

「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

H24年度 実績報告

加藤 進昌

昭和大学大学院保健医療学研究科・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(金沢大学子どものこころの発達研究センター、特任教授)

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。新規環境で、養育行動に対する環境因子の研究を行った。
- 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に加えて、におい物質を記録し、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やオキシトシン受容体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(東京大学精神神経科、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研究分担グループ長:加藤 進昌(昭和大学大学院保健医療学研究科、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 など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。また、化学合成によるオキシトシン関連薬物の開発を行っている。東京大学では ASD 当事者に特徴的な拡散強調画像の解析を行った。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、現在論文を投稿中である。さらに連続投与試験を現在継続中である。昭和大学では烏山病院での成人 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。

【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¹⁾、父親マウスの養育に関わる社会脳をエストロゲンを作るアロマトラーゼ活性を指標に分析した。CD38 ノックアウトマウスを用いて、養育障害、社会的記憶喪失ストレス時のオキシトシン分泌によるストレス解消作用のメカニズムを更に研究した⁸⁾。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の特性を解析し、個体間の情報伝達を研究した¹⁾。

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

社会性障害を不安やうつに類似した症状を示すマウスの行動を種々のマウスで検討した⁹⁾。特に CD157 欠損マウスの新しい精神症状類似行動を観察した。

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ヶとエクソン部の 15ヶの SNP を引き続き調査した⁵⁾。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をし、C 末端側にオキシトシン受容体刺激後の細胞

内反応を変える変異を見出している。

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。新しい化合物の合成を試みている。また、CをSで置換したサイクリックADPリボース類似体を人工合成し、培養視床下部・下垂体等の細胞内Ca濃度上昇活性^{2),4)}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¹⁰⁾、自閉症治療薬の開発を行った。

【東京大学】成人ヒトレベルでの検証:

MR-spectroscopyとDiffusion tensor imagingのメタ解析と症例対照研究

ASD当事者の神経ネットワークの障害について脳形態学的な知見を得る為に、ASD当事者を対象としたMR-spectroscopy¹⁹⁾とDiffusion tensor imaging (DTI)研究(投稿中)の系統的レビューとメタ解析を行った。その上で、服薬や知的障害や併発する精神神経疾患の影響の少ない成人男性ASD当事者40名と背景情報を一致させた定型発達の対照男性40名でのMRS²⁰⁾およびDTI(解析中)の比較解析を行なった。

DTIのメタ解析からは、ASD当事者では脳梁などの神経繊維束についての有意な拡散異方性の低下が示され、ASDでは葉や半球をまたぐ様な長い距離の神経連絡が低下しているという仮説を支持する結果が認められた。さらに、方法論的問題を最少にして40名のASD当事者と40名の定型発達のDTI指標の比較解析を行なっている。

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(投稿中)

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オリジナル心理課題の成績や脳画像指標が^{18,21)}、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。本年度は、平成23年8月末で完了した40例での解析を行って論文を完成させ、論文投稿を開始した。またこの40例のデータについてGenome-wideのSNP解析・メチル解析も行なっている。

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(実施中)

オキシトシン単回投与試験によって同剤の安全性と社会性障害の治療可能性が支持されたが、これまでASD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、東大病院IRBの承認を受け、実施体制の整備を経て、平成24年5月下旬に試験を開始し、平成25年1月22日時点では、目標症例20例中20例の導入を終え、12例の試験を終了している。本年4月下旬に全20例の試験を終了する予定である。

また、単回投与および連続投与のオキシトシン点鼻剤の臨床試験の成果を臨床応用に結びつけるための情報収集や諸調整を国内外で行なって来た(Yamasue et al., J Neurosci 32:

14109-14117, 2012 など)。

【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²³⁾。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、論文投稿中である。

成人ASD者の視線追跡研究をひき続き行い、その特徴を統合失調症患者などと比較している。また表情認知が独特であることを見出し、報告した²⁷⁾。

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。さらに、パーソナリティに関する自記式検査、ウェクスラー知能テストによる認知プロフィールの調査を行った²⁶⁾。

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は平成24年3月末で組み入れを完了した。現在約300名をフォローしている。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。高感度のオキシトシン測定法の開発を続けるとともに、市販のキットを改良した測定法で妊娠中、健常男女、オキシトシン投与時、臍帯血中の平均値を検出した。

胎内環境の関与を検討する目的の一環として、生殖医療と発達障害の発生頻度の関連を検討した。生殖医療によって出生した児のフォローを開始した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Liu HX, Lopatina O, Higashida C, Fujimoto H, Akther S, Inzhutova A, Liang M, Zhong J, Tsuji T, Yoshihara T, Sumi K, Ishiyama M, Ma WJ, Ozaki M, Yagitani S, Yokoyama S, Mukaida N, Sakurai T, Hori O, Yoshioka K, Hirao A, Kato Y, Ishihara K, Kato I, Okamoto H, Cherepanov SM, Salmina AB, Hirai H, Asano M, Brown DA, Nagano I, Higashida H. “Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates”, Nat Commun, 4, 1346, 2013 (DOI: 10.1038/ncomms2336).

2. Shawl AI, Park KH, Kim BJ, Higashida C, [Higashida H](#), Kim UH, “Involvement of actin filament in the generation of Ca²⁺ mobilizing messengers in glucose-induced Ca²⁺ signaling in pancreatic β -cells”, *Islets*, 4, 145-151, 2012 (DOI: 10.4161/isl.19490)
3. Hirose T, Kikuchi M, [Higashida H](#), Okumura E, Ueno S, Shitamichi K, Yoshimura Y, Munesue T, Tsubokawa T, Haruta Y, Nakatani H, Hashimoto T, Minabe Y, “Oxytocin attenuates feelings of hostility depending on emotional context and individuals' characteristics” *Sci Rep*, 2, 384, 2012 (DOI: 10.1038/srep00384)
4. 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*, 61, 854-858, 2012 (DOI: 10.1016/j.neuint.2012.02.011)
5. [Higashida H](#), Yokoyama S, Huang JJ, Liu L, Ma WJ, Akther S, Higashida C, Kikuchi M, Minabe Y, Munesue T, “Social memory, amnesia, and autism: brain oxytocin secretion is regulated by NAD⁺ metabolites and single nucleotide polymorphisms of CD38” *Neurochem Int*, 61, 828-838, 2012 (DOI: 10.1016/j.neuint.2012.01.030)
6. [Higashida H](#), Trisler D, Walsh FS, “Honoring nobel laureate Dr. Marshall Nirenberg on decoding brain memory. Preface” *Neurochem Int*, 61, 815-816, 2012 (DOI: 10.1016/j.neuint.2011.12.017)
7. Lopatina O, Inzhutova A, Salmina AB, [Higashida H](#), “The roles of oxytocin and CD38 in social or parental behaviors” *Front. Neurosci*, 2013 (DOI: 10.3389/fnins.2012.00182)
8. Akimoto N, Kamiyama Y, Yamafuji M, Fujita K, Seike T, Kido MA, Yokoyama S, [Higashida H](#), Noda M, “Immunohistochemistry of CD38 in Different Cell Types in the Hypothalamus and Pituitary of Male Mice” *Messenger* 2, 54-61, 2013 (DOI: org/10.1166/msr.2013.1021)
9. Higashida C, Islam MS, Kamimura S, Inoue T, Jin D, Zhang J, Hashii M, Liang M, Zhong J, Hori O, Fukunaga K, Okamoto H, Graeff R, Lee HC, [Higashida H](#), “Dopamine-Induced Regulation and Deregulation of the Catabolism of Cyclic ADP-Ribose, an Intrinsic mTOR Signal Inhibitor, During Development in the Rodent Striatum” *Messenger* 2, 33-43, 2013 (DOI:org/10.1166/msr.2013.1019)
10. Liu HX, Lopatina O, Amina S, Higashida C, Islam MS, Graeff R, Lee HC, Hashii M, [Higashida H](#), “Intracellular Calcium Concentrations Regulated by Cyclic ADP-Ribose and Heat in the Mouse Hypothalamus” *Messenger* 1, 150-159, 2012

(DOI:org/10.1166/msr.2012.1015)

11. Higashida C, Kiuchi T, Akiba Y, Mizuno H, Maruoka M, Narumiya S, Mizuno, K Watanabe N. “ F/G-actin homeostasis regulates Ca²⁺- and phosphorylation-independent mechanosensitive F-actin regeneration by formin homology proteins” *Nature Cell Biol.* 2013 (DOI: 10.1038/ncb2693.)
12. Kikuchi M, Yoshimura Y, Shitamichi K, Ueno S, Hiraishi H, Munesue T, Hirose T, Ono Y, Tsubokawa T, Inoue Y, Oi M, Niida Y, Remijn GB, Takahashi T, Suzuki M, Higashida H, Minabe Y, “Anterior prefrontal hemodynamic connectivity in conscious 3- to 7-year-old children with typical development and autism spectrum disorder” *PLoS One*, 8 : e56087, 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0056087)
13. Kikuchi M, Yoshimura Y, Shitamichi K, Ueno S, Hirose T, Munesue T, Ono Y, Tsubokawa T, Haruta Y, Oi M, Niida Y, Remijn GB, Takahashi T, Suzuki M, Higashida H, Minabe Y, “A custom magnetoencephalography device reveals brain connectivity and high reading/decoding ability in children with autism” *Sci Rep*, 3 : 1139, 2013 (DOI: 10.1038/srep01139)
14. Liu L, Hayashi K, Kaneda T, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Konno T, Tsuda T, Kawashiri MA, Ueda K, Higashikata T, Shuai W, Kupersmidt S, Higashida H, Yamagishi M, “A novel mutation in the transmembrane nonpore region of the KCNH2 gene causes severe clinical manifestations of long QT syndrome” *Heart Rhythm*, 10 : 61-7, 2013 (DOI: 10.1016/j.hrthm.2012.09.053)
15. 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*, 515 : 141-146, 2012 (DOI: 10.1016/j.neulet.2012.03.031)
16. Higashida H, “A personal view from a long-lasting collaborator on the research strategies of Marshall Nirenberg” *Neurochem Int*, 61 : 821-827, 2012 (DOI: 10.1016/j.neuint.2012.02.030)
17. Jin D, 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 Int.* 61 : 907-912, 2012 (DOI: 10.1016/j.neuint.2011.12.021)
18. Watanabe T, Yahata N, Abe O, Kuwabara H, Inoue H, Takano Y, Iwashiro N, Natsubori T, Aoki Y, Takao H, Sasaki H, Gono W, Murakami M, Katsura M,

- Kunimatsu A, Kawakubo Y, Matsuzaki H, Tsuchiya K, Kato N, Kano Y, Miyashita Y, Kasai K, Yamasue H. Diminished medial prefrontal activity behind autistic social judgments of incongruent information. *PLoS ONE* 7:e39561, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0039561)
19. 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*. 2: e69, 2012 (DOI: 10.1038/tp.2011.65)
 20. Aoki Y, Abe O, Yahata N, Kuwabara H, Natsubori T, Iwashiro N, Takano Y, Inoue H, Kawakubo Y, Gonoï W, Sasaki H, Murakami M, Katsura M, Nippashi Y, Takao H, Kunimatsu A, Matsuzaki H, Tsuchiya K, Kato N, Kasai K, Yamasue H. Absence of age-related prefrontal NAA change in adults with autism-spectrum disorder. *Translational Psychiatry* 2:e178, 2012 (DOI:10.1038/tp.2012.108)
 21. Watanabe T, Yahata N, Kawakubo Y, Inoue H, Takano Y, Iwashiro N, Natsubori T, Takao H, Sasaki H, Gonoï W, Murakami M, Katsura M, Kunimatsu A, Abe O, Kasai K, Yamasue H. Network structure underlying resolution of conflicting nonverbal and verbal social information. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 2013 (DOI: 10.1093/scan/nst046)
 22. Otowa T, Kawamura Y, Nishida N, Sugiya N, Koike A, Yoshida E, Inoue, Yasuda S, Nishimura Y, Liu X, Konishi Y, Nishimura F, Shimada T, Kuwabara H, Tochigi M, Kakiuchi C, Umekage T, Miyagawa T, Miyashita A, Shimizu E, Akiyoshi J, Someya T, Kato T, Yoshikawa T, Kuwano R, Kasai K, Kato N, Kaiya H, Tokunaga K, Okazaki Y, Tanii H, Sasaki T. Meta-analysis of genome-wide association studies for panic disorder in the Japanese population. *Translational Psychiatry* 2:e186, 2012 (DOI:10.1038/tp.2012.89)
 23. Yamada T, Ota H, Watanabe H, Kanai C, Tani M, Ohno T, Takayama Y, Iwanami A, Kato N, Hashimoto R. Functional alterations in neural substrates of geometric reasoning in adults with high-functioning autism. *PLoS ONE* 7:e43220, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0043220.g004)
 24. Xu X, Kanai H, Ookubo M, Suzuki S, Kato N, Sadamatsu M. Consideration of Congenital Hypothyroidism as the Possible Cause of Autism. *A New Look at Hypothyroidism* :243-256, 2012
 25. Horii Y, Kawaguchi M, Ohta R, Hirano A, Watanabe G, Kato N, Himi T, Taya K. Male Hatano high-avoidance rats show high avoidance and high anxiety-like behaviors as compared with male low-avoidance rats. *Experimental Animals*. (in press)

26. Kanai C, Tani M, Kato N. 「The comprehensive guide to autism」 Clinical characterization of adults with Asperger's syndrome – Clinical data bases of outpatient clinic at Showa University Hospital for adults with ASD in Japan –. Springer. (in press)
27. Doi H, Fujisawa T, Kanai C, Ohta H, Yokoi H, Iwanami A, Kato N, Shinohara K. Recognition of facial expressions and prosodic cues with graded emotional intensities in adults with Asperger syndrome. Journal of Autism and Developmental Disorders. (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 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)