

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤進昌

平成19年3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 10
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2 12
—自閉症状とADHD症状に関する体系的調査—
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. 広汎性発達障害の分子遺伝学的研究に関する研究 15
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 20
—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 29
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 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 35

I . 総括研究報告

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—

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知的障害を伴わない例を除いて、文科省の調査（2002）によれば、およそ6.3%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。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、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、の2分野を中心として解析を進め、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。

方法：1) 臨床評価は、東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部を平成18年4月から11月に初診した患者について診療で得られたデータを体系的に収集して解析した。2) 画像評価研究は、①MRIにおいては、実際のPDD診断に必要な、局所脳体積値を取り出す方法について検討を進めた。②NIRSについては、PDD小児と成人等を対象として、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。③ADHDについて、NIRS測定法を開発するための課題の策定を行った。④prepulse inhibition (PPI) について、日本人の高機能広汎性発達障害の患者を対象に眼輪筋反射にてPPIを健常者と比較する。3) 分子遺伝研究は、①家系サンプル240例を含む300例以上のPDDサンプルを用いて7番染色体長腕領域、15番染色体長腕領域の遺伝子群等につき解析を進めた。②2q領域のCACNB4と自閉症との関係を検討した。③HOXA1遺伝子のヒスチジン長多型の伸長が細胞機能に与える影響を検討した。

結果と考察：1) 臨床評価：自閉症状、特にコミュニケーションの質的障害がADHD症状、特に不注意症状と独立していることが再確認された。2) 画像評価研究：①Broca野（下前頭回）のうち左側BA44でPDD群における著明な体積減少を認めた。②PDDにおける前頭葉機能異常を鋭敏に反映する指標をNIRSを用いて確立した。③ADHD児のメチルフェニデートの臨床効果を予測する生理指標を開発するため、NIRSを用いた認知課題を確立した。④高機能自閉症ではPPIの減弱が認められる可能性があることを見出した。3) 分子遺伝研究：①7番領域では若干の遺伝子でSNPsとPDD（特に自閉症）との間に統計学的に有意な関連を観察した。②CACNB4遺伝子と自閉症との連鎖不均衡伝達テストは有意ではなかった。③HOXA1遺伝子のヒスチジンリピートの多型は神経細胞の分化異常をもたらすことが判明した。

結論：PDDにおいて、ミラーニューロンシステムを担うBA44の灰白質体積が非常に鋭敏な診断であることが示唆された。この発見は自閉症におけるミラーニューロンの重要性を指摘する仮説に初めて実証的な裏づけを与えるものであり、大きな進歩と考えている。

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、その障害が一部遺伝的素因を反映することから、今後は神経発達に関わる遺伝子多型との関連を見出す必要がある。

ADHD については、客観的診断ツールとしての NIRS による評価法を確立したので、今後はメチルフェニデートの効果予測を含めた臨床研究を展開する予定である。以上の研究は平成 19 年 2 月の公開シンポジウムで発表した。

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

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的障害を伴わない例を除いて、文科省の調査（2002）によれば、およそ 6.3% 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 5 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、の 2 分野を中心として解析を進め、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。

特に ADHD についてメチルフェニデートの効果を NIRS を用いて客観的に評価する手法を開発することで、効果的な治療法と効果予測の確立に繋げることを大きな目標としている。

B. 研究方法

臨床評価：

東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部を平成 18 年 4 月から 11 月に初診した患者について診療で得られたデータを体系的に収集して解析した。この期間の全初診患者 215 名中で、明確な知的遅れを伴わない（特殊学級に通っておらず、文章を話す）4～16 歳の 71 名を本研究の対象とした。初診にあたって依頼している、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）という 3 種類の質問紙について分析の対象とした。

脳画像研究：

①MRI においては、実際の PDD 診断に必要な、局所脳体積値を取り出す方法について検討を進めた。健常被験者を対象として異なる 3 施設で撮像した MRI からそれぞれ局所脳体積を計算し、それらの一致度を検討した。また、高機能 PDD 成人 13 例と IQ をマッチさせた健常成人 11 例における MRI 体積計測を行った。

②NIRS については、PDD 小児、健常同胞、健常対照児、PDD 成人、健常同胞、健常対照成人を対象として、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の計測を前年度から継続し、最終サンプルを確定した。

③ADHD について、メチルフェニデート投与による臨床効果を予測する NIRS 指標を開発するため、課題の策定と臨床試験登録の準備を行った。

④脳内情報処理回路の障害を反映すると考えられ、近年、統合失調症の動物モデルの評価法としても使用される prepulse inhibition (PPI) について、日本人の高機能広汎性発達障害の患者を対象に眼輪筋反射にて PPI を健常者と比較する。今回の対象は右利きで WAIS-R で TIQ=80 以上の高機能自閉症、およびアスペルガー障害者 7 人。年齢、性別、学歴、をマッチさせた精神医学的な障害の存在や既往のない右利きの健常者 9 名とした。

分子遺伝研究：

①平成 18 年度末の段階で、家系サンプル 240 例を含む 300 例以上の PDD サンプルの収集を終えている。これらのサンプルを用いて 7 番染色体長腕領域の TAC1, NPTX2, RELN, LAMB1, LAMB4, NRCAM, S-SCAM, FOXP2, PTPRZ1, WNT2, NPTX2、

15 番染色体長腕領域の GABA 受容体遺伝子群等につき、昨年に引き続き解析を進めた。

②自閉症の原因候補領域のひとつである 2q 領域を中心に解析を行っているが、未だ有意な結果は得られていない。今回もこの 2q 領域に存在する遺伝子の中でカルシウムチャンネル蛋白のベータ 4 サブユニット (Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit、以下 CACNB4) と自閉症との関係を検討した。

③ HOXA1 遺伝子のヒスチジン長多型の伸長が細胞機能を障害する可能性を検討した。また、自閉症状を呈するレット症候群 40 検体のうち解析可能な 12 検体について MECP2 遺伝子ならびに DLX5 遺伝子のアレル特異的な発現を検討した。さらに、自閉症に関連すると考えられる染色体 2 番と 7 番の領域に存在する 31 遺伝子と 36 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化解析を行った。

C. 結果と考察

臨床評価：

自閉症状、特にコミュニケーションの質的障害が ADHD 症状、特に不注意症状と独立していることが再確認された。自閉症状と ADHD 症状という 2 つのディメンジョンの組み合わせで行動特徴を検討したが、少なくとも CBCL で昨年度に認められたような行動症状の相違は確認されなかった。明確な知的な遅れを伴わない場合には、自閉症状がより軽くなりカットオフについて再検討がいるのかもしれない。また、年齢についても考慮すべきと思われた。

脳画像研究：

①Broca 野（下前頭回）を PDD の病態生理とかかわりの深いミラーニューロンシステムを担う BA44 とそれに隣接する BA45 に区分けするトレース法を確立し、群間比較を行った結果、仮説どおり左側 BA44 で PDD 群における著明な体積減少（ $p < 0.001$, effect size=1.5）を認め、診断マーカーとなりうることを見出した。

②PDD における前頭葉機能異常を鋭敏に反映する指標を確立した。また、本検査が繰り返し測定による信頼性が高いことを示し、臨床検査として適切であることを確かめた。この指標を用いて、小児及び成人 PDD の各年齢層のデータを集積し、健常者では年齢とともに前頭葉機能が発達する様子を NIRS が捉えること、PDD ではその発達が障害されていること、健常同胞では健常対照と PDD の中間的な機能レベルであることを見出した。

③ADHD 児のメチルフェニデートの臨床効果を予測する生理指標を開発するため、NIRS を用いた認知課題の最適化を行い、stop signal task を用いた NIRS 計測法を確立した。また、上記研究を東京大学医学部治験委員会に臨床試験登録を申請中で、まもなく承認される見込みである。

④高機能自閉症では PPI の減弱が認められる可能性があることと、自閉症では単音の聴覚刺激に対する反応が健常者となる可能性があること、およびそれは自閉症者が Social brain function (Baron Cohen ら、2000)のみならず、ラットなどの哺乳類にまで共通する原始的神経回路に障害を持つことを示唆すると考える。今後、対象例を増やしながらか検討していきたい。

分子遺伝研究：

①7 番領域では若干の遺伝子で SNPs と PDD（特に自閉症）と統計学的に有意な関連を観察した。NPTX2 および TAC1 については有意性は否定され、それぞれ原著として報告した。15 番染色体上の SNPs については有意な結果は得られていない。Neurologin 関連遺伝子の変異探索については、遺伝子のエクソン部分を中心に 200 例弱の自閉症 DNA について検討しているが、これまでの段階では変異は見出していない。

②今回、染色体の 2q 領域に存在している CACNB4 遺伝子と自閉症との連鎖不均衡伝達テストを行ったが有意な結果は得られなかった。

③HOXA1 遺伝子のヒスチジンリピートの多型は自閉症の原因にはならなかったが、神経細胞の分化異常を呈するなど興味深い影響をもたらした。レット症候群での DLX5 遺伝子解析は MECP2 の TRD 内の異常により刷り込み異常を呈する可能性が示された。

D. 結論

7 番染色体長腕ではいくつかの遺伝子で自閉症（あるいは PDD）との有意な関連が認められており、日本人でもこの領域が自閉症等 PDD の発病に影響していることを示唆している。15 番染色体長腕領域の日本人 PDD での役割については、既知の SNP 解析では有意な結果は得られなかったが、もともとこの領域は染色体異常の症例報告から自閉症との関連が注目されている領域であり、今後 array-CGH を用いた染色体の微小欠損・重複を調べていくことが必要と考えている。

なお、本研究でのもう一つの重要な対

象は ADHD であるが、圧倒的に遺伝的要因の役割が強い PDD に比較すれば、ADHD では一卵性双生児でも不一致例が生じやすく、リンパ芽球での遺伝子発現比較からのアプローチがとりやすい。この観点をもとに、分担研究者の山本らとともに、双生児不一致例からのアプローチを図りつつある。

DNA の配列変異を伴わない遺伝子発現として DNA メチル化の検討は今後の課題として重要と考えている。今回の予備的検討では、多くの遺伝子においては正常脳組織、正常リンパ芽球における CpG アイランドは非メチル化状態であった。また、自閉症におけるメチル化状態の差は認められなかった。ゲノム刷り込みを示唆する領域は同定できなかったが、4 遺伝子はメチル化状態に個体差が認められた。また、2 遺伝子は自閉症検体におけるメチル化の増加が示唆された。

HOXA1 遺伝子のヒスチジンリピートの多型は自閉症の原因にはならなかったが、神経細胞の分化異常を呈するなど興味深い影響をもたらした。レット症候群での DLX5 遺伝子解析は MECP2 の TRD 内の異常により刷り込み異常を呈する可能性が示

された。

PDD において、ミラーニューロンシステムを担う BA44 の灰白質体積が非常に鋭敏な診断であることが示唆された。この発見は自閉症におけるミラーニューロンの重要性を指摘する仮説に初めて実証的な裏づけを与えるものであり、大きな進歩と考えている。これからは、この重要な知見をコンピュータ自動診断法の確立につなげていくことが必要である。

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、その障害が一部遺伝的素因を反映することから、今後は神経発達に関わる遺伝子多型との関連を見出す必要がある。

これらの研究成果は平成19年2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、Sally Rogers 博士 (UC, Davis, MIND 研究所) と東田陽博教授 (金沢大学) も参加され、それぞれ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翌日に行うことが出来たこともあわせ、今後につながる大きな成果であったと考えている。

公開シンポジウム
「こころの発達」
臨床教育センター

治療教育を考える



「こころの発達」臨床教育フロンティア事業の一環である本シンポジウムでは、自閉症を中心としながら、治療教育の現状と展望について多面的に検討します。

これを通じて、学習障害、注意欠陥多動性障害も含めた発達障害の治療教育の意義について理解を深めて、多くの発達障害児・者に還元できればと願っています。

関係する多くの方々にご参加いただければ幸いです。(英語講演には同時通訳を準備いたします)

日時: 平成19年2月11日(日)

(受付開始: 12:00)

13:00~17:00

場所: 東京大学安田講堂

参加費: 無料 事前登録は不要です
託児はありません

司会: 加藤進昌
(東京大学大学院医学系研究科)

金生由紀子
(東大病院「こころの発達」診療部)

東大病院での治療教育の取り組み
養和巖(東大病院「こころの発達」診療部)

児童精神科医療からの発達支援
・・・危機介入としての入院治療・・・
西田寿美(三重県立小児心療センターあすなる学園)

広汎性発達障害: 社会認識記憶喪失マウスの研究から
東田陽博(金沢大学大学院医学系研究科)

自閉症スペクトラムのこころの発達
・・・生涯発達の観点から・・・
神尾陽子(国立精神神経センター精神保健研究所)

自閉症の早期介入 (Early Intervention in Autism)
Sally J. Rogers (UC Davis M.I.N.D. Institute)

問い合わせ先: 〒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 ホームページ: <http://kokoro.umin.jp>

協賛: 厚生労働省・こころの健康科学研究事業・(財)精神・神経科学振興財団

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支部・朝日新聞社

II. 分担研究報告

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—

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
研究協力者 柄木 衛、加藤 千枝子 東京大学大学院医学系研究科 精神医学
梅景 正 東京大学保健センター

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対象リクルート試料収集を行い、家系サンプル 240 例を含む 300 例以上の DNA サンプルを収集した。これを用いて 7 番染色体長腕ならびに 15 番染色体長腕の候補遺伝子の SNP 解析を継続しているほか、自閉症の一部家系での変異が報告されている *neuroligin* の関連分子についての変異の探索を中心に解析を進めた。また 15 番長腕領域については微小な欠損や重複と PDD 発症との関連を検討するため、array-CGH による解析を開始しつつある。

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・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

東大病院こころの発達診療部に通院中の患者・家族を中心にリクルートを進めている。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 番染色体および 15 番染色体長腕領域に最も重点を置いて行った。また自閉症家系の一部で発病との因果関係が確認されている *neuroligin* と機能的に密接に関連する分子の遺伝子について、direct sequence にて変異の探索を行った。これとともに、来年度に向けた計画として、染色体の欠損・重複が頻繁に起こり、かつ Angelman 症候群での欠損から自閉症症状

との関連が深いと考えられる 15 番染色体長腕領域について、array-CGH を用いた染色体の微小欠損・重複を調べ、広汎性発達障害との関連を検討する。

（倫理面への配慮）対象者のリクルートにおいては、書面と口頭にて十分な説明を行い、書面による同意を得ている。18 歳未満の対象リクルートについては、保護者の同意を得て行っている。また得られたサンプル・情報は、東京大学医学部の規定に基づいて厳重に匿名化した後、用いている。本研究は東京大学医学部のヒトゲノム研究に関する倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

平成 18 年度末の段階で、家系サンプル 240 例を含む 300 例以上の PDD サンプルの収集を終えている。これたのサンプルを用いて 7 番染色体長腕領域の TAC1, NPTX2, RELN, LAMB1, LAMB4, NRCAM, S-SCAM, FOXP2, PTPRZ1, WNT2, NPTX2、15 番染色体長腕領域の GABA 受容体遺伝子群等につき、昨年引き続き解析を進めた。7 番領域では若干の遺伝子で SNPs と PDD（特に自閉症）と統計学的に有意な関連を観察したが、15 番染色体上の SNPs については有意な結果は得られていない。Neurologin 関連遺伝子の変異探索については、遺伝子のエクソン部分を中心に 200 例弱の自閉症 DNA について検討しているが、これまでの段階では変異は見出していない。Array-CGH による 15 番染色体長腕領域の微小欠損・重複の探索については、probe の設計をほぼ完了した段階である。

D. 考察

7 番染色体長腕ではいくつかの遺伝子で自閉症（あるいは PDD）との有意な関連が認められており、日本人でもこの領域が自閉

症等 PDD の発病に影響していることを示唆している。15 番染色体長腕領域の日本人 PDD での役割については、既知の SNP 解析では有意な結果は得られなかったが、もともこの領域は染色体異常の症例報告から自閉症との注目されている領域であり、array-CGH による探索など、染色体の微小異常との関連の有無が興味深いところである。

なお、本研究でのもう一つ重要な対象は ADHD であるが、圧倒的に遺伝的要因の役割が強い PDD に比較すれば、ADHD では一卵性双生児でも不一致例が生じやすく、芽球での遺伝子発現比較からのアプローチがとりやすい。この観点をもとに、分担研究者の山本らとともに、双生児不一致例からのアプローチを図りつつある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Paraguison R, Higaki K, Yamamoto K, Matsumoto H, Sasaki T, Kato N, Nanba E. Enhanced autophagic cell death in expanded polyhistidine variants of HOXA1 reduces PBX1-coupled transcriptional activity and neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 85:479-87,2007

Marui T, Koishi S, Funatogawa I, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Ishijima M, Nanba E, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K, Watanabe K, Kano Y, Kato N, Sasaki T. No association between the Neuronal Pentraxin II genepolymorphism and autism. *Prog-Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry*, in press

Marui T, Ikuko Funatogawa I, Koishi S,
Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O,
Nanba E, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K,
Watanabe K, Kano Y, Kato N, Sasaki T.
Tachykinin 1 (TAC1) gene SNPs and haplotypes
with autism: a case-control study. *Brain Dev*, in
press

佐々木司. 遺伝的要因（特集：アスペルガ
ー症候群）. 日本臨床 65: 443-448. 2007.

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；

非侵襲神経画像法を用いて、広汎性発達障害および注意欠陥多動性障害の診断・治療に役立つ検査法を開発することを目的に、MRI ではコンピュータ自動診断法の開発を行うとともに、BA44 の体積減少が鋭敏な診断マーカーとなることを示唆した。近赤外線スペクトロスコピー [NIRS] では、PDD の前頭葉機能発達変化の経過を客観的に把握する病態診断法を開発するとともに、ADHD のメチルフェニデートによる臨床効果予測を判定する検査法を開発を目指した。

A. 研究目的

非侵襲神経画像法 (MRI・NIRS) を用いて、広汎性発達障害 (PDD) 及び注意欠陥多動性障害 (ADHD) の診断や治療効果判定に役立つ検査法を開発する。

B. 研究方法

1) MRI においては、実際の PDD 診断に必要な、局所脳体積値を取り出す方法について検討を進めた。健常被験者を対象として異なる 3 施設で撮像した MRI からそれぞれ局所脳体積を計算し、それらの一致度を検討した。また、高機能 PDD 成人 13 例と IQ をマッチさせた健常成人 11 例における MRI 体積計測を行った。

2) NIRS については、PDD 小児、健常同胞、健常対照児、PDD 成人、健常同胞、健常対照成人を対象として、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の計測を前年度から継続し、最終サンプルを確定した。

3) ADHD について、メチルフェニデート投与による臨床効果を予測する NIRS 指標を開発するため、課題の策定と臨床試験登録の準備を行った。

(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) voxel-based morphometry (VBM) で個々人の MRI を標準脳に変換するための deformation field を用いて、標準脳アトラスイメージを逆変換して、個々人の局所脳体積を自動的に計算する方法を開発した。用手的な方法については、Broca 野（下前頭回）を PDD の病態生理とかわりの深いミラーニューロンシステムを担う BA44 とそれに隣接する BA45 に区分けするトレース法を確立し、群間比較を行った結果、仮説どおり左側 BA44 で PDD 群における著明な体積減少 ($p < 0.001$, effect size=1.5) を認め、診断マーカーとなりうることを見出した。

2) PDD における前頭葉機能異常を鋭敏に反映する指標を確立した (Kuwabara et al., Behav Brain Res, 2006)。また、本検査が繰り返し測定による信頼性が高いことを示し、臨床検査として適切であることを確かめた (Kono et al., in press)。この指標を用いて、小児及び成人 PDD の各年齢層のデータを集積し、健常者では年齢とともに前頭葉機能が発達する様子を NIRS が捉えること、PDD ではその発達

が障害されていること、健常同胞では健常対照と PDD の中間的な機能レベルであることを見出し、NIRS が PDD における脳機能発達レベルを縦断的にフォローする臨床指標として利用できる可能性を示唆した。

3) ADHD 児のメチルフェニデートの臨床効果を予測する生理指標を開発するため、NIRS を用いた認知課題の最適化を行い、stop signal task を用いた NIRS 計測法を確立した。また、上記研究を東京大学医学部治験委員会に臨床試験登録を申請中で、まもなく承認される見込みである。

D. 考察

- 1) PDD において、ミラーニューロンシステムを担う BA44 の灰白質体積が非常に鋭敏な診断であることが示唆される。この重要な知見をコンピュータ自動診断法の確立につなげていくことが必要である。
- 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、その障害が一部遺伝的素因を反映することから、今後神経発達に関わる遺伝子多型との関連を見出す必要がある。

E. 結論

非侵襲脳計測である MRI・NIRS を用いて PDD と ADHD の診断・治療効果予測法を開発し、その見通しを得た。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwabara H, et al., Decreased prefrontal activation during letter fluency task in adults with pervasive developmental disorders: a near-infrared spectroscopy study. Behav Brain Res 172: 272-277, 2006.

Kono T et al., Multiple-time replicability of near-infrared spectroscopy recording during prefrontal activation task in healthy men. Neurosci Res, in press.

2. 学会発表

川久保友紀、桑原斉、笠井清登：自閉症スペクトラム障害の脳機能画像. 第 36 回日本臨床神経生理学会、シンポジウム、横浜、2006 年 11 月 30 日

発達障害における行動表現型に関する研究 2 —自閉症状と ADHD 症状に関する体系的調査—

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
研究協力者 渡辺慶一郎 東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部 特任講師
金樹英 東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部 特任助手
桑原斉 東京大学大学院医学系研究科 精神医学

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、明確に知的遅れを伴わない4~16歳の外来患者71名(平均10.1歳；男52名、女19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 の得点との相関をみると、自閉症状、特にコミュニケーションの質的障害が ADHD 症状、特に不注意と独立していることが再確認された。

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でもほぼ同様である。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体系的な調査を行って検討した。

B. 研究方法

東京大学医学部附属病院「こころの発達」診療部を平成18年4月から11月に初診した患者について診療で得られたデータを体系的に収集して解析した。この期間の全初診患者215名中で、明確な知的遅れを伴わない(特殊学級に通っておらず、文章を話す)4~16歳の71名を本研究の対象とした。初診にあたっては、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)という3種類の質問紙の記入を親に依頼している。CBQ-Rは自閉症でよく見られる症状を尋ねており、45項目中19項目は自閉症の3主徴に対応する。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32項目で合計した得点で13/14が自閉症のカットオフという。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、総得点が16点以上でADHDの疑いが強いという。CBCLは多様な行動症状について尋ねている。なお、初診で得られたデータを解析しており、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

71名の平均年齢は10.1歳(SD: 3.3)、性別は男52名、女19名であった。初診時診断は、PDDが23名、ADHDが12名、チック障害(PDD及びADHDを伴わない)が22名、その他が14名であった。

CBQ-Rの32項目の平均得点は、PDDで10.3、ADHDで10.5、チック障害で5.7、その他で5.4であった。ADHD-RS-IVの平均総得点は、PDDで18.8、ADHDで29.2、チック障害で10.0、その他で12.0であった。PDD、ADHD、チック障害の3群間では、CBQ-Rの32項目の合計得点、対人的相互反応の6項目の得点、その他の13項目の得点で有意差が認められ、チック障害で低かった($p=0.041$, $p=0.004$, $p=0.021$, 分散分析)。

PDD及びADHD計35名でCBQ-RとADHD-RS-IVとの相関をみると、CBQ-Rのコミュニケーションの7項目の得点は、ADHD-RS-IVの不注意得点、多動性—衝動性得点、総得点のいずれもと有意に相関しなかった。対人的相互反応の6項目の得点及び興味と活動の偏りの6項目の得点は、不注意得点と有意に相関しなかった。

また、CBQ-R得点とADHD-RS-IV得点のカットオフの組み合わせから、両低得点群10名、低CBQ-R/高ADHD-RS-IV群13名、高CBQ-R/低ADHD-RS-IV群3名、両高得点群9名に分かれた。低CBQ-R/高ADHD-RS-IV群ではADHDが46.2%と低かったが、高CBQ-R/低ADHD-RS-IV群ではPDDが100%であった。CBCLの下位尺度、内向尺度、外向尺度及び

総得点はこの4群間で大差はなかった。

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、特に不注意と独立していることが再確認された。自閉症状とADHD症状という2つのディメンジョンの組み合わせで行動特徴を検討したが、少なくともCBCLで昨年度に認められたような行動症状の相違は確認されなかった。明確な知的な遅れを伴わない場合には、自閉症状がより軽くなりカットオフについて再検討がいるのかもしれない。また、年齢についても考慮すべきと思われた。

自閉症状もADHD症状も単一のディメンジョンとは言いがたいので、症例数を増やしながら、自閉症の3主徴や不注意、多動性—衝動性などに分けた上でそれらの組み合わせによる検討を深めたい。

今後は症例を蓄積すると共に、初診から1年後も通院を継続している者について診断変更の有無も含めて検討を加えたい。

G. 研究発表

金生由紀子. トウレット症候群 (太田昌孝) 発達障害, 日本評論社, 東京, 2006, 127-142

金生由紀子. ADHDの子どもへの発達支援. 教育と医学 54(5):437-444, 2006

金生由紀子. 児童期精神医学の現在 医学のあゆみ 217(10):923-927, 2006

金生由紀子. 高機能広汎性発達障害 臨床精神医学 35(8):1143-1145, 2006

小平雅基, 金生由紀子: 反抗挑戦性障害、行為障害. 小児内科 38 巻増刊: 748-749, 2006

桑原齊，金生由紀子，加藤進昌：発達障害の生物学的研究の現状とわが国における研究の方向性．脳と精神の医学 17(1)：341-351, 2006

高橋礼花，小尾央桂，金生由紀子：思春期のうつ病に SSRI は有効か？ EBM 小児疾患の治療（五十嵐隆ほか編），中外医学社，572-577, 2007

広汎性発達障害の分子遺伝学的研究に関する研究

分担研究者 難波 栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

研究要旨；

ヒスチジンの長さの多型をもつ HOXA1 遺伝子により細胞機能が障害され、神経分化の異常が引き起こされることが明らかになった。この多型は精神神経疾患の新たな原因になる可能性が示された。また、自閉症状を呈するレット症候群 40 検体のうち解析可能な 12 検体について MECP2 遺伝子ならびに DLX5 遺伝子のアレル特異的な発現を検討した。12 検体のうち 5 検体は MECP2 遺伝子の MBD 内に変異があり、6 検体は TRD 内に変異が認められた。MBD 内に変異を有する検体では変異 MECP2 アレルの発現が低いことから、この変異は細胞の増殖を抑制することが示唆された。また、TRD 内に変異のあり変異アレルの発現が高い検体では DLX5 遺伝子が両アレルで発現しており、刷り込み異常が示唆された。さらに、自閉症に関連すると考えられる染色体 2 番と 7 番の領域に存在する 31 遺伝子と 36 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化解析を行い、メチル化のバリエーションを示す興味ある領域のデータを得つつある。

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。本年は、正常および自閉症検体に見いだされたヒト HOXA1 遺伝子内のヒスチジン長多型の検討を行い、核内凝集体形成および神経分化に対する興味深い知見を得たので報告する。また、自閉症状を特徴の一つとするレット症候群の研究を行った。レット症候群は、methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) 遺伝子の変異によって生じる X 連鎖性優性遺伝の進行性神経疾患で女兒に発症する。MECP2 遺伝子はメチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) ならびに転写抑制ドメイン (TRD) を有し、転写抑制に重要な役割を担っている。近年、この MECP2 遺伝子の標的として、父性に刷り込みを受ける distal-less homeo box 5 (DLX5) 遺伝子が明らかとなり、Mecp2 欠損マウスならびに患者由来リンパ芽球細胞において DLX5 遺伝子の刷り込み異常が報告された。DLX タンパク質は神経伝達物質である抑制性 γ -アミノ酪酸 (GABA) を合成する *GAD67* の発現を誘導することや、GABA 作動性ニューロンの

神経分化への関与が示唆されていることなどから、本疾患の発症機構の一つとして着目されている。今回は、DLX5 遺伝子の刷り込み異常を誘引する MECP2 遺伝子の変異タイプと DLX5 遺伝子の刷り込み異常の関係を検討した。さらに、自閉症の発症機構としてエピジェネティクスの関与が着目されている。遺伝子のメチル化による発現制御はエピジェネティクスの重要なメカニズムの一つである。今回は、プレリミナリーな検討として染色体 2 番と 7 番の領域に存在する 31 遺伝子と 36 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化の検討を行った。

B. 研究方法

HOXA1 遺伝子のヒスチジン長多型の検討

ヒト HOXA1 cDNA 発現ベクターは C 末 Green fluorescence protein (GFP) 融合させた HOXA1 を CMV プロモーター下流に組み込んだ (pHOXA1-GFP)。トランスフェクションには培養 COS7 細胞またはヒト神経芽細胞腫細胞株 SK-N-SH にリポフェクション法により行っ

た。HOXA1 転写活性の測定は pHOXA1、pPBX1、pAdMLAre をコトランスフェクション後、ルシフェラーゼアッセイにより行った。オートファジー誘導はラパマイシンを、SK-N-SH 細胞の神経分化誘導はレチノイン酸をそれぞれ培養液に添加した。

レット症候群の検討

本邦におけるレット症候群患者由来のリンパ芽球細胞 40 検体を使用した。まずこれらの細胞のゲノム DNA を用いて、DLX5 遺伝子内に存在する C7/C8 の単一塩基リピートの多型を PCR 法で解析することにより多型を有する細胞を選出した。この多型を有する細胞を用いて、MECP2 遺伝子の変異アレルの発現ならびに DLX5 遺伝子の刷り込みの状態を RT-PCR 法ならびにダイレクトシーケンス法により解析した。

メチル化の検討

自閉症に関連する新規刷り込み遺伝子の同定と自閉症における DNA のメチル化状態の解析を目的に刷り込み候補遺伝子、自閉症の候補遺伝子および精神疾患等と関連が示唆されている合計 25 遺伝子の転写開始領域近傍に存在する CpG アイランドについて解析を行った。DNA のメチル化はバイサルファイトダイレクトシーケンス法により行った。解析には正常脳組織 5 検体、正常リンパ芽球 11 検体、自閉症患者由来リンパ芽球 16 検体を用いた。

(倫理面への配慮)

自閉症の検体およびメチル化検討の材料は鳥取大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て研究に使用した。HOXA1 遺伝子の研究は鳥取大学組換え DNA 安全委員会の承認を得ている。レット症候群の解析に使用した検体は愛媛大学・鳥

取大学にて倫理審査を経て、研究への使用が承認されたものである。試料提供を受ける際には口頭および文書で十分な説明を行い、研究への使用の明確な同意を得たものである。

C. 研究結果

HOXA1 遺伝子のヒスチジン長多型の検討

正常 HOXA1 蛋白質(10 ヒスチジンリピート)は核内に均一に局在するのに対し、伸長多型 11、12 リピートは核内に凝集体を形成した(図1)。この凝集体形成はラパマイシン添加により抑制された(図2)。HOXA1 転写活性は伸長多型 11、12 リピートで正常に比べ顕著な活性低下が見られた(図3)。また、レチノイン酸誘導神経細胞分化は、7、11、12 リピート多型において抑制された(図4)。

レット症候群の検討

レット症候群患者由来のリンパ芽球細胞 40 検体のうち、DLX5 遺伝子の刷り込み状態の解析が可能な多型は 12 検体にみられた。これら 12 検体のうち 5 検体は MBD 内に、6 検体については TRD 内に、残り 1 検体については MBD と TRD の間の領域に変異を有していた。MECP2 遺伝子のアレル特異的な発現を解析したところ、解析可能な 12 検体のうち 7 検体において、変異 MECP2 アレルの発現がみられなかった。DLX5 遺伝子内の C7/C8 一塩基リピート多型を利用した発現解析では、12 検体のうち 5 検体で刷り込み異常が生じ父性の刷り込みが失われていた。特に変異アレルの発現の最も強かった TRD ドメイン内に変異をもつ検体 RTT217 では DLX5 の刷り込みが完全に消失し、両アレル発現を示していた。

メチル化の検討

多くの遺伝子においては正常脳組織、正常リンパ芽球における CpG アイランドは非メチ