

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K03491

研究課題名(和文)日本で開発された自閉症マウスの超音波コミュニケーション障害の解明

研究課題名(英文)The investigation of ultrasonic communication in autism model mice developed in Japan

研究代表者

和田 博美(WADA, Hiromi)

北海道大学・文学研究院・名誉教授

研究者番号：90191832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内匠ら及び中山らが開発した自閉症モデルマウスの超音波発声を、母仔分離及びレジデント-イントルーダー実験を用いて解析した。内匠らのモデルマウスは母仔分離実験で、多音節で周波数変動を伴う長い発声が爆発的に増加し、パニック様の反応を示した。レジデント-イントルーダー実験では発声数が減少・単調化し、他個体に対する興味低下が認められた。これらのことから超音波コミュニケーションの変異が明白となった。一方、中山らのモデルが示した超音波発声の変異は散発的で一貫性が見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症は世界中で深刻な問題となっており、患者数も増加傾向にある。原因を解明し治療法を開発することが喫緊の課題である。その手段として、自閉症患者と同じ遺伝子異常を持つモデルマウスの開発が進んでいる。自閉症の原因遺伝子が特定できれば治療法開発も可能になる。そこで日本で開発された自閉症モデルマウスを対象に、主要な症状であるコミュニケーション障害の解明を行った。その結果、内匠らが開発したモデルマウスには超音波コミュニケーションの変異が明白に認められ、自閉症モデルマウスとして妥当性が高いとの結論に達した。今後、コミュニケーション障害発症プロセスの解明や遺伝子治療法の開発への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed ultrasonic vocalizations (USVs) in autism model mice by using maternal isolation and resident-intruder tasks. The model mice developed by Takumi et al. indicate explosive increases of USVs with longer durations, multi-syllables and frequency-modulations upon maternal isolation, suggesting panic-like responses. Moreover, the model mice indicate decreases of USVs upon the resident-intruder task, suggesting the reduction of interests in other mice. Thus, abnormality of ultrasonic communication is evident in the model mice. However, the model mice developed by Nakayama et al. don't display consistent changes of ultrasonic communication upon both maternal isolation and resident-intruder tasks.

研究分野：神経行動発達学

キーワード：自閉症 モデルマウス 超音波コミュニケーション 母仔分離 レジデント イントルーダー実験

1. 研究開始当初の背景

自閉症は世界中で深刻な問題となっている。原因の解明や治療法を開発するため、自閉症患者と同じ遺伝子変異を持つモデルマウスが世界各国で開発されている。日本では内匠ら(Nakatani et al., 2009)と中山ら(Katayama et al., 2016)がモデルマウスを開発している。しかしこれらのマウスは、自閉症の主要な症状であるコミュニケーション障害の解明が行われていない。表面妥当性が完全には証明されておらず、モデルマウスとしての妥当性が十分満たされていない。

2. 研究の目的

マウスは自身の欲求や感情を伝えるために超音波を発してコミュニケーションを行う。そこでモデルマウスが発する超音波を解析して正常マウスと比較し、超音波コミュニケーションにどのような変異が認められるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 母仔分離実験 新生仔を母仔分離すると超音波を発して母親を呼び寄せようとする。本実験では母仔分離を用いてモデルマウスの超音波を解析し、野生型と比較して変異を解明する。

被験体：内匠らが開発したモデルマウス(ヒト 15 番染色体 q11-13 領域に相当するマウス 7 番染色体 6.3Mb 領域を重複させたマウス。以後 7H とする)と中山らが開発したモデルマウス(Chromodomain Helicase DNA-binding protein 8 ノックアウトマウス。以後 chd8 マウスとする)を用いた。対照の野生型には C57BL6/J を用いた。7H はオス 23 匹、メス 20 匹、野生型のオス 27 匹、メス 30 匹。Chd8 はオス 22 匹、メス 31 匹、野生型のオス 20 匹、メス 31 匹。

超音波測定：生後 4, 7, 10, 13, 16, 19 日に母仔分離し、1 日 1 回 5 分間超音波を測定した(写真 1)。超音波の測定及び解析には Metris 社のソノトラックとマウス用発声パターン解析ソフトを使用した。

(2) 非接触型レジデント イントルーダー実験 成熟マウスは他個体と相互交渉を行い、その際に超音波コミュニケーションを利用する。レジデント

イントルーダー実験(R-I 実験)では、マウスの居るケージに別ケージのマウスを入れて対面させる。元のケージに居たマウス(R)は侵入したマウス(I)に接近して超音波を発して相互交渉を行う。しかしこの方法ではケージ内に 2 匹のマウスが居るため、どちらが超音波を発したのか識別できない。またオスオスの対面では激しい攻撃が起こり、致命的なダメージを受ける場合もある。そこで我々は非接触型 R-I 実験を開発して実験を行った(写真 2)。

この方法は、R のケージの上蓋上にガラス製の瓶を載せ、中に I を入れる。上蓋があるため 2 匹は互いの体に触れることはできないが、R の超音波は隙間を通して I や測定用マイクに達する。一方 I の

超音波は R には届くが、ガラスの瓶に遮られ測定用マイクには達しない。この改良により 2 匹が

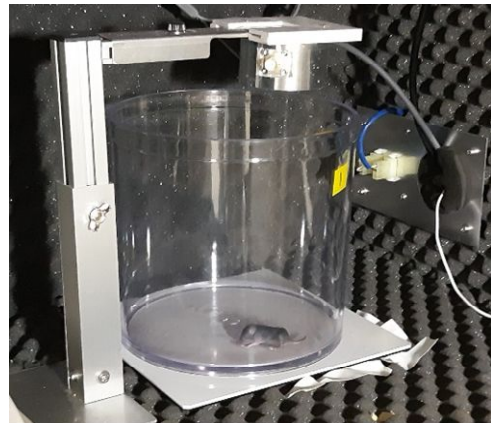


写真 1 母仔分離実験での超音波測定



写真 2 非接触型 R-I 実験

接触することなく R の超音波のみ記録できる。本実験では R であるモデルマウスが発する超音波を解析し、野生型と比較して変異を解明した。

R メス vs I メス実験：R は 7H のメス 6 匹，野生型のメス 8 匹、Chd8 のメス 7 匹，野生型のメス 11 匹。I は野生型のメスを用い，7H 用と chd8 用にそれぞれ 4 匹を充てた。超音波の測定は R のケージの上に I を入れたガラス瓶を載せ，1 日 1 回 5 分間，連続 8 日間行った。I は R3 匹分，15 分間の実験毎にホームケージに戻し 30 分間休憩させた。超音波の測定及び解析には Metris 社のソノトラックとマウス用発声パターン解析ソフトを使用した。

R オス vs I メス実験：R は 7H のオス 4 匹，野生型のオス 8 匹，Chd8 のオス 11 匹，野生型のオス 12 匹。I は野生型のメスを用い，7H 用と chd8 用にそれぞれ 4 匹を充てた。超音波の測定は上記と同様であった。

R オス vs I オス実験：R は 7H のオス 4 匹，野生型のオス 6 匹，Chd8 のオス 11 匹，野生型のオス 9 匹。I は野生型のオスを用い，7H 用と chd8 用にそれぞれ 4 匹を充てた。超音波の測定は上記と同様であった。

4. 研究成果

(1) 母仔分離実験

7H 新生仔の超音波コミュニケーション：7H の超音波発声回数は野生型と比較して爆発的に増大した($p < 0.001$)。生後 7, 10, 13, 16 日には野生型の 2~6 倍に達した(図 1)。

超音波発声の音響学的な特徴を解析したところ，7H は 15~100 ミリ秒超の長い発声頻度が増大し，4~15 ミリ秒の短い発声頻度が減少した。1 回の発声を構成する音節数では，2 音節以上の発声頻度が増大し，1 音節の発声頻度は減少した。1 回の発声中に周波数が変動する周波数変調型発声では，周波数が上下に変動する発声頻度が増大し，周波数が一定で単調な発声頻度が減少した。超音波発声の長さ，音節数，周波数変調に基づいて発声パターンを 14 種類に分類したところ，Down 型(1 音節で周波数が低下)，chevron 型(1 音節で周波数が逆 U 字型に変化)，Step up 型(2 音節で周波数が上昇)，Step double 型(3 音節でいったん周波数が低下，後に上昇)，Complex3 以上型(音節数が 3 個以上で周波数が繰り返し不連続にジャンプ)の発声頻度が増大し，Short 型(1 音節で周波数が一定，長さ 15 ミリ秒以下)の発声頻度が減少した。

