

平成23年 5月 23 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700452

研究課題名(和文)

AD/HD様の行動薬理的表現型を示す変異マウスの疾患モデルとしての有用性の検討

研究課題名(英文) Validation of mutant mice that exhibit AD/HD like behavior as psychiatric-disease models

研究代表者

古瀬 民生 (FURUSE TAMIO)

独立行政法人理化学研究所・マウス表現型解析開発チーム・開発研究員

研究者番号： 60392106

研究成果の概要(和文)：

ENU誘発突然変異によってAD/HD様の行動異常を示すモデルマウスの探索を行った。その結果、open-field testで高活動を示したM-174、M-1736変異体の変異遺伝子を同定した。M-174に関して、行動特性、メチルフェニデート(MPH)への反応性、脳組織中のcFos発現の分布、ERKタンパクのリン酸化などを検討し、論文として報告した。また、血液検査などを行い、複数の異常を検出した。M-1736に関しては、変異遺伝子を特定するとともに、MPHを用いた行動薬理的、組織学的解析を行った。

研究成果の概要(英文)：

We screened mice that exhibit AD/HD like behavior in RIKEN ENU mutagenesis program. In the screening, we isolated 2 mutant lines, M-174 and M-1736, as candidates of AD/HD model. In the detailed analyses of M-174, we carried out comprehensive behavioral, pharmacological, histological, biochemical, hematological, blood biochemical tests and evaluated the mutant as an AD/HD model. Additionally, we identified a mutation in M-1736 and carried out pharmacological and histological analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：(1) AD/HD (2) ENU mutagenesis (3) Methylphenidate (4) 疾患モデル (5) 発達障害

1. 研究開始当初の背景
(1) . AD/HD の病態

AD/HD (Attention-Deficit/hyperactive disorder: 注意欠陥多動性障害)とは、発達段階に

そぐわない多動、衝動性、注意の欠如を主な行動的特徴とする発達障害の総称である。米国精神医学会編集による DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) によるとさらに、AD/HD は不注意優勢型、多動-衝動性優勢型と両者の混合型に分類される。これらの症状は、社会生活が生じる小児期から症状が顕在化し、その際の有病率は3-9%といわれ、一般的には小児期にみられる発達障害と認識されているが、実際には成人期においても症状が持続する事が知られている。これまでのMRI画像を用いた非侵襲的かつ定量的な解剖学的所見から、AD/HD児においては健常児と比較して、前頭前皮質及び大脳基底核の一部に縮小が見られることが明らかになっている。また、複数の大規模な双生児研究により、AD/HDの発症には遺伝的要因が強く関与していることが明らかになっている。さらに、AD/HD治療薬はメチルフェニデート、選択的ノルエピネフリン再取り込み阻害剤など、モノアミン系を分子標的している事が知られている。この中でもメチルフェニデートはアンフェタミン、コカインと同様、中枢刺激薬に含まれ、一般的には興奮性の薬物として知られているが、AD/HD患者の70%に鎮静効果を持つといわれている。これらの薬理的な知見とともに、連鎖解析及び多型解析からAD/HDの発症機序におけるモノアミン系の関与が強く示唆されている。さらに、家系調査による連鎖解析により、複数の遺伝子座がAD/HDの発症に関与していることが知られている。このため、病態の本質的理解と治療法の解明のためには、遺伝的背景及び、生育環境のコントロールが容易なモデル動物の作製が必要である。

(2) 既存のAD/HDモデル動物の現状と問題点

既存の遺伝モデル動物としては、変異型ヒト甲状腺刺激ホルモン受容体トランスジェニックマウス、Colobomaマウス、高血圧自然発症ラット (SHラット、他)、ドーパミントランスporter (DAT)ノックアウトマウスなどが挙げられる。これらは、高活動、メチルフェニデートに対する反応性の変化、注意の低下、衝動性など、AD/HDの症状の一部を再現している。しかし、これらがAD/HDの多様な症状と原因を全て再現しているとは言えない。また、AD/HDの症状と、モデル動物の表現型との一致に関する定義もあいまいである。さらに、これらのモデルマウスの中で表現型の分子的基盤が明らかになっているものは少数であり、AD/HDの効率的な治療法の開発のためには、現状存在しているモデル動物だけでなく、新規のAD/HDモデルを複数開発する必要がある。

