

厚生労働科学研究研究費補助金
こころの健康科学研究事業

広汎性発達障害・ADHDの原因解明と
効果的発達支援・治療法の開発

—分子遺伝・脳画像を中心とするアプローチ—

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤進昌

平成18年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 広汎性発達障害・ADHDの原因解明と効果的発達支援・治療法の開発 1
—分子遺伝・脳画像を中心とするアプローチ—
加藤 進昌 東京大学医学部附属病院 精神神経科

II. 分担研究報告

1. 発達障害の関連遺伝子探索に関する研究 7
佐々木 司 東京大学保健管理センター
2. 神経画像学的解析 9
笠井 清登 東京大学医学部附属病院 精神神経科
3. 発達障害における行動表現型に関する研究 11
—発達障害における自閉症状とADHD症状との関係の検討:予備的研究—
金生 由紀子 東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部
4. 広汎性発達障害・ADHDの原因解明と効果的発達支援・治療法の開発 13
—分子遺伝・脳画像を中心とするアプローチに関する研究—
難波 栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター
5. 広汎性発達障害・ADHDの原因解明と効果的発達支援・治療法の開発 21
—分子遺伝・脳画像を中心とするアプローチに関する研究—
松本 英夫 東海大学医学部精神科学部門
6. 自閉症の遺伝子解析研究 25
山本 賢司 北里大学医学部精神科学
7. 自閉症モデル動物における甲状腺ホルモンの関与に関する研究 32
定松 美幸 滋賀医科大学医学部精神医学講座

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 41

I . 総括研究報告

**広汎性発達障害・ADHD の原因解明と効果的発達支援・治療法の開発
—分子遺伝・脳画像を中心とするアプローチに関する研究—**

主任研究者 加藤 進昌 東京大学医学部附属病院精神神経科 教授

研究要旨:

目的: 自閉症、アスペルガー障害等の広汎性発達障害 (PDD) や ADHD など小児発達障害は合計 1 割近くの児童に観察され、近年その増加が懸念されている。病態の本質は高次脳機能障害にあり、遺伝要因が強く関与するほか環境要因の影響も無視できない。本申請は、過去 3 年間の研究をさらに発展拡充させ、これまでの PDD に ADHD を加えて、1) 脳画像、2) 分子遺伝、3) 動物実験 (環境要因) の 3 分野で解析を進め、発達支援方法の改善・開発への応用を図る。

方法: 1) 脳画像は voxel-based morphometry (MRI) による脳体積測定、近赤外線分光鏡 (NIRS) による語流暢性課題遂行時の脳血流変化を測定した。2) 分子遺伝研究はこれまでに蓄積した家系サンプル 200 例と罹患者 80 例を対象とした。3) 動物実験では独自に開発した新生児期低甲状腺ラットを自閉症モデルとして用いた。

結果と考察: 1) 脳画像研究については、アスペルガー障害一卵性双生児一致例の MRI 画像解析より、社会性やコミュニケーションの責任脳部位の体積減少を一致して認めたことから同部位の遺伝的脆弱性を明らかにした。一方従来重要とされてきた扁桃体の体積は一致せず、環境要因を反映すると思われた。NIRS 研究では、課題遂行時の前頭葉賦活が健常者では成長に応じて認められるのに対して、自閉症群では見られなかった。従って課題遂行に前頭葉を用いない方略が自閉症では発達すると示唆された。2) 分子遺伝研究では、多施設共同研究により候補遺伝子を分担して解析している。確実な原因遺伝子を同定するに至っていないが、2 番と 7 番染色体領域に資源を集中しており、いくつかの予備的結果を得つつある。3) 動物実験では、自閉症類似症状を成長後に発現するモデルラットで新生児期 (ヒト胎生中期に相当) にセロトニンニューロンの低形成がみられ、これを SSRI の同時投与は増悪させた。胎内環境と発達障害発生の関連で重要な示唆と考える。4) 研究成果を平成 18 年 1 月 700 名の参加者を得て公開シンポジウムで発表した。

結論: 3 分野それぞれ今後につながる研究成果を得ることができた。特に脳画像の結果は診断ツールとして応用できると考えている。平成 17 年より発足した東大病院内「こころの発達診療部」を臨床基盤として、新しいツールも取り入れつつ、新たに ADHD を対象とした施設共同研究を計画している。

分担研究者

佐々木司

東京大学保健管理センター 助教授

笠井清登

東京大学医学部附属病院精神神経科 講師

難波栄二

鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

松本英夫

東海大学医学部精神神経科学部門 助教授

山本賢司

北里大学医学部精神神経科 講師

金生由紀子

北里大学大学院医療系研究科人間科学 助教授

(現: 東京大学医学部附属病院こころの発達診療部 特任助教授)

定松美幸

滋賀医科大学精神神経科 講師

A. 研究目的

自閉症、アスペルガー障害等の広汎性発達障害（PDD）や ADHD など小児発達障害は知能低下を伴わない例も含めると合計 1 割近くの児童に観察され、近年その発生率の増加が懸念されている。その病態の本質は高次脳機能障害にあり、遺伝要因が強く関与するほか環境要因の影響も無視できない。我々は 4 年前より厚労省の支援の下、自閉症中心に病態・病因解明のための研究を複数研究機関共同でスタートさせ、分子遺伝、環境物質、脳画像研究で一定の成果を得てきた。本申請は、この 3 年間の研究をさらに発展拡充させ、これまでの PDD に、発病頻度からも社会的影響からも研究意義の高い ADHD を加えて、脳画像、分子遺伝、動物実験（環境要因）の 3 分野で解析を進め、発達支援の方策の改善・開発への応用を図ることを目的とする。

B. 研究方法

脳画像研究：①成人アスペルガー障害一卵性双生児一致例 1 組を対象として、voxel-based morphometry 法により、脳構造異常の共通点・相違点を検討した。②自閉症スペクトラム障害（ASD）小児（5 歳から 17 歳）14 名、健常同胞 11 名、健常対照児 15 名、成人（18 歳以上）8 歳以上）8 名、健常同胞 7 名、健常対照成人 15 名の計 70 名を対象として、近赤外線スペクトロスコピーを用いて語流暢性課題施行中の前頭前野酸素化ヘモグロビン濃度変化を計測した。③大脳辺縁系を中心とした脳内情報処理回路の障害を反映するとされている prepulse inhibition（PPI）の異常は、今回は preliminary study として 5 名の高機能広汎性発達障害者と 6 名の健常者を対象に聴覚刺激を用いて PPI を測定した。

分子遺伝研究：平成 17 年度は広汎性発達障害を中心に 25 家系 76 名の当事者・家族にご協力いただき DNA サンプルと臨床・心理情報の収集を行った。平成 16 年度以前までの分を合わせると、広汎性発達障害についてはグループ全体で家系サンプル 200 例と罹患者のみのサンプル 80 例をこれまでに収集している。①これらを用いて 7 番染色体長腕領域の遺伝子解析を引き続き実施した。②自閉症の原因候補領域である 2q31-33 に存在する遺伝子のデータベース・サーチを行った。③脳形成に関連する HOXA 群と D 群のアミノ酸リピート配列に注目して研究を進めた。

動物実験：われわれの自閉症モデルラット（propylthiouracil（PTU）投与による新生児期低甲状腺ラット）についてセロトニンニューロン形成の発達を観察し、セロトニン関連薬剤の効果も合わせて検討した。

C. 結果と考察

脳画像研究：

①ペアに共通して体積減少を認めた部位は、前頭前野、紡錘状回、上側頭回灰白質であった。従来自閉症スペクトラム障害で重要とされている扁桃体についてはうつ病を合併している片方でのみ体積減少を示していた。このことは、社会性回路における脳構造異常が遺伝的素因を反映している一方、扁桃体体積については何らかの非遺伝的環境因を反映している可能性を示唆している（Yamasue et al., 2005）。

②近赤外線スペクトロスコピーを用いて語流暢性課題施行中の前頭前野酸素化ヘモグロビン濃度変化を計測した結果、ASD、健常同胞、健常対照の小児の 3 群ではいずれも低く、群間で有意な差を認めなかったが、成人の 3 群では、明瞭な群間差を認め、ASD では賦活が低いのに対し、健常同胞群および健

常対照成人群では大きな前頭前野賦活を認めた。このことは、実行機能課題遂行時の前頭前野の有効利用が ASD で発達していないこと、かつその障害発現は自閉症症状を代償するためではないかと思われた。

③高機能広汎性発達障害者では聴覚刺激に対する prepulse inhibition が減弱することが示された。

分子遺伝研究：

①7番染色体候補遺伝子についてはこれまで S-SCAM, TAC1, NPTX2, RELN, LAMB1, LAMB4, NRCAM, FOXP2, PTPRZ1, WNT2, NPTX2 等の遺伝子を case-control と、家族サンプルでは Transmission Disequilibrium Test を併用して解析中であるが、FOXP2, PTPRZ1 については有意な結果は得られなかった (Marui et al. 2005)。RELN, NRCAM, WNT2 では自閉症との関連を示唆するデータがあり、より詳細に検討中である。このほか comorbidity から注目される TSC1, TSC2 についても解析を続けている。

②2g31-33 領域から原因候補遺伝子 (CACNB4、3-Fet、SCN2A、SCN1A など) を抽出した。それらの SNP、マイクロサテライトなどを検出し、解析可能な条件を検索した。

③HOXA 群と D 群のアラニンリピート配列の一つで自閉症に関連する可能性のある多型を見出した。脳における differentially methylated region (DMR) の解析から、2番と7番染色体のそれぞれに11個のヘミメチル化領域を見出した。

動物実験：

自閉症モデルラット (PTU ラット) では脳幹におけるセロトニンニューロンの形成、ノルアドレナリンニューロン形成、小脳における extragranular cell layer の migration、プ

ルキンエ細胞の形成などに遅れが見られることが明らかになった。5-hydroxytryptohpan (5-HTP) の同時投与はこの遅れを回復させ、fluvoxamine (SSRI) は増悪させることが明らかになった。また、PTU ラットでは社会性の異常も認められた。(Sadamatsu et al., 2006)。

D. 結論

3分野それぞれに今後残された期間の研究につながる成果を得ることが出来た。特に voxel-based morphometry を用いた個人における脳体積異常部位の描出は、広汎性発達障害の社会性回路異常の病態診断ツールとしての臨床応用可能性を示唆している。また、近赤外線スペクトロスコピーによる前頭葉機能計測は、広汎性発達障害における前頭葉発達変化の経過を客観的に把握するツールとなる可能性がある。今後は、このようなツールを ADHD を対象とする臨床研究にも活用して行きたい。現在 ADHD の薬物反応性をターゲットにした多施設共同研究を計画中である。

自閉症モデルラットでの発達異常がセロトニン関連薬剤で変化するという発見は今後重要な示唆を与えるものと考えている。アスペルガー症候群の不応症候群には通常 SSRI が多用されているからである。また妊娠中期 (ラットの新生児期にあたる) にある妊婦の SSRI 服用はまれならずおこりうる状況であり、児の精神発達をターゲットにした胎児毒性の研究につながる可能性もあると考えている。

これらの研究成果は平成 18 年 1 月に行った公開シンポジウムで 700 名の参加者の前で紹介された。このシンポジウムにはアメリカから、D. Amaral 博士、韓国から Kan-E. Hong 博士も参加され、それぞれ両国での研究を紹介

された。両博士を交えての研究報告会もシンポジウム前日に行うことが出来、当研究チームの内容を伝えることが出来たのも今後につながる大きな成果であったと考えている。

E. 研究発表

1. Kohda K, Jinde S, Iwamoto K, Bundo M, Kato N, Kato T: Maternal separation stress drastically decreases expression of transthyretin in the brains of adult rat offspring. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 4:1-8,2005
2. Paraguison RC., Higaki K, Sakamoto Y, Hashimoto O, Miyake N, Matsumoto H, Yamamoto K, Sasaki T, Kato N, Nanba E. Polyhistidine tract expansions in HOXA1 result in intranuclear aggregation and increased cell death. *Biochem Biophys Res Comm* 336:1033-1039,2005
3. Marui T, Koishi S, Funatogawa I, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Ishijima M, Watanabe K, Kasai K, Kato N, Sasaki T. No association of FOXP2 and PTPRZ1 on 7q31 with autism from the Japanese population. *Neurosci Res* 53: 91-94,2005
4. Yamasue H, Ishijima M, Abe O, Sasaki T, Yamada H, Suga M, Rogers M, Minowa I, Someya R, Kurita H, Aoki S, Kato N, Kasai K. Neuroanatomy in monozygotic twins with Asperger disorder discordant for comorbid depression. *Neurology* 65:491-492,2005
5. Kasai K, Hashimoto O, Kawakubo Y, Yumoto M, Kamio S, Itoh K, Koshida I, Iwanami A, Nakagome K, Fukuda M, Yamasue H, Yamada H, Abe O, Aoki S, Kato N. Delayed automatic detection of change in speech sounds in adults with autism: a magnetoencephalographic study. *Clin Neurophysiol* 116: 1655-1664, 2005
6. Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Aaskura A, Aoki Y, Atsumi M, Iga T, Inomata J, Inoko H, Sasaki T, Nanba E, Kato N, Ishii T, Yamazaki K. Serotonin transporter gene promotor polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev* 28:257-260,2006
7. Sadamatsu M, Kanai H, Xu X, Liu Y, Kato N. Rreview of animal models for autism: implication of thyroid hormone. *Congenital Anomalies* 46:1-9,2006

発達障害の治療と支援を目指して

公開シンポジウム

「こころの発達」

臨床教育センター



日時：平成18年1月8日(日)

開演：13:00～17:00

(受付開始：12:00)

場所：東京大学安田講堂

参加費：無料
(事前登録は不要です)

平成17年度より東京大学医学部と同附属病院にて広汎性発達障害(PDD)や注意欠陥多動性障害(ADHD)などの教育支援をめざす「こころの発達」臨床教育フロンティア事業が開始されました。

同事業の一環として公開シンポジウムを開催いたします。

復刻版である自閉症記録映像の上映も予定されております。

また英語講演には同時通訳が準備されますのでお気軽にご参加下さい。

司会：佐々木正美

(川崎医療福祉大学医療福祉学部)

金生由紀子

(北里大学大学院医療系研究科)

カリフォルニアでのPDD療育・研究への取り組み

David G. Amaral (Univ. California Davis)

韓国におけるPDD治療教育の取り組み

Kang-E. Michael Hong (Seoul National Univ.)

東大病院での診療と教育の取り組み

渡辺慶一郎(「こころの発達」臨床教育センター)

ADHDの治療をめくって

上林靖子(中央大学文学部)

東大病院における発達障害研究の歩み

加藤進昌(東京大学大学院医学系研究科精神医学分野)

〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部
電話：03-5800-8664
E-mail：kokoro-group@umin.ac.jp

後援：東京都教育委員会・文京区・文京区教育委員会・(社)日本自閉症協会・(社)日本自閉症協会東京都支部
毎日新聞社・神奈川新聞社・日本放送協会 **NHK**

II. 分担研究報告

発達障害の関連遺伝子探索に関する研究

分担研究者 佐々木 司 東京大学保健センター 助教授

研究要旨：

広汎性発達障害(PDD)の関連遺伝子をヒトの DNA 試料を用いて探索することを目的に研究を進めている。当事者・ご家族の PDD の疫学と研究の必要性へのご理解をもとに試料収集を行い、7 番染色体長腕の候補遺伝子を中心に解析を進めた結果、一部の遺伝子で自閉症との関連が示唆された。今後試料規模を拡大し結果を確認するとともに、注意欠陥多動性障害にも対象を広げる。

A. 研究目的

広汎性発達障害(PDD)では、複数の遺伝子からなる遺伝的要因が強く発病に作用することが明らかにされている。わが国ではこれらの遺伝子を解明する取り組みは僅かであった。我々は過去数年間、わが国では数少ない自閉症の研究機関がチームを組み、地域と連携して自閉症関連遺伝子解明の共同研究を進めてきた。本研究はこれまでの研究を包括的に発展させ、教義の自閉症のみでなく、広くPDDの関連遺伝子解明を進め、さらに注意欠陥多動性障害(ADHD)まで含めた包括的な研究に取り組むことを目的としたものである。また、単一遺伝子病との違いを含む自閉症の複雑疾患としての疫学について当事者ご家族に理解を深めて頂き、今後の研究の発展基盤を築くことも重要な目的の一つである。

B. 研究方法

当事者・ご家族に理解を深めて頂く活動は、今年度は公開講座などを通じて行った。これに基づき協力を申し出ていただいた当事者・ご家族から DNA 抽出のための血液試料と臨床情報の収集を行った。得られた

試料をこれまでに収集した試料に加えて対象とし、相関解析(case-control および TDT)のデザインで候補遺伝子の解析を行った。候補遺伝子としては、全ゲノム連鎖解析のメタ解析でも最も強く示唆される7番染色体長腕領域に最も重点を置いて行った。

C. 結果

平成17年度は25家系76名の当事者・ご家族にご協力いただき DNA 試料と臨床心理情報を収集した。これをこれまでの収集分と合わせて7番染色体長腕領域の TAC1, NPTX2, RELN, LAMB1, LAMB4, NRCAM, S-SCAM, FOXP2, PTPRZ1, WNT2, NPTX2 等の遺伝子を解析している。このうち FOXP2, PTPRZ1 では結果は有意でなかったが、残りの一部では自閉症との関連を示唆するデータが得られている。なお解析には既知 SNP を主に用いているが、特に注目される部分では sequence で新たな mutation 検索を行っている。

D. 考察

これらの結果は、7 番染色体長腕のいくつかの遺伝子が自閉症(あるいは PDD)の発病と関連していることを示唆するものである。さらに解析を進め、発病メカニズムと予防・治療法開発に迫りたい。

E. 発表論文

1. Koishi S, et al. Brain Dev (in press).
2. Paraguison RC et al. Biochem Biophys Res Commun 336: 1033-9. (2005)
3. Marui T et al. Neurosci Res 53: 91-4. (2005)
4. 佐々木司、臨床精神医学 34: 909-913. (2005)

広汎性発達障害・ADHD の原因究明と効果的発達支援・治療法の開発
—分子遺伝・脳画像を中心とするアプローチ—
「神経画像学的解析」

分担研究者 笠井 清登 東京大学医学部附属病院精神神経科 講師

研究要旨；

複数の神経画像モダリティ(構造 MRI、拡散テンソル画像、近赤外線スペクトロスコピー、脳磁図)を用いて、双生児法・健常同胞対法によって、発達障害の脳異常における遺伝・環境要因を明らかにし、早期診断・予防・治療法の開発に結びつけることを目指し、voxel-based morphometry を用いた一卵性双生児による検討や、近赤外線スペクトロスコピーを用いた自閉症小児・成人およびその健常兄弟における前頭葉機能計測を行った。

A. 研究目的

複数の神経画像モダリティ(構造 MRI、拡散テンソル画像、近赤外線スペクトロスコピー、脳磁図)を用いて、双生児法・健常同胞対法によって、発達障害の脳異常における遺伝・環境要因を明らかにし、早期診断・予防・治療法の開発に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

1) 成人アスペルガー障害一卵性双生児一致例1組を対象として、voxel-based morphometry(VBM)法により、脳構造異常の共通点・相違点を検討した。

2) 自閉症スペクトラム障害小児14名、健常同胞11名、健常対照児15名、成人8名、健常同胞7名、健常対照成人15名の計70名を対象として、近赤外線スペクトロスコピー(NIRS)を用いて語流暢性課題施行中の前頭前野酸素化ヘモグロビン濃度変化を計測した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学医学部倫理委員会の承認を得ており、すべての被験者(未成年者の場合は親権者)から文書にてインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1) 成人アスペルガー障害一卵性双生児一致例ペアに共通して体積減少を認めた部位は、前頭前野、紡錘状回、上側頭回灰白質であった。従来自閉症スペクトラム障害で重要とされている扁桃体についてはうつ病を合併している片方でのみ体積減少を示していた。

2) 小児の3群ではいずれも賦活が低く、群間で有意な差を認めなかったが、成人の3群では、明瞭な群間差を認め、自閉症スペクトラム障害群では賦活が低いのに対し、健常同胞群および健常対照成人群では大きな前頭前野賦活を認めた。

D. 考察

1) 自閉症スペクトラム障害において、社会性回路における脳構造異常が遺伝的素因を反映している一方、扁桃体体積については何らかの非遺伝的環境因を反映している可能性を示唆している (Yamasue et al., Neurology, 2005)

2) 実行機能課題遂行時の前頭前野の有効利用が自閉症スペクトラム障害において、うまく発達しないことを示唆するとともに、その発達の障害が遺伝的素因ではなく、発病自体と関連していることを示唆している。

adults with autism spectrum disorder and healthy siblings. The 16th World Congress of the International Society of Brain Electromagnetic Topography, Bern, Switzerland October 6, 2005.

E. 結論

voxel-based morphometry を用いた個人における脳体積異常部位の描出は、広汎性発達障害の社会性回路異常の病態診断ツールとしての臨床応用可能性を示唆している。また、近赤外線スペクトロスコピーによる前頭葉機能計測は、広汎性発達障害における前頭葉発達変化の経過を客観的に把握するツールとなる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamasue H, et al: Neuroanatomy in monozygotic twins with Asperger's disorder discordant for comorbid depression. Neurology 65: 491-492, 2005.

Kasai K, et al: Delayed automatic detection of change in speech sounds in adults with autism: a magnetoencephalographic study. Clin Neurophysiol 116: 1655-1664, 2005.

2. 学会発表

Kawakubo Y, et al: Prefrontal activation during verbal fluency test in children and

発達障害における行動表現型に関する研究 —発達障害における自閉症状と ADHD 症状との関係の検討：予備的研究—

分担研究者 金生由紀子 東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部特任助教授

研究要旨：

発達障害の診断分類では広汎性発達障害(pervasive developmental disorders: PDD)と注意欠陥多動性障害(Attention-deficit hyperactivity disorder: ADHD)とは併存しないという定義になっているが、実際には自閉症状と ADHD 症状を併せ持っている場合が多く、両者の関係を検討する必要がある。そこで、知的に遅れがないか軽度である発達障害児 21 名(平均 7.9 歳; 男 17 名、女 4 名)を対象に診療で得られた質問紙のデータなどを解析して検討した。自閉症状を評価する改訂行動質問票(child behavior questionnaire revised: CBQ-R)の得点と ADHD 症状を評価する ADHD-RS-IV の得点とに相関が乏しく、自閉症状と ADHD 症状は同一患者に存在しても独立していると確認された。CBQ-R 得点と ADHD-RS-IV 得点の組み合わせによって他の行動症状が異なっており、さらなる検討が必要と思われた。

A. 研究目的

DSM-IV-TR では広汎性発達障害(PDD)であれば注意欠陥多動性障害(ADHD)ではないと定義されており、ICD-10 でも同様である。しかし、実際には、多くの発達障害児が自閉症状と ADHD 症状を併せ持っている。特に、知的な遅れがないか軽度であり、不注意や多動性や衝動性をいくらか示すと同時に何らかの対人関係の問題を有する場合には、診断が容易ではない。発達障害における自閉症状と ADHD 症状との関係を検討することは、より正確な診断のみならず行動表現型の抽出にも重要と思われる。そこで、本研究では、知的な遅れがないか軽度である発達障害を対象として自閉症状と ADHD 症状との関係について他の行動症状なども参照しつつ検討した。

B. 研究方法

北里大学病院精神神経科を平成 17 年 4 月から 10 月に初診した 15 歳以下の発達障害児について診療で得られたデータを解析した。この期間に分担研究者が診察した発達障害児 61 名中で幼児期後期か小学生年代であり、知的な遅れがないか軽度であり、継続的通院を予約した 21 名を本研究の対象とした。改訂行動質問票(CBQ-R)、ADHD-RS-IV、子どもの行動チェックリスト(CBCL)、怒りの質問紙という 4 種類の質問紙の中で患者の診療に必要なものの記入を親に依頼した。CBQ-R は自閉症でよく見られる症状を尋ねており、その中の 19 項目は自閉症の 3 主徴に対応する。ADHD-RS-IV は ADHD 症状について尋ねており、不注意と多動性—衝動性に分けて得点が得られる。CBCL は多様な行動症状について、怒りの質問紙は怒り発作について尋ねている。

なお、研究のみを目的としたデータの収集は行わなかった。

C. 研究結果

21 名の平均年齢は 7.9 歳(SD: 1.9)、性別は男 17 名、女 4 名であった。初診時診断は、PDD が 8 名、ADHD が 10 名、その他の発達障害が 3 名であった。CBQ-R と ADHD-RS-IV と CBCL 共に得られた者が 11 名おり、年齢、性別、診断が 21 名全体とほぼ同じ構成であった。

CBQ-R について 4 段階評定の中で「少し目立つ」以上の「有り」をすべて 1 点として、CBQ-R 得点と ADHD-RS-IV 得点との関係を見ると、CBQ-R の 32 項目の得点は、ADHD-RS-IV の不注意得点、多動性—衝動性得点、総得点のいずれとも有意な相関を認めなかった。CBQ-R の 32 項目を、対人的相互反応の 6 項目、コミュニケーションの 7 項目、興味と活動の偏りの 6 項目、その他の 13 項目に分けると、自閉症の 3 主徴に対応する項目の得点は ADHD-RS-IV の各得点と有意な相関をほとんど認めなかった。特に、コミュニケーションの得点と ADHD-RS-IV の各得点とは全く相関しなかった。

CBQ-R 得点と ADHD-RS-IV 得点の組み合わせから、両低得点群 3 名、低 CBQ-R/高 ADHD-RS-IV 群 3 名、両高得点群 5 名に分けると、CBCL の下位尺度の中で不安/抑うつと攻撃的行動で 3 群間に有意に近い差を認めた ($p=0.077$, $p=0.069$; Kruskal Wallis test)。不安/抑うつ得点は両高得点群で最も高く(平均 66.4 点)、攻撃的行動得点は低 CBQ-R/高 ADHD-RS-IV 群と両高得点群共に高かった(平均 72.3 点, 平均 69.4 点)。

D. 考察

自閉症状、特にコミュニケーションの質的障害が ADHD 症状と独立していることが改めて確認された。

自閉症状と ADHD 症状の両方を有する発達障害児は不安/抑うつ得点が高く、ADHD 症状を有する発達障害児は自閉症状の有無にかかわらず攻撃的行動得点が高いことから、自閉症状と ADHD 症状との組み合わせによって他の行動症状が異なることが示唆された。

CBQ-R と ADHD-RS-IV は自閉症状と ADHD 症状について臨床場面で簡便に評価できるので、今後より体系的に多数例について施行して検討を深めたい。

広汎性発達障害・ADHD の原因解明と効果的発達支援・治療法の開発 —分子遺伝・脳画像を中心とするアプローチに関する研究

分担研究者 難波 栄二 生命機能研究支援センター 教授

研究要旨:

自閉症の遺伝的背景について研究を行った。最初に HOX 遺伝子群のアミノ酸リピートに注目して解析を進めているが、HOXA2、HOXD8、HOXD13 遺伝子に関して、自閉症 100 例以上、その家族 200 例以上、正常対象 350 例以上について解析を進めた。自閉症と正常対象ともに長さの多型を示す例は少ないが、HOXA2 などは自閉症の患者および家系にのみ多型を示す例があり、今後さらに検討が必要と考えられた。

さらに、脳における differentially methylated region(DMR)の解析から、2 番および 11 番染色体上に 11 個のヘミメチル化領域を見出した。今後これらの領域のメチル化が自閉症に特異的であるか検討を行う予定である。

A. 研究目的

我々は、東海大学、東京大学と共同で自閉症の遺伝的背景の解析を行っている。今までの3年間では、自閉症家系検体(110家系、リンパ芽球様細胞株 213 株)を用い、自閉症の発症に関与する遺伝子の検索を行い、1)自閉症候補遺伝子の SNPs 解析、2)既知のゲノムインプリンティング遺伝子などの遺伝子発現量の解析、3)cDNA マイクロアレイ解析、4) *FMR1* 遺伝子における CGG リピート数の解析、5)ホメオボックス(HOX)遺伝子群に存在する3塩基リピート数の解析を行った。さらに、6)正常ヒト脳組織における differentially methylated region (DMR)に着目し、自閉症感受性領域より新規のゲノムインプリンティング遺伝子の検索を試みた。しかしながら、未だに自閉症に特異的な遺伝メカニズムを見出すことはできていない。

本年度は、5)の HOX 遺伝子群に存在するアミノ酸のリピート構造の解析の研究を進めた。また、6)の研究経過から、明確なゲノムインプリンティング遺伝子と考えられるもの

は多くなく、明確なゲノムインプリンティングでなくても、疾患に関連する DMR が存在する可能性が高いと推測されるようになってきた。そこで本年度より、自閉症に特異的な DMR 領域に的を絞って研究を進める方向とした。

B. 研究方法

材料

東海大学において樹立された自閉症の子供をもつ 110 家系のリンパ芽球様細胞株(219 検体:子:93、母:62、父:64、全て日本人)およびリンパ球(33 検体:子:3、母:14、父:16、全て日本人)より樹立した芽球化細胞株を培養し、DNA および RNA を抽出した。また、東京大学および鳥取大学で樹立した正常ヒトリンパ芽球様細胞株(368 検体)を正常コントロールとして用いた。

HOX 遺伝子に存在するアミノ酸リピート構造の解析

1)PCR

PCR 溶液は、10 μ l 中に、DNA(100ng, 50ng, 25ng, 12.5ng, 10ng, 2.5ng, 0.625ng, 0.3125ng, 0.15625ng)、1 \times PCR buffer、0.25mM dNTPs、5pmol 4F プライマー、Cy5-4F プライマー(3pmol, 2pmol, 1pmol)、10pmol 1R プライマー、0.5U Ampli Taq Gold が含まれるように調整した。PCR は iCycler(BIO RAD)を用いて、95 $^{\circ}$ C で 5min 加熱した後、(95 $^{\circ}$ C 1min, 各遺伝子のアニーリング温度 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min)のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C 5min で加熱する条件で行った。PCR 産物はアガロースゲル (1% Agarose S, 1% Nusieve)電気泳動でそのサイズを確認した。分子量マーカーには Marker4(ϕ X174/HaeIII)を用いた。PCR 産物は 12 $^{\circ}$ C で保存した。

2) フラグメントサイズの解析

ゲルは 50ml 中に 6% HydroLink LongRanger、6M Urea、1.2 \times TBE (1M Tris-HCl, 0.83M Boric Acid, 10mM EDTA Na₂)が含まれるように調整し、厚さ 0.35mm のものを作成した。PCR 産物 2 μ l に変性剤 8 μ l を加え、95 $^{\circ}$ C で 5min の熱変性処理をした後氷中で急冷却し、その 5 μ l を電気泳動のサンプルとした。ALFred DNA Sequencer (Pharmacia)を用いて、0.6 \times TBE で 1200V、26mA、45W、47 $^{\circ}$ C、480min の条件で電気泳動を行った。泳動後はソフトウェア AlleleLinks を用いて PCR 産物の長さの解析を行った。

