

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16902

研究課題名（和文）行動療法が自閉症の社会性障害を改善するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Study of the Mechanisms by Which Behavioral Therapy Improves Impairment of Social Interaction in ASD

研究代表者

村上 浩子（古田島浩子）（KOTAJIMA, Hiroko）

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主任研究員

研究者番号：60619592

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は野生型マウスとのペア飼育を自閉スペクトラム症（自閉症）の療育に見立て結節性硬化症（TSC）モデルマウスの自閉症様行動に対するペア飼育の効果を検討し、そのメカニズムとして遺伝子の後天的修飾であるDNAメチル化を解析した。早期から野生型マウスとペア飼育するとTsc1+/-マウスは社会性行動障害が改善した。また遺伝子型やペア飼育によってメチル化をうけるパターンが異なる可能性が示唆された。さらに、社会性行動障害に関連することが示唆される遺伝子を抽出したところ発達やタンパク質結合に関与することが見出された。これらの結果から、自閉症の社会性行動障害の改善にDNAメチル化が寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症の主な症状は、社会性相互交流の障害であり、ヒトとのコミュニケーションや対人相互関係に困難を有するが、根本的な治療法は開発されていない。本研究は野生型マウスとペア飼育することによって、Tsc1+/-マウスの社会性行動障害が改善することを示した。さらに、ペア飼育によってDNAメチル化状態が変化することが見出された。これらのことから自閉症の社会性行動障害の改善にDNAメチル化が寄与することが示唆された。将来的に薬剤との相加・相乗効果を調べることで、標的となる遺伝子が明確になり、より効果的な治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：This study examined the effects of peer-rearing on autism spectrum disorders (ASD)-like behaviors in tuberous sclerosis (TSC) model mice, using peer-rearing with wild-type mice as a behavioral therapy of ASD, and analyzed DNA methylation. Tsc1+/- mice showed improved impairment of social interaction when living with wild-type mice from 3 weeks of age. We also found that the pattern of DNA methylation may differ depending on the genotype and peer-rearing. Genes that were found to be involved in development and protein binding were extracted from the genes that were suggested to be related to social behavior. These results suggest that DNA methylation contributes to the improvement of social deficits in ASD.

研究分野：精神行動医学

キーワード：自閉スペクトラム症 行動療法 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

結節性硬化症 (TSC) は皮膚症状、神経症状及び全身の過誤腫からなる難治性疾患であるが、患者の約 60%が自閉スペクトラム症 (自閉症) に罹患する。また、自閉症患者の 1-4% は TSC に起因する (Caglayan, 2010)。自閉症の主な症状は、社会性相互交流の障害であり、ヒトとのコミュニケーションや対人相互関係に困難を有する。このため、患者のみならず支援する家族や関係者にも大きな負担となっている。罹患率は 45 人に 1 人と高く、自閉症は小児科領域の解決すべき重要な疾患の一つである。

現在のところ、自閉症患者の社会性障害に対する薬剤治療法は存在せず、行動療法が治療として行われており開始年齢が早いほど効果的である。行動療法の中に、仲間媒介法がある。これは、健常児と自閉症児をペアにし、健常児が日常生活内における課題の達成をサポートすることで、自閉症児のコミュニケーションスキルも高まることが報告されている (Eikeseth et al., 2002)。基礎研究レベルにおいて、自閉症モデルマウス (BTBR マウス) と野生型マウスを同じケージ内で飼育すると、野生型マウスと共に飼育された BTBR マウスは社会性障害の改善が見られるが、BTBR マウスのみで飼育した BTBR マウスは、改善が見られなかったことが報告されている (Yang et al., 2011)。このように自閉症モデルマウスにおいても、行動療法すなわち環境調整 (生後の飼育環境の調整) を行うことにより、社会性障害が改善することが見出されている。しかしながら、自閉症の社会性障害が行動療法によって、どのようなメカニズムで改善するかは明らかでない。一方で、近年、不安障害児を対象とした研究において、行動療法が DNA メチル化に影響することが示された。6-13 歳の不安障害児 116 人を対象に行動療法の効果とセロトニントランスポーターのメチル化を解析したところ、6 か月の追跡調査後、治療効果があった群のセロトニントランスポーター遺伝子のメチル化率は増加し、治療効果がなかった群はメチル化率が減少することを報告した (Roberts et al., 2014)。このことから、行動療法は DNA メチル化に影響を及ぼすことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Tsc1*^{+/-}マウスと野生型マウスを 1 対 1 の飼育 (ペア飼育) をすることによって、自閉症様行動 (主に社会性行動) への影響と遺伝子の後天的修飾である DNA メチル化修飾を解析することで自閉症の社会性障害におけるペア飼育の影響・効果を検討することである。

3. 研究の方法

マウスを 2-3 週齢でジェノタイプングを行った後、3 週齢で離乳・雌雄分けし、同腹の雌雄をそれぞれ次の 3 パターンで飼育した。パターン 1: 野生型-野生型、パターン 2: 野生型-*Tsc1*^{+/-}、パターン 3: *Tsc1*^{+/-}-*Tsc1*^{+/-}。以降、パターン 1 で飼育された野生型を ww-w、パターン 2 で飼育された野生型を wh-w、パターン 2 で飼育された *Tsc1*^{+/-} を wh-h、パターン 3 で飼育された *Tsc1*^{+/-} を hh-h と記述する。12 週齢以降に、各パターンで飼育されたマウスの行動テストを開始した。行動テストは、オープンフィールドテスト (行動量・不安の評価)、高架式十字迷路テスト (不安の評価)、ホットプレートテスト (痛みに対する応答の評価)、ハンギングワイヤテスト (筋力の評価)、ホームケージを用いた社会性行動テスト (社会性

行動の評価)を行った。社会行動テスト終了後にマウスの全脳を DNA メチル化解析のために回収し、液体窒素にて瞬時に凍結し解析時まで保存した。全脳を溶解後、DNA 抽出を行い ChIp-on-chip 用アレイの Mouse CpG Island Microarray (G4811A)を使用し、ゲノムワイドに全メチル化領域を解析した。

4. 研究成果

オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、ホットプレートテスト、ハンギングワイヤテストを行ったが、いずれのテストにおいても ww-w、hh-h、wh-w、wh-h の 4 群間において、有意な差は無かった。社会性行動テスト (社会性の評価) においては、ww-w に対して hh-h は有意に社会性行動時間が減少した (図 1)。一方で、野生型と飼育した wh-h は hh-h に対して有意に社会性行動時間が増加した。wh-w は ww-w と社会性行動時間に有意な差は無かった。これらの結果から、野生型とペア飼育した *Tsc1*^{+/+}マウスは社会性行動が改善することが見出された。

ww-w、hh-h、wh-w、wh-h の 4 群におけるメチル化パターン (Density) を解析した (図 2)。Density は mCpG / all CpG (全ての CpG 領域においてメチル化を受けた領域の割合) にて算出した。ww-w 群以外の群は分散が大きいことが観察され、genotype やペア飼育によってメチル化をうけるパターンが異なる可能性が示唆された。さらに、社会性行動に寄与するメチル化を受けた遺伝子を解析するために、解析対象となる遺伝子の Gene Ontology(GO)や pathway enrichment 解析を行った。hh-h/ww-w と wh-h/hh-h において共通し、なおかつメチル化状態が逆方向を示す 667 個の遺伝子を抽出した。これらの遺伝子に関して、GO 解析を行ったところ、発達や細胞内器官、タンパク質結合に関することが見出された (図 3)。pathway enrichment 解析においては、mTOR シグナルも抽出され、下流の S6K や eIF4E のメチル化がペア飼育によって影響を受けることが見出された。最後に、早期にペア飼育を行わない場合、社会性行動にどのような影響が生じるかを検討するため、7 週齢からペア飼育を開始したところ、wh-h の社会性行動障害に改善は見られなかった。

本研究は、*Tsc1*^{+/+}マウスを用いてペア飼育による社会性行動障害への影響を調べ、DNA メチル化を解析した。野生型と飼育することによって *Tsc1*^{+/+}マウスの社会性行動障害が改善することが示された。さらに、ペア飼育によって DNA メチル化状態が変化することが見出された。これらのことから早期の行動療法による自閉症の社会性行動障害の改善に DNA メチル化が寄与することが示唆された。

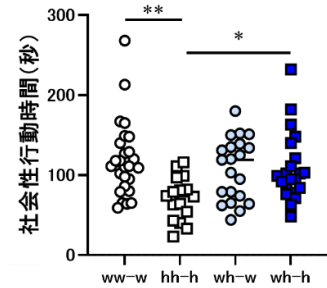


図1 社会性行動テスト
hh-hはww-wと比較して社会性行動が減少していた。野生型マウスと飼育したwh-hは社会性行動が改善した。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

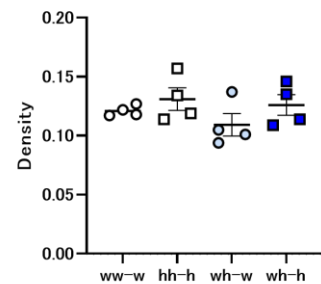
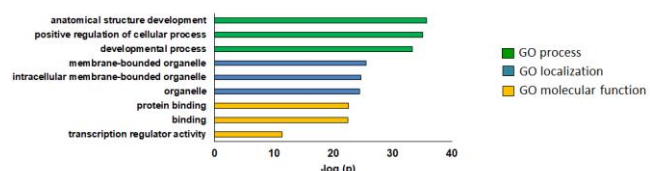


図2 各群におけるDNAメチル化パターン
Densityは全てのCpG領域においてメチル化を受けた領域の割合である。



Maps	p-value	Network Objects from Active Data
1 Stem cells_Aberrant Hedgehog signaling in medulloblastoma stem cells	5.432E-07	Cyclin D2, IGF-2, NCTD11, BM-1, GLI-2, SFRP1
2 Immune response_L-15 signaling via MAPK and PI3K cascades	3.487E-05	GAB2, TRAF2, p70 S6 Kinase, Mei-1, KLF2, SO5, FOXO3A, eIF4E
3 Role of activation of WNT signaling in the progression of lung cancer	5.836E-05	WNT4, DKK3, WNT, ROR2, FZD2, BM-1, Frizzled, SFRP1, SUZ12
4 Neurogenesis_NGF/Tkna MAPK-mediated signaling	1.225E-04	SHPK1, K-RAS, GAB2, PVR, M-Ras, RCTD11, SO5, IP3 receptor, DNAJA4 (TID1), AFS
5 Regulation of lipid metabolism_Regulation of lipid metabolism via LXR, NF-Y and SREBP	1.932E-04	SREBP2 (nuclear), AMPK, gamma subunit, SREBP2 precursor, SREBP2 (Golgi membrane), CREM (activators), RARalpha
6 Inhibition of oligodendrocyte precursor cells differentiation by Wnt signaling in multiple sclerosis	2.118E-04	WNT, FZD2, Frizzled, GLI-2, OLG2
7 Role of epigenetic alterations in proliferation and differentiation of SCLC cells	2.154E-04	DNMT3B, Cyclin D2, K-RAS, ZNF403, Synapsin I, DNMT2, RARbeta, CDK2
8 Immune response_L-2 signaling via ERK, PI3K, and PLC-gamma	2.372E-04	Cyclin D2, GAB2, p70 S6 Kinase2, p70 S6 Kinase, FOXO3A, CDK1 (p34), CDK2, SO51
9 Desensitization of Beta-2 adrenergic receptor signaling and reduction of relaxation	3.101E-04	Beta-arrestin1, MSK1/2 (RP56A8/4), SO5, Beta-2 adrenergic receptor, PDE4D
10 Signal transduction_mTORC1 downstream signaling	3.953E-04	SREBP2 (nuclear), CAD, p70 S6 Kinase2, RRN3, p70 S6 Kinase, eIF4E, Cyclin D

図3 GO, pathway enrichment解析
抽出した667個の遺伝子を対象に解析を行った。発達や細胞内器官、タンパク質結合に関することが見出された。また、pathway enrichment解析においては、mTORシグナルも抽出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato A, Kotajima-Murakami H, Tanaka M, Katoh Y, Ikeda K	4. 巻 13
2. 論文標題 Influence of Prenatal Drug Exposure, Maternal Inflammation, and Parental Aging on the Development of Autism Spectrum Disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychiatry	6. 最初と最後の頁 821455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpsy.2022.821455.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kotajima-Murakami H, Hagihara H, Sato A, Hagino Y, Tanaka M, Katoh Y, Nishito Y, Takamatsu Y, Uchino S, Miyakawa T, Ikeda K	4. 巻 13
2. 論文標題 Exposure to GABAA Receptor Antagonist Picrotoxin in Pregnant Mice Causes Autism-Like Behaviors and Aberrant Gene Expression in Offspring	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychiatry	6. 最初と最後の頁 821354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpsy.2022.821354.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka M, Sato A, Kotajima-Murakami H, Kashii H, Hagino Y, Ide S, Ikeda K.	4. 巻 42
2. 論文標題 Interaction between social behavior and paternal age in offspring of the same paternal mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 343-346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr.12258.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Kotajima-Murakami H, Sato A, Hagino Y, Tanaka M, Kato Y, Takamatsu Y, Nishito Y, Uchino S, Ikeda K
2. 発表標題 Prenatal exposure of GABAA receptor inhibitor picrotoxin causes ASD-like behaviors and aberrant gene expression in mice.
3. 学会等名 7th Congress of AsCNP（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古田島浩子, 佐藤敦志, 池田和隆
2. 発表標題 mTORシグナル経路を中心とした自閉スペクトラム症の病態解明と治療法開発に向けて.
3. 学会等名 第43回 日本生物学的精神医学会. 第51回 日本神経精神薬理学会 合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotajima H, Sato A, Hagino Y, Tanaka M, Kato Y, Takamatsu Y, Uchino S, Ikeda K
2. 発表標題 Exposure of picrotoxin, a GABAA receptor antagonist, in pregnant mice causes ASD-like behaviors in offspring.
3. 学会等名 CINP 2021 Virtual World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotajima H, Sato A, Hagino Y, Tanaka M, Kato Y, Takamatsu Y, Uchino S, Ikeda K
2. 発表標題 Exposure of Picrotoxin, a GABAA Receptor Antagonist, in Pregnant Mice Causes ASD-Like Behaviors in Offspring.
3. 学会等名 59th Annual Meeting of The American College of Neuropsychopharmacology (ACNP 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田島浩子, 佐藤敦志, 萩野洋子, 田中美歩, 加藤喜久, 高松幸雄, 内野茂夫, 池田和隆
2. 発表標題 妊娠マウスへのGABA受容体阻害剤曝露による仔への影響
3. 学会等名 NPBPP2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroko KOTAJIMA-MURAKAMI
2. 発表標題 Effects of rapamycin on social interaction deficits and gene expression in mice exposed to valproic acid in utero
3. 学会等名 第2回脳科学サロン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kotajima H, Sato A, Hagino Y, Tanaka M, Kato Y, Takamatsu Y, Uchino S, Ikeda K
2. 発表標題 Exposure of GABA receptor inhibitor picrotoxin in pregnant mice causes ASD-like behaviors in offspring.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kotajima H
2. 発表標題 mTOR signaling pathway plays a key role in autism spectrum disorder.
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotajima H
2. 発表標題 The role of the cerebellum in fear-conditioned bradycardia.
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotajima H
2. 発表標題 Effects of rapamycin treatment on impaired social interaction and gene expression in mice treated prenatally with valproic acid.
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (IBRO2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田島浩子
2. 発表標題 結節性硬化症に伴う自閉スペクトラム症への行動療法による効果とメカニズムの解明
3. 学会等名 第10回日本結節性硬化症学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.igakuken.or.jp/abuse/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------