

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700380

研究課題名(和文) 自閉症モデルマウスを用いた自他認識機構の基盤的研究

研究課題名(英文) Analysis of self-other recognition in mice model for autism

研究代表者

玉田 紘太 (Tamada, Kota)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：10550957

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)：自閉症スペクトラム障害では自他の認識機構が破綻しているという仮説を自閉症モデルマウスにて検証し、異常脳領域および分子の探索を行った。野生型マウスは他のマウスの匂い提示により、全体的に脳活動が活性化したが、自閉症モデルマウスでは自己の匂い提示により、脳活動が活性化し、いくつかの異常脳領域候補を得た。また、異常分子の探索を行った結果、特定のアミノ酸量の減少が自閉症モデルマウスでは著名であった。このことから脳内アミノ酸のインバランスが自閉症における社会性行動異常、および自他認識に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by less social interaction / communication or repetitive behaviors. Despite recent intensive researches, its molecular mechanism remains largely unclear. Recently, our research group succeeded to generate mice model (patDp/+) for ASD that have duplicated chromosome 7B to C region, corresponding to human chromosome 15q11-13 which is one of the responsible locus for ASD. In this study, we addressed the self-other recognition mechanism by using this model and tried to find causative molecule in the brain. Compared to WT mice, patDp/+ mice showed altered brain activity stimulated by the odor of other mice or self. PatDp/+ mice had decreased levels of a specific amino acid in the brain both in adult and postnatal developmental period. These results suggest that the imbalance of amino acids in brain might be a critical role in the social abnormalities found in ASD.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉症 自他認識 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

精神疾患研究領域における最終的目標は、その病態を分子、細胞、神経回路レベルでの理解をもってして治療を可能にすることである。精神疾患の中でも自閉症スペクトラム障害はその多用な原因・症状から、最も未解明な部分の多い研究といえる。自閉症スペクトラム障害は近年、非常に注目されている神経発達障害であり、その罹患率は1/100と非常に高いものとなっている。自閉症は1. 社会性の欠如・コミュニケーションの質的障害、2. 常同・反復的行動、強い固執性により特徴付けられる。自閉症スペクトラム障害の責任領域はこれまでに様々な染色体領域が同定されてきている。その中でもヒト染色体15q11-13領域の重複という染色体異常は自閉症者の数パーセントにも上ると報告されている。ヒト染色体15q11-13領域にマップされている遺伝子群は、マウス染色体7番B-C領域にほとんど保存されていることを利用し、近年、我々研究チームは本領域の重複マウス(patDp マウス)を作製することに成功した(Cell, 137: 1235-1246, 2009)。patDp マウスは社会性の欠如、母子分離時の超音波啼鳴反応数の異常、および逆転学習による固執性の上昇といった、自閉症様の行動学的異常を呈することが分かった。また、自閉症スペクトラム障害の子供では通常認められる脳内セロトニンの生後発達期における上昇が認められないことから、patDp マウスの脳内セロトニン量を調べたところ、減少していることが明らかとなった(PLoS One 5: e15126, 2010)。patDp マウスを発表してから現在に至るまで盛んに自閉症モデルマウスの作製が行われてきており、自閉症研究は今まさに hot topics と言える一方、分子メカニズムにまで踏み込んだ報告は少ない。

自閉症者における社会性の障害の原因と考えられている仮説の一つに、"ミラーニューロンを介した自他認識の障害"がある。DaprettoらはfMRIを用いて、自閉症スペクトラム障害の子供に模倣させる課題を行わせたときの脳活動をモニタリングした結果、自閉症者では前頭葉の弁蓋部における活動が健常群に比べて有意に低いことが分かった(Nature Neuroscience 9: 28-30, 2005)。この結果は自閉症者の社会性障害において、特定部位の脳活動と関連があることを示唆しており、ミラーニューロンの機能障害が関与する可能性が挙げられた。このミラーニューロンはヒトだけでなく、サル、鳥類でも存在が示唆されており、齧歯類においてもミラーシステム様の機構があるのではないかと考えられている。しかし、これまで適した動物モデルがないため、分子的機構を解明することは困難であった。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでの先行研究で、染色体工学を用いて15q11-13相同領域重複マウスを作製することに成功しており、本マウスが自閉症様行動を示し、脳内セロトニンの減少を有していることが明らかとなっている。本研究ではpatDp マウスにおける社会的相互作用の異常がどの脳領域、あるいは神経回路の異常により誘起されるか？また異常分子は何か？という二点について明らかにすることとする。また異常分子をpatDp マウスにおいて抑制もしくは活性化させることで、先行研究にて認められたpatDp マウスの社会的相互作用の異常が改善されるかを検証することとする。本研究により得られる結果は、"自他認識"に關与する脳領域・分子となり得る可能性が考えられ、自閉症スペクトラム障害の発症メカニズムの解明に向けた基盤的知見になると期待される。

3. 研究の方法

本研究には全て雄マウスを使用した。

(1) 自他の匂いに対する嗜好性試験 (Olfactory preference test)

patDp マウスにおける他のマウスと自己の匂いに対する嗜好性を調べるために、嗜好性の行動試験を行った。最低でも3日以上交換せずに飼育したケージ中の床敷きに対して、綿棒を擦り付けることでその匂いを付けた。実験の開始1時間前にマウスを実験環境と匂いをつけていない綿棒に順化させた。水を染み込ませた綿棒を3分間、3回提示し、最後に自己の匂い、および他のマウスの匂いをそれぞれ用意し、試験を受けるマウスに対して同時に5分間提示した。綿棒は床から5cmの高さに固定し、綿棒の先端を匂いでいる時間を測定した。なお綿棒を噛んでいる時間は除外した。

