

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月14日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011年度～平成2012年度

課題番号：23791313

研究課題名（和文）ミラーニューロン障害仮説に基づく自閉症スペクトラム障害の早期診断
マーカーの探索.研究課題名（英文）Research of diagnostic marker of autism spectrum disorders based on
the mirror neuron failure hypothesis.

研究代表者

遠藤 太郎 (ENDO TARO)

新潟大学 医歯学総合病院・講師

研究者番号：70515759

研究成果の概要（和文）：

本研究は、近赤外線分光鏡（NIRS）を用いて自閉症スペクトラム障害（ASD）者の模倣中のミラーニューロン系（MNS）の活動を非侵襲的に測定し、定型発達者や ASD サブタイプ間での差異を明らかにすると同時に、ASD の脳神経発達に關与する遺伝子多型と MNS の障害との關係を解明することで、ASD の超早期診断を可能にする生物学的指標を解明することを目的に行われた。模倣課題を用いた NIRS 調査では、ASD 者は定型発達者でみられた左前頭葉優位の MNS 活動が消失していた。さらに、ASD の表現型への關与が想定される遺伝子多型解析では、オキシトシン受容体遺伝子多型が ASD の模倣の障害および MR スペクトロスコピーで想定した右内側側頭葉の N-アセチルアスパラギン酸/クレアチン比（神経細胞の成熟度の指標）の低下に、セロトニン 1A 受容体遺伝子多型が常同反復行動にそれぞれ關与することが明らかとなった。疾患との關連解析では、トリプトファンヒドロキシラーゼ 2 遺伝子におけるミスセンス変異を同定した。これらの遺伝子と NIRS で測定した MNS 活動との關連も解析したが、有意な結果は得られなかった。本研究の結果より、幼小児期に ASD 者と定型発達者の間で違いが顕在化する MNS の障害を NIRS にて検出することが出来る可能性が示唆された。また、疾患や ASD の表現型に關連する遺伝子多型のいくつかを同定することができた。これらの画像診断、遺伝子診断を組み合わせが、ASD の超早期診断を可能にする生物学的指標となりうる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to elucidate the biological markers that allow very early diagnosis of ASD based on the MNS failure hypothesis. We measured the MNS activity non-invasively using the NIRS and investigated the relationship between the intermediate phenotypes and genetic polymorphisms involved in brain development of ASD. In the NIRS study using the imitation task, ASD group disappeared the MNS activity in the left frontal lobe advantage. The gene analysis, the polymorphism of oxytocin receptor gene is related to a decrease in N-acetylaspartate/creatine ratio of the right medial temporal lobe and the failure of imitation of ASD, and the polymorphism of 5-HT 1A receptor gene is associated with a stereotyped repetitive behavior revealed. In association studies, we identified a missense mutation in the gene TPH2. The failure of the MNS in ASD detected by NIRS, to be useful in the early diagnosis of ASD was suggested. Further, we could identify some of the genetic polymorphism associated with intermediate phenotypes ASD or disease. Combination of these diagnostic imaging and genetic, may be a biological marker that allows for very early diagnosis of ASD.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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、ミラーニューロン、近赤外線スペクトロスコピー (NIRS)、オキシトシン受容体遺伝子、セロトニン 1A 遺伝子、受容体 TPH2 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害やアスペルガー障害に代表される自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorder : 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。我々は先行研究で、内側側頭葉の神経発達障害が ASD の重症度に関与していること (Endo et al., 2007) や、視床の体積が定型発達者に比し減少していること (Tamura et al., 2010) など、ASD の脳内生化学代謝、脳形態異常に関するいくつかの生物学的基盤を見いだしてきた。しかしながら、未だ ASD の真の病因は明らかとなっておらず、また、これらの先行研究は主に思春期・青年期を研究対象者としていたため、ASD の早期診断には活用できないという問題があった。

ASD では、他の中核症状が顕在化してくる以前の発達早期より模倣や共感の障害を認める (Naber et al., 2007) ことが認知心理学的研究により明らかとなっており、この ASD の模倣・共感の障害には、下前頭回を中心としたミラーニューロン系 (Mirror Neuron System : MNS) の障害が関与していること報告されている (Dapretto et al., 2006)。一方、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り、様々な遺伝子変異が ASD の疾患感受性遺伝子として注目されている。我々は、先行研究にて ASD 者の前頭葉の神経発達障害にセロトニン・トランスporter 遺伝子の多型が関与することを明らかにした (Endo et al., 2010)。またこの多型は、ASD の中間表現型としての臨床症状プロフィールに影響を与えていることが報告されている (Brune et al., 2006)。このような ASD 者の前頭葉発達や臨床症状などの中間表現型に関与する遺伝子多型は、同じく前頭葉に基盤を持つ MNS にも影響を与えている可能性は非常に高いと推測される。

2. 研究の目的

我々は、『ASD 児では MNS の障害を持ち、その障害は定型発達者と区別しうる診断マーカーとなる』という仮説を立てた。この仮説を立証するため、対面式に様々な課題が提示

でき、かつ被験者が実際に模倣行動を行っている際の脳活動を非侵襲的に解析することの出来る近赤外線スペクトロスコピー (Near Infrared Spectroscopy : NIRS) を用いて、発達早期の ASD 者を対象として、MNS 課題における前頭葉活動を測定し、定型発達者と比較することにより、ASD 児の MNS の障害の詳細を明らかにすることを目的として本研究を立案した。さらに本研究では、前頭葉の発達に影響するセロトニン関連遺伝子

(5-HTTLPR, 5-HTR1A, 5-HTR2A, TPH2 遺伝子) や共感性に影響するオキシトシン受容体遺伝子 (OXTR 遺伝子) 多型と MNS 課題中の脳活動や臨床症状の関連も明らかにすることで、ASD の疾患感受性遺伝子とその中間表現型との関係を解明することも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) MNS 研究

対象者は全て右利きの ASD 児 20 名 (10.6 ± 3.8 歳) と年齢、性別、IQ をマッチさせた正常対照群 20 名 (8.8 ± 2.1 歳) である。ASD の診断は米国精神医学会の診断基準である DSM-IV-TR における広汎性発達障害の診断基準に基づいて行い、IQ70 以上かつ他の精神疾患の既往のない患児のみを対象とした。被験者に対して、NIRS (浜松ホトニクス社の近赤外線酸素モニター装置 ; NIRO200) を装着し、モニター画面に映された手の模倣課題を与え、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) の変化量の定量を行った。手の模倣課題については過去の MNS 研究において用いられた、手の鏡像模倣 (mirror-image imitation (MI)) および解剖学的模倣 (anatomical imitation (AI)) を 5 秒の動作を一回として 12 回の計 60 秒間行い、左右 PFC における O2Hb および HHb の変化量 [Δ O2Hb]AI、[Δ O2Hb]MI、[Δ HHb]AI、[Δ HHb]MI を、0.5 秒毎に経時的に測定し、[Δ O2Hb]AI-[Δ O2Hb]MI、[Δ HHb]AI-[Δ HHb]MI について、ASD および正常群との比較を行った。尚、NIRS の装着部位は臨床脳波の標準的電極装着法である 10-20 法に従い、左は Fp1-F7、右は Fp2-F8 に相当する位置と

した。統計解析には被検者内因子を半球(左、右)、被検者間因子を診断(ASD、正常群)として2元配置反復測定分散分析を行い、有意な相互作用が認められた場合は、事後解析として、2標本t-検定および対応のあるt-検定を用いて診断および半球の単純主効果を評価した。また各課題における手の動作の正答数の測定を行い、正答数とASD群および正常群における左右PFCの $[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{AI}}-[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{MI}}$ 、 $[\Delta \text{HHb}]_{\text{AI}}-[\Delta \text{HHb}]_{\text{MI}}$ との相関について、ピアソン相関係数を用いて評価を行った。

