

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25590213

研究課題名(和文) マウス発達障害モデルの多面的病態評価システムの構築

研究課題名(英文) The multidimensional assessment system of developmental disorder model in mice

研究代表者

山田 郁子 (Yamada, Ikuko)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発達障害の多様な症状に応じた多角的なテストバッテリーを用いたハイスループットかつ高精度な発達障害評価システムの構築と、既報の発達障害モデルマウスを用いた検証を行った。C57BL/6Jマウスをコントロールとしてデータを収集し、テストバッテリーが高い再現性を持つことを確認した。また、我々が開発したENU変異マウスB6-Grin1Rgsc174を用いて実験を行ったところ、多動と社会性の低下、学習障害など発達障害でも広くみられる症状と共通する特徴が確認された。これらの結果から、本研究で構築されたテストバッテリーは発達障害に特徴的な行動を高感度に検出し評価できることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to establish a multidimensional-assessment system of behavioral phenotypes of mutant mice. In order to validate this system, an ENU mutant mouse B6-Grin1Rgsc174 that is known as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder was tested in this pipeline. The data which collected in the test pipeline were statistically stable and had less variation among subjects. Moreover, common behavioral characteristics widely observed in developmental disorders such as hyper activity, decrease of social approach, and learning disorder were observed also in B6-Grin1Rgsc174 mutant.

These results indicate that the test battery which was established in this study is capable of evaluating the detected characteristic behaviors of the models of developmental disorders with high sensitivity.

研究分野：行動科学

キーワード：発達障害 マウス 行動テストバッテリー 社会行動 学習障害 注意欠陥・多動性障害

1. 研究開始当初の背景

近年、自閉症スペクトラムに代表される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。発達障害は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(2)、根底に何らかの脳機能異常が存在すると考えられている。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, 4)、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未解明の部分が多い。また、自閉症スペクトラムという概念が示すようにその症状には多様性・連続性があり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。

2. 研究の目的

従来の発達障害モデルマウスは単一の症状を扱ったものがほとんどである。しかし、実際の症例では自閉傾向と多動など複数の症状を併せ持つなど複雑な病態を示す事が多い。そこで本研究では、臨床に即した多面的な病態を示す疾患モデルマウスの開発と、発達障害の多様な症状に応じた多角的なテストバッテリーを用いたハイスループットかつ高精度な発達障害評価システムの構築を試みることを目的とした。また、構築されたテストバッテリーを用いて既存の発達障害モデルマウスの解析を行い、テストバッテリーの妥当性についての検討も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多面的病態評価システムの構築

マウスの行動表現型を測定するテストには様々なものがあり、それらは精神疾患モデルの探索と検証に用いられてきている。これまで、不安様行動(Light/dark transition test)、自発活動性・活動パターン(Home-cage activity test)、新奇環境での活動性・反応性(Open-field test)、感覚調整機能(Pre-pulse inhibition test)などの行動解析試験として確立しているが、これらに加えて自閉症スペクトラム障害で顕著に異常が見られるとされる社会行動試験(Social interaction test)を組み合わせ、詳細な神経科学的・行動学的解析を行った。また、各テストの標準実施手続き(Standardized Operation Procedure: SOP)

の整備を行なった。

(2) テストバッテリーの評価

我々が構築したテストバッテリーの信頼性と妥当性を評価するため、基準系統として C57BL/6Jc1 (B6/J)、ポジティブコントロールとして ENU 変異マウスである B6-Grin1^{Rgsc174} を用いて実験を行った(5)。被験体は日本クレアより購入した B6/J、および IVF によって自家生産された ENU 変異マウスである B6-Grin1^{Rgsc174} を用いた。行動解析バッテリーは先行経験の影響を受けやすいテストから順に実施した。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: 9w)、Home-cage activity test (自発活動性、活動リズム: 10-11w)、Fear-conditioning test (学習・記憶: 13w)、Pre-pulse inhibition test (感覚統制: 14w)、また、Y-maze は B6/J を用いて 4 週齢から 10 週齢までの間、1 週間毎に 7 回テストを行った。

4. 研究成果

(1) B6/J マウス系統を用いて、テスト実施週齢が行動表現型に及ぼす影響の検討をおこなった。我々の構築したテストバッテリーでは 6 週齢で実験開始とするが、8 週齢開始の群との比較を行った。6 週齢群雄 7 匹、8 週齢開始群推す匹での比較を行ったが、週齢による差がみられたテストはなかった。また、Y-maze では B6/J 雄 7 匹、雌 7 匹を用いて 4 週齢から 10 週齢までの間、1 週間毎に 7 回テストを行ったが、自発的交替率には週齢による結果の違いはみられず、安定したデータが得られた(Fig.1)。

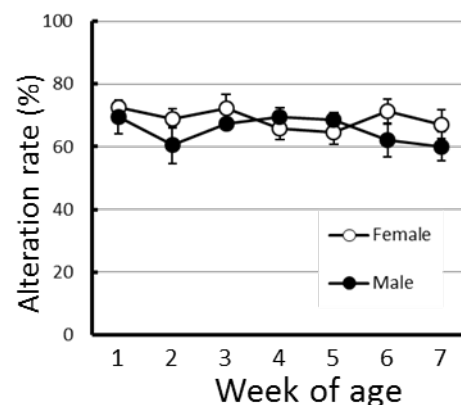


Fig.1 B6/J の Y-maze における自発的交替率は週齢による影響を受けなかった (mean+sem.)

(2) 発達障害モデルのためのテストバッテリーとしての妥当性を検証するため、既存の発達障害モデルである B6-Grin1^{Rgsc174} を用いて検証をおこなった。

B6-*Grin1*^{Rgsc17}はOpen-field test (Fig.2)とHome-cage activity test (Fig.3)で高活動を示し、多動性について再現が確認された。

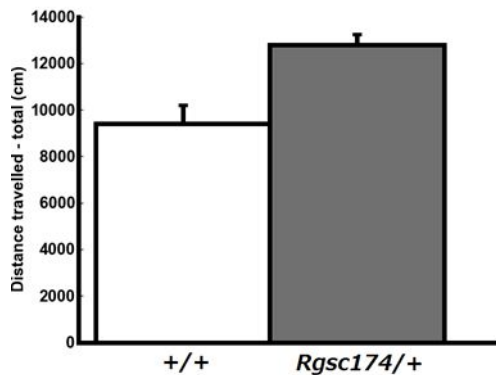


Fig.2 Open-field testで *Grin1* 変異体の移動距離は有意に長かった ($p < .01$, mean+sem)

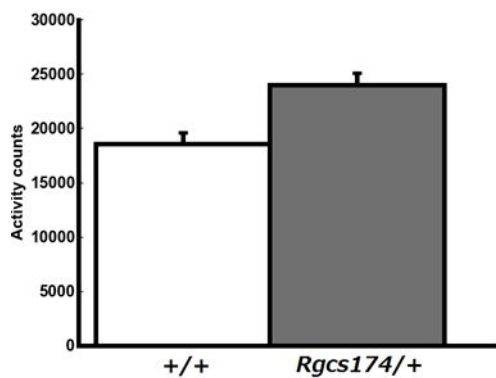


Fig.3 Home-cage activity test において *Grin1* 変異体は高い活動量を示した ($p < .01$, mean+sem).

また、学習・記憶のテストである Fear conditioning test では音と電撃を対提示し、freezing を指標として記憶のテストを行う。海馬の機能を反映するといわれる場所学習である Contextual test では wild type とくらべ *Grin1* 変異体の学習成績が低い傾向がみられた。一方、扁桃体機能を反映するとされ、音による手がかり記憶を測定する Cued test では Genotype による有意な差はみられず、いずれの群でも学習が成立していた (Fig4)。

社会性のテストである Crawley's social interaction test では新奇物体および他個体への接近反応を探索欲求・社会性の指標として測定するが、*Grin1* 変異体では新奇物体への接近は B6/J や wild type とくらべやや増加しているが、他個体への接近は減少していた (Fig.5)。

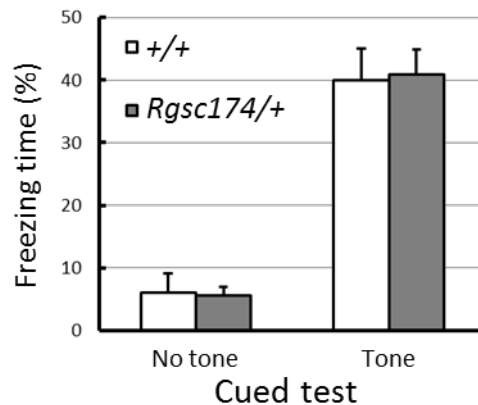
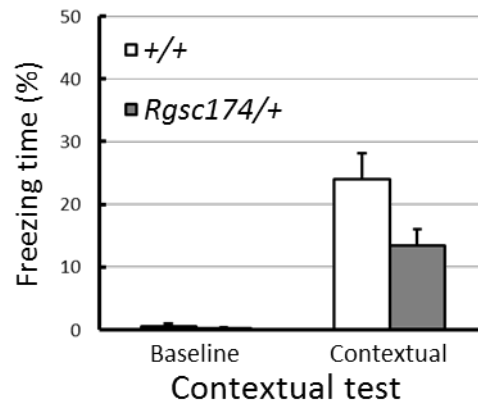


Fig.4 Fear conditioning test では Contextual test において *Grin1* 変異体の学習成績が低下していた ($p < .05$, mean+sem)

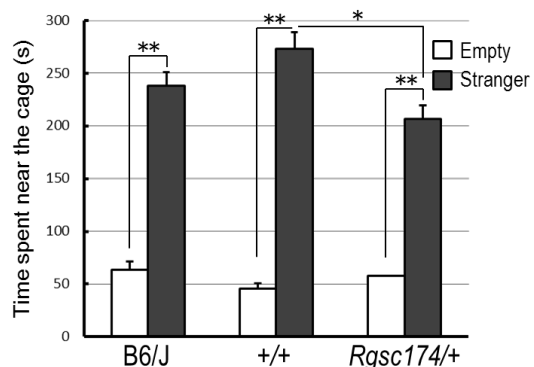
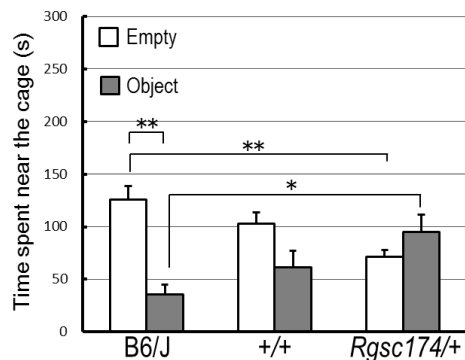


Fig.5 Crawley's social interaction test では *Grin1* 変異体の他個体への接近が減少していた (**: $p < .01$, *: $p < .05$, mean+sem)

Pre-pulse inhibition test は感覚調節機能を反映し、統合失調症モデルとして用いられているテストである。*Grin1* 変異体を用いてこのテストを行ったところ、wild type と比較してPPI抑制率の抑制率がひくく、感覚調節機構に何らかの障害があることが示唆された(Fig.6)。

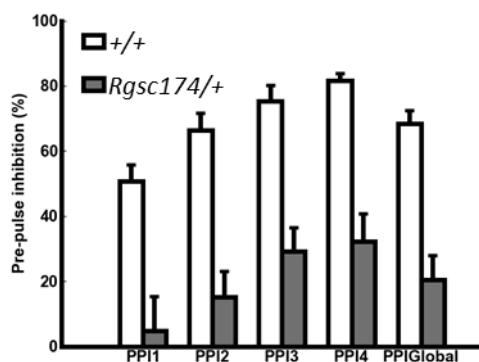


Fig.6 Pre-pulse inhibition test では *Grin1* 変異体の抑制率が低かった ($p < .01$, mean+sem)

本研究では、発達障害の多様な症状に応じた多角的なテストバッテリーを用いたハイスループットかつ高精度な発達障害評価システムの構築および基礎データの収集、既知の発達障害モデルを用いた検証を行うことを目的として B6/J をコントロールマウスとし、B6-*Grin1*^{Rgsc174} を用いて実験を行った。本研究では再現性の高い高精度なテストバッテリーを構築することも目標としており、B6/J を用いた実験では再現性の高い安定したデータを得ることができた。また、B6-*Grin1*^{Rgsc174} は注意欠陥・多動のモデル動物であるが、本研究で実施したテストバッテリーでは Open-field test と Home-cage activity test では多動を示し、Crawley's social interaction test では新奇物体へ対する興味は強いが他個体への興味はやや低い、Fear conditioning test では学習・記憶の低下がみられるなどの特徴が示された。多動、社会性(他個体への興味)の低下、学習障害などは発達障害でも広くみられる症状である。これらの結果から、本研究で構築されたテストバッテリーは発達障害に特徴的な行動を検出し、評価することのできる高感度なテストバッテリーであることが示された。

<引用文献>

- 1.Honda et al., Cumulative incidence of childhood autism: a total population study of better accuracy and precision. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 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. *Behavioral Genetics*, 2012, 42, 245-255.
- 3.Koike et al., Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behavioral Brain Research* 2009, 202:1, 114-121.
- 4.Limin et al., Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity* 2009, 23:1, 116-123.
- 5.Furuse et al., Phenotypic characterization of a new *Grin1* mutant mouse generated by ENU mutagenesis. *Behavioral Neuroscience*, 2010, 31, 1281-1291.

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 2件)

1. Naruse M, Ono R, Irie M, Nakamura K, Furuse T, Hino T, Oda K, Kashimura M, Yamada I, Wakana S, Yokoyama M, Ishino F, Kaneko-Ishino T., Sirh7/Ldoc1 knockout mice exhibit placental P4 overproduction and delayed parturition. *Development*. 査読あり 141, 2014, 4763-71.
DOI: 10.1241/dev.114520
2. Suzuki T, Furuse T, Yamada I, Motegi H, Kozawa Y, Masuya H, Wakana S. Pheno-Pub: a total support system for the publication of mouse phenotypic data on the web. *Mammalian Genome* 査読あり 24, 2014, 473-83.
DOI: 10.1007/s00335-013-9482-y

[学会発表](計 2件)

1. 山田郁子, 串田知子, 柏村実生, 鈴木智広, 金田秀貴, 小林喜美男, 三浦郁生, 古瀬民生, 若菜茂晴 マウス発達障害モデルの多面的行動解析テストバッテリーの解析. 実験動物科学技術さっぽろ2014 2014年5月15日 北海道札幌市 札幌コンベンションセンター
2. 山田郁子 日本マウスクリニックにおける行動解析パイプラインのご紹介 筑波実験動物研究会(招待講演)2013年6月7日 茨城県つくば市 文部科学省研究交流センター

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

日本マウスクリニック

mouseclinic.brc.riken.jp/

6．研究組織

(1)研究代表者

山田 郁子（YAMADA, Ikuko）

理化学研究所・バイオリソースセンター・

開発技師

研究者番号：60568723

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし