

令和 2 年 8 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08562

研究課題名(和文) 発達期脳内GABA変動からみた自閉症モデルマウスの病態解析および早期治療法の探索

研究課題名(英文) The clinical condition analysis and search of the early therapy of the autistic model mouse in view of GABA change in the developmental brain.

研究代表者

山田 順子 (YAMADA, JUNKO)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：30334965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症を含めた発達障害は脳機能の疾患であるが、詳しい病態は未だ不明である。一方で早期介入により改善できる可能性が多い疾患でもある。本研究ではバルプロ酸(VPA)が脳内GABA抑制システムを変化させ行動に変化をもたらす可能性に着目し、VPA母体投与および、成長期VPA投与の両方の投与方法を用いた自閉症モデルマウスの病態解析を行い運動介入による効果を解析した。運動介入により、常同行動の減少、記憶・学習障害の改善がみられたが、活動量には両群で違いはみられなかった。以上の結果から生後VPA投与にも記憶障害、常同行動など脳へ何らかの影響を与えていること、運動により改善される可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達障害は脳機能の障害であると考えられるが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。本研究は病態解明および運動介入の効果を検討することを目的とした。本研究では自閉症モデル動物を用いて周生期及び成長後の行動変化を解析し運動介入効果を解析した。母体にバルプロ酸を投与したマウスは生後直後に変化が見られた。生後14日でVPA投与したマウスも行動変化が見られたが、運動介入により改善する傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：Developmental disorders including autism are disease of the cerebral functions, but the detailed clinical condition is still unknown. On the other hand it has the likelihood that can be improved by early intervention. The aim of this study is to investigate pathological analysis of the autism-like behavior and to verify of the interventional approaches using the VPA administration autism model mice. The VPA administration was performed prenatal and postnatal groups. The effect of exercise was confirmed as for to improvement of the stereotyped behavior and memory disorder but not of amount of activity. These data suggested that not only prenatal but also postnatal administration of VPA are influence memory and stereotyped behavior, and the exercise might be useful for the improvement of these symptoms.

研究分野：生理学

キーワード：脳 発達 自閉症 マウス

1. 研究開始当初の背景

発達障害の現状：発達障害とは、主に広汎性発達障害、ADHD（注意欠如・多動性障害）、学習障害（LD）、知的障害の総称であり、学齢児童における割合は、6.5%に及んでいる（文部科学省調査 2012）。発達障害の症状は成長と共に自然消失することは少なく、成長に従い心身症や学校不適応、社会不適応などの二次的な不適応やいじめなどの問題に進展していく可能性が多いため、保護者の負担も増大する。**自閉症を含めた発達障害は脳機能の疾患であるが、詳しい病態は未だ不明である一方、早期介入により改善できる可能性が多い疾患**でもある。

発達期の脳：母親が妊娠中に精神的ストレスを受けた子供には異常行動や精神遅滞が二倍も多いことが知られ（Scott, 1973）胎中の脳障害が疑われているがそのメカニズムは不明である。動物実験でも母体ストレスにより仔ラットの認知学習機能が低下することが報告されている。興味深いことにストレス脆弱性の臨界期は神経幹細胞から発生した神経細胞が大脳皮質を形成する時期に一致し、この時期本来は抑制性に働く GABA が Cl⁻流出による興奮作用でニューロンの分化や細胞移動に関与したり、シナプス形成、強化を促進することが示唆されている（後述）。このように高次機能を担う大脳皮質発達初期の GABA の役割は古典的概念の“抑制性伝達物質”とは大きく異なることが最近明らかになってきた。

バルプロ酸投与による自閉症モデル動物：胎生期にてんかん治療薬であるバルプロ酸に暴露されると、自閉症の発症リスクが上昇するという報告が 2013 年 JAMA 誌に発表され（Christensen et al. 2013）胎生期母体暴露による自閉症モデル動物の研究も近年増えてきているが、発症メカニズムはいまだ不明である。ここで注目すべきことは**バルプロ酸（VPA）は GABA トランスアミナーゼの阻害薬であり、これは脳内の GABA を増加させる働きをもつこと**である。GABA 増加は母体には発作抑制として働くが、前述のように胎生期、出生直後では GABA は興奮性に働いているため、神経ネットワーク発達過程において何らかの障害が生じていると推察されるが、ヒトではシナプスレベルでの検証は不可能であるためこのモデルは有用である。

2. 研究の目的

前述のとおり、脳内の主要な抑制性伝達物質である GABA は脳の発達期や神経障害時には分化、移動、神経ネットワーク形成・強化などに関与する非常に重要な物質であり、さまざまな疾患にも関与するが、事前に操作することで治療・予防につながる可能性が高い。また、脳の損傷時の運動回復にはリハビリテーションが有効であるが、脳の障害ともいえる発達障害に対しても運動療法が有効である可能性は容易に想像できる。

本研究では、バルプロ酸投与による自閉症モデル（VPA マウス）を作製し、病態解明、運動介入による症状改善、GABA 機能正常化のための治療法探索、性差、を検討することを目的とし、（1）自閉症モデル病態の解明、予防法の探索（2）自閉症症状への運動介入による改善効果の検討（3）性差の検討を行う。

3. 研究の方法

当初の計画ではバルプロ酸ナトリウム（VPA）母体投与し生まれた仔のみを使う予定であったが、生後 VPA 投与マウスへの影響も見た。

(1) VPA 投与

母体投与は 12.5 日の妊娠マウスに VPA 600mg/kg で母親の頸部に皮下投与を行い、生後投与は P14 で 400mg/Kg の VPA を頸部に皮下投与した。

(2) 出生前 VPA 投与マウスの解析

超音波発声（ultrasonic vocalization: USV）解析：

マウスが発する USV は、人間の言語コミュニケーションに相当し、特に生後 1 週間程度の間認められる母子分離による USV は、各種自閉症モデルマウスにおいてその低下が報告されている。また、仔は 5 分を超えると体温保持のため発声数が減少するため、本研究においても記録時間を 5 分間とした。P3 および P8 マウスを、長方形の発泡スチロールの容器（18cm×18cm×19.5cm）に入れ、容器の蓋部分に UltraSoundGate CM16/CMP マイクロフォンを取り付けた。発声は、Avisoft Recorder ソフトウェアを用いて 250kHz の Sampling rate および 16bit Format で、マイクロフォンで収録し、UltraSoundGate 416Hb 録音インターフェイスを介して記録し 1 分間当たりの発声数を解析した。

社会性テスト：

マウスの社会性を調べるためにスリーチャンパーテストを行った。同齢で以前に未接触のマウス（stranger mouse）を入れたワイヤーケージと空のケージ（empty cage）を配置して、記録を 10 分間行った。empty cage がある区画を empty zone、stranger mouse 側の区画を stranger zone とした。テストは HD Webcam C615 でビデオ記録し、Smart 3.0 ビデオトラッキングシステムにより、各区画で過ごした時間、各ワイヤーケージに対する社会的相互作用（におい嗅ぎ行動、鼻突き）数を解析した。

概日行動リズム：

P40 で、三種混合麻酔薬をマウスに腹腔内投与（0.01ml/g）し、体内埋め込み式運動量計測装置（nano tag®）を頸部皮下に埋め込んだ。そして、術後 1~2 日回復させた後、ホームケージ内での運動量を約 2 日間測定した。運動量は、3 軸加速度センサで計測した XYZ の合成波に対して、単位時間当たりに閾値を超えた回数（振動数：170）を運動量としてカウント

される。

(3) 生後 VPA 投与マウスの解析

生後 VPA 投与による行動への影響を見ること、運動介入による行動変化、雌雄差を見るため以下の解析を行った

運動介入：

運動介入にはトレッドミル運動を行った、すべての群に対し運動介入3日前から訓練し、運動群は P34 ~ P61 の4週間毎日 10m/分、1時間トレッドミルによる運動を行い、非介入群はプレトレーニングのみとした。

行動解析：

オープンフィールドテスト、社会性テスト(スリーチャンバーテスト)、記憶学習テスト(8方向迷路試験)

4. 研究成果

出生前 VPA 投与マウスの解析

出生数と体重：母体 VPA 暴露による出生数、出生仔の体重水位はコントロール(母体生理食塩水投与)群と比較して差はみられなかった。

超音波発声(USV)：P3において、コントロール群に比べて VPA 群では発声数が有意に減少していた。一方 P8 においては P3 コントロールに比べ発声数は減少し、コントロール、VPA の2群間に有意な差はみられなかった。

社会性の比較：スリーチャンバーテストで、滞在時間は、コントロール群と VPA 群ともに empty zone に比べて stranger zone で有意に多くの時間を過ごしていた。アプローチ数では、コントロール群は empty cage に比べて stranger mouse に対して有意に接触数が増加していたが VPA 群においては有意な差はみられなかった。

概日行動リズム：2日間の総活動量を解析したところ、コントロール群に比べて VPA 群では、有意に活動量が増加していた。2日間を明暗期に分けると、暗期ではコントロール群に比べて VPA 群で活動量が増加していた。明期では2群に有意な差はみられなかったが、VPA 群で活動量が増加傾向にあった。

以上の結果より、母体 VPA 投与により、生後間もないマウスでは母親を呼ぶ回数が減少し、成長後では(P40)活動量の増加が見られることがわかった。

生後 VPA 投与マウスの解析：総活動量：運動介入前の総活動量は雌マウスで VPA 投与群が優位に増加していた。一方、運動介入後は雌雄ともコントロール、VPA 投与群の違いは見られなくなった。

オープンフィールドテスト解析：運動介入前はオスの VPA 投与群が著しく中央滞在時間が増加していた。

社会性解析：スリーチャンバーテストでは、オスではコントロール、VPA 群で違いは見られなかったが、ストレンジャーマウスに対する鼻付き行動が VPA 雌マウスで優位に増加が見られた。運動介入による効果はどの群でも見られなかった。

常同行動解析：Preening/Grooming による常同行動解析：雌雄とも VPA 群で有意に増加が見られた。

記憶テスト(八方向迷路)解析：雌でのみ VPA 群で記憶時間の延長が見られた。

運動介入により、常同行動の減少、記憶・学習障害の改善がみられたが、活動量には両群で違いはみられなかった。雌雄では、常同行動の改善は雌で顕著であり、記憶障害の改善は雄で顕著であった。以上の結果から、生後 VPA 投与にも記憶障害、常同行動など脳へ何らかの影響を与えていることが示唆された。

一方、運動介入によりこれらの障害が改善される可能性が明らかとなった。現在運動介入による効果が神経新生によるものなのか、シナプス可塑性によるものなのかを解析するため、神経新生解析用に運動介入開始から7日間 BrdU を連続投与した脳サンプルの解析を進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato C, Tanji K, Shimoyama S, Chiba M, Mikami M, Koeda S, Sumigawa K, Akahira K, Yamada J.	4. 巻 31(2)
2. 論文標題 Effects of voluntary and forced exercises on motor function recovery in intracerebral hemorrhage rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 189-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001396.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koeda S, Yoshikawa T, Sato C, Sumigawa K, Yamada	4. 巻 31(11)
2. 論文標題 Ultrasound irradiation before high-load exercise reduces muscle rigidity associated with delayed-onset muscle soreness.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. J Phys Ther Sci.	6. 最初と最後の頁 922-924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1589/jpts.31.922.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2.Nikaido Y, Furukawa T, Shimoyama S, Yamada J, Migita K, Koga K, Kushikata T, Hirota K, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S.	4. 巻 361
2. 論文標題 Propofol Anesthesia Is Reduced in Phospholipase C-Related Inactive Protein Type-1 Knockout Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther	6. 最初と最後の頁 367-374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.116.239145.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1.三上美咲、斉藤まなぶ、高橋芳雄、足立匡基、大里絢子、増田貴人、中井昭夫、中村和彦、山田順子	4. 巻 8
2. 論文標題 幼児期における協調運動と行動及び情緒的問題の関連	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 保健科学研究	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Kazuki Akahira, Koshi Sumigawa, Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The comparison of the synaptic changes with voluntary and forced rehabilitation in intracerebral hemorrhage model rats
3. 学会等名 The 1st Japan-Korea-Taiwan Neurorehabilitation Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Koeda Shuhei, Mana Kishimoto, Shun Mori, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery and synaptic plasticity was affected by the exercise in the hemorrhage model rat
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaki Mikami, Manabu Saito, Takahito Masuda, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada
2. 発表標題 Characteristics of developmental coordination disorders for fine motor skill in 5-year-old children: A 2D video tracking analysis system
3. 学会等名 DCD-13 13th developmental coordination disorder (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Aoi Naraoka, Momoko Tomita, Chihiro Sato, Junko Yamada
2. 発表標題 The Performance of Scissor Skills in Typically Developing Pre-school Children
3. 学会等名 第三回日本DCD学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Misaki Mikami, Manabu Saito, Ayako Osato, Takahito Masuda, Shuhei Koeda, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada
2. 発表標題 The muscle strength in 5-years old children with Developmental coordination disorder
3. 学会等名 第三回日本DCD学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 大岡優輝, 小枝周平, 澄川幸志, 赤平一樹, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 自発運動が脳出血モデルラットの運動麻痺回復に及ぼす効果
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三上美咲, 山本千夏, 斉藤まなぶ, 小枝周平, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 5歳児における協調運動機能へ影響を及ぼす感覚及び認知的因子
3. 学会等名 第二回日本DCD学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 ちひろ, 赤平 一樹, 澄川 幸志, 小枝 周平, 三上 美咲, 山田 順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける運動に伴うモチベーション有無が麻痺回復効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第9回日本ニューロリハビリテーション学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤平一樹, 佐藤ちひろ, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 PIT法を用いた脳梗塞ラットにおける麻痺側肢集中使用後の機能回復効果
3. 学会等名 第9回ニューロリハビリテーション学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kazuki Akahira, Shuhei Koeda, Koshi Sumigawa, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 自発運動が脳卒中後の運動機能回復にもたらす影響
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤平一樹, 佐藤ちひろ, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットに対する自発運動が運動機能回復に及ぼす影響
3. 学会等名 第53回日本作業療法学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三上美咲, 斉藤まなぶ, 小枝周平, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 幼児期における協調運動の問題への感覚機能および認知機能の影響
3. 学会等名 第53回日本作業療法学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤平一樹, 佐藤ちひろ, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 PIT法を用いた脳梗塞ラットにおける麻痺側肢集中使用が運動機能回復に及ぼす影響
3. 学会等名 第53回日本作業療法学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kazuki Akahira, Shuhei Koeda, Koshi Sumigawa, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The effect of the forced limb using training for recovery of the motor paralysis in cerebral ischemic model rat by photochemically induced thrombosis (PIT).
3. 学会等名 Annual meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kazuki Akahira, Shuhei Koeda, Koshi Sumigawa, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 Voluntary and forced rehabilitation to promote motor palsy recovery in intracerebral hemorrhage rats
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabu Saito, Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Taihiro Aoki, Kazutaka Yoshida, Yui Sakamoto, Junko Yamada, Kenji Tsuchiya, Taiichi Katayama, Kazuhiko Nakamura
2. 発表標題 Characteristics of eye movements of 5-year-old children with developmental coordination disorder
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Manabu Saito, Tamaki Mikami, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada
2. 発表標題 Nutritional status of Japanese children with developmental disorders
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junko Yamada, Kazuki Akahira, Misaki Mikami, Yuuri Kato, Chihiro Sato
2. 発表標題 The effect of forced limb training of rats under photochemically induced focal cerebral ischemia
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misaki Mikami, Shuhei Koeda, Ayako Osato, Takahito Masuda, Manabu Saito, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada
2. 発表標題 Features of fine motor skills in 5-year-old children with developmental coordination disorders
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小枝 周平 (Koeda Shuhei) (00455734)	弘前大学・保健学研究科・講師 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	富山 誠彦 (Tomiya Masahiko) (40311542)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	
研究 分担者	佐藤 ちひろ (Sato Chihiro) (70757468)	弘前大学・保健学研究科・助教 (11101)	