

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12606

研究課題名(和文)映像解析による「マウス社会的ストレス応答指標」の開発

研究課題名(英文) Establishment of video-analysis-based behavioral index of social stress in mice.

研究代表者

掛山 正心 (Takeyama, Masaki)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：30353535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：「社会性」は認知機能と並んでヒトをヒトたらしめる重要な機能であり、化学物質など環境危険要因の曝露がそれを害する恐れが指摘されている。我々は動物実験において、ダイオキシン等の胎仔期曝露が、発達障害当事者やそのモデルマウスが示すような社会的場面を避ける行動ならびに社会的ストレス場面における脳活動異常を引き起こすことを明らかにしてきた。本研究では、独自開発を進めてきた映像解析システムを用い、社会的ストレスに着目した新たなマウス社会行動の解析指標ならびにそのデータ解析アルゴリズムを開発し、実用化することに成功したと言える。

研究成果の概要(英文)："Sociality" is an important brain function to human beings as well as cognitive function, and it is pointed out that exposure to environmental risk factors such as chemical exposures may harm it. In animal experiments, we have revealed that perinatal exposure to dioxin causes social behavioral abnormality, accompanied with brain activity abnormalities in social stress situation. In this research, we succeeded in developing and practicing the analysis index of new mouse social behaviors focusing on social stress, as well as its data analysis algorithm, using the image analysis system.

研究分野：環境脳科学

キーワード：社会行動

1. 研究開始当初の背景

胎児・乳幼児に対する化学物質曝露が、発達障害やうつ病などでみられるような「社会性」の問題に関連するという懸念は、米小児科学会の公式声明(2012)のように臨床的立場からも指摘されるほど環境学分野を超えた重要課題である。それにも関わらず「社会性」を指標とした健康リスク評価が皆無に等しいこと背景には、動物実験において「社会性」を定量化することが難しく、取り組みが極めて乏しいことがあげられる。

我々は IntelliCage 全自動行動解析システムをマウス毒性試験に最初に取り入れ、また独自の課題を開発してきた(Behav Brain Res 221:172-181, 2011 など)。そして一般的な記憶機能には影響が顕われない極めて低用量のダイオキシンの胎仔期曝露が、「社会的競争の場面を避ける」社会行動異常を引き起こすことを明らかにした(Plos One 7:e50741, 2012、共同通信、東京新聞、ナショナルジオグラフィックニュース等報道)。この行動表現型がヒトの「社会性」のどのような異常にあてはまるのかは議論が残るものの、社会的ストレスを負荷された時のマウス神経活動のそれは、ヒトにおいて社会性に顕著な問題をもつ発達障害当事者のケースに類似することも見出した(同論文)。さらに発達障害モデルである幼若期社会環境隔離(Physiol Behav 137:42-52, 2014)や大脳皮質内の異所性皮質(J Neurosci 35:12432-12445, 2015)でも同様の症状を示すことも明らかにした。

すなわち、従来考えられていた以上にマウス毒性試験において「社会性」を指標に用いることが可能であり、議論の余地の残るマウス社会行動の意味を説明しうる新たな解析技術が必要である。

2. 研究の目的

「社会性」は認知機能と並んでヒトをヒトたらしめる重要な機能であり、化学物質など環境危惧要因の曝露がそれを害する恐れが指摘されている。我々は動物実験において、ダイオキシンの胎仔期曝露が、発達障害当事者やそのモデルマウスが示すような社会的場面を避ける行動ならびに社会的ストレス場面における脳活動異常を引き起こすことを明らかにしてきた。本研究では、独自開発を進めてきた映像解析システムを用い、社会的ストレスに着目した新たなマウス社会行動の解析指標ならびにそのデータ解析アルゴリズムを開発し、実用化することを目的とした。

3. 研究の方法

すべての動物実験は、早稲田大学生物実験管理委員会、遺伝子組換え実験審査委員会、動物実験審査委員会の承認・管理・指導のもと行なった。オペラント装置を内蔵した集団型全自動マウス行動解析システム IntelliCage を用い、我々がダイオキシンの曝露実験の際に開発した「社会的競争環境課題」

(Plos One 7:e50741, 2012)を行った。四隅にある水飲み場(コーナー)には、一度に1匹のマウスしか入れない。我々の課題は、4箇所の水飲み場を16匹でとりあう、いわば椅子取りゲームのような社会的競争環境を作ることができる(毎日決まった3時間だけ試験を行う等の条件による)(Front Neurosci 9:91, 2015, J Neurosci 35:12432-12445, 2015)。

本研究では映像解析と生理学的解析を組み合わせて、試験時のストレス応答反応の検出を試みた。同定済の「社会的競争の場面を避ける」モデルマウスや、逆に競争場面で優位性を示すモデルマウスのうち、準備が容易なものをを用い、競争状態において表出する「他個体との関係性」を、他個体と被験マウスがつくりだす関係性場面、他個体が表出する行動、被験マウスの対他行動について類型化して解析することで、生理学的ならびに行動学的な指標を開発した。

生育時の社会的環境に着目し、集団飼育した「群飼マウス」と1匹だけで飼育された「隔離マウス」を作成し解析に用いた。

4. 研究成果

「群飼マウス」は数時間で寄り添って寝るようになるが、1匹だけで飼育された「隔離マウス」は寄り添うのに24時間以上を要した。さらに群飼マウスでも隔離マウスと寄り添うのには時間がかかること、すなわち自身の経験(性質)だけでなく、他個体の性質によって行動パターンが変化した。

本研究では、他個体の性質(既知(familiar)のマウス/未知(stranger)のマウスと出会った時)によって被験マウスが受ける社会的ストレス応答指標の違いを検出した。

「寄り添い行動」を、30分間の平均個体間距離が60mm未満である状態と定義した。実験開始後から初めて寄り添い行動を示すまでに要した時間(Latency)は、試験開始後からの経過時間を30分毎に分け、各マウスペアにおける平均個体間距離(mm/sec)を算出し、初めて基準(平均個体間距離が60mm未満)を満たした時間とした。

あるマウスペアの個体間距離が60mm以上から未満になることを「アプローチ」と定義した。また、アプローチが起こった時刻から過去3秒間の総移動量を2匹間で比較し、移動量が多かったマウスが少ないマウスにア

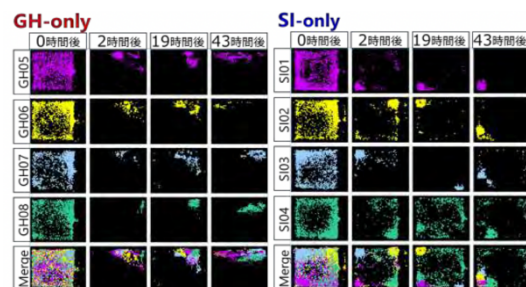


図1

アプローチしたと定義し、アプローチの時刻と方向を算出した。

成育環境が成熟後の社会的飼育環境における行動にどのような影響を与えるか検討するため、離乳時から隔離飼育されたマウス (socially-isolated mice, SI マウス) と集団飼育されたマウス (group-housed mice, GH マウス) を作成した。GH マウスと SI マウスの中からそれぞれ 4 匹、互いに未知の雄マウスを実験ケージに投入し、連続 4 日間同居させた。GH マウスのみ 4 匹を GH-only 条件、SI マウスのみ 4 匹を SI-only 条件とし、3 回ずつ MAPS による行動解析を行った。

試験開始から 1 時間毎に各マウスの滞在場所をプロットし、滞在分布の時間変化を検証した。その結果、試験開始直後 (0 hr) は GH マウス、SI マウスどちらもケージ内を探索する様子が見られた。その後、GH マウスは数時間以内に 1 ヶ所に寄り添う様子が観察されたのに対し、SI マウスでは 4 隅の各コーナーを各マウスが陣取る様子が観察された。SI マウスが 1 ヶ所に寄り添うようになるまでには 1 日から 2 日ほど要した (図 1)。

マウスの個体間距離を定量化したところ、明期、暗期どちらにおいても SI マウスペア (SI-SI) の個体間距離は GH マウスペア (GH-GH) より有意に長かった。また、GH マウスペアの個体間距離の変化には概日リズム (明期において同距離が短く、暗期において長い; それぞれ約 60 mm と 100 mm) が観察された。GH マウスは非活動期の明期において互いに寄り添って寝ることが多く、明期の個体間距離 (約 60 mm) はこの行動によるためと考えられる。一方、SI マウスペアの個体間距離は Day 2 において明期と暗期の差は見られない。ただし、SI マウスペアの個体間距離は明期、暗期とも日ごとに短くなっていき、Day 4 では明確な概日リズムが見られた (図 2)。

この休息時に寄り添う行動を定量化するため、「寄り添い行動」を「2 個体間の 30 分間の平均個体間距離が 60 mm 未満の状態」と定義した。まず、試験開始後から初めて寄り添い行動が観察されるまでの時間 (Latency) を GH-only 条件と SI-only 条件で比較した。その結果、SI マウスは寄り添い行動を起こすまでに GH マウスより有意に長い時間を必要

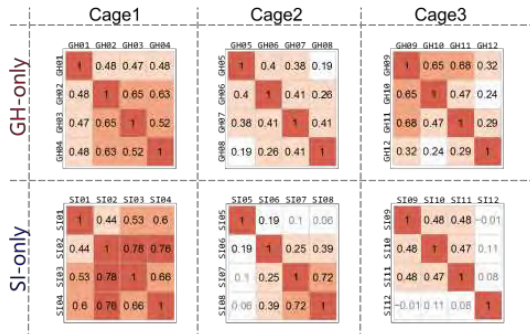


図 2.

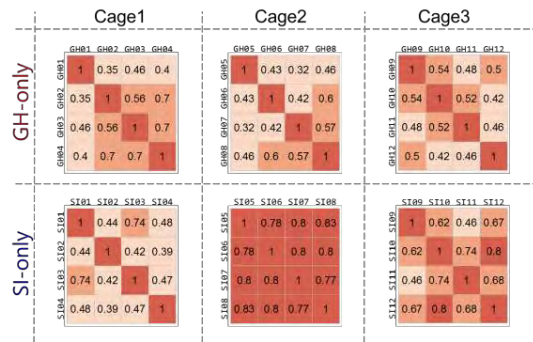


図 3.

とすることが分かった。

SI マウスペアの寄り添い行動の割合は明期暗期ともに日ごとに増えていき、最終的に、Day 4 の暗期において SI マウスペアは GH マウスペアと同レベルの寄り添い行動を示した (図 3)。これらの結果から、SI マウスは休息時・非活動時の社会性行動を示しにくいと考えられるが、その表現型は時間と共に回復する可逆的なものであることが示された。

GH-only 条件と SI-only 条件の結果から、SI マウスは未知の個体との関係性構築により時間を要するが示された。では、性質の異なる GH マウスと SI マウスが同居した場合、それぞれの性質はどう影響しあうのか? ここでは、GH マウス 2 匹、SI マウス 2 匹を同居させる GH-SI mixed 条件を作成した。

滞在分布をみると、試験開始後、まず GH マウス同士が 1 ヶ所に集まり、そこに SI マウスが加わっていく様子が観察された。寄り添い行動が最初に起こるまでの Latency 解析でも、GH マウスペア (GH-GH) が最も短く、SI マウスペア (SI-SI) が最も長く、GH マウスと SI マウスのペア (GH-SI) はその中間となった。実験ケージ内で各マウスペアが寄り添い行動を示した順番を解析したところ、GH-GH ペアは 7 ペア中 7 ペア (100%) が寄り添い行動を最初に示し、SI-SI ペアは 7 ペア中 4 ペア (57.1 %) は寄り添い行動が最後になった。残りの SI-SI ペア (42.9%) は中位であった。Day 2 以降における寄り添い行動の割合は、マウスペアタイプ間の差は見られなかった。これらの結果から、GH-SI mixed 条件における SI マウスが社会性行動を示すまでの時間は SI-only 条件の時に比べ短くなっていることが示唆された。

これまでの隔離飼育マウス並びに集団飼育マウスの寄り添い行動やアプローチおよび社会的接触時間の解析、活動量の相関解析の結果をあわせて考えると、未知マウスとの社会的関係性の構築は自身の行動特性のみならず、ケージメイトの行動特性にも影響されることが示唆された。

以上の成果により、独自開発を進めてきた映像解析システムを用い、社会的ストレスに着目した新たなマウス社会行動の解析指標ならびにそのデータ解析アルゴリズムを開発し、実用化することに成功したと言える。

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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

掛山正心、「高次脳機能の健康を阻害する幼少期の環境要因と遺伝要因」第86回日本衛生学会学術総会シンポジウム(招待講演)、2016年.

Masaki Takeyama.

Introduction of symposium: Mouse social behavior, environmental and genetic factors. 第39回日本神経科学大会(招待講演)、2016年.

掛山正心、脳発達における AhR の役割とダイオキシン発達神経毒性 環境ホルモン学会第19回研究発表会(シンポジウム講演)(招待講演)、2016年.

掛山正心、「ASD 病態と OXT の薬効メカニズム解明を目指した齧歯類モデル動物の行動解析技術」次世代脳プロジェクト 2016 年冬のシンポジウム AMED 企画シンポジウム(招待講演)、2016年.

Waka Ujita, Nozomi Endo, Daisuke Ichikawa, Toki Saito, Hiroshi Oyama, Masaki Takeyama.

Early weaning induces high-dominance social behavior of mice under group-housed conditions. 第39回日本神経科学大会、2016年.

宇治田和佳・遠藤のぞみ・小山博史・掛山正心、マウス早期離乳が成熟期における集団内社会性行動に及ぼす影響 第25回日本行動神経内分泌研究会、2016年.

京相和貴・宇治田和佳・若菜茂晴・遠藤のぞみ・掛山正心、Grin1 ミュータントマウスの社会性行動の解析 第25回日本行動神経内分泌研究会、2016年.

掛山正心、マウスにおける早期環境要因操作による神経発達障害の形成 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会(招待講演)、2017年.

掛山正心、集団生活下のマウス個体識別と行動計測 日本動物行動関連学会 2017(招待講演)、2017年.

Takeyama M. Social Competitive Dominance in Group-Housed Mice. Social Neural Networks Research Unit Kickoff Symposium (招待講演)(国

際学会)、2018年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

掛山 正心 (TAKEYAMA, Masaki)

早稲田大学人間科学学術院・教授

研究者番号: 30353535

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

三嶋 博之 (MISHIMA, Hiroyuki)

早稲田大学人間科学学術院・教授

研究者番号: 90288051

遠藤のぞみ (ENDO, Nozomi)

奈良県立医科大学・研究助教

研究者番号: 90802819