

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 27 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特異的に活性化できる。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。