

「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 21 年度
実績報告

加藤 進昌

昭和大学医学部精神医学教室・教授
昭和大学附属烏山病院・院長

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

自閉症は、社会相互性障害、言語コミュニケーション障害、興味限局・常同性を 3 主徴とする発達障害である。中でも社会相互性障害は本質的で、当事者の社会適応を深刻にさまたげ、発達障害をとりまく社会問題の最大の要因と言えるが、この社会性障害に直接有効な従来の薬物療法は皆無だった。実験動物グループでは、オキシトシンが社会行動異常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。そしてオスマウスでも、CD38 誘発性のオキシトシン放出が社会性に関与することを示した。さらにオキシトシン受容体の下流にリン酸化酵素と CD38 が関与することを証明し、CD38 が cADPR 依存的にオキシトシン分泌を促進することを実証した。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、その産物の類似物と非ペプチド性オキシトシンを合成し、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、さらにまたオキシトシン受容体遺伝子多型も扁桃体体積のような社会性の障害の中間表現型とも、そして自閉症とも関連することを示した。これらの知見を基に、成人の自閉症スペクトラム障害当事者において、オキシトシン投与による社会性障害の治療効果を検証し、この治療効果とオキシトシン関連分子の遺伝子多型との関係を、中間表現型に functional-MRI 上の脳活動変化などを用いて解明する臨床試験を開始した。そして、家族歴、臍帯血中の関連遺伝子多型、血中オキシトシン低値、発達異常などからオキシトシンによる治療効果が予測される例には、発達障害の臨床徴候出現後に出来る限り早期からオキシトシンを経鼻投与する臨床試験の実現に向けて、新生児コホート研究を開始した。これらの研究を進め、自閉症における社会性障害の根本的治療法創出に結びつけるような知見を見出していく。

§ 2. 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。
- 自閉症患者に特徴的とされるアイコンタクトの障害に着目した視線追跡の定量的評価と諸指標との比較。
- 新生児コホート研究の倫理承認ならびに発足のための環境調整。
- 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。

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

動物実験レベル:

平成 21 年度には、CD38 分子について脳視床下部での検討を重ねた。サイクリック ADP リボー

ス(cADPR)合成能を持つ CD38 は、マウスでオキシトシン含有神経との共存を観察していたので、グリア細胞との共存をアストロサイトやミクログリア特異抗原との共存があるか否か調査した。その結果、多くはないが共存しており、サイクリック ADP リボースが周辺の他の細胞で作られパラクリン作用で効果を持つことも否定できなかった¹³⁻¹⁶)。そこで、次にヒト死後脳における情報が何も存在しない事から、共染色を試みた。ヒト視床下部で、CD38 とオキシトシンが共局在している事を初めて確認し、ヒト視床下部オキシトシン神経細胞での CD38 の分泌調整の可能性を考える第一の手がかりを得た¹⁷)。次に、オキシトシンによるオキシトシン遊離促進(オートレギュレーション)が、オスの社会行動に作用しているか否かを検討するため、オスマウスの視床下部細胞を培養した。オキシトシン添加による細胞内カルシウム増加を測定し、種々の阻害剤の効果から、オキシトシン受容体下流にタンパク質リン酸化酵素 C (PKC) や CD38 の関与を明らかにした¹⁴)。メスの生殖活動としての子宮収縮や射乳以外に、オスの社会性行動発現にもオキシトシンの分泌をオキシトシン自体が促進するオートレギュレーションが関与している事、その分子機構の一端を明らかにした^{15,16})。

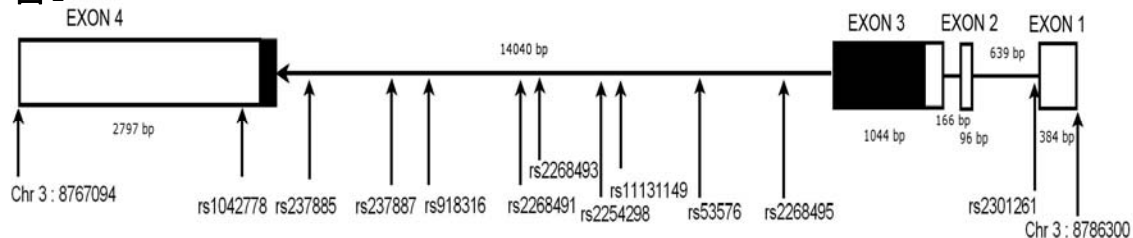
次に、ペアリング行動実験によって、マウスの好(反)集団行動や家族形成行動などの社会性行動を検討した。父親の家族養育行動については情報が極めて少ない。父親がどの程度、家族との社会交流を行うかをマウスで実験する方法を検討した。一夫一婦制をとらないが、マウスでも狭い飼育箱に子供とともに父親母親を飼い続けると、父親も養育することが報告されている。そこで、そのような状態で、父親と子供のみ条件下で、父親が巣の外におかれた子供を口にくわえて巣に戻す行動(リトリブ)を観察した。母親が存在しないと、約 60%の父親はリトリブを示し、同じ条件下の母親よりも時間はかかるが、母親のそれと本質的に同じ行動を示した。CD38 ノックアウトでは、両方にこのような行動は観察されなかった。また、オキシトシンの注射により回復したことから、CD38 が「両親脳」に関わるオキシトシンを介して作用する分子である事が明らかになった(未発表)。

