

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293262

研究課題名(和文) 自閉症スペクトラム障害幼児における遺伝子多型、脳内ネットワークと表現型の関係

研究課題名(英文) The genotype, the phenotype and the end-phenotype measured by MEG in autism spectrum disorder.

研究代表者

菊知 充 (Kikuchi, Mitsuru)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号：00377384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ASDの症状を、行動評価と、MEGをもちいた生理学的指標を用いて、より客観的に数値化し、自閉症のリスク型の遺伝子多型とどのように関連するかを調べた。ASD幼児(延べN=71)および定型発達幼児(延べN=102)が参加した。現時点でMET遺伝子のrs1858830の一塩基多型については、ASD幼児33名、定型発達(TD)幼児で30名の解析が終了した。結果、ASD群はTD群と比較してリスク型の遺伝子多型Cを含む群は、作動記憶の発達に遅れが認められた。社会性については、同様の傾向が認められたが有意差にはいならなかった。MEGをもちいたAEFの潜時についてはTD群がよりリスク遺伝子の影響を受けていた。

研究成果の概要(英文)：The symptom of ASD was evaluated using the behavioral and neurophysiological methods. We researched the effect of the genotype (which was thought to be risk type for ASD) on phenotype measured by behavioral data and end-phenotype measured by MEG. Young children with ASD (N=71: including the repeated subjects) and typically developing children (N=102: including the repeated subjects) participated. At the present moment, single nucleotide polymorphism of rs1858830 in a MET gene have identified in 33 children with ASD and 30 TD children. We defined CC and a CG genotype (which include risk type genetic polymorphism C) as CC_CG group, and we compared some phenotype and end-phenotype between CC_CG and GG groups. As the result, in the ASD group including genetic polymorphism C, developmental delay was observed in working memory task. On the other hand, TD group was affected by the risk gene more about the latency of auditory evoked field measured by MEG.

研究分野：児童精神医学

キーワード：自閉スペクトラム症 脳磁図 幼児 遺伝子多型 MET遺伝子 社会性 ワーキングメモリ 言語発達

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害を代表とする ASD は、主に社会性、コミュニケーションにおける障害および反復的な行動様式によって特徴づけられる神経発達障害である。ASD の有病率は 100 人に 1 人程度(Baird et al. 2006 Lancet)と高く、幼少期からその特徴が認められ、生涯にわたりその特徴が持続する。たとえ知的障害を伴わないケースであっても、生涯にわたる長期間、様々な社会的不適応状態に陥ることがある。むしろ障害が軽度であるほど、周囲に気づかれることもなく、療育的介入の機会が少なく、学童期以降不適応障害になり、その結果生涯にわたり就労困難な状態になることもある。その病態生理の解明と早期の客観的診断指標の確立が社会的に急務になってきている。残念なことに、現時点で、これらの発達障害には早期介入が望ましいにもかかわらず、早期診断のための医療機器開発は遅れており、治療法に関しても極めて選択肢の少ない状況にある。ASD の発病メカニズムの起点をたどっていくと、幼児期以前にまでさかのぼる。発症時に脳内で何が起きているかを調べるためには、胎児期から幼児期までの脳研究が必要になる。しかし、従来の脳機能記録方法では、幼少期の被験者は協力的ではないため、安全に研究することは困難であった。幼児において、覚醒状態で、危険を伴わない、安全な環境で脳研究を可能にしたい。その思いから、金沢大学では 2008 年から国内唯一(世界で 2 台目)の幼児専用脳磁図測定装置(以下幼児用 MEG)を開発し、幼児脳機能測定に挑戦してきた。我々が開発した日本で唯一の装置、幼児用 MEG は、ヘルメット状のセンサーに頭部を入れるだけで簡単に検査が可能である。頭に直接センサーを設置することがないため、幼児でも不愉快にならず、自然な状態で脳活動の記録が可能である。精神的ストレスも少なく、放射線被ばくもなく、幼児に最も非侵襲的に試行できる。MEG は神経の活動そのものを、高い時間分解能と空間分解能で記録可能である点においても他の追従をゆるさない検査方法である。この装置を用いて「自閉症の脳の特徴を可視化する」ことを目指し、就学前の早期の診断の補助となりえることを我々は報告してきた。

