

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19200030
 研究課題名（和文） 社会認識に関わる分子の神経化学的解析による自閉症の解明と治療
 研究課題名（英文） Neurochemical studies on molecules involved in social recognition and research on genes and therapy in autism.
 研究代表者
 東田 陽博（HIGASHIDA HARUHIRO）
 金沢大学・医学系・教授
 研究者番号：30093066

研究成果の概要（和文）：オキシトシンは信頼を基礎とする社会性行動に影響を与える。オキシトシンの脳内分泌を制御する CD38 遺伝子の一塩基多型(SNP)を日本人およびアメリカ人の広汎性発達障害者や健常人で調査した。2 箇所の SNP が自閉症の危険因子である可能性を見いだした。また、一例で、オキシトシンの投与により一部の症状の改善が見られた。CD38 は良い対人関係を構築するのに必須で、一方その不全が社会性障害の原因ではないかと思われる。

研究成果の概要（英文）：The neurobiological basis of autism spectrum disorder (ASD) remains poorly understood. Given the role of CD38 in social recognition through oxytocin (OT) release, we hypothesized that CD38 may play a role in the etiology of ASD. Here, we first examined the immunohistochemical expression of CD38 in the hypothalamus of post-mortem brains of non-ASD subjects and found that CD38 was colocalized with OT in secretory neurons. In studies of the association between CD38 and autism, we analyzed 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and mutations of CD38 by re-sequencing DNAs mainly from a case-control study in Japan, and Caucasian cases mainly recruited to the Autism Genetic Resource Exchange (AGRE). The SNPs of CD38, rs6449197 ($p < 0.040$) and rs3796863 ($p < 0.005$) showed significant associations with a subset of ASD (IQ > 70; designated as high-functioning autism (HFA)) in the U.S. 104 AGRE family trios, but not with Japanese 188 HFA subjects. A mutation that caused tryptophan to replace arginine at amino acid residue 140 (R140W; (rs1800561, 4693C>T)) was found in 0.6-4.6% of the Japanese population and was associated with ASD in the smaller case-control study. The SNP was clustered in pedigrees in which the fathers and brothers of T-allele-carrier probands had ASD or ASD traits. In this cohort OT plasma levels were lower in subjects with the T allele than in those without. One proband with the T allele who was taking nasal OT spray showed relief of symptoms. The two variant CD38 polymorphisms tested may be of interest with regard of the pathophysiology of ASD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2008 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
年度			
年度			
総計	36,300,000	10,890,000	47,190,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：脳・神経、シグナル伝達、ADP リボシルシクラーゼ、CD38、自閉症

1. 研究開始当初の背景

近年子どものこころの危機が叫ばれ、若年者の殺人などの触法行為が社会問題となっており、その対応が社会的急務となっている。社会認識やその欠如により生じる発達障害（自閉症スペクトラム）を神経化学的に研究する事は、従来から大変難しいと考えられてきた。そのため、この領域の基礎的研究を手がける人は少ない。一方、最近、以下の事が判明し、この領域を研究できる希望が生まれ、開拓する必要が生じてきた。即ち、9ヶのアミノ酸からなるオキシトシンは、視床下部・視索上核・室傍核で合成され、神経軸索内を流れ下垂体に貯えられ、Ca 依存的に血中に放出され、妊娠末期の陣痛誘発、分娩後の射乳を生じる下垂体後葉ホルモンである。一方、オキシトシンとその受容体は、脳や男性にも存在することから、神経伝達物質としても働くことが考えられていた。2000年に Insel らがオキシトシン遺伝子をノックアウトしたオスマウスのペア（対）メスマウスへの嗅覚刺激を中心とする調査行動がペアリングの回数を増すごとに減少せず、ペアである留意の（社会性の）記憶が生じないか喪失しているという結果から、オキシトシンが（向）社会性行動に関与していると発表した（Nature Genetics）。2005年、Kosfeld らは、人間社会の多くの行動活動の基礎が人と人との間の信頼の上に成り立っているが、その生物学的な側面がオキシトシンに依っているという事を、スイス工科大学学生による「信託ゲーム」で示し、ヒトでもオキシトシンが生殖に関わるホルモン作用以外に重要な役割をしている事が示された。一方、ボストン大学等の研究者は自閉症児の血中オキシトシンを測定し、自閉症児の血中オキシトシン濃度が低いという結果を見出し出している。また、オキシトシンを注射した自閉症とアスペルガー症の患者では、プラセボ投与群より、常同行動が改善したという報告もある（Neuropharmacol, 28, 2003）。このように、動物からヒトに到るまで、オキシトシンと自閉症の社会行動やこだわり（反復）行動に密な関係がある事が示唆されるようになった。

そこで我々は、このオキシトシンと、発達障害（自閉症）児のオキシトシン血中濃度との関係について、深く考察し（もちろんオキシトシン合成や受容体の不全という遺伝的

原因も考えられるが）、オキシトシンの血中や脳内への分泌障害が、自閉症の一つの原因ではないかという仮説を立てた。その仮説を証明しうる文献の一つとしてオキシトシン分泌神経終末には脱分極を感知するリアノジン受容体が存在する事を Walsh らが報告している事を知った。

また一方、我々はこの10年来、科研費基盤Bのサポートを得て、Ca シグナル系の一つとしてサイクリック ADP リボース (cADPR) とその合成酵素である ADP リボシルシクラーゼ / CD38 を研究し、脳機能との関係を明らかにしてきた。そして、最近、CD38/ADP リボシルシクラーゼ欠損ノックアウトネズミを東北大学岡本教授から得て、線条体でのドーパミン放出に関して一連の研究をしてきたが、野生株ネズミとの差を見い出せないでいた為、ドーパミンのようなアミン伝達物質に関しては cADPR/CD38 は無関係であると結論していた。

ところで、このノックアウトネズミのミューテーションフェノタイプが長らく不明であったが、昨年、この CD38 ノックアウトネズミオスを使いメスペアとの調査時間を測定したところ、オキシトシンノックアウトネズミで示された社会性の留意の喪失（ペアの記憶喪失）と同じ行動をとる事を見出した。更に血中のオキシトシン濃度も低い事を見出した。この我々の予備的実験結果（Nature, 2007）を基に、オキシトシン分泌に関わる CD38/ADP リボシルシクラーゼ分子の機能障害と自閉症の病因との因果関係を探る研究が考えられるようになった。

2. 研究の目的

この1、2年でオキシトシンと社会行動の関係が益々注目されるようになり、「オキシトシンは信頼の生物学的基盤」とまで考えられるようになり、世界中のトピックスとなった。オキシトシン分泌には、トランスミッターの分泌とは異なる独特の（脱分極によらない分泌という生理学のテーゼに反するような）メカニズムがあり、我々はその分子基盤の一端を CD38/cADPR という分子の関与として解明したと言える（Nature, 2007）。そこで、今回オキシトシン分泌に関わる CD38 の SNP 解析とそれら分子の変異体の細胞及びマウ

スレレベルの神経化学的研究を行い、自閉症がオキシトシン分泌の Ca 信号系破綻で生じるという自閉症成立の新概念を打ち立てる事を目的に、以下の実験を行うことにした。

3. 研究の方法

研究計画の中心は CD38 の遺伝子変異と一塩基多型 (SNP) 遺伝子解析である。

(1) 金沢大学病院子どもこころの診療科に受診する自閉症者約 100 名、石川県立明和養護学校の中の 30 名の自閉症児、金沢アスペの会の約 40 名の中から、CD38 の SNP 検査に対して本人あるいは両親が同意書に署名し・同意を得た自閉症者を対象とした。

(2) 健常人、健常発達コントロール群は、国立病院機構七尾病院勤務者の約 100 名、循環器内科教室に保管されている 137 名および小児科の自閉症以外の子供約 100 名を対象とした。(これらを対象者とし本研究を行うことは倫理委員会で承認されている。血液採取等を行う医師とは共同研究で合意している。)

(3) 2 時間は少なくとも食事をしていない状態で、大学病院に受診してもらい、10 時から 12 時、15 時から 18 時の間に 6ml の末梢血をへパリン入採血管に採血した。

(4) 末梢血の採取が不可能な自閉症患者においては、爪、頬の粘膜細胞を提出してもらった。

(5) 4°C、2600 g の遠心を 15 分以内に行う。血球成分と血漿に分離した。

(6) 両者を -80°C に凍結し保存した。

(7) ヒトの CD38 は第 4 染色体上 (4P15) にある事が報告されている (Cytogenet. Cell Genet. 69, 1995) が、カリフォルニア大学サンタクルーズ校のヒトゲノム

(<http://www.genome.ucsc.edu>) の 2006 年 3 月版の CD38 のゲノム構造に基づいて考えた。

(8) 国際 HapMap プロジェクト

(<http://www.hapmap.org>) と米国国立バイオインフォマテックスセンター (NCBI) の一塩基多型 (SNP) の情報から、ハプロビューソフト

(<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) V4.0 ベータ 14 を用いて、アリル頻度 (MAF > 0.057) を計算し、約 200 ケの SNP の中から約 10 ケのイントロン部の SNP を抽出した (図)。

(9) エクソン部のバリエーションについては再塩基配列決定により検索する。エクソン部の SNP は全シーケンスから決定した。

(10) フェノール/クロロホルム法 (インビトロゲン Easy-DNA キット) で、末梢血サンプルよりゲノム DNA を抽出した。

(11) CD38 のエクソンと必要なイントロン部

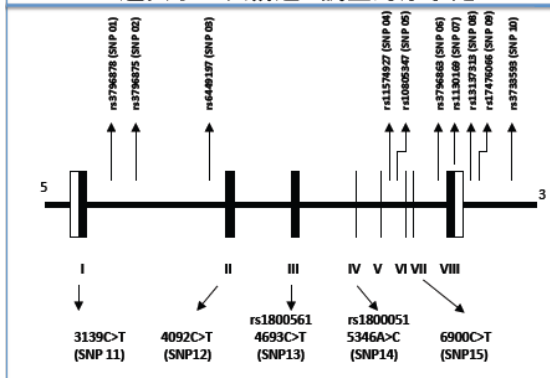
を PCR 法で TaqPCR コアキット (QIAGEN) で増幅した。

(12) リアルタイム PCR システム (AB インストルメント社、7900HT、購入予定) により SNP ジェノタイプイング シーケンスディテクションシステム (SDS) V. 20 を用いて行った。

(13) Assay-on-Demand SNP ゲノム分析産物 (Applied Biosystem) を使用し、我々の論文 (Anita et al., Am. J. Med. Genetics, 2008) で記述したように、TaqMan アッセイ法で SNP を点数化した。

(14) SNP の頻度を健常群と自閉症群で比較し、相関を見出し自閉に特異的な SNP を同定した。

ヒトCD38遺伝子一次構造と調査対象予定のSNPs



(15) CD38 の SNP に自閉症特異的 SNP が見出したので、文部科学省教育連携事業ですでに協力関係にある大阪大学子どもこころの分子統御機構研究センター、浜松医科大学子どもこころの発達研究センターに確保している自閉症者、健常者に解析を拡大し、日本人自閉症者約 500 人の症例・健常者 (ケース コントロール) コホート研究を完成した。

(16) 続いて、アメリカカリフォルニア大学ロサンゼルス校自閉症ライブラリー Autism Genetic Resource Exchange (AGRE・<http://www.agre.org>) での解析に発展させた。CD38SNP の研究を AGRE のトリオサンプル (発端者+両親) で行う。AGRE のサンプル約 300 に付いている IQ 値を指標に、低 IQ 自閉症と高 IQ (高機能) 自閉症群での差を見出した。高機能自閉症に特異的 SNP を検査した。

4. 研究成果

CD38 遺伝子の一塩基多型 (SNP) を 15ヶ所で、自閉症群 330 人健常群 732 人で調べた。SNP6 (rs3796863) がアメリカ人の高機能性自閉症者と強い相関があり、また SNP13 (rs1800561) が日本人の自閉症者と弱い相関がある事を見出した。さらに、SNP13 を

持ち、血中オキシトシン濃度が低い事を確認した 23 歳男子の自閉症者にオキシトシンを投与し、自閉症症状の改善される事を観察した。

本実験により、Ca シグナル研究の延長線上で、セカンドメッセンジャーとして働くサイクリック ADP リボース(cADPR)がオキシトシンの脳内への分泌に重要である事を見出し、自閉症の中核症状である社会性認識障害に関係がある事がわかった。今回の結果は、発達障害(自閉症)児ではオキシトシン血中濃度が低いという報告を考え合わせ、オキシトシンの cADPR/CD38 依存的脳内への分泌障害が、自閉症の一つの原因ではないかという仮説が益々本当らしく思えるようになった。

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 14 件)

1. Munesue T, Yokoyama S, Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Hayashi K, Asaka T, Liu HX, Jin D, Koizumi K, Islam MS, Huang JJ, Ma WJ, Kim UH, Kim SJ, Park K, Kim D, Kikuchi M, Ono Y, Nakatani H, Suda S, Miyachi T, Hirai H, Salmina A, Pichugina YA, Soumarokov AA, Takei N, Mori N, Tsujii M, Sugiyama T, Yagi K, Yamagishi M, Sasaki T, Yamasue H, Kato N, Hashimoto R, Taniike M, Hayashi Y, Hamada J, Suzuki S, Ooi A, Noda M, Kamiyama Y, Kido MA, Lopatina O, Hashii M, Amina S, Malavasi F, Huang EJ, Zhang J, Shimizu N, Yoshikawa T, Matsushima A, Minabe Y, Higashida H, Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls, *Neurosci. Res.*, 67(2010),181-191, 査読有
2. Amina S, Hashii M, Ma WJ, Yokoyama S, Lopatina O, Liu HX, Islam MS, Higashida H, Intracellular Calcium Elevation Induced by Extracellular Application of Cyclic-ADP-Ribose or Oxytocin is Temperature-Sensitive in Rodent NG108-15 Neuronal Cells with or without Exogenous Expression of Human Oxytocin Receptors, *J Neuroendocrinol*, 22(2010),460-466, 査読有
3. Islam MS, Tsuji T, Higashida C, Takahashi M, Higashida H, Koizumi K, Expression of a Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor, Ect2, in the Developing Mouse Pituitary, *J Neuroendocrinol*, 22(2010),477-482, 査読有
4. Salmina AB, Lopatina O, Ekimova MV, Mikhutkina SV, Higashida H, CD38/cADPR-SYSTEM: A NEW PLAYER FOR

OXYTOCIN SECRETION AND REGULATION OF SOCIAL BEHAVIOUR, *J Neuroendocrinol*, 22(2010),380-392, 査読有

5. Higashida H, Lopatina O, Yoshihara T, Pichugina YA, Soumarokov AA, Munesue T, Minabe Y, Kikuchi M, Ono Y, Korshunova N, Salmina AB., Oxytocin Signal and Social Behaviour: Comparison among Adult and Infant Oxytocin, Oxytocin Receptor and CD38 Gene Knockout Mice, *J Neuroendocrinol*, 22(2010),373-379, 査読有

6. Lopatina O, Liu HX, Amina S, Hashii M, Higashida H., Oxytocin-induced elevation of ADP-ribosyl cyclase activity, cyclic ADP-ribose or Ca(2+) concentrations is involved in autoregulation of oxytocin secretion in the hypothalamus and posterior pituitary in male mice, *Neuropharmacology*, 58(2009),50-55, 査読有

7. Liu HX, Lopatina O, Higashida C, Tsuji T, Kato I, Takasawa S, Okamoto H, Yokoyama S, Higashida H., Locomotor activity, ultrasonic vocalization and oxytocin levels in infant CD38 knockout mice, *Neurosci Lett.*, 448(2008),67-70, 査読有

8. Anitha A, Nakamura K, Yamada K, Suda S, Thanseem I, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Miyachi T, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Kawai M, Sekine Y, Tsuchiya K, Sugihara G, Ouchi Y, Sugiyama T, Koizumi K, Higashida H, Takei N, Yoshikawa T, Mori N., Genetic analyses of roundabout (ROBO) axon guidance receptors in autism, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(2008), 1019-1027, 査読有

9. Ohtsuji M, Yagi K, Shintaku-Kubota M, Kojima-Koba Y, Ito N, Sugihara M, Yamaaki N, Chujo D, Nohara A, Takeda Y, Kobayashi J, Yamagishi M, Higashida H., Decreased ADP-ribosyl cyclase activity in peripheral blood mononuclear cells from diabetic patients with nephropathy, *Exp Diabetes Res*,

Doi:10.1155/2008/2008/897508. 査読有

10. Higashida H, Salmina AB, Olovyanikova RY, Hashii M, Yokoyama S, Koizumi K, Jin D, Liu HX, Lopatina O, Amina S, Islam MS, Huang JJ, Noda M., Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system. *Neurochem Int.*, 51 (2007),192-199, 査読有

11. Koizumi K, Higashida H, Yoo S, Islam MS, Ivanov AI, Guo V, Pozzi P, Yu SH, Rovescalli AC, Tang D, Nirenberg M., RNA interference screen

to identify genes required for Drosophila embryonic nervous system development, Proc Natl Acad Sci U S A., 104 (2007), 5626-5631, 査読有

12. Jin D, Liu HX, Hirai H, Torashima T, Nagai T, Lopatina O, Shnyder NA, Yamada K, Noda M, Seike T, Fujita K, Takasawa S, Yokoyama S, Koizumi K, Shiraishi Y, Tanaka S, Hashii M, Yoshihara T, Higashida K, Islam MS, Yamada N, Hayashi K, Noguchi N, Kato I, Okamoto H, Matsushima A, Salmina A, Munesue T, Shimizu N, Mochida S, Asano M, Higashida H., CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion, Nature, 446 (2007), 41-45, 査読有

13. Higashida H, Bowden SE, Yokoyama S, Salmina A, Hashii M, Hoshi N, Zhang JS, Knijnik R, Noda M, Zhong ZG, Jin D, Higashida K, Takeda H, Akita T, Kuba K, Yamagishi S, Shimizu N, Takasawa S, Okamoto H, Robbins J., Overexpression of human CD38/ADP-ribosyl cyclase enhances acetylcholine-induced Ca(2+) signalling in rodent NG108-15 neuroblastoma cells, Neurosci Res., 57 (2007), 339-346, 査読有

14. Kuraishi T, Manaka J, Kono M, Ishii H, Yamamoto N, Koizumi K, Shiratsuchi A, Lee BL, Higashida H, Nakanishi Y., Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila, Exp Cell Res., 313 (2007), 500-510, 査読有

[学会発表] (計7件)

1. 東田 陽博, 仔どもから大人までのマウスの社会認識行動と血清オキシトシン濃度は視床下部の CD38/ADP-リボース環状化酵素により制御される, 第32回日本神経学会大会, 2009年9月16日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

2. 東田 陽博, CD38は視床下部のオキシトシン分泌を介して、社会認識行動に関与する, 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月16日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

3. 東田 陽博, Social and Autistic Behavior Regulated by Oxytocin Release in a CD38, Cyclic ADP-ribose and Calcium-Dependent Fashion, Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology, 2008年10月29日, ホテルソウル教育文化会館 (韓国)

4. 東田 陽博, Social recognition, Oxytocin, and CD38, World Congress on Psychiatric Genetics, 2008年10月13日, 大阪国際

会議場 (大阪府)

5. 東田 陽博, CD38 and social brain: Autistic behavior regulated by oxytocin release in a cyclic ADP-ribose-dependent fashion, NAD2008, 2008年9月14日-17日, Elsa-Brandstrom-Haus, Hamburg-ablankenese, (ドイツ)

6. 東田 陽博, CD38:オキシトシン遊離調節による社会認識行動、社会認識、オキシトシンとCD38, 第51回日本神経化学学会大会, 2008年9月11日、12日, 富山国際会議場 (富山県)

7. 東田 陽博, CD38-Dependent Oxytocin Release on Social and Parental Behavior, PARENTAL BRAIN CONFERENCE, 2007年6月8日, Back Bay Hilton Hotel-Boston, Massachusetts (アメリカ)

[図書] (計1件)

1. Higashida H, Jin D, Liu H, Lopatina O, Yokoyama S, Koizumi K, Hashii M, Islam MS, Hayashi K, Munesue T., Academic Press, San Diego, Neurobiology of the Parental Brain, Bridges, R. S. ed., Social memory, maternal care, and oxytocin secretion, but not vasopressin release, require CD38 in mice. In: 2008年, 361頁~375頁

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: CD38による自閉症の診断と治療
発明者: 東田 陽博
権利者: 金沢大学 TLO
種類: 特許
番号: PCT/JP2007/072603
出願年月日: 2007年11月15日
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等
医学系研究科脳細胞遺伝子学研究分野
<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med37/>

21世紀COE革新脳科学
<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med63/index.html>

子どものこころの発達研究センター
<http://kodomokokoro.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

連合大学院小児発達学研究所
<http://rengou.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東田 陽博 (HIGASHIDA HARUHIRO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30093066

(2) 研究分担者

横山 茂 (YOKOYAMA SHIGERU)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00210633

橋井 美奈子 (HASHII MINAKO)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：10272957

小泉 恵太 (KOIZUMI KEITA)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：70377406

棟居 俊夫 (MUNESUE TOSHIO)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：50293353

菊知 充 (KIKUCHI MITURU)

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：00377384

三邊 義雄 (MINABE YOSHIO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60181947