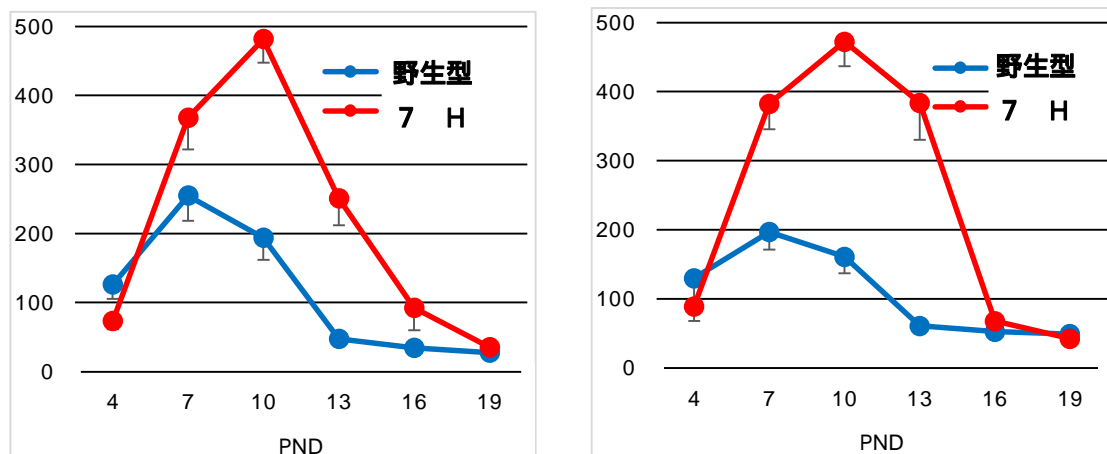


図 1 5 分間の母仔分離中における 7H の超音波発声回数

Chd8 新生仔の超音波コミュニケーション：Chd8 の超音波発声回数は野生型と比較して有意差は無かった。超音波発声の長さ，音節数，周波数変調，及び発声パターンなども影響は散発的で，一貫した変異は無かった。

(2) 非接触型 R-I 実験(R メス vs I メス)

R が 7H の場合：7H の発声回数は野生型と比較して有意に低く ($p < 0.05$)，8 日間を通して 300 ~ 400 回と一定であった(図 2)。これに対して野生型は，初めて他個体と対面した 1 日目に 700 回近く発声し，その後徐々に減少して 7H と同レベルの 300 ~ 400 回に達した。

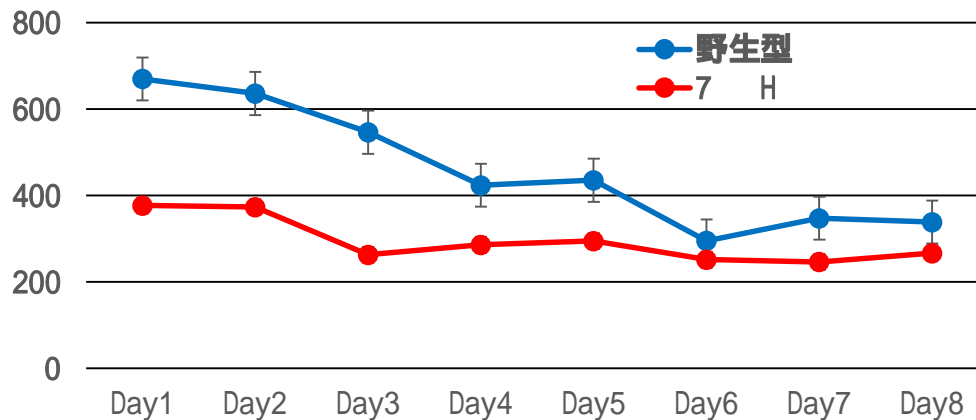


図 2 5 分間の R-I 実験における 7H メス R の発声回数

超音波発声の音響学的な特徴を解析したところ，7H は 15 ~ 100 ミリ秒超の長い発声頻度が減少し，4 ~ 15 ミリ秒の短い発声頻度が増大した。1 回の発声を構成する音節数では，2 音節と 5 音節の発声頻度が減少した。1 回の発声中に周波数が変動する周波数変調型発声では，周波数が上下に変動する発声頻度が減少し，周波数が一定で単調な発声頻度が増大した。超音波発声の長さ，音節数，周波数変調に基づいて 14 分類した発声パターンでは，周波数が変動する Up 型(1 音節で周波数が上昇)，Down 型，chevron 型の発声頻度が減少し，Short 型の頻度が増大した。

R が chd8 の場合：chd8 は野生型と比較して，超音波発声の回数にも音響学的な特徴にも変異はまったく無かった。

(3) 非接触型 R-I 実験(R オス vs I メス)

R が 7H の場合：7H は野生型と比較して，超音波発声の回数にも音響学的な特徴にも変異はまったく無かった。

R が chd8 の場合：超音波発声の音響学的な特徴を解析したところ，chd8 は周波数が変動する周波数変調型の発声頻度が増大した。14 種類に分類した発声パターンでは，chevron 型や Step down 型(2 音節で周波数が下降)の発声頻度が増大した。

(4) 非接触型 R-I 実験(R オス vs I オス)

R が 7H の場合：7H は野生型と比較して，超音波発声の回数にも音響学的な特徴にも変異はまったく無かった。

R が chd8 の場合：超音波発声の音響学的な特徴を解析したところ，chd8 は 2 音節や 6 音節以上の発声頻度が減少した。発声パターンでは，Step down 型(2 音節で周波数が低下)や complex5+ 型(5 音節以上から構成され，周波数が上下に繰り返し変動)の頻度が減少した。

