うホルモンや他の神経の副次的な活動を排除できるのではないかと考えた(図 1-5)。近年、化学遺伝学 (Chemogenetics) 手法や光遺伝学 (Optogenetics) が開発され、神経活動を人工的に制御することが可能になった。

化学遺伝学として汎用されている DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) は、G タンパク共役受容体 (GPCRs) の変異体を用いて神経活動をコントロールする。DREADD はムスカリン性アセチルコリン受容体の変異体であり、天然リガンドであるアセチルコリンへの結合能を消失している。一方、人工化合物である clozapine-N-oxide(CNO)を特異的に受容する。この化合物は体内の他の GPCR には作用しないことが示されている(Armbruster et al., 2007)。DREADD は結合する G タンパク質の種類に応じて複数存在し、CNO の (腹腔内) 投与により神経活動を可逆的に興奮(Gq 共役型) もしくは抑制(Gi 共役型) できる(Pei et al., 2008 ; Wess et al., 2013)(図 1-6)。

光遺伝学では、遺伝学的手法を用いて光によって活性化されるイオンチャネルを特定の細胞に発現させ、その機能を光で操作する技術であり、神経回路の解析でよく使用されている(Reiner and Isacoff, 2013)。最も汎用されているとして光活性化型イオンチャネルのチャネルロドプシン 2(Channelrhodopsin-2)が知られている(Häusser, 2014; Hernández et al., 2018)。

チャネルロドプシン 2 は光応答性イオンチャネルで、470nm の青色光を受容すると非選択的陽イオンチャネルが開口し、その結果 ChR2 発現細胞は脱分極応答を示し、神経を活性化する。また、チャネルロドプシン 2 は神経の細胞体部分だけではなく、投射先末端にも溜まる性質を持つため、投射先末端を光刺激することによって、投射先限定的に神経活動を活性化することができる。これにより、経路特異的に神経活動を操作することが可能になる。

＜本研究の目的＞

以上を踏まえ、本研究では、神経活動を人工的に制御することで、空腹が味覚嗜好・忌避性の変化に与える影響を明らかにすることを目的とした。第2章では、末梢やホルモンの影響を軽減するため、DREADD手法を用いて AgRP 神経をコントロールし、嗜好味・忌避味の受容が空腹時にどのように変化するかを調べた。その結果、AgRP 神経を活性化すると、甘味に対する嗜好性の上昇、苦味に対する忌避性の低下が見られた。第3章では、光遺伝学を使用して、味覚嗜好・忌避性に関する AgRP 神経の投射先の特定を試みた。その結果、外側視床下部に投射する AgRP 神経を選択的に活性化した時のみ味覚の嗜好性・忌避性に変化が観察された。最後に第4章と第5章では、外側視床下部のグルタミン酸作動性神経が AgRP 末端と近接していることを示し、この部位から異なる経路を介して味覚の嗜好性や忌避性がそれぞれ調節されることを見出した。

このように本研究は、脳内における味・栄養情報の統合・評価機構を解明する初めての取り組みである。

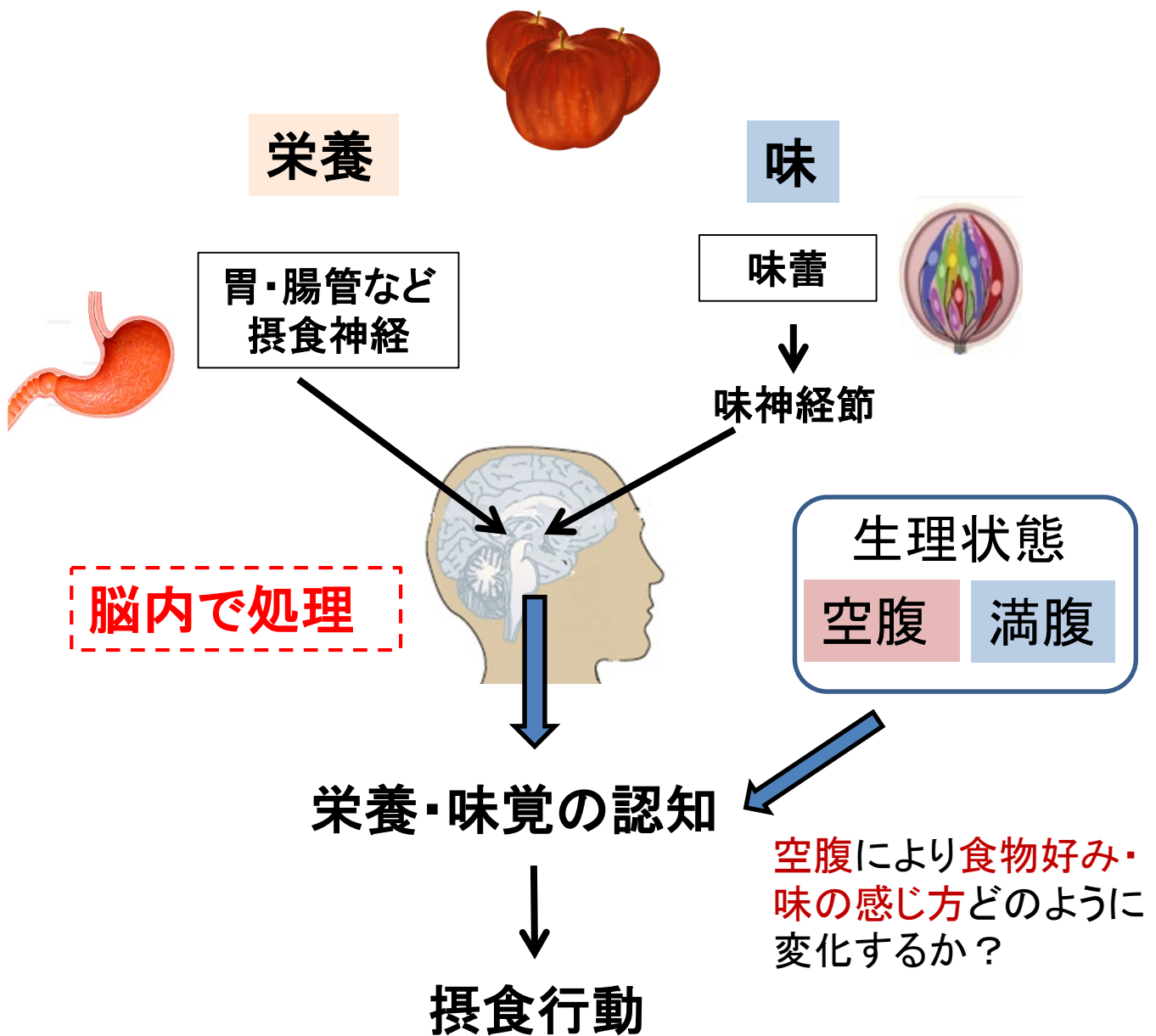


図1-1 脳における食の栄養と味覚の認知

食べ物の味覚や栄養の情報を末梢の別々の伝導路を介して受け取られ、脳内で統合処理され、最終的な摂食行動の実行や停止に関わる。しかし、生理状態の空腹・満腹時では末梢や脳レベルで様々な変化が生じ、味の感じ方や食物への嗜好に影響することが考えられる。

統合した味・栄養情報、は栄養状態(空腹・満腹)によって異なる様式で摂食行動を制御する。

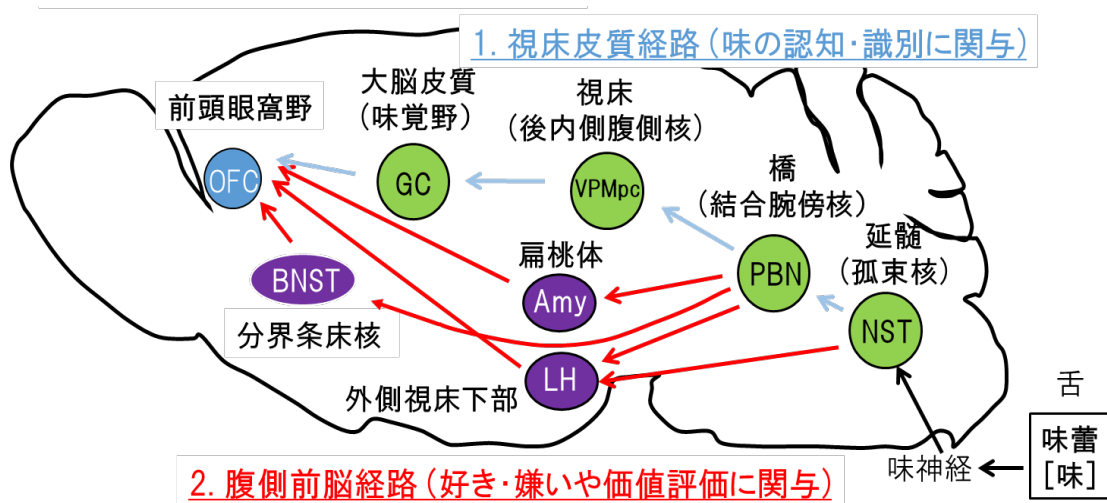


図1-2: マウスの脳内の味覚伝達経路

マウスの脳内には5基本味の識別に関わる視床皮質経路と、味の嗜好性・忌避性に関与する腹側前脳経路が存在する。これら2つの経路が味の認知または価値を評価し、食物の摂取・拒絶反応を引き起こす。

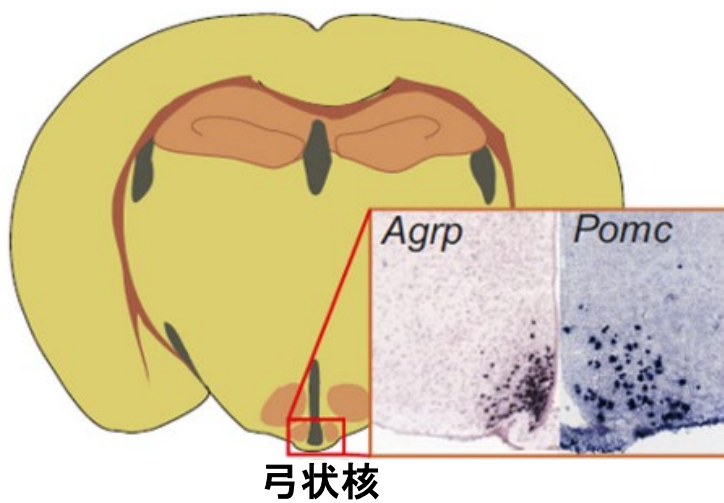


図1-3 NPY/AgRP神経の位置

NPY/AgRP神経は脳の視床下部弓状核に局在し、この神経が興奮すると、摂食行動を促進する。弓状核には、NPY/AgRP神経に隣接し、摂食行動を抑制するPOMC神経も存在する。

(Cancell.C .*Front Endocrinol* . 2012 より引用)

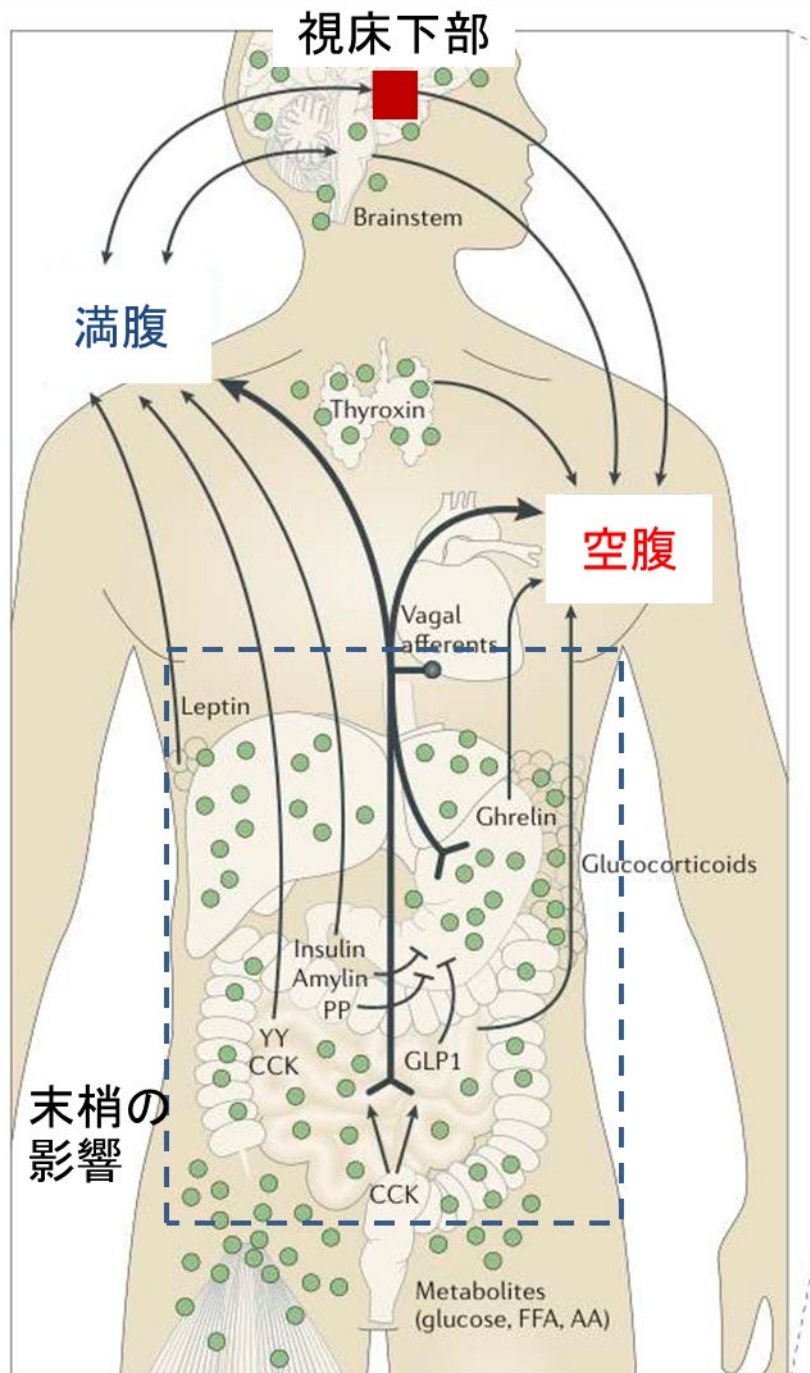


図1-4 空腹・満腹時臓器から分泌されるホルモン

空腹・満腹時は視床下部の活動の変化だけではなく、末梢の臓器でも様々なホルモンの分泌変化が生じる。

空腹時に変化するホルモン(例:グレリン)

満腹時に変化するホルモン(例:レプチン)

(Dietrich and Horvath. *Nat Rev Drug Discov.* 2012より引用、改変)

脳内における味・栄養情報の統合・評価



問題点

空腹に伴う血糖値・臓器ホルモンの活動変化が脳の様々な部位に影響する



解決策

摂食中枢神経AgRPの活動を制御した「人工的な空腹・満腹」時の味覚嗜好・忌避性の評価



ホルモンなど副次的な影響を排除

＜空腹・満腹時の味の感じ方（感度・閾値）・嗜好・忌避性の変化の評価＞

図1-5 空腹に伴う味覚・嗜好性変化の評価の課題の問題点と解決策

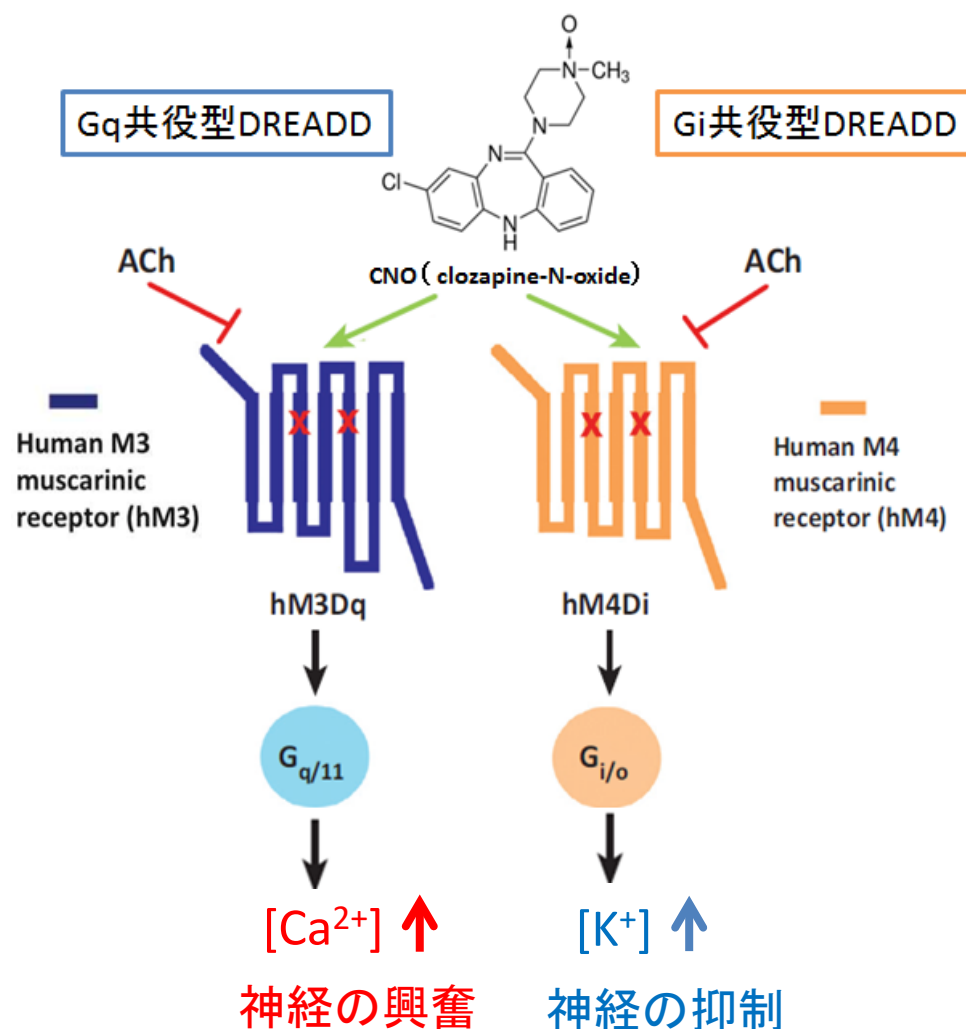


図1-6 薬理遺伝学(DREADD)による神経活動制御

hM3DqやhM4Diはムスカリン性アセチルコリン受容体の変異体であるGPCRであり、天然リガンドであるアセチルコリンへの結合性を失ってその代わりに人工化合物であるclozapine-N-oxide(CNO)を特異的に受容する。hM3DqはCNOと結合すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇することによって神経が興奮する。一方、hM4DiはCNOと結合すると、 K^+ 濃度の上昇によって神経活動が抑制される。

(Wess et al., *Trends Pharmacol Sci.* 2013より引用、改変)

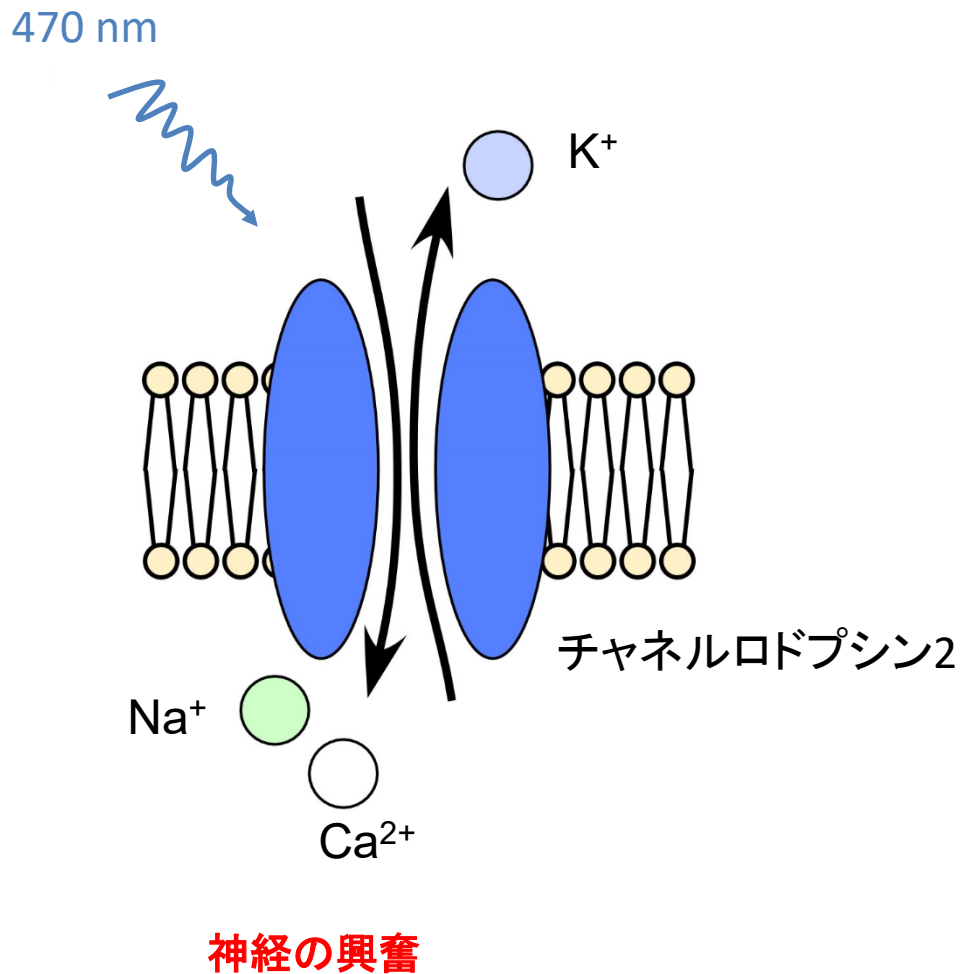


図1-7 光遺伝学技術による光刺激依存的な神経活動制御
チャンネルロドプシン2 (Channelrhodopsin2) は光応答性イオンチャネルで、470 nmの青色光を受容すると非選択的陽イオンチャネルが開口し、その結果ChR2発現神経細胞は脱分極応答を示し、神経が活性化される。

第 2 章

空腹を誘引する視床下部 AgRP 神経活動が
味覚嗜好・忌避性に与える影響

2-1 序

国内外の最近の多くの研究で、脳が味覚や栄養の情報を別々の伝導路を介して受け取り、摂食行動を制御していることがわかった。このうち味覚は食物の価値の判断基準として機能する。糖質、アミノ酸、脂質など好ましい味の食物は基本的に高栄養価であり多く摂取され、腐敗物や毒物は強い酸味や苦味を呈し有害であり忌避される。

しかし、こういった基準は常に一定ではなく、生理状態によって味覚の嗜好・忌避が変化することが知られている。例えば、生理状態の空腹・満腹や肥満時で味覚情報に対する認知が変化することが報告されている(Hanci and Altun, 2016; Hardikar et al., 2017)。

一方で、満腹・空腹といった生理状態の変化により味の感じ方や食物の好みが変わることが不明なままである原因の一つは、空腹時には、末梢の多くの臓器がホルモンを放出し、様々な部位の脳神経の活動レベルを変化させるため、味覚と栄養の情報の統合・評価に重要な部位の活動と機能を正確に把握することが困難であることが挙げられる。

近年、神経活動の人工制御システムである DREADD 技術 (designer receptors exclusively activated by designer drugs) が神経科学の研究にとって有力な手法として用いられるようになった。DREADD はムスカリン性アセチルコリン受容体の変異体であり、天然リガンドであるアセチルコリンへの結合性を失っている。一方、人工化合物である clozapine-N-oxide(CNO)を特異的に受容する。したがって、CNO を投与することで、DREADD を導入した神経の活動を制御することが可能である(図 2-2、図 2-3)。

そこで本章では、野生型のマウスで満腹と空腹の味覚嗜好性・忌避性の変化を検証した上で、摂食中枢神経である AgRP 神経の活動が味の感じ方に影響を及ぼすかどうかを調べた。具体的には、AgRP-ires-Cre ノックインマウスに、Cre 依存的に興奮性 DREADD(hM3Dq)を発現するアデノ随伴ウイルスを導入することで AgRP 神経の活動を人工的に制御した(図 2-1)。このマウスは CNO を腹腔内に投与すると、空腹時と同様に餌を大量に摂取するようになることが確認できた。また、AgRP 神経の活動の有無によって味嗜好性が変化するかどうかについて brief access taste test で解析することをした。

2-2 実験材料と方法

以下の実験は東京大学動物実験実施マニュアルに沿って実施し、実験計画については東京大学農学部動物実験委員会の承認を受けた。組み換えアデノ随伴ウイルス注入の組み換え DNA 実験については東京大学大学院農学生命科学研究科の遺伝子組み換え生物等委員会に承認を受けた。

マウス

C57BL/6J 野生型マウス（以後 WT マウスと表記）は日本クレアより購入した。

AgRP-ires-Cre ノックインマウス（系統名：AgRP^{tml(cre)}Low/J, Stock#012899）(Tong et al., 2008) は The Jackson Laboratory より購入し、C57BL6/J(日本クレア)と繁殖して使用した。このマウスは AgRP 遺伝子の終止コドンの直後に ires 配列と Cre 遺伝子が挿入されたノックインマウスで AgRP 神経特異的に Cre recombinase を発現することが他の多くの研究でも確認されている(Atasoy et al., 2012;Krashes et al., 2011)。

アデノ随伴ウイルス(AAV, Adeno Associated Virus)

AgRP 神経の活動を人工制御するため Cre 依存的に外来遺伝子を発現できる組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)を使用した(Rossi et al., 2015)。図 2-1C に示すように、この AAV では、外来遺伝子は DIO スイッチ (double-floxed inverted open reading frame) に挟まれているため、通常は遺伝子の向きが逆であり翻訳されない。一方、Cre recombinase が存在すると、組換えが起こり、遺伝子の向きが変わり神経特異的なプロモーターであるヒトシナプシンプロモーターの下流で正しく翻訳されるようになる(図 2-2A を参考)。本章では、Cre 依存的に興奮性 DREADD(hM3Dq)を発現する AAV、またはそのコントロール AAV を The University of North Carolina Vector Core より購入し、使用した。

AAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry (Titer: 8×10^{12} ゲノムコピー/ml, セロタイプ 8)

AAV-hSyn-DIO-mCherry (Titer: 5×10^{12} ゲノムコピー/ml, セロタイプ 8)

AgRP-ires-Cre マウスへの AAV ウイルスの導入

8-10 週齢のオスの AgRP-ires-Cre マウスを実験に使用した。マウスはイソフルランを用いて麻酔した（動物イソフルラン麻酔装置 SN-487、シナノ製作所、麻酔導入時の濃度 4%、手術中 1-2%）。脳定位装置（model 900、kopf 社）にマウスを固定し(図 2-1A)、頭蓋の正中線周辺の皮膚を切開し、少量の過酸化水素(H₂O₂)を頭蓋骨に塗布し、ブregマとラムダの位置を確認した。

以下の座標に AAV をインジェクションするためマイクロドリル（Ideal Micro-Drill™ Surgical Drills, 0.45 mm drill）を用いて頭蓋骨に小さい穴を開けた(図 2-1B)。（座標はブregマから AP= -1.45 mm ML= ±0.3 mm DV= -5.8 mm）。

ウイルスインジェクションはマイクロポンプ（UltraMicroPump-UMP3, World Precise

Instruments) に固定したマイクロシリンジ(10 μ l syringe, 701RN-model 7635-01, Hamilton) を用いて行った。マイクロシリンジコントローラ (Micro4 microsyringe pump controller, World Precise Instruments) で AAV 溶液 (300 nl) を速度 (60-100 nl/min) でインジェクションした (図 2-1-D)。その後、5 分間放置しニードルをゆっくり抜いた。頭蓋骨をエタノールで消毒後、抗生物質 (NEOSPORIN) を塗布した後、外科用接着剤(アロンアルファ、第一三共) で皮膚を接着した。また、術後の痛みを軽減するため鎮痛剤であるメロキシカム(0.5 mg/kg)を腹腔内投与した。その後、1 匹ずつ別々のケージに入れ、2~3 週間ほど飼育後、他の実験に使用した。以降、AAV を導入した AgRP-ires-Cre マウスは以下のように記載する。

AgRP-hM3Dq-mCherry マウス: AAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry 導入

AgRP-mCherry マウス: AAV-hSyn-DIO-mCherry 導入

マウス脳の灌流固定・切片作製

マウスの脳切片は以下の通り準備した。ウイルスインジェクション後 2-3 週間を経ったマウスを 300 μ l の Avertin (Sigma) で麻酔し、動物が昏睡したことを確認後、開腹し、心臓を介して氷冷 PBS (30 ml) を灌流した。その後、氷冷 4%PFA/PBS で灌流固定し、脳を摘出した。摘出した脳は 4%PFA/PBS 中 4°C で 1 晩追固定後、翌日、30%スクロース溶液中に移し、4°C で 1-2 晩放置した。

その後、脳サンプルはミクロトーム (REM-710、大和光機工業) を用いて、50 μ m の厚さでブレグマからの距離が-1.4 mm から-2.6 mm までの範囲で冠状切片を作製した。作製した切片は不凍液 (組成は以下に記載した) に入れ、実験に使用するまで-20°Cで保存した。

不凍液の組成: リン酸塩緩衝液(pH 7.2) 50 mM、スクロース 30%(w/v)、PVP-40(Sigma) 1%(w/v) 、エチレングリコール 30%(v/v)

免疫組織染色

免疫組織染色は浮遊法を用いて行った(Rossi et al., 2015)。使用した 2 種類の AAV はいずれも赤色蛍光タンパク質である mCherry を発現する。このため、作製した脳切片は PBST で 3 回洗浄後、スライドガラス (Micro Slide Glass APS コート付、matsunami 社) に載せ、その蛍光をスライドスキャナー顕微鏡 (バーチャルスライド VS-120、Olympus 社) で直接観察した。

AgRP 神経の活動変化を評価するため、神経活動マーカーである c-Fos との 2 重染色を行う際は以下の手順で行った。AgRP-hM3Dq-mCherry マウスと AgRP-mCherry マウスに CNO (1.0 mg/kg) を腹腔内投与し 1 時間放置後、上述の方法で脳切片を作製した。

作製した切片は PBS で 3 回洗浄後、ブロッキング溶液(5%donkey serum を含む PBST)で 250 倍に希釈した c-Fos 抗体 (SC52-G, Santa Cruz) を用いて 4°C で 1 晩静置した。翌日、

PBS で 3 回洗浄し、遮光した状態で 500 倍に希釈した Alexa488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (A-11055, Molecular Probes) と 2 時間反応させた。染色した切片を PBST で 3 回洗浄後、スライドガラスに載せ観察した。

摂食量の測定

摂食量の測定は、通常マウスが餌をほとんど摂取しない明期である午前中(9:30~10:00)に開始した(Nakajima et al., 2016)。1 匹ずつ飼育している AgRP-hM3Dq-mCherry マウスを、2 つのグループに分け、一方のグループに CNO (1.0 mg/kg) を腹腔内投与し、もう一方のグループに同量の生理食塩水を投与した(図 2-4)。その後、各マウスをケージに戻し、秤量した餌 (クレア、CE-2) を与え、30 分、1 時間、2 時間、4 時間の時点での摂食量を測定した(図 2-4)。翌日、前日 CNO を投与したグループのマウスに生理食塩水、もう一方のグループのマウスに CNO を腹腔内投与し、前日同様に、摂食量を測定した(図 2-4)。データは両日の結果を合わせて解析した。図 3-8D の絶食後の摂食量の測定は前日の夕方から絶食させたマウスを用いて実験を行った。

Brief access taste test による味嗜好性の評価

Brief access taste test はマウスに味溶液を短期間(5-10 秒間)提示し、飲み口を舐める回数(リック数)をカウントすることで、post-ingestive effect を除いた味への嗜好性を測定する試験である(Glendinning et al., 2002)。C57BL6/J マウス、AgRP-hM3Dq-mCherry マウスと AgRP-mCherry マウス (各 6 匹)を使用した。甘味・苦味についてテストを行った。

各マウスは個別に飼育し、本テストの実施前に、溶液の舐め口の位置と舐め方を覚えさせるため、3-4 日間トレーニングを行った(図 2-5A)。

嗜好される味(甘味)の試験については、6 時間絶水の条件で行った。一方、忌避される味(苦味・酸味)の試験については、味物質を高濃度のスクロースに溶かした場合では 6 時間絶水の条件で行い、水に溶解した場合は 23 時間絶水後で行った。餌は自由に摂取できるようにした。

Brief access taste test はレーザ式リックメータと専用ケージ (ニューロサイエンス株式会社)を用いて行った (図 2-5B)。各味溶液を提示して、マウスが飲み口を舐めはじめてから 10 秒間のリック数の測定を行った。マウスがリックした時にレーザを遮断する回数がリック数として記録される(図 2-5C)。嗜好性味溶液は高濃度から低濃度順、忌避性味溶液は低濃度から高濃度の順で測定した。各濃度の Lick ratio は、300 mM スクロースのリック数に対する比率として計算した。

実験日程、テスト内容、摂食・飲水条件の一覧を図 2-6A に示す。使用した味質と濃度は表 2-6C に示す。WT マウスでは、1 つの味溶液について通常時と絶食時で測定した。

AgRP-hM3Dq-mCherry と AgRP-mCherry マウスでは、1 つの味溶液について CNO の腹腔内投与の有無で 2 日間測定した。各群は 2 グループに分け、一方のグループは初日に CNO

(1.0 mg/kg) を投与し、もう一方には生理食塩水を投与した。いずれの場合も投与後 10 分してから測定した。翌日はインジェクションする溶液を逆にして、同様のアッセイを行った (図 2-6B)。

味神経応答測定

AgRP-hM3Dq-mCherry マウスの味神経応答測定は、当研究室の成川真隆先生により実施した。マウスに生理食塩水または CNO(1.0 mg/kg)を腹腔内投与後、10 分してから、ペントバルビタールとウレタンで麻酔を行った。鼓索神経応答は生理食塩水または CNO 投与後 90 分から 180 分の間で測定した。鼓索神経応答で使った味溶液の種類と濃度は以下のとおりである。: スクロース(30-500 mM)、スクラロース(3-30 mM)、デナトニウム(3-30 mM)。各味物質に対する応答は、100 mM 塩化アンモニウムの応答値との比率として計算した。

データの統計処理

図 2-7BC、図 2-8CDEF、図 2-9CD、図 2-10、図 2-11 ではスチューデントの t 検定により、有意差検定を行った。統計処理は GraphPad Prism 6 ソフトウェアを使用して行った。

2-3 結果

2-3-1 WT マウスで通常時と絶食時の味覚嗜好性テスト結果

Brief access taste test はマウスに味溶液を 10 秒間提示し、溶液を舐める回数を数えることで、その味溶液の嗜好・忌避の度合を判定する実験方法である。WT マウスで、甘味(スクロース)、苦味 (デナトニウム) 溶液を用いて、満腹時と空腹時の味覚嗜好・忌避性を比較した。

甘味溶液で Brief access taste test を行った結果、満腹時と空腹時で、高濃度の 300mM スクロース溶液をリックする回数で差は見られなかった。しかし、空腹時に中間の濃度である 100mM スクロースをリックする回数は満腹時と比べて、有意に上昇した (図 2-7B)。このことから、甘味に対する感度は空腹によって上昇することが示唆された。

次に、スクロース溶液と苦味物質であるデナトニウムの混合溶液を使用して、満腹時と空腹時の苦味への忌避性を評価した。混合溶液をリックする回数はデナトニウムの濃度依存的に減少する。興味深いことに、絶食したマウスでは、満腹時と比べ、1 mM のデナトニウム溶液をリックした数が有意に上昇し、デナトニウムに対する応答曲線が右方向にシフトした (図 2-7C)。空腹時、苦味に対する忌避行動が緩和され、苦味に対する感度が減少したことが示唆された。

以上の結果より、空腹状態が味覚嗜好性と忌避性を反対方向に調整していることが明らかになった。

2-3-2 AgRP-ires-Cre マウスの視床下部 AgRP 神経における DREADD の発現

2-3-1 の実験で、生理的な空腹状態で味覚感受性が変化することが分かった。次に、摂食神経回路である AgRP 神経の活動が空腹時の味覚嗜好性・忌避性に直接影響を与えるかどうか検証した。

AgRP 神経の活動を人工制御するため、興奮性 DREADD である hM3Dq をコードする組換えアデノ随伴ウイルス(AAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mcherry)を使用した(図 2-4A)。この AAV では、hM3Dq は DIO スイッチ (double-floxed inverted open reading frame) には含まれているため、通常は遺伝子の向きが逆であり翻訳されない。一方、Cre recombinase が存在すると組換えが起こり hM3Dq の向きがかわり正しく翻訳されるようになる。そこで、AgRP 神経特異的に Cre recombinase を発現する AgRP-ires-Cre ノックインマウスの視床下部にこの組換え AAV を導入した(図 2-2AB・図 2-8A)。AAV 導入マウス(AgRP-hM3Dq-mCherry マウス)の脳切片を作製したところ図 2-8B に示すように、視床下部弓状核に hM3Dq と融合した mCherry の蛍光 (赤) が観察された。以上より AAV を用いることで hM3Dq を AgRP 神経に発現させることができたことを確認した。

2-3-3 AgRP-hM3Dq-mCherry マウスへの CNO 投与による摂食量の変化

次に、このマウスに CNO を投与し、マウスが普段餌を食べない明期の摂食量を測定した(図 2-8C)。生理食塩水を投与した場合と比べ、投与後 30 分から 4 時間の間での摂食量が有

意に上昇した(図 2-8C)。また重要な事に、この摂食パターンは、マウスを 1 晩絶食させた後に再給餌したときの摂食パターンに非常によく似ていた(図 2-8D)。一方、AgRP-mCherry マウスでは CNO 投与による摂食量の変化が見られなかった(図 2-9C)。したがって、DREADD を用いて AgRP 神経を人工的に活性化させることで、通常の空腹時に匹敵する摂食行動を誘導することができた。

2-3-4 CNO 投与による AgRP 神経での c-Fos の発現

CNO 投与により神経活動マーカーである c-Fos の発現が AgRP 神経で上昇するかを検証した。AgRP-hM3Dq-mCherry マウスに CNO を投与し 1 時間後に脳を摘出し、切片を作製した。図 2-8B に示すように、hM3Dq-mCherry の発現細胞(赤)において c-Fos (緑) の発現が観察された。一方、コントロールとして mCherry を発現させた AgRP-mCherry マウスでは CNO を投与しても c-Fos の発現が見られなかった(図 2-9B)。

2-3-5 AgRP 神経の活動が嗜好性の味におよぼす影響の評価

嗜好性の甘味に対する味覚嗜好テストは 6 時間絶水後に実施した。AgRP-hM3Dq-mCherry マウスでは、CNO を投与した場合にスクロース溶液に対する感度が上昇した(図 2-8E, 100 mM スクロース溶液のリック数の違いを参照)。重要なことに、この感度上昇はマウスを絶食させた場合にも観察された(図 2-7B)。一方、カロリーを含まない人工甘味料スクラロースを用いて同様の実験を行った場合においても、AgRP 神経の活動が高まるとスクラロース溶液への感度が上昇した(図 2-10A)。これに対し、コントロールの AgRP-mCherry マウスでは、CNO を投与してもスクロース溶液に対する嗜好性の変化が観察されなかった(図 2-9D)。したがって、AgRP 神経の活動が高まると嗜好性の甘味に対する感度が上昇することが考えられた。

2-3-6 AgRP 神経の活動が忌避性の味におよぼす影響の評価

忌避性の味の評価は 6 時間絶水後に実施した。苦味溶液(デナトニウムを 500 mM スクロースに溶かした溶液)に対する味感受性を評価したところ、CNO を投与するとコントロール群と比べ、デナトニウムに対する感度が低下する傾向にあった(図 2-8F)。この変化は絶食時とよく似ていた。同様の実験を酸味でも行った。この場合、CNO を投与すると酸味に対する感受性の変化も観察された(図 2-10C)。以上により、AgRP 神経の活動が高まると忌避性の味に対する反応が減弱する傾向にあることが示された。

苦味に対する感度の評価はデナトニウムを高濃度(500 mM)のスクロースに混合溶液を使用しているため、苦味溶液に対する反応が AgRP の活性化に伴う甘味感受性の上昇にマスクされた可能性が考えられる。そのため、デナトニウムのみを溶解した溶液を使用して検証した。デナトニウム溶液に対するリック行動のモチベーションを高めるため、AgRP-hM3Dq-mCherry マウスは前日から 23 時間絶水した。翌日、マウスに CNO または食塩水を

投与し、苦味に対する感受性を評価した。その結果、CNO を投与して AgRP 神経を活性化させると、0.3 mM のデナトニウム溶液をリックした回数の上昇が観察され（図 2-10B）、空腹時の甘味嗜好性の上昇に関係なく、苦味物質に対する感度が低下することが明らかになった。

2-3-7 AgRP 神経を活性化した場合の味神経応答

AgRP 神経の活動が末梢の味神経の活動を調節しているかを味神経応答実験で検証した。

AgRP-hM3Dq-mCherry マウスを用い、生理食塩水または CNO を投与の 90 分後に、麻酔した状態で鼓索神経の味覚応答を行った。その結果、甘味溶液のスクロース、スクラロース、または苦味溶液のデナトニウムの味覚応答を測定した結果、CNO 群と食塩水群では差が観察されなかった（図 2-11ABC）。したがって、AgRP 神経活動が末梢の味覚伝達に影響を及ぼしていないことが示唆された。

2-4 考察

本章では、空腹時に生じる生体の様々な変化—脳における神経活動、末梢の臓器のホルモン産生など—の影響を除去した状態で味嗜好性の変化を評価するため、AgRP 神経の人工制御を実施した。はじめに、DREADD 手法を用いて AgRP 神経を起点とした神経ネットワークを人工的に活性化すると空腹状態を再現できることを確認した(図 2-3、図 2-8BC)。人工空腹マウスの味嗜好性を評価したところ、AgRP 神経の活動に応じて甘味に対する感度が上昇し(図 2-8E)、苦味に対する感度が減少することを見出した(図 2-8F)。また、AgRP 神経を活性化した時の味神経応答を測定し、通常時と比較したところ、鼓索神経における甘味や苦味に対する応答の変化が見られず、空腹状態は末梢の味覚応答に影響を及ぼしていないと考える(図 2-10)。

2-4-1 DREADD 手法を用いた AgRP 神経の活性化による摂食亢進

今回の実験で AgRP 神経を人工的に興奮させた場合、通常餌を摂取しない明期でも摂食行動が見られるようになることを確認した(図 2-8C)。また、この摂食パターンは、マウスを 1 晩絶食させた後に再給餌したときの摂食パターンに非常によく似ていた(図 2-8D)。さらに、AgRP 神経を活性化させると神経活動マーカーである c-Fos の発現が顕著に上昇することを見出した(図 2-8B)。

以上の結果より、AgRP 神経を人工的に興奮させることで、末梢の影響を排除しつつも空腹状態を再現できたといえる。また、研究対象を脳内での AgRP 神経の活動と味受容経路との関係に絞り込むことができた。

2-4-2 AgRP 神経の活動と味覚嗜好性・忌避性の変化

AgRP 神経の活動が味覚嗜好性・忌避性に及ぼす影響を評価したところ、AgRP 神経を人工的に活性化させると、スクロースとカロリーを含まないスクラロースに対する嗜好性の上昇が観察された(図 2-8E、図 2-10A)。空腹時の甘味に対する嗜好性の上昇は甘味溶液に含まれるカロリーに対するものではないと示唆された。また、AgRP 神経の活性化と同時に、苦味・酸味に対する忌避性の低下を見出した。

このような現象の生理的な意義を考察したところ、空腹時の甘味の嗜好性の上昇は、カロリーを含む餌の味に敏感になることで食物を探索・摂取する効率を高めるからかもしれない。一方、カロリーを含まないスクラロースに対する感度も上昇したことから、好ましい味そのものに対して敏感になることも考えられる。苦味への感度低下は、空腹時には有毒なリスクのある食物も摂取しないと生存出来ないためと考えられる。いずれの変化も動物が飢餓を回避するための適応戦略の一環と考えられる。

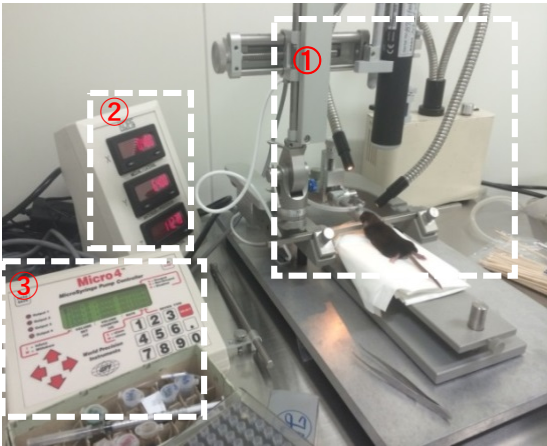
2-4-3 AgRP 神経の活動と末梢の味覚認知

DREADD 手法を用いて AgRP が活性化すると、好ましい味に対する感受性が上昇し、嫌

いな味に対する感受性が低下することが明らかになった。味物質は最初、舌の味蕾の味覚受容体に感知され、味神経を介し、その味覚情報が脳の孤束核（NST）に伝達されることが知られている。従って、AgRP 神経活動による味覚感受性の修飾効果の作用部位は末梢の味神経もしくは脳神経だと考えられる。通常の満腹時と DREADD 手法を用いて AgRP の活動を活性化した人工空腹時で鼓索神経の味覚応答を比較した結果、嗜好性・忌避性の味に対する応答値の変化が観察されなかった(図 2-10)。以上の結果より、AgRP 神経の活動は末梢の味覚情報伝達に影響を及ぼしてないことが明らかになり、脳神経で味覚認知の修飾を行っていることが示唆された。

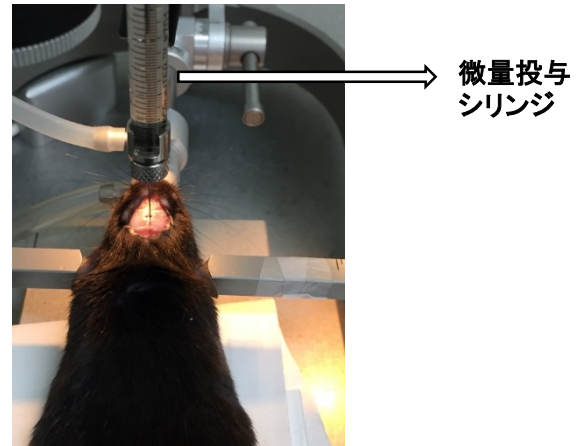
本章の成果をまとめると、マウスモデルで満腹時と空腹時で味に対する嗜好性・忌避性が変化することが実証された。また、DREADD 手法を用いて視床下部の AgRP を活性化することで人工空腹を再現し、空腹に似たような味覚感受性の変化が観察された。つまり、AgRP 神経活動が空腹時の味覚修飾に重要であることが示された。次章では AgRP 神経回路の活動に着目し、空腹が味覚嗜好性・忌避性を制御する脳部位の探索を進めた。

A

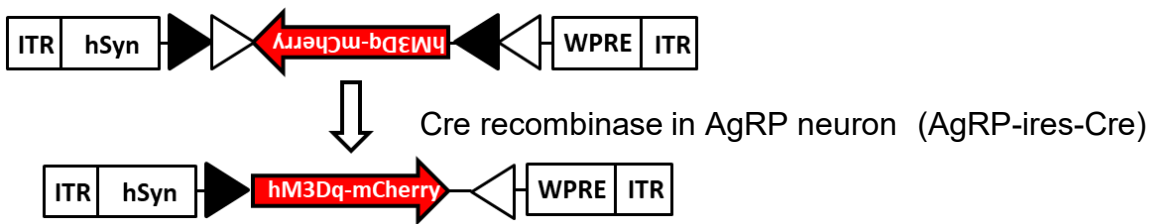


① 脳定位装置 ② デジタル座標表示 ③ マイクロポンプ

B



C



D

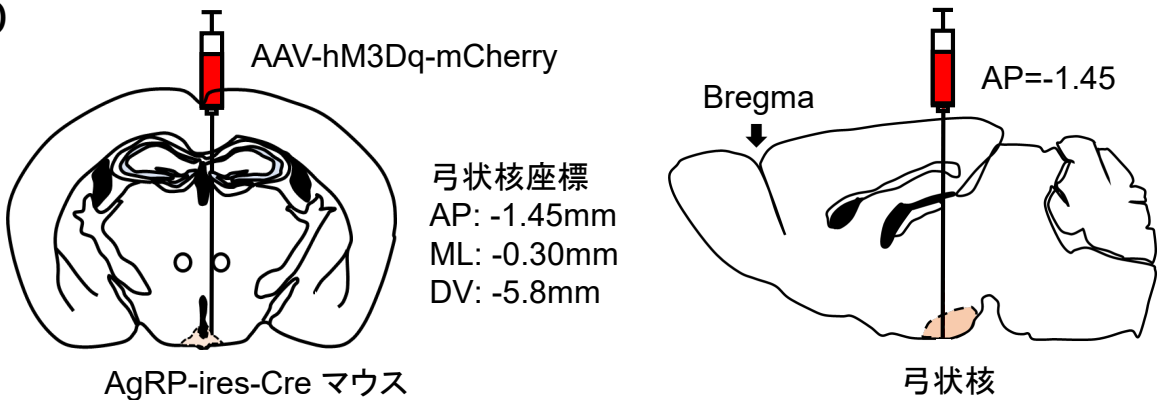


図2-1 DREADD導入手術

(A)手術で使用した装置とマウスの固定

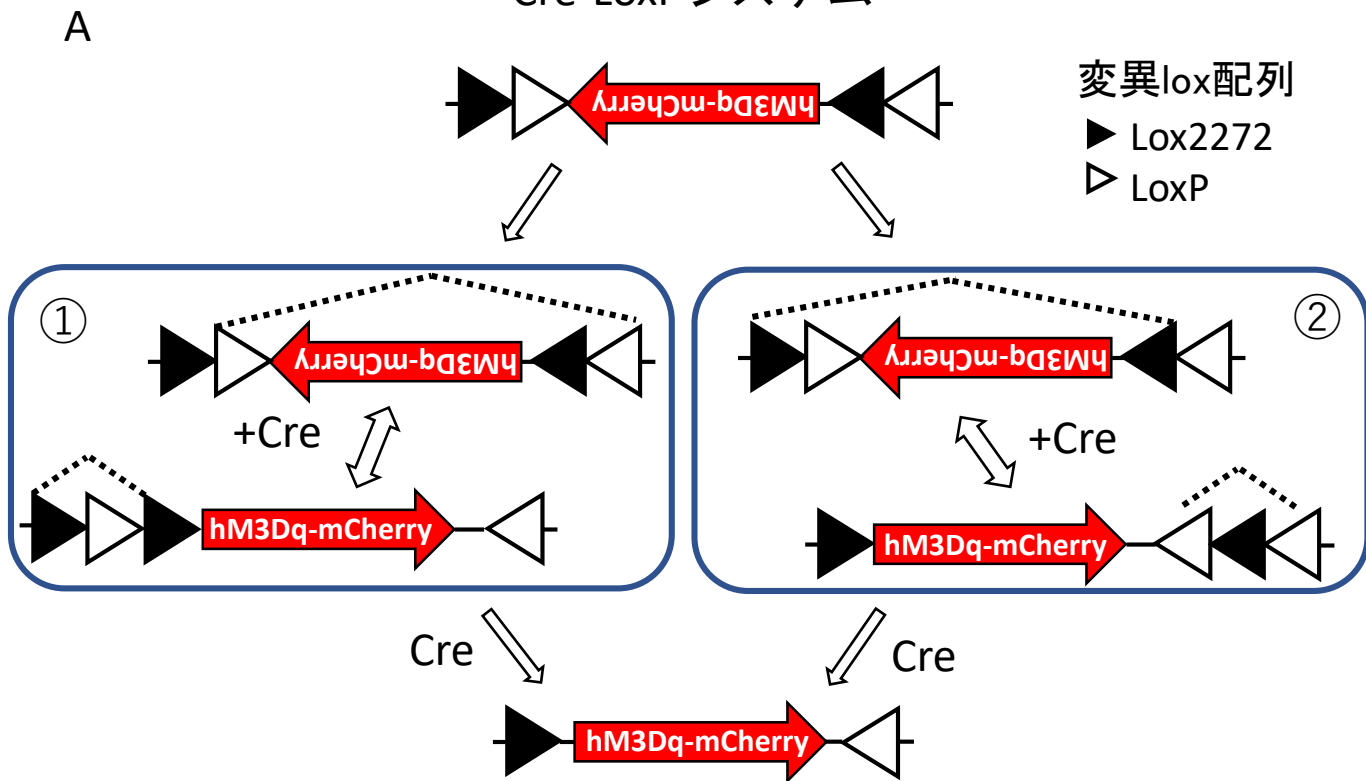
(B)脳定位装置を用いたAgRP-ires-CreマウスへのAAVインジェクション

(C) 使用したアデノ随伴ウイルスのコンストラクト

AAV-hSyn-DIO-mCherryのloxP配列の間にhM3Dq-mcherryが挿入されている。
 ITR(inverted terminal repeats): 末端逆位配列(AAVの増殖と宿主細胞への遺伝子挿入に重要な配列) Human synapsin promotor: ヒトシナプシンプロモーター(神経特異的に外来遺伝子を発現する強力なプロモーター) WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element): ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御領域(AAVによる遺伝子発現を増強する配列)

(D) 視床下部弓状核におけるウイルスインジェクションの位置

Cre-LoxPシステム



B

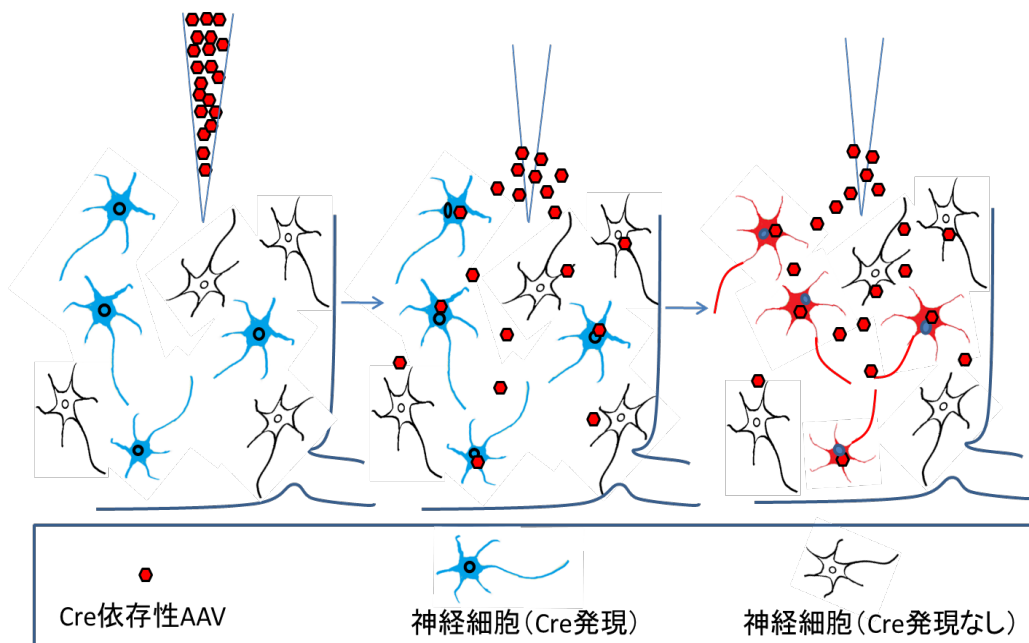


図2-2 AgRP神経におけるDREADDの発現

(A) LoxP配列(DIO スイッチ)を含むAAVを用いたCre依存的な遺伝子の発現
 AAVベクター内でDREADD(hM3Dq)が逆向きに挿入されている。このため通常hM3Dqは翻訳されない。Creリコンビナーゼが存在するとDIOスイッチ部分で組換えが起こり、発現カセットの向きが変わり、二回目の組み換えが起こるとDREADDを安定して発現するようになる。(Lox2272, LoxP: 変異lox配列)

(B) AAVによるAgRP神経特異的なDREADDの発現(模式図)
 Creを発現するAgRP神経細胞のみDREADDが導入される。

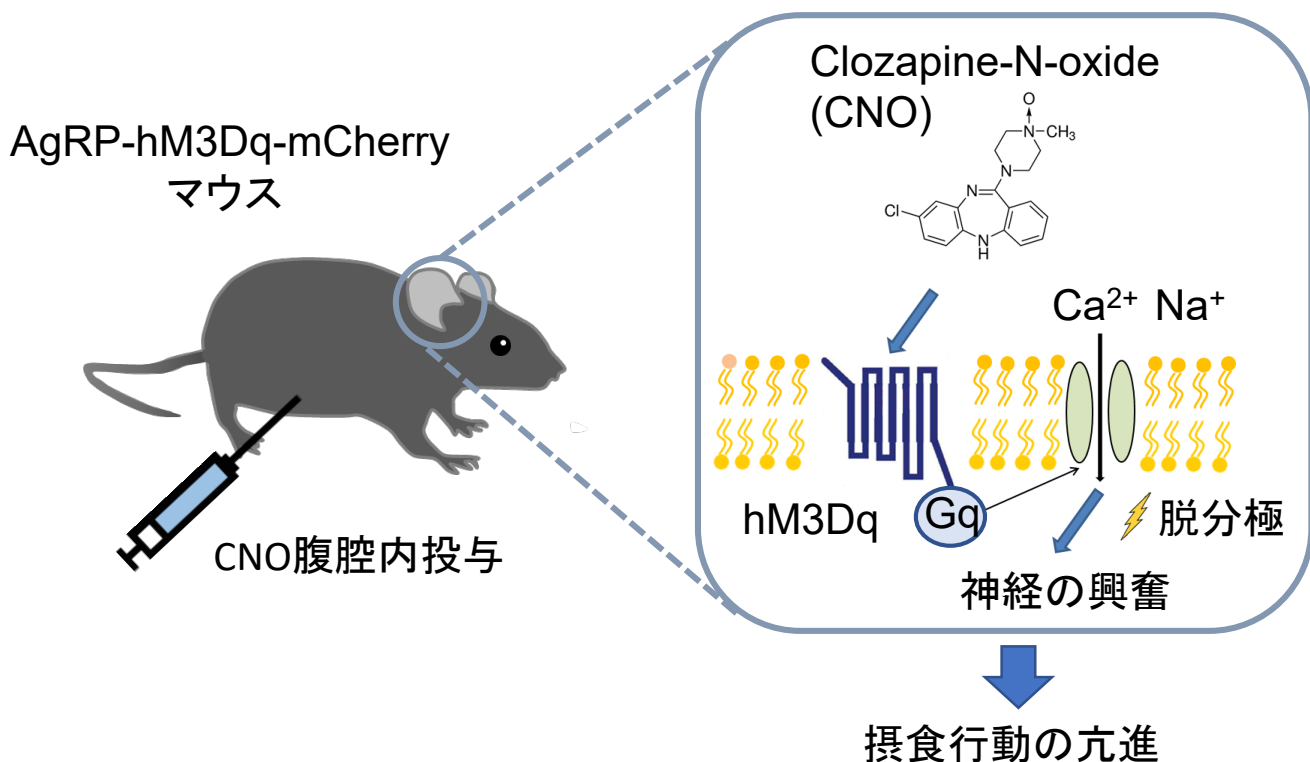


図2-3 CNO投与によるAgRP神経の興奮(模式図)

hM3Dqを導入したAgRP-ires-CreマウスにCNOを腹腔内投与すると、CNOが脳に到達してAgRP神経でhM3Dqに受容される。これによりAgRP神経で脱分極が起こり、AgRP神経が選択的に興奮し、摂食行動が誘導される。

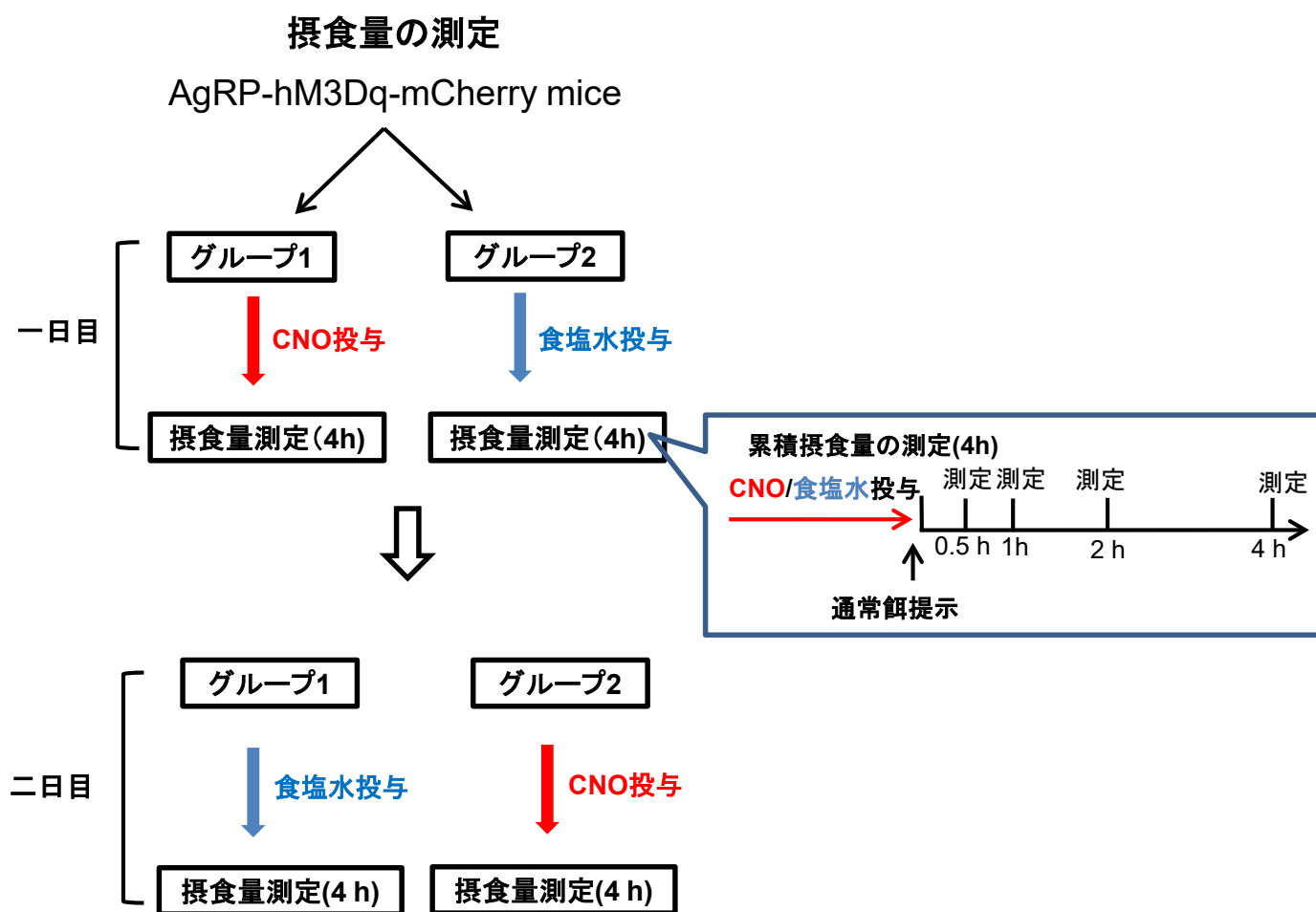
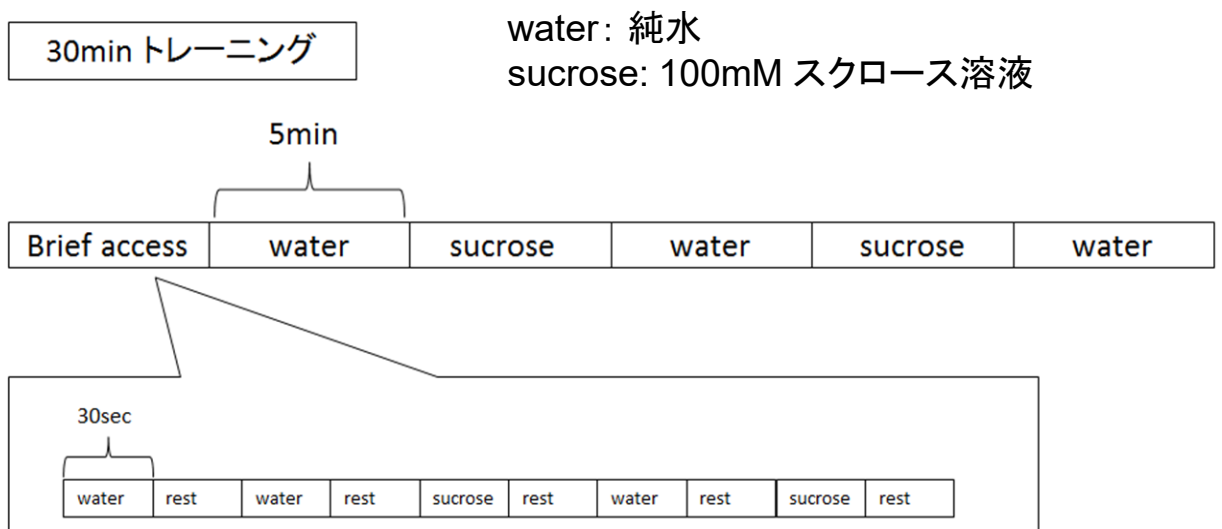


図2-4 AgRP-hM3Dq-mCherryマウスのCNO投与による摂食量の変化の測定

AgRP-hM3Dq-mCherryマウスを2グループに分けて、CNOまたは生理食塩水投与後、4時間以内における通常餌の摂取量を測定した。腹腔内投与は朝10時に行った。2日間の結果を併せたものをデータとしてまとめた。

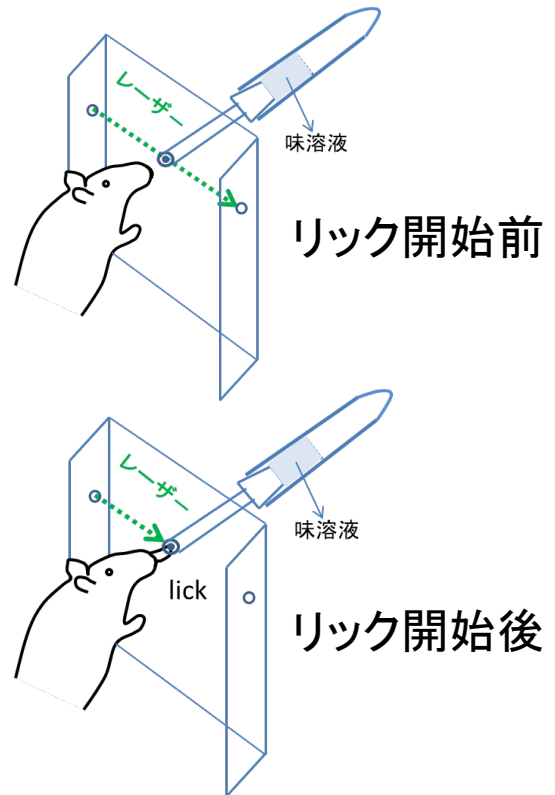
A



B



C



D

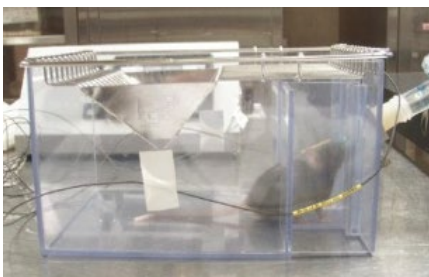


図2-5 brief access taste test による味嗜好性テストの評価

(A) brief access taste testのトレーニング手順

味溶液を図のように順番で提示し、マウスが自発的に味溶液を舐めるようにトレーニングする。

(B) 使用したレーザー式リック測定装置

(C) リック数測定の様式図。マウスが舐め口の先端を舐めると、レーザーが遮断される。遮断された回数をリック数としてカウントする。

(D) brief access taste test の様子。

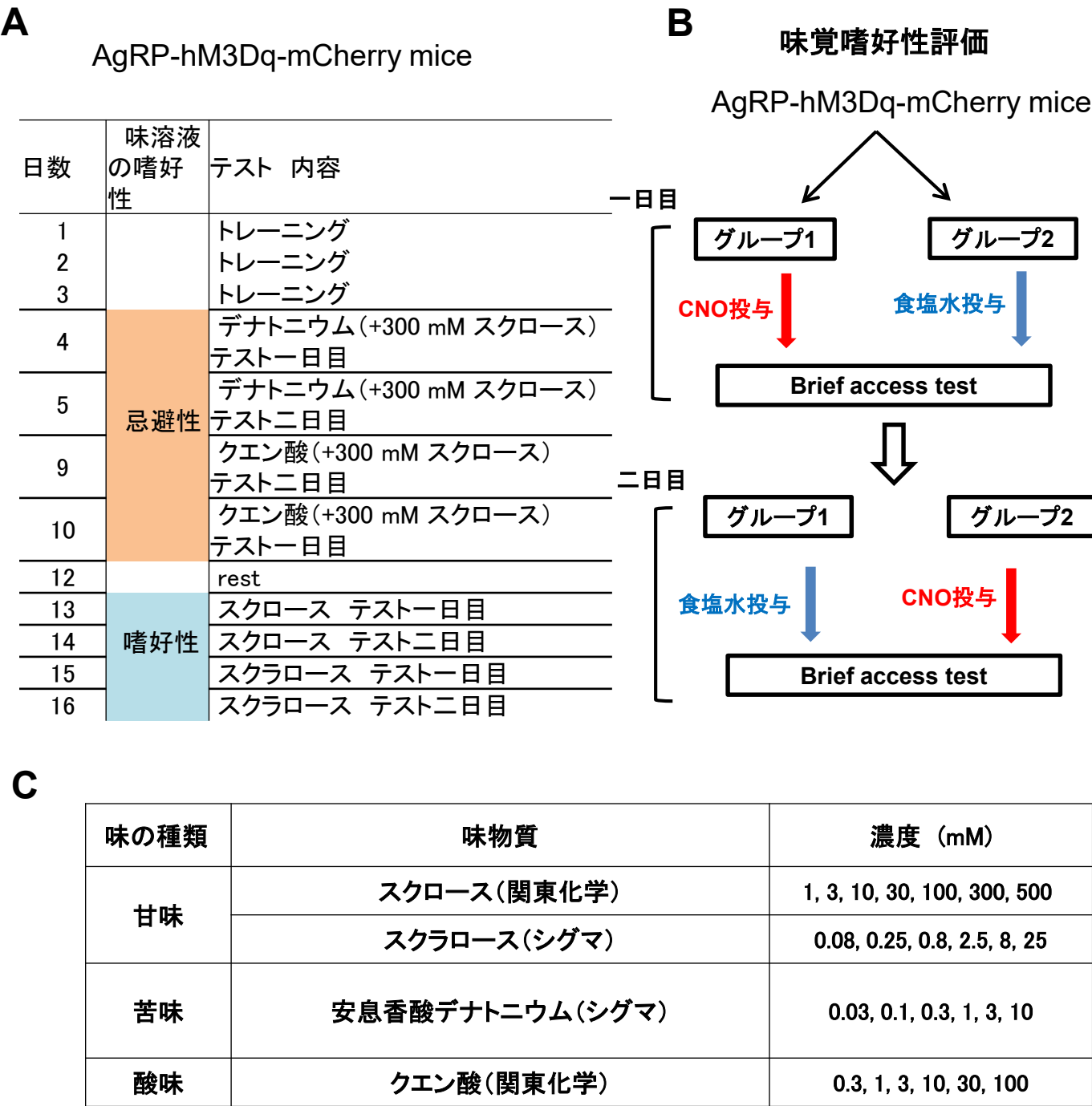
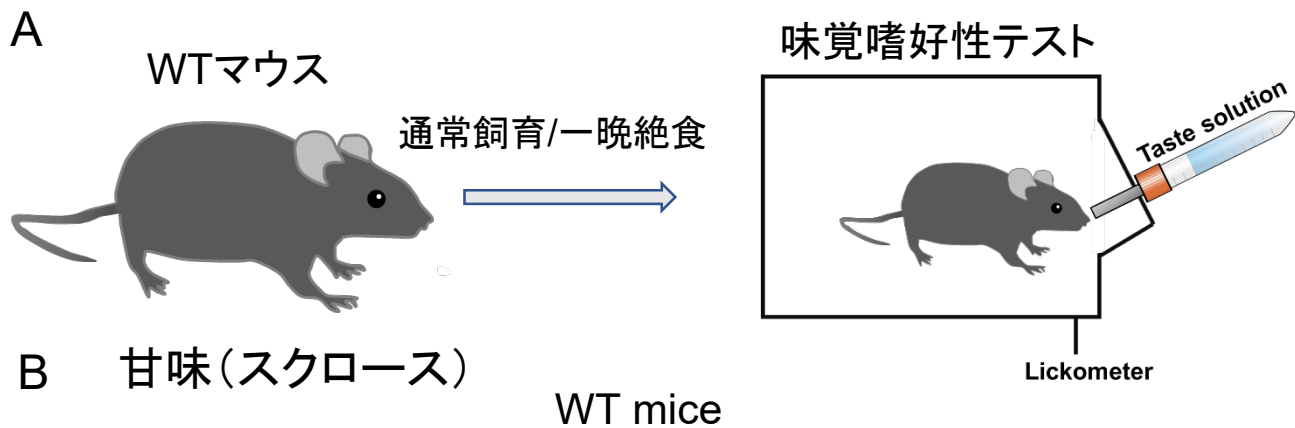


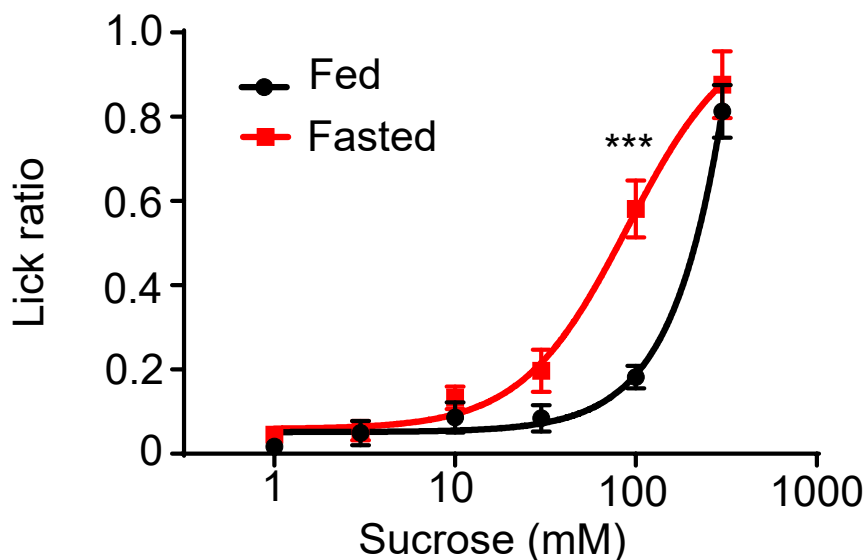
図2-6 DREADD導入マウスのBrief access taste testの条件

- (A) Brief access taste testのスケジュール
- (B) DREADD導入マウスの味覚嗜好性評価の実験手順
- (C) 使用した味溶液種類・濃度



B 甘味(スクロース)

WT mice



C 苦味(デナトニウム)

WT mice

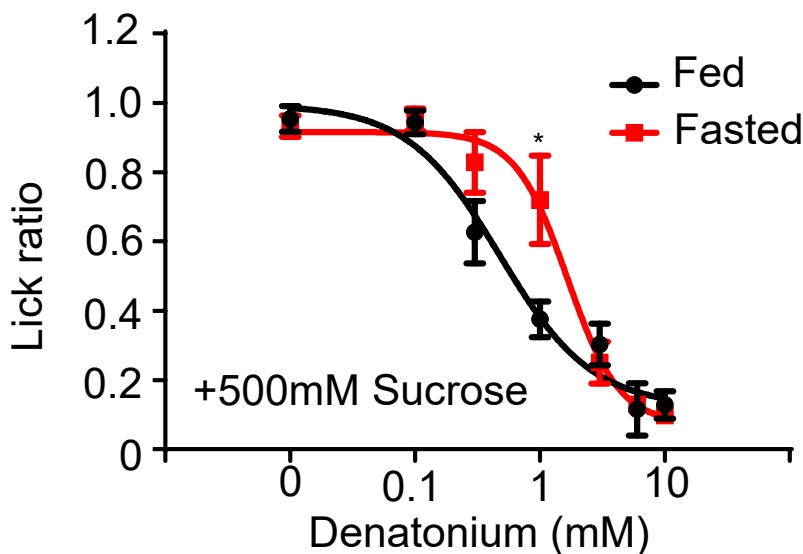


図2-7 WTマウスの空腹・満腹時の味覚嗜好性・忌避性の評価

(A)空腹と満腹時のBrief access testの模式図

(B)通常状態(黒)と絶食(赤)時でのスクロースに対する味覚嗜好性テストの結果

(C)通常状態(黒)と絶食(赤)時でのデナトニウムに対する味覚嗜好性テストの結果

データは平均プラスSEで示す(n=6)。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 対応する食塩水投与群との比較(スチューデントのt検定)

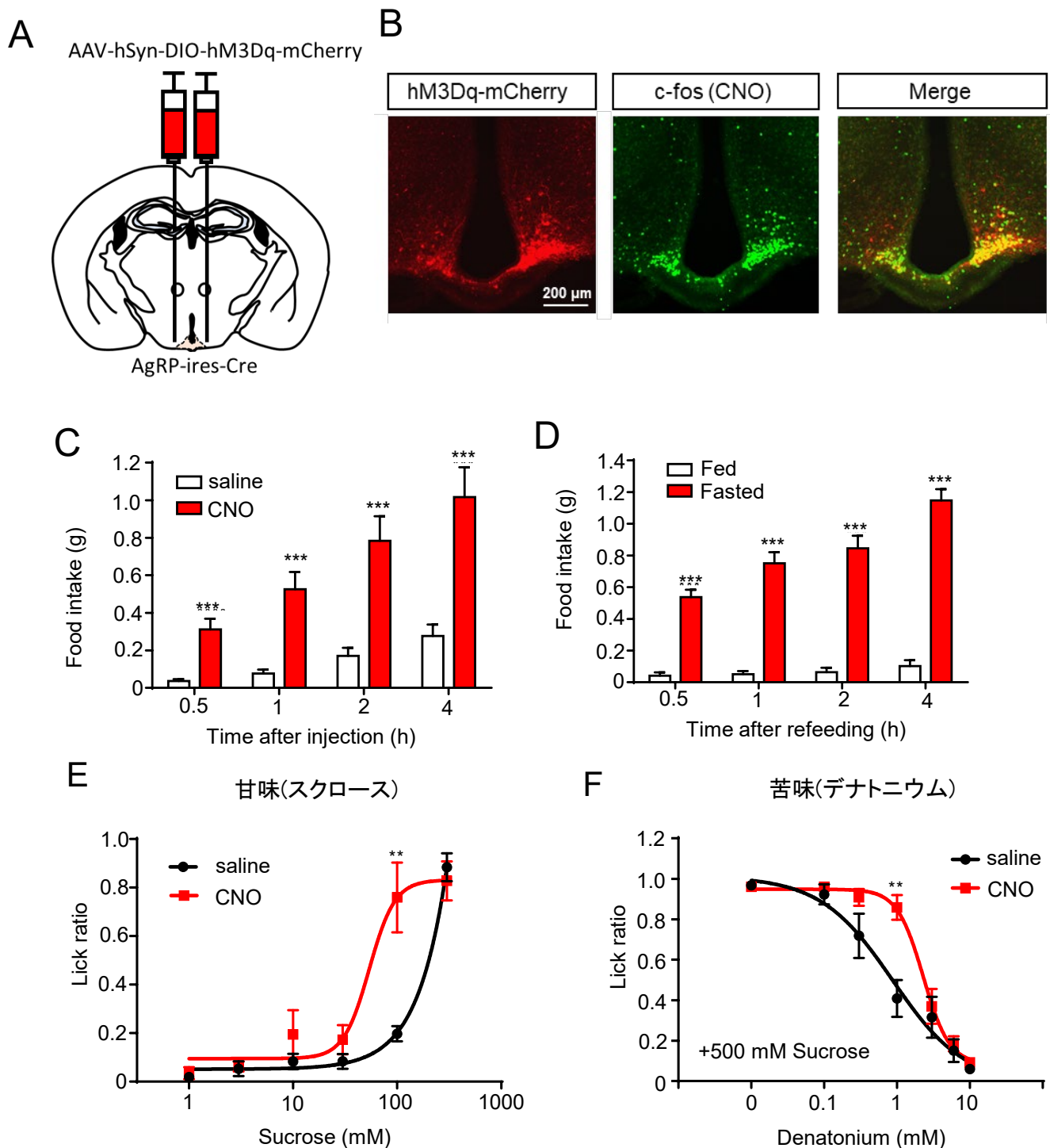


図2-8 AgRP-hM3Dq-mCherryマウスの摂食量と味覚嗜好性・忌避性の評価

(A) AAV-hM3Dq-mCherryをAgRP-ires-Creマウスの弓状核への導入

(B) AgRP-hM3Dq-mCherryマウスCNO投与後の弓状核C-fos染色を示す。hM3Dqを導入したAgRP神経特異的にC-fosの発現が上昇。

(C) AAV-hM3Dq-mCherryマウスの食塩水(白)、CNO(赤)投与後4時間の間に摂取したエサの累積摂食量 (D) AAV-hM3Dq-mCherryマウスの通常時(白)と絶食時(赤)4時間の間に摂取したエサの累積摂食量

(E) AAV-hM3Dq-mCherryマウスに食塩水(黒)、CNO(赤)を腹腔内投与後のスクロースに対するbrief access testの結果

(F) AAV-hM3Dq-mCherryマウスに食塩水(白)、CNO(赤)を腹腔内投与後のスクロースに対するbrief access testの結果

データは平均プラスSEで示す(n=6)。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 対応する食塩水投与群との比較(スチューデントのt検定)

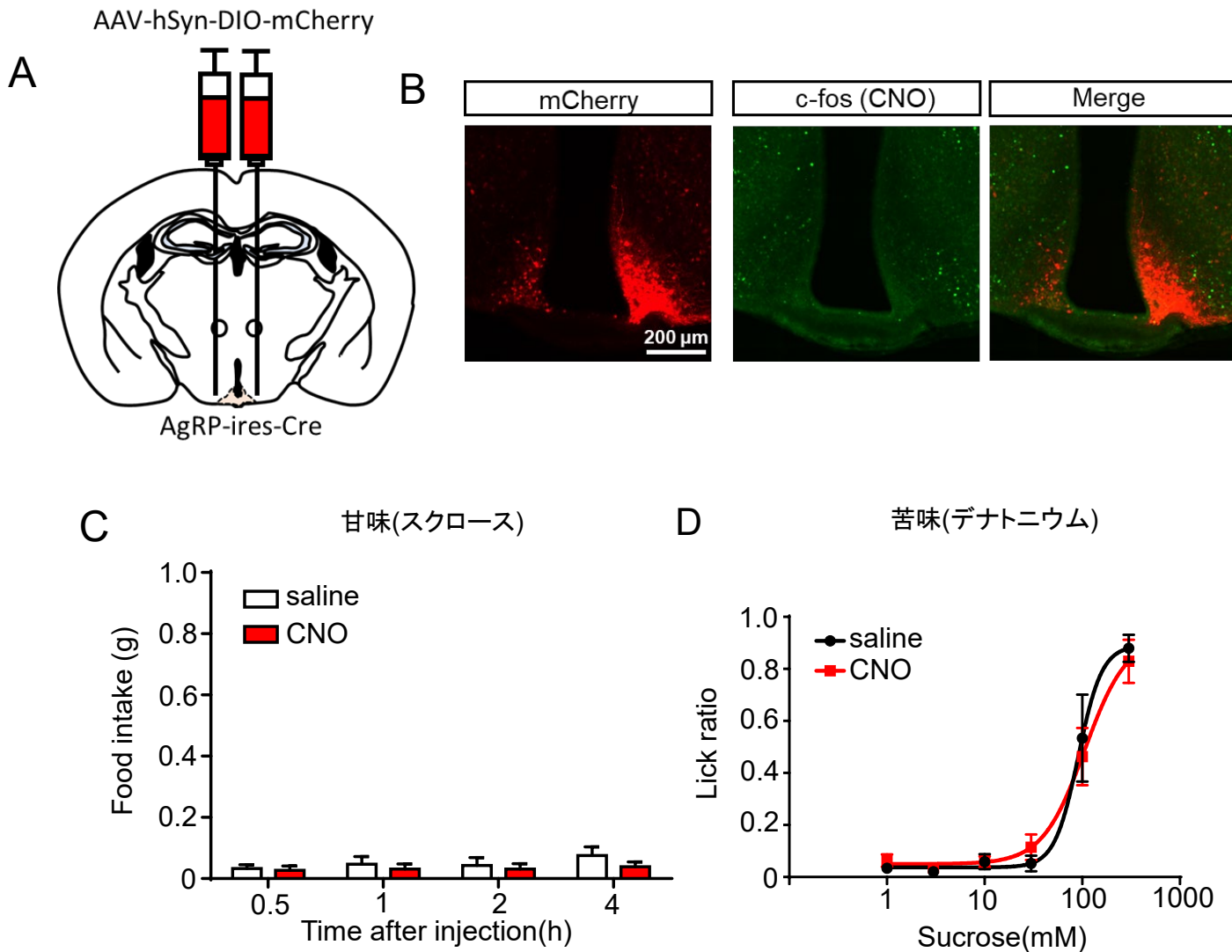
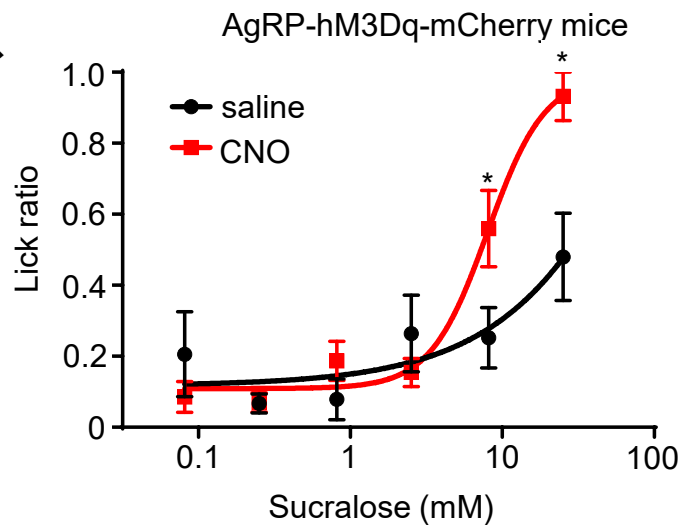


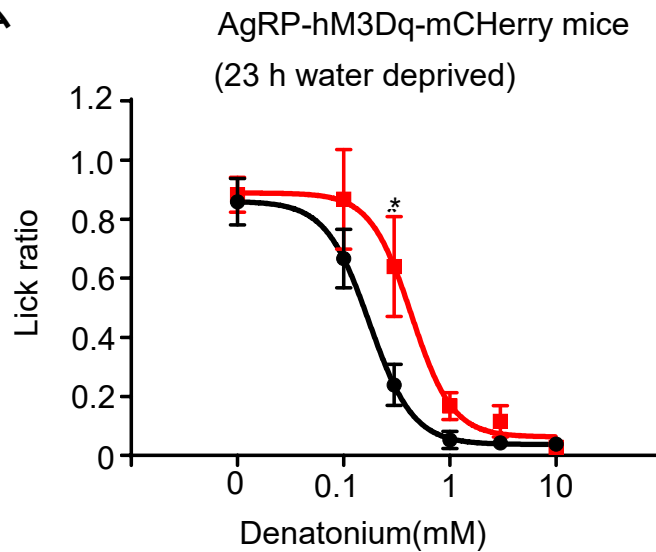
図2-9 AgRP-mCherryコントロールマウスの摂食量と味覚嗜好性・忌避性の評価
 (A) DREADD発現なしのAAV-mCherryをAgRP-ires-Creマウスの弓状核への導入
 (B) AgRP-mCherryマウスCNO投与後の弓状核C-fos染色を示す。mCherryを導入したAgRP神経でC-fosの発現は観察されなかった。
 (C) AAV-mCherryマウスに食塩水(白)、CNO(赤)を腹腔内投与後4時間の間に摂取したエサの累積摂食量を示す
 (D) AAV-hM3Dq-mCherryマウスに食塩水(白)、CNO(赤)を腹腔内投与後のスクロースに対するbrief access testの結果

データは平均 \pm SEで示す(n=6)。(スチューデントのt検定)

A スクラロース



B デナトニウム (23h絶水)



C クエン酸

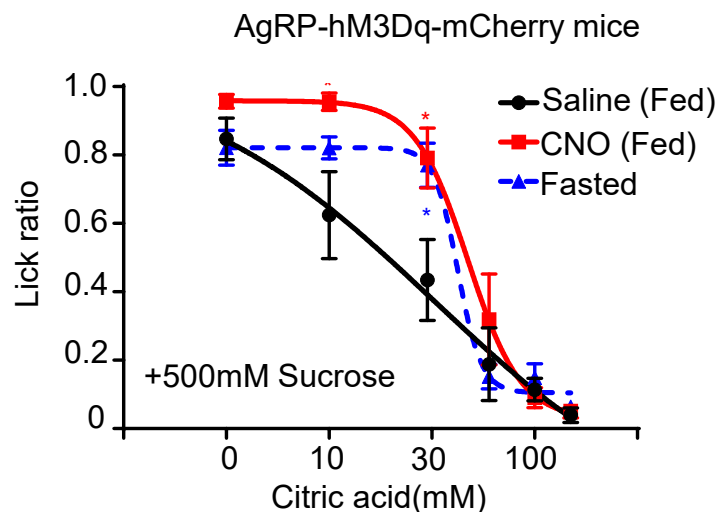


図2-10 AgRP-hM3Dq-mCherryマウスにおけるスクラロース、デナトニウム(23時間絶水)、クエン酸の味覚嗜好・忌避性評価

(A)スクラロース、(B)デナトニウム(23時間絶水)、(C)クエン酸に対すbrief access testの結果を示す。食塩水投与(白)、CNO投与(赤)、絶食時(青)の条件で実施した。

データは平均±SEで示す(n=6)。*p<0.05に対応する食塩水投与群との比較(スチューデントのt検定)

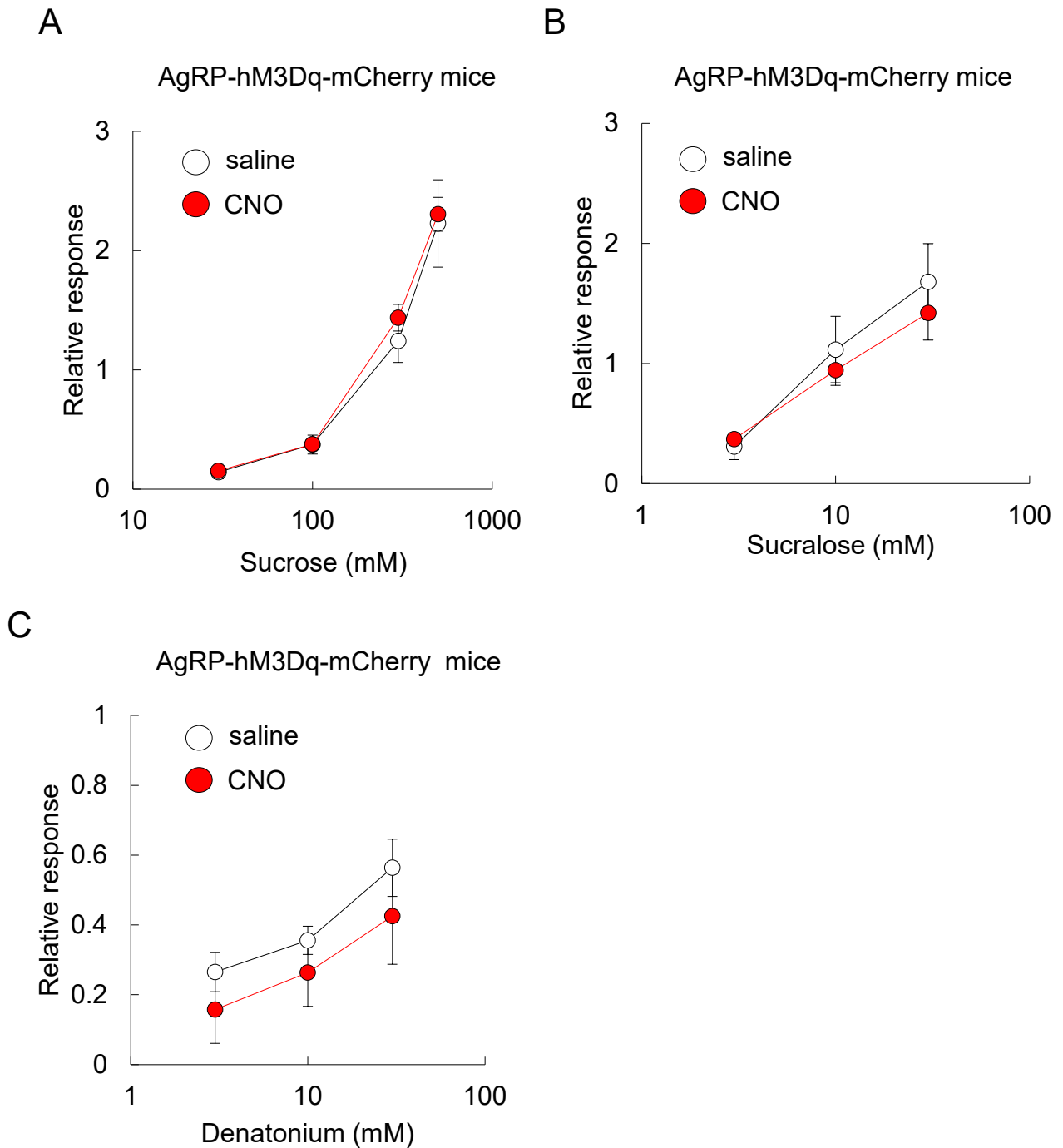


図2-11 生理食塩水投与(白)またはCNO投与(赤)後のAgRP-hM3Dq-mCherryマウスの鼓索神経における味溶液に対する神経応答の結果

(A) スクロース、(B) スクラロース、(C) デナトニウム
神経応答はNH₄Clの強度に対して標準化して表示している。

データは平均±SEで示す(n=6)

第 3 章

光遺伝学を用いた味覚嗜好・忌避性に関連する
AgRP 神経投射先の特定

3-1 序

第 2 章の実験では、野生型マウスで味覚嗜好性を評価したところ、マウスが空腹になると、甘味や苦味などの味に対する感受性が変化することが分かった。このような変化は、DREADD 手法を用いて AgRP 神経を人工的に活性化した場合でも観察された。また、AgRP 神経を活性化した場合の味覚応答の結果で、AgRP 神経活動は末梢の味覚伝導路に影響を及ぼしていないことが示され、脳神経レベルで空腹時の味覚感受性を修飾していることが示唆された。しかし、摂食神経経路の起点である AgRP 神経が脳内でどのような部位に影響を及ぼし、味覚の嗜好・嫌悪を調節しているのかが不明のままである。

近年の研究によって、視床下部弓状核に局在する AgRP 神経は、複数の脳部位に投射していることが分かっている。その投射先によって味の嗜好・嫌悪に影響を与える部位としない部位が存在することが推測される。そこで、神経の投射先の活動を選択的に制御できるツールを用い、味覚感受性に関わる AgRP 神経の投射部位の探索を試みた。

近年、神経科学の発展によりオプトジェネティクス（光遺伝学）という、光で神経活動を制御する手法が神経回路研究の有力なツールとなった(Reiner and Isacoff, 2013)。神経活動を興奮するため、チャンネルロドプシン 2 (ChR2) という特定の波長の光に応答するイオンチャンネルでよく使用されている。神経細胞に導入した ChR2 は光に応答して細胞外から陽イオンを流入させ、その神経を興奮させることができる。また、ChR2 は神経細胞の細胞体だけでなく軸索にも運ばれる性質があるため、神経末端の投射先部分を光刺激することによって、特定の神経末端に投射する神経細胞を選択的に興奮させることも可能となる。

近年、この性質を使用して AgRP 神経を起点とした神経回路の研究が行われた。マウスの AgRP 神経の投射先である分界条床核(aBNST)、室傍核(PVH)、視床室傍核 (PVT)、視床下部外側野 (LH)、中脳水道周囲灰白質(PAG)と腕結合腕傍核(PBN)など脳内の様々な部位を光遺伝学手法で選択的に活性化した結果、aBNST、PVH、LH、PVT を活性化させた場合には、視床下部弓状核を光刺激した際に匹敵する摂食量の増加が生じた。一方、CEA、PBN、PAG を活性化した場合にはそのような変化が見られなかった(Betley et al., 2013)。このことから、AgRP 神経の複数ある投射先のうち aBNST、PVH、LH、PVT が摂食の亢進に関与することが明らかになった。本章では、光遺伝学を用い、AgRP 神経の投射先が味覚の嗜好・嫌悪に及ぼす影響を検証した。

3-2 実験材料と方法

以下の実験は東京大学動物実験実施マニュアルに沿って実施し、実験計画については東京大学農学部動物実験委員会委員会の承認を受けた。組み換え DNA 実験については東京大学大学院農学生命科学研究科の遺伝子組み換え生物等委員会に承認を受けた

マウス

2 章で記載した通り、AgRP-ires-Cre ノックインマウス(系統名:AgRP^{tml(cre)}Low^l, Stock#012899) は The Jackson Laboratory より購入し、C57BL6/J(日本クレア)と繁殖して使用した。

アデノ随伴ウイルス(AAV, Adeno Associated Virus)

本章では、AgRP 神経活動を光で操作するため、Cre 依存的にチャネルロドプシン(ChR2)を発現する AAV を使用した。また、AgRP 神経の投射先を可視化するため、synaptophysin を発現する AAV を使用した(図 3-4A)。

AAV-FLEX-rev-ChR2-TdTomato (Titer: 5.0×10^{12} ゲノムコピー/ml、セロタイプ 10)

AAV-hEF1a-DIO-synaptophysin-mCherry (Titer: 2.48×10^{12} ゲノムコピー/ml、セロタイプ 8)

AAV-FLEX-rev-ChR2-TdTomato は The University of North Carolina Vector Core より購入した。AAV-hEF1a-DIO-synaptophysin-mCherry は Virovek, Inc.から購入した。

AAV ウイルスのインジェクション手術

第 2 章で示した実験手順でウイルスインジェクション手術を行った。

8-10 週齢のオスの AgRP-ires-Cre マウスを実験に使用した。上記のマウスはイソフルランを用いて麻酔した。脳定位装置への固定は 2 章の実験方法と同様に行った。マイクロポンプを用いて以下の座標に AAV をインジェクションした(座標はブレグマから AP: -1.45 mm ML: ± 0.3 mm DV: -5.8 mm) (図 3-4A、図 3-5A)。

導入した AAV は以下のようになる：

AgRP-ChR2-tdTomato マウス: AAV-FLEX-rev-ChR2-tdTomato 導入

AgRP-synaptophysin-mCherry マウス: AAV-hEF1a-DIO-synaptophysin-mCherry 導入

光ファイバーの装着

ChR2 を導入した AgRP マウスの脳部位に光を照射するために、光ファイバーを装着した(200- μ m diameter, 0.22 NA, thorlabs)。

光ファイバーはルビーファイバースクライブ(thorlabs)を用いて導入する部位の合わせて適切な長さにカットし、光強度計を使用して 10 mW/mm² 以上の光強度が出ることを確認した。

AgRP-ires-Cre マウスを脳定位装置に固定した後、マイクロドリル(0.8mm drill)を用いて

AgRP 神経またはその投射先にあたる座標で頭蓋骨に小さい穴を開け、そのあと光ファイバーを決めた座標まで移動させ、ファイバーの周囲にデンタルセメント (Densply) を塗り付け、頭蓋骨の上に固定した。

光ファイバーを装着した部位と座標は以下になります：

弓状核 ARC (Bregma から: AP: -1.46 mm, ML: ± 0.3 mm, DV: -5.30mm、片側導入、図 3-6A)、視床下部室傍核 PVH (Bregma から: AP: -0.7 mm, ML: -0.15 mm, DV: -4.6 mm、片側導入、図 3-7A)、外側視床下部 LH (Bregma から: AP: -1.34 mm, ML: ± 1.0 mm, DV: -4.7 mm、両側導入、図 3-8A)、扁桃体中心核 CEA (Bregma から: AP: -1.22 mm, ML: ± 2.5 mm, DV: -4.35 mm、両側導入、図 3-9A)、視床室傍核 PVT (Bregma から: AP: -1.1 mm, ML: 0 mm, DV: -3.0 mm、片側導入、図 3-10A)、分界条床核 aBNST (Bregma から: AP: +0.62 mm, ML: ± 0.65 mm, DV: -4.4 mm、両側導入、図 3-11A)。

手術後、マウスは 1 匹ずつ別々のケージに入れ、2~3 週間ほど飼育後、他の実験に使用した。

***In vivo* 光刺激**

In vivo 光刺激は図 3-1 の模式図のように行っていた。光刺激をするため、473nm の青色光を発生できるレーザを使用した (COME2-LB474/300, Lucir 社)。光ファイバーパッチコード (200- μ m diameter, 0.22 NA, Doric lenses 社) はレーザの input 側に接続した。光ファイバーを装着した AgRP-ChR2-tdTomato マウスはイソフルラン (4%) を使用して麻酔をし、スリーブを介し光ファイバーパッチコードの先端部分と接続した。また、光ファイバーパッチコードはロータリージョイントと繋いでおり、マウスは自由行動をできる状態を保っている (図 3-1)。

光刺激の条件はオプトジェネティクス用スティムレータ (STOmK-2, バイオリサーチ社) を用いて制御した。ファイバーの先端の光強度は光強度計を用いて測定した (図 3-1)。刺激の条件は以下となっている：先端の光強度：10 mW/mm²、パルス幅 10 ms、1 秒間 20 パルス、1 回の光刺激時間は 1 秒、これを 4 秒ごとに繰り返した。

マウス脳の灌流固定・切片作製・免疫組織染色

この実験操作は第 2 章で示した通りに実施した。

AgRP 神経での AAV の発現または AgRP 神経の投射先を可視化するため、AgRP-ChR2-tdTomato マウスと AgRP-synaptophysin-mCherry マウスを灌流固定した。脳を摘出し、50 μ m の厚さで Bregma から -1.0 mm から -2.6 mm まで冠状切片を作製した。使用した 2 種類の AAV はいずれも赤色蛍光タンパク質である tdTomato や mCherry を発現するため、浮遊法で免疫組織染色を行った。作製した脳切片は PBST で 3 回洗浄後、ブロッキング溶液 (5% donkey serum を含む PBST) で 1000 倍に希釈した Rat anti-RFP 抗体 (5F8, ChromoTek) を用いて 4°C で 1 晩静置した。翌日、PBST で 3 回洗浄し、遮光した状態で 300 倍に希釈した Alexa568 標識抗ラット IgG 抗体 (ab175475, abcam) と 2 時間反応させた。染色した切片を PBST で 3

回洗浄後、スライドグラスに載せ、その蛍光をスライドスキャナー顕微鏡で直接観察した。

In vivo 光刺激時の AgRP 神経活動の変化を評価するため、神経活動マーカーである c-Fos との 2 重染色を行う際は以下の手順で行った。AgRP-ChR2-tdTomato マウスを光刺激装置と接続し、1 時間の光刺激を行った。その後灌流固定を行い、脳を摘出した。視床下部に脳切片を作成し、作製した切片は PBS で 3 回洗浄後、ブロッキング溶液(5% donkey serum を含む PBST)で 250 倍に希釈した c-Fos 抗体 (SC52-G, Santa Cruz) と 1000 倍に希釈した Rat anti-RFP 抗体 (5F8, ChromoTek) を加えた PBST 溶液を用いて 4°C で 1 晩静置した。翌日、PBS で 3 回洗浄し、遮光した状態で 500 倍に希釈した Alexa488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (A-11055, Molecular Probes) と 300 倍に希釈した Alexa568 標識抗ラット IgG 抗体 (ab175475, abcam) と 2 時間反応させた。染色した切片を PBST で 3 回洗浄後、スライドグラスに載せ観察した。

摂食量の測定

摂食量の測定は通常マウスが餌をほとんど摂取しない午前中(9:30~10:00)に開始した。1 匹ずつ飼育している AgRP-ChR2-tdTomato マウス (ARC、PVH、LHA、CEA、PVT、aBNST にファイバーを設置したマウス) を光ファイバーパッチコードと接続した。ゲージの上部から光ファイバーを通すため、蓋に穴を開けた摂食測定ケージを使用した。各マウスを摂食測定ケージに入れ、秤量した餌 (クレア、CE-2) を与え、光刺激なしの状態で 30 分、1 時間の時点での摂食量を測定した。その後光刺激を開始し、30 分、1 時間の時点での摂食量を測定した(図 3-3A)。摂食量のデータは光刺激前後を合わせて解析した。

Brief access taste test による味嗜好性・忌避性の評価

Brief access taste test は第 2 章で説明した通りに実施した。

各投射先にファイバーを設置した AgRP-ChR2-tdTomato マウス(各 6 匹)を使用した。甘味、苦味についてテストを行った。各マウスは個別に飼育し、本テストの実施前に、溶液の舐め口の位置と舐め方を覚えさせるため、3-4 日間トレーニングを行った。嗜好される味(甘味)の試験については、6 時間絶水の条件で行った。一方、忌避される味(苦味・酸味)の試験については、味物質を高濃度のスクロースに溶かした場合では 6 時間絶水の条件で行い、水に溶解した場合は 23 時間絶水後に行った。

本章から Brief access taste test は検出精度の高い電流式リックメータ(Hayar et al., 2006)と専用ケージ (ニューロサイエンス株式会社) を用いて行った (図 3-2A)。各味溶液を提示して、マウスが飲み口を舐めはじめてから 10 秒間のリック数の測定を行った(図 3-2BC)。嗜好性味溶液は高濃度から低濃度の順、忌避性味溶液は低濃度から高濃度の順で測定した。マウスがリックした時の電流変化を AD converter (Inter medical Co.LTD.,) で検出し、Irec ソフト (Inter medical Co.LTD.,) で記録した。各濃度のリック数は pCLAMP ソフトを用いて解析した。

味溶液は味物質を脱イオン水に溶解して調製したものを使用した。使用した味質と濃度は第二章の図 2-6C で示しているのと同様である。

AgRP-ChR2-tdTomato マウスでは、1 つの味溶液について光刺激ありと光刺激なしの二つの条件で **Brief access taste test** を行った。測定時、味溶液を順番に提示し、まず光刺激なしの状態で十秒間のリック数を記録した。その後、*in vivo* 光刺激を開始し、同様なアッセイを行った(図 3-3B)。

データの統計処理

図 3-5CDEF、図 3-6BCDE、図 3-7BCDE、図 3-8BCDE、図 3-9BCDE、図 3-10BCD、図 3-11BCD ではスチューデントの *t* 検定により、有意差検定を行った。統計処理は GraphPad Prism 6 ソフトウェアを使用して行った。

3-3 結果

3-3-1 AgRP 神経の投射先の可視化

AgRP 神経は脳内の様々な部位に投射していることが知られている、それらの投射先を可視化するため、神経末端に溜まりやすい性質を持つ Synaptophysin-mCherry を発現させる AAV ウイルスを AgRP-ires-Cre マウスの視床下部にインジェクションをした (図 3-4A)。Synaptophysin はシナプス小胞の膜に存在するカルシウム結合性の膜タンパク質で、前シナプスに局在し、神経の細胞体部分から神経末端に運ばれる。mCherry の免疫染色を行った脳冠状切片 (弓状核) を観察したところ、AgRP 神経の細胞体において強い発現を確認できた (図 3-4B)。また、吻側から尾側までの様々な部位で神経末端に運ばれた mCherry 蛍光タンパク質の発現についても確認できた。その結果、視床下部室傍核 PVH をはじめ、外側視床下部 LH、扁桃体中心核 CEA、視床室傍核 PVT、分界条床核 aBNST で繊維状の mCherry 蛍光が観察された (図 3-4C)。したがって、AgRP 神経がそれらの脳部位に投射されていることが確認できた。

3-3-2 AgRP-ires-Cre マウスの視床下部の ChR2 発現

AgRP 神経の投射先の活動を選択的に活性化するため光応答性イオンチャンネルであるチャネルロドプシン 2(ChR2)をコードする組換えアデノ随伴ウイルス(AAV-FLEX-rev-ChR2-tdTomato)を使用した(図 3-5A)。この AAV では、DREADD と同様な DIO スイッチ (double-floxed inverted open reading frame) を使用しているため、AgRP 神経特異的に ChR2 を発現させることが可能になる(図 2-2AB を参考)。AAV 導入マウス(AgRP-ChR2-tdTomato マウス)の脳切片を作製したところ図 3-5B に示すように、視床下部弓状核に ChR2 と融合した tdTomato の蛍光 (赤) が観察された。以上より AAV を用いることで ChR2 を AgRP 神経に発現させることができたことを確認した。

3-3-3 In vivo 光刺激による AgRP 神経での c-Fos の発現

In vivo 光刺激により神経活動マーカーである c-Fos の発現が AgRP-ChR2-tdTomato マウスの AgRP 神経で上昇するかを検証した。弓状核に光ファイバーを装着した AgRP-ChR2-tdTomato マウスを光刺激装置と接続し、1 時間 *in vivo* 光刺激を行った。その後、脳を摘出し、切片を作製した。図 3-5B に示すように、ChR2-tdTomato の発現細胞(赤)において c-Fos (緑) の発現が観察された。

3-3-4 AgRP-ChR2-tdTomato マウスの AgRP 神経全体を光刺激した場合の摂食量・飲水量の変化

弓状核に光ファイバーを装着した AgRP-ChR2-tdTomato マウスを用い、光刺激前と光刺激後の摂食量を測定した(図 3-5C)。光刺激なしの場合と比べ、光刺激後摂食行動が誘引され、1 時間の間での摂食量が有意に上昇した。また重要な事に、この摂食パターンは、マウスを

1 晩絶食させた後に再給餌したときの摂食パターンに非常によく似ていた(図 3-5D)。また、水溶液をリックした回数では、光刺激前後で有意差が見られなかった(図 3-5E)。したがって、光遺伝学を用いて AgRP 神経の細胞体を人工的に活性化させることで、通常の空腹時に匹敵する摂食行動を誘導できた。

3-3-5 AgRP-ChR2-tdTomato マウスの AgRP 神経の投射先を選択的に光刺激した場合の摂食量の変化

ChR2 は導入した神経の投射先末端に溜まる性質を持つため、AgRP 神経投射先末端活動を選択的に活性化するため、PVH、LH、CEA、PVT、aBNST のそれぞれに光ファイバーを装着した(図 3-7A, 図 3-8A, 図 3-9A, 図 3-10A, 図 3-11A)。一つの投射先につき 6 匹の AgRP-ChR2-tdTomato マウスを用い、異なる投射先の光刺激前と光刺激後の摂食量を測定した(図 3-5F, 図 3-10B, 図 3-11B)。光刺激なしの場合と比べ、PVH と LH を光刺激すると摂食行動が誘引され、1 時間の間での摂食量が有意に上昇した(図 3-5F)。また、PVT(図 3-10B)と BNST(図 3-11B)を光刺激した時の摂食量を測定した結果、光刺激すると摂食量が増える傾向が見られたが、有意差が見られなかった。これに対し、CEA の場合、光刺激前と光刺激後の摂食量変化が観察されなかった(図 3-5F)。したがって、光遺伝学を用いて AgRP 神経の末端を選択的に活性化させることで、摂食行動を誘引する部位としない部位が存在することが確認できた。

3-3-6 AgRP 神経全体または投射先を光刺激した場合の味嗜好性・忌避性評価

上記のマウスを用い、AgRP 神経の細胞体またはそれぞれの投射先を光刺激した場合の味嗜好性・忌避性を評価した。嗜好性の甘味に対する嗜好性を評価するため、味覚嗜好テストを実施した。AgRP-ChR2-tdTomato マウスでは、AgRP 神経の細胞体部分を光刺激すると、マウスを絶食させた時と似たように、100 mM と 300 mM のスクロース溶液のリック数の上昇が観察され、スクロースに対する嗜好性が上昇した(図 3-6B)。一方、カロリーを含まない人工甘味料スクラロースを用いて同様の実験を行ったところ、AgRP 神経の活動が高まるとスクラロース溶液への嗜好性が上昇した(図 3-6D)。したがって、AgRP 神経の活動が高まると甘味に対する嗜好性が上昇することがわかった。

次に、忌避性の味である苦味溶液に対する味感受性を評価したところ、AgRP 神経光刺激開始後と開始前を比べ、デナトニウム溶液に対する感度が低下する傾向にあった(図 3-6C)。同様の実験を酸味溶液でも行った。この場合、中間濃度の 30 mM クエン酸溶液に対するリック数の上昇がみられ、クエン酸に対する忌避性が低下した(図 3-6E)。以上より、AgRP 神経の活動が高まると苦味や酸味に対する忌避が緩和されることが示された。

また、味覚の嗜好性・忌避性に関わる AgRP 神経の投射先を調べるため、PVH、LH、CEA、PVT、aBNST を光刺激し、投射先を選択的に活性化した状態で味覚感受性を評価した。興味深いことに、外側視床下部 LH を光刺激すると、AgRP 神経の細胞体全体を光刺激した時と

同様に、甘味溶液であるスクロースおよびスクラロースに対する嗜好性が上昇した(図 3-8BD)。一方、中間濃度の苦味溶液のデナトニウムや酸味溶液のクエン酸に対する忌避性が低下した(図 3-8CE)。これに対し、PVH(図 3-7B-E)、CEA(図 3-9B-E)、PVT(図 3-10CD)または aBNST(図 3-11CD)への経路を選択的に活性化した場合の味覚感受性を評価した結果、光刺激前後で嗜好性溶液や忌避性溶液に対する感受性の変化が観察されなかった。

以上の結果より、弓状核から外側視床下部 LH に投射する AgRP 神経が特に空腹時の味覚嗜好性・忌避性を制御していることが明らかになった。

3-4 考察

本章においては、空腹時の味覚嗜好性・忌避性を制御する AgRP 神経の下流の探索を行った。そのため、光遺伝学を用いて AgRP 神経の投射先活動を選択的に活性化した場合の味覚感受性を評価した。はじめに、AgRP 神経の細胞体部分や AgRP 神経の投射先である PVH、LH、CEA、PVT、aBNST を選択的に活性化し摂食行動に及ぼす影響を調べた結果、摂食行動を引き起こす部位としない部位が存在することが確認できた(図 3-5A)。また、AgRP 神経の一部を選択的に活性化した時の味嗜好・忌避を評価したところ、外側視床下部 LH に投射する経路が特に甘味嗜好性の上昇と苦味忌避性の低下に関係していることを見出した。

3-4-1 光遺伝学手法を用いた AgRP 神経投射先の選択的活性化による摂食亢進と文献との比較

AgRP 神経は様々な部位に投射されているが、投射先によって弓状核のインプット細胞の集団が異なることが報告されている。また、光遺伝学で投射先を選択的に活性化した場合、摂食行動を引き起こす部位としない部位が存在することが知られている(Betley et al., 2013)。

今回の実験では光遺伝学を用い、AgRP 神経の細胞体や投射先部分を活性化した時の摂食量変化を検証した。光照射で AgRP 神経の細胞体を興奮させた場合、通常餌を摂取しない明期でも摂食行動が見られるようになることを確認した(図 3-6C)。また、AgRP 神経を活性化させると神経活動マーカーである c-Fos の発現が顕著に上昇することも確認できた(図 3-9)。AgRP 神経の投射先である PVH、LH、CEA、PVT や aBNST を選択的活性化した結果、PVH と LH を光刺激した場合の摂食量が顕著に上昇し、CEA を刺激した場合では摂食量が変わらなかった。この三つの投射先の実験結果は文献と一致した。しかし、先行文献(Betley et al., 2013)では BNST と PVT においても摂食行動を引き起こすデータが示めされたが、今回の実験で PVT や BNST を光刺激した場合、摂食量が上昇した傾向が観察されたが、有意差は見られなかった。

PVT は第三脳室下部の非常に小さい領域で、aBNST は脳基底核に存在する神経核で、それらの部位は AgRP 神経の細胞体ある視床下部基底部の位置から離れている。Synaptophysin で末端をラベルした実験では、PVH、LH と比べ、PVT や aBNST の mCherry 発現量が低かった(図 3-4C)。したがって、今回の条件では PVT や aBNST の末端に運ばれた ChR2 の量が少なかったため、光刺激による摂食亢進効果を引き起こすレベルの神経発火には至っていない可能性も考えられる。

3-4-2 AgRP 神経の投射先の活動と味感受性の変化

光遺伝学を用い AgRP 神経の投射先を選択的に制御した場合の味覚嗜好性・忌避性を評価したところ、光刺激で AgRP 神経の細胞体を興奮させると、空腹時または DREADD 手法で AgRP を興奮させた場合と同様に、甘味に対する嗜好の上昇と苦味に対する忌避の低下が観察された。興味深いことに、様々な投射先を検証した場合、このような味覚嗜好性・忌

避性の変化は外側視床下部 LH を光刺激した時のみ観察された（図 3-8BCDE）。視床下部室傍核 PVH を選択的に興奮させた場合、摂食行動は誘引されたが、味覚の嗜好性・忌避性の変化が見られず、PVH への経路は空腹時の味覚認知に影響を及ぼしてないことが示唆された(図 3-7BCDE)。

ただし本章では AgRP 神経の投射先の全てを調べていないため、その他（PBN や PAG）に投射する経路も味覚嗜好性・忌避性に影響を与えることが否定できない。今後は光遺伝学で用いて PBN や PAG を選択的に興奮した時の味覚嗜好性・忌避性を評価する必要があると考えられる。

以上のように、本章では、光遺伝学で味覚嗜好性・忌避性に関する AgRP 神経回路の下流を調べた結果、外側視床下部に投射する経路が空腹時の味覚感受性変化に重要であることが新たな知見として得られた。次章では外側視床下部に着目し、AgRP 神経の下流の二次神経の分子特性や LH から味覚嗜好性・忌避性に関連する経路を調査することにした。

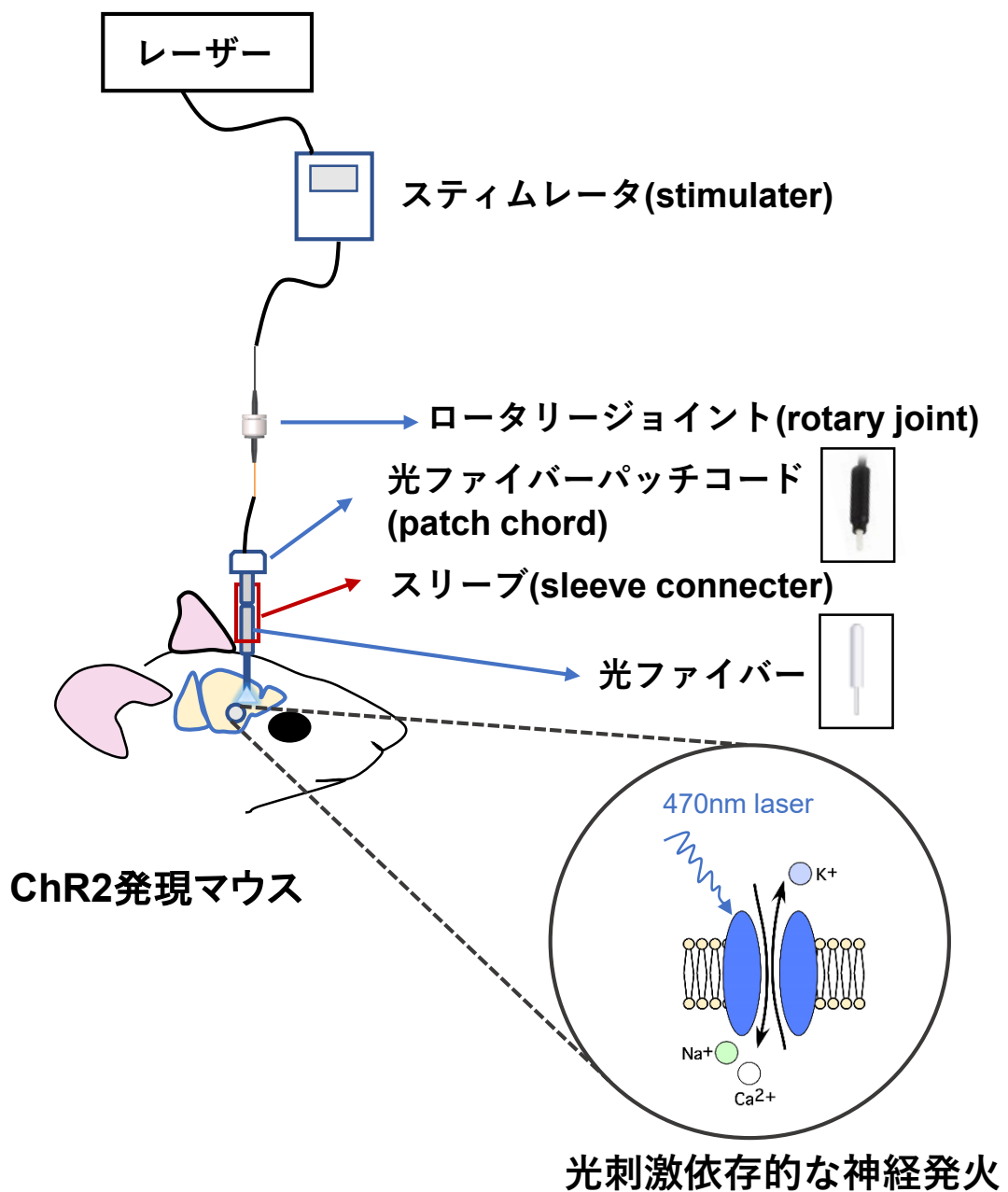
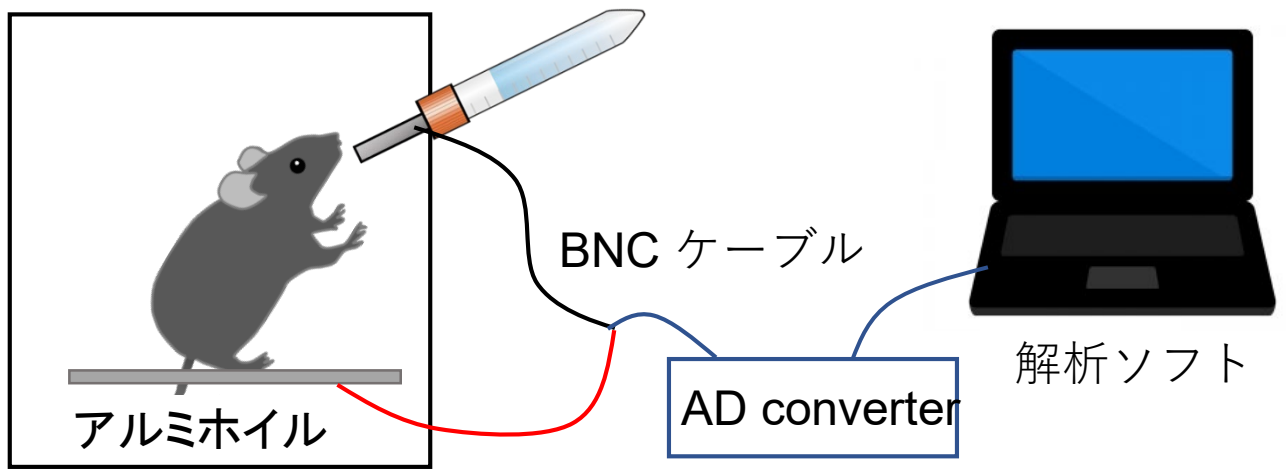


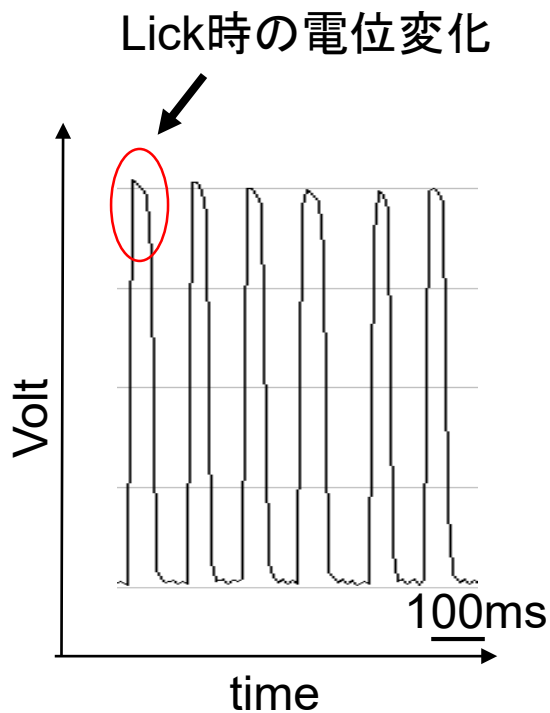
図3-1 光遺伝学を用いた神経活動操作の模式図

ChR2を発現した部位の上部に光ファイバーを固定し、スリーブを介して光ファイバーパッチコードと接続した。レーザーシステムを用いて青色光を脳に導入して、ChR2発現神経を刺激するとその神経が発火する。

A



B



C

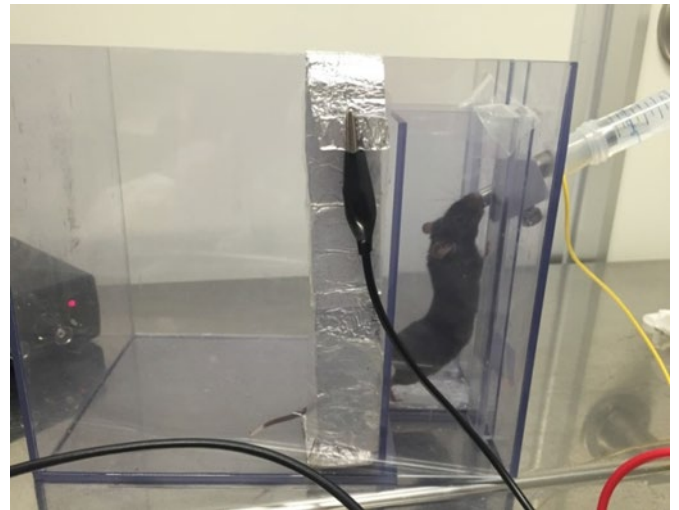
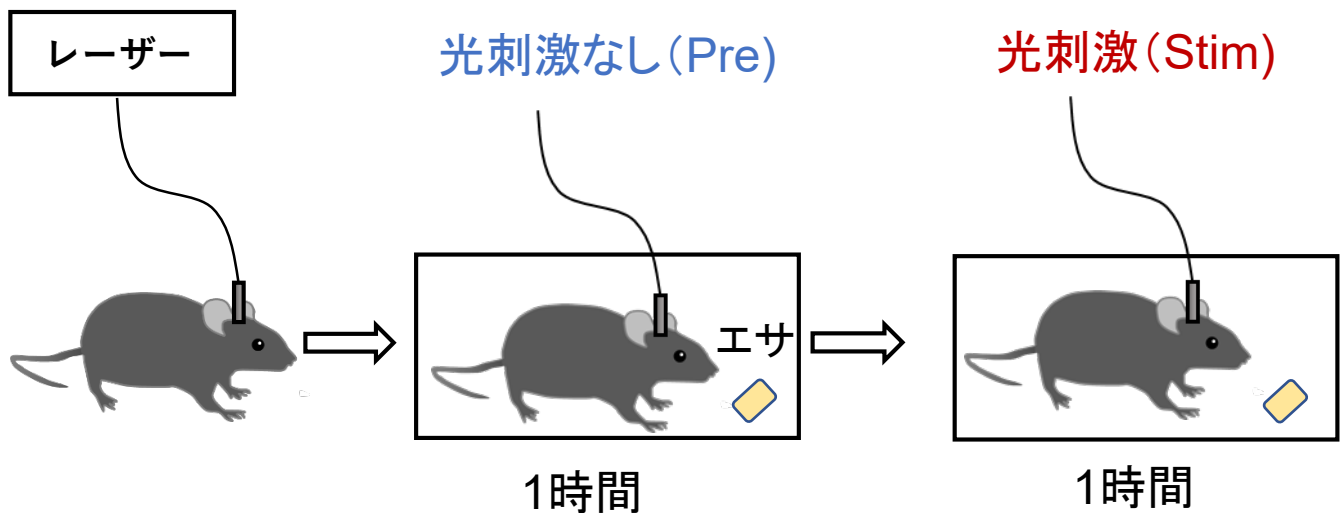


図3-2:電流式リック装置を用いた味覚嗜好性テストのリック数の測定
 (A) Lick数の測定の模式図。
 (B) マウスが溶液の飲み口をLickすると、足元のアルミホイルと舌との間で通電してその電流の波形がパソコンに記録される。
 (C) Brief access test実施中のマウスの様子。

A 摂食量の評価(AgRP-ChR2マウス)



B 味覚嗜好性・忌避性の評価(AgRP-ChR2マウス)

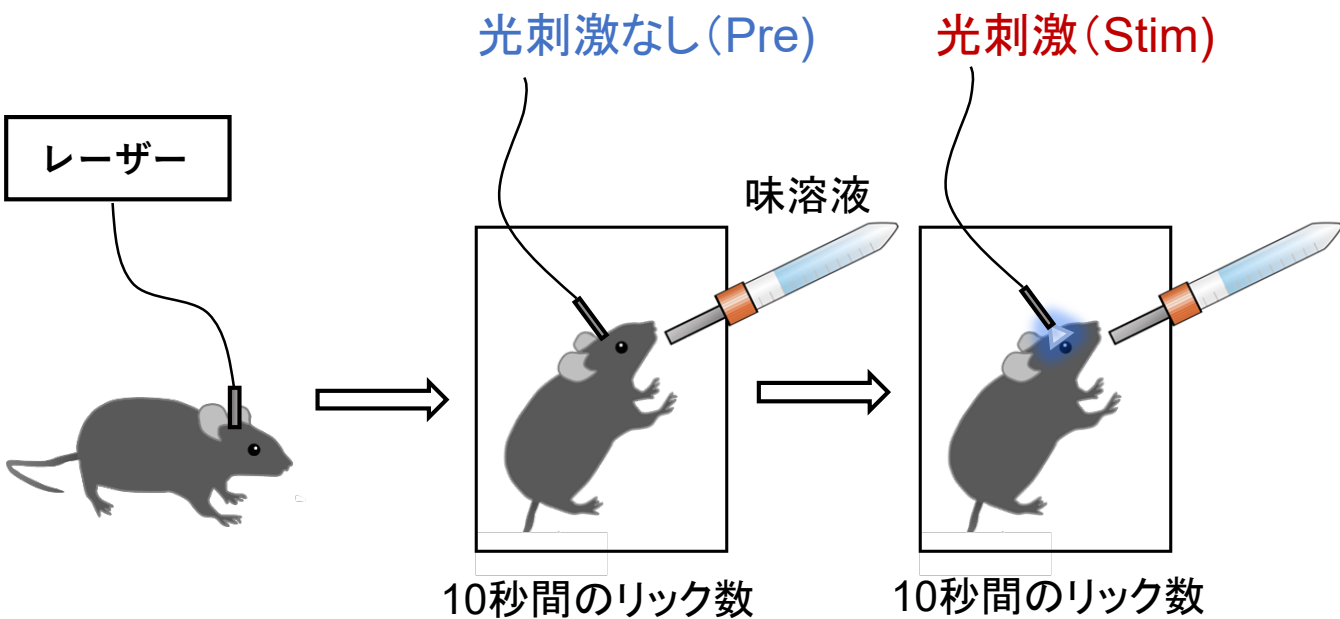
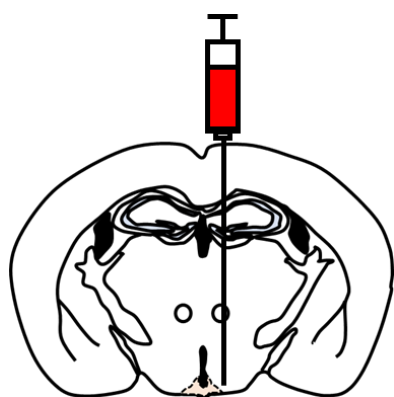


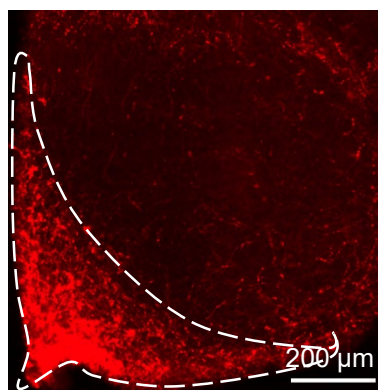
図3-3 AgRP-ChR2マウスの光刺激なし・光刺激時の摂食量(A)と味覚嗜好性・忌避性(B)の評価の模式図

A AAV-DIO-Synaptophysin-mCherry



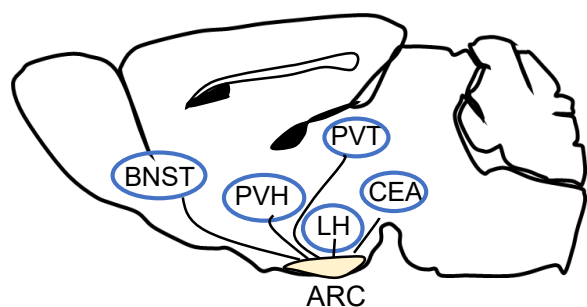
AgRP-ires-Cre mice

B 細胞体部分
ARC

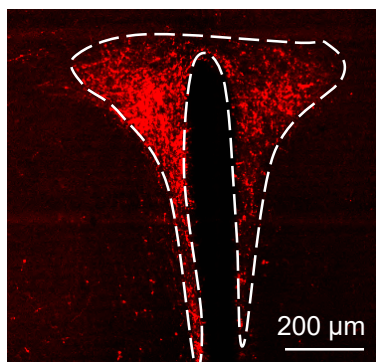


Synaptophysin-mCherry

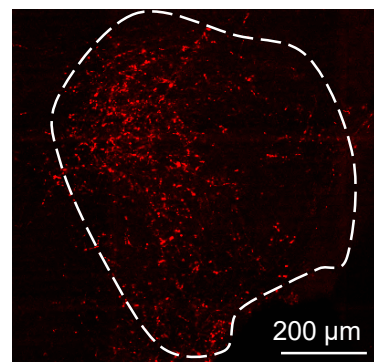
C 神経末端部分



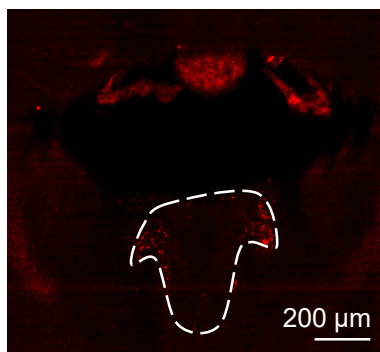
PVH



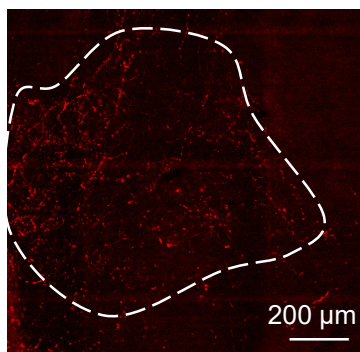
LH



PVT



aBNST



CEA

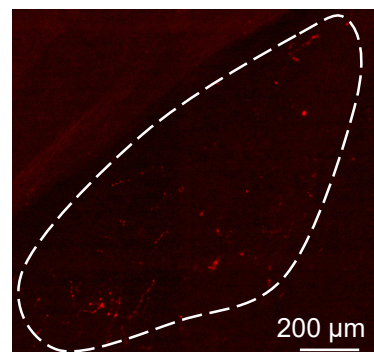


図3-4 AAV-DIO-Synaptophysin-mCherryを用いたAgRP神経投射先の可視化
(A) AgRP-ires-Creマウスの弓状核におけるAAV-Synaptophysin-mCherryの導入
(B) AgRP神経の細胞体部分のmCherry発現
(C) 投射先末端PVH、LH、PVT、BNST、CEAにおけるmCherryの発現

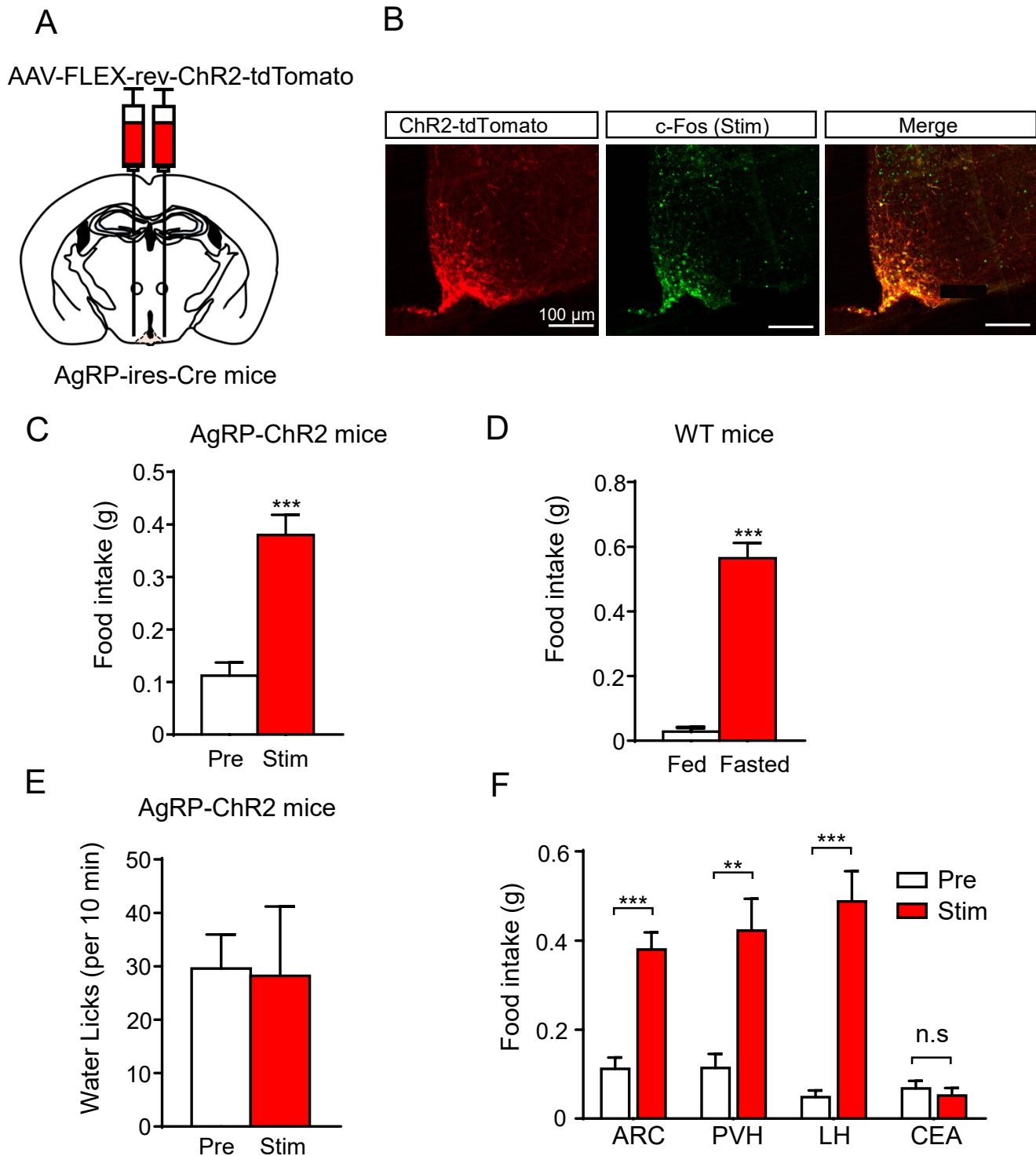


図3-5 AgRP-ChR2 マウスのAgRP神経回路を光刺激した時のc-fos発現と摂食・飲水量変化

- (A) AgRP-ires-Cre マウスの弓状核のAAV-ChR2-Tdtomatoの導入の模式図
- (B) AgRP-ChR2 マウスの弓状核を光刺激した後のc-fos染色を示す。ChR2を導入したAgRP神経特異的にC-fosの発現が上昇した。
- (C) AgRP-ChR2マウスの光刺激前(Pre)と光刺激時(Stim)の摂食量を示す。
- (D) WTマウスの通常時(Fed)と絶食時(Fasted)の摂食量を示す。
- (E) 光刺激前(Pre)と光刺激後(Stim) で水に対するリック数(10分間)を示す。
- (F) AgRP神経の投射先のPVH、LH、CEAの光刺激前と光刺激時の摂食量を示す。PVHやLHを選択的に刺激した時で摂食量の上昇が観察された。

データは平均 \pm SEで示す。AgRP-ChR2 mice(ARC,PVH,LH,CEA) (n=6), WT mice(n=6), **p<0.01, ***p<0.001対応する光刺激時との光刺激前の比較(スチューデントのt検定)

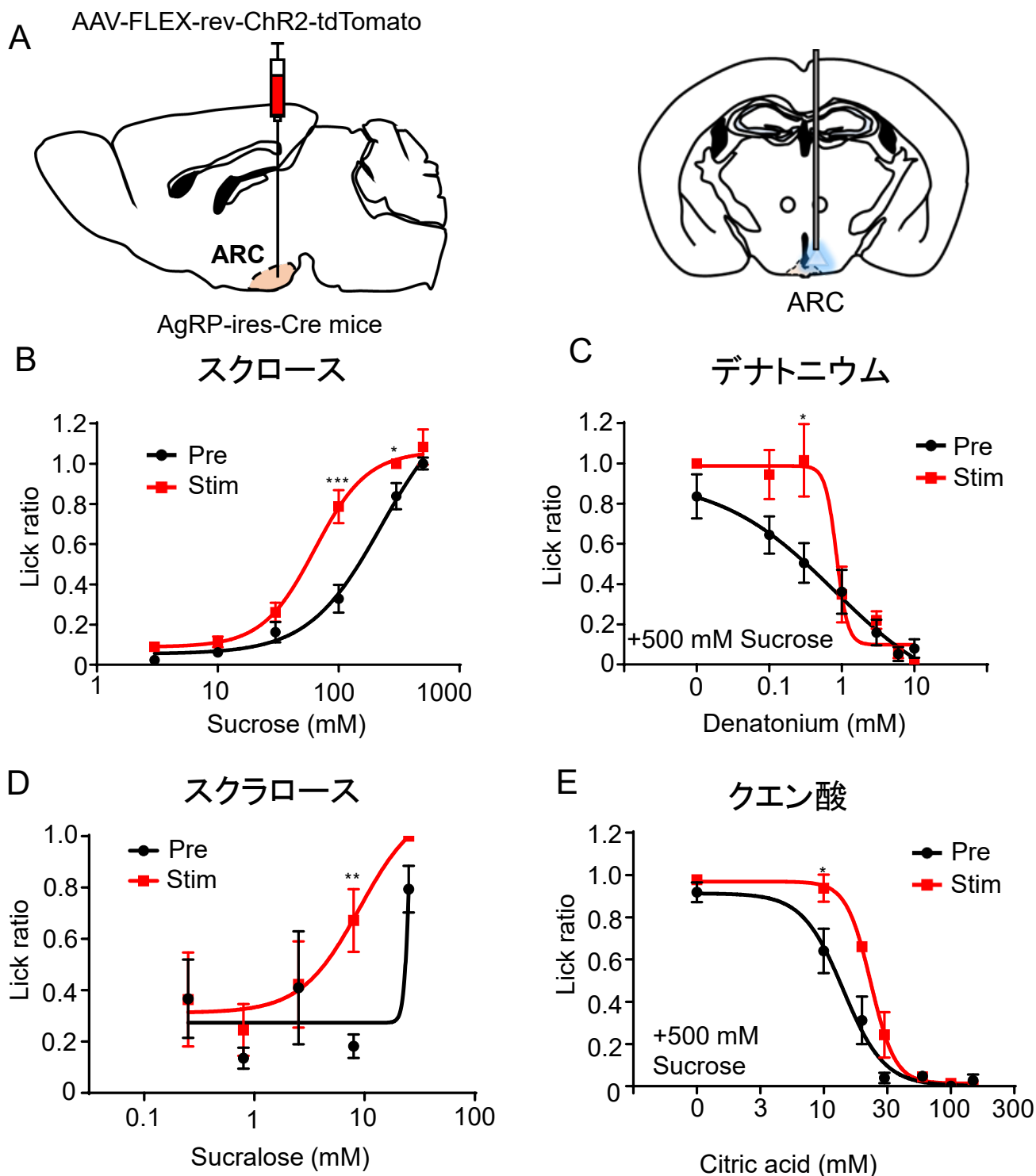


図3-6 AgRP-ChR2 マウスの細胞体部分を光刺激した時の味覚嗜好性・忌避性評価

(A) AgRP-ires-CreマウスにおけるAAV-ChR2の導入と光ファイバーの挿入(ARC)
 (B-E) AgRPの細胞体の光刺激前(黒)光刺激した時(赤)でスクロース(B)、デナトニウム、(C)スクラロース(D)、クエン酸(E)に対する味覚嗜好性テストの結果を示す。

データは平均±SEで示す(n=6)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 対応する光刺激時との光刺激前の比較(スチューデントのt検定)

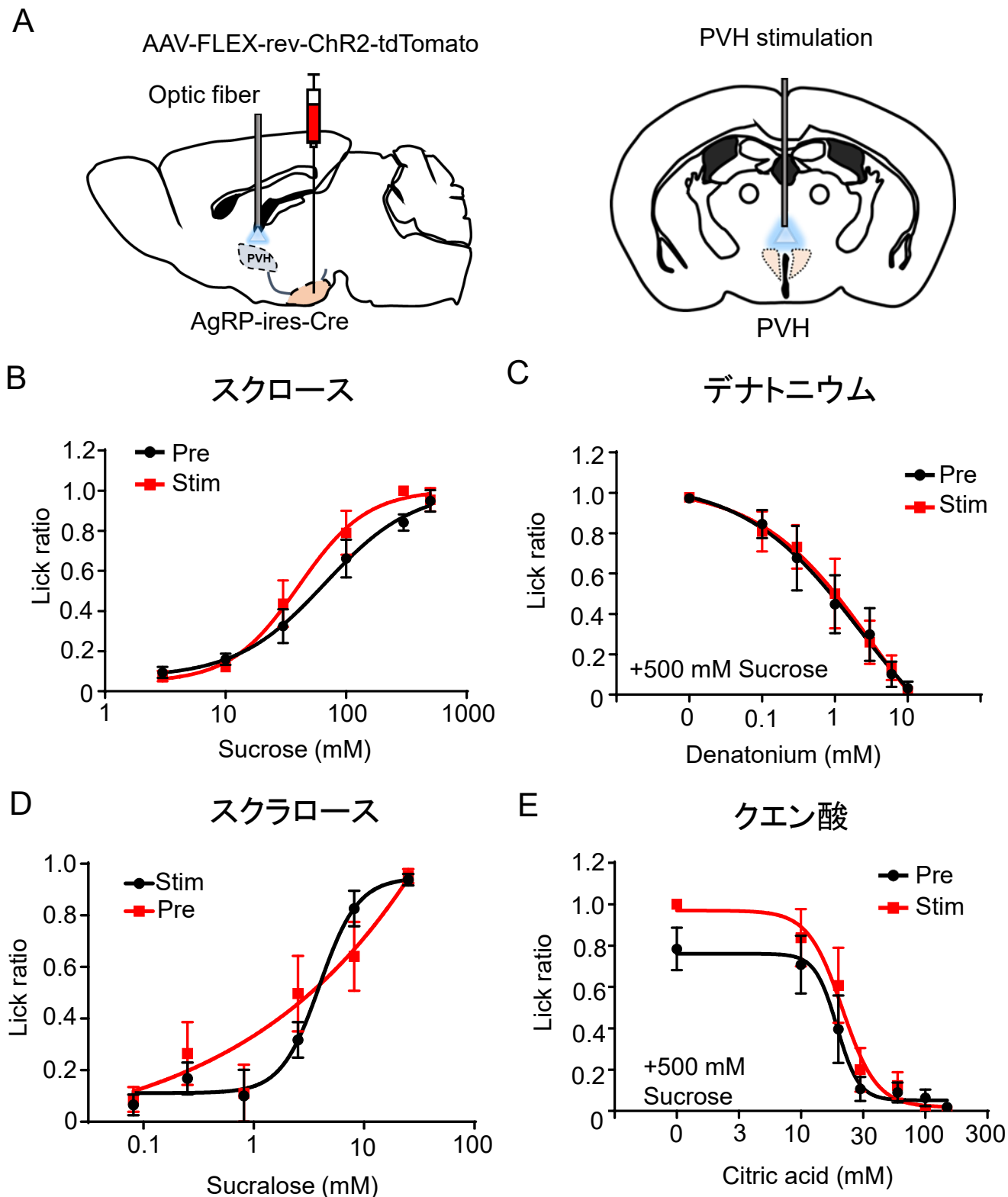


図3-7 AgRP-ChR2 マウスのPVH部分を光刺激した時の味覚嗜好性・忌避性評価

(A) AgRP-ires-CreマウスにおけるAAV-ChR2の導入と光ファイバーの挿入(PVH)
 (B-E) AgRPのPVHの光刺激前(黒)光刺激した時(赤)でスクロース(B)、デナトニウム、(C)スクラロース(D)、クエン酸(E)に対する味覚嗜好性テストの結果を示す。

データは平均±SEで示す(n=6)。

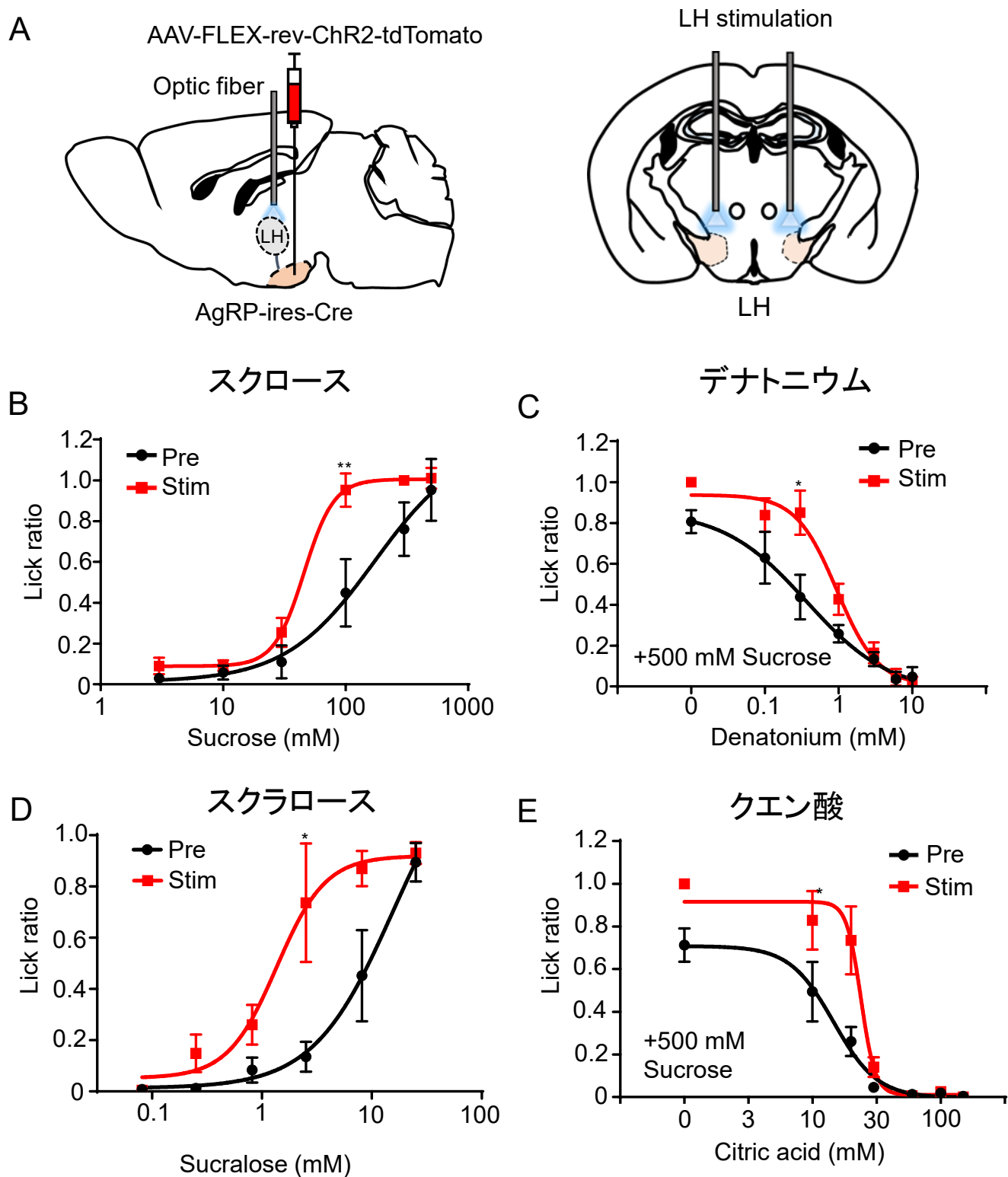


図3-8 AgRP-ChR2 マウスのLH部分を光刺激した時の味覚嗜好性・忌避性評価

(A) AgRP-ires-CreマウスにおけるAAV-ChR2の導入と光ファイバーの挿入(LH)
(B-E) AgRPのLHの光刺激前(黒)光刺激した時(赤)でスクロース(B)、デナトニウム、(C)スクラロース(D)、クエン酸(E)に対する味覚嗜好性テストの結果を示す。

データは平均±SEで示す(n=6)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 対応する光刺激時との光刺激前の比較(スチューデントのt検定)

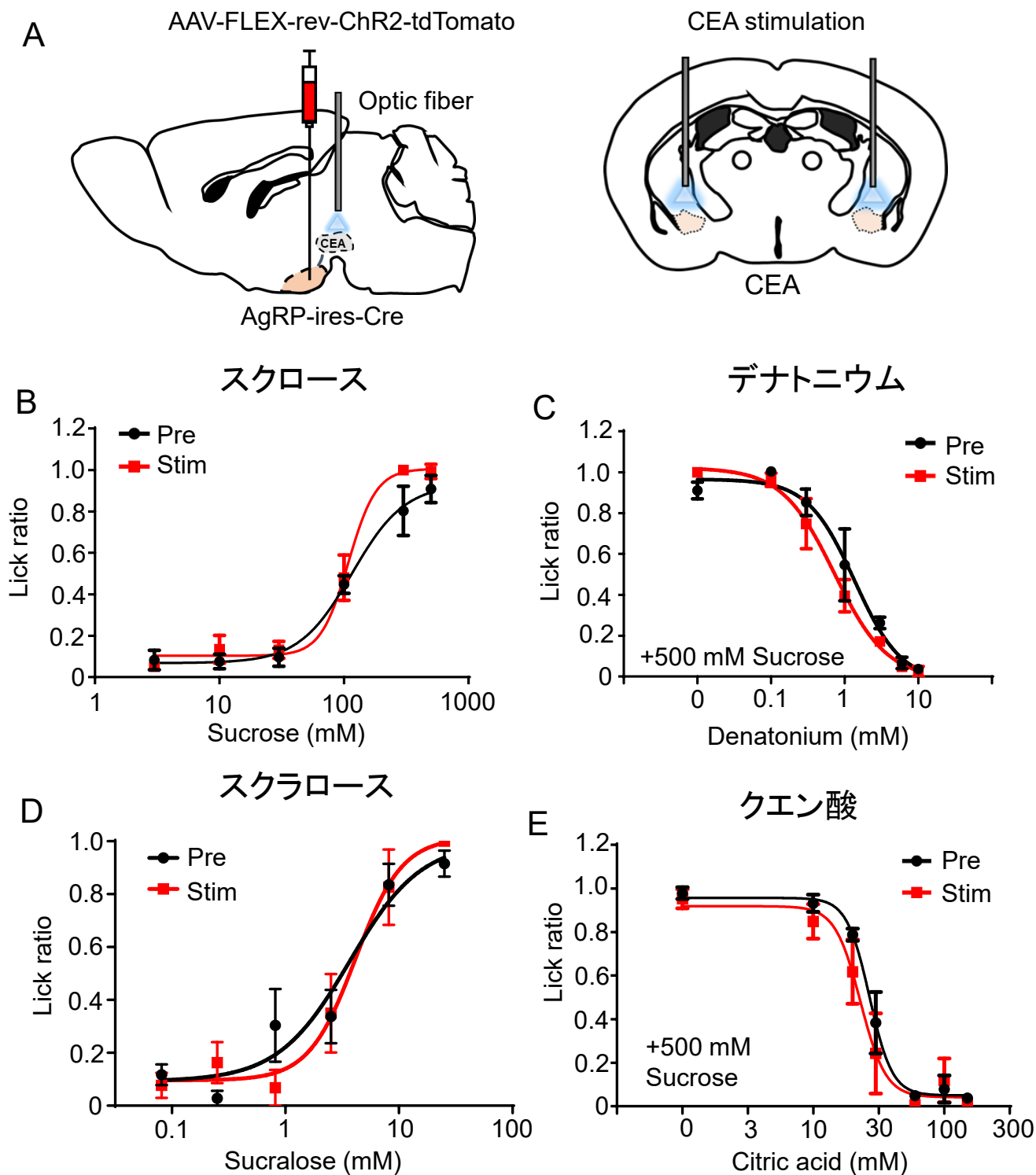


図3-9 AgRP-ChR2 マウスのCEA部分を光刺激した時の味覚嗜好性・忌避性評価

(A) AgRP-ires-CreマウスにおけるAAV-ChR2の導入と光ファイバーの挿入(CEA)
 (B-E) AgRPのCEAの光刺激前(Pre)光刺激した時(Stim)でスクロース(B)、デナトニウム、(C)スクラロース(D)、クエン酸(E)に対する味覚嗜好性テストの結果を示す。

データは平均±SEで示す(n=6)。

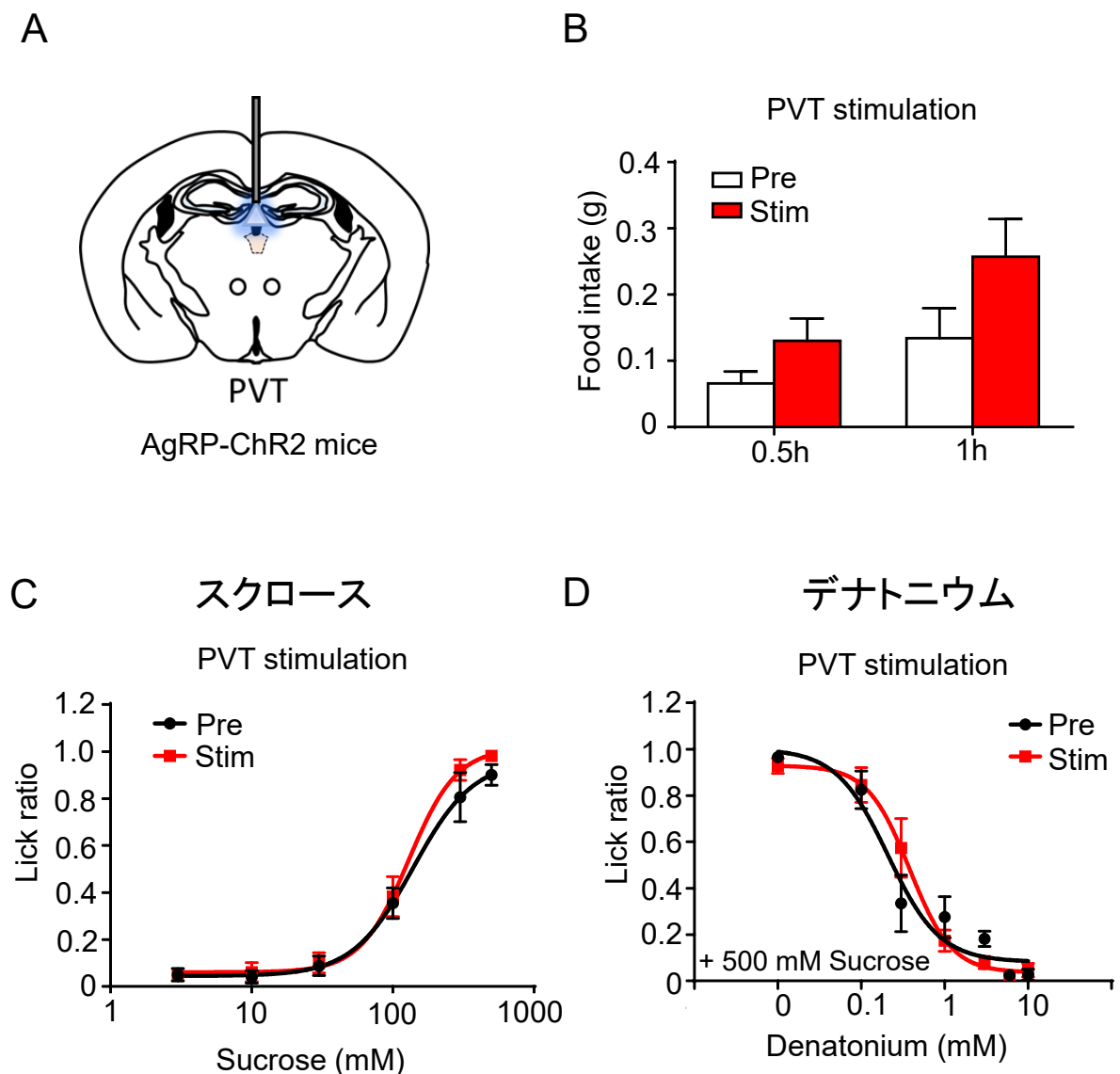
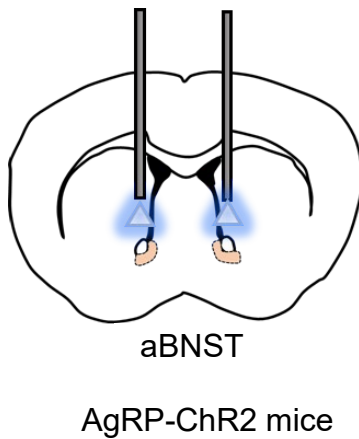


図3-10 AgRP-ChR2 マウスのPVT部分を光刺激した時の摂食量と味覚嗜好性・忌避性評価

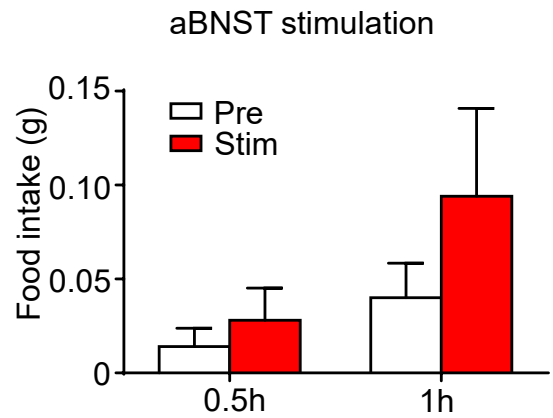
- (A) PVTにおける光ファイバーの挿入
 (B) PVT光刺激前(Pre)と光刺激時(Stim)の摂食量。
 (C) PVT光刺激前(Pre)光刺激した時(Stim)でスクロースに対する嗜好性の評価
 (D) PVT光刺激前(Pre)光刺激した時(Stim)でデナトニウムに対する忌避性の評価

データは平均±SEで示す(n=6)。

A

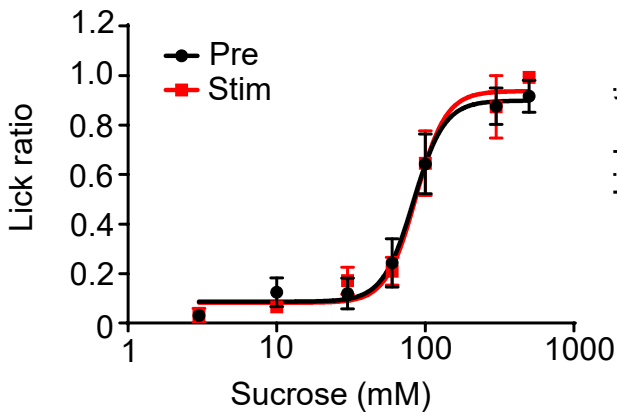


B



C

スクロース
aBNST stimulation



D

デナトニウム
aBNST stimulation

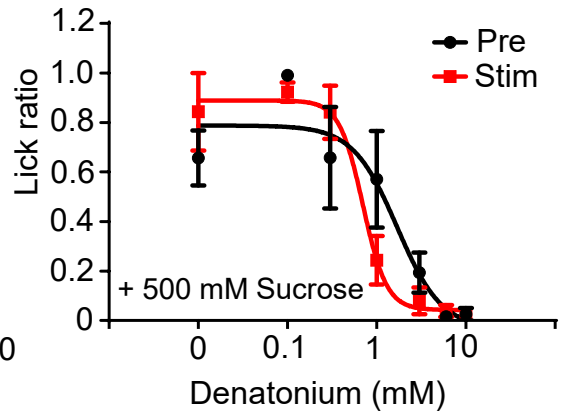


図3-11 AgRP-ChR2 マウスのBNST部分を光刺激した時の摂食量と味覚嗜好性・忌避性評価

(A) aBNSTにおける光ファイバーの挿入

(B) aBNST光刺激前(Pre)と光刺激時(Stim)の摂食量。

(C) aBNST光刺激前(Pre)光刺激した時(Stim)でスクロースに対する嗜好性の評価

(D) aBNST光刺激前(Pre)光刺激した時(Stim)でデナトニウムに対する忌避性の評価

データは平均±SEで示す(n=6)。

第 4 章

外側視床下部 LH における AgRP 神経の下流神経の探索

4-1 序

第3章の実験で、光遺伝学手法を用いて、視床下部 AgRP 神経とその投射先の活動が味の嗜好と嫌悪に及ぼす影響を検証した。その結果、外側視床下部に投射する AgRP 神経が特に空腹時の味の嗜好・忌避性を調節していることが明らかになった。しかし、外側視床下部における AgRP 神経の下流神経の分子特性は不明である

外側視床下部は視床下部の中で非常に広いかつ複雑な構造であり、異なる部位の神経が異なる行動に関係することが考えられる。例えば、摂食行動や睡眠行動においてはこれまでの研究で検証されている(Sakurai, 2007)。外側視床下部では、オレキシン (Orexin) やメラニン凝集ホルモン (MCH) など (Hahn JD, 2010)、様々な神経ペプチドを放出する神経が存在している。また、外側視床下部の神経は神経伝達物質によってグルタミン酸や GABA 作動性神経に分類できることが知られている。

これまでの知見によって、外側視床下部の小胞型グルタミン酸トランスポーターである Vglut2 神経 (グルタミン酸作動性神経のマーカー) の活動を抑制すると短期間の摂食量が増える(Hristea et al., 2011)のに対し、小胞 GABA トランスポーターである Vgat 神経 (GABA 作動性神経のマーカー) を抑制すると摂食量が低下する(Jennings et al., 2013)。また、AgRP 神経が GABA 作動性の抑制性神経であり、投射先の外側視床下部の二次神経活動を抑制することによって摂食行動を誘引することが知られている(Wu et al., 2009)。この二つの知見から、空腹時に活性化する AgRP 神経は外側視床下部の Vglut2 神経を抑制することによって摂食亢進を誘引すると推測される。

本章では AgRP 神経と外側視床下部の Vglut2 神経の接続を検証し、Vglut2 神経の活動が味覚嗜好・忌避性に影響を及ぼすかどうかを調べた。

4-2 実験材料と方法

以下の実験は東京大学動物実験実施マニュアルに沿って実施し、実験計画については東京大学農学部動物実験委員会の承認を受けた。組み換え DNA 実験については東京大学大学院農学生命科学研究科の遺伝子組み換え生物等委員会に承認を受けた

マウス

Vglut2-ires-Cre ノックインマウス（系統名：Slc17a^{6tm2(cre),Lowl} Stock# 028863）は Harvard University の Bradford Lowell 先生より分与いただき、C57BL6/J(日本クレア)と繁殖して使用した。このマウスは *Slc17a6* 遺伝子の終止コドンの直後に ires 配列と Cre 遺伝子が挿入されたノックインマウスで Vglut2 神経特異的に Cre recombinase を発現する(Vong et al., 2011)。

アデノ随伴ウイルス(AAV, Adeno Associated Virus)

本章では、Vglut2 神経の活動を制御する、Cre 依存的に抑制性または興奮性 DREADD を発現する AAV を使用した。Vglut2 神経の投射先をトレーシングするため TdTomato を発現する AAV を使用した。

興奮性 DREADD : AAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry(Titer: 8×10^{12} ゲノムコピー/ml, セロタイプ 8)

抑制性 DREADD : AAV-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry (Titer: 4.3×10^{12} ゲノムコピー/ml, セロタイプ 8)

AAV-FLEX-tdTomato (Titer: 5.0×10^{12} vg/ml, セロタイプ 1)

AAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry と AAV-FLEX-tdTomato は The University of North Carolina Vector Core より購入した。AAV-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry は Addgene より購入した。

AAV ウイルスのインジェクション手術

第二章で示した実験手順でウイルスインジェクション手術を行った。

8-10 週齢のオスの Vglut2-ires-Cre マウスを実験に使用した。上記のマウスはイソフルランを用いて麻酔した。脳定位装置への固定は 2 章の実験方法と同様に行った。マイクロポンプを用いて以下の座標に AAV を外側視床下部にインジェクションした (Bregma から AP:-1.34 mm ML= ± 1.0 mm DV= -5.2 mm)。

AAV を導入したマウスは以下のように示す：

Vglut2^{LH}-hM4Di マウス: AAV-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry 導入

Vglut2^{LH}-hM3Dq マウス: AAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry 導入

Vglut2^{LH}-tdTomato マウス: AAV-FLEX-tdTomato 導入

マウス脳の灌流固定・切片作製・免疫組織染色

この実験操作は第 2 章で示した通りに実施した。外側視床下部の Vglut2 神経を標識するため、Vglut2-tdTomato マウスを灌流固定した。脳を摘出し、50 μ m の厚さで脳の吻側から尾側まで冠状切片を作製した。浮遊法で免疫組織染色を行い、作製した脳切片は PBST で 3 回洗浄後、ブロッッキング溶液(5% donkey serum を含む PBST)で 1000 倍に希釈した Rat anti-RFP 抗体 (ChromoTek) を用いて 4°C で 1 晩静置した。翌日、PBST で 3 回洗浄し、遮光した状態で 300 倍に希釈した Alexa568 標識抗ラット IgG 抗体 (abcam) と 2 時間反応させた。染色した切片を PBST で 3 回洗浄後、スライドグラスに載せ、その蛍光をスライドスキャナー顕微鏡で直接観察した。

Vglut2^{LH} マウスの AgRP 抗体と tdTomato 抗体の二重染色

AgRP 抗体の免疫染色のため Vglut2^{LH}-tdTomato マウスの外側視床下部付近で脳切片の作製を行った。作製した脳切片は PBST で 3 回洗浄後、ブロッッキング溶液(5% donkey serum を含む PBST)で 1000 倍に希釈した Goat anti AgRP 抗体(Neuromics)1000 倍に希釈した Rat anti-RFP 抗体 (ChromoTek) を用いて 4°C で 1 晩静置した。翌日、PBST で 3 回洗浄し、遮光した状態で 300 倍に希釈した Alexa488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Life tech) と 300 倍に希釈した Alexa568 標識抗ラット IgG 抗体 (abcam) と 2 時間反応させた。染色した切片を PBST で 3 回洗浄後、スライドグラスに載せ、その蛍光をスライドスキャナー顕微鏡で直接観察した。

Vglut2^{LH}-hM4Di マウスと Vglut2^{LH}-hM3Di マウスの摂食量の測定

摂食量測定のは第 2 章で説明した通り実施した。摂食量の測定は通常マウスが餌をほとんど摂取しない午前中(9:30~10:00)に開始した。1 匹ずつ飼育している Vglut2^{LH}-hM4Di マウスを、2 つのグループに分け、一方のグループに CNO (1.0 mg/kg) を腹腔内投与し、もう一方のグループに同量の生理食塩水を投与した。その後、各マウスをケージに戻し、秤量した餌 (クレア、CE-2) を与え、30 分、1 時間の時点での摂食量を測定した。翌日、前日 CNO を投与したグループのマウスに生理食塩水、もう一方のグループのマウスに CNO を腹腔内投与し、前日同様に、摂食量を測定した。データは両日の結果を合わせて解析した。

Vglut2^{LH}-hM3Di マウスは摂食量測定の前日の 15:00 から、絶食を開始した。2 つのグループに分け、一方のグループに CNO (1.0 mg/kg) を腹腔内投与し、もう一方のグループに同量の生理食塩水を投与した。その後、各マウスをケージに戻し、秤量した餌 (クレア、CE-2) を与え、30 分、1 時間の時点での摂食量を測定した。翌週、前週 CNO を投与したグループのマウスに生理食塩水、もう一方のグループのマウスに CNO を腹腔内投与し、前週と同様に、摂食量を測定した。データは両日の結果を合わせて解析した。

Brief access taste test による味嗜好性の評価

Brief access taste test は第 2 章で説明した通りに実施した。Vglut2^{LHA}-hM4Di マウスと Vglut2^{LHA}-hM3Dq マウス(各 6 匹)を使用し、甘味物質であるスクロース、苦味物質であるデ

ナトリウムについてテストを行った。各マウスは個別に飼育し、本テストの実施前に、溶液の舐め口の位置と舐め方を覚えさせるため、3-4 日間トレーニングを行った。味溶液は味物質を脱イオン水に溶解して調製したものを使用した。嗜好性の甘味の試験については、6 時間絶水の条件で行った。一方、忌避性の苦味の試験については、味物質を高濃度のスクロースに溶かし、6 時間絶水の条件で行った。

Brief access taste test は電流式リックメータと専用ケージを用い、AD converter と Irec ソフトで記録した。リック数は pCLAMP ソフトを用いて解析した。

Vglut2^{LH}-hM4Di マウスと Vglut2^{LH}-hM3Dq マウス マウスでは、1 つの味溶液について CNO 投与の有無で二回測定した。各群は 2 グループに分け、一回目では、一方のグループは初日に CNO (1.0 mg/kg) を投与し、もう一方には生理食塩水を投与した。いずれの場合も投与後 10 分してから測定した。二回目の実験ではインジェクションする溶液を逆にして、同様のアッセイを行った。

データの統計処理

図 4-3CDE、図 4-4CDE ではスチューデントの t 検定により、有意差検定を行った。統計処理は GraphPad Prism 6 ソフトウェアを使用して行った。

4-3 結果

4-3-1 外側視床下部の AgRP 神経末端の分布

まず、AgRP 抗体で染色した視床下部の脳切片で、AgRP 神経末端の局在を確認した。その結果、細胞体がある弓状核で強い発現が観察されるとともに、投射先である PVH や LH などの部位でも AgRP の発現が見られた(図 4-1)。特に、吻側から尾側の切片で外側視床下部の AgRP 末端発現を比較した結果、Bregma から-1.0 mm から傾向がみられ、そこから後ろに移動すると、蛍光の発現量は増加する傾向が見られ、特に-1.4 mm 切片での、Fornix という構造の付近で AgRP 神経の末端が最も密集している。-1.4 mm 以降の切片では、AgRP 神経末端の発現が減少する傾向があり、-2.0 mm になると LH における AgRP の発現が消失した。したがって、弓状核から外側視床下部に投射された AgRP 神経の末端は LH の中の特定の領域に局在することが示唆された。

4-3-2 外側視床下部 Vglut2 神経と AgRP 神経末端の免疫染色

Vglut2-ires-Cre マウスの外側視床下部において AgRP 神経末端の発現が最も強い座標 (Bregma から-1.5 mm) に AAV-Flex-tdTomato ウイルスを導入し、Vglut2 神経をラベルした。その結果、外側視床下部で TdTomato の蛍光が観察された。また、AgRP 抗体で染色した切片で、外側視床下部の Vglut2 神経の細胞体と AgRP 神経末端の局在を比較した結果、外側視床下部における AgRP 神経の末端が一部の Vglut2 神経に隣接していることが観察された(図 4-2AB)。以上の結果より、外側視床下部における AgRP 神経の二次神経がグルタミン酸作動性神経である可能性が示唆された。

4-3-3 外側視床下部 Vglut2 神経を抑制した時の味覚嗜好性・忌避性変化

AgRP 神経は GABA 作動性神経であり、下流の神経活動を抑制することによって摂食行動を引き起こしていることが知られている。そこで、DREADD 手法を用いて LH の Vglut2 神経活動を抑制し、行動実験で味覚嗜好性・忌避性の変化を評価した。

まず、Vglut2-ires-cre マウスの外側視床下部に抑制性 DREADD である AAV-hM4Di-mCherry を導入した(図 4-3A)。hM4Di 受容体は CNO と特異的に結合することで神経活動を人工的に抑制することができる。CNO を投与した場合の摂食量を測定した結果、コントロールの食塩水投与群と比べ 1 時間内での摂食量が有意に上昇した(図 4-3C)。

次に、上記の Vglut2-hM4Di マウス用いて CNO 投与時と食塩水投与時で味覚嗜好性・忌避性を評価した結果、CNO 投与で Vglut2 神経活動を抑制すると、スクロースに対する嗜好性が上昇した(図 4-3D)ことに対し、デナトニウムに対する忌避性が低下した(図 4-3E)ことが観察された。ことような変化は AgRP 神経の外側視床下部神経末端を選択的に活性化した時と類似した。したがって、外側視床下部の Vglut2 神経の活動が味覚嗜好性・忌避性に関係していることが見出された。

4-3-4 外側視床下部 Vglut2 神経を興奮させた時の味覚嗜好性・忌避性変化（絶食時）

次に、空腹時の味覚嗜好性・忌避性変化の調節に外側視床下部の Vglut2 神経が必要かどうかを検証するために、興奮性 DREADD の hM3Dq を外側視床下部の Vglut2 神経に導入した (図 4-4A)。Vglut2-hM3Dq マウスを一晩絶食させ、CNO 投与時と食塩水投与時の味覚嗜好性・忌避性を評価した。

はじめに、Vglut2-hM3Dq を用いて、CNO の投与でこの神経を選択的に活性化した場合の摂食量を測定した。その結果、食塩水を投与コントロールの群（絶食）では餌を摂取しはじめ、一時間の摂食量が上昇した。一方、CNO を投与して Vglut2 神経を活性化すると、摂食量が顕著に低下し (図 4-4C)、摂食行動が抑制された現象が観察された。

また、絶食時と通常時で味覚感受性を比較した結果、野生型マウスと同様に、空腹になるとスクロース溶液のリック数の上昇とデナトニウム溶液リック数の低下が確認できた。次に、CNO を投与して Vglut2 神経を興奮させると、絶食時で観察された甘味 (図 4-4D) や苦味 (図 4-4E) の感受性の変化が消失し、リックの応答曲線が通常状態に戻る傾向が見られた。したがって、Vglut2 神経活動の低下が空腹の味覚嗜好性・忌避性の調節に重要であることが明らかになった。

4-4 考察

本章では、味覚嗜好性・忌避性の調節に関わる AgRP 神経の外側視床下部に着目し、AgRP 神経の下流の神経の候補である Vglut2 神経が味覚感受性を制御しているかどうかを検証した。はじめに、免疫染色で LH における AgRP 神経末端が Vglut2 神経に隣接していることを確認した。また、DREADD 手法を用いて LH の Vglut2 神経を活性化または抑制した場合の味覚嗜好性・忌避性を評価したところ、通常状態でその神経を抑制すると甘味に対する嗜好の上昇と苦味に対する忌避の低下が観察されるのに対し、空腹状態でこの神経を活性化すると空腹に伴う味覚嗜好性・忌避性の変化が消失することが明らかになった。また、LH から LS、LHb の異なる経路で甘味や苦味の感受性を調節していることが示唆された。

4-4-1 外側視床下部の AgRP 神経末端の分布と Vglut2 神経の発現

AgRP は GABA 作動性神経であり、下流の二次神経活動を抑制することが知られている。また、外側視床下部のグルタミン酸作動性神経を抑制すると摂食量が増加するのに対し GABA 作動性神経を抑制すると摂食量が減少することが分かっている。したがって、AgRP 神経がグルタミン酸作動性神経に抑制性のインプットをすることで摂食行動を誘引している可能性が十分考えられる。

AgRP の免疫染色で外側視床下部 LH の AgRP 末端発現を観察した結果、AP-1.0 mm から -1.9 mm の座標で発現していることが分かった。特に AP-1.4 mm 付近の Fornix (脳弓周核) 構造の周辺に密集して発現している。また、LH の Fornix 周囲の脳弓周囲野で LHAjp (LHA juxtaparaventricular)、LHAs (LHA supraformical) などの垂核に分類されている(Hahn and Swanson, 2010)。LH の AgRP 神経末端染色の結果とこれらの垂核の位置を比較した結果、AgRP 神経の投射先末端は LHAs 部分に所属すると考えられる。また、AAV を用いて LH の Vglut2 神経を標識した結果、一部の Vglut2 神経が LHAs の AgRP 神経末端に近接していることが観察された。これらの結果から、AgRP 神経が LHAs の Vglut2 神経に投射していることが示唆された。

また、MCH や Orexin などの摂食に関係するペプチドが LHAs に発現していることが知られている (Hahn JD,2010)。したがって AgRP 神経でこれらのペプチド産生神経にシナプス結合をしている可能性が考えられる。今後、AgRP と MCH や Orexin の二重染色や、Vglut2 神経と MCH や Orexin などの抗体との免疫染色で分子特性を調べることによって AgRP 神経の二次神経をさらに絞り込むことができると期待している。

4-4-2 外側視床下部 Vglut2 神経活動と摂食量の変化について

外側視床下部の Vglut2 神経が摂食行動に与える影響を調べた結果、満腹時の Vglut2 神経活動を抑制すると、短期間内での摂食量の上昇がみられたが、AgRP 神経の LH 投射先末端を選択的に活性化した時と比べ、1h 内の摂食量の増加量としては少ないことが考えられた。抑制性イオンチャンネルのハロロドプシン (Halorhodopsin) で LH の Vglut2 神経を抑制し

た時の摂食量を測定した実験では(Hristea et al., 2011)、短期間内における摂取した餌の量は増加したが、上昇量は比較的低かった (0.1 g から 0.2 g)。この量は今回、DREADD 手法で Vglut2 神経を抑制した場合の摂食量と一致していると考えられる(図 4-3C)。今回の実験で LHAs 部位の座標をターゲットして hM4Di を発現させているが、導入した AAV が局所的に広がり、AgRP と接続しない LH の Vglut2 にも感染することが回避できない。したがって、CNO 投与で AgRP 神経に接続していない神経活動が同時に抑制され、それらの神経の活動変化が摂食行動に影響を及ぼしている可能性が存在すると考えられ、それが原因で Vglut2 神経を抑制した時の摂食量変化が AgRP 神経回路を操作した時より低いと考えられる。

空腹時で LH の Vglut2 神経を活性化した時の再摂食を評価した結果、Vglut2 神経が興奮すると摂食行動が抑制され、短期間内の摂食量が顕著に低下した(図 4-4C)。このことから摂食抑制効果が非常に強力だと考えられる。外側視床下部は摂食神経ネットワークで摂食欲求や摂食行動のモチベーションを統合していることが最近の研究で明らかになってきた(Jennings et al., 2015)。空腹時の Vglut2 神経を活性化すると、摂食のモチベーションを低下したことによって摂食量が減少したことが考えられる。

4-4-3 外側視床下部 Vglut2 神経活動と味覚嗜好・忌避性

DREADD 手法を用いて通常状態の Vglut2 神経を抑制すると、空腹時または AgRP 神経活性化時と似たような甘味嗜好性の上昇と苦味忌避性の低下が観察された。また、空腹時状態で Vglut2 神経を活性化した結果、空腹時に生じる味覚感受性が消失し、通常状態に戻ることがわかった。この二つの結果から、外側視床下部の Vglut2 神経活動が空腹時に生じる味覚嗜好性・忌避性の変化を引き起こす上で必要不可欠であることが明らかになった。外側視床下部は味の好き嫌いの判断の腹側前脳経路に所属する部位であり、空腹と満腹時での外側視床下部神経の味に対する応答が異なることによって味嗜好や忌避の価値判断が変化すると推測される。

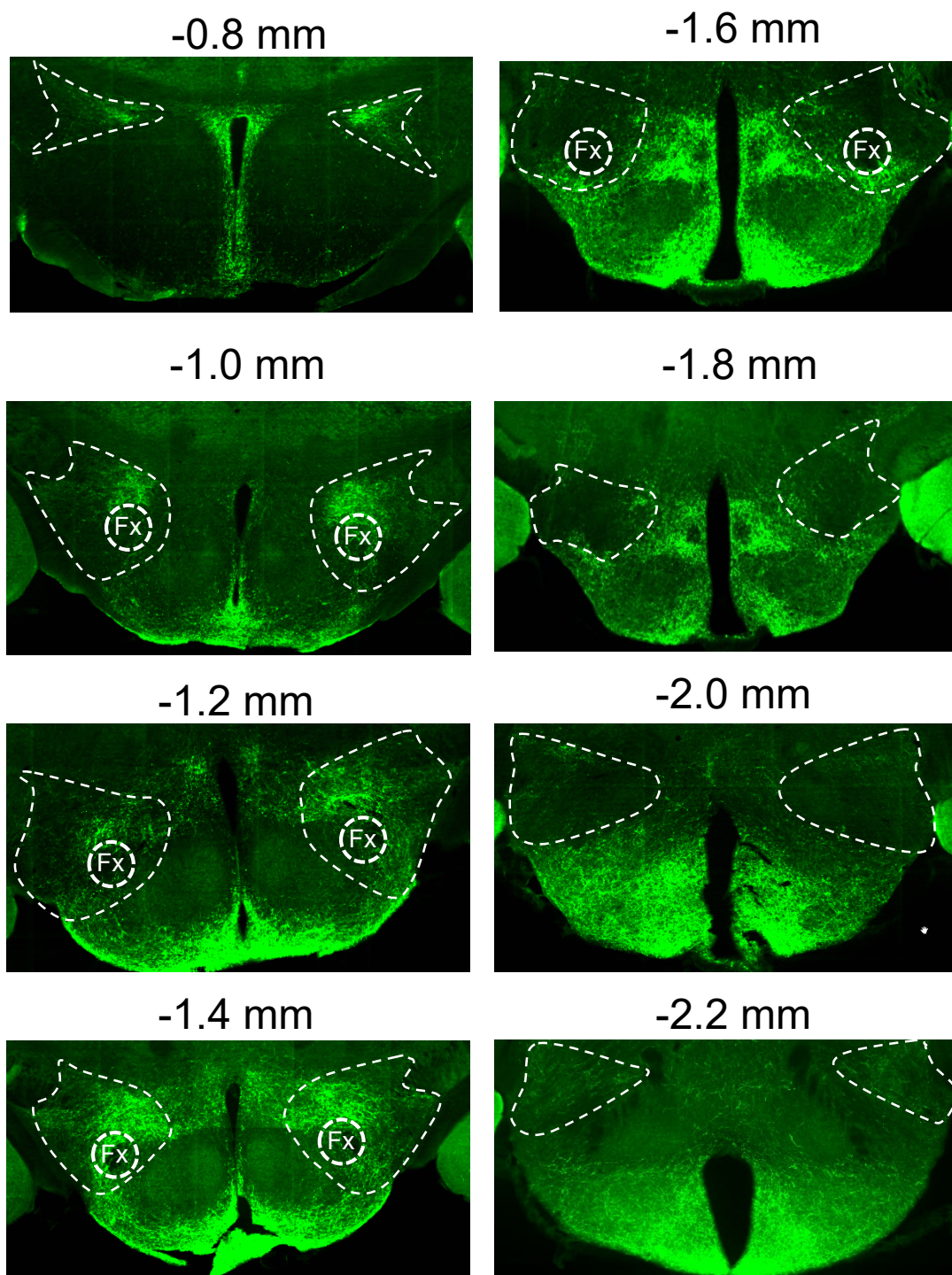


図4-1 外側視床下部におけるAgRP神経末端の分布

Bregmaから-0.8 mmから-2.2 mmの座標における領域から切片を作製し、AgRPに対する抗体染色を行った(各図の上の数字はBregmaからの距離、点線で囲んだ部分はLHの位置を示す)。

投射先であるPVHやLHなどの部位でAgRPの発現が観察された。特に、外側視床下部LHにおいて、Fornix構造の付近にAgRPの末端が密集している。Fx:Fornix

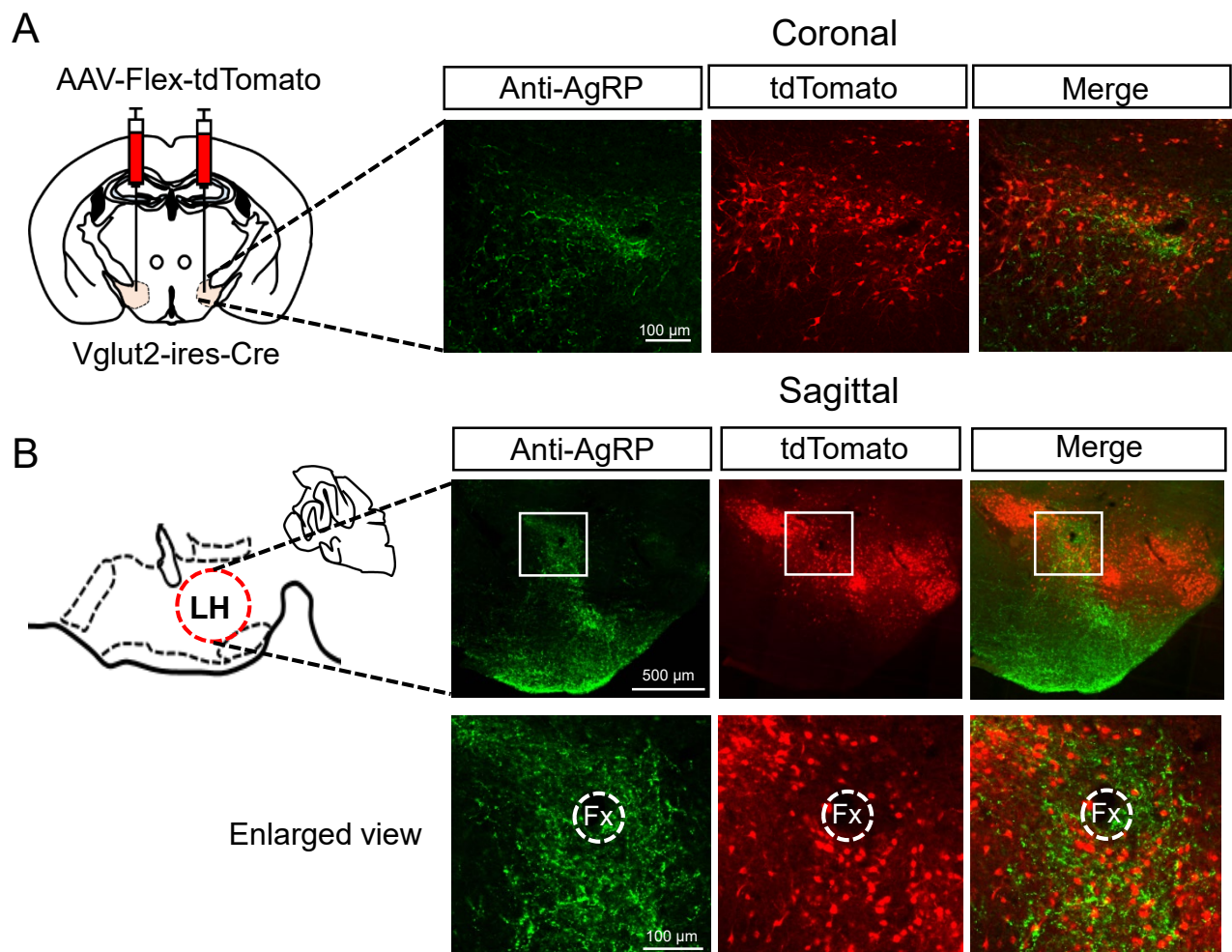


図4-2 外側視床下部におけるVglut2神経とAgRP抗体の二重免疫組織染色

(A)冠状切片で観察したAgRPの発現(緑)とVglut2神経の細胞体(赤)
 (B)矢状切片で観察したAgRPの発現(緑)とVglut2神経の細胞体(赤)
 Fx: Fornix

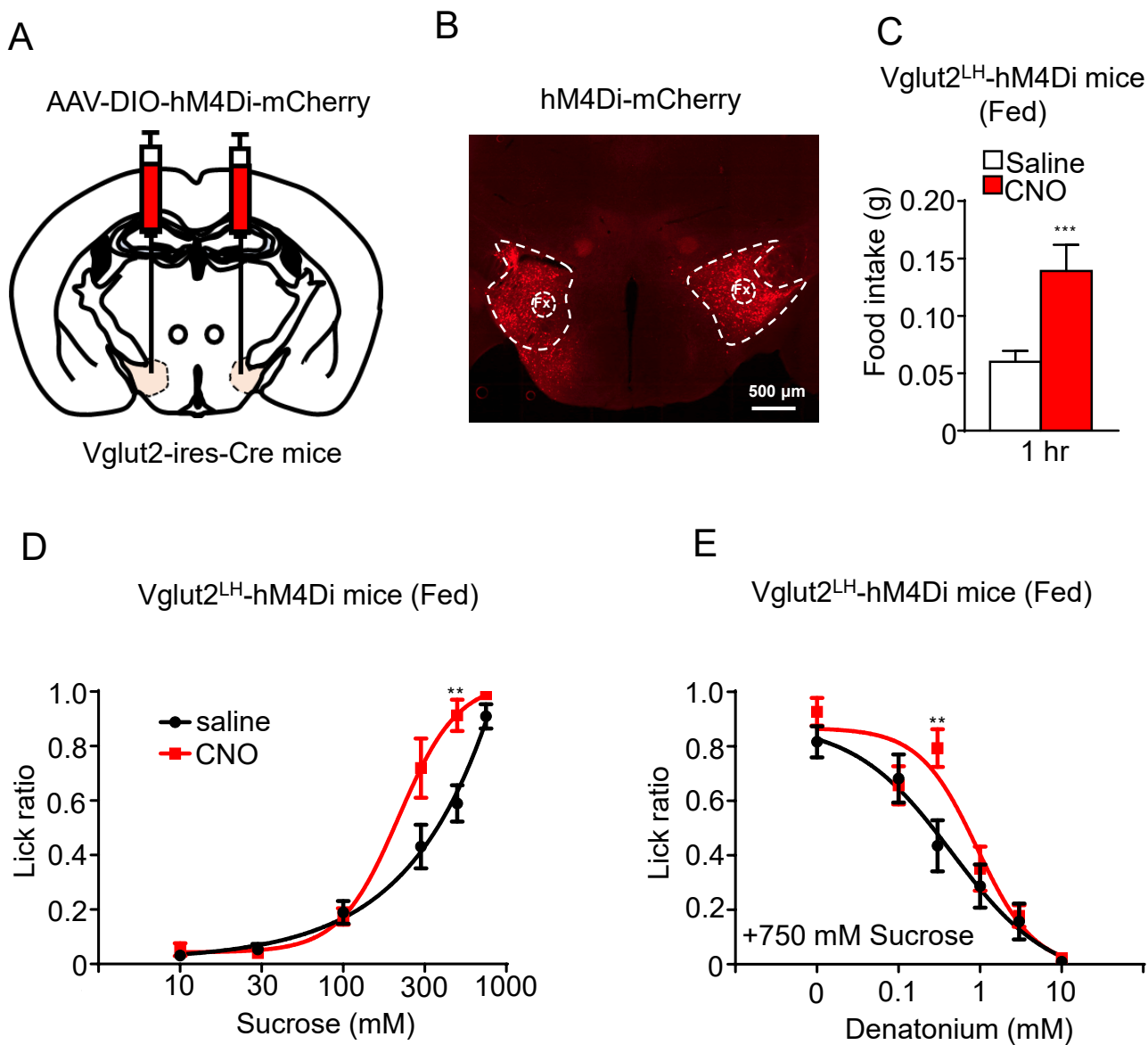


図4-3 外側視床下部Vglut2神経を抑制した場合の摂食量と味覚嗜好性・忌避性評価

(A)Vglut2-ires-CreのLHにおけるAAV-hM4Di-mCherry導入の模式図

(B)LHにおけるhM4Di-mCherryの発現

(C)Vglut2-hM4Diマウスに食塩水(白)またはCNO(赤)投与時の摂食量。Vglut2神経の抑制すると摂食量の上昇が観察された。

(D) Vglut2-hM4Diマウスに食塩水(黒)またはCNO(赤)投与時のスクロースに対する嗜好性の評価

(E) Vglut2-hM4Diマウスに食塩水(黒)またはCNO(赤)投与時のデナトニウムに対する忌避性の評価

データは平均 \pm SEで示す(n=6)。**p<0.01, ***p<0.001対応するCNO投与時と食塩水投与時の比較(スチューデントのt検定)

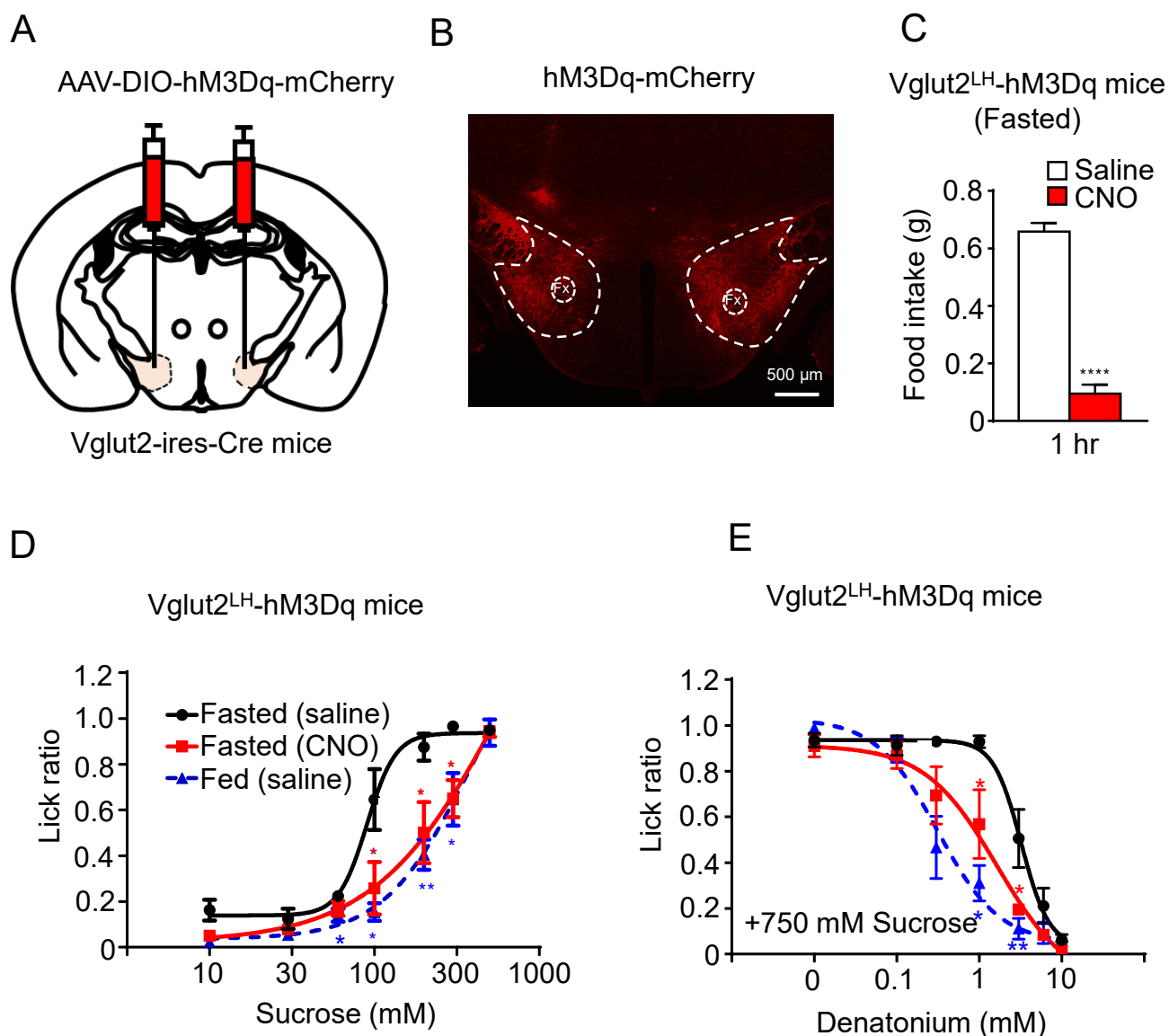


図4-4 外側視床下部Vglut2神経を活性化した場合(絶食時)の摂食量と味覚嗜好性・忌避性評価

(A)Vglut2-ires-CreのLHにおけるAAV-hM3Dq-mCherry導入の模式図

(B)LHにおけるhM3Dq-mCherryの発現

(C)Vglut2-hM4Diマウス(絶食時)に食塩水(白)またはCNO(赤)投与時の摂食量。Vglut2神経を活性化すると摂食量の低下が観察された。

(D) Vglut2-hM4Diマウス(絶食時)に食塩水(黒)、CNO(赤)投与時または通常状態の食塩水投与時(青)のスクロースに対する嗜好性の評価

(E) Vglut2-hM4Diマウス(絶食時)に食塩水(黒)、CNO(赤)投与時または通常状態の食塩水投与時(青)のデナトニウムに対する忌避性の評価

データは平均±SEで示す(n=6)。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001対応するCNO投与時と食塩水投与時の比較(スチューデントのt検定)

第 5 章

外側視床下部 Vglut2 神経の投射先の特定と
投射先活動が味覚嗜好・忌避性に与える影響

5-1 序

LH は摂食神経系と味覚神経系の両方に関わり、摂食行動や味の嗜好に影響を及ぼしていると考えられる。LH では摂食開始行動と摂食の完了行動が異なる神経によって制御されていることが最近の研究であきらかになった。また、電気生理の実験で、外側視床下部は嗜好性の味と忌避性の味の応答する神経が存在することが報告されている(Li et al., 2013)。

第3章の実験では、免疫染色で LH における AgRP 神経の末端がグルタミン酸作動性神経 Vglut2 神経に近接していることが観察された。そこで、薬理遺伝学手法で LH の Vglut2 神経を抑制した時では摂食亢進と同時に、甘味嗜好性の上昇と苦味忌避性の低下が観察された。また、絶食したマウスの Vglut2 神経を活性化すると、摂食行動が抑制されたに伴い、空腹時による甘味嗜好性と苦味忌避性の変化が消失した。これらの結果から LH の Vglut2 神経が味覚嗜好性や忌避性の調整に必要不可欠であることが見出した。しかし、外側視床下部はどのような経路を介し、空腹時の味覚嗜好性・忌避性を調節しているのが不明です。

本章では抑制性 DREADD の AAV-hM4Di-mCherry を用いて外側視床下部の Vglut2 神経の投射先のトレーシングを行った。その結果、外側中隔核 (LS)、外側手網核 (LHb) と背側前核 (AD) で LH の Vglut2 神経の入力が観察された。次に、特定された投射先の活動を選択的に抑制し、これらの投射先活動の中で、味覚嗜好・忌避性に影響を及ぼす部位を調べた。

5-1 実験材料と方法

以下の実験は東京大学動物実験実施マニュアルと自然科学研究機構動物実験委員会に沿って実施し、実験計画については東京大学農学部動物実験委員会と自然科学研究機構動物実験委員会の承認を受けた。組み換え DNA 実験については東京大学大学院農学生命科学研究科の遺伝子組み換え生物等委員会に承認を受けた

マウス

Vglut2-ires-Cre マウスと C57BL6/J マウスを使用した。

アデノ随伴ウイルス(AAV, Adeno Associated Virus)

本章では、Cre 依存的に抑制性 DREADD や GFP を発現する AAV を使用した。

抑制性 DREADD : AAV-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry (Titer: 4.3×10^{12} ゲノムコピー/ml, セロタイプ 8)

AAV-hSyn-DIO-GFP (Titer: 5.2×10^{12} ゲノムコピー, セロタイプ 8)は The University of North Carolina Vector Core より購入した。

AAV ウイルスのインジェクション手術

第 4 章と同じ方法で手術を行った。

Vglut2-ires-Cre マウスの LH に AAV-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry または AAV-hSyn-DIO-GFP を導入した。

局所投与カニューレの装着

DREADD である hM4Di は細胞体から運ばれ、軸索末端に溜まる性質があるため、CNO を局所投与することによって投射先の神経活動を抑制することが可能になる(図 5-1A)。そのため、マウスにカニューレを装着した。外側視床下部に AAV-hM4Di をインジェクション後、マイクロドリルを用いて外側視床下部の Vglut2 神経の投射先にあたる座標の頭蓋骨に小さい穴を開け、その後ガイドカニューレ (plastic one 社)を決めた座標まで移動させ、カニューレの周囲に接着剤 (Loctite 401) を塗り付け、頭蓋骨の上に固定した。その後、ガイドカニューレに異物混入を防ぐために、ダミーカニューレをガイドカニューレに装着した。

使用したカニューレの長さや装着部位の座標は以下のとおりである。

外側中隔核 LS 座標(Bregma から: AP: +0.86 mm, ML: ±0.92 mm, DV: -3.57mm, 角度は 15°) 長さ 4.5mm のガイドカニューレを角度 15°をつけ装着 (図 5-3A, 片側)

外側手網核 LHb 座標(Bregma から: AP: -1.34 mm, ML: -1.03mm, DV: -1.72 mm 角度は 15°) 長さ 2.6mm ガイドカニューレを角度 15°をつけ装着 (図 5-4A, 片側)

背側前核 AD (Bregma から: AP: -0.82 mm, ML: ± 1.49 mm, DV: -1.85 mm)
長さ 2.6mm ガイドカニューレを角度 15°をつけ装着 (図 5-5A, 両側)

手術後、1 匹ずつ別々のケージに入れ、2~3 週間ほど飼育後、他の実験に使用した。

CNO の脳内局所投与と Vglut2 神経の投射先末端の選択的抑制

カニューレを装着したマウスをイソフルランで麻酔し、ダミーカニューレを外した、その後 CNO や食塩水を投与のため、インターナルカニューレ (C315GS-2、2.6mm 用または 4.5mm 用 plastics one 社) を挿入した。シリコンチューブをインターナルカニューレと連結し、もう一方の端はマイクロシリンジポンプにセットしたマイクロシリンジと連結した。その後コントローラーを用いて CNO のインジェクション量と速度を決定し (0.1 mg/ml、200nl、300nl/min)、外側視床下部の Vglut2 神経の投射先において投与を行った (図 5-1BC)。その後、マウスをホームケージにもどし、20 分時間後に行動実験で用いた。

マウス脳の灌流固定・切片作製・免疫組織染色

この実験操作は第 2 章の実験手法の示した通りで実施した。マウスの麻酔はケタミン/キシラジンを使用した (80-100mg/kg)。

LH の Vglut2 神経またはその投射先を可視化するため、Vglut2-hM4Di マウスを灌流固定した。脳を摘出し、50 μ m の厚さで脳の吻側から尾側まで環状切片を作成した。

使用した 2 種類の hM4Di はいずれも赤色蛍光タンパク質である mCherry を発現するため、浮遊法で免疫組織染色を行い、DREADD の発現を確認した。作製した脳切片は PBST で 3 回洗浄後、ブロッッキング溶液 (5% donkey serum を含む PBST) で 1000 倍に希釈した Rat anti-RFP 抗体 (ChromoTek) を用いて 4°C で 1 晩静置した。翌日、PBST で 3 回洗浄し、遮光した状態で 300 倍に希釈した Alexa488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Life tech) と 2 時間反応させた。染色した切片を PBST で 3 回洗浄後、スライドガラスに載せ、その蛍光をスライドスキャナー顕微鏡で直接観察した。

Brief access taste test による CNO 微量投与時の Vglut2^{LH}-hM4Di (LS)、Vglut2^{LH}-hM4Di (LHb)、Vglut2^{LH}-hM4Di (AD) マウスの味嗜好性の評価

Brief access taste test は第 2 章で説明した通りで実施した。

投射先末端にカニューレを装着した Vglut2^{LH}-hM4Di (LS)、Vglut2^{LH}-hM4Di (LHb)、Vglut2^{LH}-hM4Di (AD) マウスでは、Vglut2^{LH}-hM4Di マウスと Vglut2^{LH}-hM3Dq マウス マウスでは、1 つの味溶液につき CNO 投与の有無で二回測定した。各群は 2 グループに分け、図 5-1BC で示したような方法で各投射先末端に saline または CNO の微量投与を行い、ホームケージに戻した。15 分後、一回目の味覚嗜好性テストを行った。翌日、インジェクション

する溶液を逆にして、同様のアッセイを二回目の実験行った。味嗜好の評価は両日のデータを用いて解析した。

逆行性トレーサーRetrobeadsを用いた LH→LS と LH→LHb 細胞の標識

LH→LS と LH→LHb 細胞を標識するため、赤色の Retrobeads (red) と緑色の Retrobeads (green) を用いた。WT マウスの LS に Retrobeads (red)、LHb に Retrobeads (green) を同時にインジェクションした。インジェクションの座標と beads 導入量は以下の通りである(図 5-6B)。

LS: 座標 (AP :+0.86 ML: -0.4 DV: -3.2, 3.5)

インジェクション量 : Retrobeads (red) 150ul 異なる DV の位置で二回インジェクション

LHb: 座標 (AP: -1.34, ML: -0.3, DV: -2.6)

インジェクション量 : Retrobeads (green) 150ul

二週間後、マウスを灌流固定し、LS,LHb,LH 付近の脳切片を作成し、顕微鏡で観察した。

Vglut2^{LH} 神経細胞と LH→LS 投射神経細胞または LH→LHb 投射神経の標識

Vglut2-ires-Cre の LH に AAV-hSyn-DIO-GFP を導入すると同時に、LS または LHb に Retrobeads (red) をインジェクションする。Retrobeads のインジェクションの座標と導入量は逆行性トレーサーRetrobeadsを用いた LH→LS と LH→LHb 細胞の標識の実験と同様です。

二週間後、マウスを灌流固定し、LS,LHb,LH 付近の脳切片を作成し、顕微鏡で観察した。

データの統計処理

図 5-3BC、図 5-4BC、図 5-5BC、図 5-7B ではスチューデントの t 検定により、有意差検定を行った。統計処理は GraphPad Prism 6 ソフトウェアを使用して行った。

5-3 結果

5-3-1 外側視床下部 Vglut2 神経の投射先の探索

AAV-hM4Di-mCherry は神経末端に溜まりやすい性質が持つため、Vglut2-hM4Di マウスの脳切片で外側視床下部の Vglut2 神経の投射先がどの部位に存するかを調べた(図 4-6A)。様々な部位を探索した結果、外側中隔核 LS(Lateral septum)、背側前核 AD (Anterodorsal thalamus)、外側手綱核 (Lateral habenula) LHb に強い投射が見られた(図 5-2B)。

5-3-2 外側視床下部の Vglut2 神経の投射先 (LS、AD、LHb) を選択的に抑制した時の味覚嗜好性・忌避性評価

次に、2-3-5 の実験で観察された投射先の中で、味覚嗜好性・忌避性に関係する部位を調べた。LH の Vglut2 の投射先活動を制御するために、それぞれの投射先でガイドカニューレを装着した Vglut2^{LH}-hM4Di (LS, LHb,AD)マウスを準備した、一か所の投射先部位につき 5 匹を実験で使用した。

CNO を投射先である LS、AD,LHb に局所投与し、投射経路を選択的に抑制した場合 (Stachniak et al., 2014)の味覚嗜好性・忌避性を評価した。興味深いことに、LS に投射する経路の活動を抑制すると、甘味に対する嗜好性の上昇が観察されたが、デナトニウムに対する評価した忌避性の変化が見られなかった(図 5-3BC)。これに対し、LHb に投射する経路の活動を抑制した場合、苦味に対する忌避性が上昇したが、甘味に対する嗜好性に影響を及ぼしていないことが観察された(図 5-4BC)。また、AD を選択的に抑制した場合では、甘味や苦味に対する感受性の変化が観察されなかった(図 5-5BC)。以上の結果より、LH から LS に投射する経路が甘味に対する嗜好性に関係するのに対し、LHb に投射する経路が苦味に対する忌避性に関係することが見出した。

5-3-3 逆行性トレーサーを用いた LH^{Vglut2}→LS と LH^{Vglut2}→LHb 経路の標識

味覚嗜好性テストで、空腹時の甘味嗜好性変化と苦味忌避性変化が外側視床下部の Vglut2 の異なる投射先経路に関係していることが分かった。しかし、LH の同一の Vglut2 神経細胞が 2 ヶ所つの投射先に投射しているのか、または異なる Vglut2 神経が 2 つの投射先に投射しているのかは不明である。そこで、逆行性トレーサーである Retrobeads を用いて、LS と LHb に投射する Vglut2 神経を標識した。RetroBeads は導入した部位の神経細胞終末の外膜タンパクに結合し、細胞体に速やかに逆行輸送される。WT マウスの LS に赤色の Retrobeads(red)、LHb に緑色の Retrobeads(green)を導入した(図 5-6AB)。外側視床下部で Retrobeads を観察した結果、LH でいずれの Retrobeads も見られ、LS と LHb から逆行的に運ばれたことを確認できた(図 5-6C、図 5-7A)。また、Retrobeads (red) 発現細胞、Retrobeads(Green)発現細胞と両方発現する細胞を計数した。興味深いことに、外側視床下部の吻側から尾側 (AP-1.1mm から-1.9mm) において、大半の細胞が単色の Retrobeads のみでラベルされていることが観察され (97.4% ± 0.4%, n = 2 mice)(図 5-7B)、LH の異なる神経細

胞集団が LS と LHb に投射していること示唆された。また、Retrobeads でラベルされた LH の細胞が Vglut2 神経かどうかを検証するため、Cre 依存的に GFP を発現する AAV を用いて Vglut2-ires-Cre マウスの LH の Vglut2 神経を標識した上、LS(図 5-8A)または LHb(図 5-8C)に Retrobeads(red)を導入した結果、GFP で標識された Vglut2 神経の一部で LS(図 5-8B)または LHb(図 5-8D)から逆行で運ばれた Retrobeads 発現と重なっていることが観察された。

5-4 考察

本章では、空腹に伴う味覚嗜好性・忌避性の調節に関わる外側視床下部 Vglut2 神経に着目し、その下流の神経の探索を行った。その結果、LH から味覚嗜好性・忌避性を調節する経路の候補として、LS、LHb、AD への投射を見出した。また、それぞれの部位にカニューレを装着した Vglut2-hM4Di マウスを用いて、CNO の局在投与で投射部位を選択的に抑制した場合の味覚嗜好性・忌避性を評価した結果、LS は甘味嗜好性の上昇、LHb は苦味忌避性の忌避に関連していることが明らかになった。次に、逆行性トレーサーRetrobeads を用いて LH→LS 経路と LH→LHb 経路を標識して観察した結果、別々の神経集団が LS と LHb 味覚嗜好性・忌避性を調節していることが明らかになった。

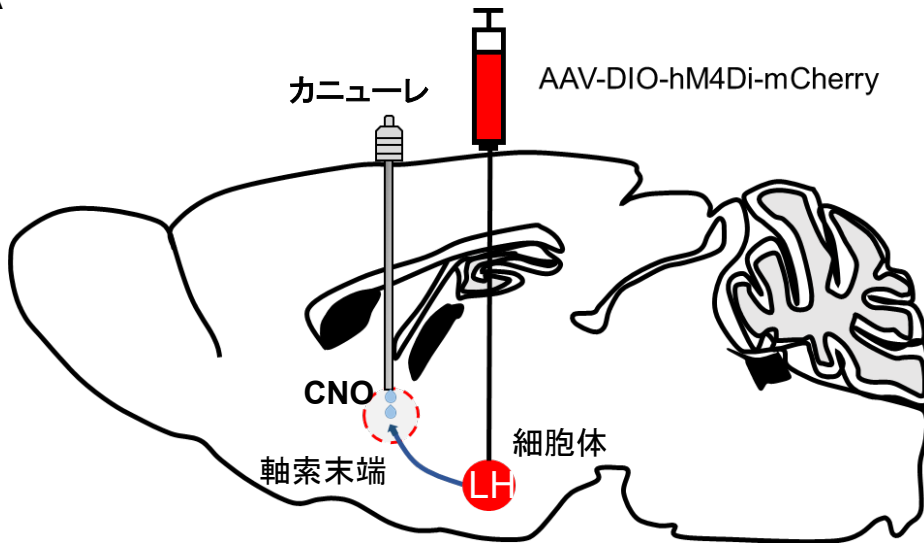
LH^{Vglut2}→LS 経路と LH^{Vglut2}→LHb 経路の活動と味覚嗜好性・忌避性嗜好性の変化

4-3-5 で特定した LS に投射する Vglut2^{LH} 神経活動を選択的に抑制した場合、苦味に対する忌避性の変化が見られず、甘味に対する嗜好性の上昇が観察された。これに対し、LHb に投射する Vglut2^{LH} 神経活動を選択的に抑制した場合、甘味に対する嗜好性の変化が見られず、苦味に対する忌避性の低下が観察された。LS と LHb はともに、好き嫌いの判断や報酬・情動に関わる大脳辺縁系に投射していることが知られている(Luo et al., 2011)。LS の活動が甘味による報酬系への刺激を高めることで甘味物質の摂取のモチベーションを促していると考えられる。また、LHb は嫌悪情報や負のシグナルを伝達していることが多く知られており(Matsumoto and Hikosaka, 2007)、この部位の活動が忌避性の味の回避行動と関係している可能性が示唆された。

LH における Vglut2^{LHA}→LS と Vglut2^{LHA}→LHb 神経の局在

2 色の逆行性トレーサーRetrobeads を LS(red) と LHb(green)に導入し、LH におけるを標識した結果、両者を共発現する細胞はほとんどなかった。その結果から、LS と LHb に投射する Vglut2 神経細胞は別々神経集団であることが示唆された。電気生理学的解析によって味刺激時のマウスの LH の神経では、嗜好性の味に応答する神経細胞と忌避性の味に応答する神経細胞が別々で存在することが分かっている(Li et al., 2013)。したがって、本研究で示した LH を起点とした甘味嗜好性に関連する経路と苦味忌避性に関連する経路は LH の別々の神経集団によって制御されていることが示唆された。

A



B

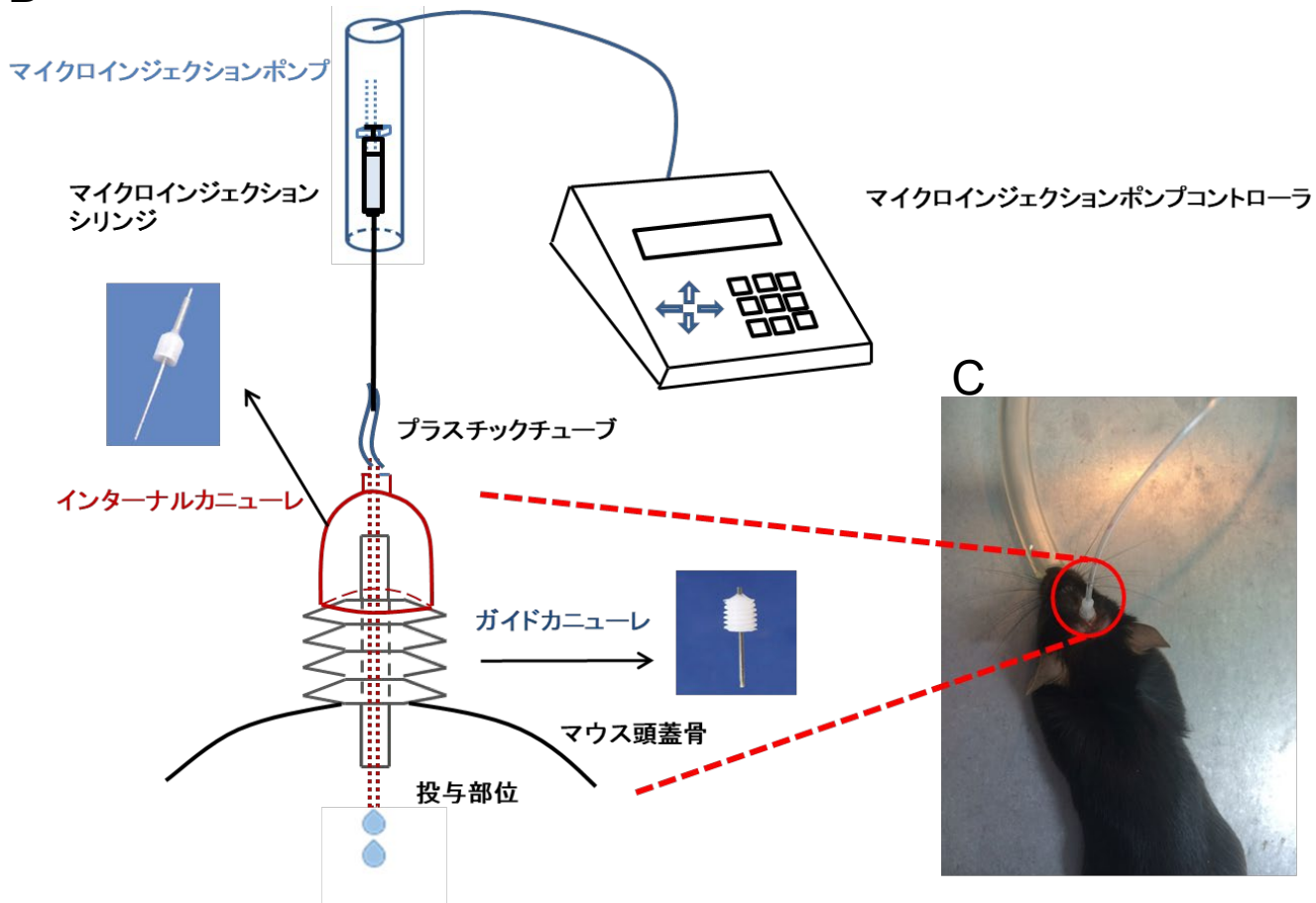


図5-1 抑制性DREADDを用いた投射先末端の神経活動の抑制

(A) hM4Diを導入した神経の投射先末端活動抑制の模式図

(B) カニューレによるCNOの微量投与

(C) マウスの脳内にマイクロインジェクションの様子。使用したCNOのインジェクション量とスピード: 150 μ l, 300 nl/min

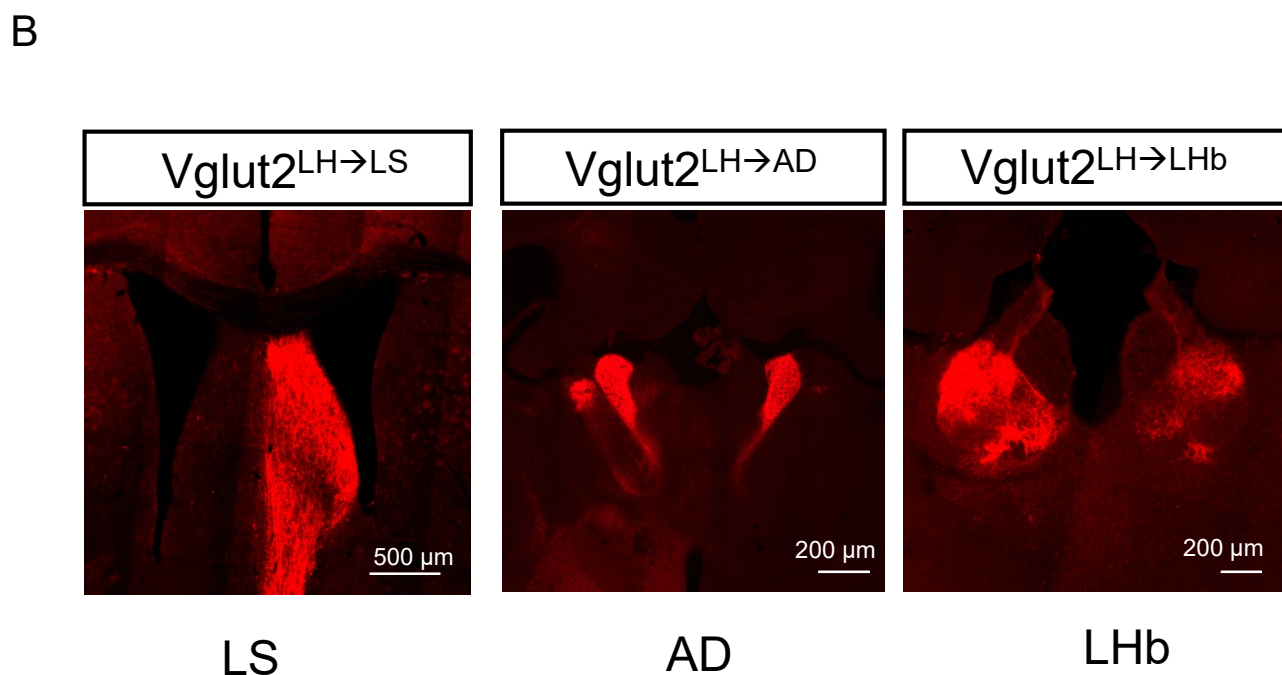
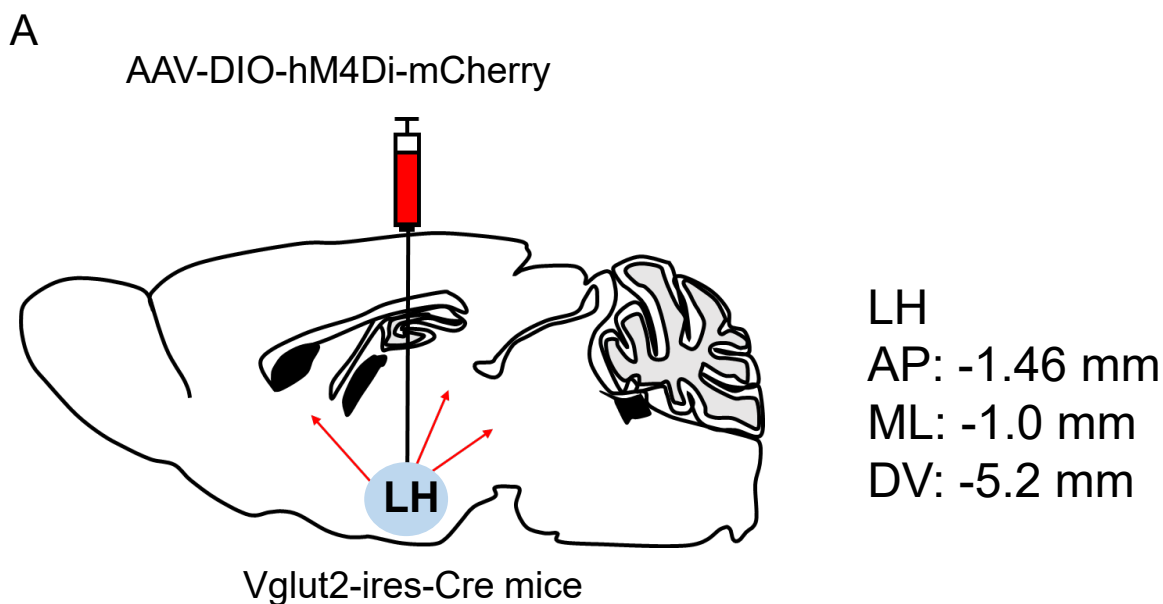


図5-2 外側視床下部Vglut2神経の投射先の可視化
(A)AAV-hM4Diを使用したLHのVglut2神経の視床下部投射先標識の模式図
(B)外側中隔核(LS)、背側前核(AD)、外側手網核(LHb)におけるmCherryの発現

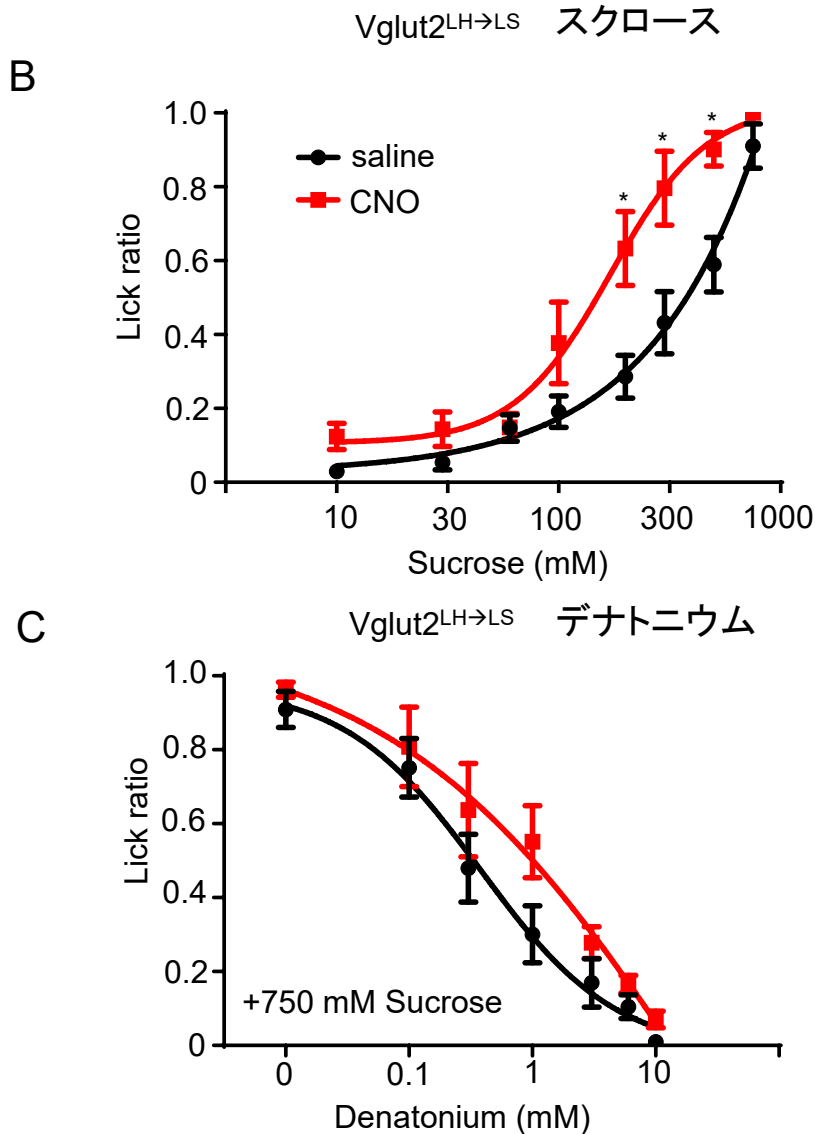
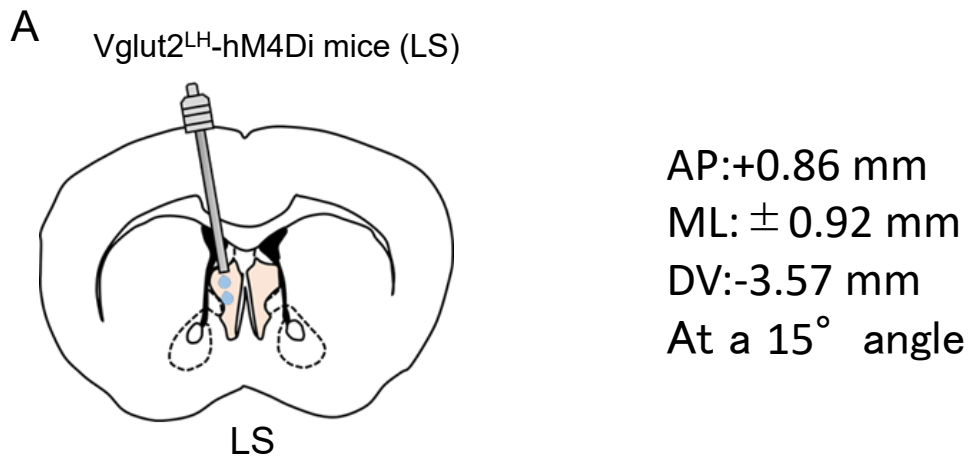


