

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H05569・20K20477

研究課題名（和文）トランスレーショナル研究戦略による社会性異常のバイオマーカー同定

研究課題名（英文）Translational biomarkers for social behavioral abnormality

研究代表者

掛山 正心（KAKEYAMA, 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） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：社会性に関する問題（社会行動異常）は、自閉スペクトラム症（ASD）をはじめとした発達障害の主症状の一つである。我々は、化学物質曝露マウスや社会隔離経験を受けたマウスの中で、行動表現型と脳活動パターンがASD当事者に類似する「環境要因ASDモデルマウス」を見出した。本研究では、これらのモデルマウスを利用し、環境要因によって生じる社会行動異常のバイオマーカーを同定することを目的とした。環境中化学物質曝露マウスを含む複数のモデルマウスに共通する遺伝子を複数同定した。動物とヒトの種間比較もあわせて行い、相関を示唆する遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト調査で見出された原因因子を検証し、あるいは未知の原因因子の曝露実験を行い、影響を未然に防ぐことが動物実験の役割である。ヒトと実験動物に共通するバイオマーカーは、動物バイオマーカーにはヒトへの外挿性情報を、ヒト・バイオマーカーには生物学的基盤情報を付与することとなり、利用価値が高いものとなる。また、唾液による検査は乳幼児対象の調査でも可能であり、社会医学、看護学および関連分野における貢献は甚大である。ヒトと実験動物に共通するバイオマーカーは、今後のトランスレーショナル研究の礎となる。医学・薬学をはじめとした生命科学全般への波及効果を期待する。

研究成果の概要（英文）：Difficulty in social communications and behaviors are one of the main symptoms of developmental disorders such as autism spectrum disorder (ASD). In this study, we compare gene expressions in several model mice to identify biomarkers of social behavioral problems. We identified multiple genes common to multiple model mice, including mice exposed to environmental chemicals. Interspecies comparisons between animals and humans were also conducted, and genes suggesting a correlation were identified.

研究分野：環境脳科学

キーワード：予防医学 バイオマーカー 衛生学

1. 研究開始当初の背景

社会性に関する問題(社会行動異常)は、自閉スペクトラム症(ASD)をはじめとした発達障害の主症状の一つである。ゲノム解析の進展により、発達障害の病因としては遺伝要因よりもむしろ環境要因の寄与度のほうが大きいことが明らかとなり、社会医学が病因解明に取り組むべきテーマになったと言える。我々はこれまでに、出生前にダイオキシンに曝露されたマウスは、社会行動異常を呈し、脳活動パターンがASD当事者に類似することから、「環境要因 ASD モデルマウス」となることを見出した。また、授乳期間中に社会隔離経験を受けたマウスも同様の行動表現型と脳活動異常を示すことも発見した。

2. 研究の目的

本研究では、これらのモデルマウスを利用し、環境要因によって生じる社会行動異常のバイオマーカーを同定することを目的とした。採血の難しい乳幼児に対応するため、唾液試料からのバイオマーカー測定を実現し、社会医学、看護学及び関連領域に貢献することも目指した。

3. 研究の方法

(1) 環境要因 ASD モデルとしてダイオキシン曝露マウスを用いた(Plos One 2012, 7:e50741 他)。加えて、別課題(発達期ダイオキシンと老年期の高次認知機能低下の関係性解明(19H01152))において作成し表現型解析を行った2,3,7,8-四臭素化ジベンゾフラン等の曝露動物の生体試料も提供を受け、解析対象とした。これらは、一般的な成長や通常の学習成績には影響がなく、社会行動異常とASD様の脳活動異常を示すモデルであることから、本研究の成果を健康リスク研究にも貢献しうるものといえる。

(2) もう一つの環境要因 ASD モデルとして、幼若期に社会的隔離を経験したマウス(Physiol Behav 2014 137:42-52 他)も作成し、試料を得て解析した。授乳期間中、1日3時間、母・兄弟と隔離し1匹の経験をさせることで、ダイオキシン曝露マウスと同様の行動と脳活動の異常を示すモデルである。

(3) 遺伝要因モデルとして、FMR1欠損マウスを用いた。脆弱X症候群原因遺伝子FMR1の欠損マウスは、ASD様症状を示すことが知られている。

(4) マウス試料については脳および血漿を対象として、mRNAシーケンス解析をIllumina社のIllumina Novaseq 6000を用いて実施した。miRNA発現解析をアジレント社のSurePrint G3 Mouse miRNA マイクロアレイ 8x60Kを用いて実施した。

(5) ヒトのデータは山末と掛山が共同で解析済のものを用いた(ASD当事者と健常対象者各40例の血液中の低分子RNAの網羅的解析データ)。血漿と唾液の発現比較も行った。

