

嗅覚を用いた脂質代謝異常の治療法の開発

奈良県立医科大学 先端医学研究機構
脳神経システム医科学分野
高橋 弘雄

1. はじめに

食生活などの変化により、血中の脂質量が過剰となる脂質代謝異常症は、近年大きな社会問題の1つとなっている。その予防や治療には、食事の適切なコントロールが重要である。油のセンサーを同定し、その活性を薬剤等により調節することができれば、カロリーの過剰摂取の原因となる油への嗜好性や摂取量のコントロールが可能となり、脂質代謝異常の治療法に繋がると考えられる。しかしながら、味覚では油センサーの研究^{1,2)}は進んでいる一方で、油の匂いを感知する嗅覚センサーについては、国内外を問わず全く研究されていない。そこで、私達は、“嗅覚に油の匂いセンサーはあるのか？”という点に着目して、マウスを用いて研究を行った。

2. 方法

匂いの嗜好性実験

匂いの嗜好性を判定する従来のテスト³⁾では、ろ紙に匂いをしみ込ませてマウスに提示し、その反応を見る方法が一般的であった。しかしながら、この方法では、マウスがろ紙の油を舐めてしまうため、嗅覚と味覚による影響を区別することができなかった。そこで、味覚の影響を排除した以下の実験方法を確立した。

実験にはICR系統の1.5-2ヵ月齢の雄マウスを用いた。マウスを新規環境に慣れさせるために、少量の餌と水を備えた床敷のないケージ(D31 x W25 x H12.5 cm)にマウスを1匹ずつ入れ、30分ごとに4回新しいケージに交換した(合計2時間)。その後、匂い物質をセットした床敷のない新規のテストケージ(D31 x W25 x H12.5 cm)にマウスを移し、3分間のマウスの行動をビデオカメラ(SONY HDR-CX560)で撮影した(Fig. 1)。匂いの提示方法として、底から1 cmの高さで切ったエッペンドルフチューブにろ紙(4 cm²)を入れ、匂い物質40 μlをろ紙に含ませた(Fig. 1; 拡大写真)。匂い物質を入れたチューブは、マウスが動かせないようにダブルクリップを用いてケージの壁面に固定した(Fig. 1)。また、この条件で、マウスが直接ろ紙に触れられないことを確認した。撮影した動画を用いて、マウスがチューブの断面に鼻先を持っていった時間を探索時間と定義し、3分間の探索時間を計測した。



Fig. 1 マウスの行動解析
マウスが直接触れられないように、匂い物質をチューブ内のろ紙に染み込ませて(右上)、チューブを壁に固定した。マウスが、匂いを嗅いだ時間を測定した。

3. 結果

マウスの植物油に対する嗜好性について、匂いの嗜好性テストを用いて検討した。水をコントロールとし、水に対する探索時間(2.21sec)より探索時間が長くなれば誘引作用がある匂い物質と判定した(Fig. 2)。マウスに対する誘引作用が知られる尿の場合には、雌雄のどちらの尿であっても、実験に用いた雄マウスに対して優位な誘引効果を示した。一方、忌避物質として知られるhexanolやIA-amine³⁾の場合、有意な探索時間の減少は見られず、この実験系では忌避行動の判定が難しいことが示唆された。そこで、植物油に対する応答を検討したところ、非常に興味深いことに、菜種油、ごま油、ピーナツ油など、実験に用いた植物油のすべてで有意に探索時間の増加が観察された(Fig. 2)。この結果から、植物油に共通する匂いの成分が、マウスを惹き付けていることが示唆された。

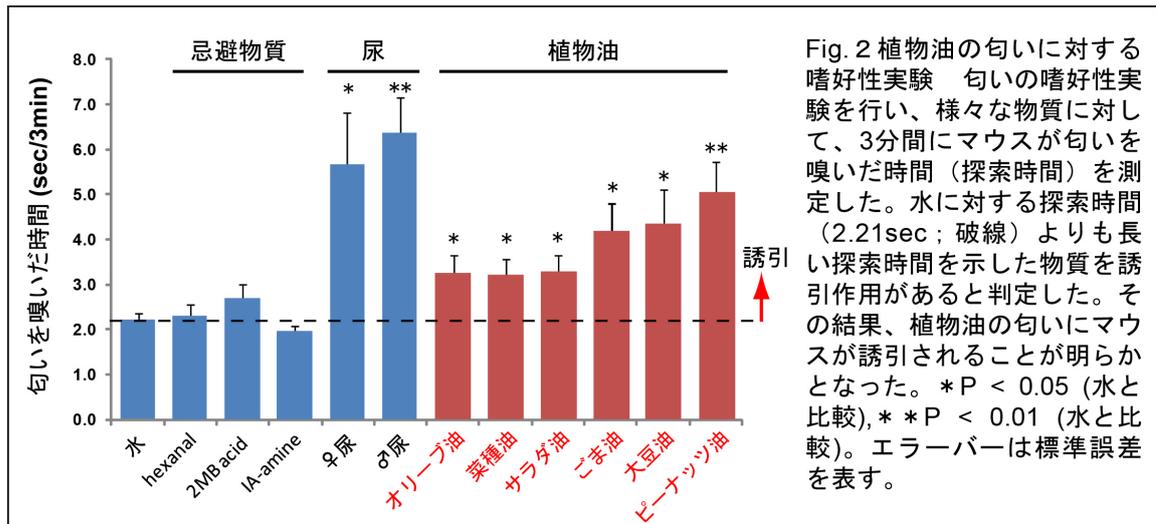


Fig. 2 植物油の匂いに対する嗜好性実験 匂いの嗜好性実験を行い、様々な物質に対して、3分間にマウスが匂いを嗅いだ時間（探索時間）を測定した。水に対する探索時間（2.21sec；破線）よりも長い探索時間を示した物質を誘引作用があると判定した。その結果、植物油の匂いにマウスが誘引されることが明らかとなった。*P < 0.05 (水と比較), **P < 0.01 (水と比較)。エラーバーは標準誤差を表す。

そこで、植物油に共通する誘因成分について、検討を行った。植物油は、グリセリンと不飽和脂肪酸から構成されるトリアシルグリセロールが主成分である。興味深いことに、グリセリン単独では全く誘引作用を示さない一方、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸は顕著な誘引効果を示した。また、オレイン酸と同様の炭素構造を持ったオレイルアルコールでも、同様の誘因効果が見られた。以上の結果から、マウスは脂肪酸の炭素骨格に誘引されることが明らかとなった。さらに、炭素鎖数の異なる脂肪酸を用いて、炭素骨格の長さによる誘因効果の違いを検討したところ、炭素鎖数が9以上の中鎖および長鎖脂肪酸が、誘引作用を持つことが分かった。

次に、このような油の誘因効果と食欲との関係について調べるため、2時間絶食させたマウスを用いて誘引作用を検討した。その結果、絶食したマウスは積極的にチューブへの探索行動を示し、空腹からか、がりがりとしてチューブをかじるような行動が観察された。この結果から、嗅覚による油への誘因効果は、食欲に強く関係していることが明らかとなった。

さらに、油への誘因作用が本当に嗅覚によるものであることを確認するため、ZnSO₄を鼻孔内に注入した嗅覚障害マウスを用いて、匂いの嗜好性テストを行った。ZnSO₄処理を行ったマウスでは、油への誘引作用は見られなくなった。行動実験後に抗体染色を行い、ZnSO₄処理によって、匂いのセンサー細胞である嗅細胞（OMP陽性）が死滅していることを確認した。この結果から、嗅細胞が油の匂いに応答していることが強く示唆された。そこで、オレイン酸をマウスに嗅がせて、嗅細胞のマーカであるOMPと神経活動のマーカであるZif268のTwo color *in situ*ハイブリダイゼーションを行い、嗅細胞の応答の有無を検討した（Fig. 3）。嗅細胞のマーカであるOMP陽性の細胞の内、腹側の一部でZif268の発現が見られた（Fig. 3矢頭）。以上の結果から、矢頭で示した嗅細胞で発現する嗅覚受容体は、オレイン酸に応答しているものと考えられる。

最後に、このような匂い刺激に伴う神経活動が嗅覚の神経回路にどのような変化をもたらすのか？という点について検討を行った。匂い刺激により、嗅細胞の投射先である嗅球介在ニューロンの発達が顕著に促進されることを見出した。神経活動依存的に発現が制御される転写因子Npas4が、介在ニューロンのシナプス形成を制御することを明らかとした⁴⁾。

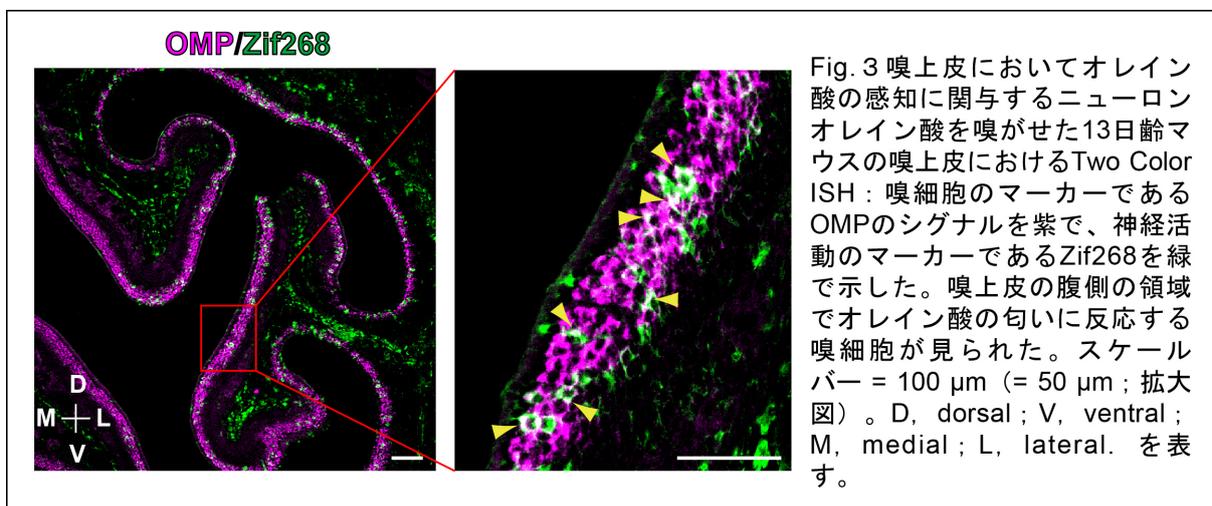


Fig. 3 嗅上皮においてオレイン酸の感知に関与するニューロン オレイン酸を嗅がせた13日齢マウスの嗅上皮におけるTwo Color ISH：嗅細胞のマーカであるOMPのシグナルを紫で、神経活動のマーカであるZif268を緑で示した。嗅上皮の腹側の領域でオレイン酸の匂いに反応する嗅細胞が見られた。スケールバー = 100 μm (= 50 μm；拡大図)。D, dorsal；V, ventral；M, medial；L, lateral. を表す。

4. 考察

本研究により、マウスの嗅覚に油のセンサーが存在し、マウスが植物油の匂いに嗜好性を示すことが明らかとなった。また、油の構成成分である不飽和長鎖脂肪酸の炭素鎖構造が、マウスに誘引作用を示すことを見出した。絶飲絶食条件下での実験により、マウスの油に対する嗜好性は食欲と密接に関連していることが分かった。また、嗅上皮の一部の嗅細胞は、オレイン酸に応答することが明らかとなり、これらの嗅細胞では油の匂いセンサーとして働く嗅覚受容体が発現していると予想される。

今後の展望として、油の匂いに応答する嗅覚受容体を同定することが必須であり、現在、培養細胞を用いて油センサーとなる嗅覚受容体のスクリーニングを進めている。嗅覚の油センサーを同定することにより、油への嗜好性や、摂取量をコントロールできる薬剤の開発に繋げていきたいと考えている。

5. 発表論文、参考文献

参考文献

- 1) Laugere F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P. (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* **115**, 3177-3184
- 2) Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, Damak S. (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci.* **30**, 8376-8382
- 3) Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H. (2007) Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* **450**, 503-508

発表論文

- 4) Yoshihara S*, Takahashi H*, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K and Tsuboi A. (2014) Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent olfactory bulb interneuron dendritic spine development. *Cell Reports* **8**, 843-857
(* These authors contributed equally to this work)