2. 研究の目的

平成19年度まで、理研GSCゲノム機能情報研究グループでは、精神・神経疾患モデルマウスの作出を目的としてENU (N-Ethyl-N-nitrosourea) 誘発突然変異マウスの行動関連表現型の大規模スクリーニングを行ってきた (理研ENUミュータジェネシスプロジェクト)。また、現在は理研バイオリソースセンター (BRC)・マウスクリニックの一員として網羅的な行動表現型解析に携わっている。我々は、研究期間内に、これまで理研ENUミュータジェネシスプロジェクトにおいて作出された精神・神経疾患モデルマウスに関して、AD/HD様の表現型 (多動、注意欠陥、メチルフェニデートによる鎮静効果) が再現されたものを選択して行動薬理的、組織学的、生化学的解析を行うことによりこれらのマウスのAD/HDモデルマウスとしての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

我々は現在、理研BRCマウスクリニックにおいて変異マウスの大規模表現型解析を行っている。この中で、申請者は行動表現型解析システムの開発を担当しており、本研究の行動解析はこの、ハイスループット表現型解析プラットフォームをベースに進めた。

これまで理研ENUミュータジェネシスプロジェクトで開発してきた、AD/HDの主症状である多動に該当する高活動性マウスのなかで、遺伝解析により変異遺伝子座が明確に特定できたものをAD/HDモデルの候補とし、更に二次的な行動学的スクリーニングを行った。新規物体に対する注意の度合いを検討するための新規物体探索試験 (注意欠陥の有無に相当する) を用いてAD/HDモデルとしての妥当性を検討した。更に、表現型スクリーニングにおいて確認された多動性が、AD/HDの主要な治療薬であるメチルフェニデートにより抑制されるかどうかの検討を行った。これらの試験においてAD/HDモデルとして妥当であると考えられるものに関し、さらに組織学的解析を行った。AD/HD児においては脳神経系において解剖学的な異常が観察される場合があるため、変異マウスと野生型マウスの脳組織切片の比較を行った。また、AD/HDにおいて機能異常が示唆されている、前頭前皮質及び、線条体など大脳基底核の神経細胞の興奮状態の比較を行った。これは、脳神経細胞の興奮の指標となる転写因子の一つであるc-Fosタンパクの免疫組織染色を行い、各領域におけるc-Fos陽性細胞を計数して比較する事により行った。

4. 研究成果

ENU誘発突然変異によってAD/HD類似の行動異常を示すモデルマウスのスクリーニングを行うとともに、表現型異常の責任遺伝子の同定を行った。その結果、open-field testで高活動を示したM-174変異体とM-1736変異体をAD/HDモデル候補として単離し、より詳細な解析を行なった。

M-174変異体は遺伝解析の結果、情染色体優性を示し、変異電子が第2染色体上に存在する事が

明らかになった。更に詳細な連鎖解析と候補遺伝子の塩基配列の確認を行ったところ、NMDA 受容体のサブユニットの一つ、*Grin1* 遺伝子上にミスセンス変異を持つ事が明らかになった。この M-174 変異体に関して open-field test、home-cage activity test、社会行動試験、新規物体探索試験などの行動試験を行い、それぞれの試験における行動面での表現型異常を明らかにした。

M-174 は、新規環境か居住環境かに関わらず活動性が上昇していた。また、新規物体に対する興味は増大したのに対し、他個体に対する注意が有意に低下した。さらに、AD/HD の治療薬である、メチルフェニデートを用いた行動薬理的解析を行い、この変異体の高活動が、MPH により抑制される事を明らかにした。これは、ヒト AD/HD 患者における逆説的鎮静効果と呼ばれる現象を再現している。さらに、脳組織中の cFos 発現の分布、ERK タンパク質のリン酸化を解析した。その結果、cFos 発現の分布が変異体と野生型との間で顕著な差が見られた。特に、変異体の前頭前皮質において神経細胞の過剰な興奮が見られ、さらに、これがメチルフェニデート投与によって野生型に対して生理食塩水を投与した場合のレベルまで抑制される事が明らかになった。また、ERK タンパク質のリン酸化についても変異体において得意なパターンが見出された。実験により得られたこれらの知見を投稿論文として発表した。さらに、日本マウスクリニックの一連の標準検査を行なったところ、血算検査における血中好酸球と白血球の増加、血液生化学検査における血糖値や血中脂質の低下、アディポサイトカイン検査におけるレプチン量の低下などの特徴的な表現型が観察された (http://www.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/en/genotypeview/pheno_index_en.html)、ヒトの発達障害の診断や分子メカニズム解明への応用が期待される。

M-1736 変異体に関して詳細な表現型解析を行なったところ、居住環境、新奇環境における高活動が観察された。また、新奇物体探索試験を行ったところ、物体時間の減少が確認された。さらに、この新規物体探索時間の減少と高活動などの異常行動が、メチルフェニデート投与によって著明に抑制される事が明らかになった。さらに、大脳皮質樹状突起における微小管構造の異常、大脳皮質の層構造の発生段階における異常が確認された。これらのことから今後、AD/HD モデルマウスとしての活用が期待される。今後は、M-174 と同様の網羅的な表現型解析を行ない、疾患モデルとしての妥当性を検討する必要があるため、日本マウスクリニックにおける標準表現型解析に供する準備を行なっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Furuse T., Wada Y, Hattori K, Yamada I, Kushida T, Shibukawa Y, Masuya H, Kaneda H, Miura I, Seno N, Kanda T, Hirose R, Toki S, Nakanishi K, Kobayashi K, Sezutsu H, Gondo Y, Noda T, Yuasa S, Wakana S. Phenotypic characterization of a new *Grin1* mutant mouse generated by ENU mutagenesis. *Eur J Neurosci.* 2010 Apr;31(7):1281-91. 2010. (査読あり)
- ② Wakana S., Suzuki T., Furuse T., Kobayashi K., Miura I., Kaneda H., Yamada I., Motegi H., Toki H., Inoue M., Minowa O., Noda T., Waki K., Tanaka N., Masuya H., Obata Y. Introduction to the Japan Mouse Clinic at the RIKEN BioResource Center. *Exp Anim.* 2009 Oct;58(5):443-50. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 古瀬民生 他「Phenotypic analyses of an ENU mutant mouse which exhibits hyper-locomotor activity」(BMB2010) 2010/12/7 神戸コンベンションセンター・神戸市
- ② 古瀬民生、若菜 茂晴 「ENU ミュータジェネシスによる注意欠如・多動性障害 (AD/HD) モデルマウスの開発」(第 3 回疾患モデルシンポジウム) 2010/11/18 中央大学駿河台記念館・東京
- ③ 古瀬民生 他 「ENU ミュータジェネシスにより作出された高活動変異マウスの表現型解析」(NEURO2010) 2010/9/2 神戸コンベンションセンター・神戸市
- ④ 古瀬民生、若菜茂晴 「マウス表現型解析基盤の標準化にもとづく行動解析—理研 ENU ミュータジェネシスプロジェクトからマウスクリニックへ」(「社会性認識」学際脳科学シンポジウム) 2009/11/5 金沢大学・金沢市
- ⑤ Furuse T. et al. Comprehensive phenotype analyses of ENU induced mutant mouse that carries a missense mutation in *Grin1* gene. 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2009). October 20, 2009. Chicago, IL, USA.

[その他]

ホームページ等

http://www.brc.riken.go.jp/lab/jmc/mouse_clinic/m-strain_jp.html

http://www.brc.riken.jp/lab/animal/mailnews/nm201006_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古瀬 民生 (FURUSE TAMIO)
独立行政法人理化学研究所・マウス表現型解
析開発チーム・開発研究員
60392106

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし