

機関番号：13101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791115
 研究課題名（和文） 中間表現型にニューロイメージングを用いた自閉症スペクトラム障害の分子遺伝研究
 研究課題名（英文） Relationships between polymorphisms of candidate gene for autism spectrum disorder and neuroimaging phenotypes.
 研究代表者
 遠藤 太郎（ENDO TARO）
 新潟大学・医歯学系・助教
 研究者番号：70515759

研究成果の概要（和文）：自閉症スペクトラム障害（ASD）は、乳幼児期に顕在化する生来の発達障害であるが、その生物学的診断マーカーについては未だ解明されていない。我々は、ASDの中間表現型として、脳画像（脳形態、脳内生化学代謝）や臨床症状を用いて、疾患感受性遺伝子として想定されているセロトニン関連遺伝子との関連を調査した。その結果、①ASD者では右内側側頭葉（海馬-扁桃体）領域において神経発達障害を認め、この障害の程度はASD各サブタイプ間によって異なり、ASDの重症度に寄与している可能性がある、②ASD者では視床の萎縮を認め、この萎縮はASDの臨床症状の一つ「人との関係」に関連している、③5-HTTLPR 遺伝子 S・L 多型と 5-HTR1A 遺伝子 C(-1019)G 多型は ASD の様々な臨床症状に関与している可能性がある、④5-HTTLPR 遺伝子多型は、ASD 者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があることを明らかにした。これらの遺伝子により影響を受ける中間表現型は ASD の生物学的診断マーカーになり得るものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder; the diagnostic biological markers for ASD have not been established. We examined the relationships between the serotonin-related genes and the intermediate phenotypes of ASD (brain morphology, chemical metabolites, and clinical symptoms). Our findings revealed that follows; 1) Individuals with ASD had neurodevelopmental disturbance in the medial temporal lobes, and the degree of this disturbance varies between ASD subtypes and contributes to the severity; 2) Individuals with ASD have smaller thalamus and the small thalamus is related to the clinical symptoms of Relating to People; 3) The polymorphisms of 5-HTTLPR and 5-HTR1A gene are related to a number of clinical symptoms of ASD; The polymorphism of 5-HTTLPR gene influences the neural development of the medial prefrontal cortex among individuals with ASD. These intermediate phenotypes affected by serotonin-related genes are considered a potential biological marker for ASD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：自閉症スペクトラム障害、MRI、MRS、セロトニン・トランスポーター遺伝子、セロトニン 1A 受容体遺伝子、セロトニン 2A 受容体遺伝子

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、対人的相互性やコミュニケーションの質的障害および常同・反復的な興味・行動で特徴付けられる生来の発達障害である。また、ASD は一卵性双生児の一致率が 90%以上と遺伝的な関与が強い疾患であるが、その反面、典型例の自閉症から定型発達と鑑別が困難な特定不能の広汎性発達障害まで連続性を持った幅広い疾患概念であり、非常に異質性の高い症候群である。

近年、ASD の脳機能画像研究は飛躍的な進歩を遂げ、扁桃体を中心とした神経系の神経発達障害説やミラーニューロン障害仮説などの様々な仮説が提唱されているが、その真の病態ははまだ解明されていない。ASD の有効な治療法も存在せず、ASD の早急な病態解明が求められており、そのための生物学的研究が全世界的に推進されているが、わが国の発達障害に関する生物学的研究は欧米に比し非常に立ち遅れている。我々は、

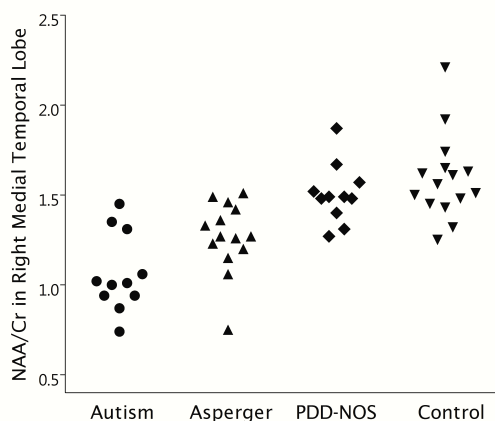
¹H-Magnetic Resonance Spectroscopy

(¹H-MRS) を用いた先行研究で、ASD 者では右内側側頭葉 (海馬-扁桃体) 領域の神経発達障害を認め、その神経発達の程度が自閉症スペクトラム障害の重症度や自閉性障害

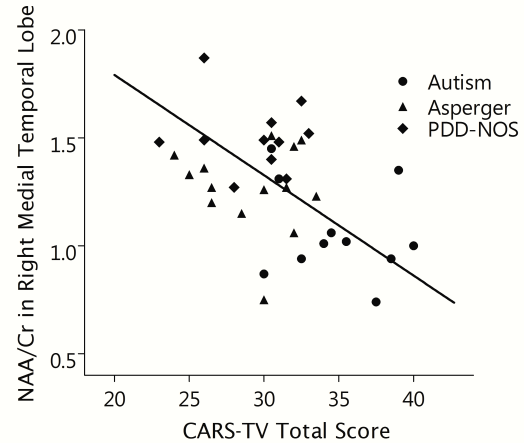
(Autism)、アスペルガー障害 (Asperger)、特定不能の広汎性発達障害 (PDD-NOS) などの亜型分類に寄与していることを報告した (Endo et al., 2007: 図 1, 2)。しかし同時に、同じ自閉症スペクトラム障害者においても神経発達障害の程度は著しく異なり、臨床像のみならず生物学的にも異質性の高い症候群であることも明らかとなり、脳画像で確認される中間表現型に影響を与える因子の

解明といった新たな課題も残された。

(図 1: ASD 各サブタイプおよび定型発達群における N-アセチルアスパラギン酸 (NAA) / クレアチニン (Cr) 比の比較)



(図 2: ASD 群の小児自閉症評価尺度-東京版 (CARS-TV) 得点と NAA/Cr の関係)



また、ASD 者では古くからセロトニン神経系の異常が指摘されており (Cook et al., 1996, Chugani et al., 1999)、さらにセロトニン再取り込み阻害作用をもつ抗うつ薬が ASD の臨床症状を改善すると報告されている (Gordon et al. 1993, McDougle et al. 1996)。しかし、これまでに複数研究でセロトニン関連遺伝子と ASD 発症の関連が調査されているが、一致した結果は得られておらず、明かな関連は示されていない。そこで我々は、これらの遺伝子は疾患そのものではなく、ASD の特定の臨床症状や特定の領域の脳の発達に影響を与えているものと仮説を立て本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、自閉症スペクトラム障害者と定型発達者を対象に、ニューロイメージングで得られた中間表現型としての脳の発達に関与する遺伝子多型を同定し、自閉症スペクトラム障害の臨床症状やその異質性に影響を与える因子を見出すことを目的として行った。特に、ASD 者の多くでみられる感覚の異常に関連していると想定される小脳の体積、および ASD の社会性に関連していると想定される前頭前野、内側側頭葉、小脳における神経発達などの脳画像所見や ASD の詳細な臨床症状と、疾患感受性遺伝子として想定されているセロトニン関連遺伝子との関連を明らかにすることに焦点を当てて本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 対象

対象は、新潟大学医歯学総合病院および新潟県立はまぐみ小児療育センターに通院中のASD者および公募により集まった定型発達者である。ASD者38名（平均年齢12.9歳、男：女 = 32：6）、定型発達者16名（平均年齢11.5歳、男：女 = 10：6）からMRIおよびMRS撮影の同意が得られ、112名のASD者（平均年齢14.8歳、男：女 = 83：29）よりDNAサンプル収集の同意が得られた。他の性心疾患、および脆弱X症候群、結節性硬化症などの神経疾患や代謝性疾患などの身体疾患を持つ者は除外した。定型発達者では、ASDの家族歴を持つ者や自閉症スクリーニング質問紙でASDが疑われる者も除外した。

ASD者の臨床症状は、小児自閉症評価尺度-東京版（CARS-TV）を用いて評価し、知的機能は、WAIS-IIIもしくはWAIS-Rを用いて評価した。

尚、本研究は新潟大学医学部遺伝子倫理委員会により承認を得た。

(2) MRI・¹H-MRS プロトコール

MRI撮影は、1.5テスラMRI装置を用いて1.5mm間隔、128スライスで全脳を撮影し、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。¹H-MRSは、右内側前頭前野、右内側側頭葉（海馬・扁桃体領域）、小脳虫部に各々8ccのボクセルを設定し、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（TE = 35ms、TR = 2000ms）、Crを脳内基準物質としてNAA/Cr、Cho/Crを測定した。

(3) 分子遺伝

末梢血もしくは唾液（唾液DNA収集キットOragene®を使用）よりDNAサンプルを収集した。PCR法を用いて、セロトニン・トランスポーター遺伝子のプロモーター領域

（5-HTTLPR）におけるS型・L型多型、セロトニン1A受容体遺伝子（5-HTR1A）のC(-1019)G多型、およびセロトニン2A受容体遺伝子（5-HTR2A）のA(-1438)G多型を同定した。

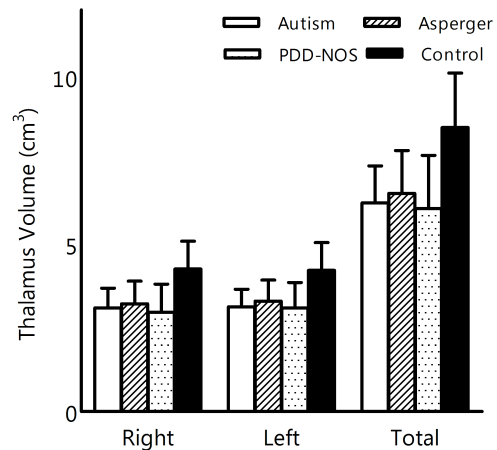
4. 研究成果

(1) ASDの局所脳体積

ASD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結果、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3）。また、CARS-TVで評価した臨床症状のうち、「人との関係」の項目と両側の視床の体積の間に有意な負の相関を認めた（右視床： $p < 0.05$ 、左視床： $p < 0.001$ 、両側視床： $p < 0.001$ ）。

（図3：ASD各サブタイプおよび定型発達群の両側視床体積）



(2) セロトニン関連遺伝子と臨床症状

5-HTTLPR遺伝子のS・L多型、5-HTR1A遺伝子のC(-1019)G多型、および5-HTR2A遺伝子のA(-1438)G多型を同定した結果、5-HTTLPRにおいてはS/S型63名、S/L型42名、L/L型4名、5-HTR1A C(-1019)GにおいてはC/C型8名、C/G型44名、G/G型58名、5-HTR2A A(-1438)GにおいてはA/A型27名、A/G型54名、G/G型26名であった。

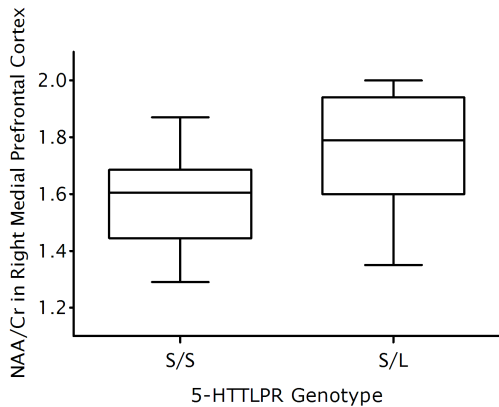
年齢とIQを共変量とした共分散分析を行った結果、CARS-TVで評価した臨床症状のうち「聴覚反応」の項目の得点で5-HTTLPR遺伝子多型間で有意な群間差（ $p < 0.05$ ）を認め、特にL/L群はS/L群に比し有意に得点が高かった（ $p < 0.05$ ）。また5-HTR1A遺伝子多型間では、CARS-TV総得点、および「身体の使用」、「視覚反応」、「恐れや不安」、「言語的コミュニケーション」、「非言語的コミュニケーション」の項目の得点において有意な群間差（全て $p < 0.05$ ）を認め、C/C群はC/G群、G/G群に比し「身体の使用」、「視覚反応」の得点が高く（それぞれ $p < 0.05$ ）、C/C群はG/G群に比し「言語的コミュニケーション」の得点が高かった（ $p < 0.05$ ）。5-HTR2A遺伝子多型間ではCARS-TVのいずれの項目においても有意な群間差を認めなかった。

(3) セロトニン関連遺伝子と脳形態、脳内生化学代謝

¹H-MRSで測定した右内側前頭前野、右内側側頭葉、小脳虫部におけるNAA/Cr、Cho/Crを前述のセロトニン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

共分散分析を行った結果、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 遺伝子多型と内側前頭前野の NAA/Cr 比)



右内側前頭前野および小脳虫部においては、各遺伝子多型間で NAA/Cr、Cho/Cr に有意な群間差を認めなかった。視床の体積に関しては、いずれの遺伝子多型も関連を認めなかった。

(4) 研究結果の総括

我々は先行研究にて、①ASD 者では右内側側頭葉（海馬-扁桃体）領域において神経発達障害を認め、この障害の程度は ASD 格サブタイプ間によって異なり、ASD の重症度に寄与している可能性があることを明らかとした。さらに本研究により、②ASD 者では視床の萎縮を認め、この萎縮は ASD の臨床症状の一つ「人との関係」に関連していること、③5-HTTLPR 遺伝子の L アレルは、ASD の臨床症状の「聴覚反応」に、5-HTR1A 遺伝子 C(-1019)G 多型の C アレルは、「言語的コミュニケーション」、「視覚反応」、「身体の使用」などの様々な臨床症状に関与している可能性があること、④5-HTTLPR 遺伝子の S アレルは、ASD 者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があることを明らかにした。

我々の一連の研究にて、ASD 者では海馬-扁桃体を含む右内側側頭葉の神経発達障害と視床の形態異常（体積減少）を認めることが明らかになり、右内側側頭葉の神経発達障害は ASD の重症度に寄与し、視床の体積減少は ASD の中核症状の一つである「人との関係」に関係することが判明した。内側側頭葉のうち、情動に深く関与する扁桃体が ASD で傷害されているという「扁桃体仮説」は以前から指摘されていた (Baron-Cohen et al., 2000) が、その障害の程度が ASD の重症度に影響を

与えていることは、我々の報告 (Endo et al., 2007) が世界初のものである。さらに我々は、これまで ASD ではあまり注目されていなかった視床にも注目した。ASD 者では感覚の過敏性がしばしば認められるため、我々は感覚の統合中枢である視床に異常を認めると仮説を立てた。本研究の結果、ASD では視床の体積が減少しており、体積減少が ASD の中核症状の強さに関連していることが立証された。このように、ASD では脳のいくつかの領域で神経発達障害を認め、それらが ASD の特定の臨床症状の発症に寄与しているものと思われる。今後、同様の研究の蓄積により、ASD の臨床症状に寄与する他の脳部位を解明して行く必要があると考える。

さらに本研究では、セロトニン関連遺伝子が、ASD の臨床症状や脳形態・脳内生化学代謝などの中間表現型に与える影響についても調査した。その結果、5-HTTLPR 遺伝子の L アレルは臨床症状のうち聴覚反応に関連し、S アレルは前頭前野の神経発達障害に影響を与えていることが明らかとなった。先行研究では、L アレルは表情表出や非特異的感覚への反応などのコミュニケーションの障害に関連した臨床症状に関連していると報告されている (Brune et al., 2006)。さらに、脳形態学的には S アレルを保有する ASD 者で前頭葉皮質の灰白質体積が増加していると報告されており (Wassink et al. 2007)、5-HTTLPR 遺伝子多型は、ASD の前頭葉の神経発達障害に関連し、その結果として、ASD の特定の臨床症状に影響を与えている可能性がある。また、5-HTR1A 遺伝子 C(-1019)G 多型では、C アレルが言語的コミュニケーション、視覚反応、身体の使用などの多彩な臨床症状に影響を与えていることが明らかとなった。5-HTR1A C(-1019)G 多型は、5-HTR1A の発現を調整し (Lemondé et al., 2003)、さらに扁桃体の体積や不安反応に対する同領域の賦活に影響を与える報告されている (Fakra et al., 2009, Zetzsche et al., 2008)。

ASD の病態に深く関与していると想定されている扁桃体の発達や賦活に影響を与える 5-HTR1A C(-1019)G 遺伝子が、ASD の中核症状や周辺症状に関与しているという本研究の結果は、ASD の扁桃体仮説にさらなる裏付けを与えるものである。

以上のように、本研究では臨床症状や脳発達などの ASD の中間表現型と関連遺伝子との関連を解析し、いくつかの新たな知見を明らかとした。今後も研究を継続し、他の臨床症状に関連する脳部位や遺伝子型を同定することで、ASD の発症に関わる生物学的診断マーカーを同定することが出来ると考える。

(5) 参考文献

Baron-Cohen S et al.: The amygdala theory

- of autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(3):355-364, 2000.
- Brune CW et al.: 5-HTTLPR genotype-specific phenotype in children and adolescents with autism. *Am J Psychiatry.* 163(12):2148-2156, 2006.
- Chugani DC et al.: Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol.* 45(3):287-295, 1999.
- Cook EH Jr et al.: The serotonin system in autism. *Curr Opin Pediatr.* 8(4)348-354, 1996.
- Endo T et al.: Altered chemical metabolites in the amygdala-hippocampus region contribute to autistic symptoms of autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry.* 62(9):1030-1037, 2007.
- Fakra E et al.: Effects of HTR1A C(-1019)G on amygdala reactivity and trait anxiety. *Arch Gen Psychiatry.* 66(1):33-40, 2009.
- Gordon CT et al.: A double-blind comparison of clomipramine, desipramine, and placebo in the treatment of autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 50(6):441-447, 1993.
- Lemondé S et al.: Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci.* 23(25):8788-8799, 2003.
- McDougle CJ et al.: A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 53(11): 1001-1008, 1996.
- Wassink TH et al.: Cerebral cortical gray matter overgrowth and functional variation of the serotonin transporter gene in autism. *Arch Gen Psychiatry.* 64(6):709-717, 2007.
- Zetsche T et al.: 5-HT1A receptor gene C-1019 G polymorphism and amygdala volume in borderline personality disorder. *Genes Brain Behav.* 7(3):306-313, 2008.

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2件)

- ① 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), 2010, 170-173.

- ② 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), 2010, 186-188.

[学会発表] (計3件)

- ① 〈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.
- ② 〈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.
- ③ 〈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.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤太郎 (TARO ENDO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 70515759

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし