

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた
新技術の創出」

平成 20 年度採択研究代表者

平成 20 年度
実績報告

加藤 進昌

昭和大学医学部・教授

社会行動関連分子機構の解明に基づく自閉症の根本的治療法創出

1. 研究実施の概要

実験動物グループでは、オキシトシンの分泌障害が自閉症の原因となりうるという仮説を立て、オキシトシン分泌神経終末に存在し脱分極を感知するリアノジン受容体に作用するサイクリック ADP リボース(cADPR)を作る CD38 に注目した。そして、オス CD38 ノックアウト(KO)マウスでは、オキシトシン KO マウスで示された社会性の留意の喪失(ペアーの記憶喪失)を認めた。また授乳中のメス CD38-KO マウスは子マウスの養育行動に異常があり、この子マウスも多動傾向を示した。CD38-KO マウスの血漿オキシトシン濃度は正常の 50%低値で、上述した行動異常はいずれもオキシトシン投与で回復した。さらに、CD38 が cADPR 依存的にオキシトシン分泌を促進することも実証した。以上一連の実験によって、CD38 とその産物がオキシトシン分泌に重要な作用を発揮し、社会行動異常の発現に重要な関わりをもつことを証明した。そこで、その産物の類似物を合成し、自閉症の治療薬としての可能性を探るシステムを作っている。

臨床研究グループでは、実験動物から得られた知見を、まずは成人の自閉症スペクトラム障害当事者に応用し、オキシトシン経鼻投与による社会性障害の改善効果と脳画像所見、遺伝要因との関連を検証する。これまで当事者の双生児例を対象に社会脳領域の形態異常が遺伝由来だと示唆し、協調性の男女差が社会脳領域の形態の男女差と関連することを報告した。また、400例強の当事者から血液サンプルを収集し遺伝子解析可能な体制を整えた。さらに平成20年から21年にかけて、オキシトシン受容体遺伝子多型が社会脳領域の形態の男女差に関連すること、社会性障害の解明に適した心理課題を作成しこれら社会脳領域の男女差は機能にも及ぶことを見出した。一方で臨床試験遂行のための倫理基盤・機器・体制を整え、平成21年度は臨床試験を開始し脳画像や遺伝子多型を含めたデータ収集を開始する。

成人での知見に基づき、最終的な目標である幼児期早期臨床試験の適応を定めていく。平成20年から21年にかけては、新生児の臍帯血やろ紙血の収集方法とオキシトシン濃度測定方法を精神科・小児科・産婦人科・薬学部で共同開発し、予備的検討を行った。また、自閉症スペクトラム障害の専門外来とデイケアを立ち上げ、MRIを導入し、評価・介入・キャッチアップ体制を整え

た。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

実験動物を用いた研究(金沢大・東田)は、当該研究構想の基礎を与えるものであると同時に、臨床との共同研究や、探索的な遺伝子関連解析によって得られた遺伝子候補を疾患モデルで検証する。臨床試験の際の治療効果判定のための客観的マーカー発見にも、動物レベルでのエビデンス獲得に努めて寄与する。オキシトシン無効例や奇異反応などの臨床結果が出ることも十分に予測されることから、動物レベルでの検証によって解決法を探ることも重要な任務である。

平成 20 年度には、まず動物レベルで CD38 分子について検討を重ねた。サイクリック ADP リボース(cADPR)合成能を持つ CD38 は、脳の神経やグリア細胞に多量存在し、成長とともに発現が増加する。しかし、視床下部下垂体後葉領域での CD38 は未報告だったため、CD38 プロンプによる CD38 メッセンジャー量の発達に伴う変化を RT・PCR 法で調べ、多量の発現を認めた。また CD38 抗体によるウエスタンブロットにて、脳全体・視床下部及び下垂体部の CD38 タンパクの発現を調べたところ、オキシトシン神経と共発現しており、両者の深い機能相関が示唆された。さらに抗オキシトシン抗体による免疫電顕学的検査により、視床下部・下垂体領域でのオキシトシン含有細胞を確認したが、CD38 ノックアウト(KO)マウスでは、分泌量が減り組織内に貯留され含有量が増えていることを、金コロイド粒子の存在で確認した。

次に、ペアリング行動実験によって、CD38KO マウスの好(反)集団行動や家族形成行動などの社会行動を検討した。オス、メス一匹ずつを 10 分間別のケージに入れた後、1 分間同一ケージに入れ、これを 4 回繰り返し、オスがメスを追い臭いを調査する時間を測定した。KO マウスでは、オスがメスを追跡調査する行動に異常がみられ、CD38 が社会行動に関係がある事を確認した。また KO マウスでは繁殖率が低いため、ペア形成無認知結果としての求愛性行動量の減少がないか調査した。暗視野カメラによる夜間の行動観察を行い、オスがメスに寄り添う時間に野生型と KO マウスに差が存在したが、性行動量までは推測できなかった。今後、観察数を倍に増やして引き続き観察する。KO マウス新生仔では、子どもの測定法を総合的に開発し、多動で発声量が少なく母親を求めて鳴かない事を実証した(1)。さらに KO マウスの血中オキシトシン量を ELISA 法にて定量すると、野生マウスと比較して減少しており、自閉症当事者で血中オキシトシン量減少の有無を調査する事が重要だと示唆された。

さらに、ヒト CD38 遺伝子の変異と多型を自閉症当事者の末梢血液で解析し、血中オキシトシン及びバゾプレシン量を RIA キットにて濃度を測定した。ヒト CD38 は 8 つのエクソンからなっているので、それぞれのエクソン部を PCR にて増幅できるプライマーにて増幅した。塩基配列を現在解析中で、公表するには至っていない。また、自閉症児に対するオキシトシン噴霧投与による社会行動の改善について、短期、長期的に臨床評価するシステムを現在模索し、現在、種々の合成上の技法を開発し、CD38 酵素の産物であるサイクリック ADP リボースの類似体の合成に成功し、その物質の持つ有効性を実証した(2, 3)。

東京大学(山末)では、実験動物で得られた知見を成人当事者で検証することを目的として、急増する当該領域論文を概観し(Yamasue H, Kuwabara H, Kawakubo Y, Kasai K: Oxytocin, Sexually-dimorphic feature of social brain, and autism. Psychiatry Clin

Neurosci 63:129-140, 2009)、予備的検討(4)を行って研究仮説と研究デザインの細部を洗練させ、東京大学医学部附属病院内でオキシトシン噴霧剤を用いた臨床試験として申請し承認を受けた。

関連解析によって自閉症との有意な関連が報告され、追試も行われているオキシトシン受容体遺伝子多型 rs2254298 A allele と 20 歳代から 30 歳代の健常成人 180 名における脳形態との関連を検討した。その結果、rs2254298 A allele を多く持つ個体ほど前部帯状皮質と右半球の上側頭溝後部の体積が小さかった。さらに、男性では認めずに女性で特異的な相関として、この allele が少ないほど扁桃体や後部下前頭回の体積が大きかった(投稿準備中)。これらの部位は体積の男女差が存在する部位でもあり、女性ではこれらの部位の体積が大きいほど協調性が高いという相関を報告した部位でもある(4)。

さらに、脳機能との関連も検討するため、オキシトシンによる改善が報告されている対人交渉や表情理解と関連が深く、さらに自閉症の社会性障害との関連も報告された表情模倣課題を functional-MRI に採用した。健常成人 34 名(男 17 名/女 17 名)で、男女 1 名ずつの俳優が演技する、恐怖、悲しみ、幸せの表情を観察する条件と模倣して一緒に演技する条件、そして相当する表情筋の運動のみの条件を行う予備的課題を用いた functional MRI での検討を行った。その結果、後部下前頭回、後部上側頭溝などの領域は模倣をする際に運動の際よりも有意に強く活動した。また、観察する際にも模倣と類似した脳活動が多く得られたが、扁桃体、前部島皮質など情動処理に関与する部位は模倣の際に観察よりも有意に強く活動していた。さらに、女性では男性よりもこれらの扁桃体や前部島皮質などの賦活が有意に強かった(投稿準備中)。これらの対人知覚や模倣や情動に関与する脳領域の賦活によって共感が成立し、こうした脳活動には男女差があると考えられた。男女差のある対人相互性の脳基盤を明らかにするために有効なこの表情模倣課題は、自閉症の対人相互性の障害やオキシトシンによる改善効果を検討する上で適していると考え、さらに俳優 20 名(男性 10 名/女性 10 名)の撮影を追加し、表情刺激課題の素材を確保して心理課題を改良している。

研究グループから 3 名が国際的に妥当とされる診断面接 Autism Diagnostic Interview Revised (ADI-R) のトレーニングを渡米して受講した。

昭和大学(加藤)では、平成20年から21年にかけて、成人で高機能の自閉症スペクトラム障害当事者を対象とした専門外来と専門デイケアを立ち上げ、男性だけでも50名程度の当事者が定期通院するまでに発展させた。成人自閉症スペクトラム障害(アスペルガー症候群)の問題を広く社会に訴え、同時に本研究への参加協力に資することも意図して、一般向けの書籍を発行した(加藤進昌:「大人のアスペルガー症候群」との接し方、講談社、2009)。この効果もあって昭和大学烏山病院への問い合わせが急増しており、次年度に向けてより多くの当事者の研究協力が期待される。また、MRIを導入し、脳機能・形態の評価も含めた臨床評価・介入・キャッチアップの体制を整えた。

さらに、実験動物や成人での知見に基づき、最終的な目標である幼児期早期臨床試験の適応を検討しながら、その実施体制を整えている。乳幼児臨床試験実施にあたっては、成人における試験(東京大学で実施)で、その効果と安全性が十分担保されなければいけないことは論を俟たない。したがって、まず昭和大学病院産科で出産予定の妊婦を対象に、環境ホルモンなどの周

産期リスクを中心に検討する研究計画を立案し、倫理委員会の承認を受けた。これを受けて、臍帯血や新生児スクリーニング用の採血時の検体について各種ホルモンと同時にオキシトシン濃度の測定を開始した。使用検体量がごく限られることから、この実現には超高感度測定法の開発が必須であり、現在薬学部の協力を得ながら抗体作製などの段階に入っている。平成 21 年度には臍帯血中の遺伝子解析についても慎重に計画を立て、倫理委員会に申請する予定である。

3. 研究実施体制

(1)「金沢大学」グループ

①研究分担グループ長:東田 陽博 (金沢大学、教授)

②研究項目

- 社会性(親養育行動)における母親と父親の両者の関与・役割について調べる。観察をホームケージで行いながら、養育行動をスタートするきっかけとなる条件を見出す。
- 社会性を人間はコミュニケーションにより確保している。自閉症のコミュニケーション障害をマウスで研究するための土台を作るため、マウスの発する超音波会話の記録装置を完成する。
- 自閉症患者とその血縁者の検体試料(血液、爪等)から DNA を抽出し、CD38 遺伝子の第 3 エクソンの塩基配列を決定し、その部位に SNP があるか否かを調べる。

(2)「東京大学」グループ

①研究分担グループ長:山末 英典 (東京大学、准教授)

②研究項目

以下のヒト (自閉症スペクトラム障害当事者・健常者) を対象とした研究実施項目:

- オキシトシン関連分子 (CD38, オキシトシン受容体など) の遺伝子関連解析
- 社会性障害の心理課題作成、オキシトシン経鼻噴霧剤を用いた成人臨床試験
- 脳画像データ収集・解析 (structural-MRI, functional-MRI, Diffusion Tensor Imaging, MR-Spectroscopy)

(3)「昭和大学」グループ

①研究分担グループ長:加藤 進昌 (昭和大学、教授)

②研究項目

- 研究統括
- 附属烏山病院における「アスペルガー障害研究・ケアセンター(仮称)」の立ち上げと、成人自閉症スペクトラム障害患者のリクルート、臨床評価、遺伝子・脳画像指標の収集。本研究は主として東京大学で行われる共同研究の一環となるものである。
- 臍帯血プロジェクトと幼児期早期臨床試験。
そのほかの共同研究遂行に必要な補足的基礎ならびに臨床研究。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Liu, H.-X., Lopatina, O., Higashida, C., Tsuji, T., Kato, I., Takasawa, S., Okamoto, H., Yokoyama, S. & Higashida, H.. Locomotor activity, ultrasonic vocalization and oxytocin levels in infant CD38 knockout mice. *Neurosci Lett.* 448 : 67-70, 2008.
2. Kudou, T., Weber, K., Guse, A. H., Potter, B. V. L., Hashii, M., Higashida, H., Arisawa, M., Matsuda, A. & Shuto, S. Design and synthesis of 4'',6''-unsaturated cyclic ADP-carbocyclic ribose as a Ca²⁺ -mobilizing agent. *Tetrahedron Letters*, 49 : 3976-3979, 2008.
3. Kudou, T., Murakami, T., Hashii, M., Higashida, H., Sakurai, T., Maechling, C., Spiess, B., Weber, K., Guse, A. H., Potter, B. V. L., Arisawa, M., Matsuda, A. & Shuto, S. Design and synthesis of 4'',6''-unsaturated cyclic ADP-carbocyclic-ribose, a Ca²⁺ -mobilizing agent selectively active in T cells. *Tetrahedron*. 64 : 9754-9765, 2008.
4. Yamasue H, Abe O, Suga M, Yamada H, Rogers MA, Aoki S, Kato N, Kasai K. Sex-Linked neuroanatomical basis of human altruistic cooperativeness. *Cerebral Cortex* 18:2331-2340, 2008.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)