

「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 22 年度採択研究代表者

加藤進昌

昭和大学医学部・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

自閉症の社会相互性障害は当事者の社会適応を深刻に妨げるが、この社会性障害に有効な従来の薬物療法は皆無だった。しかし、オキシトシン分泌が低下する CD38 ノックアウトマウスは愛他行動に障害をきたし、この障害はオキシトシン投与で改善することが示された (Nature, 2007)。本課題では、このオキシトシン関連分子の遺伝的な機能不全によって社会脳領域の障害が生じて社会行動が障害されるというモデルを共有し、動物実験・成人ヒト・幼児コホートレベルで検証する。それによって社会性障害の薬物療法を幼児期早期に導入して自閉症における社会性障害の根本的治療法創出を目指すという最終目的のもと、動物実験、ヒトでの遺伝子解析と臨床試験と脳画像解析を連携して行ってきた。

本年度は、下垂体発達への Ect2 の関与<sup>22)</sup>、Trpm2 カチオンチャネルとオキシトシンの関連<sup>23)</sup>、CD38 遺伝子と自閉症の関連<sup>25)</sup>、mDial によるアクチン重合端の回転<sup>24)</sup>、オキシトシン受容体遺伝子多型と自閉症<sup>9)</sup>および扁桃体体積の関連<sup>17)</sup>、自閉症当事者における下前頭回体積の減少<sup>18)</sup>などの知見を報告した。さらに臨床試験の結果として自閉症当事者におけるオキシトシン投与による社会性障害の改善とその基盤をなす脳活動変化を見出した(投稿中)。また、これらの知見を発展させる為の幼児期コホートを開始し、進行させている。

### § 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(金沢大学医薬保健研究域医学系研究科、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し、解析する。
- 国内外の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 遺伝子の一塩基置換(SNP)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 (東京大学大学院医学系研究科、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 (研究機関別)

① 研究分担グループ長:加藤 進昌 (昭和大学医学部精神医学教室、教授)

② 研究項目

- 研究統括
- 附属烏山病院専門外来・デイケアにおける、成人自閉症スペクトラム障害当事者の臨床評価、遺伝子・脳画像指標の収集。
- 自閉症スペクトラム障害当事者における視線追跡パターンの臨床諸指標との比較。
- 新生児コホート研究の実施ならびにハイリスク児追跡研究の準備。
- 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

#### 動物実験レベルでの検証:

**社会性認識に関わるオキシトシン遊離の分子機能研究** オキシトシンによる受容体刺激はホスホリパーゼ C を活性化し、プロテインキナーゼ C のリン酸化機能を高める。種々のプロテインキナーゼ C 阻害剤により、オキシトシンによる細胞内 Ca 濃度上昇が抑えられ<sup>19)</sup>、細胞外へのオキシトシン放出が低下した。これらオスマウスで行った研究から、妊娠末期のメスマウス特有と思われる視床下部におけるオキシトシン誘発性のオキシトシン遊離が、社会性認識機構の一部として働く事を初めて証明した<sup>19)20)21)23)</sup>。CD38 によって細胞外で生成されるサイクリック ADP リボースによる細胞内 Ca 濃度の上昇は、サイクリック ADP リボースによる細胞外への刺激単独よりも、測定温度を 35°C から 37~39°C に上昇させる刺激を同時に行うと飛躍的に増大した<sup>23)</sup>。TPRM2 温度感受性チャネル阻害剤によるこの反応の抑制などから、オキシトシン刺激後の TRPM2 チャネルを通じた細胞外からの Ca 流入とサイクリック ADP リボースによる Ca 動員が Ca 上昇に関与する事を示した<sup>21)</sup>。

**ヒト CD38 遺伝子多型解析** 自閉症当事者とその血縁者の CD38 遺伝子のイントロン部 10 ケとエクソン部 5 ケの一塩基多型 (SNP) を再シークエンスし、白人または日本人を含むアジア人で自閉症と関連する SNP をそれぞれ見出した<sup>25)</sup>。また、CD38 遺伝子変異と自閉症およびオキシトシン濃度低下との関連を示した。さらに当事者と両親を含む 3 世代以上の血液検体を収集し、この SNP の集積家系を見出した。

**化学合成によるオキシトシン関連治療薬の開発** オキシトシン機能部位の類似化合物を現在までに 3 種類合成し検討したところ、ヒトオキシトシン受容体発現培養細胞系で 1 つは弱いアゴニスト的効果を、他の一つはアンタゴニスト的効果を有した。今後この 2 つについてマウス個体レベルでの効果を観察できる量の合成が可能か検討すると共に、更に効率の良い類似体も合成する。

**新しい自閉症関連分子の探求** 自閉症関連分子の探求から見出したショウジョウバエの Pebble のマウス類縁体 Ect2 が下垂体発達と関係していた<sup>22)</sup>。Ect2 は前葉と中葉に発現し、下垂体腺部の発達に重要であると思われた<sup>22)</sup>。更に、Ect2 が制御する Rho の下流にある mDia1 がアクチン伸長する際に先端部分が回転している事を偏光顕微技術を用いた 1 分子イメージングで示した<sup>24)</sup>。mDia1 によるアクチン重合と自閉症脳のシナプス形態変化の関係が新しい課題として浮かんだ。

#### 成人ヒトレベルでの検証:

今年度は遺伝要因<sup>10)11)17)</sup>、年齢<sup>7)8)13)15)16)</sup>、男女差<sup>12)</sup> (Abe, NMR, 2010) および発達障害<sup>14)18)</sup>と脳形態の関連について検討を進め、オキシトシン受容体遺伝子多型と自閉症<sup>9)</sup>および扁桃体体積の関連<sup>17)</sup>、自閉症当事者における下前頭回体積の減少<sup>18)</sup>などを報告した。また、オキシトシン投与による社会性障害と社会脳領域の活動の改善を予測して東京大学医学部附属病院で臨床試験 UMIN000002241 を行い、当事者 20 症例の試験を平成 22 年 7 月末に完了した。

**仮説に適合した心理課題作成と健常成人での実験結果** オキシトシンが動物同士やヒトでも言語

獲得以前から良好な対他関係を促進し、信頼増強や表情認知改善にも働くことから、この物質が非言語的認知過程に作用して他者との友好関係を促進すると予想した。一方、非言語情報の活用困難による他者との関係形成破綻が自閉症の社会性障害の中核である。そこで我々は、他者を友好的か敵対的か判断する際に非言語情報と言語情報のどちらを重視するか検討する心理課題を作成した。そしてまず健常成人にてこの心理課題で内側前頭前野や後部下前頭回などを含む脳部位に妥当な賦活が認められる事などを確認した。

**オキシトシン経鼻投与による社会性障害の改善と社会脳領域の機能不全の回復** 上述の臨床試験参加者 20 名のうち向精神薬非服薬の自閉症当事者は 18 名で、そのうち 15 名が非投薬下での健常対照 17 名との比較にも参加した。非投薬下の当事者では他者判断に非言語情報を活用する頻度が低く、その際の腹内側前頭前野と下前頭回の活動が減弱していた。しかし、プラセボに比べオキシトシン投与下では、非投与下で認められた行動上及び脳活動上の異常パターンが正常化することを見出した。さらに遺伝子や分子レベルでの知見を得るために改変した臨床試験 UMIN000004393 を東大病院で平成 22 年 10 月から新たに開始した。

**昭和大学での成人高機能自閉症当事者の研究** 昭和大学で平成 19 年度から開始した自閉症スペクトラム障害の専門外来とデイケアには現在多くの当事者が通院・通所し研究への理解や協力性も高い<sup>1)2)3)4)5)</sup>。同大学で選択的注意の障害や流動性知能の亢進を検討する fMRI 課題を開発し、当事者 16 名と健常対照 14 名の結果で、選択的注意障害に右背外側前頭前野の活動低下が関与し、流動性知能の亢進に左側頭・頭頂部の活動亢進が関与すると示した。対人コミュニケーション場面を観察中の視線計測を当事者 47 名、統合失調症群 12 名、健常対照群 36 名で行い、3 群にそれぞれ特有の視線方向パターンを抽出した。20 名の当事者と 18 名の健常対照を比較し、言語流暢性課題施行中の下前頭領域での活性不全を近赤外線スペクトロスコープで示した<sup>16)</sup>。自閉症と分裂病型人格障害の臨床的鑑別のために自記式性格検査を行い、「異常な知覚体験」、「異常な行動」、「猜疑心」などの項目で 2 つの群が異なることを示した<sup>6)</sup>。

#### 幼児期コホートでの検証:

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、新生児のろ紙血の収集方法と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、昭和大学での新生児コホートからのデータ収集を開始した。平成 22 年 11 月末までに 140 名のリクルートおよびデータ収集を行い、現在も更に進行させている。

## §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, Nanba E. Fragile X carrier screening and FMR1 allele distribution in the Japanese population. *Brain Dev* 32: 110-114, 2010. (DOI:10.1016/j.braindev.2008.12.015)
2. Nakano T, Tanaka K, Endo Y, Yamane Y, Yamamoto T, Nakano Y, Ohta H, Kato N, Kitazawa S. Atypical gaze patterns in children and adults with autism spectrum disorders dissociated from developmental changes in gaze behaviour. *Roy Soc Biol Sci Proc B*, 277:2935-2943, 2010. (DOI:10.1098/rspb.2010.0587)
3. Marui T, Funatogawa I, Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Jinde S, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K, Watanabe K, Kano Y, Kato N. The NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 5 (NDUFA5) gene variants are associated with autism. *Acta Psychiatr Scand* 123: 118-124, 2010. (DOI:10.1111/j.1600-0447.2010.01600.x)
4. Iwanami A, Okajima Y, Ota H, Tani M, Yukawa Y, Kanai C, Yamada T, Kawakubo Y, Yamasue H, Kato N. Frontal dysfunction during a cognitive task in persons with Asperger disorder investigated with multi-channel near-infrared spectroscopy. *International Journal of Psychophysiology* 77: 255, 2010.( DOI:10.1016/j.ijpsycho.2010.06.073)
5. Iwanami A, Okajima Y, Ota H, Tani M, Yukawa Y, Kanai C, Yamada T, Kawakubo Y, Yamasue H, Kato N. P3a and P3b of event-related potentials in persons with Asperger disorder. *Int J Psychophysiology* 255-256, 2010.( DOI:10.1016/j.ijpsycho.2010.06.074 )
6. 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. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 5:185-190, 2011 ( DOI:10.1016/j.rasd.2010.03.008 )
7. Abe O, Yamasue H, Yamada H, Aoki S, Kasai K, Inoue H, Takei K, Suga M, Matsuo K, Kato T. Voxel-based analyses of gray/white matter volume and diffusion tensor data in major depression. *Psychiatry Research Neuroimaging*. 181: 64-70, 2010 (DOI: 10.1016/j.psychresns.2009.07.007)
8. 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. *Magnetic Resonance Imaging*. 28: 128-34, 2010 (DOI: 10.1016/j.mri.2009.05.0209)
9. 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.* 2010 Mar;55(3):137-41. DOI:10.1038/jhg.2009.140

10. 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)<sub>n</sub> polymorphisms in promoter region of N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit (GRIN2A) gene affect hippocampal and amygdala volumes. *Genes, Brain and Behavior.* 9: 269-75, 2010 (DOI: 10.1111/j.1601-183X.2009.00557.x)
11. Inoue H, Yamasue H, Tochigi M, Takei K, Suga M, Abe O, Yamada H, Rogers MA, Aoki S, Sasaki T, Kasai K. Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on amygdalar and hippocampal volumes. *Brain Research.* 1331: 51-57, 2010 (DOI: 10.1016/j.brainres.2010.03.057)
12. Abe O, Yamasue H, Yamada H, Masutani Y, Kabasawa H, Sasaki H, Takei K, Suga M, Kasai K, Aoki S, Ohtomo K. Sex dimorphism in gray/white matter volume and diffusion tensor during normal aging. *NMR in Biomedicine*, 23: 446-58, 2010 (DOI: 10.1002/nbm.1479)
13. Abe O, Takao H, Gonoi W, Sasaki H, Murakami M, Kabasawa H, Kawaguchi H, Goto M, Yamada H, Yamasue H, Kasai K, Aoki S, Ohtomo K. Voxel-based analysis of the diffusion tensor. *Neuroradiology.* 52: 699-710, 2010 (DOI: 10.1007/s00234-010-0716-3)
14. Sasayama D, Hayashida A, Yamasue H, Harada Y, Kaneko T, Kasai K, Washizuka S, Amano N. Neuroanatomical correlates of attention deficit hyperactivity disorder accounting for comorbid oppositional defiant disorder and conduct disorder. *Psychiatry and Clinical Neuroscience.* 64: 394-402 2010 (DOI: 10.1111/j.1440-1819.2010.02102.x)
15. Takao H, Abe O, Yamasue H, Aoki S, Sasaki H, Kasai K, Yoshioka N, Ohtomo K. Gray and white matter asymmetries in healthy individuals aged 21-29Years: A voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study. *Human Brain Mapping.* 2010 Sep 30. [Epub ahead of print]
16. 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.* 52: 865-73, 2010 (DOI: 10.1007/s00234-009-0641-5)
17. Inoue H, Yamasue H, Tochigi M, Abe O, Liu X, Kawamura Y, Takei K, Suga M, Yamada H, Rogers MA, Aoki S, Sasaki T, Kasai K. Association between the oxytocin receptor gene (OXTR) and amygdalar volume in healthy adults. *Biological Psychiatry.* 68: 1066-72, 2010 (DOI:10.1016/j.biopsych.2010.07.019)
18. Yamasaki S, Yamasue H, Abe O, Suga M, Yamada H, Inoue H, Kuwabara H, Kawakubo Y, Yahata N, Aoki S, Kano Y, Kato N, Kasai K. Reduced gray matter volume of pars opercularis is

- associated with impaired social communication in high-functioning autism spectrum disorders. *Biological Psychiatry*. 68: 1141-7, 2010 (DOI:10.1016/j.biopsych.2010.07.012)
19. 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
  20. 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*. 22 : 373-379, 2010. Review [doi] 10.1111/j.1365-2826.2010.01976.x
  21. 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*. 22 : 380-392, 2010. Review [doi] 10.1111/j.1365-2826.2010.01970.x
  22. Islam MS, Tsuji T, Higashida C, Takahashi M, Higashida H, Koizumi K. Expression of a Rho-guanine nucleotide exchange factor, Ect2, in the developing mouse pituitary. *J Neuroendocrinol*. 22 : 477-482, 2010.[doi] 10.1111/j.1365-2826.2010.01962.x
  23. 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*. 22: 460-466, 2010. [doi]10.1111/j.1365-2826.2010.01978.x
  24. Mizuno H, Higashida C, Yuan Y, Ishizaki T, Narumiya S, Watanabe N. : Rotational Movement of the Formin mDia1 Along the Double Helical Strand of an Actin Filament. *Science*. 331 : 80-83, 2011.[doi]10.1111/j.1365-2826.2010.01962.x
  25. 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, Kim UH, Kim SJ, Park K, Kim D, Kikuchi M, 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. *Neuroscience Research*. 67: 181-191, 2010 (DOI: 10.1016/j.neures.2010.03.004)

26. Iwanami A, Okajima Y, Ota H, Tani M, Yamada T, Hashimoto R, Kanai C, Watanabe H, Yamasue H, Kawakubo Y, Kato N. Task dependent prefrontal dysfunction in persons with Asperger's disorder investigated with multi-channel near-infrared spectroscopy. Research in Autism Spectrum Disorders, in press.

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)