3) PCR 産物のサブクローニング

PCR 溶液には、10 μ l 中に 10–30ng DNA、1 \times PCR buffer、0.25mM dNTPs、10pmol 4F プライマー、10pmol 1R プライマー、0.1U Ampli Taq Gold が含まれるように調整した。PCR は iCycler (BIO RAD)を用いて、95 $^{\circ}$ C で

5min 加熱した後、95 $^{\circ}$ C 1min、55 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min、のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5min で加熱する条件で行った。この PCR 産物 5 μ l に T-vector 0.5 μ l、2 \times ligation buffer 4 μ l、T₄ ligase 1 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。このサンプル 2 μ l に氷中で融解させた Competent cell 25 μ l を加え、氷中で 20min 放置した後、42 $^{\circ}$ C で 26sec の熱処理を行い、すぐに氷中に戻して 1min おいた。これに S.O.C 500 μ l を加えて 37 $^{\circ}$ C で 60min 保温した後、X-gal 50 μ l、IPTG 5 μ l、S.O.C 45 μ l を塗布した LB-Amp Plate に 200 μ l、300 μ l ずつ塗布して、37 $^{\circ}$ C で一晩保温した。

4) プラスミドの単離と精製

T-vector をもつ白のシングルコロニーを LB-Amp 培地 2ml に植え、37 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養した。その後、アルカリ SDS 法の原理による自動プラスミド抽出機 PI-100 Σ (Kurabo) によりプラスミドを抽出した。このプラスミドに 100 μ l の TE-Rnase (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA Na₂, 50 μ g/ml RNase)を加え、37 $^{\circ}$ C、100rpm で振とうしながら 30–60min インキュベートした後、1.5ml チューブに移した。このサンプルを 12000rpm、5min、室温で遠心し、上清 50 μ l をマルチスクリーン PCR プレート (Millipore)に移し、マルチスクリーンバキュームマニホールド (Millipore)を用いて 20–25inch Hg で 5min 上清がなくなるまで吸引した。その後、100 μ l の TE を加えて上清がなくなるまで吸引し、この操作を 2 回繰り返した。最後に 50 μ l の TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA Na₂)を加え、5min シェーカーで攪拌し(100rpm)、溶出した DNA を 4 $^{\circ}$ C で保存した。

5) プラスミドのシーケンシング

シーケンス反応液には、10 μ l 中に Terminator Ready Mix 4 μ l、精製プラスミド 1 μ l、SP6 プライマーまたは T7 プライマーが 4pmol 含まれるように調整した。反応は iCycler (BIO RAD)を用いて、96°C 30sec、50°C 15sec、60°C 4min のサイクルを 25 回繰り返す条件で行った。Multiscreen Dye Terminator Removal Kit (Millipore)を用いて反応液中の余分な蛍光物質を除去し、ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)でそのシーケンスを解析した。

DMR 領域の検討

1) ゲノム DNA の bisulfite 処理

1 μ g のゲノム DNA を EZ DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH)を使用し処理を行った。

2) 物理的地図および PCR プライマーの作成

NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>)により CpG アイランドを保有する遺伝子群を検索し、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>)および CpG island sercher (<http://cpgislands.usc.edu/>)によりそれぞれの遺伝子の物理的地図を作製した。bisulfite 処理によりメチル化を受ける CpG ジヌクレオチドのシトシン以外は全てチミンに変換されることを想定し(図1)、各 CpG アイランドの中で転写開始点近傍の CpG を 25 ~69 箇所はさむプライマーを primer3(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)にて作成した。

3) PCR 法

PCR 反応容量が 10 μ l となるように MQ 水

を 5.45 μ l、2mM each dNTPs (Applied Biosystems)を 1.25 μ l、10 \times PCR buffer (Applied Biosystems)を 1.0 μ l、プライマー (10 μ M)を各 1.0 μ l、Ampli Taq Gold (ABI) 0.1 μ l にゲノム DNA (50ng/ μ l) 0.2 μ l を加えた。これを PCR 法 (95°C で 10 分間 denature した後、95°C 1 分、プライマーに応じたアニーリング温度で 1 分、72°C 1 分をそれぞれのプライマーに応じたサイクル、最後に 72°C で 5 分)によって増幅反応を行った。

4) 電気泳動および PCR 産物のダイレクトシーケンス解析

PCR 産物の電気泳動は 2%のアガロースゲルで行い、エチジウムブロマイドにより染色を行った。PCR 産物の精製には QIA quick Gel extraction kit (QIAGEN) または Multiscreen-PCR (Millipore)を用いた。シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Ver.3.1 または Ver.1.1 (Applied Biosystems)を用いて 96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 2分 30 秒 (25 サイクル)で行い、シーケンス解析は 3130lx Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で行った。得られたシーケンスデータをもとにメチル化状態の検討をした。CpG のシトシンの位置にチミンが同時に存在する場合をメチル化状態の異なる部位とし、DMR 候補として判定した。

(倫理面での配慮)

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)に従い、東京大学医学部、東海大学医学部、鳥取大学医学部の倫理委員会の承認を得

て行った。

C. 研究結果

HOX 遺伝子群のアミノ酸リピート多型の解析

NCBI データベースから HOXA 群および D 群遺伝子のアミノ酸リピートが存在する領域かを選び出し、予備的に自閉症 30 と正常対象 60 の解析を最初に行った。その結果、多型が存在する領域を同定した(表 1)。その領域について自閉症サンプル 100 以上、正常対象 300 以上で解析を進めた。HOXA2、HOXD8、HOXD13 のアラニンリピート多型の解析結果をそれぞれ表 2、3、4 に示す。HOXA2 のアラニンリピートは自閉症家系の数例のみに見出された。

染色体 2 番と 7 番の DMR 領域の同定

2 番・7 番染色体において、転写開始点近傍に CpG アイランドが位置し脳や胎生期に重要な遺伝子の中から、2 番染色体から 30 個、7 番染色体から 32 個を選び出し解析を行った。最終的に、一部ヘミメチル化を含む遺伝子は 2 番染色体 7 番染色体から、それぞれ 11 個得られた。2 番染色体上の 31 箇所のヘミメチル化を含む *HOXD9*、多数のヘミメチル化を含む *HOXD4* や *HOXD10* はゲノム刷り込み遺伝子の可能性も考えられた。自閉症関連領域との報告もある 7 番染色体領域の遺伝子 (*RELN*, *LAMBI*, *WNT2*) では、明らかなゲノム刷り込みの可能性は低いが、DNA メチル化の個体差が認められた。

D. 考察

HOX 遺伝子群のアミノ酸リピート多型の解

析

今回の解析では、いずれもアラニンリピートが多型を示し、HOXA2 では自閉症の一部と関連するかもしれない結果が得られた。アラニンは疎水性の無極性のアミノ酸であり、ヒトにおけるポリアラニンを含むタンパク質は 494 個報告されている。

HOX 遺伝子は番号の若い 3' 側の遺伝子ほど発生初期に 3' 側の遺伝子ほど発生の初期に胚の頭部で、5' 側ほど後期に胚の尾部で発現している。HOX 遺伝子の変異によるヒトの疾患は A13 と D13 などで報告されているが、ともに四肢の奇形を生じる。また、これらの変異はともにアラニンリピートの延長であり、あらたなアミノ酸リピートによる疾患としても注目されている。アラニンリピートの延長による疾患は、この他に X 連鎖性精神遅滞と関連する ARX や SOX3 遺伝子などもあり、精神神経疾患の原因としても重要と考えられる。

さらに自閉症では指の長さ 2D/4D の比が自閉症の生物学的マーカーになる可能性の報告がある。HOXD13 遺伝子などは、四肢の形成にも関連しており興味深い。

今までの我々の研究では、自閉症の一部に特異的な異常をもつ可能性は見出してきているが、多くの自閉症の遺伝的背景を検討するためには、さらに様々な方向からの検討が必要かもしれない。

染色体 2 番と 7 番の DMR 領域の同定

今回の検討でも、すべての検体が一致する明らかなゲノムインプリンティングと考えられる遺伝子は少なく、*RELN*, *WNT2*, *LAMBI* などの遺伝子においてもメチル化状態が検体間で異なっている場合があった。芽球化

の影響なども考えられるが、メチル化の個人差が疾患と関連する化膿性もあり、今後の検討が重要になる。これらの遺伝子の中で、*RELN* はシナプスの形成や軸索の分岐など神経発達に重要な役割を担い、統合失調症患者の脳組織検体を用いたメチル化解析においてはプロモーター領域の一部の CpG 部位が高度にメチル化を受けることが報告されている。さらに自閉症患者の脳組織検体においては、*RELN* の mRNA および蛋白量が低下しているとの報告もあり今後の健闘が重要になる。

2 番染色体長腕上の *HOXD4*、*HOXD9*、*HOXD10* の解析では、インプリンティング遺伝子の存在を示唆する DMR と考えられた。これらの遺伝子ではアミノ酸リピート多型は見出されなかったが、自閉症との関連が注目されるため、さらに解析を進める予定である。

E. 結論

1. HOX 遺伝子のアミノ酸リピートの解析は自閉症の一部に関連するかもしれないが、今後さらに検討が必要である。
2. 2 番染色体と 7 番染色体の DMR 領域を明らかにした。今後、自閉症患者での解析をさらに進める予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Asakura A, Aoki Y, Atsumi M, Iga T, Inomata J, Inoko H,

Sasaki T, Nanba E, Kato N, Ishii T, Yamazaki K. Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: A family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev.* 2006 May;28(4):257-60.

Paraguison RC, Higaki K, Sakamoto Y, Hashimoto O, Miyake N, Matsumoto H, Yamamoto K, Sasaki T, Kato N, Nanba E. Polyhistidine tract expansions in HOXA1 result in intranuclear aggregation and increased cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Nov 4;336(4):1033-9.

Marui T, Koishi S, Funatogawa I, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Ishijima M, Watanabe K, Kasai K, Kato N, Sasaki T. No association of FOXP2 and PTPRZ1 on 7q31 with autism from the Japanese population. *Neurosci Res.* 2005 Sep;53(1):91-4.

2. 学会発表

坂本裕美子、難波栄二、塩見春彦：日本人における脆弱 X 症候群の保因者頻度の検討と自閉症での解析。第 47 回日本小児神経学会 熊本 2005 年 5 月 19-21 日

板場則子、坂田寿子、鷲野伸恵、大塚晋、前川真治、押村光雄、難波栄二：自閉症責任遺伝子同定を目的としたヒト 7 番染色体上新規ゲノム刷り込み遺伝子の探索第 28 回日本分子生物学会年会 福岡 2005 年 12 月 7 日-10 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし