

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82404

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26700012

研究課題名(和文) マウスの身体像錯覚による発達障害モデルの解析

研究課題名(英文) Evaluation of mouse model of developmental disorders by using body ownership illusion task

研究代表者

和田 真 (Wada, Makoto)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 脳機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：20407331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：自閉スペクトラム症(ASD)者では、身体の捉え方の問題が生じ、これが視点の置き換えや運動の苦手を生み出すと考えられる。定型発達者では、模造品の手と実験参加者の手を同時に筆で刺激すると、視触覚の統合により、模造品の手が自分の手であるかのような錯覚が生じる(ラバーハンド錯覚)。一方、ASD者ではこの錯覚が弱い。我々は、マウスでも、このような現象(ラバーテイル応答)が生じることを発見したため、ASDモデル動物での傾向を調査した。結果、自閉症モデルマウスの一種であるCaps2 KOマウスでは、ラバーテイル応答が生じず、c-Fosイメージングからも感覚統合に関わる後部頭頂皮質の活動低下が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In individuals with autism spectrum disorder (ASD), they have impairment in body representations and it may cause deficits in motor behaviors and viewpoints. In typically developing individuals, when someone's hand and a fake hand (i.e., rubber hand) are stroking synchronously, the participant feels the fake hand becomes her/his own hand. In contrast, individuals with ASD feel this illusion much weaker. We found even mice may feel such kind of body ownership illusions. A fake tail and a tail were synchronously stroking more than one minute. When the fake tail was grasped, a mouse responded as if his actual tail was grasped (rubber tail response). We examined whether the rubber tail response is intact or not in autism model mice, and found that response rates were not significantly different between test and control conditions in Caps2 KO mice, and decreased c-Fos expressions in the posterior parietal cortex might be related. Multisensory integration might be impaired in the KO mice.

研究分野：認知科学

キーワード：多感覚統合 身体性 マウス 自閉症モデル動物 免疫染色

### 1. 研究開始当初の背景

ラバーハンド錯覚とは、ラバーハンドと被験者の手を同期して刺激すると、あたかもラバーハンドが体の一部として感じられる身体イメージの錯覚である (Botvinick & Cohen, 1998)。この時、ラバーハンドを針で刺すと、感じるはずがない「痛み」に反応が生じる為 (Armel & Ramachandran, 2003)、共感性とも関係があると考えられている (Asai et al., 2011)。

サルでは、身体イメージの変化を示唆するような神経応答は報告されているものの (Iriki et al., 1996; Graziano et al., 2000)、動物でラバーハンド錯覚を報告した例はない。応募者らは、マウスの尾とその模造品を同期して刺激してやることでマウスでもラバーハンド錯覚のような応答が生じることを世界で初めて発見した。現時点ではそれがヒトのラバーハンド錯覚と同様に身体イメージの拡張によって生じているか確かめる必要があり、その神経基盤も明らかではない。

一方、身体表象は感覚運動調節に必要不可欠であり、自閉症で顕著に障害される。自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder, ASD) 者ではラバーハンド錯覚が生じにくいことが報告されている (Paton et al., 2011)。自閉症関連遺伝子は、シナプスや軸索に関わるものが多く、感覚統合に影響することで、身体イメージの障害を引き起こしている可能性が高い。

今日、自閉症に関連した多数の遺伝子改変マウスが作られ、特有の障害が再現することが報告された (Sadakata et al., 2007; Durand et al., 2007; Nakatani et al., 2009)。しかし、身体イメージの障害を調べた例はなく、脳の構造変化が障害を起こす機序も不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、発見したマウスのラバーテイル応答を利用して、自閉症モデルマウスでの障害の有無とそのメカニズムを調べることで、自閉スペクトラム症者における身体像の障害の基盤に迫る。この目的を達するために、1) 自閉症などの障害モデルマウスで、ラバーハンド錯覚の応答低下が見られるかを示す。さらに組織化学実験 (免疫染色) も行い、障害特性を反映した神経回路の変化を明らかにする。課題に関連する脳の部位を明らかにする。2) 活動依存性の即時遺伝子 (c-Fos) 等に対する免疫染色を行い、これまでに開発した可視的な解析法 (特許 3958340; Wada et al., 2006 *Neurosci Res*; Wada et al., 2010 *PLoS One*) を用いて、発現部位をスクリーニングする (c-Fos イメージング)。さらに3) 比較認知的な観点からヒトのラバーハンド錯覚との共通点と相違点を明らかにする為の対照実験を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスのラバーテイル応答

マウスを保持するためのステンレス製の筒の左または右側に電線を加工して製作した模造品の尾 (ラバーテイル) を配置した。野生型マウス (C57BL/6) をその筒に馴化するように訓練した後、マウスの尾とラバーテイルを筆により刺激した (図1)。1分以上刺激した後、実験者がラバーテイルを把持して、そのときのマウスの応答を評価した。1) 同期して刺激する条件 (Sync 条件) および、2) 同期させない条件 (Async 条件) で、それぞれ10分間の実験 (~10 試行/条件・日) を同日に行い、驚愕や定位反応がどの程度生じたかを評価した (ラバーテイル課題)。ラバーテイルの把持後1秒以内に、後退や定位が生じた場合の得点を1.0、頭部のビクツとした動きのみが観察された場合の得点を0.5点、はっきりとした動きが観察されなかった場合を0点として算出した。実験は10日間行い、それぞれの条件の平均応答率を算出した。

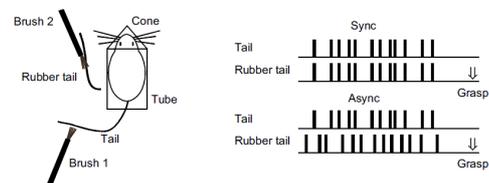


図1. マウスのラバーテイル課題 (Wada et al., 2016 *J Neurosci* より引用)

#### (2) 自閉症モデルマウスの応答

ASD 様の行動特性を示す  $Ca^{2+}$ -dependent activator protein for secretion 2 (*Caps2*)-knockout マウスと統制群としての野生型マウス (C57BL/6) を対象に、実験 (1) と同様の手順でラバーテイル課題を実施した。なお、ASD 者ではラバーハンド錯覚生起が遅延するという報告 (Cascio et al., 2012) があるため、*Caps2* KO マウスにおいてラバーテイル応答獲得に要する時間が遅れることを考慮して、同期 (Sync) 条件と非同期 (Async) 条件、それぞれの反応率について、20 試行の移動平均の差が最大となる時点での反応率を算出した。

#### (3) マウス自身の尾を把持した時の応答

*Caps2* マウスにおいて、触覚応答そのものが低下している可能性が考えられたため、マウス自身の尾を把持したときの応答を記録した (図2)。野生型マウス (C57BL/6) と *Caps2* KO マウスを対象に、筒に馴化した後、マウス自身の尾をマスキングテープで固定した。その状態で、実験者が約1分の間隔で、マウスの尾を把持し、そのときの応答を記録した。

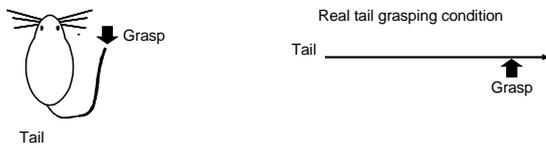


図2. マウス自身の尾を把持した時の応答

(4) 筆による刺激なしでラバーテイルを把持した時の応答

*Caps2* KO マウスにおいて、身体外の物体に対する注意が低下している可能性が考えられたため、筆による刺激なしにラバーテイルを把持したときの応答を記録した(図3)。

野生型マウス(C57BL/6)と *Caps2* KO マウスを対象に、筒に馴化した後、筒の左または右側にラバーテイルを配置した。その状態で、実験者が約1分の間隔で、マウスの尾を把持し、そのときの応答を記録した。実験(2)とは異なり、筆による刺激は行わなかった。

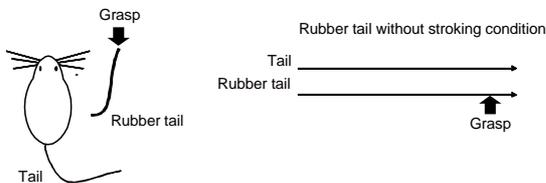


図3. 筆による刺激なしでラバーテイルを把持した時の応答

(5) 免疫染色による責任部位の同定

神経活動に依存して発現が増加する c-Fos を対象に免疫抗体染色を行うことで、課題に関連した領域を探索した。実験(1)および(2)を実施した後、野生型マウス(C57BL/6)を対象に筆による同期(Sync)刺激のみを20分間経験した群と、非同期(Async)刺激のみを20分間経験した群にわけて、灌流固定を実施した。*Caps2* KO マウスでは同期(Sync)刺激のみを20分間経験させた後に灌流固定を実施した。驚愕反応など運動の影響を最小限にするために、ラバーテイルの把持は行わなかった。脳標本を凍結し、薄切(7μm厚)した後、抗 c-Fos 抗体に対する免疫抗体染色を実施した。

免疫抗体染色を実施したプレパラートについて、スライドスキャナを用いて画像を取得し、これまでの研究で開発した免疫染色陽性細胞の自動検出・定量・可視化プログラム(Wada et al., 2006 *Neurosci Res*)を用いて解析した。100μm × 100μm の区画中の c-Fos 陽性細胞密度を各切片中で計算し、得られた統計量マップを標準化することで群間の比較を行った。群間比較は、野生型マウスの同期条件群・非同期条件群間、ならびに野生型マウスと *Caps2* マウスの同期条件同士で行った。

#### 4. 研究成果

(1) マウスのラバーテイル応答

マウスの尾とラバーテイルを筆により、1分以上刺激した後、実験者がラバーテイルを把持したところ、あたかも自身の尾を把持されたときのような定位や後退(驚愕反応)が観察された。

マウスの尾とラバーテイルを同期させた条件(Sync)と同期させなかったときの条件(Async)の反応を10日にわたり記録して、平均を計算したところ、同期条件での応答率が有意に高いことが明らかとなった( $p < 0.0001$ , 図4)。17匹中8匹では個体内の比較でも有意に同期条件で応答率が高いことが判明した。

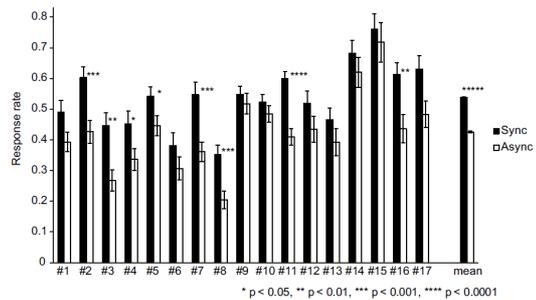


図4. マウスのラバーテイル応答(Wada et al., 2016 *J Neurosci* より引用)

(2) 自閉症モデルマウスの応答

ASD様の行動特性を示す *Caps2* KO マウスと野生型マウスを対象に、ラバーテイル応答を観察した。同期(Sync)条件と非同期(Async)条件の反応率の差が最大となる時点において、比較したところ、野生型マウスでは実験(1)同様に反応率(同期条件と非同期条件の差)に有意な差( $p < 0.05$ )が観察された一方で、*Caps2* KO マウスでは、個体ごとに最も差が拡大する時点を選択してもなお、条件間の有意な差は観察されなかった(図5)。

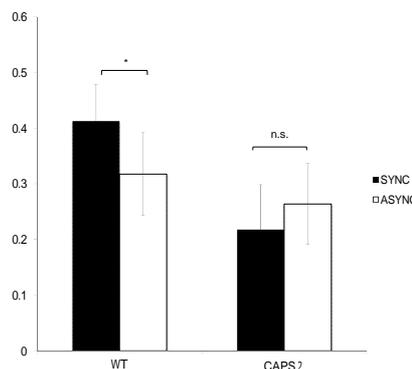


図5. 自閉症モデルマウスの応答  
WT(野生型マウス) CAPS2(*Caps2* KO マウス)でのそれぞれの条件での応答率を示す。

(3) マウス自身の尾を把持した時の応答

野生型マウス(C57BL/6)と *Caps2* KO マウスを対象に、マウス自身の尾を把持したときの

応答を観察した。結果、野生型マウスと *Caps2* マウスの間に反応率の有意な差はなく（図 6）また、反応自体も、ラバーテイル応答（同期条件）と大きな差異は観察されなかった。