(6) 以上のデータを用いて各モデルにおいて有意に発現変動した遺伝子を同定するとともに、KEGGデータベースを用いて、パスウェイ解析を行ない、脳と血漿のRNA及びmiRNAの関係性を検討し、バイオマーカー候補遺伝子群を絞り込んだ。

4. 研究成果

(1) 本研究では、マウスの社会行動異常を基準として、ヒトとの種間比較によりバイオマーカーを同定する戦略をとった。化学物質の胎仔期低用量曝露により社会行動異常を表出しているマウスと、社会性の問題やコミュニケーションの障害をもつヒトの共通項を検出するトランスレショナル研究戦略をとることで、バイオマーカーの絞り込み作業を行った。モデルマウスの脳および血液中の RNA 発現解析を行い、有意に発現変動する RNA を複数同定した。計 6 つのモデルマウスのバイオマーカー候補と行動表現型との対応についての比較を行い、分子の絞り込みを行い、環境中化学物質曝露マウスを含む 6 つのモデルマウスに共通する遺伝子を複数同定した(図 1)。

miRNA ID	wt signal ave	M signal ave	fold change
mmu-miR-18a-5p	4.6762949	12.6030105	2.695084657
mmu-miR-8110	167.592805	371.17801	2.21476101
mmu-miR-135a-1-3p	11.5901450	20.9188145	1.804879447
mmu-miR-144-3p	33.8736650	58.6102030	1.730258683
mmu-miR-494-3p	34.5335500	56.8456150	1.646098215
mmu-miR-711	10.0385798	16.0213350	1.595976263
mmu-miR-8090	12.3871500	19.4315405	1.568685331
mmu-miR-6934-5p	357.2765	236.709045	0.662537405
mmu-miR-3093-3p	45.9916000	30.2497900	0.657724237
mmu-miR-5622-3p	170.04085	108.3160500	0.637000168
mmu-miR-770-3p	11.6628850	6.9592700	0.596702274
mmu-miR-7648-3p	22.3530050	11.1644953	0.499471782
mmu-miR-6370	39.0323010	17.3134600	0.443567496

図 1. モデルマウスに共通して発現変動する遺伝子群

(2) ヒトバイオマーカーの抽出精製方法の開発を行うとともに、血液中バイオマーカーと唾液中バイオマーカーの対応づけを行った(図 2)。動物とヒトの種間比較もあわせて行い、相関を示唆する遺伝子を同定した。また、脳 mRNA 発現解析の結果から、Fmr1 遺伝子 KO マウスでは、シナプス可塑性や、神経細胞の分化や生存に関わる遺伝子発現に変動があったが、それらに対応する変化は環境要因モデルおよびヒトデータとは共通性がみられなかった。以上の結果から、ヒト試料の例数を増やし、証を進める必要があることが強く示唆された。

ヒト miRNA ID	マウス miRNA ID	wt signal ave	ko signal ave	FC
hsa-miR-26a	mmu-miR-26a-5p	86.123	90.422	1.050
	mmu-miR-26a-1-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-miR-93	mmu-miR-93-5p	58.610	77.660	1.324
	mmu-miR-93-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-miR-126	mmu-miR-126a-5p	6.613	7.748	1.188
	mmu-miR-126a-3p	195.816	201.718	1.030
hsa-miR-24	mmu-miR-24-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-miR-221	mmu-miR-221-5p	0.100	0.100	1.000
	mmu-miR-221-3p	11.228	12.217	1.088
hsa-miR-106a	mmu-miR-106a-5p	検出なし	検出なし	—
	mmu-miR-106a-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-miR-23a	mmu-miR-23a-5p	0.100	0.100	1.000
	mmu-miR-23a-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-miR-191	mmu-miR-191-5p	0.100	0.100	1.000
	mmu-miR-191-3p	4.454	4.529	1.017
hsa-miR-22	mmu-miR-22-5p	0.100	0.100	1.000
	mmu-miR-22-3p	159.353	159.353	1.000
hsa-miR-17	mmu-miR-17-5p	0.100	0.100	1.000
	mmu-miR-17-3p	0.100	2.262	22.619
hsa-miR-146a	mmu-miR-146a-5p	42.705	43.793	1.025
	mmu-miR-146a-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-miR-151-3p	mmu-miR-151-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-let-7c	mmu-let-7c-2-3p	0.100	0.100	1.000
	mmu-let-7c-5p	201.718	167.593	0.831
hsa-let-7i	mmu-let-7i-5p	108.316	120.883	1.116
	mmu-let-7i-3p	0.100	0.100	1.000
hsa-let-7d	mmu-let-7d-5p	48.522	51.775	1.067
	mmu-let-7d-3p	5.051	4.106	0.813
hsa-miR-103	mmu-miR-103-1-5p	0.100	0.100	1.000
	mmu-miR-103-3p	25.170	33.874	1.346
hsa-miR-107	mmu-miR-107-3p	33.244	39.032	1.174
	mmu-miR-107-5p	0.100	0.100	1.000

図 2. バイオマーカー候補のヒトとマウスの比較結果。

(3)本研究では、我々はヒトと動物モデルの橋渡し研究を、血液や唾液試料から測定可能なバイオマーカーを対象として行った。バイオマーカー開発では主としてダイオキシン毒性を起点として進め、症状(行動表現型)と脳活動の二項目を基準として、ヒトとマウスの種間共通性に基づいて抽出する戦略をとった。さらに社会隔離マウスとの比較も行うため、広範に利用可能なバイオマーカーの開発が期待できると考えられ、検体あたり 1,000 円程度で測定できるプロトコールも作成した。

ヒト調査で見出された原因因子を検証し、あるいは未知の原因因子の曝露実験を行い、影響を未然に防ぐことが動物実験の役割である。ヒトと実験動物に共通するバイオマーカーは、動物バイオマーカーにはヒトへの外挿性情報を、ヒト・バイオマーカーには生物学的基盤情報を付与することとなり、利用価値が高いものとなるはずである。また、唾液による検査は乳幼児対象の調査でも可能であり、社会医学、看護学および関連分野における貢献は甚大であるといえよう。

ヒトと実験動物に共通するバイオマーカーは、今後のトランスレーショナル研究の礎となる。具体的には、基準マーカーとしてだけでも利用価値の高いものになる。医学・薬学をはじめとした生命科学全般への波及効果を期待する。

一方で、我々は本研究開始前に、プロトン磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)により、MRS 反応に対応するような遺伝子発現変動をマウス前頭前皮質において示す遺伝子セットを同定済である。そのような神経活動との対応など、より多くの指標を用いることで、むしろ偽陰性を回避できるようにも思われる。トランスレーショナル戦略をさらに推進することで、生命科学の成果を健康と医療に直結させる端緒になることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 掛山正心・前川文彦	4. 巻 61
2. 論文標題 胎生期・発達期の環境要因と成人期・老年期の脳	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日仏生物学会誌	6. 最初と最後の頁 29-35
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 -
1. 著者名 Horigane SI, Ozawa Y, Zhang J, Todoroki H, Miao P, Haijima A, Yanagawa Y, Ueda S, Nakamura S, Kakeyama M, Takemoto-Kimura S.	4. 巻 10
2. 論文標題 A mouse model of Timothy syndrome exhibits altered social competitive dominance and inhibitory neuron development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1436-1446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12924	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 ベナー聖子・掛山正心.	4. 巻 39
2. 論文標題 社会的隔離の動物モデル.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 精神科.	6. 最初と最後の頁 1-6
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 無
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 掛山正心・藤原昌也	4. 巻 30
2. 論文標題 マウスの集団内社会行動の客観定量分析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本生物学的精神医学会誌	6. 最初と最後の頁 182-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11249/jsbpjpp.30.4_182	査読の有無 無
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 Kimura E, Suzuki G, Uramaru N, Kakeyama M, Maekawa F.	4. 巻 42
2. 論文標題 Liver-specific decrease in Tff3 gene expression in infant mice perinatally exposed to 2,3,7,8-tetrabromodibenzofuran or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Appl Toxicol	6. 最初と最後の頁 305-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.4220	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木健, 城宝大輔, 奥野浩行, 掛山正心
2. 発表標題 Decision-making task in mice toward in vivo fluorescence imaging
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市原華, 亀池彩乃, 齋藤直哉, 城宝大輔, 前川文彦, 掛山正心
2. 発表標題 他個体認知は新たなマウス行動指標となりうるか: 周産期ダイオキシン曝露マウスの影響解析
3. 学会等名 BPCNP4学会合同年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 掛山正心
2. 発表標題 動物モデルを用いた環境化学物質の発達神経毒性評価: 毒性エンドフェノタイプ
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城宝大輔, 鈴木健, 皆川栄子, 斉藤貴志, 西道隆臣, 掛山正心
2. 発表標題 Appノックインマウスにおける認知的柔軟性の新規評価指
3. 学会等名 第35回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

核家族を営むネズミの愛情形成遺伝子 https://www.waseda.jp/top/news/68062
--

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	吉岡 亘 (YOSHIOKA Wataru) (80425496)	麻布大学・獣医学部・准教授 (32701)	
研究分担者	山末 英典 (YAMASUE Hidenori) (80436493)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	

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
---------	---------