2. 研究の目的

ASD は、遺伝子の寄与率が高い(90%との報告もある)こともあり、関連遺伝子が見つかる事が期待され、研究されてきた。金沢大学では(分担研究:横山茂) ショウジョウバエとマウスをもちいた動物実験を繰り返し、オキシトシン分泌に関与する遺伝子多型の一つが自閉症に関連している可能性を示し(Jin et al., 2007 Nature) その結果発病メカニズムの一部を解明しつつある。それらの一連の研究が、現在当大学の ASD の臨床試験にまでつながっている。これからも同様の戦略で、遺伝子研究から、自閉症スペクト

ラム障害の原因と治療方法の解明が進むことが期待されている。一方で、ゲノムの網羅的解読が可能になった現在においても、「自閉症スペクトラム障害」全体を説明するために十分な効果量をもった関連遺伝子がなかなか見つからない現実もある。その原因の一つとして、この疾患がもつ表現型の多様性が、遺伝子研究を効果的に行う上での障壁になっていると考えられる。すなわち、多様な臨床症状の一つ一つに、異なる遺伝子が弱く関連しているために、多様な症状を示す ASD を全体として説明しきれない可能性がある。あるいは、疾患に強く関連する遺伝子があっても、疾患のごく少数例にしか関連していないため、ASD を一まとめにして大規模な調査をすると、高い効果のある遺伝子として見つけ出すのが困難になっている可能性がある。本研究は、ASD の多彩な症状を、主観的な行動評価のみならず、脳機能測定をもちいた生理学的指標を用いて、より客観的に抽出し数値化する。そして、それらの特徴が、ASD に関連する遺伝子多型とどのように関連するかを調べる。

3. 研究の方法

ASD 幼児および定型発達幼児を対象とした横断的調査で、表現型としての社会性評価、中間表現型としての脳機能測定、遺伝子型としての遺伝子多型の評価を実施した。研究対象として、一般公募を行うとともに、金沢大学付属病院神経科精神科あるいは子どものこころ診療科に受診した ASD 患者をリクルートした。診断は DISCO (The Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders), ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule) に基づいて行った。対象者の実父母に本研究の主旨を文書により十分に説明し、文書による同意を得る。金沢大学医学倫理委員会の承認のもと、本人および保護者に研究の内容を文書にて十分に説明した後に、文書にて同意を得た。認知機能の評価は K-ABC (Kaufman Assessment Battery for Children) にて行った。社会性のレベルについては Social responsive scale(SRS)を用いて評価し、被験者の多様性を評価した。脳機能面での多様性については幼児用 MEG 測定にて評価した。遺伝子多型の多様性については、ASD の重症化と脳内ネットワークに影響することが近年明らかにされた遺伝子、すなわち MET(Met Receptor Tyrosine Kinase)遺伝子の多型(Rudie et al. 2012 Neuron)そして、社会性に関係するオキシトシンに関連する遺伝子多型を評価した。具体的な遺伝子解析の方法としては、幼児からストレスなく遺伝子サンプルを抽出するために、頬粘膜を擦過して得た細胞から染色体 DNA を抽出し、特異的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法によって、特定の遺伝子を増幅した。さらにダイレクトシーケンシングを行って塩基配列を決定し、MET 遺

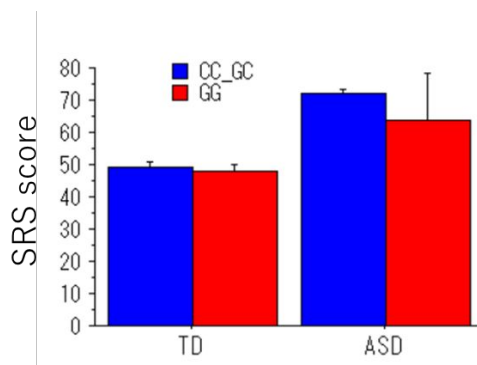
伝子であることを確認し、rs1858830 の一塩基多型を調べ、リスク型の C が含まれているかを調べた。

4. 研究成果

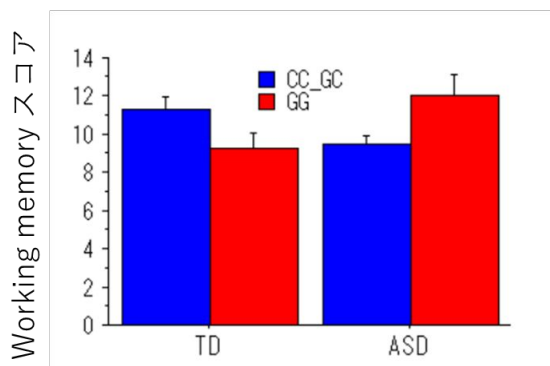
縦断および横断研究の延べ人数として ASD 幼児 (N=71) および定型発達幼児 (N=102) を対象とし、臨床症状、認知機能評価、MEG による脳機能評価、頬粘膜からの遺伝子の採取を実施した。現時点で MET 遺伝子の rs1858830 の一塩基多型については、ASD 幼児 33 名、定型発達幼児で 30 名分の解析が終了している。

以下に遺伝子解析が完了した被験者で横断研究として被験者の重複のない結果を示す。自閉症者において、症状の重症化に関係している rs1858830 の CC と CG タイプを CC CG 群とし、GG 群と比較した。2 元配置分散分析で、独立変数を定型発達 (TD) 群 vs ASD 群、および CC CG 群 vs GG 群の 2 要因にて、SRS トータルスコア、K-ABC における Spatial Working Memory の評価尺度、言語性類推課題の評価尺度、MEG で測定した一次聴覚野における聴覚誘発反応 P1m の潜時 (神経ネットワークの成熟度の指標) をそれぞれ従属変数とし、統計処理した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

下図は、SRS トータルスコアを従属変数にした場合の結果である。ASD 群においてリスク遺伝子である C を持つ群が、より自閉症の症状が重度である傾向は認められたが、主要効果および、交互作用に有意差は認めていない。

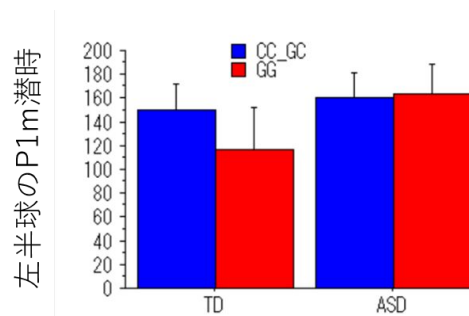


下図は、K-ABC における Spatial Working Memory の評価尺度を従属変数にした場合の結果である。ASD 群においてリスク遺伝子である C を持つ群が、Working Memory の発達が遅れていた。交互作用が有意水準で認められている ($P < 0.05$)。

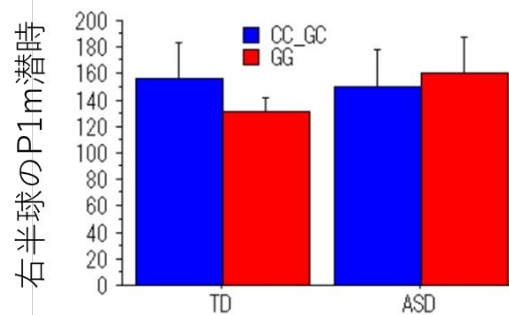


言語性類推課題の評価尺度を従属変数に用いた場合、主要効果および、交互作用に有意差は認めなかった。

下図は、左半球の聴覚誘発反応の P1m の潜時を従属変数にした場合の結果である。ASD 群では遺伝子の影響は認められないが、TD 群においてリスク遺伝子である C を持つ群が、潜時が遅れていた。交互作用が有意水準で認められている ($P < 0.05$)。



下図は、右半球の聴覚誘発反応の P1m の潜時を従属変数にした場合の結果である。左半球と同様の傾向は認めるものの有意水準には達していない。



遺伝子解析がまだ全例で完了していないが、現時点までの評価によると、rs1858830 の C が自閉症者において、Working Memory といった認知機能の低さに影響していることが示された。その一方で、脳のネットワーク構造の成熟を示す P1m 潜時については、定型発達において C 遺伝子が影響している結果が得られた。今後はサンプルサイズを増加させ、統計的な検出力をあげて検討していく予定である。また、脳内ネットワークについて、Coherence 解析を用いた生理学的指数や、聴覚反応の Equivalent current dipole 法を用いた反応強度および潜時による脳の成熟度の指数と遺伝子多型との関係については、現在も解析中である。

増幅した遺伝子を用いた、オキシトシンに関連する遺伝子多型については現在も解析の準備を進めている。

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22件 すべて査読あり)

- 1, Kikuchi M, Yoshimura Y, (4人中1番目 Kikuchi M) Magnetoencephalography in the study of children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2016 Feb;70(2):74-88.
- 2, Remijn GB, Kikuchi M, Yoshimura Y, (9人中2番目 Kikuchi M) A NIRS study on cortical hemodynamic responses to normal and whispered speech in 3- to 7-year-old children. *Journal of Speech, Language, and Hearing Research*, 2016
- 3, Hasegawa C, Ikeda T, Yoshimura Y, Kikuchi M, (11人中2番目 Ikeda T) Mu rhythm suppression reflects mother-child face-to-face interactions: a pilot study with simultaneous MEG recording. *Sci. Rep*. 2016, 6, 34977
- 4, Takahashi T, Yoshimura Y, Kikuchi M, (8人中8番目 Kikuchi M) Enhanced brain signal variability in children with autism spectrum disorder during early childhood. *Hum Brain Mapp*. 2016 Mar;37(3):1038-50.
- 5, Tanaka S, Kikuchi M, Yoshimura Y, (8人中4番目 Kikuchi M) Characteristics of Communication among Japanese Children with Autism Spectrum Disorder: A Cluster Analysis Using the Children's Communication Checklist-2 Clinical Linguistics & Phonetics 2016 ;31(3):234-249.
- 6, Takesaki N, Kikuchi M, Yoshimura Y, (10人中2番目 Kikuchi M) The Contribution of Increased Gamma Band Connectivity to Visual Non-Verbal Reasoning in Autistic Children: A MEG Study. *PLoS One*. 2016 Sep 15;11(9):e0163133.
- 7, Yoshimura Y, Kikuchi M, (10人中1番目 Yoshimura Y) Synchrony of auditory brain responses predicts behavioral ability to keep still in children with autism spectrum disorder: Auditory-evoked response in children with autism spectrum disorder. *Neuroimage Clin*. 2016 Jul 22;12:300-5.
- 8, Kurita T, Kikuchi M, Yoshimura Y, Ikeda T (13人中2番目 Kikuchi M) Atypical Bilateral Brain Synchronization in the Early Stage of Human Voice Auditory Processing in Young Children with Autism. *PLoS One*. 2016 Apr 13;11(4):e0153077.
- 9, Yoshimura Y, Kikuchi M, (11人中1番目 Yoshimura Y) Atypical development of the central auditory system in young children with Autism spectrum disorder. *Autism Res*. 2016 Jan 25.
- 10, Mahmuda NA, Yokoyama S, Higashida H, (10人中2番目 Yokoyama S). A Study of Single Nucleotide Polymorphisms of the SLC19A1/RFC1 Gene in Subjects with Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 2016 May 19;17(5). pii: E772.
- 11, Kikuchi M, Yoshimura Y, (10人中1番目 Kikuchi M) Reduced long-range functional connectivity in young children with autism spectrum disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2015;10:248-254.
- 12, Hasegawa C, Kikuchi M, Yoshimura Y, (10人中2番目 Kikuchi M) Changes in autistic trait indicators in parents and their children with ASD: A preliminary longitudinal study. *Psychiatry Res*. 2015 Jun 11.
- 13, Okazaki R, Kikuchi M, (8人中6番目 Kikuchi M) Changes in EEG complexity with electroconvulsive therapy in a patient with autism spectrum disorders: a multiscale entropy approach. *Front Hum Neurosci*. 2015 Feb 26;9:106.
- 14, Akther S, Yokoyama S, (13人中9番目 Yokoyama S) Paternal Retrieval Behavior Regulated by Brain Estrogen Synthetase (Aromatase) in Mouse Sires that Engage in Communicative Interactions with Pairs. *Front Neurosci*. 2015 Dec 15;9:450.
- 15, Yokoyama S (7人中1番目 Yokoyama S) Association Study between the CD157/BST1 Gene and Autism Spectrum Disorders in a Japanese Population. *Brain Sci*. 2015 May 20;5(2):188-200.
- 16, Yoshimura Y, Kikuchi M, (13人中1番目 Yoshimura Y). A longitudinal study of auditory evoked field and language development in young children. *Neuroimage*. 2014 Jul 24;101C:440-447.
- 17, Hiraishi H, Kikuchi M, (13人中2番目 Kikuchi M) Unusual developmental pattern of brain lateralization in young boys with autism spectrum disorder: power analysis with a child-sized MEG. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2014 Nov 30.
- 18, Hasegawa C, Kikuchi M, (10人中2番目 Kikuchi M). The broader autism phenotype in mothers predicts social responsiveness in young children with autism spectrum disorders. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2014 Jun 6.
- 19, Remijn GB, Kikuchi M, Minabe Y, (10人中2番目 Kikuchi M) Somatosensory evoked field in response to visuotactile stimulation in 3- to 4-year-old children. *Front Hum Neurosci*. 2014 Mar 24;8:170.
- 20, Hirata M, Kikuchi M, Yoshimura Y, (7人中2番目 Ikeda T) Hyperscanning MEG for understanding mother-child cerebral interactions. *Front Hum Neurosci*. 2014 Mar 4;8:118.
- 21, Duan F, Yoshimura Y, Kikuchi M, (6人中3番目 Yoshimura Y) Relationship between brain network pattern and cognitive performance of children revealed by MEG signals during free viewing of video. *Brain Cogn*. 2014 Feb 10;86C:10-16.
- 22, Lopatina O, Yokoyama S, Higashida H, (23人中14番目 Yokoyama S) Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Front Behav Neurosci*. 2014 Apr 22;8:133.

[学会発表](計11件)

- 1, Mitsuru Kikuchi, Yoshio Minabe. Atypical development of the auditory system in children with autism spectrum disorder. The 20th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2016) 場所: Seoul (Korea) 日時: 2016年10月1-6日
- 2, Mitsuru Kikuchi Atypical brain activity in children with autism spectrum disorder. The 3rd International Symposium on

- Cognitive Neuroscience Robotics: Toward Constructive Developmental Science 場所: Osaka (Japan) 日時: 2016年12月12日
- 3, 菊知 充 三邊義雄, 自閉症幼児期の MEG 研究 The 3rd International Symposium on Cognitive Neuroscience Robotics: Toward Constructive Developmental Science 場所: Osaka (Japan) 日時: 2016年12月12日
- 4, 菊知充, Atypical development of the auditory system in children with autism: custom child-sized MEG studies. 第31回日本生体磁気学会大会 場所: 金沢市文化ホール(金沢市) 日時: 2016年6月10日
- 5, Mitsuru Kikuchi, Laurent Mottron, Yuko Yoshimura, Brain connectivity during a high-level visual perceptual task in young ASD children: a MEG investigation. The International Meeting for Autism Research. Salt Lake City, Utah, USA. 2015,5.16
- 6, Yuko Yoshimura, Laurent Mottron, Mitsuru Kikuchi Mental rotation: a high-level perceptual strength of young ASD children. The International Meeting for Autism Research. Salt Lake City, Utah, USA. 2015,5.14
- 7, 菊知充 自閉症スペクトラム障害児の MEG 研究 第 57 回日本小児神経学会学術集会 場所: 帝国ホテル大阪(大阪) 日時: 2015年5月29日
- 8, 菊知 充 幼児の長所を見える化し、弱点克服をモニターする 第5回CiNetシンポジウム 第3回大阪大学 COI シンポジウム 場所: 東京国際フォーラムホール(東京) 日時: 2015年6月17日
- 9, 菊知 充 三邊 義雄 Atypical brain auditory processing in young children with autism spectrum disorder. 第58回神経化学会 場所: 大宮ソニックシティ(さいたま市) 日時: 2015年9月11-13日
- 10, 菊知 充 広汎性発達障害の早期診断のための診断システム開発 第45回公益財団法人アステラス病態代謝研究会 場所: 日本工業倶楽部(東京) 日時: 2014年10月18日
- 11, 菊知 充 自閉症スペクトラム障害の認知特性と脳機能の特徴 第14回、「精神疾患と認知機能研究会」 場所: 海運クラブ(東京) 日時: 2014年11月8日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

<http://bambiplan.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

<https://kodomokokoro.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊知 充 (Kikuchi Mitsuru)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号: 00377384

(2) 研究分担者

横山 茂 (Yokoyama Shigeru)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号: 00210633

真田 茂 (Sanada Shigeru)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号: 50020029

吉村優子 (Yuko Yoshimura)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号: 70597070

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: なし

(4) 研究協力者

なし