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、同時に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 にて増幅し、塩基配列から変異の有無と自閉症との関連を調べた。更に、10ヶ所のイントロン部の一塩基多型(SNP)を選び、自閉症に特異的に相関のある SNP の有無を日本人とアメリカ人(JARE)自閉症 DNA サンプルで検討した¹⁷)。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、非ペプチド性類似体の種々の合成上の技法を開発しているところである。合成された類似体の活性をスクリーニングするため、ヒトオキシトシン受容体を発現する培養細胞系は確立した¹⁴)。

成人ヒトレベルでの検証：

オキシトシン受容体遺伝子多型 (OXTR) を用いた関連解析

図 1



既知の SNPs との関連解析を行った^{1,10,11,12}。自閉症との関連が複数報告される rs2254298 多型を含む 11 の OXTR (図 1) について、日本人健常対照 440 名、自閉症スペクトラム障害 (ASD) 当事者 282 名で、rs2254298 多型を含む 4 つの多型で有意な関連を認めた¹²。

OXTR と社会脳領域の体積の個体差 これまでの検討から、脳形態や機能は、遺伝要因の影響を強く受けるが^{3,4,8}、他に年齢^{5,7}や男女差⁶などの要因も交絡し、遺伝要因との関連の検討が困難になりやすい。そこでさらに、OXTR と脳形態の個体差の関係について検討を進めた。

オキシトシン経鼻投与による社会認知の改善と社会脳領域の活動変化を検討する臨床試験

これまでの検討結果から、遺伝的に規定されたオキシトシンの働きやすさが社会脳領域の発達に一部は男女で特異的に影響し、これらの脳領域を介して社会認知の個体差や男女差、そして男女で頻度の異なる社会性障害が規定される可能性が示唆された。さらに、オキシトシン投与による社会性障害改善効果とこれらの脳領域の活動変化や関連分子の遺伝子多型との関連を予測した (Yamasue H et al., Psychiatry Clin Neurosci 63:129-140, 2009)。そこで、オキシトシン噴霧剤と社会認知を動員するオリジナルの心理課題による f-MRI を用いた臨床試験を開始した

(<https://center.umin.ac.jp/cgi-open-bin/>

[/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&type=summary&recptno=R000002743&language=J](https://center.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&type=summary&recptno=R000002743&language=J))。

21 年度には 7 症例での臨床試験を実施したが有害事象は認められず、22 年度には更に症例を増やして仮説を検証する。

幼児期コホートでの検証 新生児コホートを行なうために、母子血および新生児の臍帯血の収集とこれらの検体からの遺伝子解析、新生児のろ紙血からのオキシトシン血中濃度測定方法を昭和大学精神科・小児科・産婦人科・薬品分析化学教室で共同開発し予備的検討を行った。また、遺伝子解析を含む点からも発達障害を標的とした新生児コホートという点からも倫理的問題の検討については重視し、特に入念な議論を重ねて昭和大学内で倫理委員会での承認を得た。さらに新生児・幼児の社会行動の評価指標をリストアップして臨床データ収集の体制を整え、データ収集を開始した。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Otsuka S, Sakamoto Y, Siomi H, Itakura M, Yamamoto K, Matumoto H, Sasaki T, Kato N, and Nanba E. Fragile X carrier screening and FMR1 allele distribution in the Japanese population. *Brain Dev*, 31:110-4,2010. [doi]10.1016/j.braindev.2008.12.015
2. Nakano T, Ota H, Kato N, Kitazawa S. : Deficit in visual temporal integration in autism spectrum disorders. . *Proc. R. Soc. Lond. B*, 277:1027-30, 2010, [doi]10.1098/rspb.2009.1713
3. Kawakubo Y, Kuwabara H, Watanabe K, Minowa M, Someya T, Minowa I, Kono T, Nishida H, Sugiyama T, Kato N, Kasai K. Impaired prefrontal hemodynamic maturation in autism and unaffected siblings. *PLoS One* 4: e6881, 2009. [doi]10.1371/journal.pone.0006881.
4. Inoue H, Yamasue H, Tochigi M, Suga M, Iwayama Y, Abe O, Yamada H, Rogers MA, Aoki S, Kato T, Sasaki T, Yoshikawa T, Kasai K. Functional (GT)_n polymorphisms in promoter region of N-methyl-d-aspartate receptor 2A subunit (GRIN2A) gene affect hippocampal and amygdala volumes. *Genes Brain Behav* , 2009 [Epub ahead of print] . doi: 10.1111/j.1601-183X.2009.00557.x
5. Gonoi W, Abe O, Yamasue H, Yamada H, Masutani Y, Takao H, Kasai K, Aoki S, Ohtomo K. Age-related changes in regional brain volume evaluated by atlas-based method. *Neuroradiology*, 2009 [Epub ahead of print] . [doi]10.1007/s00234-009-0641-5
6. Asami T, Yamasue H, Hayano F, Nakamura M, Uehara K, Otsuka T, Roppongi T, Nishashi N, Inoue T, Hirayasu Y. Sexually dimorphic gray matter volume reduction in patients with panic disorder. *Psychiatry Res* 173: 128-134, 2009. [doi]10.1016/j.psychres.2008.10.004
7. Takao H, Abe O, Yamasue H, Aoki S, Kasai K, Sasaki H, Ohtomo K. Aging effects on cerebral asymmetry: a voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study. *Magn Reson Imaging* 28: 65-69, 2010. [doi]10.1016/j.mri.2009.05.020
8. Inoue H, Yamasue H, Tochigi M, Takei K, Suga M, Abe O, Yamada H, Rogers M, Aoki S, Sasaki T, Kasai K. Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on amygdalar and hippocampal volumes. *Brain Res*: in press.
9. Kanai C, Iwanami A, Ota H, Yamasue H, Matsushima E, Yokoi H, Shinohara K, Kato N. Clinical characteristics of adults with Asperger's Syndrome assessed with self-report questionnaires, RASD, in press.
10. Marui T, Funatogawa I, Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Nanba E, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K, Watanabe K, Kano Y, Kato N, and Sasaki T. Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism. *Int J Neuropsychopharmacol* 12: 1-10, 2009. [doi]10.1017/S1461145708009127
11. Marui T, Funatogawa I, Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Jinde S, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K, Watanabe K, Kano Y, and Kato N. Association between autism and

12. Liu X, Kawamura Y, Shimada T, Otowa T, Koishi S, Sugiyama T, Nishida H, Hashimoto O, Nakagami R, Tochigi M, Umekage T, Kano Y, Miyagawa T, Kato N, Tokunaga K, Sasaki T. Association of the oxytocin receptor (OXTR) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD) in the Japanese population. *J Hum Genet* 55: 137–141, 2010. [doi]10.1038/jhg.2009.140
13. Lopatina O, Liu HX, Amina S, Hashii M, Higashida H. Oxytocin-induced elevation of ADP-ribosyl cyclase activity, cyclic ADP-ribose or Ca(2+) concentrations is involved in autoregulation of oxytocin secretion in the hypothalamus and posterior pituitary in male mice. *Neuropharmacology*. 58: 50-55, 2010. [doi]10.1016/j.neuropharm.2009.06.012
14. Amina S, Hashii M, Ma W-J, Yokoyama S, Lopatina O, Liu H-X, Islam MS, Higashida H. Intracellular calcium elevation induced by extracellular application of cyclic-ADP-ribose or oxytocin is temperature-sensitive in rodent NG108-15 neuronal cells with or without exogenous expression of human oxytocin receptors. *J. Neuroendocrinol*. 2010 (in press)
15. Higashida H, Lopatina O, Yoshihara T, Pichugina YA, Soumarokov AA, Munesue T, Minabe T, Kikuchi M, Korshunova N A, Salmina AB. Oxytocin signal and social behaviour: Comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and *Cd38* gene knockout mice. *J. Neuroendocrinol*. 2010 (in press)
16. Salmina AB, Lopatina O, Ekimova MV, Mikhutkina MV, Higashida H. CD38/cADPR-system: A new player for OT secretion and regulation of social behaviour. *J. Neuroendocrinol*. 2010 (in press)
17. Munesue T, Munesue T, Yokoyama S, Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Hayashi K, Asaka T, Liu HX, Jin D, Koizumi K, Islam MS, Huang JJ, Ma WJ, Hyun Kim UH, Kim SJ, Park K, Kim D, Kikuchi K, Ono Y, Nakatani H, Suda S, Miyachi T, Hirai H, Salmina A, Pichugina YA, Soumarokov AA, Takei N, Mori N, Tsujii M, Sugiyama T, Yagi K, Yamagishi M, Sasaki T, Yamasue H, Kato N, Hashimoto R, Taniike M, Hayashi Y, Hamada J, Suzuki S, Ooi A, Noda M, Kamiyama Y, Kido MA, Lopatina O, Hashii M, Amina S, Malavasi F, Huang EJ, Zhang J, Shimizu N, Yoshikawa T, Matsushima A, Minabe Y, Higashida H. Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls. *Neurosci. Res*. 2010 (in press)