

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 A

研究期間：2006 年～2008 年

課題番号：18209037

研究課題名（和文）中枢神経系超早期の発達に影響する分子異常に着目した自閉症脳病態の解明

研究課題名（英文）Developmental brain pathophysiology at an early prenatal period in autism spectrum disorder - gene, molecule and neuroimaging studies.

研究代表者

加藤進昌 (KATO NOBUMASA)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：50158846

研究成果の概要：

自閉症を高率に合併することが知られている結節性硬化症の責任遺伝子 TSC2 に変異をもつ Eker ラットのスパインを超微形態学的に検討し、多数の融合した異常ミトコンドリアとシナプス未形成のフィロポディアを確認した。また、発達期に発現する arcadlin という蛋白質のスパイン制御機構を明らかにした。結節性硬化症では、TSC2-Rheb-mTOR の異常が何らかのメカニズムを介してミトコンドリアの増殖あるいは融合を促進し、そのためにスパイン成熟の遅れをきたすものと考えられた。この点では、臨床遺伝学的研究により、神経接着因子(NRCAM)の遺伝子多型が自閉症と有意に関連することを見出し、興味深い。オスのメス化作用が知られている環境ホルモンのラット新生仔期における低用量暴露が、成長後のオスのみに学習障害と多動をきたし、かつ Estrogen α 受容体 (ER α) アンタゴニスト投与によって、環境ホルモンの脳への影響を未然に防ぐことができた。環境ホルモンの作用はラット胎仔海馬組織の初代培養系でも観察することができ、スパインの成熟遅延が見られた。このメカニズムにも ER α の関与が証明された。

遺伝子解析では、7 番および 15 番染色体長腕領域 (7g, 15g) 上の候補遺伝子を中心に自閉症との関連を検討し、NRCAM 以外にも TSC 遺伝子や maternal expression domain (MED) の一部との有意な関連を見出した。その他の部位ではオキシトシン受容体 (OXTR) 遺伝子の複数の SNP で自閉症症状との有意な関連を認めた。

神経画像研究では、自閉症の三主徴である、社会的相互性、コミュニケーション、固執・常同に対応する脳基盤をマルチモダリティ神経画像によって同定した。具体的には、自閉症患者の言語流暢性課題施行時の前頭葉賦活の低値とコミュニケーション障害の相関、固執の基盤となる空間的注意機能異常、社会性脳回路（下前頭回・上側頭溝など）の顕著な性差を見出した。これらの神経画像指標は、今後自閉症の三主徴に対応する遺伝子・分子基盤を効率的に見出す有力な中間表現型となる可能性がある。とくに、下前頭回は自閉症の認知異常との関連が推定されているミラーニューロンを担う部位であり、興味深い結果と考えている。現在男女差と関連する自閉症の分子機構として、性差のあるホルモンの代表であるオキシトシンに着目して研究を開始している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,580,000 円	4,740,000 円	20,540,000 円
2007 年度	11,100,000 円	3,330,000 円	14,430,000 円
2008 年度	8,100,000 円	2,430,000 円	10,530,000 円
総計	35,000,000 円	10,500,000 円	45,500,000 円

研究分野：

科研費の分科・細目：精神神経科学・児童精神医学

キーワード：児童精神医学・環境変動・遺伝子・脳/神経・発生/分化

1. 研究開始当初の背景

1) 結節性硬化症は、その原因遺伝子 TSC1 および TSC2 の変異により、脳内に結節を形成し、高率に自閉症を合併する。TSC2 に変異があると、下流の Rheb が GTP 型となり、mTOR を活性化し、蛋白合成が亢進する。神経細胞の樹状突起においても mTOR を介する局所の蛋白合成系の存在が報告されていることから、この系を介して合成される蛋白質の量的異常が、結節性硬化症に伴う自閉症の発症に関与していると考えられる。研究開始当初から現在まで、神経細胞において mTOR を介して合成が制御される蛋白質に関する報告はほとんど無い。

2) 自閉症に遺伝要因が強く関与することは、双生児研究をはじめとする疫学研究から明らかにされている。これまで欧米を中心とする連鎖研究や染色体研究では、複数の染色体領域が自閉症遺伝子の候補領域として示されているが、中でも 7 番染色体と 15 番染色体の長腕領域はメタ解析から特に有望と考えられている。このうち 7 番染色体については我々も以前から候補遺伝子と P 自閉症との関連解析を行ってきた。

3) これまでの自閉症スペクトラム障害の脳研究は、「こころの理論」などの心理学的仮説で自閉症を一元的に説明しようとするものであり、その成果は限定的なものであった。最近、自閉症の三主徴である、社会的相互性、コミュニケーション、固執・常同は、互いにある程度独立の遺伝的基盤を持つことが提唱されるようになってきた。そこでわれわれは、これらの三主徴に対する脳基盤をマルチモダリティ神経画像によって同定することを目指した。

2. 研究の目的

1) 結節性硬化症モデルラット (Eker ラット、TSC2 変異ラット) の樹状突起内で合成される蛋白質のプロテオーム解析を行う。さらに、同定された蛋白質の樹状突起スパインやシナプス形成における役割を調べる。また、TSC2 変異がもたらす樹状突起の形態異常を超微形態学的に解析することで、mTOR を介した局所蛋白合成系と樹状突起スパイン制御機構との機能的な関わりを検証する。

自閉症や発達障害に樹状突起スパインの形態異常が伴うことが知られている。本研究のもう一つの目的として、この発達に伴うスパインの形態変化を規定する分子の解析も行う。Arcadlin は、カドヘリンスーパーファミリー

に属する神経接着分子であり、上述の Rheb などと共に、発達臨界期に海馬や大脳皮質の興奮性シナプスに発現する。Arcadlin ノックアウトマウスでは、スパイン密度の増加がみられることから、arcadlin によるスパイン形態制御の障害が自閉症の発症メカニズムに関与すると予想される。そこで、その分子メカニズムを明らかにする。

2) 遺伝子解析では 7 番染色体の検討をさらに深めるとともに、15 番染色体等他の染色体上の候補遺伝子についても、鳥取大、北里大、東海大等諸研究機関と協力して、PDD との関連について検討を進めることを目的とする。同時に、そのために必要な PDD の DNA サンプルをさらに充実することを目指した。

3) 非侵襲的神経画像法 (NIRS・EEG・MRI) を用いて、自閉症スペクトラム障害の社会的相互性、コミュニケーション、固執・常同に対応する脳機能異常を同定することを目的とした。

2. 研究の方法

1) 海馬ニューロン初代培養・遺伝子導入・免疫沈降・ウェスタンブロット・免疫組織染色・L-cell を用いた接着実験・two-hybrid スクリーニング・ビオチン化アッセイを行った。超微形態学的解析は、培養ニューロン樹状突起の連続超薄切片を作製し、それらを透過型電子顕微鏡で観察することで行った。

2) 7 番および 15 番染色体長腕領域 (7q, 15q) 上の候補遺伝子を中心に、自閉症を中心とする PDD との関連について検討した。SNP (single nucleotide polymorphism) を主なマーカーとし、case-control および TDT (transmission disequilibrium test) のデザインで解析した。また 15q11-q13 については、oligonucleotide を probe としたチップによる array-CGH により微小欠損/重複についても検討を行った。また 7q, 15q 以外では、近年対人交流の改善可能性が注目されるオキシトシン受容体 (*OXT*) 遺伝子、自閉症の合併率の高い結節性硬化症の原因遺伝子である TSC-1 について検討した。このほか、一般の人を対象に自記式質問紙 (Autism Quotient (AQ)) を用いて測定した自閉症傾向の量的スコアと関連する遺伝子についての全ゲノムレベルでの網羅的検討を 90K SNP チップを用いて開始した。サンプルの拡充については、脳画像のグループと協力して当事者・ご

家族のリクルートを、また AQ スコア等の情報を備えた一般対象者のリクルートを進めた。

3) NIRS については、自閉症成人における、言語流暢性課題施行時の前頭葉血流計測と、被験者のコミュニケーション能力得点の関連を検討した。EEG については、gap-overlap 課題を用いて、視覚刺激へのサッケードに先行する脳の電気的活動を事象関連電位法によって計測した。MRI については、多数例の健常者を対象として、協調性と関連する脳部位を検索した。すなわち、155 名の健常成人を対象に 1.5T MRI の撮像を行い、人格質問紙 TCI により協調性傾向 (cooperativeness) を評価した。voxel-based morphometry (VBM) を用いて全脳にわたって脳灰白質体積と cooperativeness 得点の相関を求めた。

4. 研究成果

1) 野生型および Eker ラットからシナプソーム画分を調整し、二次元電気泳動後、Eker ラットのシナプスで増加している蛋白スポットを切り出した。質量分析によってこれらの蛋白質を同定したところ、大部分がミトコンドリア関連蛋白質であった。TCA 回路や呼吸鎖を構成する酵素が増加していたことから、TSC のシナプスにおいてミトコンドリアの増加ないしは機能亢進の可能性が考えられた。実際にニューロンを初代培養し、そのミトコンドリアを Mito-Red や Ds-Red-Mito により可視化したところ、Eker ニューロンの樹状突起ミトコンドリアは、野生型のそれより長く繋がっており、単位長さ当たりのミトコンドリアが増加していた。電子顕微鏡観察においても、Eker ラットの樹状突起では融合したミトコンドリアが多数確認できた。また、シナプスが形成された樹状突起スパインはほとんど無く、多数の分枝を持つ異常なフィロポディア様突出構造物が多く観察された。これらの結果から、結節性硬化症では樹状突起内のミトコンドリアが異常に増加しているため、正常なシナプス形成が遅れていると考えられた。この発見は世界で初めてであり、今後はミトコンドリア増加によるスパイン成熟の遅れの分子メカニズムを明らかにしていく。

発達期 (臨界期) に脳内で発現する arcadlin の細胞内領域と結合する蛋白質を two-hybrid 法によりスクリーニングし、p38 MAP キナーゼの MAPKKK の一つである TA02 □ キナーゼを見出した。免疫沈降実験および免疫染色の結果から、arcadlin 発現によるシナプス結合に必須の接着分子 N-cadherin の内

在化がシナプス結合を減弱させることにより、スパイン減少を引き起こすと考えられた。これは、神経活動によるスパイン減少のメカニズムを明らかにした最初の報告である。

2) 7q 上の候補遺伝子の検討では、NRCAM 遺伝子で 13SNP 中 6SNP で、また haplotype 解析でも、主に case-control で有意な結果が得られた。TSC 遺伝子では部分的に有意な結果は得られたが、現在これを確認中である。15q 領域については SNP の検討で、Angelman 症候群の責任領域である maternal expression domain (MED) の一部と有意な関連が認められた。また array-CGH による解析では、いくつかの部位で欠損の可能性が示唆された。これについては real-time PCR 等による確認を進めている。OXTR 遺伝子では、アジア人を対象とした先行研究と同じ複数の SNP で有意な関連を認め、自閉症症状とオキシトシンの関係を支持する結果が得られた。なお、一般対象を用いた自閉症傾向 (AQ スコア) と関連する遺伝子の網羅的探索は、現在 350 例を対象に 900K SNP チップによるゲノムの解析を進めている。

なお対象のリクルートについては、PDD 当事者の DNA サンプル数は家系サンプル 240 例を含む 300 例以上に達している。また AQ スコアを備えた一般対象は 450 例を新たにリクルートすることが出来た。

3) NIRS については、自閉症患者で健常者に比べて有意に言語流暢性課題施行時の前頭葉賦活が低いこと、それらと患者のコミュニケーション能力得点が有意な正の相関を示すことを見出した EEG については、PDD における固執傾向の脳基盤となる空間的注意機能異常を見出した。MRI については、女性に特異的に cooperativeness 得点と有意な正の相関を示したのは、両側の下前頭回と左内側前頭前野であった。ヒトの協調性に関連する人格特性の神経生物学的背景として、いわゆる社会性脳回路が関与し、その関係に性差があることが明らかとなり、自閉症の社会性障害の脳基盤と関連している可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

1. Kuwabara H, Kasai K, Takizawa R, Kawakubo Y, Yamasue H, Rogers MA, Ishijima M, Watanabe K, Kato N: Decreased prefrontal activation during letter fluency task in adults with pervasive developmental disorders: a near-infrared spectroscopy study. *Behav Brain Res* 172: 272-277, 2006.
2. Xia Y, Yamagata K, Krukoff TL. Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS. *Brain Res*, 1095:85-95, 2006.
3. Takemiya T, Maehara M, Matsumura K, Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K. Prostaglandin E2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region., *Neurosci Res*. 56:103-110, 2006.
4. Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Aaskura A, Aoki Y, Atsumi M, Iga T, Inomata J, Inoko H, Sasaki T, Nanba E, Kato N, Ishii T, Yamazaki K Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev* 28:257-260, 2006.
5. Otake T, Yoshinaga J, Seki Y, Matsumura T, Watanabe K, Ishijima M, Kato N. Retrospective in utero exposure assessment of PCBs with the preserved umbilical cords and its application to case-control comparison. *Environ Heal Prevent Med*, 11:65-68, 2006
6. Sadamatsu M, Kanai H, Xu X, Liu Y, Kato N. Review of animal models for autism: implication of thyroid hormone. *Congenit Anom (Kyoto)* 46: 1-9, 2006.
7. Kawakubo Y, Kasai K, Okazaki S, Hosokawa-Kakurai M, Watanabe K, Kuwabara H, Ishijima M, Yamasue H, Iwanami A, Kato N, Maekawa H: Electrophysiological abnormalities of spatial attention in adults with autism during the gap overlap task. *Clin Neurophysiol* 118: 1464-1471, 2007.
8. Tochigi M, Kato C, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim S-Y, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T. No evidence for significant association between the GABA receptor genes in chromosome 15q11-q13 and autism in a Japanese population. *J Hum Genet* 52: 985-9, 2007.
9. 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, Sasaki T. *Tachykinin 1 (TAC1)* gene SNPs and haplotypes with autism. A case-control study. *Brain Dev*. 29:510-3, 2007.
10. Paraguison R, Higaki K, Yamamoto K, Matsumoto H, Sasaki T, Kato N, Nanba E. Enhanced autophagic cell death in expanded polyhistidine variants of HOXA1 reduces PBX1-coupled transcriptional activity and neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 85:479-87, 2007.
11. Marui T, Koishi S, Funatogawa I, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Ishijima M, Nanba E, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K, Watanabe E, Kano Y, Kato N, Sasaki T. No association between the *Neuronal Pentraxin II* gene polymorphism and autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 31:940-943, 2007.
12. Otake T, Yoshinaga J, Enomoto T, Matsuda M, Wakimoto T, Ikegami M, Suzuki E, Naruse H, Yamanaka T, Shibuya N, Yasumizu T, Kato N. Thyroid hormone status of newborns in relation to in utero exposure to PCBs and hydroxylated PCB metabolites. *Environ Res* 105: 240-246, 2007.
13. Takemiya T, Matsumura K, Yamagata K. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem Int*. 51:112-120, 2007.
14. Yasuda S, Tanaka H, Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, Mizoguchi A, Yagita Y, Sakurai T, De Robertis EM, Yamagata K. Activity-Induced Protocadherin Arcadlin Regulates Dendritic Spine Number by Triggering N-Cadherin Endocytosis via TAO2beta and p38 MAP Kinases. *Neuron*, 56:456-471, 2007.
15. Shirakawa T, Nakano K, Hachiya NS, Kato N, and Kaneko K. Temporospacial patterns of COX-2 expression and pyramidal cell degeneration in the rat hippocampus after trimethyltin administration. *Neurosci Res* 59: 117-123, 2007.
16. Xu X, Liu Y, Sadamatsu M, Tsutsumi S, Akaike M, Ushijima H, Kato N. Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors

- and its responsive gene. *Neurosci Res* 58: 149-155, 2007.
17. Kato C, Tochigi M, Ohashi J, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim S-Y, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T. Association study of the 15q11-q13 maternal expression domain in Japanese autistic patients. *Am J Med Genet Part B* 147B:1008-12, 2008.
 18. Tochigi M, Kato C, Ohashi J, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim S-Y, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T. No association between the ryanodine receptor 3 gene and autism in a Japanese population. *Psychiatr Clin Neurosci* 62:341-4, 2008.
 19. Kato C, Tochigi M, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim S-Y, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T. Association study of the commonly recognized breakpoints in chromosome 15q11-q13 in Japanese autistic patients. *Psychiatr Genet* 18: 133-136, 2008.
 20. Takemiya T, Yamagata K. Effects of COX-2 inhibitors on brain diseases., *Brain Research Journal*, 1(2/3):135-164, 2008.
 21. Yamasue H, Abe O, Suga M, Yamada H, Rogers MA, Aoki S, Kato N, Kasai K: Sex-linked neuroanatomical basis of human altruistic cooperativeness. *Cereb Cortex* 18: 2331-2340, 2008.
 22. Morita M, Imai H, Liu Y, Xu X, Sadamatsu M, Nakagami R, Shirakawa T, Nakano K, Kita Y, Yoshida K, Tsunashima K, and Kato N. FK506-protective effects against trimethyltin neurotoxicity in rats: Hippocampal expression analyses reveal the involvement of periarterial osteopontin. *Neuroscience* 153: 1135-1145, 2008.
 23. Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K. Transducing neuronal activity into dendritic spine morphology: new roles for p38 MAP kinase and N-cadherin. *Neuroscientist*. 15(1):90-104, 2009.
 24. 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, Sasaki T. Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism. *Int J Neuropsychopharmacol* 12: 1-10, 2009.
 25. Otsuka S, Sakamoto Y, Siomi H, Itakura M, Yamamoto K, Matsumoto H, Sasaki T, Kato N, Nanba E. Fragile X carrier screening and FMR1 allele distribution in the Japanese population. *Brain Dev* (in press).
 26. 安田新、山形要人、痙攣発作で誘導される G 蛋白質 Rheb と結節性硬化症, *医学のあゆみ*, 217:854-856, 2006.
 27. 田中秀和、安田新、杉浦弘子、山形要人、ニューロンの過剰興奮後に生じるシナプス減少のメカニズム, *実験医学*, 26:1257-1260, 2008.
 28. 加藤進昌, 発達精神医学の時代: 成人自閉症スペクトラムの専門外来から見えてくるもの, *精神医学*, 51:312-313, 2009.
- [学会発表] (計 30 件)
- (計 1 件)加藤進昌
1. X Xu, Y Liu, Imai H, Sadamatsu M, Akaike M, Ushijima H, Matsuda K, Kawata M, Kato N. Environmental Disruptors hinder brain development - role of estrogen. . The 37th Annual ISPNE Conference, Hormones & Brain from cloning to clinic. The Netherlands, Leiden , August 23-26, 2006. [Symposium]
- (計 23 件) 山形要人
1. 安田新、竹宮孝子、杉浦弘子、瀧上周、田中秀和、山形要人、発作により発現する神経接着分子 Arcadlin のてんかん病態における役割, 第 42 回日本てんかん学会, リーガロイヤルホテル東京, (2008-10-19) 他
- (計 6 件) 笠井清登
1. 笠井清登: 広汎性発達障害における神経画像研究の現状と展望. 第 37 回日本臨床神経生理学会、ランチョンセミナー、宇都宮、2007 年 11 月 22 日.
 2. 笠井清登、川久保友紀、桑原斉、山末英典: 自閉症スペクトラム障害の神経画像. 第 30 回日本神経科学大会、シンポジウム、横浜、2007 年 9 月 12 日.
 3. 笠井清登: 発達障害の脳機能画像. 第 10 回科学技術交流フォーラム、東京大学、2008 年 6 月 17 日. (シンポジウム)
 4. Kuwabara H, Kasai K, Kawakubo Y, Kato N: Assessment of prefrontal cortical function in pervasive developmental disorders using near-infrared spectroscopy. 13th International Congress on European Society for Child and Adolescent Psychiatry, Florence, Italy, August 26, 2007. [Symposium]
 5. Yamasue H, Kasai K, Kato N: Neural basis of social dysfunction in autism-spectrum disorder. 13th Pacific Rim College of

Psychiatrists Scientific Meeting, Tokyo, Japan, Oct 31, 2008. [Symposium]

6. Kawakubo Y, Kuwabara H, Kasai K: The broader phenotype in parents of individuals with autism spectrum disorders. International Meeting for Autism Research, London, May 15-17, 2008. [Poster]

[図書] (計 3 件)

1. Takemiya T, Yamagata K. The modulatory role of COX-2 and prostaglandins in brain diseases, Prostaglandins: New Research, 0(0), 63-89, 2006
2. Takemiya T, Yamagata K. Effects of COX-2 inhibitors on brain diseases, Trends in COX-2 inhibitor research, 0(0), 47-75, 2006
3. Takigami S, Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Yamagata K. Activity-dependent spine remodeling and brain disorders. "Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties", Nova science publishers, New York, in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

生体光計測装置における刺激課題呈示装置及び刺激課題呈示方法
(特願 2008-146721、平成 20 年 6 月 4 日)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

平成 19 年 11 月 16 日 朝日新聞 (山形)
平成 19 年 11 月 8 日 日経産業新聞 (山形)
平成 19 年 11 月 8-14 日 Yahoo! JAPAN ニュース (山形) 他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 進昌 (KATO NOBUMSA)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：50158846

(2) 研究分担者

佐々木 司 (SASAKI TSUKASA)
東京大学・保健センター・教授
(2008 年より連携研究者)
研究者番号：502352586
笠井 清登 (KASAI KIYOTO)
東京大学・医学部・教授
(2008 年より連携研究者)
研究者番号：80322056
山形 要人 (YAMAGATA KANATO)
東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
(2008 年より連携研究者)
定松 美幸 (SADAMATSU MIYUKI)
奈良県立医科大学・准教授
(2008 年より連携研究者)
研究者番号：9025238