

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18719

研究課題名(和文) マウス発達障害モデルを用いた生物学的マーカーの探索

研究課題名(英文) Search for biological markers using mouse developmental disorder model

研究代表者

山田 郁子 (Yamada, Ikuko)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発技師

研究者番号：60568723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスの行動表現型を多面的に評価する行動解析テストバッテリーを用いてヒト発達障害患者の病態に即した動物モデルの開発を行うとともに、発達障害モデルに特有の生理学的・生化学的マーカーの探索を試みることを目的とした。

行動スクリーニングおよびテレメトリーシステムを用いた体温の解析により、既存の発達障害モデル動物とは異なる表現型プロフィールを持つ変異体が見出された。また血中脂質解析ではtriglycerideと活動量で負の相関がみられる系統が見つかった。今後は社会行動と生化学的指標の解析を行い、複数の系統に共通するような行動的、生化学的指標の発見につなげていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトとマウスに共通の行動的・生理学的指標に着目し、同一の個体から多岐にわたる表現型データを収集し、多角的解析による発達障害の新たな生理学的指標の探索を行った。発達障害の診断基準には言語的発達も含まれるため、従来はおおよそ3歳以降にならないと確定診断をすることは困難であった。従来の診断基準には含まれない生物学的特徴は早期診断の補助となる可能性が期待されている。

本研究の結果、従来の発達モデル動物とは異なる行動表現型を示す変異体が見出された。今後、血液生化学といった生物学的指標についても解析を行うことで、予測妥当性を持つモデル動物の開発とそれによる早期診断の確度向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop animal models that matched the symptoms of developmental disorders using a behavioral analysis test battery which evaluates the behavioral phenotype of mice in a multifaceted way. We also aimed to search for physiological and biochemical markers specific to developmental disorder models.

New candidate animal models for developmental disorders were found by behavioral screening and analysis of body temperature using a telemetry system. These models had a different phenotypic profile than existing animal models of developmental disorders. On the other hand, we analyzed blood lipids and found mouse strains that had a negative correlation with blood triglyceride concentration and locomotor activity. In the future, we will analyze social behavior and biochemical indicators, and aim to discover behavioral and biochemical indicators that are common to multiple mouse strains.

研究分野：行動科学

キーワード：発達障害 モデルマウス テレメトリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、発達障害の増加が社会的にも問題とされている(1)。増加の理由として、診断基準の変化や社会的認知度の高まりに伴う診断率の上昇など社会的な要因が挙げられているが、近年の発達障害の増加率は社会的要因のみでは説明のつかないものであり、胎生期、発達初期の環境要因などの生物学的要因の影響も示唆されている。双生児研究などから遺伝要因が発症に大きく関わっていることが報告されており、何らかの脳機能異常が根底に存在すると考えられている(2)。これまでに遺伝説、神経発達障害仮説、環境因子説など数多くの仮説が報告され、それぞれの仮説に基づいたモデルマウスが作製されているが(3)、脳機能の異常から認知的障害に至る具体的な発症メカニズムについてはいまだ未解明の部分が多い。また、実際の臨床場面では自閉傾向と多動など複数の症状を併せ持つケースが多いのに対し、従来の発達障害モデルはそのうちの特定の症状のみを扱ったものがほとんどであるため、臨床に即した多面的な病態を示す疾患モデルの開発が望まれている。統合失調症患者では、脳波の異常や感覚調整機能の障害といった生理学的特徴が見られることが知られている(4)。こういった従来の診断基準には含まれていない生理学的特徴は、患者の持つ遺伝的素因と精神症状という病態との間をつなぐものとして考えられている。発達障害患者においても、感覚神経や自律神経の異常が高頻度で見られることから、発達障害患者に特有の生物学的マーカーの発見が期待されている。

2. 研究の目的

発達障害の病因には多くの仮説があるが、未だ発症メカニズムの詳細な機序は解明されていない。また、診断基準も言語発達やコミュニケーション能力といった高次脳機能を指標としていることから、これまでは病態を反映する動物モデルの作成が困難であった。近年、統合失調症などの精神疾患をもつ患者に共通する生物学的、生理学的特徴が発見され、これらを用いた精神疾患の早期診断、早期治療に期待がもたれている。精神疾患と同様、発達障害にも病因として何らかの脳機能異常が存在すると考えられているため、発達障害の診断に有用な生理学的マーカーの発見が期待されている。

本研究では、既存の遺伝子改変マウスに対して研究代表者が開発した多角的行動表現型スクリーニングシステムを用いて行動表現型の解析を行い、実際の病態に即した多面的な病態を示す疾患モデルマウスを開発を行うことを目的とした。また、本研究で得られた発達障害モデル候補動物および既存の精神疾患モデルマウスに対し、テレメトリーシステムを用いた継続的な生理学的指標の測定および生理学的・血液生化学的データを継続的に集積し、行動表現型との関連を解析することで発達障害や精神疾患の発症を予測可能とする生物学的マーカーの探索を試みる。先天的コレステロールの合成異常を示す Smith-Lemli-Opitz 症候群の患者では約半数で ASD の症状を示すことや(5)、ASD 患者でコレステロールの異常がみられること(6)などから、コレステロールは生物学的マーカー候補として有望であると考えられている。そこで生化学的解析手法として、主に血液生化学による脂質解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 行動表現型スクリーニングシステムによる発達障害モデルマウスを開発

ポジティブコントロールとして既存の発達障害モデルである Shank2 KO 変異体 (Shank2)、Nlgn3 KO 変異体 (Nlgn3) を用いた。また、ENU により作出された Grin1 ミスセンス変異体 (Grin1)、Ikzf5 KO 変異体 (Ikzf5)、Tgm3 KO 変異体 (Tgm3) についてスクリーニングを行った。被験体は野生型と変異体の雄を各 7 個体用いた。テストおよび実施週齢は次の通りである。Light/dark transition test (情動性: 6w)、Open-field test (自発活動性: 7w)、Crawley's social interaction test (社会行動: 8、9w)、Home-cage activity test (自発活動性、活動パターン: 10-11w)、Y-maze test (交替反応: 12w)、Fear-conditioning test (学習・記憶: 13w)、Pre-pulse inhibition test (感覚統制: 14w)。各テストの手続き詳細は日本マウスクリニック HP に記載されている (https://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/business/pipeline.html)。

(2) IMPC 解析データを用いた移動活動量と血液生化学検査の解析

理化学研究所バイオリソース研究センター・日本マウスクリニック (Japan Mouse Clinic: JMC) は、国際マウス表現型解析コンソーシアム (International Mouse Phenotyping Consortium: IMPC) の一員として、遺伝子ノックアウトマウスについての国際的標準プロトコルである IMPReSS (International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens) に基づいた網羅的な表現型解析検査を行っている。これまでに IMPC パイプラインを用いて検査を行った系統のうち Shank2 と Nlgn3 のデータを用い、移動活動量と血液生化学的データとの相関について解析を行った。被験体は野生型と変異体の雌雄を各 7 個体用いた。検査項目および実施週齢は次の通りである。Open-field test (自発活動性: 7w)、Hematology (血算検査: 16w)、Clinical Blood Chemistry (血液生化学検査: 17w)。各テストの詳細な手続きは IMPReSS の HP に記載されている (<https://www.mousephenotype.org/impress>)。

(3) テレメトリーシステムを用いた社会行動、活動量と深部体温の解析

Shank2、Nlgn3、Grin1、Ikzf5、Tgm3 の系統について、野生型と変異体の雄を各 8 個体用いた。8 週齢から 10 週齢時にテレメトリー用送信機を腹腔内に挿入した。テストは 11 週齢時に行つ

た。1日目は10分間の装置順化を行い、同時に装置内での活動量を測定した。2日目に被験体とB6雄を同時に装置内に入れて10分間の社会行動テストを行い、2個体が接触していた時間を社会性の指標として測定した。社会行動テスト終了後に被験体を単独で装置内に入れ、24時間の活動量を測定した。またこれらの測定と同時にテレメトリーシステムを用いて深部体温の測定を行った。行動テスト終了後の12から13週齢時に、血液生化学による脂質解析を行うため採血を実施した。

4. 研究成果

(1) 行動表現型スクリーニングシステムによる発達障害モデルマウスの開発

既存の発達障害モデル動物である *Shan2* と *Nlgn3* ではどちらも Open-field test での高活動および *Crawley's social interaction test* での社会性の低下がみられた。このことから、本研究で用いた多角的行動テストバッテリーシステムを用いた発達障害モデル動物のスクリーニングによって、発達障害モデル候補の検出が十分可能であることが確認された。*Grin1* では既存の発達障害モデルと同様に高活動と社会性の低下の両方がみられ、加えて PPI テストでは驚愕反応と抑制率が低いという感覚異常を示した。一方、*Ikzf5*、*Tgm3* ではこれまでの発達障害モデルとは異なり、高活動を伴わずに社会性の低下のみがみられた (Table 1)。

Table1 行動表現型スクリーニングの結果

Test	index	<i>Shank2</i>	<i>Nlgn3</i>	<i>Grin1</i>	<i>Ikzf5</i>	<i>Tgm3</i>
Light/dark transition test (6w)	Anxiety	—	↓	↓	—	—
Open-field test (7w)	Activity in novel place	↑↑	↑↑	↑↑	—	—
<i>Crawley's social interaction test</i> (9w)	Social activity	↓↓	↓	↓	↓	↓
Home-cage activity test (10-11w)	Activity in familiar place	↑↑	—	↑↑	—	—
Y-maze (12w)	Persistence	—	↑↑	—	—	↓
Fear conditioning test (13w)	Learning & memory	↓↓	—	—	↑↑	—
Pre-pulse inhibition test (14w)	Sensory gating	—	↑	↓↓	—	—

↓↓↑↑:p<.01, ↓↑:p<.05, ↓:p<.10 vs wild type.

多角的な行動テストバッテリーを用いた解析によって、各系統それぞれに多面的な表現型が認められた。また、*Ikzf5* や *Tgm3* では既知の発達障害モデル動物とは異なる表現型プロフィールを示したことから、新たなタイプの発達障害モデル動物候補として有望であると考えられる。

(2) IMPC 解析データを用いた移動活動量と血液生化学検査の解析

Shank2 では変異体のオスで TG の多値が有意に低く、移動活動量との間に負の相関がみられた。*Nlgn3* では雌雄ともにホモで LDL-C の値が有意に高く、また雌では LDL-C と移動活動量との間に正の相関がみられた。TG は雌のみで低く移動活動量と負の相関を示した (Fig.1)。

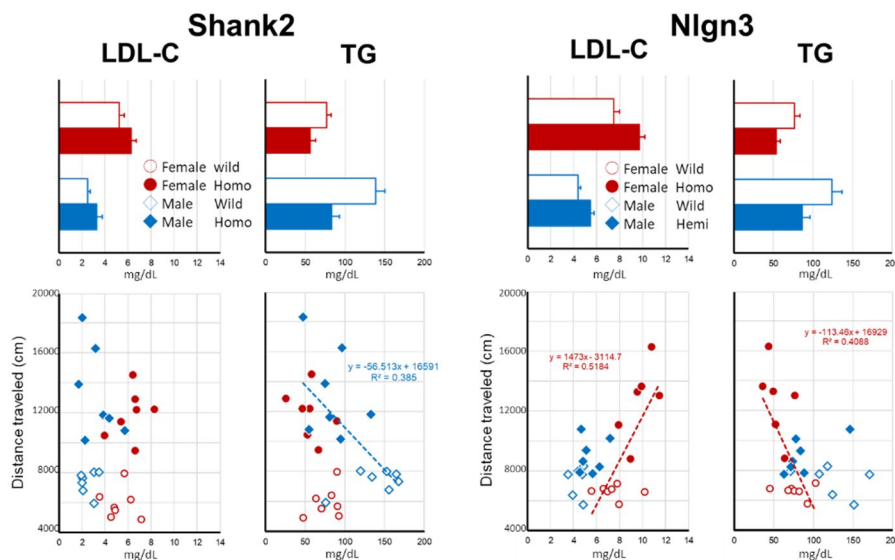


Figure1 Open-field自発活動量と血中脂質代謝の解析

(3) テレメトリーシステムを用いた社会行動、活動量と深部体温の解析

行動テストバッテリーにおいて社会性の低下が認められた系統について、社会行動テストと同時にテレメトリーシステムを用いた深部体温の測定を行った。Shank2、Nlgn3、Ikzf5 では他個体との接触時間が減少しており、社会性の低下が再認められた。しかし、Grin1 と Tgm3 では社会行動の低下は見られなかった (Fig.2)。

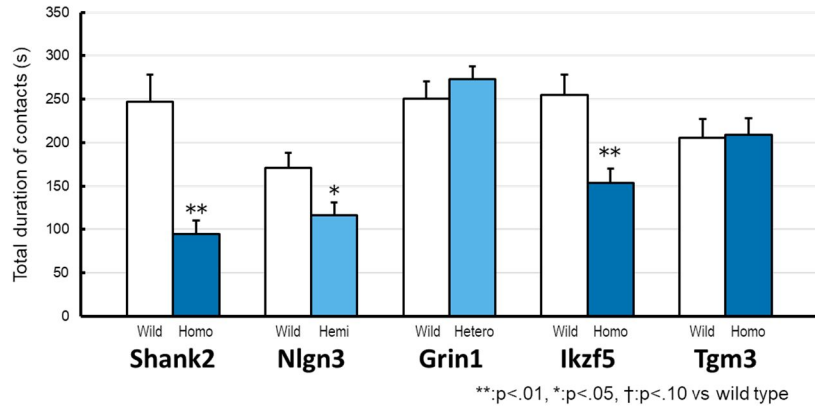


Figure2 社会行動テストにおける他個体との総接触時間

行動テストバッテリーで実施した Crawley 's social interaction test では社会行動を測定する際に相手個体はケージの中に入れており、個体どうしの直接の接触はないが、この実験で用いた社会行動テストでは同じケージに被験体と相手個体を同時にいれるため直接的な身体接触を伴う。そのためテストの結果に違いが出たのではないかと考えられる。社会行動実施時に、テレメトリーシステムを用いて同時にマウスの体温の測定を行った。Nlgn3 では体温の上昇がみられ、また Tgm3 では体温が下降する傾向がみられたが、ほかの3系統では有意な差はみられなかった (Fig.3)。

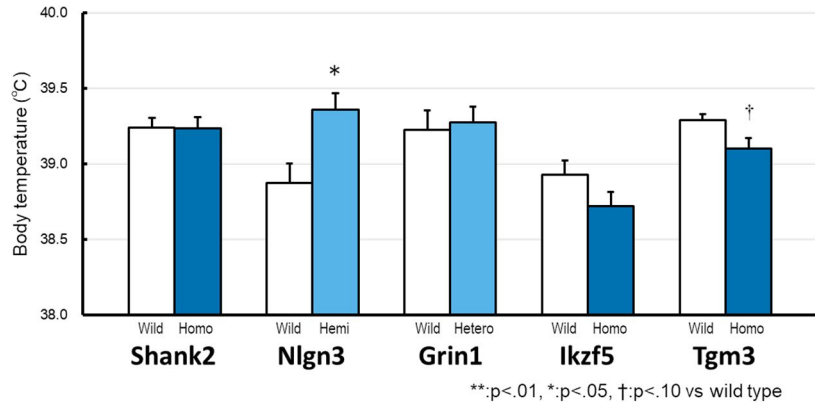


Figure3 社会行動テスト時の平均体温

社会行動テスト終了後、24 時間にわたって活動量と体温の測定を行った。Shank2、Nlgn3 では変異体の活動量が高く、また体温も活動量の増大に合わせて高くなっていった。Grin1 では時刻によって Genotype による体温の差に変動が見られ、明期の活動量が低い時刻には野生型とくらべ変異体の体温が低く、暗期の活動量が高い時刻には変異体の体温がより高くなっていった。また、Ikzf5 では活動量には差異がないが、変異体のほうが体温が高くなっていった。Tgm3 では活動量、体温ともに有意な差は見られなかった (Table2)。

Table2 社会行動テストと体温測定の結果

Test	index	Shank2	Nlgn3	Grin1	Ikzf5	Tgm3
Habituation	Activity	↑↑	↑↑	↑	—	—
	Body temperature	—	—	—	—	—
Social behavior test	Social behavior	↓↓	↓↓	—	↓↓	—
	Body temperature	—	↑	—	—	↘
24hour activity test	Activity	↑↑	↑↑	↑	—	—
	Body temperature	↑↑	↑↑	↑↓	↑↑	—

↓↓ ↑↑:p<.01, ↓ ↑:p<.05, ↘:p<.10 vs wild type.

24 時間活動量の測定後に血液生化学的検査を実施する予定にしていたが、COVID-19 による緊急事態宣言の影響により解析が中断している。血液サンプルは採取済みなので、研究再開後に順次血液生化学解析を行い、活動性、社会行動、体温と血中脂質代謝との相関関係について検討を行っていく予定である

本研究では、既存の遺伝子改変マウスに対して多角的行動表現型スクリーニングシステムを用いて行動表現型の解析を行い、実際の病態に即した多面的な病態を示す疾患モデルマウスの開発を行うことを目的とした。スクリーニングの結果、Ikzf5、および Tgm3 では多動を伴わずに社会行動の異常を示すことが見いだされた。既知の発達障害モデル動物とは異なる表現型プロフィールを示すことから、新たなタイプの発達障害モデル動物候補として有望であると考えられる。また活動量と血中脂質代謝物との解析を行った結果、Shank2、Nlgn3 変異体のいずれにおいても TG が活動量と負の相関を示していた。今後はほかのモデル候補動物についても行動指標と血中脂質代謝との関係についての解析を行い、複数の系統に共通するような行動的、生化学的データを見出して生物学的マーカーとしての検討を行っていく必要がある。

テレメトリーシステムを用いた解析では、活動量、社会行動と深部体温との関係についての解析を行った。おおむね活動量が高いときに体温が高くなる傾向がみられ、Shank2 や Nlgn3 などの既存の発達障害モデル動物ではその傾向が強くみられた。それに対し、Ikzf5 では活動量の増加を伴わない体温の上昇がみられた。発達障害患者では自律神経の調節機能が弱く体温リズムに異常がみられるという報告があることから(7) 新たな発達障害モデル動物の有力な候補として、さらに詳細な検討をおこなっていく必要があると考えられる。

<引用文献>

- 1.Honda et al., Cumulative incidence of childhood autism: a total population study of better accuracy and precision. *DMCN*,2005,47:10-8.
- 2.Robinson et al., A Multivariate Twin Study of Autistic Traits in 12-Year-Olds: Testing the Fractionable Autism Triad Hypothesis. *Behav Genet*, 2012, 42, 245-255.
- 3.Koike et al., Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav. Brain Res.* 2009, 202:1, 114-121.
- 4.Kunugi et al., Prepulse inhibition of acoustic startle in Japanese patients with chronic schizophrenia. *J.Neurosci. Res.*, 2007, 59:23-8.
- 5.ukelis et al. *Am. J. Psychiatry*, 2007, 164, 1655-1661.
- 6.Maekawa et al. *Biological Psychiatry*, 2015, 78:2, 116-125.
7. Hill et al., *Dev Psychobiol*, 1977, 10(6), 579-583

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Karam Kim, Akio Suzuki, Hiroto Kojima, Meiko Kawamura, Ken Miya, Manabu Abe, Ikuko Yamada, Tamio Furuse, Shigenaru Wakana, Kenji Sakimura, Yasunori Hayashi	4. 巻 157
2. 論文標題 Autophosphorylation of F-actin binding domain of CaMKII is required for fear learning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Learning and Memory	6. 最初と最後の頁 86-95
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimazu T, Furuse T, Balan S, Yamada I, Okuno S, Iwanari H, Suzuki T, Hamakubo T, Dohmae N, Yoshikawa T, Wakana S, Shinkai Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Role of METTL20 in regulating β -oxidation and heat production in mice under fasting or ketogenic conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 1179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19615-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山田郁子、串田知子、三浦郁生、古瀬民生、田村勝
2. 発表標題 発達障害モデルマウスにおける移動活動量と血液生化学的データとの関連
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuko YAMADA, Tomoko KUSHIDA, Ikuo, MIURA, Tamio FURUSE, Masaru TAMURA
2. 発表標題 Correlations between behavioral phenotype and biochemical data in developmental disorder model mice
3. 学会等名 6th congress of AsCNP（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田郁子、串田知子、鈴木智広、小林喜美男、三浦郁生、古瀬民生、若菜茂晴
2. 発表標題 発達障害様行動解析テストバッテリーの構築とASDモデル候補マウスの行動表現型解析
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田郁子、串田知子、山末英典、古瀬民生、若菜茂晴
2. 発表標題 ASDモデルマウスに対するオキシトシン投与効果の評価を目的とした表現型解析プラットフォームの開発 (1): コントロールデータの収集
3. 学会等名 日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古瀬民生、山田郁子、串田知子、綾部信哉、吉木淳、山末英典、若菜茂晴
2. 発表標題 ASDモデルマウスに対するオキシトシン投与効果の評価を目的とした表現型解析プラットフォームの開発 (2): 既存モデルマウスを用いた検証
3. 学会等名 日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古瀬民生、幸田尚、串田知子、山田郁子、三浦郁生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、若菜茂晴
2. 発表標題 母体のone carbon metabolism関連遺伝子変異が仔の行動表現型に与える影響
3. 学会等名 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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木智広、古瀬民生、小澤恵代、山田郁子、田中信彦、若菜茂晴、榎屋啓志
2. 発表標題 表現型データウェブ公開サポートシステム「Pheno-Pub」を用いた日本マウスクリニック網羅的表現型情報の公開
3. 学会等名 トーゴの日シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若菜茂晴、田村勝、金田秀貴、鈴木智広、古瀬民生、小林喜美男、山田郁子、三浦郁生
2. 発表標題 日本マウスクリニックにおけるマウスの加齢性網羅的表現型解析パイプライン
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古瀬民生、幸田尚、串田知子、山田郁子、三浦郁生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、若菜茂晴
2. 発表標題 マウスにおける母体のMat2a遺伝子変異による仔の遺伝子発現・行動表現型の修飾
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----