

平成 17 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 18 年 3 月 6 日提出

ふりがな	みやかわ つよし	所属・職	京都大学医学研究科・科学技術振興助教授																																																																																																																																																																																																																																																																		
開発代表者名	宮川 剛																																																																																																																																																																																																																																																																				
開発課題名	大規模データ解析による遺伝子改変マウスの行動テストバッテリーの標準化・効率化 —マウスを用いた統合的脳研究の「ハブ」を目指して—																																																																																																																																																																																																																																																																				
経過及び成果																																																																																																																																																																																																																																																																					
<p>マウスの遺伝子ターゲティングの手法が脳科学の研究に初めて用いられた 1990 年初頭以来、10 年以上、この方法は統合的脳研究の中心的方法の一つとして用いられている。代表者は、この手法によって遺伝子が改変された各種のマウスに対して、幅広い領域をカバーした行動テストバッテリー（表 1）を行い、各種遺伝子の新規機能を見出してきた。この戦略のユニークさは、遺伝子改変マウスの表現型に予め特定の仮説を持たず、まず<u>包括的・網羅的行動テストバッテリー</u>を行うことによって、<u>脳での遺伝子機能の最終出力レベルである行動での表現型を同定することにある</u>。次に、見出された表現型と改変された遺伝子の細胞レベルでの既知の機能からその脳内での機能発現についての推測をし、脳研究の各種研究領域の専門家との共同研究を促すことができる、つまり<u>統合的脳研究の「ハブ」</u>のような役割を果たすことができる（図 1；次頁）。</p> <p>代表者の研究室では、これまでに、以下の統合脳の班員と共同研究を開始している。<u>既にマウスの送付が行われ、行動テストバッテリーを行った班員</u>：一瀬宏 (4)、木下専 (4)、横井峰人(4)、八木健(4)、榊正幸(4)、大西浩史 (4)、矢部大介(1)、嘉村巧(5)、饗場篤(4)、内匠透(5)、中西重忠(4)の計 11 名。括弧内は領域番号。</p> <p><u>今後実験予定が入っている班員</u>：森寿(4)、久保田健夫(5)、柚崎通介(4)、白尾智明(3)、橋本亮太(5)の計 5 名。</p> <p>既に、網羅的行動テストバッテリーを用いて解析された 12 系統の結果を表 2 に示した。なお、全ての共同研究を合わせるとこれまで 44 系統の遺伝子改変マウスの解析を行い 40 系統であらたな表現型を見出している。</p>	<p>表 1. <u>行動テストバッテリーの一覧</u>：数字の順でテストを遂行していく。(12)～(17)までのテストはマウスの行動特性・労力などを考慮して、適宜選択する。</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">テスト名称</th> <th style="width: 40%;">測定項目</th> <th style="width: 30%;">テストに要する期間</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>(1) general health/neurological screen</td><td>体重・直腸温測定・髭や毛皮の状態・各種反射</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(2) wire hang</td><td>筋力</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(3) grip strength test</td><td>筋力</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(4) beam test</td><td>強調運動・バランス</td><td>5日</td></tr> <tr><td>(5) light/dark transition</td><td>不安様行動</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(6) open field test</td><td>活動量・不安様行動・薬物感受性</td><td>2日</td></tr> <tr><td>(7) elevated plus maze</td><td>不安様行動</td><td>3-4日</td></tr> <tr><td>(8) hot plate</td><td>痛覚感受性</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(9) social interaction test (novel environment)</td><td>社会的行動</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(10) rotarod</td><td>協調運動・運動学習</td><td>2日</td></tr> <tr><td>(11) prepulse inhibition test</td><td>感覚-運動ゲーティング・聴覚・驚愕反応</td><td>2日</td></tr> <tr><td>(12) Morris water maze</td><td>参照記憶・固執傾向・作業記憶など</td><td>3週間</td></tr> <tr><td>(13) Barnes circular maze</td><td>参照記憶・固執傾向・作業記憶など</td><td>3週間</td></tr> <tr><td>(14) eight-arm radial maze</td><td>作業記憶・参照記憶・固執傾向など</td><td>1-2ヶ月</td></tr> <tr><td>(15) object recognition test</td><td>参照記憶</td><td>1-2週間</td></tr> <tr><td>(16) cued and contextual fear conditioning</td><td>文脈記憶など</td><td>2日</td></tr> <tr><td>(17) latent inhibition test</td><td>注意</td><td>6日</td></tr> <tr><td>(18) Porsolt forced swim test</td><td>鬱モデル</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(19) tail suspension test</td><td>鬱モデル</td><td>1日</td></tr> <tr><td>(20) 24-hour home cage monitoring (+food and water intake)</td><td>24時間の活動性・サーカディアンリズム</td><td>3-4週間</td></tr> <tr><td>(21) 24-hour social interaction test in home cage</td><td>ホームケージ内での社会的行動</td><td>2週間</td></tr> </tbody> </table> <p>表 2. <u>統合脳班員との共同研究によって得られた結果</u>：既にマウスの送付が行われ、網羅的行動解析が行われたものについての結果を示した。野生群と実験群について、矢印 1 本が p<0.05, 2 本は p<0.01, 3 本は p<0.001 で統計的有意差が得られたことを示す(は有意差なし、ND は未解析)。ほとんどの系統でなんらかの表現型が見いだされている。</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="12">遺伝子改変マウスの系統</th> </tr> <tr> <th>A</th><th>B</th><th>C</th><th>D</th><th>E</th><th>F</th><th>G</th><th>H</th><th>I</th><th>J</th><th>K</th><th>L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>体重</td><td>-</td><td>↑</td><td>-</td><td>↑↑↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑</td><td>↑↑↑</td></tr> <tr><td>体温</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑↑</td></tr> <tr><td>握力</td><td>-</td><td>↑↑↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑↑</td><td>-</td><td>↑↑↑</td><td>-</td><td>↑↑↑</td></tr> <tr><td>不安様行動</td><td>-</td><td>↑↑</td><td>-</td><td>-</td><td>↑</td><td>↑↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>活動量</td><td>↑</td><td>↑↑↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑↑↑</td><td>-</td><td>-</td><td>↑↑</td><td>-</td></tr> <tr><td>社会的行動</td><td>-</td><td>-</td><td>↑?</td><td>-</td><td>↑↑</td><td>↑?</td><td>↑</td><td>-</td><td>-</td><td>↑</td><td>↑↑</td><td>↑</td></tr> <tr><td>運動機能</td><td>↑↑</td><td>↑↑</td><td>↑</td><td>↑↑</td><td>↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑</td><td>-</td><td>↑↑</td><td>-</td></tr> <tr><td>痛覚</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>PPI</td><td>-</td><td>↑</td><td>-</td><td>↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑↑↑</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>鬱様行動</td><td>↑↑</td><td>↑↑</td><td>-</td><td>ND</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>↑</td><td>↑</td><td>ND</td><td>↑↑↑</td></tr> <tr><td>作業記憶</td><td>↑</td><td>ND</td><td>ND</td><td>ND</td><td>ND</td><td>-</td><td>-</td><td>ND</td><td>-</td><td>↑</td><td>ND</td><td>-</td></tr> <tr><td>参照記憶</td><td>-</td><td>↑</td><td>-</td><td>ND</td><td>-</td><td>-</td><td>↑</td><td>ND</td><td>ND</td><td>↑↑</td><td>ND</td><td>↑</td></tr> <tr><td>痙攣発作</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> </tbody> </table>	テスト名称	測定項目	テストに要する期間	(1) general health/neurological screen	体重・直腸温測定・髭や毛皮の状態・各種反射	1日	(2) wire hang	筋力	1日	(3) grip strength test	筋力	1日	(4) beam test	強調運動・バランス	5日	(5) light/dark transition	不安様行動	1日	(6) open field test	活動量・不安様行動・薬物感受性	2日	(7) elevated plus maze	不安様行動	3-4日	(8) hot plate	痛覚感受性	1日	(9) social interaction test (novel environment)	社会的行動	1日	(10) rotarod	協調運動・運動学習	2日	(11) prepulse inhibition test	感覚-運動ゲーティング・聴覚・驚愕反応	2日	(12) Morris water maze	参照記憶・固執傾向・作業記憶など	3週間	(13) Barnes circular maze	参照記憶・固執傾向・作業記憶など	3週間	(14) eight-arm radial maze	作業記憶・参照記憶・固執傾向など	1-2ヶ月	(15) object recognition test	参照記憶	1-2週間	(16) cued and contextual fear conditioning	文脈記憶など	2日	(17) latent inhibition test	注意	6日	(18) Porsolt forced swim test	鬱モデル	1日	(19) tail suspension test	鬱モデル	1日	(20) 24-hour home cage monitoring (+food and water intake)	24時間の活動性・サーカディアンリズム	3-4週間	(21) 24-hour social interaction test in home cage	ホームケージ内での社会的行動	2週間		遺伝子改変マウスの系統												A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	体重	-	↑	-	↑↑↑	-	-	-	-	-	-	↑	↑↑↑	体温	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑↑	握力	-	↑↑↑	-	-	-	-	-	↑↑	-	↑↑↑	-	↑↑↑	不安様行動	-	↑↑	-	-	↑	↑↑	-	-	-	-	-	-	活動量	↑	↑↑↑	-	-	-	-	-	↑↑↑	-	-	↑↑	-	社会的行動	-	-	↑?	-	↑↑	↑?	↑	-	-	↑	↑↑	↑	運動機能	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑	-	-	-	↑	-	↑↑	-	痛覚	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	PPI	-	↑	-	↑	-	-	-	↑↑↑	-	-	-	-	鬱様行動	↑↑	↑↑	-	ND	-	-	-	-	↑	↑	ND	↑↑↑	作業記憶	↑	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	↑	ND	-	参照記憶	-	↑	-	ND	-	-	↑	ND	ND	↑↑	ND	↑	痙攣発作	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
テスト名称	測定項目	テストに要する期間																																																																																																																																																																																																																																																																			
(1) general health/neurological screen	体重・直腸温測定・髭や毛皮の状態・各種反射	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(2) wire hang	筋力	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(3) grip strength test	筋力	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(4) beam test	強調運動・バランス	5日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(5) light/dark transition	不安様行動	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(6) open field test	活動量・不安様行動・薬物感受性	2日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(7) elevated plus maze	不安様行動	3-4日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(8) hot plate	痛覚感受性	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(9) social interaction test (novel environment)	社会的行動	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(10) rotarod	協調運動・運動学習	2日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(11) prepulse inhibition test	感覚-運動ゲーティング・聴覚・驚愕反応	2日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(12) Morris water maze	参照記憶・固執傾向・作業記憶など	3週間																																																																																																																																																																																																																																																																			
(13) Barnes circular maze	参照記憶・固執傾向・作業記憶など	3週間																																																																																																																																																																																																																																																																			
(14) eight-arm radial maze	作業記憶・参照記憶・固執傾向など	1-2ヶ月																																																																																																																																																																																																																																																																			
(15) object recognition test	参照記憶	1-2週間																																																																																																																																																																																																																																																																			
(16) cued and contextual fear conditioning	文脈記憶など	2日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(17) latent inhibition test	注意	6日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(18) Porsolt forced swim test	鬱モデル	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(19) tail suspension test	鬱モデル	1日																																																																																																																																																																																																																																																																			
(20) 24-hour home cage monitoring (+food and water intake)	24時間の活動性・サーカディアンリズム	3-4週間																																																																																																																																																																																																																																																																			
(21) 24-hour social interaction test in home cage	ホームケージ内での社会的行動	2週間																																																																																																																																																																																																																																																																			
	遺伝子改変マウスの系統																																																																																																																																																																																																																																																																				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L																																																																																																																																																																																																																																																									
体重	-	↑	-	↑↑↑	-	-	-	-	-	-	↑	↑↑↑																																																																																																																																																																																																																																																									
体温	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑↑																																																																																																																																																																																																																																																									
握力	-	↑↑↑	-	-	-	-	-	↑↑	-	↑↑↑	-	↑↑↑																																																																																																																																																																																																																																																									
不安様行動	-	↑↑	-	-	↑	↑↑	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																									
活動量	↑	↑↑↑	-	-	-	-	-	↑↑↑	-	-	↑↑	-																																																																																																																																																																																																																																																									
社会的行動	-	-	↑?	-	↑↑	↑?	↑	-	-	↑	↑↑	↑																																																																																																																																																																																																																																																									
運動機能	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑	-	-	-	↑	-	↑↑	-																																																																																																																																																																																																																																																									
痛覚	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																									
PPI	-	↑	-	↑	-	-	-	↑↑↑	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																									
鬱様行動	↑↑	↑↑	-	ND	-	-	-	-	↑	↑	ND	↑↑↑																																																																																																																																																																																																																																																									
作業記憶	↑	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	↑	ND	-																																																																																																																																																																																																																																																									
参照記憶	-	↑	-	ND	-	-	↑	ND	ND	↑↑	ND	↑																																																																																																																																																																																																																																																									
痙攣発作	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																									

本年度配分された予算については、1) 京都大学近辺のレンタル飼育・実験スペース (40 万円/月 x 6 ヶ月) のレンタル費、2) ホームケージ活動量・社会的行動測定システム (30 ケージ分)、3) マウス飼育用アイソレーター (30 ケージ収容)、に使用した。これにより、研究室の処理能力を向上させることができた。

- 取得された 1000 匹以上のマウスのデータについて、因子分析や、週齢・実験時刻などの諸要因の影響についての解析を行った。この結果について 2005 年度の日本神経科学会で発表を行った。

開発成果を踏まえた今後の展開

- 「成果」で述べた共同研究は、共同研究の希望があった研究室について受け入れる形式をとっており、まだ「公募」という形式はとっていない。今後、統合脳班員に広く公募を行うことを予定しているが、予想される多くの要望に応えるためには、処理能力をより一層向上させる必要がある。
- 処理能力を向上させるために解決すべき大きな問題点が現時点で 2 点ある。一点目はこの行動テストバッテリーについては、實際上不可欠な諸々の基礎的な知見が圧倒的に不足していることである。例えば、不安様行動の指標とされている明暗選択テストと高架十字迷路の結果には相関が見られるのだろうか？テストを行う時刻、1 ケージ内に飼育されている匹数、マウスの週齢、遺伝的背景、テストの順番、等は、各テストの結果にどの程度の影響を与えるのだろうか？本研究では、行動テストバッテリーを用いた多くの共同研究を実施しつつ、1000~2000 匹のマウスから得られたデータを活用して基礎データの蓄積と解析を行い、これらの実際的な疑問に対する答えを得て、行動テストバッテリーを改良し、標準化していく。二点目は、共同研究のニーズが極めて高く、現時点で研究施設の許容量を超えてしまっていることである。これを解消するために、近辺のレンタル飼育・実験スペースを借り、また実験装置数を増やすことにより、研究施設の処理能力を高め、ニーズにできるだけ応えることができるような整備を行う。

これらにより、当研究室がマウスを用いた統合的脳研究の拠点としてより効率的に機能できるだけでなく、国内での同様な施設の運営に有用な情報を提供することができることが予想され、日本の統合的脳研究の競争力を高めることが期待できる。

- 遺伝子改変マウスを用いた「統合的脳研究」においては、行動レベルでの表現型を明らかにすることはゴールというよりもスタートと考えることができる (図 1)。表 2 に示したような行動レベルでの研究成果も、これに対応する脳の様々なレベルでの表現型解析とセットとなって公表されることが望ましい。しかしながら現状では、「脳の各レベルでの表現型解析」をスムーズに行うことができるような共通プラットフォームが整備されておらず、行動レベルでの表現型解析から論文発表へ至るまでに長い時間がかかってしまう、という問題がある。今後、

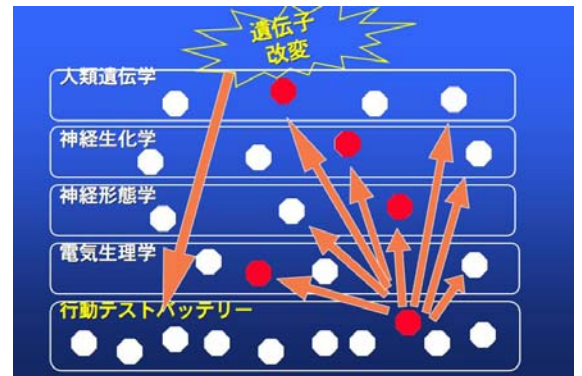


図 1. 研究戦略の概念図

- 様々な脳表現型の解析法 (トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析、電気生理学的解析、生化学的解析、組織学的解析など) について、当研究室のような国内の基盤的共通プラットフォーム (=コア・ラボラトリー) を、何らかの形で整備していくことによって、日本の統合的脳研究の競争力を高める努力を行うことが必要であろう。
- 京大からの代表者の研究室へのサポート (科学技術振興調整費) は平成 18 年度で終了し運営費が激減する予定であること、レンタルスペースについても月々の多額のレンタル費用がかかること、などから、平成 18 年度以降の統合脳支援班からの継続的支援を希望する。