(2) fMRI を用いた匂い提示による脳活動のモニタリング

patDp マウスが1. 他のマウスの匂いを提示されているとき、2. 自己の匂いを提示されているときという二つの条件下における脳活動をモニタリングするために、fMRI を用いて覚醒条件下でそれぞれの匂い提示時のBOLD信号を調べた。匂い提示には糞・尿を含んだ床敷きを使用し、1L/min でマウスの鼻先に送風した。

(3) patDp マウスにおける社会性異常に關連する物質の探索

patDp マウスの成体の脳内においてWT マウスと比較して、どの物質に変化があるかを嗅球、前頭前野、海馬、視床下部、中脳、小脳、橋及び延髄の7つの脳領域に対して、質

量分析、HPLC を用いて網羅的に調べた。また、自閉症スペクトラム障害は発達障害であることから、生後発達期の変化が重要であると考えられる。そこで、本解析の結果得られた特定のアミノ酸を生後発達段階においても同様に調べた。生後発達の解析に関しては、生後 1、2、3 週齢の 3 点について、最も成体で顕著であった脳領域についてのみ解析を行った。

(4) アミノ酸投与による社会性異常のレスキュー実験

(3) の解析結果で得られた特定のアミノ酸を patDp マウスに急性投与し、社会性異常が改善されるかを調べた。行動試験の 30 分前に行動試験の部屋に順化させた。20 mg/kg body weight の濃度で腹腔内投与を単回行い、30 分後に Direct social interaction test により社会的相互作用の異常を検証した。なお、コントロールとしては生理食塩水を投与し、同様の試験を行った。また、同様の投与方法を用いて、超音波啼鳴反応試験を行った。試験を受ける雄マウスがいるケージに対して、同種の成体雌マウスを入れ、5 分間に発した超音波の啼鳴数を計測した。

4. 研究成果

(1) 自他の匂いに対する嗜好性試験

WT マウスと同様に、patDp マウスでは自己の匂いと比較して、他のマウスの匂いを嗅いでいる時間が長い傾向にあったが、WT マウスほど顕著ではなかった。

(2) fMRI を用いた匂い提示による脳活動のモニタリング

WT マウスでは全体的に他のマウスの匂いを提示したときに、脳活動が活性化されていた一方で、自己の匂いを提示したときにはほとんど活性化が認められなかった。しかし、patDp マウスでは逆の現象、すなわち、自己の匂いを提示したときに全体的な脳活動が活性化されていた。部位別でみると、WT マウスでは他のマウスの匂い提示により、視床の一部などの領域において強い信号が認められ、patDp マウスは自己の匂い提示により、線条体等において WT マウスでは認められない信号が検出された。

(3) patDp マウスにおける社会性欠如に関連する物質の探索

成体における WT と patDp マウスの脳内物質の量を網羅的に調べた。Mass spectrometry の結果、数個のアミノ酸が patDp マウスでは減少していることが明らかとなった。その後、HPLC を用いて再現性

を確認し、特定のアミノ酸量が高い再現性をもって、patDp マウスにおいて減少していることが明らかとなった。更に、このアミノ酸の量を patDp マウスの生後発達段階(1, 2, 3 週齢)において調べたところ、生後 2 週齢から WT マウスに比べて有意に減少していた。このことから、自閉症スペクトラム障害において重要と位置づけられている発達段階で、このアミノ酸が病態に寄与している可能性が示唆された。また、このアミノ酸の減少は脳部位により異なり、高次脳機能を司ると報告されている脳領域において最も顕著な差が認められた。

(4) アミノ酸投与による社会性異常のレスキュー実験

(3) の実験結果により、patDp マウスにおけるアミノ酸の減少が顕著であることと社会性行動異常が関連するかを調べるために、特定のアミノ酸を投与し、社会性行動異常の改善が認められるかを検討した。WT マウスではアミノ酸の影響は認められなかったが、patDp マウスでは不完全ながらも一部改善が認められた。更なる指標として超音波啼鳴反応試験を行った。通常、雄の WT マウスは成体雌マウスに遭遇すると超音波を発することが知られており、先行研究により、patDp マウスはこの啼鳴数が非常に少ないことが分かっている。このアミノ酸投与により部分的ではあるが、patDp マウスの超音波の啼鳴数が増える傾向にあった。

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 1 件)

1. Rui Kishimoto*, Kota Tamada*, Xiaoxi Liu, Hiroko Okubo, Satoko Ise, Hisashi Ohta, Sandra Ruf, Jin Nakatani, Nobuoki Kohno, Francois Spitz, Toru Takumi. Model mice for 15q11-13 duplication syndrome exhibit late onset obesity and altered lipid metabolism.

*These authors have contributed equally to this work.

Hum Mol Genet, in press, 2015, 査読有 <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddv187>

[学会発表](計 1 件)

1. 岸本 瑠衣、玉田 紘太、中西 修平、河野 修興、内匠 透
ヒト染色体 15q11-13 相同領域重複マウスにおける肥満メカニズムの解析

第36回日本分子生物学会年会
2013.12.3、神戸

〔図書〕(計 1件)

1. Kota Tamada, Toru Takumi. (2015)
Serotonin Disturbance in Mouse Models
of Autism Spectrum Disorders. In
Neuromethods, Organism Models of
Autism Spectrum Disorders (ed. Pierre,
R.), vol. 100, chapter 9, pp. 239-262.
Humana Press Inc., New York
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2250-5_9

6 . 研究組織

(1)研究代表者

玉田 紘太 (TAMADA KOTA)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研
究センター・研究員
研究者番号：10550957

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし