

先天的恐怖活用技術の開発によるげっ歯類からの食害防止

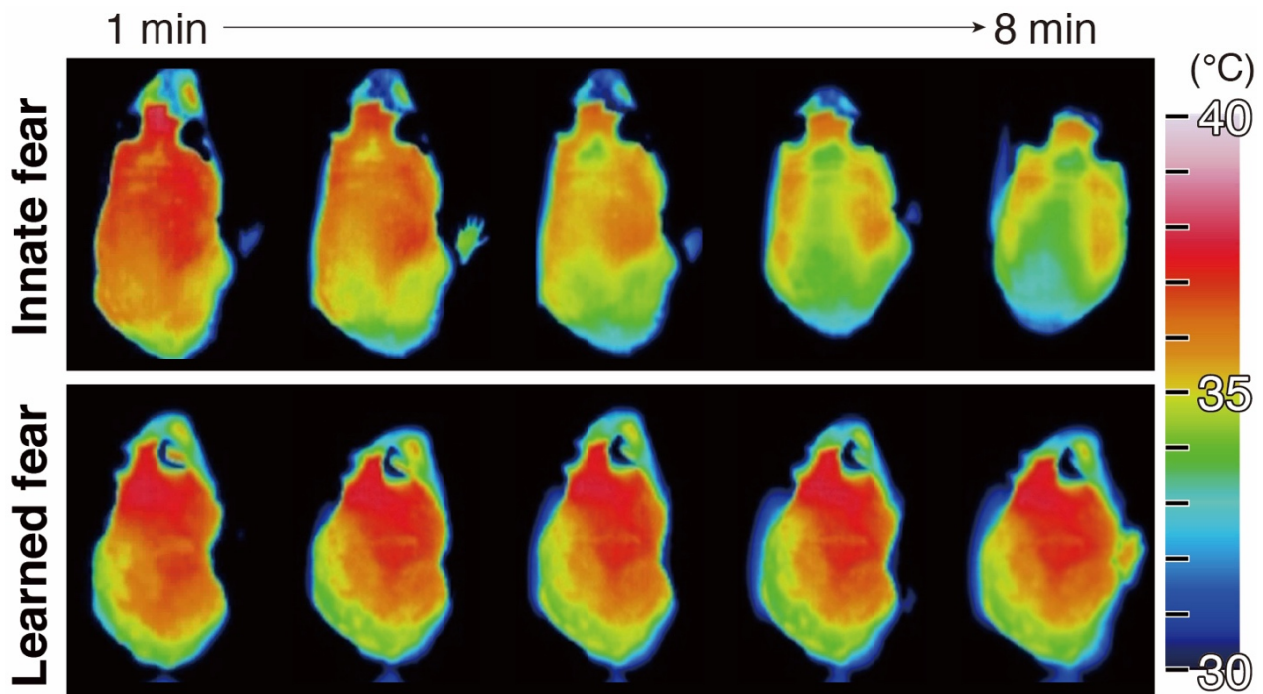
研究代表者

小早川 高 関西医科大学

共同研究者

船曳 和夫 先端医療振興財団

松尾 朋彦 関西医科大学



上段は先天的恐怖の匂い、下段は後天的恐怖の匂いを嗅がせたマウス。両者の恐怖刺激は同等の行動を誘導するが、先天的恐怖条件のみで、背筋を中心とした体表面温度が低下した。本研究では、既知の感覚刺激の中で最強の先天的恐怖情動を誘導できる、私たちが開発した「チアゾリン類恐怖臭:Thiazoline related fear odors: tFOs」を活用し、先天的恐怖情動の原理を解明し、人類の食を守る革新的な忌避剤技術を開発する。

1. 研究の背景と達成目標

人口増や気候変動のため発展途上国では食料不足の危機が迫っている。げっ歯類による農作物や備蓄食料への被害は甚大であり、さらに、ヒトや家畜の感染症も媒介する。私たちは、マウスの匂いに対する行動を先天的に制御する神経回路を発見し、さらに、極めて強力な先天的恐怖行動を誘発する人工匂い分子「恐怖臭」の開発に成功した。恐怖臭はげっ歯類の摂食を完全にブロックできる。本計画では、恐怖臭の忌避誘発メカニズムを遺伝子レベルで解明し、人間や家畜には安全性を保障するが、げっ歯類に対しては強力な忌避活性を持つ革新的な忌避剤技術を確立する。有史以来続く、人類とげっ歯類の食料争奪戦の勝利を目指す。

恐怖臭による先天的恐怖反応の制御原理を理解するためには幾つかの段階が必要になる。まず、必要となるのは外気に存在する恐怖臭を感知した情報を脳へ伝達する受容体遺伝子の決定である。さらに、この受容体遺伝子が確かに恐怖行動や生理応答を誘導することの証明が必要である。一般に、匂い分子は数十から百種類以上の嗅覚受容体遺伝子に結合する。これら多数の遺伝子の中から行動制御を担う遺伝子が単一のものに絞れるのかは疑問であり、実際にそのような遺伝子を特定することは困難であると想定される。もし、単一の先天的恐怖受容体遺伝子が同定できれば、それを標的に様々な有害動物種用の忌避剤が開発できるようになる。さらに、受容体遺伝子が脳へどのような情報を伝達しているのか、その情報を脳がどのように判断して恐怖情動やそれに伴う行動や生理応答を誘導するのかという、脳の情動制御原理の解明にまで踏み込んだ研究を実施する。

既存の忌避剤は、ある種の匂い分子などが経験的に動物に忌避効果をもたらすことを基準に開発されているが、その作用機序は不明である。本研究ではげっ歯類に対する忌避剤の開発を、受容体や神経回路レベルにまで掘り下げて実施する。げっ歯類による被害は有史以来連綿と続き、現代の科学技術でも事実上殆ど対抗策がない。人類にもげっ歯類にも食べることは生存本能であり、その抑制は容易ではないからである。本研究ではより強力な本能である先天的恐怖情動の本質的解明にまで踏み込んでこの難問の解決を目指す。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

● 先天的恐怖誘発遺伝子の発見

大規模フォワードジェネティクススクリーニングにより、痛みや温度の情報を脳へ伝達するとされた *Trpa1* 遺伝子が、tFO に結合し、恐怖行動の誘発を担うという予想外の事実が明らかになった。さらに、*Trpa1* 遺伝子は天然の天敵複合臭への恐怖行動も制御することが判明し、tFO に限らず、天敵や危険な環境化学物質一般を感知評価し恐怖行動を担う鍵遺伝子であることが示唆された。先天的恐怖受容体遺伝子 *Trpa1* が初めて同定され、恐怖情動への人為的アクセスが可能になった。

● 忌避剤から「人工冬眠・生命保護」誘発技術への発展

情動とは行動やそれを動機づける意識、生理応答を統合誘導する脳の機能である。実験室と実環境の双方のレベルで、tFO が誘導する恐怖情動は食欲情動を有効に抑え込み、恐怖 > 食欲の情動階層原則が示された。恐怖情動は忌避剤の開発に利用できるが、一般的には、ストレスとして心身に悪い影響を与えると認識されている。しかし、恐怖情動とは危機状態を認識した脳が誘導する意識、行動、生理応答を統合誘導する機能として進化したはずであり、本質的には潜在的な生命保護作用に繋がる良い影響を心身に与える可能性がある。しかし、これまで恐怖情動の良い影響を解明し、それをヒトや動物の利益に昇華させる研究視点はなかった。本研究では、tFO が三叉神経・迷走神経の TRPA1 を介し、脳幹から中脳に至る生命保護中枢経路に危機情報を伝達することで極めて強力な「人工冬眠・生命保護状態」が誘導されるという新現象の発見につながった。本発見により、先天的恐怖情動は忌避剤開発の枠を超え、生と死を結ぶ原理の解明に繋がる道を切り開いた。

3. 研究成果

先天的恐怖誘発遺伝子の発見

夜行性の動物は暗闇で天敵の存在を察知する。このために、天敵の発する匂い分子を危険シグナルと認識する能力が発達したと考えられてきた。この考えに従い、肉食動物の排泄物自体やその成分を利用した忌避剤が開発されてきた。しかし、既存の忌避剤では忌避活性が弱い、馴化しやすいという弱点が克服できなかった。

私たちは、先天的と後天的な匂い情報が鼻腔内で分離した経路により脳へ伝達され行動を誘導することを発見した。この原理に従い、天然物ではなく人工匂い分子ライブラリーのスクリーニングを行い、極めて強力な先天的恐怖情動を誘発する一連の匂い分子群である「チアゾリン類恐怖臭:Thiazoline-related fear odors (tFO)」を世界で初めて開発した。tFO は繰り返し嗅がせても馴化が起こらず、強力な忌避剤として利用できる。

一般に、動物の行動をヒトが望むように制御することは困難である。さらには、自分自身の行動ですら望ましく制御することが困難な場合もあり、そのような状態が著しく進めば精神疾患となる。ヒトや動物の行動を動機付ける原動力は恐怖、食欲、母性などの情動であり、原始的な本能である。一方で、情動は AI やロボットによる再現が困難な動物やヒトの本質であるとも言える。本研究では人類の長い歴史で克服できなかったげっ歯類による被害を実質的に抑える初めての忌避剤技術の開発を目指した。この目的の達成には、食欲を抑え込み行動を制御するほどの強力な恐怖情動の誘発技術が必要であり、このためには恐怖情動の解明も必要となる。逆に言えば、本研究が期待通りに進めば、現在のところ謎に包まれている脳の情動制御原理の理解も進むと期待できる。

匂い分子は鼻腔内の嗅細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子により感知され、その情報は脳の嗅球へ伝達される。一般に匂い分子は数十から百種類以上の嗅覚受容体に結合する。私たちは、tFO に結合特異性が高い受容体遺伝子を複数同定し、それらのノックアウトマウスを作成した。しかし、これらのノックアウトマウスでは tFO が誘発する恐怖行動が僅かにしか抑制されなかった。これらの結果から、tFO が誘導する恐怖行動は単一の受容体遺伝子の機能には帰着できないことが考えられた。しかし、私たちは嗅覚受容体遺伝子以外の遺伝子も含めて、何らかの単一の受容体遺伝子が tFO に対する恐怖行動を制御する可能性は残されており、これに該当する遺伝子を同定するためには、これまでになくアプローチが必要になると考えた。

そこで、何ら仮説を置かずに機能的遺伝子を同定できるフォワードジェネティクススクリーニングで先天的恐怖受容体遺伝子の探索を目指した。tFO は全てのマウスに殆ど同じ強度のフリージング行動を誘導できる。フォワードジェネティクススクリーニングでは変異動物が1から数匹しか得られないので、全てのマウスに同等の行動を誘発できるという tFO の性質が必須になる。大規模なスクリーニングの結果、痛みや温度の情報を脳へ伝達するとされた *Trpa1* 遺伝子が、tFO に結合し、恐怖行動の誘発を担うという予想外の事実が明らかになった。フォワードジェネティクススクリーニングでは tFO の一種である 2MT が誘導するフリージング行動に異常の見られる個体を探索した。その結果、TRPA1 受容体タンパク質は 2MT 以外の様々な種類の tFO に対して直接結合し、先天的な恐怖行動を誘導できることが判明した。さらに、*Trpa1* 遺伝子は tFO のみではなく蛇の皮などの tFO を含まない天然の天敵複合臭への恐怖行動も制御することが判明した。従って、*Trpa1* は天敵や危険な環境化学物質一般を感知評価し恐怖行動を誘発する単一の鍵遺伝子であることが示唆された。続いて、*Trpa1* 遺伝子が脳へ情報を伝達する経路を解明するために、*Trpa1* 遺伝子を発現する細胞を特異的に標識できる *Trpa1-Cre* ノックインマウスを作成した。*Trpa1* 遺伝子は三叉神経の一部の細胞に発現し、脳幹部にある三叉神経脊椎路核の数カ所の領域に接続して情報を伝達しており、この経路が先天的な恐怖行動を制御することが明らかになった。

続いて、tFO に対する全脳活性化マッピングと神経経路データベースを利用して、脳幹部から中枢への先天的恐怖情報の伝達経路候補を発見し、さらに、この経路を人為的に活性化することで tFO が誘導する強力な恐怖行動が再現されることを確認した。tFO の感知情報が先天的恐怖情報へと変換される過程を解明するために、三叉神経と脳中枢部の各レベルの神経細胞において tFO 刺激が誘導する神経活動イメージングを行った。

本研究では、*Trpa1-cre* ノックインマウスを用いて *Trpa1* 陽性細胞を標識し、自由行動条件のマウスの神経活動をイメージングするために顕微内視鏡と頭上設置型小型顕微鏡を用いた。三叉神経に関しては、生体マウスで頭蓋基底部分にある *Trpa1* 陽性細胞へのアクセスするのが困難だったので、摘出標本のイメージング解析を実施した。一方で、脳中枢部に関しては自由行動条件の生体の頭上に小型顕微鏡を設置する方法でイメージング解析を実施した。その結果、tFO 刺激が単なる感覚情報から先天的恐怖情報へと変換される過程が明らかになった。本成果により、忌避情動を誘発する嫌悪性の匂い分子と、先天的恐怖情動を誘発する tFO は脳内で明確に異なる情報として処理されていることが示唆され、両者の忌避剤としての性能の違いが裏付けられた。

本計画の忌避剤が有効に機能するためには、恐怖情動の誘導によって食欲情動が抑制される必要がある。tFO を利用して作成した忌避剤は、実験室環境のみではなく、実際のネズミ類被害が発生している商店や農地などの実環境においても有効に機能し、摂食行動を抑制できることが明らかになった。従って、恐怖 > 食欲の情動階層原則が行動実験レベルで示された。*Trpa1* 遺伝子は線虫や昆虫からヒトに至るまで広く存在する。一方で、TRPA1 は動物種ごとに結合する匂い分子の種類が異なることが知られる。さらに本研究により、パッチクランプ解析を用いて培養細胞に発現させた各種動物由来の TRPA1 の応答を解析し、tFO への応答特異性も動物種毎に異なることが明らかになった。例えば、tFO の一種である 2MT はげっ歯類の TRPA1 を活性化するがヒトの TRPA1 は活性化しなかった。このことから 2MT がげっ歯類に強力な忌避効果を誘導するが、ヒトには強力な影響を与えないことを説明できる可能性がある。一方で、様々な有害動物に特異的に作用する tFO 類縁匂い分子が存在することも明らかになった。従って、TRPA1 を標的にすれば、tFO やそれに類似する匂い分子の種類は適切に選択する必要があるものの、様々な種類の有害動物の先天的恐怖情動を誘発する忌避剤が開発できる可能性が示された。本研究により、実環境で機能する初めての忌避剤の動作原理が解明された。全世界の食料や衛生環境を保全するために本研究成果を産学官の様々なレベルで推進する。

4. 今後の展開

忌避剤から「人工冬眠・生命保護」誘発技術への発展

恐怖情動は一般的には、ストレスとして心身に「悪い影響」を与えると認識されている。しかし、恐怖情動とは危機状態を認識した脳が誘導する意識、行動、生理応答を統合誘導する機能として進化したはずである。そうであれば、危機状態で恐怖情動は潜在的な生命保護作用に繋がる「良い影響」を心身に与える可能性がある。しかし、これまで恐怖情動の「良い影響」を解明し、それをヒトや動物の利益に昇華させる技術は実用化されていない。

tFO を嗅がせるだけで動物の行動をほぼ完全に制御できる。しかし、tFO は麻酔とは異なり意識に影響は与えない。本研究の過程で tFO はこれまで知られる中で最強の先天的恐怖情動の誘発刺激であることが明らかになった。そうであれば、tFO を用いればモデル動物の脳に強力な危機認識を誘導でき、その結果、未知の潜在的な生命保護能力が発見できる可能性があると考えた。この独自の仮説に基づいた研究を進めることで、tFO は三叉神経・迷走神経の TRPA1 を介し、脳幹から中脳に至る生命保護中枢経路に危機情報を伝達することで極めて強力な「人工冬眠・生命保護状態」を誘導するという新現象の発見につながった。

高い濃度の tFO 刺激を長時間続けると室温近くまで体温が低下し続け、人工冬眠状態が誘導された。冬眠動物は食料が不足する冬季に体温と代謝を下げる。低体温・代謝は消費エネルギーの抑制に繋がるが、免疫能力の低下も誘導してしまう。このために、感染への抵抗性が失われる。冬眠とはエネルギー消費の抑制と引き換えに生命機能全般を低下させる応答であると考えられている。もし、tFO が危機に反応する生命保護能力を誘導するという我々の仮説が正しいのであれば、tFO 刺激が冬眠と同様に感染に対する抵抗性を失わせることは矛盾している。しかし、興味深いことに tFO 刺激は冬眠とは逆で、血液中の自然免疫を担う細胞の数を大幅に増加させることが判明した。通常条件では、自然免疫細胞の増加は感染への抵抗性を高めるが、それは同時に、過剰な炎症による組織の破壊を誘導してしまう。つまり、免疫とは両刃の剣であり、異物への攻撃力を高めることは、即ち、自己組織への破壊力の増強に繋がる。ところが、tFO 刺激は自然免疫細胞の増加を促すにも関わらず、

強力な抗炎症効果を同時に誘導した。つまり、tFO 刺激は通常の免疫状態では達成が困難な抗炎症性免疫増強作用を誘導していると考えられた。

驚くべきことに、tFO 刺激を与えると、マウスは通常では15分程度しか生存できない致死的な低酸素環境において何時間も生存できるようになり、また、致死的な炎症応答を誘導する敗血症モデルにおいても、生存確率が飛躍的に上昇した。さらに、tFO 刺激は脳梗塞モデルにおいても強力な治療効果を発揮した。tFO が誘導する生命保護作用は、脳幹部から始まる中枢生命保護経路の活性化によって誘導されることが明らかになった。これらの結果から、生-病気-死の軸から外れた「人工冬眠・生命保護」状態が存在し、この状態は tFO 刺激を受けた脳の機能により誘導され、その結果、強力な生命保護能力が発揮されるというモデルが示された。

現代の医学研究は異常の生じた分子、細胞、組織を発見し、それら個別の異常をもとに戻す治療技術を提供してきた。これに対して、私たちは病気を引き起こす異常に個別に対応するのではなく、潜在的な生命保護能力を誘導することで自己治癒能力を最大化する技術を開発したと考えられる。本研究の成果の普及を進め、恐怖情動が持つ強力な効果や生物学的な意義の認識を高めることで、有害動物の行動を制御することで食害を防ぐ技術や、生命保護能力を誘導する医療技術が一般化することを目指す。

5. 発表実績

原著論文

- Sato T, Katsuoka Y, Yoneda K, Nonomura M, Uchimoto S, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Mizutani Y. Sniffer mice discriminate urine odours of patients with bladder cancer: A proof-of-principle study for non-invasive diagnosis of cancer-induced odours. *Scientific Reports* 7: 14628 (2017)
- Wang Y, Cao L, Lee CY, Matsuo T, Wu K, Asher G, Tang L, Saitoh T, Russell J, Klewe-Nebenius D, Wang L, Soya S, Hasegawa E, Chérasse Y, Zhou J, Li Y, Wang T, Zhan X, Miyoshi C, Irukayama Y, Cao J, Meeks JP, Gautron L, Wang Z, Sakurai K, Funato H, Sakurai T, Yanagisawa M, Nagase H, Kobayakawa R, Kobayakawa K*, Beutler B*, Liu Q*. Large-scale forward genetics screening identifies Trpa1 as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nat Comm.* 9(1): 2041 (2018)
- Fujimoto S, Leiwe MN, Sakaguchi R, Muroyama Y, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Saito T, Imai T. Spontaneous activity generated within the olfactory bulb establishes the discrete wiring of mitral cell dendrites. *bioRxiv* 10.1101/625616 (2019)
- Matsuo T, Isosaka T, Tang L, Soga T, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Thiazoline-related TRPA1 agonist odorants orchestrate survival fate in mice. *bioRxiv* 10.1101/2020.05.17.100933 (2020)

特許

- 「動物用忌避剤」小早川高, 小早川令, アメリカ特許 No. 9918472B2 (2018/3/20)
- 「低酸素障害、虚血再灌流障害又は炎症の予防又は治療剤、移植及び生体保存材」小早川高, 小早川令子, 特願 2018-049761(2018/3/16)
- 「哺乳類動物用忌避剤」小早川高, 小早川令子, 特願 2020-54031 (2020/3/25)
- 「抗炎症型免疫強化剤」小早川高, 小早川令子, 特願 2020-54032 (2020/3/25)

招待講演

- Ko Kobayakawa, Sensory TRPA1 activation by thiazoline-related odorants orchestrate life-protective effects, 生理学研究所 2019 年度国際研究集会 Pain and Survival Strategy, 2020 年 1 月 7 日～8 日, 岡崎
- Ko Kobayakawa, Innate fear odors elicit a physiological crisis mode that promotes survival in life-threatening situations, 第 10 回武田科学振興財団 薬科学シンポジウム, 2020 年 1 月 24 日・25 日, 大阪