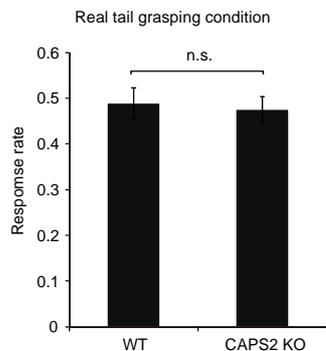


図 6. マウス自身の尾を把持した時の応答

（４）筆による刺激なしでラバーテイルを把持した時の応答

野生型マウス（C57BL/6）と *Caps2* KO マウスを対象に、筆による刺激なしにラバーテイルを把持したときの応答を観察した。結果、*Caps2* KO マウスの応答率が低い傾向が認められたものの、有意には達しなかった（ $p = 0.08$ ，図 7）。

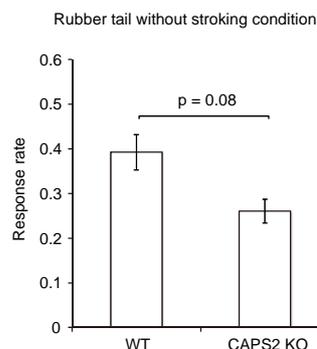


図 7. 筆による刺激なしでラバーテイルを把持した時の応答

（５）免疫染色による責任部位の推定

神経活動に依存して発現が増加する *c-Fos* を対象に免疫抗体染色を行うことで、課題に関連した領域を明らかにした。野生型マウスの同期条件群・非同期条件群間（Sync > Async）の比較を行ったところ、ラバーテイル錯覚が生じると考えられる同期条件において、後部頭頂皮質に相当する領域の *c-Fos* 陽性細胞が有意に多いことが明らかになった（ $p < 0.01$ ，図 8）。さらに、刺激は共通である野生型マウスと *Caps2* マウスの同期条件同士（WT Sync > *Caps2* KO Sync）の比較を行ったところ、野生型マウスの同期条件において、後部頭頂皮質に相当する領域の *c-Fos* 陽性細胞が有意に多いことが示された（ $p < 0.01$ ，図 8）。

げっ歯類においても、後部頭頂皮質は、異なるモダリティの感覚信号が入力する多感覚野であることが示唆されており（Menzel, Barth, 2005）、今回の結果も、ラバーテイル応答の生起に、視覚・触覚の感覚統合が必要である可能性を示唆している。また、*Caps2* KO マウスの感覚機能は正常とされる一方（Sadakata et al., 2007）視触覚のような感覚統合は障害されている可能性が示された。この基盤が身体性の障害につながる可能性が考えられる。

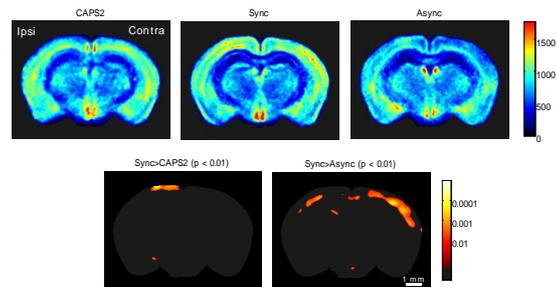


図 8. ラバーテイル実験後の *c-Fos* 発現  
上段は、各条件（左から *Caps2* KO Sync, WT Sync, WT Async）での *c-Fos* 陽性細胞密度（cells/mm<sup>2</sup>）下段は野生型マウスと *Caps2* マウスの同期条件同士の比較（WT Sync > *Caps2* KO Sync,  $n = 6 / 8$ ）と野生型マウスの同期条件群・非同期条件群間（Sync > Async,  $n = 6 / 6$ ）の比較を示している（ $p < 0.01$ ）。一方、図中の Ipsi/Contra とは、それぞれラバーテイルの同側/反対側を示している。

以上の研究について、成果発表を行うとともに、比較認知的な観点からヒトのラバーハンド錯覚についても調査を進めて、錯覚の生じやすさと唾液中オキシトシン濃度との正の相関関係や自閉傾向との負の相関関係を発見し、成果発表した（Ide & Wada, 2017 *Front Hum Neurosci* 等）。

今後、マウスとヒトの身体像錯覚（ラバーテイル反応，ラバーハンド錯覚）を用いて、発達障害者等における身体性障害の神経メカニズムを明らかにしていく。

## 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 5 件)

Ide M & Wada M. Salivary oxytocin concentration associates with the subjective feeling of body ownership during the rubber hand illusion. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11:166, doi:10.3389/fnhum.2017.00166, 2017. 査読有

Wada M, Takano K, Ora H, Ide M & Kansaku

K. The Rubber Tail Illusion as Evidence of Body Ownership in Mice. *Journal of Neuroscience*, 36(43):11133-11137, 2016. 査読有

Ide M & Wada M. Periodic visuotactile stimulation slowly enhances the rubber hand illusion in individuals with high autistic traits. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 10:21, 2016. 査読有

Ide M, Hidaka S, Ikeda H & Wada M. Neural mechanisms underlying touch-induced visual perceptual suppression: An fMRI study. *Scientific Reports*, 6, 37301, 2016. 査読有

Wada M & Ide M. Rubber hand presentation modulates visuotactile interference effect, especially in persons with high autistic traits. *Experimental Brain Research*, 234(1):51-65, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 30 件)

Wada, M., Ide, M., Atsumi, T., Takano, K., Ora, H., Kansaku, K. C-Fos expressions in the cerebral cortex during rubber tail task in mice. 第 95 回日本生理学会大会, 高松, 2018.3.30.

和田真. 身体像の錯覚からみた自閉スペクトラム症の特徴. 新潟大学脳研究所特別例会, 新潟大学, 2018.3.2.

和田真, 感覚情報処理からみた自閉スペクトラム症の特徴. 第 24 回 CAPS 研究会. 関西学院大学(兵庫県西宮市), 2018.2.12.【招待講演】

和田真. マウスとヒトの身体感覚. ヒト行動のアニマルモデルとメカニズム探求研究会, ホテルマイステイズ御茶ノ水, 2018.1.21.

和田真, 渥美剛史, 井手正和, 佐野良威, 篠田陽, 古市貞一, 神作憲司. ラバーテイル応答における Caps2 遺伝子欠損マウスへのオキシトシン投与に関する予備検討. 行動 2017(日本動物行動関連学会・研究会 合同大会), 東京, 2017.8.30-31.

Atsumi, T., Ide, M., Sano, Y., Shinoda, Y., Furuichi, T., Wada, M. Aberrant responses to the biological motion of CAPS2 knockout mice by conspecifics. 行動 2017(日本動物行動関連学会・研究会 合同大会), 東京, 2017.8.30.

Atsumi, T., Ide, M., Sano, Y., Shinoda, Y., Furuichi, T., Wada, M. Altered

discriminative response to biological motion of conspecifics in Ca-dependent activator protein for secretion (CAPS) 2 knockout mice. 第 40 回日本神経科学大会, 幕張. 2017.7.21.

Wada M, Ide M, Takano T, Ora H & Kansaku K. Comparison between response in real tail grasping and rubber tail illusion in mice. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松. 2017.3.30.

Wada M, Ide M, Atsumi T, Yagishita K, Katakai M, Shinoda Y, Furuichi T & Kansaku K. A rubber tail task in Ca-dependent activator protein for secretion (CAPS) 2 knockout mice. The 46th annual meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, 2016.11.14.

Ide M & Wada M. Salivary oxytocin concentration is correlated with the subjective feeling of body ownership during the rubber hand illusion. The 46th annual meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, 2016.11.15.

Atsumi T, Ide M & Wada M. Do mice discriminate biological motion? 日本動物心理学会第 76 回大会, 札幌, 2016.11.23-25.

Wada M, Ide M, Atsumi T, Yagishita K, Katakai M, Shinoda Y, Furuichi T & Kansaku K. A rubber tail task in CAPS2 KO mice: second report. 日本動物心理学会第 76 回大会, 札幌, 2016.11.23-25.

和田真, 発達障害者における感覚情報処理と身体像の特徴. 第 2 回脳情報学セミナー, 静岡大学, 2016.7.1 【招待講演】

Wada M, Ide M, Ora H & Kansaku K. C-Fos and Arc expression during a rubber tail task in mice: an initial study. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌. 2016.3.24

Ide M & Wada M. Associations between salivary oxytocin concentration and subjective feeling during rubber hand illusion. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌. 2016.3.24

Wada M, Multisensory processing and body image in human and animals. 2016 International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University, 静岡大学 浜松キャンパス、

### 2016.3.3 【招待講演】

井手正和, 和田 真. ヒトと自閉症モデル動物の感覚統合と感覚過敏の研究紹介 感覚とその発達メカニズムに関する研究交流会、京都大学こころの未来研究センター、2016.2.24【招待講演】

Ide M, Wada M. Body representation based on visuotactile integration in human and animal. 京都大学理学研究科生物学専攻心理セミナー, 名古屋, 京都大学霊長類研究所, 2015.12.15.【招待講演】

和田真, 多感覚の情報処理と身体像-自閉傾向と比較認知からの検討- 第7回多感覚研究会, 東京女子大学, 2015.11.7【招待講演】

和田真. 自閉症スペクトラムにおける視触覚の相互作用と身体イメージの可塑性. 熊本大学心の可塑性研究ユニット主催シンポジウム「脳がつむぐ知覚世界とその適応的变化」, 熊本大学, 2015.10.31【招待講演】

Wada M, Ide M, Yagishita K, Katakai M, Shinoda Y, Furuichi T, Kansaku K. A rubber tail task in CAPS2 KO mice: an initial study. 第75回日本動物心理学会大会, 日本女子大学. 2015.9.10-12.

Wada M & Ide M: Effects of rubber hand presentation on visuotactile cross-modal dynamic captures. 第38回日本神経科学大会, 神戸. 2015.7.30.

Wada M & Ide M. Effect of a rubber hand presentation on visuotactile cross-modal dynamic captures: association with autistic traits. 16th International Multisensory Research Forum (IMRF 2015), Pisa, Italy, 2015. 6. 13-17

Ide M., Wada, M. Effects of periodicity of brush stroking on the rubber hand illusion. 第92回日本生理学会大会, 神戸. 2015.3.23

Wada, M., Ide, M. Effect of a rubber hand on cross-modal dynamic captures. 第92回日本生理学会大会, 神戸. 2015.3.23

井手正和, 和田真. 周期的触覚刺激がラバーハンド錯覚に及ぼす効果. 第6回多感覚研究会、広島大学. 2014.11.12-13.

和田真, 大良宏樹, 高野弘二, 神作憲司. マウスのラバーテイル課題. 第6回多感覚研究会、広島大学. 2014.11.12-13.

Wada M., Ora H., Takano K., Kansaku K. A

rubber tail task in mice: effect of visual occlusion. 第37回日本神経科学大会, 横浜. 2014.9.13.

Wada M, Ora H, Takano K, Kansaku K: A rubber tail task in mice: effect of spatial location of the rubber tails. 第74回日本動物心理学会大会. 犬山, 2014.7.19-20.

Wada M, Ora H, Takano K, Kansaku K: Mice may experience body ownership of the tails. 15th International Multisensory Forum, Amsterdam, Netherlands, 2014.6.11-14.

〔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

国立リハビリテーション研究所・脳機能系障害研究部・発達障害研究室  
<http://www.rehab.go.jp/ri/noukinou/hattatsu/>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

和田 真 (WADA, Makoto)

国立障害者リハビリテーションセンター  
研究所・脳機能系障害研究部・発達障害研究室長

研究者番号: 20407331

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

#### (4) 研究協力者

古市 貞一 (FURUICHI, Teiichi)

神作 憲司 (KANSAKU, Kenji)

篠田 陽 (SHINODA, Yo)

佐野 良威 (SANO, Yoshitake)

井手 正和 (IDE, Masakazu)

渥美 剛史 (ATSUMI, Takeshi)

名和 妙美 (NAWA, Taemi)

久米 尚子 (KUME, Naoko)