(5) 考察

新生仔の超音波コミュニケーション：新生仔は母親なしに生きることができないため，母子分離は強い不安情動を引き起こす。そのため新生仔は超音波を発して母親を呼ぶ。7H は多音節から構成され，周波数が変動する複雑な長い発声の頻度が爆発的に増加した。母子分離によって強い不安情動が生じ，母親の注意を引く複雑型発声を増大させたと考えられる。

Tamada et al (2010)は 7H の脳内セロトニン量を測定し，生後 1 ~ 3 週目に大脳皮質，小脳，海馬，視床下部，中脳，橋・延髄で減少したと報告している。7H はセロトニン減少によって不安情動が亢進していることに加え，母子分離に曝露されたことで一層不安が高まり，母親を呼び寄せる超音波発声が増大したと考えられる。

自閉症児は普段と異なる状況(部屋の配置が変わる,道順が違う)でパニックを起こす。7Hの新生仔も母仔分離によってパニックを起こし,爆発的な発声を引き起こした可能性がある。7Hの超音波発声の増大は,不安情動の亢進によるパニック様反応という点で,自閉症児の反応と類似性がある。一方 chd8 では超音波発声の変異は散発的で,明確ではなかった。

成獣の超音波コミュニケーション:マウスは初対面の個体に興味を示し,接近する。このため初対面の1日目に接近行動が発現し,超音波コミュニケーションも増大すると予想された。

ところが野生型メスの1日目の発声が600~700回に達していたのに対し,7Hのメスは300~400回であった。しかも他個体の注意を引く複雑な発声は減少し,短い単調な発声が多かった。初日の発声回数の減少や単調な発声は,他個体に対する関心の低下を示していると考えられる。

7Hオスの超音波発声には,野生型と比較して変異は無かった。しかしメスIと対面した場面では,野生型が1日目から徐々に発声回数を上昇させたのに対し,7Hは8日間を通してほぼ一定であった。オスはメスと出会うと求愛行動を示し,超音波コミュニケーションも盛んになる。特に発情したメスに対して活発に求愛する。メスの発情周期は4日間隔であるため,8日間の対面中に1~2回は発情することになり,オスの超音波発声回数も上昇すると予想される。にもかかわらず7Hオスの発声回数が一定で増加しなかったことから,求愛行動の減少やメスへの興味が低下していた可能性がある。

Chd8オスの超音波発声では,メスに対して周波数を変動させる発声頻度が上昇したが,オスに対しては逆に周波数を変動させる発声頻度が減少した。これらはメスへの興味の高まり,オスへの興味の低下と捉えることもできる。しかしこれらの変異は散発的であった。

(6) 結論

- ・新生仔期の7Hは母仔分離に曝されてパニック様の反応を起こし,このことが母親の注意を引く複雑な音響学的特徴を持った超音波発声の爆発的な増加を引き起こした。
- ・7Hの成獣メスは本来なら興味を示すはずの初対面の個体に対して単調な超音波コミュニケーションしか行わず,他個体への興味が低下していたと考えられる。
- ・7Hの成獣オスも求愛行動を示す相手のメスに対して,活発な超音波コミュニケーションを行わなかった。メスに対する興味の低下を示している。
- ・7Hの超音波コミュニケーションの変異には,脳内セロトニンの減少による不安情動の亢進が関与していると考えられる。
- ・7Hに生じた超音波コミュニケーションの変異は明白であり,自閉症モデルマウスの表面妥当性を満たしていると結論できる。今後,遺伝子変異とコミュニケーション障害発症プロセスの解明,遺伝子治療法の開発などに7Hの応用が期待できる。
- ・chd8に関しては,新生仔も成獣も超音波コミュニケーションの変異は散発的で明白ではなかった。chd8の欠損は脳内神経細胞の成長を阻害すると考えられているが単独では影響せず,他の遺伝子変異との相互作用によって顕在化するのかもしれない。

<引用文献>

- Katayama et al. (2016) CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature*. 537:675-679.
- Nakatani et al. (2009) Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell*. 137(7):1235-46.
- Tamada et al. (2010) Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling. *PLoS One*. 5(12): e15126.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 WADA HIROMI
2. 発表標題 The autism model mouse B6.129S7-Dp (7Herc2-Mkrn3) 1 Taku emitted altered ultrasonic vocalizations to call the dam upon maternal isolation
3. 学会等名 International Society for Autism Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田博美・岩谷 優・坂田 光
2. 発表標題 ASDモデルマウスB6.129S7-Dp(7Herc2-Mkrn3)1Taku新生仔の 超音波コミュニケーション
3. 学会等名 日本動物心理学会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------