図5-3 Vglut2^{LH→LS}経路を選択的に抑制した場合の味覚嗜好性・忌避性評価

(A) LSにおけるカニューレ設置の模式図

(B) LSにCNOを微量投与時のスクロースに対するBrief access test結果

(C) LSにCNOを微量投与時のデナトニウムに対するBrief access test結果

データは平均±SEで示す (n=5)。*p<0.05対応するCNO投与時との食塩水投与時の比較 (スチューデントのt検定)

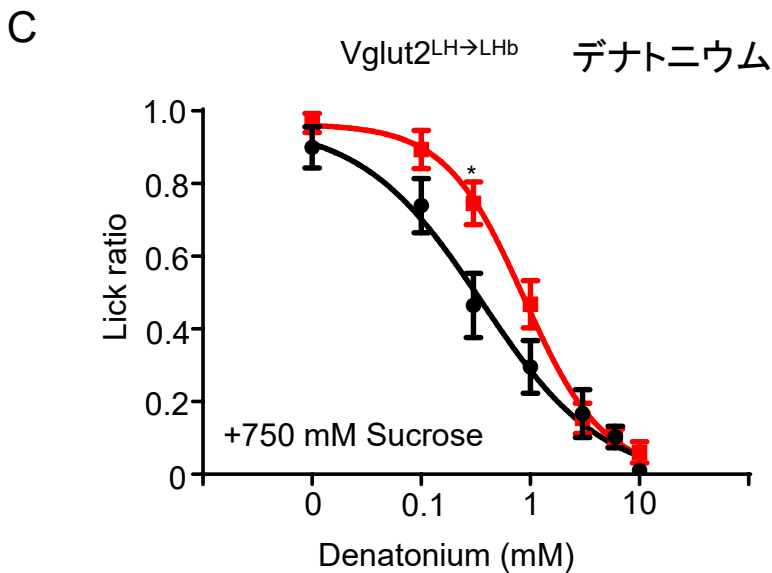
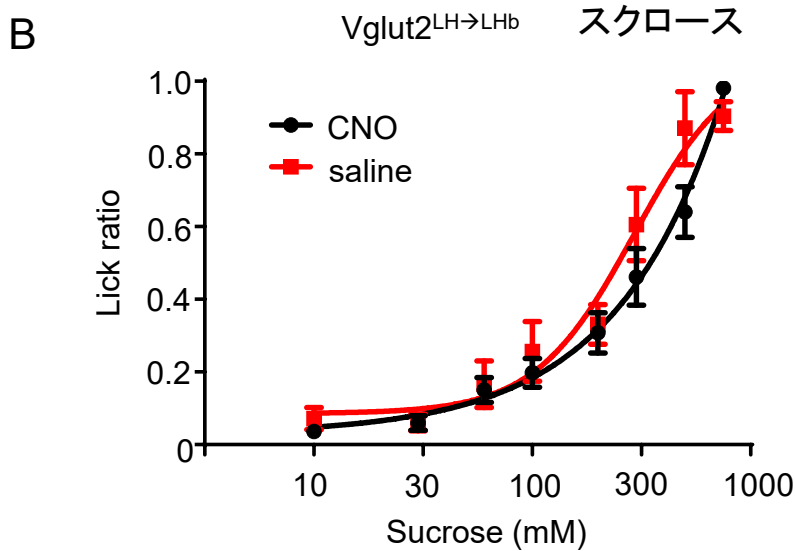
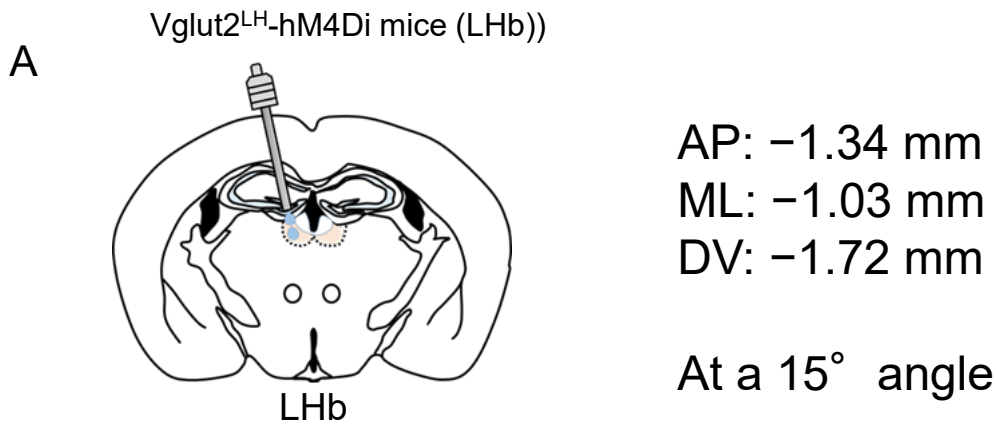


図5-4 Vglut2^{LHA→LHb}経路を選択的に抑制した場合の味覚嗜好性・忌避性評価

(A) LHbにおけるカニューレ設置の模式図

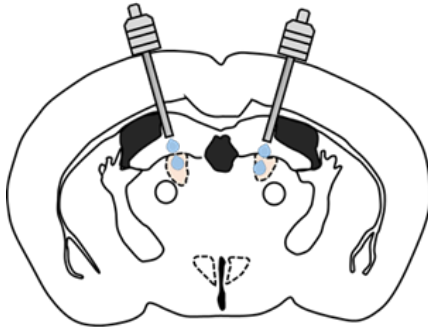
(B) LHbにCNOを微量投与時のスクロースに対するBrief access test結果

(C) LHbにCNOを微量投与時のデナトニウムに対するBrief access test結果

データは平均±SEで示す (n=5)。*p<0.05対応するCNO投与時との食塩水投与時の比較 (スチューデントのt検定)

A

Vglut2^{LH}-hM4Di mice (AD)



AP: -0.82 mm
ML: ± 1.49 mm
DV: -1.85 mm

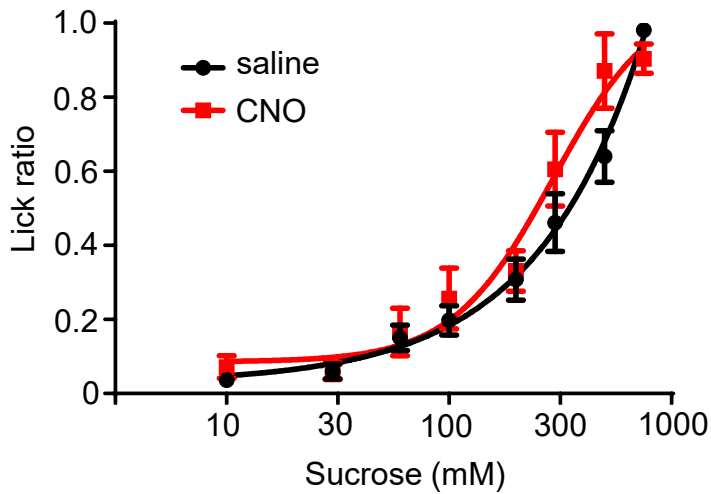
At a 15° angle

B

AD

Vglut2^{LH}→AD

スクロース



C

Vglut2^{LH}→AD

デナトニウム

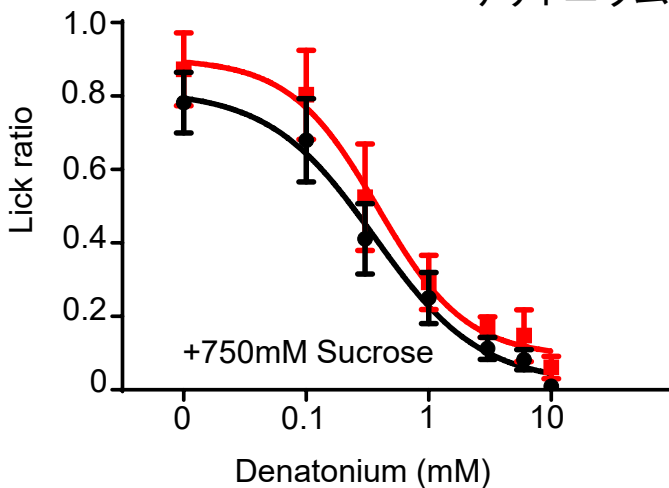


図5-5 Vglut2^{LHA}→AD 経路を選択的に抑制した場合の味覚嗜好性・忌避性評価

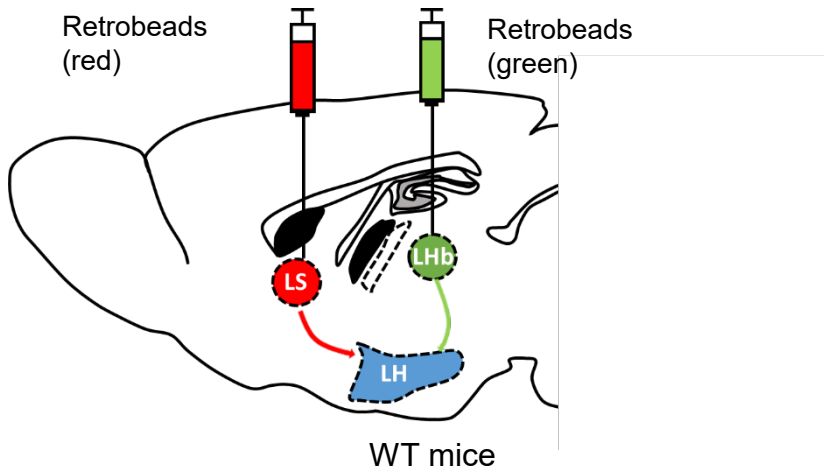
(A) ADにおけるカニューレ設置の模式図

(B) ADにCNOを微量投与時のスクロースに対するBrief access test結果

(C) ADにCNOを微量投与時のデナトニウムに対するBrief access test結果

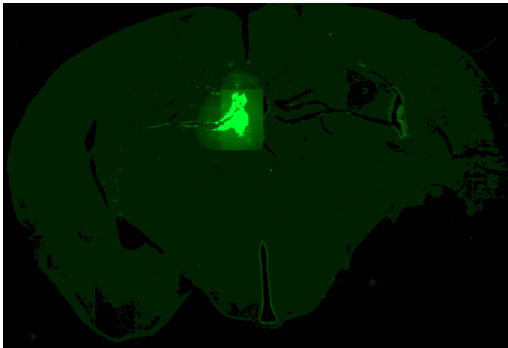
データは平均±SEで示す(n=5)。

A

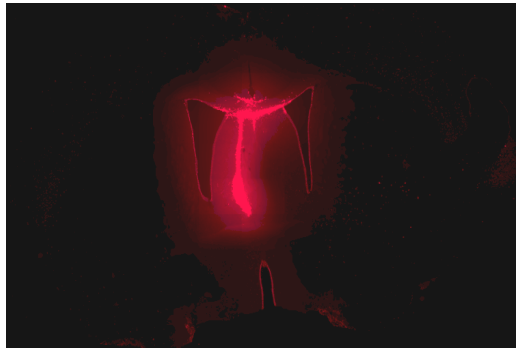


B

LHb (Green Beads)



LS (Red Beads)



C

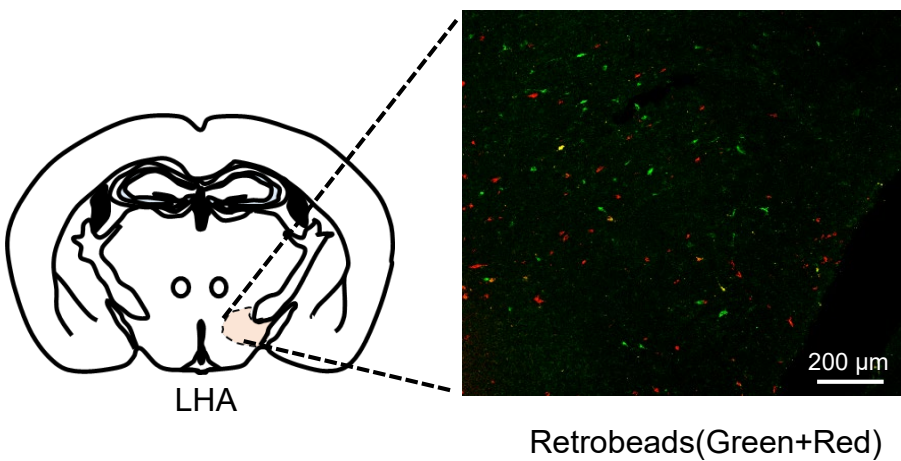
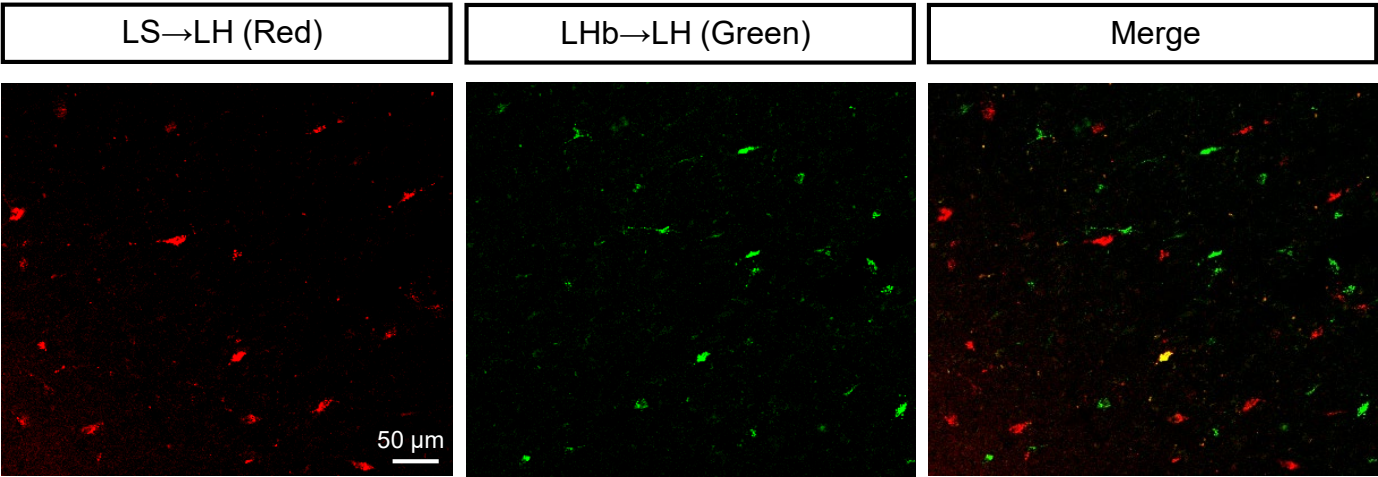


図5-6 逆行性トレーサーを用いたLH→LSとLH→LHb経路の標識
 (A)LSとLHbにおけるRetroBeads injectionの模式図
 (B)LS(赤)とLHb(緑)で導入したRetrobeadsの発現
 (C)LHにおける二種類のRetrobeadsの局在

A



B

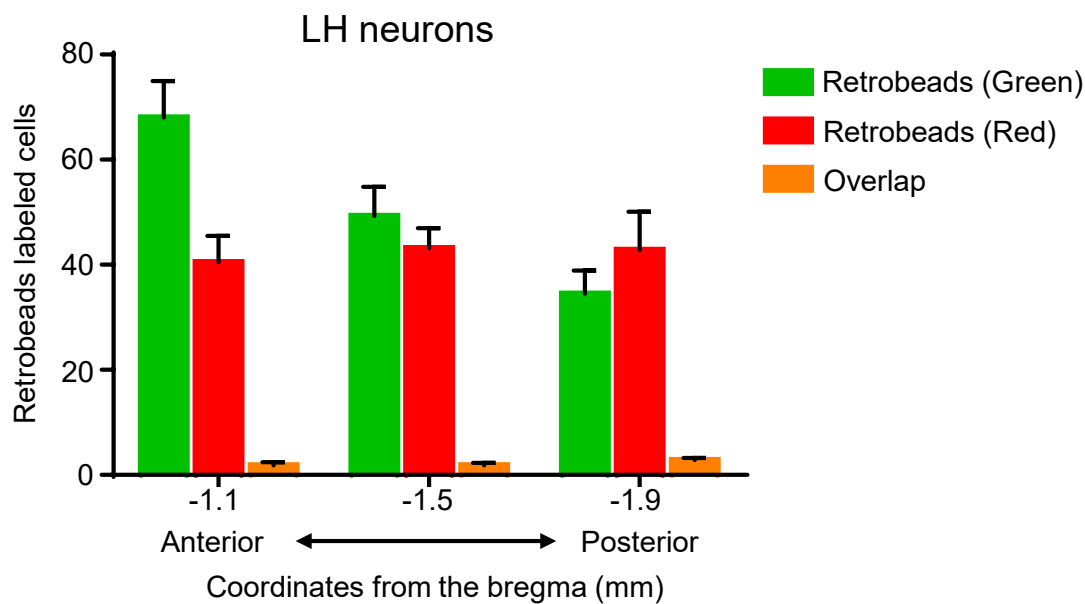
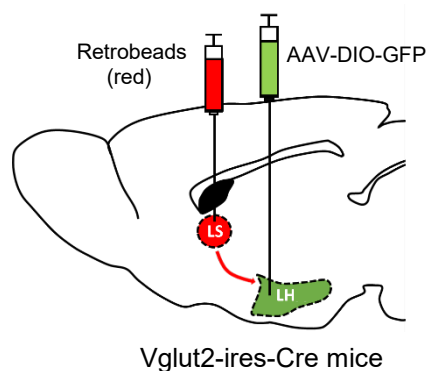


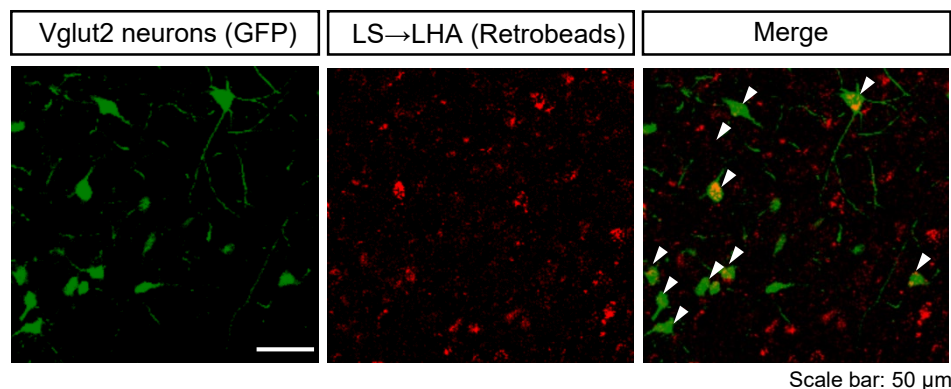
図5-7 LHのLS、LHb投射神経細胞の局在
(A)LH部分におけるRetrobeads(red)とRetrobeads(green)の発現(拡大画像)
(B)視床下部の吻側から尾側のRetrobeads(red)発現細胞と
Retrobeads(green)発現細胞の細胞計数

データは平均±SEで示す。各座標で(-1.1 mm, -1.5 mm, -1.9 mm)
二匹のマウスからデータを計数した

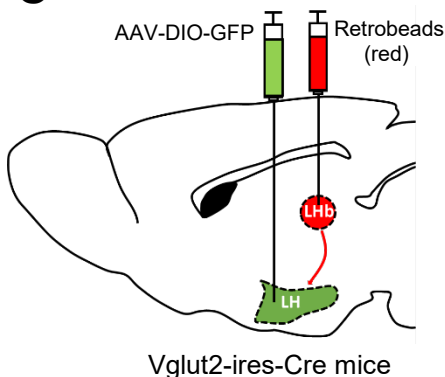
A



B



C



D

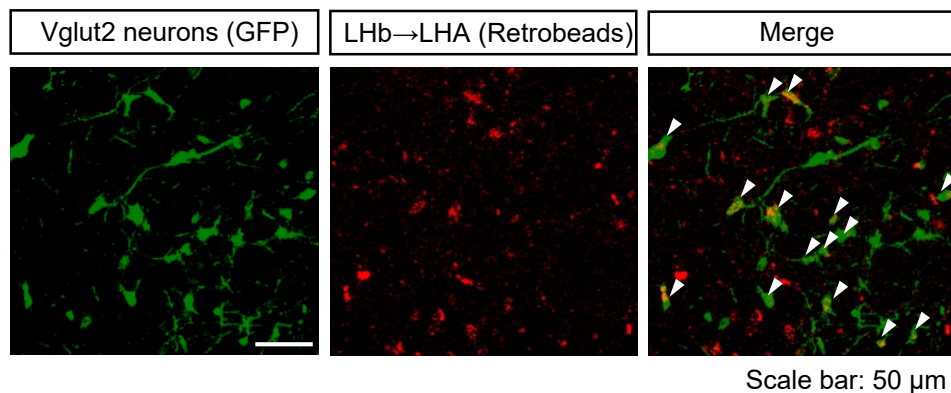


図5-8 Retrobeadsを用いたLH→LSとLH→LHb投射神経細胞とVglut2^{LH}神経の共局在

- (A) LH→LS神経細胞とVglut2^{LH}神経細胞の標識の模式図
- (B) LHで観察されたLH→LS神経細胞とVglut2^{LH}神経細胞の比較
- (C) LH→LHb神経細胞とVglut2^{LH}神経細胞の標識の模式図
- (D) LHで観察されたLH→LHb神経細胞とVglut2^{LH}神経細胞の比較

総合討論

総合討論

味覚は摂食行動の実行・中止を決定づける感覚情報で、生体恒常性を維持する様々な場面で重要な役割を果たしている。本研究では、空腹をモデルとして生理状態の違いが食物選択や味嗜好性の変化に与える影響を明らかにすることを目的とした。化学遺伝学と光遺伝学を用いて、視床下部の AgRP 神経および Vglut2 神経の活動が味覚嗜好性に与える影響を検証することで、AgRP 神経を起点として外側視床下部からの 2 種類の経路が空腹誘導性の嗜好味・忌避味受容の調節に重要であることを見出した(図 6-1)。

本章では、栄養状態に応じた脳内の味嗜好性・忌避性調節機構の考察や、今後の課題や将来展望を述べる。

<空腹・満腹状態に応じた食物に関する感覚情報の認知と行動>

飢餓は、動機づけ行動の代表の一つとして知られている。動機づけ行動は、感情とモチベーションが深く関わっていると考えられる。空腹感は負の感情であり、動物はこの感覚を解消するために食物探索行動や摂食行動を実行する。また、末梢の感覚器で受け取った感覚情報は、報酬などの情報を伴い、生理状態に応じて適切な行動の選択や実行と強く関連する。

ヒトの脳イメージング研究では、味覚野である島皮質(Insular cortex, InsCtx) (Frank et al., 2013)や眼窩前頭皮質 (OFC) (O'Doherty et al., 2000)について、食べ物に対する渴望など意識的な欲望との関連性が示唆されている。例えば、チョコレートを満腹になるまで食べると、味覚野における食物感覚応答が低下する。最近報告された自由行動のマウスの島皮質の活動をカルシウムイメージングにより計測した研究では、満腹時には食物の視覚情報に対する応答が低いのに対し、空腹になると、食物を見た時の神経応答が大幅に上昇する。また、空腹を誘引する AgRP 神経を人工的に活性化すると、島皮質において空腹時と類似の食物の視覚情報応答の上昇が観察された。さらに、神経接続のトレーシング実験によって、AgRP 神経は PVT、BLA を介し、最終的に InsCtx の食関連視覚情報の価値を評価していることが示唆された(Livneh et al., 2017)。このように、食物に関連する視覚情報の価値の認知は、栄養状態によって修飾されている。

本研究で着目した味覚情報も、視覚情報と同様に、摂食行動の継続・中止にとって重要な感覚情報であり、空腹・満腹状態の違いによって味覚認知・価値評価の修飾が行なわれていることが推測される。空腹時には、砂糖のような栄養価の高い食物への感受性が上昇することが多くの動物種から報告された(Loeffel, 1977; Kawai et al., 2000; Gillette et al., 2000; Sengupta, 2013)。例えば、絶食したジョウジョウバエは甘味に対する感度が上昇することが報告され、その原因は味刺激時のドーパミンの放出が味覚応答神経の活動を上昇させたことが推測された(Marella et al., 2012)。一方、ジョウジョウバエでの空腹時の甘味感度の上昇とは別のメカニズムで、sNPF 神経の活動が空腹時の苦味に対する感度を低下させることが明らかになった(Inagaki et al., 2014)。

本研究では、マウスの摂食神経回路の起点である AgRP 神経を選択的に活性化し、人工空

腹状態で甘味の嗜好性と苦味の忌避性を評価した結果、甘味に対する嗜好性の上昇と苦味に対する忌避性の低下が観察された。マウスモデルでは、AgRP 神経が生理状態に応じて、味覚の嗜好と忌避を調節し、摂食行動を制御することを見出した。AgRP 神経の活性化は食物に関する視覚や味覚など様々な感覚情報に対する価値評価を修飾することによって空腹時の味覚嗜好・忌避性を調節している可能性が示唆された。このような栄養不足時の適応行動は、生命が生き延びるために必須な生存戦略の脳回路として保存されていると考えられる。

<外側視床下部 LH と摂食・報酬・味覚嗜好>

AgRP 神経の中で、別々の神経集団が異なる脳領域に投射することが知られている。本研究では光遺伝学を用いて PVH や LH などの部位の活動を選択的に活性化すると、LH の末端を活性化したのみ甘味嗜好性と苦味忌避性の変化が観察された、また、LH の Vglut2 神経の活動を調節した場合の味覚嗜好・忌避性を評価すると、AgRP 神経の活性化と類似の味覚嗜好・忌避性の変化が生じた。したがって、LH における AgRP 神経の下流の Vglut2 神経が味覚の嗜好・忌避の調節に関係していることが分かった。

LH は摂食や動機付け行動に関係していることが知られている。LH を電気刺激すると、満腹のマウスであっても摂食や飲水行動が誘引される(Delgado and Anand, 1952)。また、LH にはグルタミン酸作動性神経の他にも異なる分子特性を有する神経集団が存在する。光遺伝学で LH における GABA 作動性神経である Vgat 神経を活性化すると、強烈な摂食亢進と自己刺激行動(self-stimulation behavior)が観察された(Jennings et al., 2013)。これに対し、グルタミン酸作動性神経 Vglut2 を活性化すると、空腹状態のマウスであっても食欲が抑制されるうえ、また、LH の神経はドーパミン放出に関わる大脳辺縁系の VTA (腹側被蓋野) や LHb に投射していることが知られている(Stamatakis et al., 2016)。最近の研究では、LH の Vglut2 神経と Vgat 神経の一部が中脳辺縁系の VTA の GABA 神経とドーパミン神経に接続していることが示された(Nieh et al., 2015)。

LH は摂食中枢神経 AgRP から抑制性の入力を受けることや、辺縁系に投射される他、味覚神経系にも相互投射をしていることが知られている。特に、味覚情報や好き嫌いの価値評価の味覚野 OFC から情報を受け取っている(Hirose et al., 2016) (図 6-2)。サルを用いた実験で(Rolls et al., 1986; Rolls et al., 1989)は、空腹時にグルコースを提示し、満腹になるまで継続的に摂取した時の OFC、InsCtx、LH の味覚応答を電気生理で測定すると、満腹状態になるにつれて、OFC、InsCtx、LH における甘味応答が徐々に低下する。マウスでリックテストを用いた測定系では、スクロース溶液を自発的に飲ませ (5 秒間リックするとチャンバーの窓が閉める、2 秒後で再アクセスできる)、最初の空腹時、スクロース摂取後の満腹時、または満腹から回復した空腹の三つの生理状態時の Amygdala、OFC、InsCtxLH 神経活動を測定した結果、いずれの部位でも満腹時と空腹時の味覚応答強度の変化が観察された(de Araujo et al., 2006)。別のグループで LH における五基本味に対する応答を測定した研究では、嗜好

性の味に応答する神経細胞と忌避性の味に応答する神経細胞が別々の神経集団に所属し、異なる神経発火パターンを示していることが知られている(Li et al., 2013)。

これらの知見と本研究の結果を照らしあわせて考えると、OFC から LH に伝達される味情報が、報酬や情動に関係する辺縁系を介し、味溶液に対するモチベーションを調節していることが推測される。また、LH から味覚伝達経路の PBN に投射し、味刺激をした時の LH→PBN の c-fos 発現が変化することが知られている(Tokita et al., 2014)ことから、空腹時の LH 神経活動変化が PBN での味情報の伝達を修飾し、味に対する閾値や感度を変化される可能性も考えられる (図 6-2)。

第 2 章から第 4 章の実験で、食物の味覚による価値評価は、空腹・満腹などの生理状態に強く影響をうけ、動機付け行動に結びつくと考えられる。また、食べ物のおいしさや価値によって、摂食行動も影響される。空腹時の味覚の嗜好性・忌避性変化の要因として、脳が常に生理状態に応じて食べ物の価値を評価しているのではないかと考えている。

<外側中隔核 LS・外側手網核 LHb と大脳辺縁系と味覚嗜好・忌避性の関連>

電気生理学手法を使用して味覚刺激時の LH 神経活動を測定した実験では、嗜好性の味と忌避性の味に応答する二つの神経集団が分かれていることが示唆されている。しかし、それらの神経集団がどのような経路を介し、味覚嗜好・忌避性を調節しているのが不明であった。本研究の第 5 章では、外側視床下部 LH の Vglut2 神経投射先である外側中隔核 LS と外側手網核 LHb を別々に、選択的に抑制した場合、甘味に対する嗜好性の上昇は LS 抑制時のみで観察され、一方、苦味に対する忌避性の低下は LHb を抑制した時のみで観察された。また、トレーシングの結果によって LH の異なる神経集団が LS、LHb に投射していることが見出した。LS と LHb は辺縁系のドーパミン作動性神経系やセロトニン作動性神経系の一部で(Sheehan et al., 2004; Lammel et al., 2012; Poller et al., 2013)、報酬やモチベーションに関係することが示唆されている(図 6-3)。

・外側中隔核

LS の活動は情動や感情に関係していることが知られている。この部位は海馬、扁桃体や視床下部に繋がって、感情を制御していると考えている。また、LS は大脳辺縁のドーパミンシステムの腹側被蓋野(VTA)に投射していることが知られ、報酬系の活動を調節し、線条体の活動を上昇させることが示唆された(Cornwall et al., 1990; Luo et al., 2011)。また、脳幹の縫線核からセロトニン作動性ニューロンの入力があり(Risold and Swanson, 1997)、自律神経機能や情動の形成に深く関わっていると思われる。LS は、情動や動機づけ行動を直接誘引することではなく、感覚情報や価値評価を統合し、動機付けに関係する視床下部や中脳報酬系に伝達することによって、環境に適応した行動の実行を制御している。

AgRP 神経は抑制性の GABA 作動性神経で、投射先の神経活動を抑制することが知られ

ている。AgRP 神経を除去したマウスは、AgRP 神経からの抑制がかからないことによって、直接投射している PVH や PBN 部位で c-fos の発現が有意に上昇することが観察された。興味深いことに、LS における C-fos の発現も上昇した(Wu et al., 2009)。したがって、LS は LH を介し、AgRP 神経から間接的に入力を受けていることが推測される。

以上の考察から、LH の Vglut2 神経が AgRP 神経から抑制性入力を受け、LS に投射し、空腹時の甘味報酬情報の増強をすることによって甘味に対する嗜好性を調節していると考えられる。

・外側手綱核について

手綱核と呼ばれる脳部位は魚から人間まで脊椎動物に共通して存在している。哺乳類では手綱核はさらに外側と内側手綱核の二つの領域に分けられ、このうち外側手綱核は辺縁系のセロトニンやドーパミン神経細胞の活動を制御することで運動や認知行動を制御する重要な領域であることがわかってきている。

LHb は嫌悪情報や嫌な感情を伝達し、目標指向行動に関係することが多く知られており。ゼブラフィッシュにおいては、手綱核からの情報を遮断すると、危険を回避する学習ができなくなる。一方、光遺伝を用いて手綱核を人為的に活性化させると、危険を予測しているかのような回避行動が誘導された。また、魚類からほ乳類まで進化的に保存されている手綱核は、気分などに関わる脳内神経伝達物質のセロトニンを分泌する脳幹にある縫線核 (Raphé nucleus) という領域の活動を調節しており、危険予測値の情報がセロトニンによって伝わることも明らかになった(Amo et al., 2014)。マウスは、嫌いな刺激として知られている足の電気刺激を行うと、LHb の神経が応答し、回避行動が誘導されることが知られている。しかし、薬理遺伝学で Vglut2^{LH} マウスの LHb 投射末端の活動を抑制すると、電気刺激による回避行動は消失する(Lecca et al., 2017)。また、Vglut2^{LH} マウスの LHb 投射末端の活動を抑制すると摂食行動が誘引されることも報告されており、この部位は摂食にも影響を及ぼしていることが示唆された(Stamatakis et al., 2016)。本研究の味覚忌避性の評価で使用した苦味溶液デナトニウムは、嫌悪刺激の一種だと考えられる、したがって、LH から LHb の経路を抑制することで、嫌悪刺激に対する応答が低下され、その結果、空腹時では苦味溶液による嫌悪情報の応答が緩和することによって回避行動を実行せず、苦味溶液を摂取することが可能になったのではないかと推測される。

末梢での味物質の検出と脳内の味覚伝達経路はよく研究されているが、味覚神経系と大脳報酬系や辺縁系との繋がりに関する知見は少ない。今回示した大脳辺縁系の LS、LHb といった部位は、外側視床下部から味覚や価値判断の情報を受け取って、味に対する摂取や回避の行動段階の神経回路につなげていることが考えられ、味覚認知と摂食行動の開始・停止の関係をさらに解明するために有用であると期待される。

<本研究の課題と展望>

本研究では、空腹時または AgRP 神経活動を操作した人工空腹状態で、甘味に対する嗜好性が上昇したことが明らかになった。スクロースには、味覚の情報に加え、カロリーの情報も含まれている。それらの情報が脳内で受け取られ、環境や生理状態に応じた行動が行われる。本研究では外側視床下部に投射する AgRP 神経の経路が空腹時の味覚の嗜好性・忌避性を変化されることを見出した。今後の実験課題や計画について述べる。

空腹時に生じた甘味味覚嗜好性の変化と甘味感度について

空腹時の甘味嗜好性の高まる原因を時間軸に沿って考察すると、以下の二つの可能性が考えられる。一つ目として、外側視床下部 LH は味覚伝達経路の中継点である PBN に投射し、OFC や InsCtx などの大脳皮質で味覚が認知される前の段階で味覚情報を修飾し、甘味に対する応答や閾値が変化している可能性である。もう一つの可能性として、空腹時、AgRP 神経が活性化すると、LH において AgRP 神経の活動上昇と InsCtx や OFC からの神経入力統合され、その後、大脳辺縁系を介して甘味摂取のモチベーションを調節している可能性である (図 6-2)。

本研究で使用した味覚嗜好性テスト (brief access taste test) は 10 秒間という短期間の味覚嗜好を評価しているため、post ingestion による栄養情報の影響は軽減されている。しかし、味覚嗜好性テストでは、甘味物質の味覚情報と報酬情報を独立して解析することは困難である。そこで、今後は以下の二つの実験方法で空腹時の甘味嗜好性の変化が閾値の変化によるものか、モチベーションの高まりによるものかを検証することを考えている。

1. 条件付け味覚嫌悪学習 (conditional taste aversion) と連携した味覚嗜好性テスト

味覚嫌悪学習 (CTA) は古典的 condition 付け学習の一つで、動物 (人間を含む) が飲食物を摂取した後に、腹痛、吐き気、嘔吐などの不快な経験を体験するとその飲食物に嫌悪を覚え、拒絶する現象である (Garcia et al., 1955)。スクロースを提示し、野生型のマウスに味覚嫌悪学習を覚えさせ、空腹時低濃度から高濃度で味溶液を提示し、マウスがリック行動を停止する濃度によりスクロースの味覚閾値を示すことができる。このような実験設計では、スクロースの報酬情報を排除した前提で、味覚の感度を単独で評価することが可能になる (Gaillard and Stratford, 2016)。さらに、光遺伝学を用い、LH に投射する AgRP 神経活動を調節し、AgRP 神経活動が甘味検出の閾値に影響を及ぼしているかを評価できると考えている。

2. 神経活動の脳イメージング手法を用いた空腹時と満腹時の味覚野の味覚応答の測定

行動実験で空腹時と満腹時の味覚野における甘味応答の閾値を評価する他、in vivo calcium imaging や Fiber photometry など最新の神経科学技術を用いて味覚野の甘味刺激による Ca^{2+} 濃度を測定し、空腹と満腹時での応答を比較する試みも考えられる。最近の研究では、第一次味覚野の島皮質では、苦味によく応答する Bitter cortex と甘味によく応答する

Sweet cortex が存在することが提唱された(Peng et al., 2015)。Sweet cortex にカルシウムインジケーターである GCaMP を発現させることによって、空腹時と満腹時の味覚野の神経応答を定量的に評価することが期待できる。

経シナプストレーサーを用いた外側視床下部に投射する AgRP 神経の二次神経の分子特性の検証

第4章では AgRP の免疫染色により、外側視床下部の AgRP 神経末端が Vglut2 神経に近接していることが観察され、また、行動実験で Vglut2 神経を操作した時に味覚嗜好性を評価した場合、AgRP 神経活性化時の甘味嗜好性・苦味忌避性の変化が再現されたことから、外側視床下部における AgRP 神経の下流が Vglut2 神経である可能性が示唆された。残念ながら、AgRP 抗体では外側視床下部に投射している軸索末端を標識できるが、二次神経の細胞体を可視化できない。つまり、AgRP 神経と Vglut2 神経がシナプス結合をしているかどうかについてはまだ証明されていない。そこで、AgRP 神経と LH の Vglut2 神経のシナプス結合を検証するため、変異型の狂犬病ウイルス (rabies virus) を用いた経シナプストレーシングが考えられる。

変異型の狂犬病ウイルスは、標的の細胞から一段階だけ(monosynaptic tracing)上流の前シナプス細胞を特異的に標識することができるツールである(Miyamichi et al., 2011; Callaway and Luo, 2015)。この手法ではウイルスを導入した出発点となる細胞から逆行性で一段階前のシナプスのみに移動する。

本研究で使用する場合、まず、Vglut2-ires-Cre マウスの LH に AAV-TVA-mCherry と AAV-RG を同時に導入させると、TVA と RG が LH に発現する。次に、LH で変異型の狂犬病ウイルス (SADΔ-EGFP) でのインジェクションを行うことで、LH の細胞からシナプスを超えて一段階前のシナプスのみに移動すると予想される。AgRP 抗体で免疫染色を実施し、弓状核で狂犬病ウイルスの発現細胞と AgRP 神経細胞の共局在を調べることを期待できる(図 6-4A)。

また、LH の Vgat 神経も摂食行動や食欲に対する報酬価値の情報が伝達していることから、GABA 作動性神経の活動が味覚の嗜好・忌避性に与える影響についても調べる必要がある。

Fiber photometry を用いた外側視床下部 LH の甘味応答神経と苦味応答神経活動の単独イメージング

LH における五基本味に対する応答を測定した研究では、嗜好性の味に応答する神経細胞と忌避性の味に応答する細胞が別々の神経集団に所属し、異なる神経発火パターンを示していることが知られている(Li et al., 2013)。本研究で解明された LH から LS に投射する神経は甘味のみに応答すること、また LH から LHb に投射する神経は苦味のみに応答することが推測される。それを検証するため、脳深部領域の視野内すべての細胞の蛍光強度の平均を

数値化したファイバーフォトメトリー法(Fiberphotometry)が考えられる。

ファイバーフォトメトリーは *in-vivo* で脳内の蛍光測定を行うためのシステムで、カルシウムセンサーである GCaMP6 を目的の神経に導入し、ダイクロイックミラーとフィルタセットを内蔵した蛍光測定用キューブを用いることで、光ファイバーを経由して励起光を脳内に照射して蛍光を測定することができる(Gunaydin et al., 2014)。そのため、逆行性の性質を持つタイプの AAV retro ウイルスを用いて Cre 依存的に GCaMP6 を LH に発現させ、LH から LS または LHb に投射する Vglut2 神経活動を経路特異的に測定することができる。これによって、LH→LS、LH→LHb 経路特異的に嗜好性・忌避性の味覚応答が観察されれば、これらの部位は味覚の調節に重要であることが検証できる。さらに、生理状態によってこれらの部位の味覚応答の変化を検証することも期待される(図 6-4B)。

脳が栄養状態に応じて味嗜好性・忌避性を制御する仕組みを解明することは、生体恒常性維持における味覚の役割の理解を深め、食品科学分野に新たな学問領域を拡げることが期待される成果であると結論付けることができる。

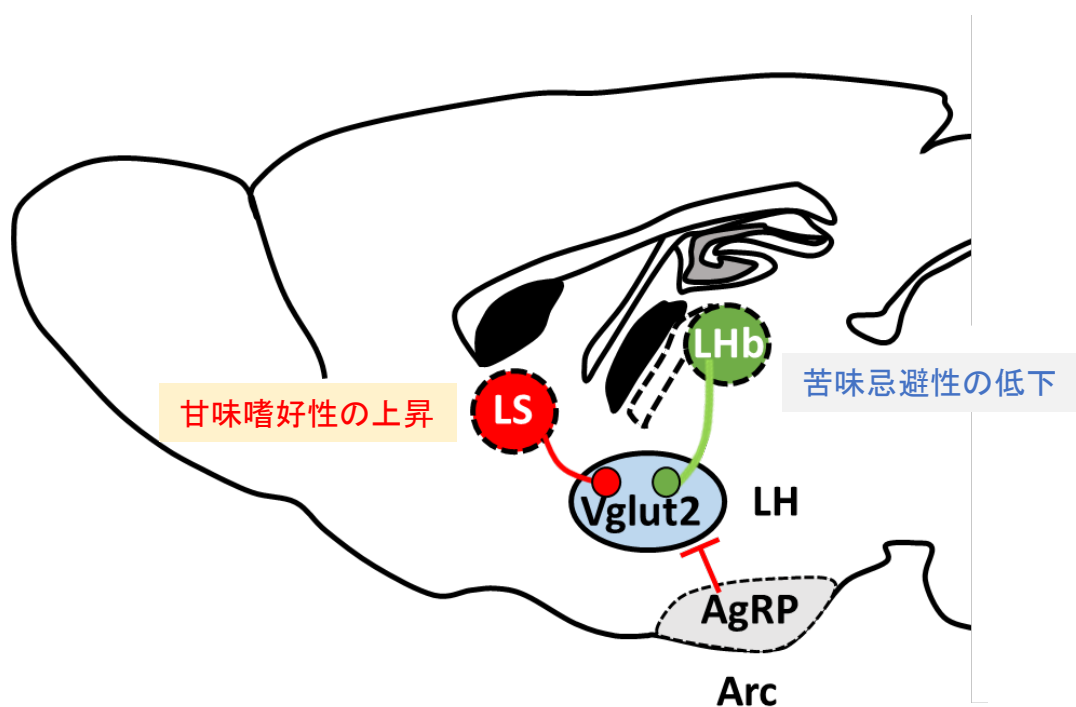


図6-1本研究で解明された空腹に伴う味覚嗜好・忌避性の調節を担う視床下部神経回路

空腹時、弓状核のAgRP神経が活性化、異なる集団の外側視床下部のVglut2神経を抑制ことによって甘味の嗜好性と苦味の忌避性を調節していることが明らかになった。

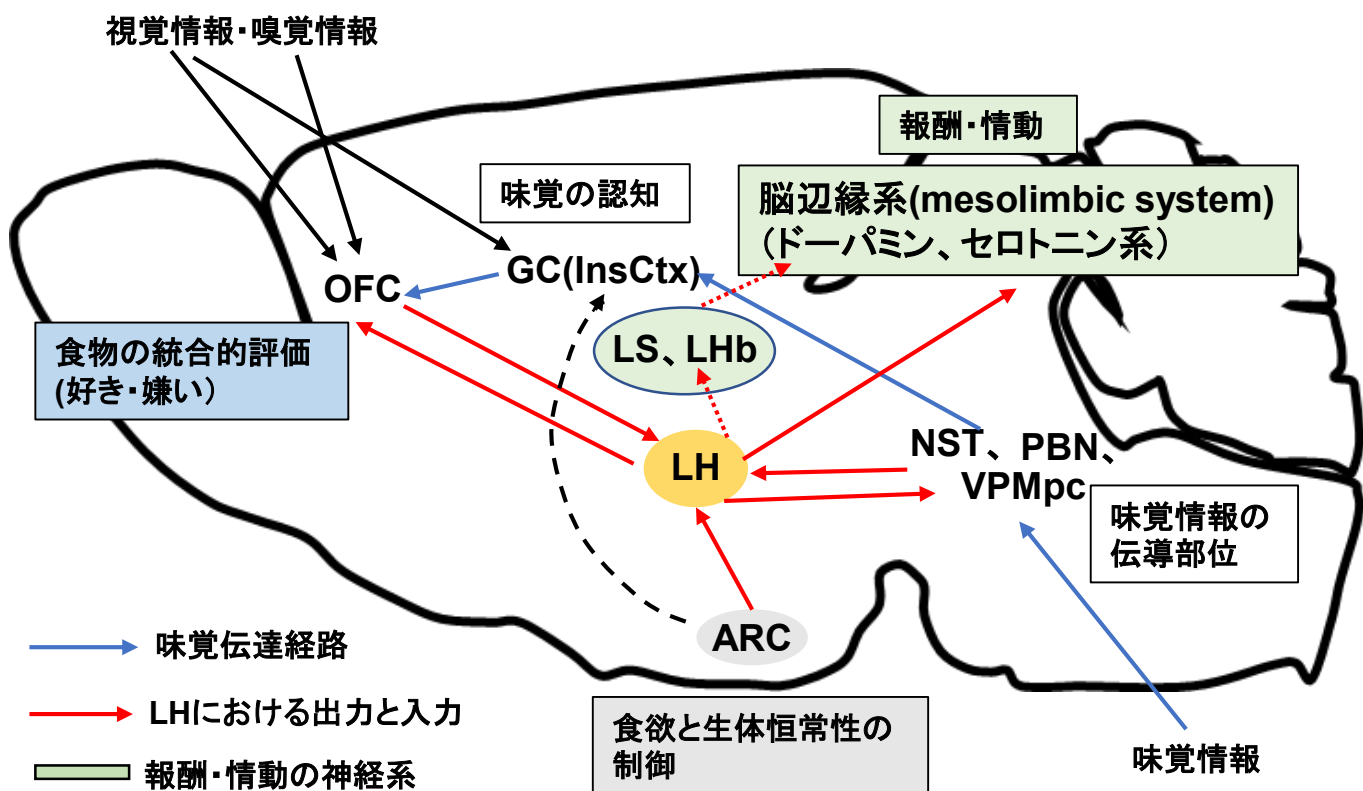


図6-2 外側視床下部LHにおける味覚神経系、摂食神経系、辺縁系の入力・出力

外側視床下部は摂食中枢神経AgRPから抑制の入力性を受ける以外に、味覚情報や好き嫌いの価値評価を行う味覚野から入力も受けるその情報ういことや味覚伝達経路のPBNに投射する。また、視床下部LHは直接、間接的な経路を介し大脳辺縁系に投射され、ドーパミン作動神経系やセロトニン作動神経系に影響を及ぼしている。

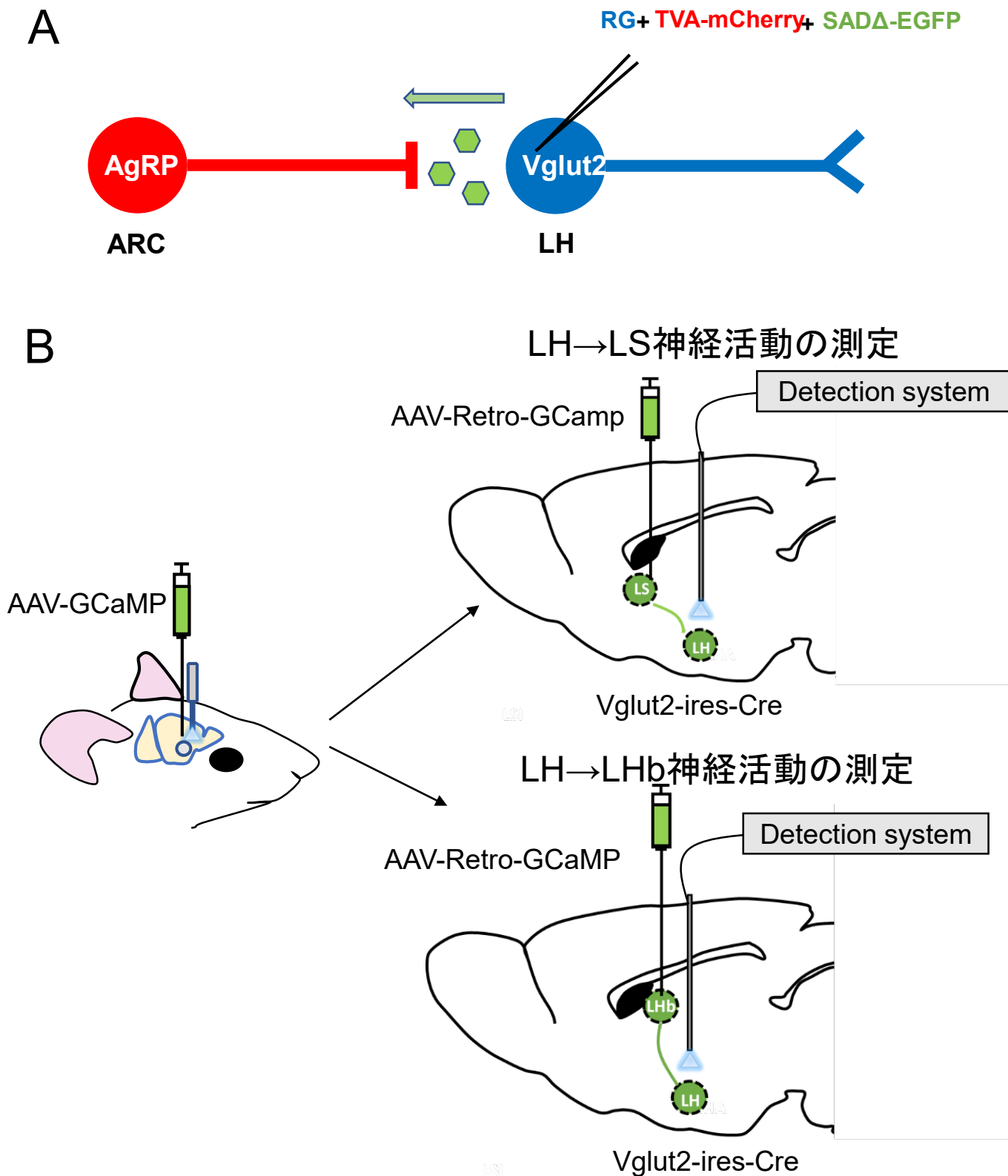


図6-4 本研究の展望

(A) 経シナプスの逆行性トレーサーRabies virusを用いたAgRP神経とLHのVglut2神経のシナプス結合の検証の模式図

(B) ファイバーフォトメトリーを用いた $LH^{Vglut2} \rightarrow LS$ 、 $LH^{Vglut2} \rightarrow LHb$ 経路特異的な神経活動の観察

参考文献

- Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., Aoki, T., Shiraki, T., Kakinuma, H., Matsuda, M., et al. (2014). The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron*. 84, 1034–1048.
- Aponte, Y., Atasoy, D., and Sternson, S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14, 351–355.
- de Araujo, I.E., Gutierrez, R., Oliveira-Maia, A.J., Pereira, A., Nicolelis, M.A.L., and Simon, S.A. (2006). Neural Ensemble Coding of Satiety States. *Neuron*. 51, 483–494.
- Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5163–5168.
- Atasoy, D., Nicholas Betley, J., Su, H.H., and Sternson, S.M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172–177.
- Betley, J.N., Cao, Z.F.H., Ritola, K.D., and Sternson, S.M. (2013). Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*. 155,1337-1350
- Callaway, E.M., and Luo, L. (2015). Monosynaptic Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses. *J. Neurosci.* 35, 8979–8985.
- Cansell, C., Denis, R.G.P., Joly-Amado, A., Castel, J., and Luquet, S. (2012). Arcuate AgRP neurons and the regulation of energy balance. *Front. Endocrinol.* 3.
- Carleton, A., Accolla, R., and Simon, S.A. (2010). Coding in the mammalian gustatory system. *Trends Neurosci.* 33, 326–334.
- Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 444, 288–294.
- Clark, J.T., Kalra, P.S., Crowley, W.R., and Kalra, S.P. (1984). Neuropeptide γ and human

pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 115, 427–429.

Cornwall, J., Cooper, J.D., and Phillipson, O.T. (1990). Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res. Bull.* 25, 271–284.

Delgado, J.M.R., and Anand, B.K. (1952). Increase of Food Intake Induced by Electrical Stimulation of the Lateral Hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 172(1):162-8.

Dietrich, M.O., and Horvath, T.L. (2012). Limitations in anti-obesity drug development: The critical role of hunger-promoting neurons. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 675–691.

Frank, S., Kullmann, S., and Veit, R. (2013). Food related processes in the insular cortex. *Front. Hum. Neurosci.* 7.

Gaillard, D., and Stratford, J.M. (2016). Measurement of Behavioral Taste Responses in Mice: Two-Bottle Preference, Lickometer, and Conditioned Taste-Aversion Tests. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 6, 380–407.

Garcia, J., Kimeldorf, D.J., and Koelling, R.A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*. 122(3160):157-8.

Gillette, R., Huang, R.-C., Hatcher, N., and Moroz, L.L. (2000). Cost-benefit analysis potential in feeding behavior of a predatory snail by integration of hunger, taste, and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3585–3590.

Gunaydin, L.A., Grosenick, L., Finkelstein, J.C., Kauvar, I. V., Fenno, L.E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J.J., Airan, R.D., Zalocusky, K.A., et al. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* 157, 1535–1551.

Hagan, M.M., Rushing, P.A., Benoit, S.C., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2001). Opioid receptor involvement in the effect of AgRP- (83-132) on food intake and food selection. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280(3), 814-21.

Hahn, J.D., and Swanson, L.W. (2010). Distinct patterns of neuronal inputs and outputs of the juxtapaaraventricular and supraformical regions of the lateral hypothalamic area in the male rat. *Brain Res. Rev.* 64, 14–103.

- Hanci, D., and Altun, H. (2016). Hunger state affects both olfactory abilities and gustatory sensitivity. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*. 273, 1637–1641.
- Hardikar, S., Höchenberger, R., Villringer, A., and Ohla, K. (2017). Higher sensitivity to sweet and salty taste in obese compared to lean individuals. *Appetite*. 111, 158–165.
- Häusser, M. (2014). Optogenetics: The age of light. *Nat. Methods* 11, 1012–1014.
- Hayar, A., Bryant, J.L., Boughter, J.D., and Heck, D.H. (2006). A low-cost solution to measure mouse licking in an electrophysiological setup with a standard analog-to-digital converter. *J. Neurosci. Methods*. 153, 203–207.
- Hernández, S.C., Jiménez, L.D., and García, J.A.B. (2018). Potential of energy production from slaughterhouse wastewater. *Interciencia*. 43, 558–565.
- Hirose, S., Osada, T., Ogawa, A., Tanaka, M., Wada, H., Yoshizawa, Y., Imai, Y., Machida, T., Akahane, M., Shirouzu, I., et al. (2016). Lateral–Medial Dissociation in Orbitofrontal Cortex–Hypothalamus Connectivity. *Front. Hum. Neurosci*. 10.
- Inagaki, H.K., Panse, K.M., and Anderson, D.J. (2014). Independent, reciprocal neuromodulatory control of sweet and bitter taste sensitivity during starvation in *Drosophila*. *Neuron*. 84, 806–820.
- Jennings, J.H., Rizzi, G., Stamatakis, A.M., Ung, R.L., and Stuber, G.D. (2013). The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science*. 341, 1517–1521.
- Jennings, J.H., Ung, R.L., Resendez, S.L., Stamatakis, A.M., Taylor, J.G., Huang, J., Veleta, K., Kantak, P.A., Aita, M., Shilling-Scriver, K., et al. (2015). Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell*. 160, 516–527.
- Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H., and Ninomiya, Y. (2000). Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 97, 11044–11049.
- Krashes, M.J., Koda, S., Ye, C.P., Rogan, S.C., Adams, A.C., Cusher, D.S., Maratos-Flier, E., Roth, B.L., and Lowell, B.B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Invest*. 121, 1424–1428.
- Krashes, M.J., Shah, B.P., Koda, S., and Lowell, B.B. (2013). Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released agRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab*.

18, 588–595.

Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*. 491, 212–217.

Lecca, S., Meye, F.J., Trusel, M., Tchenio, A., Harris, J., Schwarz, M.K., Burdakov, D., Georges, F., and Mameli, M. (2017). Aversive stimuli drive hypothalamus-to-habenula excitation to promote escape behavior. *Elife*. 6.

Levine, A.S., and Morley, J.E. (1984). Neuropeptide Y: A potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides*. 5, 1025–1029.

Li, J.X., Yoshida, T., Monk, K.J., and Katz, D.B. (2013). Lateral Hypothalamus Contains Two Types of Palatability-Related Taste Responses with Distinct Dynamics. *J. Neurosci*. 33, 9462–9473.

Livneh, Y., Ramesh, R.N., Burgess, C.R., Levandowski, K.M., Madara, J.C., Fenselau, H., Goldey, G.J., Diaz, V.E., Jikomes, N., Resch, J.M., et al. (2017). Homeostatic circuits selectively gate food cue responses in insular cortex. *Nature*. 546, 611–616.

Lorrfel, E.D. (1977). The Hungry Fly: A Physiological Study of the Behavior Associated With Feeding. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 237, 1010.

Luo, A.H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R.A., Lupica, C.R., and Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: A functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*. 333, 353–357.

Marella, S., Mann, K., and Scott, K. (2012). Dopaminergic Modulation of Sucrose Acceptance Behavior in *Drosophila*. *Neuron*. 73, 941–950.

Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*. 447, 1111–1115.

Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., Taniguchi, H., Tasic, B., Huang, Z.J., He, Z., et al. (2011). Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic

tracing. *Nature*. 472, 191–199.

Myers, M.G., Cowley, M.A., and Münzberg, H. (2008). Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 537–556.

Nieh, E.H., Matthews, G.A., Allsop, S.A., Presbrey, K.N., Leppla, C.A., Wichmann, R., Neve, R., Wildes, C.P., and Tye, K.M. (2015). Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell*. 160, 528–541.

O'Doherty, J., Rolls, E.T., Francis, S., Bowtell, R., McGlone, F., Kobal, G., Renner, B., and Ahne, G. (2000). Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport*. 11, 399–403.

Pei, Y., Rogan, S.C., Yan, F., and Roth, B.L. (2008). Engineered GPCRs as Tools to Modulate Signal Transduction. *Physiology*. 23, 313–321.

Peng, Y., Gillis-Smith, S., Jin, H., Tränkner, D., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2015). Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature*. 527, 512–515.

Poller, W.C., Madai, V.I., Bernard, R., Laube, G., and Veh, R.W. (2013). A glutamatergic projection from the lateral hypothalamus targets VTA-projecting neurons in the lateral habenula of the rat. *Brain Res.* 1507, 45–60.

Reiner, A., and Isacoff, E.Y. (2013). The Brain Prize 2013: The optogenetics revolution. *Trends Neurosci.* 36, 557–560.

Risold, P.Y., and Swanson, L.W. (1997). Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res. Rev.* 24, 91–113.

Rolls, E.T., Murzi, E., Yaxley, S., Thorpe, S.J., and Simpson, S.J. (1986). Sensory-specific satiety: Food-specific reduction in responsiveness of ventral forebrain neurons after feeding in the monkey. *Brain Res.* 368, 79–86.

Rolls, E.T., Sienkiewicz, Z.J., and Yaxley, S. (1989). Hunger Modulates the Responses to Gustatory Stimuli of Single Neurons in the Caudolateral Orbitofrontal Cortex of the Macaque Monkey. *Eur. J. Neurosci.* 1, 53–60.

Rossi, M.A., and Stuber, G.D. (2018). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metab.* 27, 42–56.

Sakurai, T. (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): Maintaining sleep and wakefulness. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 171–181.

Sengupta, P. (2013). The belly rules the nose: Feeding state-dependent modulation of peripheral chemosensory responses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 68–75.

Sheehan, T.P., Chambers, R.A., and Russell, D.S. (2004). Regulation of affect by the lateral septum: Implications for neuropsychiatry. *Brain Res. Rev.* 46(1):71-117.

Stachniak, T.J., Ghosh, A., and Sternson, S.M. (2014). Chemogenetic Synaptic Silencing of Neural Circuits Localizes a Hypothalamus→Midbrain Pathway for Feeding Behavior. *Neuron.* 82, 797–808.

Stamatakis AM., Van Swieten M., Basiri ML., Blair GA., Katak P., Stuber GD.(2016). Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *J Neurosci.* 13;36(2):302-11.

Stanley, B.G., Chin, A.S., and Leibowitz, S.F. (1985). Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: Evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res. Bull.* 14, 521–524.

Tokita, K., Armstrong, W.E., St. John, S.J., and Boughter Jr., J.D. (2014). Activation of lateral hypothalamus-projecting parabrachial neurons by intraorally delivered gustatory stimuli. *Front. Neural Circuits.* 8.

Tong, Q., Ye, C.P., Jones, J.E., Elmquist, J.K., and Lowell, B.B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat. Neurosci.* 11, 998–1000.

Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., and Lowell, B.B. (2011). Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron.* 71, 142–154.

Wess, J., Nakajima, K., and Jain, S. (2013). Novel designer receptors to probe GPCR signaling and

physiology. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 385–392.

Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5992–5995.

Wu, Q., Boyle, M.P., and Palmiter, R.D. (2009). Loss of GABAergic Signaling by AgRP Neurons to the Parabrachial Nucleus Leads to Starvation. *Cell.* 137, 1225–1234.

Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.P. (2009). Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell.* 139, 234–244.

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 28 年度博士課程進学
氏 名 傳 欧
指導教員名 三坂 巧

論文題目

空腹に伴う味覚嗜好・忌避性の調節を担う視床下部神経回路の同定

摂食行動は動物にとって、自身の生存や子孫の繁殖のために重要な行動である。このうち、味覚の情報は、食物の価値の判断基準として機能することが知られている。例えば、甘味や旨味は糖やアミノ酸など高栄養価の食物の呈する味で好まれるのに対して、酸味や苦味は腐敗物や毒物の呈する味であり忌避される。一方、この基準は常に一定ではなく、味の感じ方が、栄養状態の変化によって影響を受けることが知られている。例えば、ヒトやショウジョウバエを用いた実験から、空腹になると甘味に対して敏感になることが報告されている。また摂食神経回路には、味覚伝達の腹側前脳経路と共通する部位が存在し、栄養情報と味覚情報を統合処理して摂食神経を制御していることが考えられる。しかし、空腹という生理状態がもたらす脳内の味覚嗜好・忌避性の調節機構はよくわかっていなかった。

空腹時には、脳での神経活動や神経ペプチドの発現レベルの変化だけでなく、血中の血糖値の変化や末梢臓器での摂食関連ホルモンの分泌が行われている。したがって、脳内において味覚嗜好・忌避性が調節される部位を探索して行くことは容易ではない。本研究では、空腹時の脳における味のモジュレーションを解析するため、まず視床下部弓状核に局在するアグーチ関連ペプチド産生神経（以下 AgRP 神経と表記する）に着目した。この神経は絶食時に脳内で最初に興奮し、摂食亢進に必要な神経ネットワークの活動を引き起こす。AgRP 神経の活動を人工的にコントロールすることで、脳内で摂食行動を引き起こす神経ネットワークの活動が味覚感受性に及ぼす影響を評価できるのではないと考えた。

以上をふまえ、本研究では、視床下部を起点とした神経活動を人工的に制御することで、空腹時に味覚嗜好・忌避性の調節を制御する神経回路を同定することを目指した。

1. 空腹を誘引する視床下部 AgRP 神経活動が味覚嗜好・忌避性に与える影響

最初にマウスを絶食させ、空腹時に味に対する感度がどのように変化するかについて検証した。味覚嗜好性テスト（Brief access test）を行い空腹時の味覚嗜好性・忌避性を評価し

たところ、通常状態と比べ、絶食時の甘味に対する感度が有意に上昇した。その一方で、苦味に対する感度は低下した。すなわち、空腹時と満腹時で味の感受性が大きく変化していることが示唆された。

この発生メカニズムの解析にあたり、空腹時に脳内で最初に興奮し、摂食行動を誘引する AgRP 神経に着目した。まず薬理遺伝学手法である DREADD システムを用いて AgRP 神経を活性化し、人為的に空腹状態を再現する実験系を立ち上げた。神経細胞を人工的に活性化することができるデザイナー受容体（興奮性 DREADD である hM3Dq）を AgRP 神経特異的に発現させるため、AgRP-ires-Cre マウスの視床下部弓状核に Cre 依存的な発現カセットを組み込んだ hM3Dq 発現用アデノ随伴ウイルスを微量注入した。hM3Dq は人工 GPCR で、人工化合物である CNO と特異的に結合すると神経細胞が発火する。CNO の腹腔内投与によって AgRP 神経を特異的に活性化させると、急速な摂食行動が誘引され、短時間内における摂食量が顕著に上昇することが観察された。

そこで、このマウスを用いて味覚嗜好性テストを実施し、AgRP 神経を活性化した時とそうでない時に甘味・苦味に対する感受性がどのように変化するか比較した。その結果、AgRP 神経を人工的に活性化すると甘味溶液に対する感度が上昇した一方、苦味溶液に対する感度は低下した。また重要なことに、この味覚応答パターンの変化は生理的に空腹状態にしたマウスとよく類似していた。

以上の結果から、視床下部 AgRP 神経活動が呈味刺激に対する嗜好性・忌避性を調節していることが明らかになった。空腹時に甘味嗜好性が上昇することで、カロリーを含有する餌の味を敏感に検出できるようになり、その結果、食物の探索・摂取の効率が高まることが推測される。また、空腹時には有毒でリスクが多少ある食物も摂取しないと生存出来ないため、苦味感度が低下することで栄養摂取行動の優先順位を高めているとも考えられる。いずれの変化も、動物が飢餓を回避するための適応戦略の一環となっていることが考えられる。

2.光遺伝学を用いた味覚嗜好・忌避性変化を引き起こす AgRP 神経の投射先の特定

AgRP 神経は、脳の様々な部位に投射していることが報告されている。そのため投射部位によって、味覚嗜好性・忌避性に影響を及ぼす部位と、ほとんど影響しない部位が存在することが考えられた。この点を明確するため、光遺伝学を用いて AgRP 神経の投射先の活動を選択的に活性化するという手法を用い、空腹時の味覚嗜好性・忌避性変化を引き起こす部位の探索を実施した。試験動物には、光応答性イオンチャンネルである channelrhodopsin-2 (ChR2) を AgRP 神経特異的に発現させた。ChR2 は特定の波長の光が照射されると脱分極が誘導されるため、レーザー光の局所照射によって神経活動を選択的に活性化できる。また AgRP 神経に導入した ChR2 は細胞体だけでなく、軸索末端に輸送される性質をもつため、局所照射の部位を任意に定めることで、光刺激により投射先の神経活動を選択的に活性化することもできる。そこで、AgRP 神経の代表的な投射先である室傍核 (PVH)、外側視床下部 (LH)、扁桃体 (CeA) などに光ファイバーを挿入し、特定の経路のみを光刺激により選

択的に活性化した場合における、摂食量と味覚嗜好性・忌避性の変化を評価した。

まず AgRP 神経全体を光刺激により活性化すると、急速な摂食行動が誘引されるとともに、甘味溶液に対する嗜好性上昇と苦味溶液に対する忌避性低下が観察された。この応答パターンの変化は、DREADD システムで AgRP 神経を人工的に活性化した場合に類似していた。次に、投射先の活動を選択的に活性化した場合の味覚嗜好性・忌避性を評価したところ、PVH や CEA などの投射先を光刺激した時には味覚嗜好性・忌避性の変化が起こらなかった一方、LH を光刺激したときのみ、甘味および苦味に対する嗜好性・忌避性が大きく変化することが観察された。

以上の結果より、外側視床下部 LH に投射される AgRP 神経が、空腹時の味覚嗜好性・忌避性に大きな影響を与えることが明らかになった。外側視床下部 LH は、味の好き・嫌いや価値評価に関与する味覚伝達腹側前脳経路の中継点であることが知られている。つまり、空腹時における LH の神経が甘味・苦味に対する価値評価を変化させることによって、味覚嗜好性や忌避性を調節していることが考えられる。

3.外側視床下部 LH における AgRP 神経の下流神経の探索

LH に分布する神経細胞は、放出する神経伝達物質の種類の違いによって、グルタミン酸作動性神経と GABA 作動性神経に分類できる。しかし、AgRP 神経がどのタイプの神経に接続し、味覚感受性を調整しているのかは不明であった。これまでの知見から、AgRP 神経は GABA 作動性神経であり、この神経が興奮すると GABA が放出され、下流の二次神経の活動を抑制することが知られている。一方、LH のグルタミン酸作動性神経の活動を抑制すると摂食が亢進するのに対し、GABA 作動性神経の活動を抑制すると摂食が抑制されることが報告されている。この 2 つの報告から、AgRP 神経の下流に位置するのはグルタミン酸作動性神経である可能性が強く示唆された。そこで、LH のグルタミン酸作動性神経を薬理遺伝学手法により抑制することで、AgRP 神経を活性化した時と同じような味覚嗜好性・忌避性変化が起こるかを検証した。

アデノ随伴ウイルスを用いて、Vglut2-ires-Cre マウス（Vglut2：グルタミン酸作動性神経の分子マーカー）の脳両側の LH に hM4Di 受容体を発現させた。hM4Di 受容体は、人工化合物である CNO と結合するとカリウムチャンネルを活性化し、過分極を起こすことによって神経活動を抑制できる。Vglut2-hM4Di マウスの腹腔内に CNO を投与し Vglut2 神経を人工的に抑制すると、短時間内における摂食量が有意に増加した。このマウスを用いて味覚嗜好性・忌避性を評価した結果、CNO 投与後は甘味溶液に対する嗜好性が有意に上昇する一方、苦味溶液に対する忌避性が低下した。すなわち、AgRP 神経を活性化した時と同様な味覚感受性変化が観察された。

一方で、興奮性 DREADD である hM3Dq を LH に導入した Vglut2-hM3Dq マウスを用いて、絶食時に Vglut2 神経を興奮させた際の味覚嗜好性・忌避性を評価した。その結果、CNO 投与で Vglut2 神経を活性化すると、絶食の効果による甘味嗜好性の上昇と苦味忌避性の低

下が消失し、甘味や苦味に対する応答が満腹時と似たようなパターンに戻ることも明らかになった。

これらの結果を統合して考慮すると、外側視床下部の Vglut2 神経活動に応じて味覚嗜好性・忌避性が調節されることが示唆された。

4.外側視床下部 Vglut2 神経の投射先の特定と投射先活動が味覚嗜好・忌避性に与える影響

Vglut2 神経に導入した hM4Di 受容体は軸索末端に輸送される性質をもつため、免疫染色法によって LH の Vglut2 神経の投射先を調べた。その結果、外側中隔核 (lateral septum、LS)、外側手網核 (lateral habenula、LHb) と背側前核 (anterodorsal thalamus、AD) に強い投射が認められた。次に Vglut2-hM4Di マウスを用い、三つの投射先にカニューレを装着し、CNO の微量投与により投射先の神経活動を選択的に抑制した際の味覚感受性を評価した。その結果、外側中隔核部分 (LS) を選択的に抑制した時のみ、甘味に対する感度の上昇が観察された。一方、苦味に対する感度の低下は外側手網核 (LHb) を抑制した時のみ見られた。

また、逆行性トレーサの Retrobeads を用いて LH→LS、LH→LHb 経路の神経細胞を標識した結果、LS に投射する LH の神経細胞と LHb に投射する LH の神経細胞が、異なる細胞集団から構成されることが明らかになった。

以上の結果から、LS に投射する Vglut2 神経が甘味感受性の制御に関連する一方、LHb に投射している Vglut2 神経が苦味感受性を調節していることが示唆された。LS と LHb はともに、好き嫌いの判断や報酬・情動に関わる大脳辺縁系に投射していることが知られている。つまり LS の活動が甘味による報酬系への刺激を高めることによって、空腹時の甘味摂取のモチベーションを促していると考えられる。また、LHb は嫌悪情報や負のシグナルを伝達していることが広く知られており、この部位の活動が忌避性の味の回避行動を制御している可能性が示唆された。

味覚は摂食行動の促進や中止の決定因子であることが一般的に知られているが、生理状態 (満腹・空腹) の違いにより味覚嗜好性が変化する要因を検証した報告は少なかった。本研究によって、AgRP 神経の活性化が急速な摂食行動を引き起こすだけでなく、甘味や苦味に対する感度をも変化させることが明らかになった。また AgRP 神経は、外側視床下部のグルタミン酸作動性神経に投射しており、それぞれ別々の経路で空腹時の甘味・苦味感度を調節していることも明らかになった。このような脳内における味・生理状態の統合・評価機構の解明は、生体恒常性維持における味覚の役割の理解を深め、食品科学分野に新たな学問領域を拡げることが期待される成果であると結論付けることができる。

謝辞

本研究は、大勢の方々のご指導、ご鞭撻、ご協力により成し遂げることができました。拙筆ではありますが、以下に謝意を述べさせていただきます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 生物機能開発化学研究室 三坂巧准教授には、研究全般にわたりご指導いただきました。ディスカッションを通じて、本研究に対するご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 阿部啓子特任教授には、温かく力強い言葉をかけてくださり、研究を行っていく上で何よりの励みになりました。研究のみならず、日常生活の場面においても様々な支援を頂きました。厚く御礼申し上げます。

生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門 中島健一朗准教授には、本研究に関すること全般において大変お世話になりました。脳神経科学の基礎から始まり、この分野に関する最新の知見を教えてくださいました。実験の方針、手法や実験データ分析を非常に丁寧に御指導いただきました。また学術論文の執筆にあたっては、辛抱強くかつ丁寧に指導していただきました。心より御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 生物機能開発化学研究室 成川真隆助教には、動物の扱い方や行動実験の方法を詳細にご指導頂きました。心より御礼申し上げます。

生理学研究所 生殖・内分泌発達機構研究部門 箕越靖彦教授には、本研究に関する助言をいただきました。心より御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 高橋綾子さん、福田妙子さん木暮さんにはマウスコロニーの飼育・維持をしていただきました。心より御礼申し上げます。

生物機能開発化学研究室、ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」、日清食品寄付講座「味覚サイエンス」、食の安全研究センター「食の安全・安心・健康領域」研究室の皆様には大変お世話になりました。お蔭で楽しく有意義な研究生活を送ることが出来ました。最後に、私の留学を支援してくださった両親に、深く感謝いたします。

2018 年 12 月