

「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」

H23 年度
実績報告

平成20年度採択研究代表者

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. 研究実施体制

(1)「金沢大学」グループ

- ①主たる研究共同研究者： 東田 陽博(金沢大学医薬保健研究域医学系、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主たる共同研究者： 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

- ①研究代表者： 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。

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

自閉症の社会相互性障害に対する効果が報告されているオキシトシンおよび関連分子に焦点をおいた研究を引き続き動物モデル・成人ヒト・幼児コホートについて継続した。金沢大学では CD38 に関連する遺伝子変異マウスの行動・機能解析を行うとともに、ASD 当事者とその血縁者における CD38 遺伝子多型の検索を行った。東京大学では脳画像所見とともに ASD 当事者に特徴的な内側前頭前野の機能不全、同部位の代謝物濃度の変化を検討した。脳画像や心理課題を指標としたオキシトシン単回投与試験を当初の目標通りに完了し、現在解析を行っている。昭和大学では鳥山病院での成人 ASD 向けの外来とデイケアを活用して研究協力者のリクルートを進めるとともに、臨床データの解析と MRI 研究を行った。新生児コホート研究については、23 年度末までで約 300 名の組み入れを完了した。今後はハイリスク群の組み入れを行っていく。

【金沢大学】動物実験レベルでの検証:

社会性障害モデルとしての CD38 ノックアウトマウスの行動遺伝学的研究

マウスにおける社会性(親養育行動)の実験方法を開発し、養育に関わる社会脳の実体を解明しつつある。CD38 ノックアウトマウスを用いて、養育障害、社会的記憶喪失等のメカニズムを更に研究した²⁾。特に、社会性のコミュニケーション障害の観点から、マウスの超音波発声を測定し、個体間の情報伝達を研究した(投稿中)。

遺伝子変異マウスを用いた、オキシトシン関連分子の同定と機能解析

上記1で開発した実験法を、CD38 以外の多様な遺伝子の変異マウス(金沢大学動物実験施設において登録されているノックアウトマウスリソース)から、社会性障害と親養育行動の障害という観点からスクリーニングを行い、社会性に関わる新規分子を同定した¹⁾³⁾⁶⁾¹²⁾。特に CD157 欠損マウスについて詳細に検討した。

ヒト CD38 遺伝子変異解析

金沢大学病院に通院する自閉症者とその血縁者および白人の CD38 遺伝子の一塩基多型(SNP)を調べた。イントロン部の興味ある 10 ケとエクソン部の 15 ケの SNP を引き続き調査した。血中オキシトシン濃度も同時に測定し、CD38 遺伝子の多型との相関を調べた。同時にオキシトシン受容体の多型と重なっているか否かの解析も開始し、現在論文を作成中である。

化学合成によるオキシトシン関連合成治療薬の開発

オキシトシンの機能部位の類似化合物を 3 種類以上合成し、それらをヒトオキシトシン受容体発現培養細胞系でスクリーニングした。また、サイクリック ADP リボース類似体を人工合成し、培養視床

下部・下垂体細胞内 Ca 濃度上昇活性と CD38 マウス脳内注入によるマウス血中へのオキシトシン遊離刺激能を指標にしながら、自閉症治療薬の開発を行った。オキシトシン受容体欠損マウスへのオキシトシン受容体多型の発現による研究にも着手した。

【東京大学】成人ヒトレベルでの検証:

他者判断における非言語情報の活用不全と脳機能不全(投稿中)

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。服薬をしておらず知的障害や精神神経疾患の併発のない成人自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorder: ASD) 男性 15 名と背景情報を一致させた定型発達の対照男性 17 名で心理課題成績と課題施行中の fMRI 信号を比較した。

定型発達者 (Typically-developed: TD) がこの課題を行うと、言語-非言語情報が不一致な際には非言語情報を重視して他者判断しやすく、その際下前頭回、島前部、上側頭溝、内側前頭前野など社会知覚や共感に関与する領域が動員された。しかし、この課題を ASD 当事者が行った場合には、定型発達者に比べて非言語情報を重視して他者判断する機会が有意に少なく、その際に内側前頭前野、下前頭回、島前部などの賦活が有意に減弱していた。そして内側前頭前野の賦活が減弱しているほど臨床的なコミュニケーション障害の重症度が重いという相関を認めた。

MRS メタ解析¹⁷⁾と症例対照研究(投稿中)

ASD 当事者の内側前頭前野の障害について生化学的な知見を得る為に、ASD 当事者を対象とした proton-MR-spectroscopy (MRS) 研究の系統的レビューとメタ解析を行った。その上で、服薬をしておらず知的障害や精神神経疾患の併発のない成人男性 ASD 当事者 20 名と背景情報を一致させた定型発達の対照男性 22 名で内側前頭前野の代謝物濃度を比較した。

ASD 当事者の proton-MRS 研究のメタ解析の結果、小児期には脳内の殆ど全ての測定領域で NAA 濃度が有意に低下している一方で、成人期には全ての領域でこの定型発達との差が消失した。さらに前頭葉の NAA については年齢が高いほど NAA の低下は消失するという直線的な相関を認めた。脳のサイズが小児期には定型発達よりも大きく、成人期には定型発達と同レベルに変化する良く知られた所見と対応している。ASD における小児期の一過性の脳体積増大はグリア等の非神経細胞組織の増加によって説明されることを示唆した。

さらに、方法論的問題を最少にして 24 名の ASD 当事者と 25 名の定型発達者の内側前頭前野の代謝物濃度を比較した。その結果、NAA 濃度が有意に上昇していること、定型発達で認められる年齢と NAA 濃度の負の相関が ASD 当事者では認められないことを示した。

オキシトシン受容体遺伝子多型と前部帯状回等の体積との関連¹⁴⁾

東京大のグループが 2010 年に Biological Psychiatry 誌で報告した日本人におけるオキシトシン受容体遺伝子多型 rs2254298 と用手的に測定した扁桃体体積の相関結果に対して (Inoue et al., 2010)、同誌面上でドイツの Meyer-Lindenberg 教授のグループが、コンピューター画像統計解析で解析した前部帯状回と視床下部の体積を反映する灰白質濃度が白色人種における同 SNP と関連する事を示す一方で扁桃体の濃度とは関連しない事を示し、結果の違いについて人種差や脳部位の差異の関与を指摘した (Tost et al., 2011)。それに対して我々は更に同誌面上

で、東大の日本人サンプルにおいてもコンピューター画像統計解析を行うと同 SNP は前部帯状回と有意な関連を示すことを報告した。また、同 SNP は視床下部とは女性特異的に有意な関連を認めた一方で、扁桃体とは有意な関連を認めない事を示した¹⁴⁾。

MRI 信号と心理課題成績を評価指標としたオキシトシン単回投与試験

東京大で成人 ASD 当事者を対象に、社会性の障害を反映する心理課題成績や脳画像指標が、オキシトシン単回投与によって改善するかどうかを二重盲検で無作為の偽薬-実薬の臨床試験で検討した。更にこのオキシトシン単回投与による評価指標の変化と OXTR などの遺伝要因との関連を検討する。当初の計画では平成 24 年度で完了する予定であった臨床試験が、目標症例数の 40 例を終えて、平成 23 年 8 月末で完了した。大幅に計画よりも早く進捗している。40 例での解析は現在行っている。まず初めの 20 例での検討では、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 名であった。この 20 名での解析によって社会性の障害を反映する心理課題成績や脳画像指標がオキシトシン単回投与によって改善することを見出した。この結果の詳細については現在論文投稿を行っている。

社会性の障害を主要評価項目に MRI 信号と心理課題成績を副次評価項目としたオキシトシン連続投与試験の実施へ

オキシトシン単回投与試験によって同剤による社会性障害の治療可能性が支持されたが、これまで自閉症の社会性の障害そのものへの治療効果は検討出来ていない。そのため、これを検討するためにオキシトシン点鼻剤を連日継続投与して社会生活上の行動の変化を検討する試験を計画し、平成 23 年 12 月に東大病院 IRB の承認を受けた。

【昭和大学】CREST 脳画像センターにおける成人自閉症スペクトラム当事者(ASD)の脳画像、視線追跡研究の継続

選択的注意の障害と流動性知能の亢進を検討する fMRI 課題を開発し、選択的注意障害には無関係刺激による視覚野活動の修飾が低下し、流動性知能の亢進には左下側頭部の活動亢進が関与すると示した²⁷⁾。また、構造 MRI を用いて、前頭葉眼窩皮質における脳回・脳溝パターンの分類をおこない、ASD45 名と健常対照 50 名で比較したところ、両群の間でパターンの分布に有意差を認めた。

成人 ASD 者の視線追跡研究を行い、対照群では TV 上の人物とまばたきが同調するのに対して、ASD では欠如していること¹⁹⁾、一方で指先の触覚だけによる形態認知が優れていること²⁶⁾を発見した。また近赤外線スペクトロスコーピー(NIRS)を用いて実行機能のテストを行うと、ASD 者は前頭葉血流の変化が対照群より少ないことを発見¹⁶⁾し、それぞれ報告した。

昭和大学における成人 ASD の臨床基礎データ研究

ASD の専門外来とデイケアに現在通院・通所している成人当事者の臨床統計解析を行った²³⁾²⁵⁾。さらに、パーソナリティに関する自記式検査¹⁵⁾¹⁸⁾、ウェクスラー知能テスト²⁴⁾による認知プロフィールの調査をおこない、それぞれ専門誌に論文が掲載された。

幼児コホートでの検証、環境要因の関与についての疫学のおよび基礎研究:

妊娠初期からの母体血(初期・中期・後期)と臍帯血の採取および新生児期、1ヶ月検診時の評価

を行うコホート研究を継続した。平成 24 年 3 月末で組み入れを完了し、約 300 名を今後フォローしていく。母体血での環境ホルモン・オキシトシン値測定を開始した。

胎内環境の関与を検討するための一環として、生殖医療と発達障害の発生頻度の関連を検討した²²⁾。さらに、ビスフェノール A を新生児期に投与されたラットでは、生活習慣病が増えること²²⁾、有機スズ(環境物質)投与でおこる海馬変性に P2X 受容体が関与すること²⁰⁾を明らかにした。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Tsuji T, Higashida C, Yoshida Y, Islam MS, Dohmoto M, Koizumi K, Higashida H. Ect2, an ortholog of Drosophila's pebble, negatively regulates neurite outgrowth in neuroblastoma × glioma hybrid NG108-15 cells. *Cell Mol Neurobiol* 31:663-668, 2011.(DOI: 10.1007/s10571-011-9668-3)
2. Lopatina O, Inzhutova A, Pichugina YA, Okamoto H, Salmina AB, Higashida H. Reproductive experience affects parental retrieval behaviour associated with increased plasma oxytocin levels in wild-type and CD38-knockout mice. *J Neuroendocrinol* 23:1125-1133, 2011(DOI: 10.1111/j.1365-2826.2011.02136.x.)
3. Suda S, Iwata K, Shimmura C, Kameno Y, Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Koizumi K, Higashida H, Takei N, Mori N. Decreased expression of axon-guidance receptors in the anterior cingulate cortex in autism. *Mol Autism* 2:14,2011.(DOI: 10.1186/2040-2392-2-14)
4. Kikuchi M, Shitamichi K, Yoshimura Y, Ueno S, Remijn GB, Hirose T, Munesue T, Tsubokawa T, Haruta Y, Oi M, Higashida H, Minabe Y. Lateralized theta wave connectivity and language performance in 2- to 5-year-old children. *J Neurosci* 31:14984-14988, 2011.(DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2785-11.2011)
5. Ueno S, Okumura E, Remijn GB, Yoshimura Y, Kikuchi M, Shitamichi K, Nagao K, Mochiduki M, Haruta Y, Hayashi N, Munesue T, Tsubokawa T, Oi M, Nakatani H, Higashida H, Minabe Y. Spatiotemporal frequency characteristics of cerebral oscillations during the perception of fundamental frequency contour changes in one-syllable intonation. *Neurosci Lett*. 2012 Mar 21. [Epub ahead of print]
6. Tsuji T, Higashida C, Aoki Y, Islam MS, Dohmoto M, Higashida H. Ect2, an ortholog of Drosophila Pebble, regulates formation of growth cones in primary cortical neurons. *Neurochem Int*. 2012 Feb 15. [Epub ahead of print]
7. Yoshimura Y, Kikuchi M, Shitamichi K, Ueno S, Remijn GB, Haruta Y, Oi M, Munesue T, Tsubokawa T, Higashida H, Minabe Y. Language performance and auditory evoked fields in 2- to 5-year-old children. *Eur J Neurosci*. 35:644-650, 2012. (DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.07998.x.)
8. Jin D, Muramatsu SI, Shimizu N, Yokoyama S, Hirai H, Yamada K, Liu HX, Higashida C, Hashii M, Higashida A, Asano M, Ohkuma S, Higashida H.

- Dopamine release via the vacuolar ATPase V0 sector c-subunit, confirmed in N18 neuroblastoma cells, results in behavioral recovery in hemiparkinsonian mice. *Neurochem Int.* 2012 Jan 14. [Epub ahead of print]
9. Morita T, Kosaka H, Saito DN, Ishitobi M, Munesue T, Itakura S, Omori M, Okazawa H, Wada Y, Sadato N. Emotional responses associated with self-face processing in individuals with autism spectrum disorders: An fMRI study. *Soc Neurosci.* 2011 Sep 22. [Epub ahead of print]
 10. Kikuchi M, Koenig T, Munesue T, Hanaoka A, Strik W, Dierks T, Koshino Y, Minabe Y. EEG microstate analysis in drug-naive patients with panic disorder. *PLoS One.* 6:e22912, 2011.
 11. Tochimoto S, Kurata K, Munesue T. 'Time slip' phenomenon in adolescents and adults with autism spectrum disorders: case series. *Psychiatry Clin Neurosci.* 65:381-383,2011.(DOI: 10.1111/j.1440-1819.2011.02209.x.)
 12. Huang JJ, Ma WJ, Yokoyama S. Expression and immunolocalization of Gpnmb, a glioma-associated glycoprotein, in normal and inflamed central nervous systems of adult rats. *Brain and Behavior.* 2: 85-96; 2012. (DOI: 10.1002/brb3.39)
 13. Duo J, Muramatsu S, Shimizu N, Yokoyama S, Hirai H, Yamada K, Liu HX, Higashida C, Hashii M, Higashida A, Asano M, Ohkuma S, Higashida H. Dopamine release via the vacuolar ATPase V0 sector c-subunit, confirmed in N18 neuroblastoma cells, results in behavioral recovery in hemiparkinsonian mice. *Neurochem Internatl*, (in press)
 14. Yamasue H, Suga M, Yahata N, Inoue H, Tochigi M Abe O, Liu X, Kawamura Y, Rogers MA, Takei K, Yamada H, Aoki S, Sasaki T, Kasai K. Reply to "Neurogenetic effects of OXTR rs2254298 in the extended limbic system of healthy Caucasian adults". *Biological Psychiatry.* 70: 41-42, 2011.(DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.06.034)
 15. 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)
 16. 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* 5: 1187-1193, 2011.(DOI: 10.1016/j.rasd.2011.01.005)
 17. Aoki Y, Kasai K, Yamasue H. Age-related change in brain metabolite

- abnormalities in autism: A meta-analysis of proton magnetic resonance spectroscopy studies. *Translational Psychiatry*, (in press).
18. Kanai C, Iwanami A, Hashimoto R, Ota H, Tani M, Yamada T, Kato N. Clinical characterization of adults with Asperger's syndrome assessed by self-report questionnaires based on depression, anxiety, and personality. *Research in Autism Spectrum Disorders* 5:1451-1458, 2011.(DOI: 10.1016/j.rasd.2011.02.005)
 19. Nakano T, Kato N, Kitazawa S: Lack of eyeblink entrainments in autism spectrum disorders.*Neuropsychologia*49:2784-2790,2011.(DOI:10.1016/j.neuropsychologia.2011.06.007)
 20. Shirakawa T, Nakano K, Hachiya N, Kato N, Kaneko K. The involvement of P2X₁ receptor in pyramidal cell degeneration in the rat hippocampus after trimethyltin administration. *Neurosci Res* 71:396-404, 2011.(DOI:10.1016/j.neures.2011.08.005)
 21. Xu X, Tan L, Himi T, Sadamatsu M, Tsutsumi S, Akaike M, and Kato N. Changed preference for sweet taste in adulthood induced by perinatal exposure to bisphenol A-A probable link to overweight and obesity. *Neurotoxicol Teratol* 33:458-463, 2011.(DOI: 10.1016/j.ntt.2011.06.002)
 22. Shimada T, Kitamoto A, Todokoro A, Takahashi A, Kuwabara H, Kim SY, Watanabe K, Minowa I, Someya T, Ohtsu H, Kano Y, Kasai K, Kato N, and Sasaki T. Parental age and assisted reproductive technology in autism spectrum disorders, attention deficit hyperactivity disorder, and Tourette syndrome in a Japanese population. *Research in Autism Spectrum Disorders* 6:500-507, 2012. (DOI: 10.1016/j.rasd.2011.07.010).
 23. Yukawa Y, Ota H, Kanai C, Tani M, Yamada T, Hashimoto R, Yamasue H, Kato N, and Iwanami A. Clinical and psychosocial characteristics in adults with pervasive development disorders. A survey in Japan. *International Journal on Disability Human Development*, (in press).
 24. Kanai C, Tani M, Hashimoto R, Yamada T, Ota H, Watanabe H, Iwanami A, Kato N. Cognitive profiles of adults with Asperger's disorder, high-functioning autism, and pervasive developmental disorder not otherwise specified based on the WAIS-III. *Research in Autism Spectrum Disorders* 6:58-64, 2012. (DOI: 10.1016/j.rasd.2011.09.004).
 25. Tani M, Kanai C, Ota H, Yamada T, Watanabe H, Yokoi H, Takayama Y, Ono T, Hashimoto R, Kato N, Iwanami A. Mental and behavioral symptoms of persons with Asperger's syndrome: relationships with social isolation and handicaps. *Research in Autism Spectrum Disorders*, (in press).

26. Nakano T, Kato N, Kitazawa S. Superior haptic-to-visual shape matching in autism spectrum disorders. *Neuropsychologia*, (in press)
27. Ohta H, Yamada T, Watanabe H, Kanai C, Tanaka E, Ohno T, Takayama Y, Iwanami A, Kato N, Hashimoto R. An fMRI study of reduced perceptual load-dependent modulation of task-irrelevant activity in adults with autism spectrum conditions. *Neuroimage*, (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)