

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390331

研究課題名（和文） PDD・ARMS の有病率に関する大規模調査と長期追跡による生物学的マーカーの探索

研究課題名（英文） Large scale prevalence study and Exploring biological marker by long-term follow-up study for PDD/ARMS

研究代表者

染矢 俊幸（SOMEYA TOSHIYUKI）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50187902

研究成果の概要（和文）：

(1) 広汎性発達障害（PDD）疑いの児は、就学時健診において阿賀野市で 9/477 名（1.88%）、新潟市で 11/919 名（1.19%）であり、危険因子としては阿賀野市では父親の高年齢、新潟市では出生時仮死が挙げられた。(2) 脳画像研究において、PDD では定型発達群に比して有意に MRI 画像上の視床体積が減少していた。また、手の模倣課題中の近赤外線スペクトロスコピー（NIRS）所見において、PDD では定型発達群で認められる前頭前皮質活性の左側優位性が減少していた。(3) 分子遺伝研究において、PDD と *TPH2* 遺伝子多型との名目上有意な関連を示したが、マイクロ RNA137 多型との有意な関連は同定できなかった。(4) 中間表現型研究において、5-HTTLPR 多型は PDD の右内側前頭前野の神経発達障害に影響を与えている可能性および 5-*HTR1A* 遺伝子多型が PDD の細分化された臨床的特徴に関連があることを明らかにした。

At Risk Mental State（ARMS）に関しては、就学時健診で確認することが困難であり、研究期間の間に ARMS 症状を呈した児童は存在しなかった。今後、この確立した研究基盤をもとに今後 30 年に渡って疫学研究および生物学的マーカーの探索を推進していく。

研究成果の概要（英文）：

Rates of children with doubt of PDD, in medical examination at the time of entering school, were 1.88% (9/477) in Agano city and 1.19% (11/919) in Niigata city. As a risk factor of PDD, we identified an advanced father's age in Agano city and a birth asphyxia in Niigata city. In our imaging study, the thalamus volume in an MRI image is significantly smaller in PDD subjects compared with controls; PDD subjects have shown a decrease in leftward bias of the balance between right and left prefrontal cortex activity during imitation tasks when compared with controls. In our molecular genetic study, we observed a potential association between *TPH2* gene and PDD; we failed to identify a gene polymorphism in micro RNA 137 that significantly associated PDD. In our intermediate phenotype study, the polymorphism of 5-HTTLPR gene influences the neural development of the medial prefrontal cortex among PDD subjects; The polymorphism of 5-*HTR1A* gene is related to some divided clinical phenotypes of PDD.

It is difficult to identify At Risk Mental State (ARMS) symptoms by a medical examination at the time of entering school, thus children who showed ARMS symptoms between this research period did not exist. We will promote the epidemiological survey and exploring biological marker based on the established research base for over 30 years.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：児童精神医学

科研費の分科・細目：精神医学

キーワード：広汎性発達障害（PDD）、At risk mental states（ARMS）、分子遺伝研究、疫学研究、脳画像研究、近赤外線分光装置（NIRS）

1. 研究開始当初の背景

PDDの有病率は、世界的に過去40年で有病率が20倍の上昇を示している（Baron-Cohen et al., 2009）。しかし、わが国では最近の有病率は十分に調査されておらず、早急に調査する必要がある。さらに、この10年間でPDDの生物学的研究は飛躍的な進歩を遂げ、その病態仮説として我々は扁桃体を中心とした神経系の神経発達障害モデルを報告した（Endo et al., 2007）が、適切な治療・介入に関しては十分な研究がなされておらず、大きな進展は見られていない。

以上のことから、児童を対象とした大規模かつ長期に渡る前方視的なコホート研究を行うことで、PDDの有病率を明らかにし、さらに生物学的エビデンスの蓄積により、病態解明・早期診断法および適切な医学的介入を確立することはきわめて重要といえる。

2. 研究の目的

本研究は、新潟県新潟市および阿賀野市の就学前の児を対象として、PDDに対する(1)疫学研究を行い、そこでスクリーニングされた児に加え、新潟大学医歯学総合病院およびその関連病院の児童精神科外来に通院中のPDD患者で同意を得られた対象者に対し、MRI、¹H-MRS、近赤外線スペクトロスコピー（NIRS）を用いた(2)脳画像研究、DNAサンプルを収集し遺伝子多型とPDDとの関連を解析する(3)

分子遺伝学研究、PDDの疾患自体ではなく、脳画像所見や評価尺度による臨床症状を中間表現型として、遺伝子多型との関連を調べる(4)中間表現型研究、末梢に発現するmRNAや蛋白の解析を行う(5)生化学研究、薬物療法や治療的教育の効果を判定する(6)治療介入研究などの様々な視点から、病態解明、早期診断および有効な治療介入法の確立を目指した研究を立ち上げ、その予備的解析を開始する。

3. 研究の方法

(1) 疫学研究

新潟県阿賀野市における平成21年～23年度および新潟県新潟市における24年度小学校入学予定児の就学前健診にてPDDの疫学調査を行った。阿賀野市で1112名、新潟市で952名の保護者に質問紙を配布し、同意の得られた、それぞれ477名（回収率42.8%）、919名（回収率96.5%）を対象とした。自閉症スクリーニング質問紙（ASQ）総得点およびASQ15点以上をPDD疑い（Berument et al., 1999）としてその頻度を調べ、それらと両親の年齢、胎生期・周産期異常、生活環境などの因子との関連を重回帰分析および多重ロジスティック回帰分析で解析した。

(2) 脳画像研究

①MRI研究

PDD群38名（平均年齢12.9歳、男：女 = 32：

6) および定型発達群 16 名 (平均年齢 11.5 歳、男 : 女 = 10 : 6) を対象とし、1.5 テスラ MRI 装置にて全脳を撮影し、用手的解析にて、頭蓋内容積および両側の視床の体積を同定した。PDD 各サブタイプ群 (Autism 群、Asperger 群、PDD-NOS 群) および定型発達群で両側の視床体積を測定し、年齢および頭蓋内容積を共変量とした共分散分析を行った。

②NIRS 研究

同意を得た PDD 群 20 名 (平均年齢 10.2 歳、男 : 女 = 16 : 4) および定型発達群 20 名 (平均年齢 9.5 歳、男 : 女 = 16 : 4) を対象とし、手の模倣課題施行中の左右それぞれの前頭部における酸素化ヘモグロビン (O2Hb) および脱酸素化ヘモグロビン (HHb) の変化量の定量を NIRS にて行った。手の鏡像模倣

(mirror-image imitation (MI)) および解剖学的模倣 (anatomical imitation (AI)) 中の左右 PFC における O2Hb および HHb の変化量 [ΔO2Hb]AI、[ΔO2Hb]MI、[ΔHHb]AI、[ΔHHb]MI を、0.5 秒毎に経時的に測定し、[ΔO2Hb]AI-[ΔO2Hb]MI、[ΔHHb]AI-[ΔHHb]MI について、PDD および定型発達群との比較を行った。

(3) 分子遺伝研究

①TPH2 遺伝子多型との関連研究

PDD 患者では古くからセロトニン (5-HT) 神経系の異常が指摘されており、さらに 5-HT 再取り込み阻害作用をもつ抗うつ薬が PDD の臨床症状を改善するとも報告されている

(McDougle et al., 1996)。中枢神経系における 5-HT 合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素 2 (TPH2) と PDD との関連を調べるために PDD 群 150 名 (平均年齢 15.3 歳、男 : 女 = 119 : 31) と定型発達群 620 名 (平均年齢 38.2 歳、男 : 女 = 317 : 303) に対し、エクソンシーケンスにより同定された新規の非同義変異、タグー塩基多型、コピー数多

様性 (CNV) を含む 20 個の多型について PDD との関連について解析した。

②MIR137 多型との関連研究

小分子非コード RNA であるマイクロ RNA (MIR) がほとんどの蛋白質コード遺伝子を制御することが明らかになりつつあり、また MIR137 を含む欠失が PDD 患者に同定されている (Carter et al., 2011)。PDD 群 181 名 (平均年齢 16.2 歳、男 : 女 = 142 : 39) と定型発達群 674 名 (平均年齢 38.0 歳、男 : 女 = 341 : 333) 全例に MIR137 領域のシーケンスを行い、同定した多型と PDD の関連を解析した。

(4) 中間表現型研究

①MRI・¹H-MRS 所見と 5-HT 関連遺伝子多型

PDD 群 38 名 (平均年齢 12.9 歳、男 : 女 = 32 : 6)、定型発達群 16 名 (平均年齢 11.5 歳、男 : 女 = 10 : 6) において MRI・¹H-MRS 所見を中間表現型として、5-HT トランスポーター遺伝子のプロモーター領域における S/L 多型

(5-HTTLPR S/L 多型)、5-HT1A 受容体遺伝子の C-1019G 多型 (5-HTR1A-C-1019G 多型)、および 5-HT2A 受容体遺伝子の A-1438G 多型

(5-HTR2A A-1438G 多型) との関連を解析した。MRI 撮影は、前記②-a. MRI 研究と同様に行い、¹H-MRS は、右内側前頭前野、右内側側頭葉 (海馬・扁桃体領域)、小脳虫部の各領域における N-アセチルアスパラギン酸 (NAA)、コリン含有物 (Cho)、クレアチニン (Cr) のスペクトルを撮影し、Cr を基準物質として NAA/Cr、Cho/Cr を測定した。

②PDD の臨床症状と 5-HT 関連遺伝子

PDD 群 112 名 (平均年齢 14.8 歳、男 : 女 = 83 : 29) の小児自閉症評価尺度-東京版 (CARS-TV) で評価した臨床症状と前述の 3 つの 5-HT 関連遺伝子多型の関連を解析した。

4. 研究成果

(1) 疫学研究

PDD 疑いの児は阿賀野市で 9/477 名 (1.88%)、

新潟市で11/919名(1.19%)であった。双方とも近年の大規模疫学調査の1.57%に近い値を示した(Baron-Cohen et al., 2009)が、阿賀野市の方がやや高値であった。その要因として、阿賀野市では新潟市に比べ回収率が低かった(阿賀野市:新潟市=42.8%:96.5%)が、未回収群にはPDDがほとんど存在せず実際には近い有病率であった可能性がある。

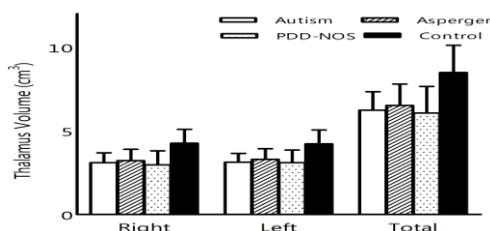
影響を与える因子としては、阿賀野市の調査においては父親の高年齢がASQ総得点の上昇($p < 0.01$ 、偏相関係数0.11)およびASQ15点以上(PDD疑い)($p = 0.04$ 、オッズ比9.5)と有意に関連していた。新潟市の調査においては出生時仮死がASQ総得点の上昇($p = 0.02$ 、偏相関係数0.08)およびASQ15点以上(PDD疑い)($p = 0.04$ 、オッズ比12.0)と有意に関連していた。Reichenberg et al (2006)は大規模疫学研究にて、PDD児の父親の出生時年齢が29歳以下に比較し40歳以上で5.75倍発症のリスクが高かったと報告したが、これは阿賀野市における調査結果と同様の結果を示している。また出生時仮死(低アプガースコア)についてはメタ研究によってPDDの危険因子となることが明らかにされている(Gardener et al., 2011)。

(2)脳画像研究

①MRI研究

左右各々および両側の視床体積において4群間で有意な群間差($p < 0.001$)を認め、Autism群、Asperger群、PDD-NOS群のいずれも定型発達群に比して有意に視床の体積が減少していた(全て $p < 0.05$:図1)。

(図1:PDD各サブタイプと定型発達群の両側視床体積)

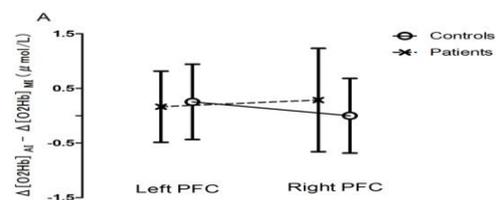


さらに、PDD男性において非右利きのほうが右利きに比べ、有意に両側および右視床の体積が減少していた($p < 0.05$)。

②NIRS研究

$[\Delta 02Hb]_{AI} - [\Delta 02Hb]_{MI}$ および $[\Delta HHb]_{AI} - [\Delta HHb]_{MI}$ について、PDD群において正常群で認められる左>右となるような有意差は認めなかった(正常群 $[02Hb]$ 、 $[HHb]$: $p = 0.03$, $p = 0.02$; PDD群 $[02Hb]$ 、 $[HHb]$: $p = 0.23$, $p = 0.28$)。この結果は、正常群では認める前頭前皮質(PFC)の左優位性がPDD群では減少していることを示唆する(図2)。

(図2:模倣課題中のPFC活性)

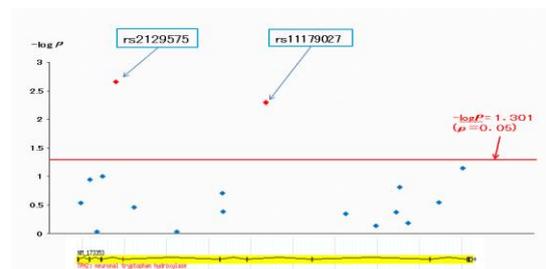


(3)分子遺伝研究

①TPH2遺伝子多型との関連研究

rs212975 ($p = 0.002$) と rs11179027 ($p = 0.005$) の2つの一塩基多型とPDDとの名目上有意な関連を見いだしたがこの結果は、TPH2遺伝子がPDDのリスク遺伝子である可能性を示唆している(図3:●)。

(図3:TPH2遺伝子多型とPDDとの関連)



②MIR137多型との関連研究

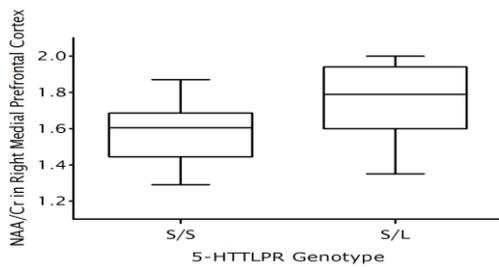
MIR137領域のシーケンスにより3つの一塩基多型および1つのvariable number of tandem repeatを同定したが、PDDと有意な関連を示した多型はなかった。

(4)中間表現型研究

①MRI・¹H-MRS 所見と 5-HT 関連遺伝子多型

¹H-MRS で測定した右内側前頭前野、右内側側頭葉、小脳虫部の NAA/Cr、Cho/Cr を前述の 3 つの 5-HT 関連遺伝子の多型群間で比較を行った。年齢と IQ を共変量とした共分散分析の結果、5-HTTLPR 遺伝子多型の S/S 群は S/L 群に比し、右内側前頭前野の NAA/Cr 比が有意に低下していた ($p < 0.05$: 図 4)。

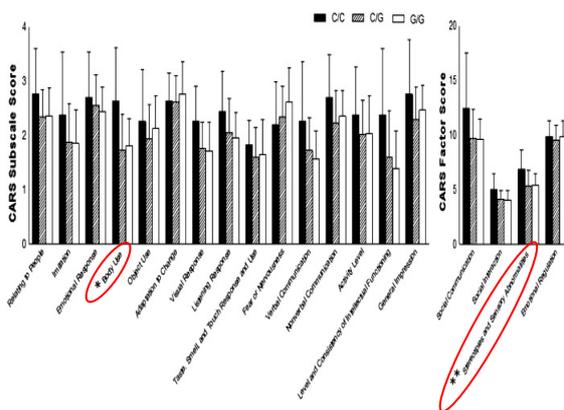
(図 4 : 5-HTTLPR 多型と内側前頭前野の NAA/Cr 比)



②PDD の臨床症状と 5-HT 関連遺伝子多型

CARS-TV で評価した臨床症状と前述の 3 つの 5-HT 関連遺伝子多型との関連を調べるために年齢と IQ を共変量とした共分散分析を行った。その結果、CARS-TV で評価した臨床症状のうち下位項目の「体の使い方」と因子項目の「常同性および感覚異常」が 5-HTT1A C-1019G 多型の C/C 群において C/G 群および G/G 群よりも有意に得点が高かった (図 5)。

(図 5 : 5-HTT1A 遺伝子多型と PDD の臨床症状)



・研究成果の総括

以上、本研究期間内に明らかになった PDD の(1)疫学研究、(2)脳画像研究、(3)分子遺伝学研究、(4)中間表現型研究による所見を報

告した。この 3 年間で PDD 長期コホート研究の基盤は確立され、30 年に渡り PDD の疫学研究を行う予定であり、総参加者が数万人単位の国内最大規模のコホート研究となる。また、上記(1)~(4)の研究をさらに発展させるとともに、(5)生化学研究、(6)治療介入研究についても推進していく。

ARMS に関して、研究期間に ARMS 症状を呈した児童は存在しなかったが、その好発年齢や就学前児童には自覚的な ARMS 症状を訴えることが困難なことなどによると考えられた。今後も長期に追跡調査を行うことにより ARMS 症状を呈す児童がスクリーニングされ、その頻度が明らかになっていくものと考えられる。スクリーニングされた児童に対して PDD と同様に脳画像研究および分子遺伝研究などを包括的に行っていく、生物学的マーカーを探索していく。

・参考文献

Baron-Cohen S et al: Br J Psychiatry. 2009.
 Berument SK et al: Br J Psychiatry. 1999.
 Carter, M et al: Clin. Genet. 2011.
 Endo T et al: Biol Psychiatry. 2007.
 Gardener H et al: Pediatrics. 2011.
 McDougle CJ et al: Arch Gen Psychiatry. 1996.
 Reichenberg A et al: Arch Gen Psychiatry. 2006.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Tamura R, Kitamura H, Endo T, Abe R, Someya T. Decreased leftward bias of prefrontal activity in autism spectrum disorder revealed by functional near-infrared spectroscopy. Psychiatry Res: Neuroimaging. 査読有 in press, 2012.
- ② Egawa J, Endo T, Tamura R, Masuzawa

- N, Fukui N, Sugai T, Someya T. Influence of the 5-HT1A C-1019G Polymorphism on Clinical Phenotypes of Autism Spectrum Disorders. *Psychiatry Res.* 査読有 epub, 2012.
- ③ Egawa J, Watanabe Y, Nunokawa A, Endo T, Kaneko N, Tamura R, Sugiyama T, Someya T. A detailed association analysis between the tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene and autism spectrum disorders in a Japanese population. *Psychiatry Res.* 査読有 epub, 2012.
- ④ Egawa J, Watanabe Y, Kitamura H, Endo T, Tamura R, Hasegawa N, Someya T. Reduced thalamus volume in non-right-handed male patients with autism spectrum disorders. *Psychiatry Clin Neurosci.* 査読有, 65 (4): 395, 2011.
- ⑤ Tamura R, Kitamura H, Endo T, Hasegawa N, Someya T. Reduced thalamic volume observed across different subgroups of autism spectrum disorders. *Psychiatry Research: Neuroimaging.* 査読有, 184 (3), 186-188. 2010.
- ⑥ Endo T, Kitamura H, Tamura R, Egawa J, Sugai T, Fukui N, Suzuki Y, Someya T. 5-HTTLPR polymorphism influences prefrontal neurochemical metabolites in autism spectrum disorder. *Psychiatry Research: Neuroimaging.* 査読有, 183 (2), 170-173, 2010.

[学会発表] (計 11 件)

- ① <第 105 回日本小児精神神経学会 2011. 6. 19. 新潟> 田村立, 遠藤太郎, 江川純, 杉本篤言, 染矢俊幸: シンポジウム: 新潟県阿賀野市における広汎性発

達障害の疫学調査について

- ② <第 105 回日本小児精神神経学会 2011. 6. 19. 新潟> 江川純, 遠藤太郎, 田村立, 増澤菜生, 杉山登志郎, 染矢俊幸: トリプトファン水酸化酵素 2 (TPH2) 遺伝子と広汎性発達障害との関連.
- ③ <第 32 回日本生物学的精神医学会 2010. 10. 9. 北九州> 田村立, 北村秀明, 遠藤太郎, 阿部亮, 染矢俊幸: 自閉症スペクトラム障害における模倣中の前頭前野賦活の側性変化.
- ④ <第 32 回日本生物学的精神医学会 2010. 10. 9. 北九州> 遠藤太郎, 江川純, 田村立, 増澤菜生, 福井直樹, 鈴木雄太郎, 北村秀明, 染矢俊幸: 自閉症スペクトラム障害の表現型に影響を与えるセロトニン関連遺伝子の探索.
- ⑤ <第 32 回日本生物学的精神医学会 2010. 10. 9. 北九州> 北村秀明, 田村立, 遠藤太郎, 長谷川直哉, 染矢俊幸: 自閉症スペクトラム障害における小脳虫部の大きさと脳代謝濃度.
- ⑥ <第 50 回日本児童青年精神医学会 2009. 10. 1. 京都> 遠藤太郎, 江川純, 田村立, 杉本篤言, 染矢俊幸: セロトニン・トランスポーターおよびセロトニン受容体遺伝子の自閉症スペクトラム者の脳体積・生化学代謝に及ぼす影響.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

染矢 俊幸 (SOMEYA TOSHIYUKI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 50187902

(2) 研究分担者

遠藤 太郎 (ENDO TARO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 70515759

(3) 連携研究者

なし