(2) 分子遺伝研究

ASD群150人(男性119人、女性31人、平均年齢 15.3 ± 7.2 歳)、健常対照群620人(男性317人、女性303人、平均年齢 38.2 ± 10.6 歳)を対象に、セロトニン合成に影響するTPH2遺伝子Tの全11エクソン領域を直接塩基配列決定法によりリシーケンスし、検出された2個のミスセンス変異(S41YとR225Q)、頻度の高い多型を代表するようHapMapデータベースを用いて選択された16個のタグ塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)、ASDとの関連が報告されているがHapMapデータベースに登録されていないrs4341581(Coon et al., 2005)、計19個のSNPをTaqMan法によりタイピングし、症例と対照のアレル頻度はカイ二乗検定もしくはフィッシャーの正確確率検定により比較した。さらに112名のASD患者(平均 14.8 ± 7.5 歳、男:女=83:29)において小児自閉症評価尺度-東京版(CARS-TV)にて評価した臨床症状(15個の下位項目および4個の因子項目)とOXTR遺伝子および3つの5-HT関連遺伝子多型(5-HTTLPR S/L多型、5-HTR1A C-1019G多型および5-HTR2A A-1438G多型)との関連を年齢とIQを共変量とした共分散分析(ANCOVA)を用いて解析し、有意差を認めた遺伝子多型についてはPost hoc検定を行った。

4. 研究成果

(1) MNS研究

AIおよびMI課題の正答数はASDおよび正常群で有意な差は認めなかった。分散分析において、 $[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{AI}}-[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{MI}}$ および $[\Delta \text{HHb}]_{\text{AI}}-[\Delta \text{HHb}]_{\text{MI}}$ にて、診断および半球との間に交互作用を認め($F = 5.82$, $P = 0.02$ および $F = 7.38$, $P = 0.01$)、診断および半球それぞれに主効果は認めず、このことからASDと正常群との間に、PFC活性の左右平衡性に違いがあることが示唆された。一方、事後解析にて、 $[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{AI}}-[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{MI}}$ および $[\Delta \text{HHb}]_{\text{AI}}-[\Delta \text{HHb}]_{\text{MI}}$ について、正常群については左>右となるような有意な差を認めたが、ASD群においては左右で有意な差は認めず(正常群 $[02\text{Hb}]$ 、 $[\text{HHb}]$: $t = 2.23$, $P = 0.03$, $t = 2.52$, $P = 0.02$; ASD群 $[02\text{Hb}]$ 、

$[\text{HHb}]$: $t = -1.23$, $p = 0.23$, $t = -1.09$, $P = 0.28$)、正常群ではPFC活性に左優位性を認めるが、ASD群ではこの優位性が減少していることが示唆された。また、各課題の正答数と $[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{AI}}-[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{MI}}$ 、 $[\Delta \text{HHb}]_{\text{AI}}-[\Delta \text{HHb}]_{\text{MI}}$ の相関については、ASD群における右PFCの $[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{AI}}-[\Delta 02\text{Hb}]_{\text{MI}}$ とのみに有意な相関を認めた($r = 0.50$, $P = 0.03$)。

(2) 分子遺伝研究

TPH2遺伝子におけるエクソンのリシーケンスにより検出されたミスセンス変異の1つであるR225Qは自閉性障害の男性1人のみにヘテロ接合で認められ、Qアレルは精神疾患と診断されたことのない父親から伝達されていた。一方、対照者ではR225Qは認められなかった。タグSNPの中ではrs2129575のアレル頻度とASDとの間に関連を認めた(補正後 $p = 0.0225$)。

臨床症状との関連解析では、CARS-TVの下位項目「模倣」のスコアにおいて、OXTR遺伝子rs237887のメジャーアレル(G)のホモ接合所有者よりもマイナーアレル(A)保有者で有意に低かった(それぞれ 1.7 ± 0.62 および 2.2 ± 0.72 ; $p = 0.0001$)。「身体の使い方」($P = 0.001$)と因子項目の「常同性および感覚異常」($P = 0.008$)が5-HTR1A C-1019G多型グループ間で有意差があり、2つの項目ともにC/C多型がC/GおよびG/G多型に比べ有意に高かった($P \leq 0.01$)。5-HTTLPRおよび5-HTR2A遺伝子の多型は臨床症状と有意な関連を示さなかった。

また、今回調べた全ての遺伝子多型において、NIRSデータとの有意な関連は認められなかった。

(3) 研究結果の総括

本研究の結果より、ASD児では模倣課題中のMNS活動の測性が定型発達児と逆転していることが示された。分子遺伝研究の結果より、TPH2遺伝子多型がASDと関連を認め、OXTR遺伝子多型や5-HTR1A遺伝子多型が、模倣、身体の使い方および常同性などの中間表現型と関連していることが示された。我々の当初の仮説であったMNSの障害に関連する遺伝子多型は、今回調査した遺伝子軍において同定できなかったが、NIRSにて測定できるMNSの障害や疾患や中間表現型に関与するいくつかの遺伝子多型は、ASDの生物学的診断マーカーとなり得る可能性があると考えられた。

(4) 参考文献

- Brune CW, Kim SJ, Salt J, Leventhal BL, Lord C, Cook EH Jr. 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. *Am J Psychiatry*. 163(12):2148-56, 2006.
- Dapretto M, Davies MS, Pfeifer JH, Scott AA, Sigman M, Bookheimer SY, Iacoboni M.

Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Nat Neurosci.* 9(1):28-30, 2006.

Endo T, Shioiri T, Kitamura H, Kimura T, Endo S, Masuzawa N, Someya T. Altered chemical metabolites in the amygdala-hippocampus region contribute to autistic symptoms of autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry.* 62(9):1030-7, 2007.

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 Res.* 183(2):170-3, 2010.

Naber FB, Swinkels SH, Buitelaar JK, Bakermans-Kranenburg MJ, van IJzendoorn MH, Dietz C, van Daalen E, van Engeland H. Attachment in toddlers with autism and other developmental disorders. *J Autism Dev Disord.* 37(6):1123-38, 2007.

Tamura R, Kitamura H, Endo T, Hasegawa N, Someya T. Reduced thalamic volume observed across different subgroups of autism spectrum disorders. *Psychiatry Res.* 184(3):186-8, 2010.

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4件)

① 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.* 196(2-3):320-2, 2012. 査読有

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.* 198(2):336-7, 2012. 査読有

③ 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.* 203(2-3):237-40, 2012. 査読有

④ Egawa J, Watanabe Y, Endo T, Tamura R, Masuzawa N, Someya T. Association between OXTR and clinical phenotypes

of autism spectrum disorders.

Psychiatry Res. S0165-1781(12)00714-7, 2012. 査読有

[学会発表] (計7件)

① 〈第108回日本小児精神神経学会. 2012.11.11. 神戸市〉林剛丞、遠藤太郎、田村立、江川純、杉本篤言、折目直樹、染矢俊幸. 新潟県新潟市就学前検診における広汎性発達障害の実態調査.

② 〈第108回日本小児精神神経学会. 2012.11.10. 神戸市〉江川純、遠藤太郎、田村立、杉本篤言、増澤菜生、染矢俊幸. セロトニン受容体1A遺伝子多型の自閉症スペクトラム障害における臨床表現型への影響.

③ 〈11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry and 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. 2012.9.30-10.1. Kobe〉Egawa J, Watanabe Y, Nunokawa A, Endo T, Kaneko N, Tamura R, Sugiyama T, Someya T. Rare missense variations of TPH2 and risk of autism: Exon resequencing and association analysis.

④ 〈第34回日本生物学的精神医学会. 2012.9.29. 神戸市〉長谷川直哉、北村秀明、村上博淳、亀山茂樹、笹川陸男、江川純、田村立、遠藤太郎、染矢俊幸. 自閉症スペクトラム障害における一時視覚野優位の視覚認知処理.

⑤ 〈第31回日本精神科診断学会. 2011.11.19. 松本市〉田村立、遠藤太郎、江川純、染矢俊幸. 広汎性発達障害の臨床像の特徴と各サブタイプ間の差異:小児自閉症評価尺度(CARS)を用いた因子分析に基づく検討.

⑥ 〈第105回日本小児精神神経学会. 2011.6.19. 新潟市〉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.

⑦ 〈第105回日本小児精神神経学会. 2011.6.19. 新潟市〉江川純、遠藤太郎、田村立、染矢俊幸. 広汎性発達障害における利き手と視床体積との関連.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

なし

[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・医歯学総合病院・講師
研究者番号：70515759

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし