

2.Maegaki Y, Kurozawa Y, Hanaki K, Ohno K.  
Risk factors for fatality and neurological  
sequelae after status epilepticus in children.  
Neuropediatrics. 2005 Jun; 36(3): 186-92.

2)学会発表

K. Ohno. Recent development of lysosomal  
disorders and allied disorders. The 24th  
Annual Meeting of Korean Child Neurology  
Society. 2005.5.13 (Busan)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究協力者：近藤章子、井上岳彦（鳥取大  
学医学部脳神経小児科）

表 1 Molar Tooth 型小脳・脳幹の形成障害を示す例の臨床症状と自閉性障害の合併

臨床 診断	小脳 虫部	知的 障害	髄膜瘤	眼瞼 下垂	網膜 変性	腎 病変	視線	非定型 自閉症
JS	欠損	最重度	あり	左	あり	?	合わず	—
JS	欠損	最重度	あり	右	あり	あり	合わず	—
JS	欠損	最重度	あり	右	あり	?	合わず	—
JS	欠損	軽度	なし	左	あり	なし	言葉あり	—
JS	欠損	重度	なし	なし	なし	なし	合わず、ヒトの顔 に興味なし、他 傷・自傷、head banging	+
JS	欠損	重度	なし	右	なし	なし	視線合う	—
COMA	低形成	正常	なし	なし	なし	なし	言葉あり	—
COMA	低形成	重度	なし	なし	なし	なし		—
Myotubular Myopathy	欠損	最重度	なし	なし	なし	なし	合わず、自傷、他 傷、興奮、常同行 為	+

JS：Joubert syndrome

COMA：Congenital oculomotor apraxia

## Ⅱ. 分担研究報告

### 4. 自閉症徴候を示す症例における FMR-1 遺伝子発現

の

量的評価について

杉江秀夫

研究要旨:自閉症と類似した症候を持ち、責任遺伝子が判明している脆弱 X 症候群は FMR-1 遺伝子がコードする蛋白 FMRP の発現異常が原因である。末梢白血球より抽出した mRNA を用いて自閉症児における FMR-1 遺伝子発現量を検討し、ABC-J によって分析した行動様式と比較した。その結果以下のような結果を得た。1.FMR-1 の発現量は自閉性障害でバラツキがあり低値を示すものまた高値を示すものがあつた。2.ABC-J の行動評価との関連では易興奮性 (irritability) で有意差はないものの単回帰分析では  $p < 0.06$  と負の相関傾向を示した。不適切な言語 (inappropriate speech) の項目では単回帰分析で  $p < 0.003$  と有意に負の相関を示した。3.FMR-1 遺伝子がコードする蛋白 FMRP は RNA-binding protein であり、さまざまな脳機能に関する因子を制御していると考えられている。そのパターンの変化 (発現の低下、過剰発現など) は精神行動機能に影響することが推測される。今回の結果でみられた自閉性障害における FMRP 発現の特徴が特に易興奮性、言語などに何らかの関わりをしている可能性があると考えられた。

#### A. 研究目的

自閉症の発症には環境要因も含む多因子の要因が関与していると考えられる。その病態を解明するためには、原因が判明している疾患をモデルとしてその病態を解明することが重要である。脆弱 X 症候群 (Fragile X syndrome :FRAXA) は遺伝学的原因が判明して自閉症と類似徴候を示す疾患群である。FMR-1 遺伝子の遺伝子産物である FMRP は RNA-binding protein であり、他の遺伝子の発現に関して間接的に影響を及ぼしていることが考えられる。我々は FRAXA に関して Aberrant Behavior Checklist (ABC) を用いて行動評価を行い、自閉症児におけ

る FRAXA 遺伝子の発現量と行動様式について検討した。

#### B. 研究方法

(1) 対象は DSM-IV に基づき自閉性障害と診断した 21 例 (男 19 例、女 2 例) で、知的レベルは高機能 5 例、軽度遅滞 4 例、中等度遅滞 8 例、重度遅滞 4 例であつた。対照は知的障害の無い 10 例である。本人または両親より承諾を得た後、白血球より抽出した total RNA を用いた。human control RNA の GAPDH、FMR-1 の発現量の検量線を作成し各例の FMR-1 遺伝子の発現量を Real-Time PCR (ABI) により検討した。

(2) 行動評価：

Aberrant Behavior Checklist (ABC)の日本語版(ABC-J)を用いた (小野善郎)。

5つのサブスケール (I:易興奮性、II:無気力、III:常同行動、IV:多動、V:不適切な言語) について、FMR-1 遺伝子の発現量との関係を分析した。

### C. 研究結果

(1) FMR-1 遺伝子の発現量 (図1)：

対照  $6.21 \pm 1.08$ 、自閉症  $5.26 \pm 4.02$  と自閉症に低い傾向があったが、有意差は認めなかった。

(2) 知的レベルから比較した FMR-1 遺伝子の発現量 (図2)：

高機能  $6.61 \pm 6.89$ 、軽度精神遅滞  $6.78 \pm 2.18$ 、中等度精神遅滞  $3.75 \pm 3.11$ 、重度精神遅滞  $5.10 \pm 2.14$ 、中等度精神遅滞とやや低値であったが有意差はなかった。

(3) FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J (I：易興奮性 (irritability) (図3)：

自閉症全体で検討した場合、易興奮性と FMR-1 発現量は負の相関の傾向が認められた ( $p < 0.06$ )。

(4) FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J (II：無気力 (lethargy) (図4)：

有意な相関は認めなかった。

(5) FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J (III：常同行動 (stereotypy) (図5)：

有意な相関は認めなかった。

(6) FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J (IV：多動 (hyperactivity) (図6)：

有意な相関は認めなかった。

(7) FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J (V：不適切な言語 (inappropriate speech) (図7)：

不適切な言語に対し FMR-1 発現量は有意に ( $P < 0.003$ ) 負の相関を示した。

### D. 考察

自閉症は3つの主要な behavioral domains (1 social interaction, 2 language/ communication/ imaginative play, 3 range of interests and activities) の障害による。またその症状には広がり (軽重) があり autistic spectrum disorder と定義づけることが適切である。従って原因遺伝子は複数であることが推定されている。

我々はまた周生期の環境要因も発症に何らかの影響があることを報告してきた。自閉症の徴候を示す脆弱 X 症候群 (FRAXA) の責任遺伝子である FMR-1 によってコードされる蛋白 (FMRP) は RNA-binding protein であり様々な複数の遺伝子の発現に関わっている可能性が推定されている。FRAXA はこの FMRP が発現しないために発症すると考えられるため FMRP が高次脳機能の発達に影響していることが推定される。

今回の FMR-1 発現量を自閉症で検討したところ、発現量に大きなばらつきがあり、非常に高いものから低いものまで分散していた。このばらつきの意義については今後個々の症例を詳細に検討する必要がある。

ABC-J を用いて行動パターンを発現量と検討すると、言語、易興奮性に対して発現量の低い例が多いことが判明した。FMR-1 の発現量はこのように自閉性障害児の行動

パターンに関連している可能性があり、今後 AD/HD、LD など他の発達障害における行動パターンとどのようなかわりがあるかを分析することが必要である。

#### E. 結論

FMR-1 遺伝子の発現量を自閉症で検討し一部の行動障害が発現量と関連していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 杉江陽子、杉江秀夫、福田冬季子、伊藤政孝、大澤純子、鈴木輝彦、平野浩一、宮本 健、大関武彦：自閉性障害におけるセロトニン 2A 受容体遺伝子多型と新生児期異常の関係について：自閉傾向、単純精神遅滞との比較検討 第 47 回日本小児神経学会 熊本
- 2) 大澤純子、杉江秀夫、杉江陽子、伊藤政孝、福田冬季子、鈴木輝彦、宮本 健、平野浩一、大関武彦：自閉症児における行動異常の特徴と第 2 指と第 4 指の長さの比に関する検討 第 47 回日本小児神経学会 熊本
- 3) 宇杉朋子、杉江秀夫：Risperidon が興奮、自傷行為に奏効した Brachmann-de Lange syndrome の一例 第 47 回日本小児神経学会 熊本

##### 2. 論文発表

- 1), Singh S, Suzuki T, Uchiyama A, Kumada S, Moriyama N, Hirose S, Takahashi Y, Sugie H,

Mizoguchi K, Inoue Y, Kimura K, Sawaishi Y, Yamakawa K, Ganesh S. Mutations in the NHLRC1 gene are the common cause for Lafora disease in the Japanese population. J Hum Genet 50: 347-52, 2005

2) Wada T, Sugie H, Fukushima Y, Saitoh S. Non-skewed X-inactivation may cause mental retardation in a female carrier of X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X): X-inactivation study of nine female carriers of ATR-X. Am J Med Genet 138:18-20, 2005

3) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, Ito M, Sasada Y, Nakabayashi M, Fukashiro K, Ohzeki T. Clinical efficacy of fluvoxamine and functional polymorphism in a serotonin transporter gene on childhood autism. J Autism Dev Disord 35: 377-85, 2005

4) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, Ito M. Neonatal factors in infants with Autistic Disorder and typically developing infants. Autism 9: 487-94, 2005

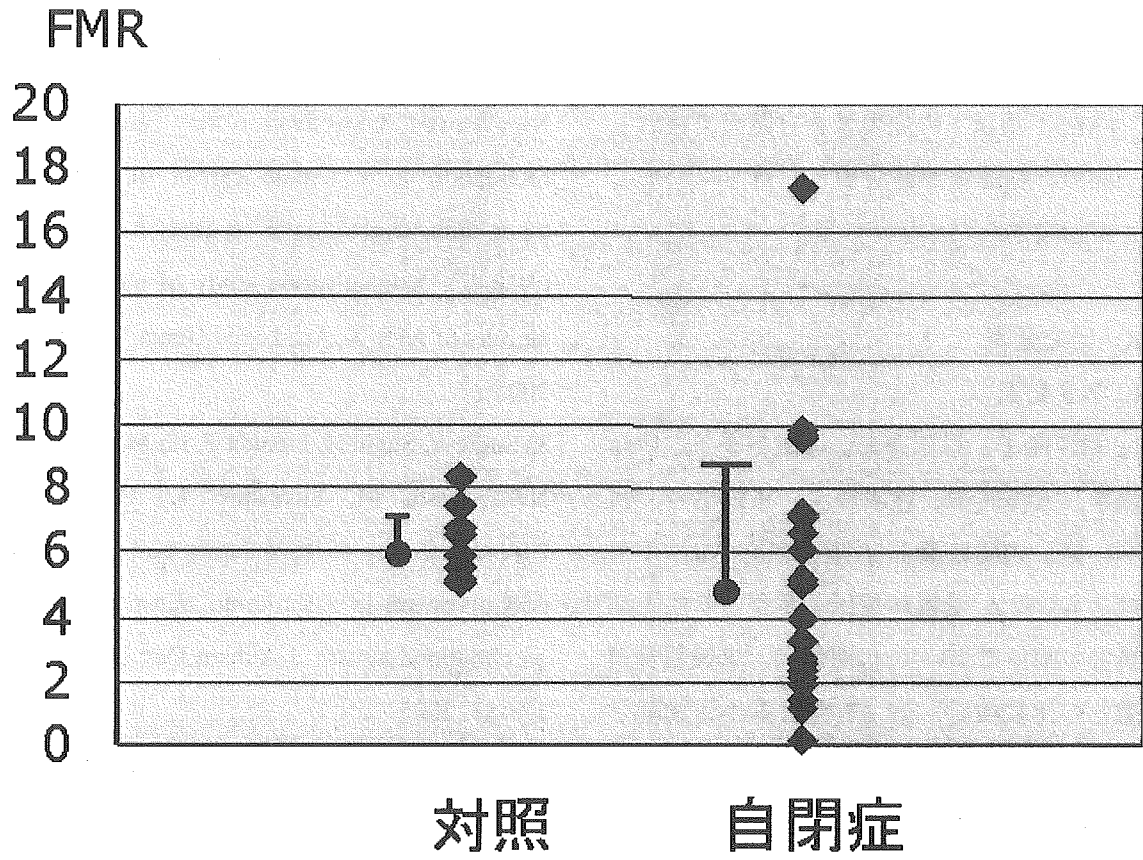
#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究協力者：鈴木輝彦、大澤純子、杉江陽子、福田冬季子（浜松市発達医療総合センター）

図 1

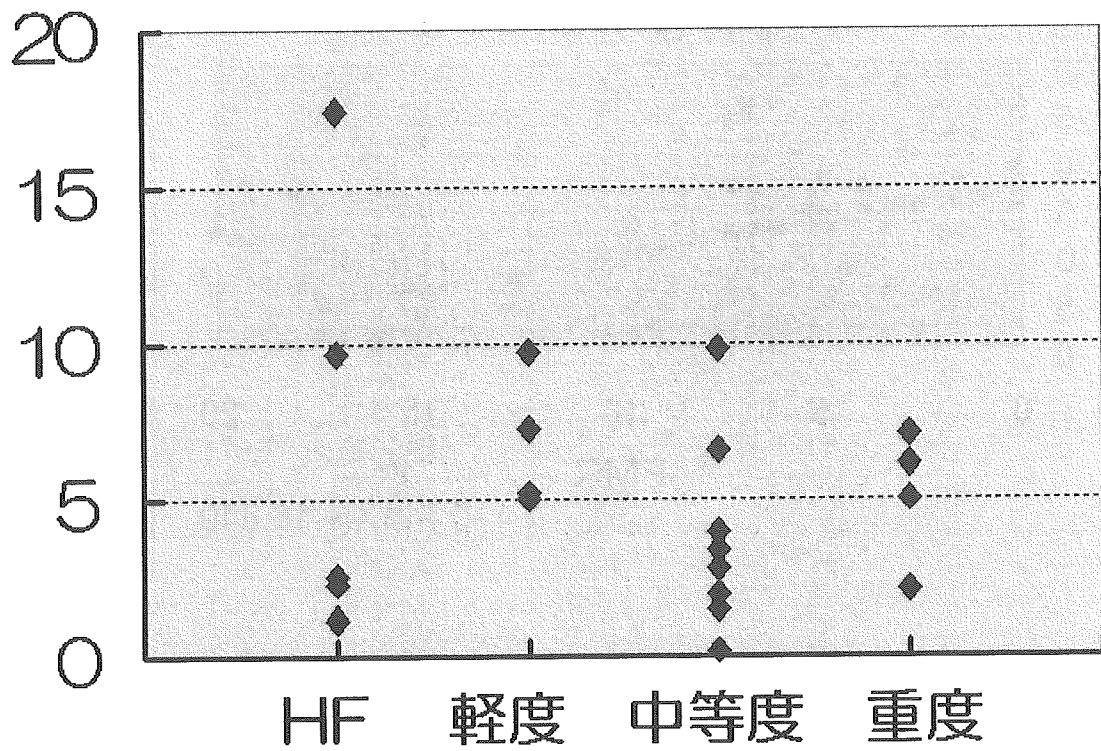
FMR-1 遺伝子の発現量



対照： 6.21 ± 1.08    自閉症： 5.26 ± 4.02

図 2

FMR-1 遺伝子の発現量 (知的レベルからの比較)



HF:  $6.61 \pm 6.89$

軽度:  $6.78 \pm 2.18$

中等度:  $3.75 \pm 3.11$

重度:  $5.10 \pm 2.14$



図 3

FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J I : 易興奮性(irritability)

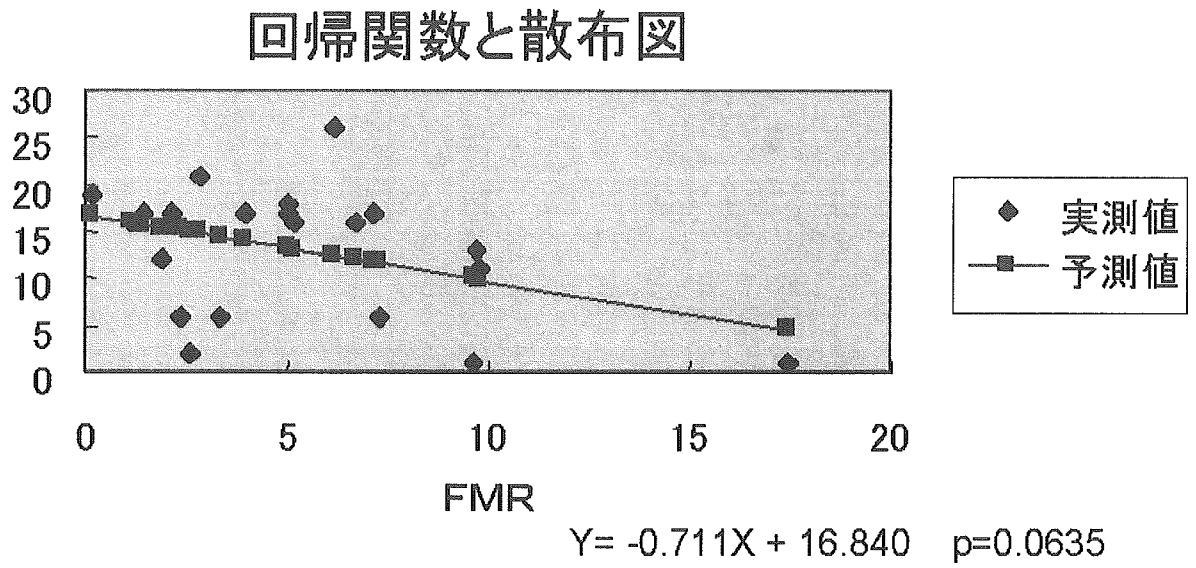


図 4

FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J II:無気力(lethargy)

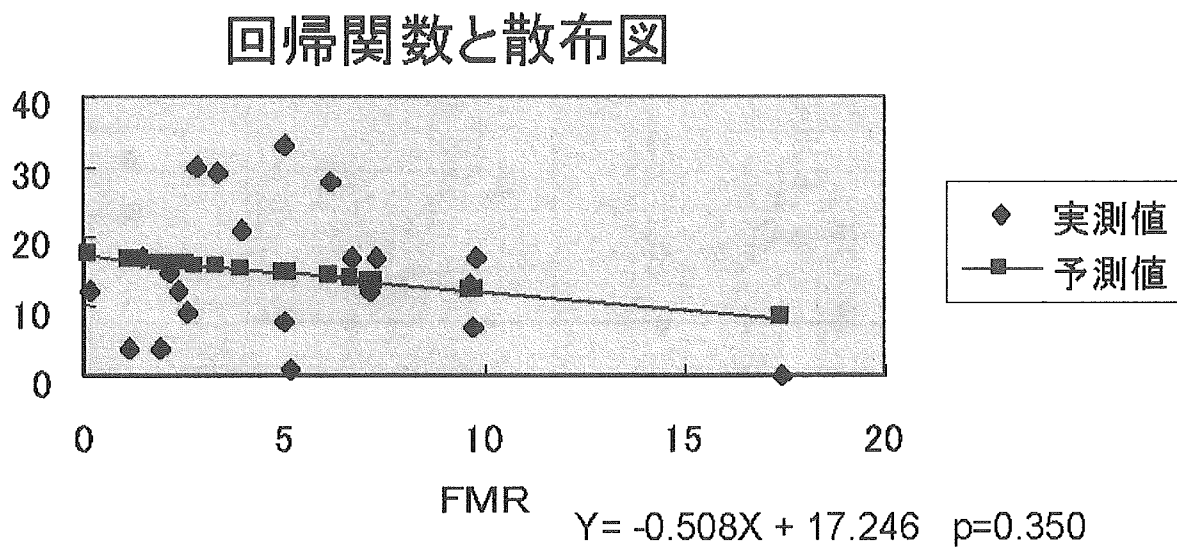


図 5

FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J Ⅲ：常同行動(sterotypy)

### 回帰関数と散布図

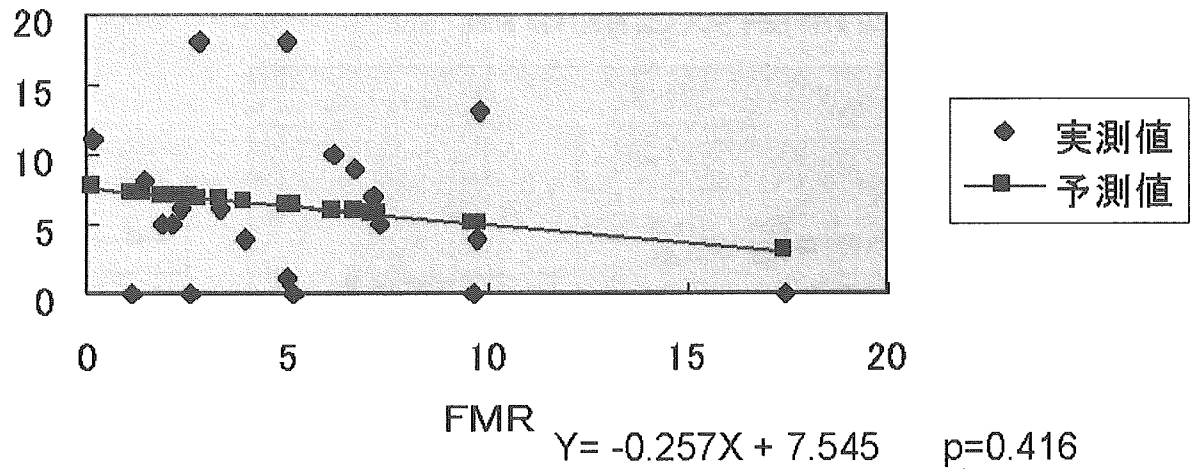


図 6

FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J IV : 多動(hyperactivity)

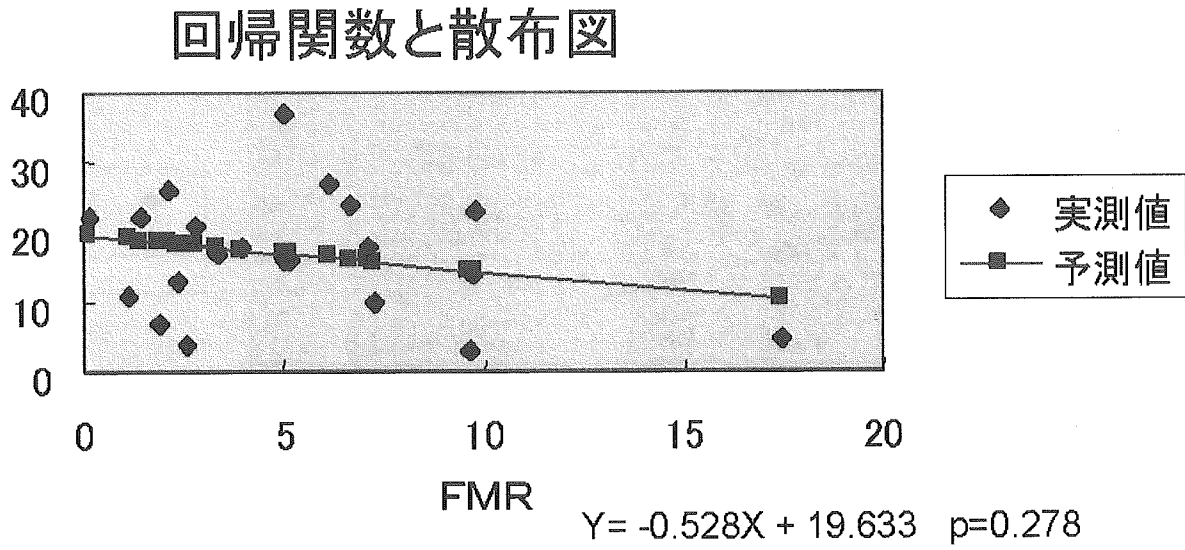
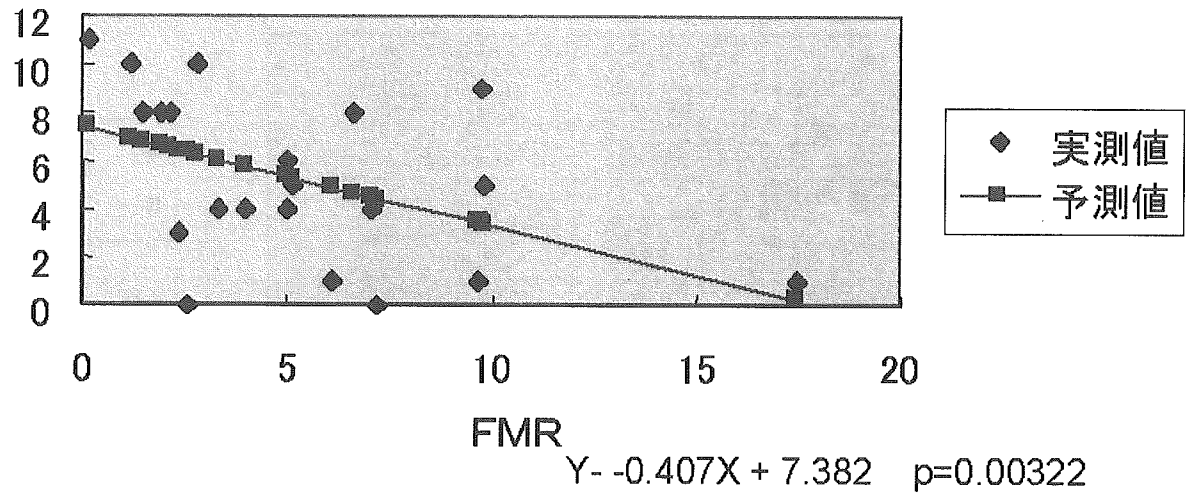


図 7

FMR-1 遺伝子発現量と ABC-J V : 不適切な言語(inappropriate speech)

### 回帰関数と散布図



## Ⅱ. 分担研究報告

### 5. 自閉症発症に関する関連遺伝子検索：HOXD 遺伝子の解析

杉江秀夫

研究要旨：自閉症の発症に関与する遺伝子は複数あり、単一ではない。発症に関与する遺伝子をひとつでも究明することは自閉症の発症予防の観点から重要である。今回は自閉症の微小臨床徴候とゲノムスキャンからの候補部位を参考に、HOXD 遺伝子に注目し解析を行った。HOXD11、12、13 の遺伝子の直接塩基配列を解析し、多型部位については、その頻度について正常対照と比較検討を行った。まだ、途中ではあるが、HOXD12 のプロモーター部位で、自閉症に有意に高頻度の遺伝子型が見られたが、自閉症の原因として有力な部位となりうるか今後さらに検討する必要がある。

#### A. 研究目的

自閉症の発症には複数の遺伝子が関与している。その関連遺伝子の検索の糸口として自閉症に認められる微小臨床徴候は重要な手がかりの一つと考えられる。自閉症では第 2 指、第 4 指長比が短いとの報告（Manning et al.）があり、我々は当センターにおいても、対照に比して有意に 2D/4D に短いことを報告している（大澤ら）。四肢骨形成にはホメオボックスのなかの HOX 遺伝子群が関与しており、指の長さ HOX（特に HOXD11、12、13）遺伝子の発現量とは相関関係があると報告されている。HOXD 群の遺伝子は、ゲノムスキャンで自閉症の候補遺伝子部位のひとつとされる 2q に座す。以上の点から我々は HOXD11、12、13 遺伝子について解析を行い、自閉症との関連を検討した。

#### B. 研究方法

〔第 1 段階〕：自閉症における HOXD11、12、13 遺伝子の変異または多型部位の検出：対象は浜松市発達医療総合センター小児科外来受診者で DSM-IV に基づき自閉症と診断した症例 11 例（男 10、女 1）うち、2D/4D が対照より短い 7 症例を含む。末梢血より DNA を抽出し、PCR 法を用いて、直接シーケンス法により HOXD11、12、13 遺伝子の塩基配列を求めた。範囲はそれぞれの遺伝子のプロモーター部位を含む上流および 2 つのエクソンとイントロンにおよんでいる。報告されている Genome sequence、SNPs data-base と比較して、変異、多型部位を検出した。

〔第 2 段階〕：多型頻度の自閉症と正常対照の比較検討：それぞれの多型部位において、リアルタイム PCR 法により、神経学的異常のない対照 30~50 例と自閉症症例

30~50 例で比較を行った。DNA 検索にはいずれも本人または家族の同意を得ている。なお症例は全例日本人である。

### C. 研究結果

〔第 1 段階〕 HOXD11、12、13 遺伝子の一部を除いて直接塩基配列解析結果が得られた。HOXD11 遺伝子では 13 ヶ所の多型が検出された。プロモーター領域における多型部位 2、エクソンにおける多型部位 0、イントロンにおける多型部位 11 であった。うち 11 ヶ所はこれまでに報告のない部位であった。HOXD12 遺伝子では 4 ヶ所の多型部位が検出された。プロモーター領域における多型部位 2、エクソンにおける多型部位 1、イントロンにおける多型部位 4 であった。うち 3 ヶ所はこれまでに報告のない部位であった。HOXD13 遺伝子では 6 ヶ所の多型部位が検出された。プロモーター領域における多型部位 2、エクソンにおける多型部位 3、イントロンにおける多型部位 11 であった。うち 3 ヶ所はこれまでに報告のない部位であった。翻訳領域にある多型は 4 ヶ所で GCC 反復一ヶ所と、SNPs 3 ヶ所であり、SNPs はいずれもアミノ酸変異のない sSNPs であった。

〔第 2 段階〕 第 1 段階で得られた多型部位において自閉症と正常対照との多型頻度の検討結果の得られた 7 ヶ所の多型部位のうち、自閉症と正常対照との間で有意差のある多型部位は 1 ヶ所あり、HOXD12 のプロモーター部位の C/A おいて、CA ヘテロの頻度が有意に自閉症で多かった。

### D. 考察

自閉症の原因は多様であり、多くの遺伝子が関与していると考えられている。多くの研究からその候補部位は多数挙げられているが、中でも 2q は注目されている部位である。ホメオボックス遺伝子は胎生初期に発現し多くの遺伝子の転写調節遺伝子としての機能を持ち、神経系の発達を含む頭部から四肢の分化・発達に関与している。HOXA1、HOXB1 遺伝子の検討からは HOXA1 の A218G 変異が自閉症の発症に関与しているとの報告が見られたが、その後否定的な報告が続いた。

また、自閉症で見られた微小臨床徴候としての手指 2D/4D 長の短いことは Manning らが報告しているが、これは我々も日本人の自閉症において有意に短いことを報告している。この指の長さ関与する遺伝子候補として、アンドロゲン遺伝子が考えられている。しかしまた、四肢骨形成には HOX 遺伝子は重要な役割をしており、さらに、指の長さ HOXD 遺伝子の発現量とに相関関係があるとされる。この HOXD 遺伝子が 2q に座していることも注目される点である。今回は解析が終わった段階では認められた有意な部位はプロモーター部位であり、遺伝子の発現量に影響を与える可能性があり、今後その点についても検討を行う必要がある。

### E. 結論

自閉症発症予防の観点から、原因遺伝子



検索は重要である。HOXD 遺伝子と自閉症との関係の解析は、現在はまだ途中であり、今後も引き続き行っていく予定である。さらに、手指の 2D/4D 長比の短い症例とそうでない症例との違いが認められるかどうかの検討も行っていく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) 杉江陽子、杉江秀夫、福田冬季子、伊藤政孝、大澤純子、鈴木輝彦、平野浩一、宮本 健、大関武彦：自閉性障害におけるセロトニン 2A 受容体遺伝子多型と新生児期異常の関係について:自閉傾向、単純精神遅滞との比較検討 第 47 回日本小児神経学会 熊本
- 2) 大澤純子、杉江秀夫、杉江陽子、伊藤政孝、福田冬季子、鈴木輝彦、宮本 健、平野浩一、大関武彦：自閉症児における行動異常の特徴と第 2 指と第 4 指の長さの比に関する検討 第 47 回日本小児神経学会 熊本
- 3) 宇杉朋子、杉江秀夫：Risperidon が興奮、自傷行為に奏効した Brachmann-de Lange syndrome の一例 第 47 回日本小児神経学会 熊本

### 2. 論文発表

- 1) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, Ito M, Sasada Y, Nakabayashi M, Fukashiro K, Ohzeki T. Clinical efficacy of fluvoxamine and functional polymorphism in a serotonin transporter gene on childhood autism. J Autism Dev

Disord 35: 377-85, 2005

- 2) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, Ito M. Neonatal factors in infants with Autistic Disorder and typically developing infants. Autism 9: 487-94, 2005
- 3) Singh S, Suzuki T, Uchiyama A, Kumada S, Moriyama N, Hirose S, Takahashi Y, Sugie H, Mizoguchi K, Inoue Y, Kimura K, Sawaishi Y, Yamakawa K, Ganesh S. Mutations in the NHLRC1 gene are the common cause for Lafora disease in the Japanese population. J Hum Genet 50: 347-52, 2005
- 4) Wada T, Sugie H, Fukushima Y, Saitoh S. Non-skewed X-inactivation may cause mental retardation in a female carrier of X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X): X-inactivation study of nine female carriers of ATR-X. Am J Med Genet 138: 18-20, 2005

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究協力者：杉江陽子、鈴木輝彦、大澤純子、福田冬季子（浜松市発達医療総合センター）

## II. 分担研究報告

6. Bronx waltzer マウスにおける刺激回避行動と  
parvalbumin 含有ニューロンの異常  
～自閉症児の呈する知覚過敏のモデルとして～

稲垣真澄

Bronx waltzer マウスにおける刺激回避行動と parvalbumin 含有ニューロンの異常  
～自閉症児の呈する知覚過敏のモデルとして～

稲垣真澄

国立精神・神経センター精神保健研究所 知的障害部 診断研究室長

研究要旨：本研究では、遺伝性難聴マウスである Bronx waltzer mouse(bv)を対象として電気刺激に対する回避行動を解析し、fear conditioning の異常の有無について検討を行った。また、介在ニューロンに含まれると考えられる parvalbumin (PV) の発現を体性感覚野・運動野について免疫組織化学的に解析した。その結果、bv マウスは電気刺激を回避する傾向が強いことが判明し、12 時間・24 時間後でも刺激回避時間が延長していた。PV 免疫染色性については、一次体性感覚野で陽性ニューロンの intensity が有意に低下していたが、二次体性感覚野では細胞体での染色性は保たれていた。いずれの領域でも、Fiber の染色性は低い結果であった。一次運動野で bv 回転群・PV 陽性ニューロン数が多い傾向を認めた。これらの結果から、bv マウスでは電気刺激による fear conditioning の閾値が低下していることに加え、いったん受けた不快な刺激に対する回避行動を修正しにくい性質を持つ可能性がある。bv マウスの行動・知覚特性は自閉症児にみられるような感覚・知覚異常の動物モデルとなりうる可能性が示唆された。bv マウスの一次体性感覚野における PV 発現の低下所見は、間接的に GABA 作動性の介在ニューロンの機能低下を示唆しており、bv マウスの呈する知覚過敏に関連している可能性がある。

A. 研究目的

自閉症の中核症状として ICD や DSM の診断基準に含まれている「社会性の障害」、「コミュニケーションの障害」、「常同反復」が知られている。一方、自閉症における「感覚知覚異常」は関連する特徴として位置づけられてきたが、高機能の広範性発達障害では感覚・知覚異常の頻度は上述した3主徴に劣らず多いことが示されている<sup>1)</sup>。一方、川崎らは自閉症における感覚知覚異常

は知能障害の程度が著しいほど頻度が増加すると報告<sup>2)</sup>している。また McAlonan ら<sup>3)</sup>は、12 人のアスペルガー障害を持つ成人例を対象として prepulse inhibition test を行い、アスペルガー障害群では聴覚刺激に対する驚愕反応の抑制不全があることを指摘している。

このように、自閉症における感覚知覚異常は、パニックや攻撃性など行動障害の原因の一つであることが推測されており、こ

の機能障害の生物学的な機序を知ることは、より良い療育の枠組みを作るためにも不可欠と思われる。中でも直接的な治療法の開発に当たっては、感覚知覚異常を示す動物モデルを確立することが重要であると考えられる。

本研究では、遺伝性難聴マウス Bronx waltzer (bv) が触覚刺激に対して過剰に反応するという事実を元に、本マウスに対して電気刺激による fear conditioning 実験を行うことで、bv マウスの感覚知覚異常を定量的に解析することを主たる目的とした。また、bv マウスの感覚知覚異常の組織学的な基盤として、大脳皮質における抑制性介在ニューロンの異常の有無に関して、介在ニューロンが含有しているカルシウム結合蛋白 parvalbumin を免疫染色法で定量的に解析した。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物および飼育環境

実験には国立精神・神経センター神経研究所実験動物研究施設にて飼育した Bronx waltzer マウス (bv/bv: n=5、月齢: 11~12 ヶ月) を使用した。対照群としては行動異常がみられない Bronx waltzer マウス hetero 型 (bv/-: n=5、月齢 11~12 ヶ月) を用いた。

bv マウスの遺伝的診断は bv マーカー遺伝子 (D5Mit209) 領域の PCR で確認した (図 1)。簡単に述べると、95°C、55°C、72°C の反応を各 1 分行い 35 回繰り返し、最終伸展は 72°C を 5 分反応させた。なお、用いた

forward プライマーは

TCTGAGCAAGGTCGTCCAC、reverse プライマーは CCCTGTCTCAAGATAAAA であった。

各マウスはプラスチックケージ (182×260×128mm) ごとに 3 匹まで飼育し、恒温、恒湿条件下で食餌、水ともに自由摂取とした。照明条件は 20 時~8 時、8 時~20 時の 12 時間ずつを 1 サイクルとしてコントロールした。

### 2. 電気刺激を用いた fear conditioning test

ショックジェネレーター MSG-001 (東洋産業) をもちいて 5 秒毎に 1.0 秒の電気刺激 (電流 0.4mA) をケージの床 (30.5×30.5cm) に敷かれたグリッドに通電した。ケージの床には 10×10cm の非ショックプレートを置き、電気刺激からの回避エリアとした。マウスを 1 個体ずつケージに入れてマウスの行動をビデオ録画し、行動解析ソフトウェア EthoVision (Noldus) を用いて回避エリア上にいた時間を通電前・通電中・通電後 12 時間後・通電後 24 時間後の各 5 分間ずつ測定した。

### 3. Fear conditioning test の統計学的解析

マウス行動の統計学的解析は、StatView for Windows ver5.0 を用いて行った。bv マウス群、hetero マウス群それぞれにおいて時間経過 (通電前・通電中・通電後 12 時間・通電後 24 時間) を 1 要因とする繰り返し ANOVA を行い、有意差が得られた群では Fisher's PLSD を用いて下位検定を行った。