

表1: CBQ-RとADHD-RS-IVとの相関

	ADHDRS_AD	ADHDRS_Hyp	ADHDRS_T
CBQR_1_32	.208 *	.363 ***	.294 **
CBQR_1_45	.272 **	.385 ***	.337 **
CBQR_1_7	.004	.242 *	.127
CBQR_8_13	.120	.120	.096
CBQR_14_19	.201	.356 **	.307 **
CBQR_20_32	.314 **	.423 ***	.389 ***
CBQR_20_45	.384 ***	.447 ***	.433 ***

ADHDRS\_AD: 不注意得点 ADHDRS\_Hyp: 多動性・衝動性得点

ADHDRS\_T: 総得点

CBQR\_1\_32: 32項目合計得点 CBQR\_1\_45: 45項目合計得点

CBQR\_1\_7: コミュニケーション障害得点 CBQR\_8\_13: 対人関係障害得点

CBQR\_14\_19: 興味と活動の偏り得点 CBQR\_20\_32: 随伴問題行動得点

CBQR\_20\_45: 随伴問題行動得点(拡大)

Spearmanの相関係数 \*\*\*: p=0.000 \*\*: p<0.01 \*: p<0.05

表2: CBQ-RとADHD-RS-IVの組み合わせによる4群におけるCBCLのT値

	両低 両症状弱 N=18		低CBQ高ADHD ADHD症状のみ強 N=35		高CBQ低ADHD 自閉症状のみ強 N=10		両高 両症状強 N=24		b)	a)		
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD				
I ひきこもり	59.5	8.2	63.2	7.6	<u>72.8</u>	10.7	**	66.5	10.4	*	**	
II 身体的訴え	55.7	6.7	55.7	7.8	62.7	15.8		60.7	9.3		+	
III 不安/抑うつ	59.8	10.0	63.8	9.1	<u>70.5</u>	14.7	+	65.4	10.1		+	
IV 社会性の問題	62.7	9.8	66.7	9.0	<u>68.4</u>	7.8		<u>73.5</u>	10.8	**	**	
V 思考の問題	54.4	4.9	64.6	10.3	**	<u>74.4</u>	13.0	***	<u>69.9</u>	10.9	***	***
VI 注意の問題	58.6	7.0	<u>68.6</u>	6.3	***	<u>67.2</u>	6.8	*	<u>72.3</u>	8.6	***	***
VII 非行的行動	57.5	8.1	63.1	10.0		58.2	8.2		<u>67.5</u>	9.2	*	**
VIII 攻撃的行動	58.0	8.3	<u>67.7</u>	9.5	**	60.9	10.6		<u>67.8</u>	11.5	*	**
内向尺度	59.6	9.6	63.8	8.3		<u>71.2</u>	13.0	*	66.0	8.9		*
外向尺度	56.4	10.6	<u>68.4</u>	10.6	**	59.4	13.1		<u>69.6</u>	12.4	**	**
総得点	59.8	9.9	<u>68.5</u>	6.6	**	<u>70.1</u>	11.3	*	<u>72.7</u>	9.8	***	***

a): 4群間の比較(分散分析) b): 両低群と各群との比較(多重比較: Tukey) \*\*\*: p=0.000 \*\*: 0<0.01 \*: p<0.05 +: p<0.1  
太字下線: 病理域 太字斜体: 境界域

## 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：

自閉症におけるエピジェネティクスの関与に着目し、今までに関連が示唆された 151 遺伝子のメチル化解析を行った。自閉症検体のみに明らかなメチル化異常を示す遺伝子はなかった。しかし、メチル化に個体差のみられる遺伝子は 38 存在し、これらの中で自閉症検体と正常対象の検体でメチル化の程度に差があると考えられる遺伝子を見出した。さらに、これらの遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法によって比較したところ、2 遺伝子では自閉症検体の方が遺伝子発現が低下しており、3 遺伝子については遺伝子発現が高い傾向を認めた。これらの遺伝子と自閉症との関連をさらに検討し、診断法や治療法につなげてゆく予定である。

### A. 研究目的

本年度は、DNA メチル化を進めてきた。DNA メチル化はエピジェネティクスの中でもよく知られている遺伝子発現制御機構の一つであり、精神疾患の発症機構としても着目されている。自閉症では、7 番、9 番、15 番染色体で親由来の連鎖不均衡を示す領域が存在することや、これらの領域の CNV (copy number variation) が自閉症に関連する可能性が報告されている。これらの領域には、エピジェネティクスのメカニズムの一つであるゲノム刷り込み遺伝子が多く存在している。さらに、15q13 染色体領域の母方由来の部分的重複が自閉症で多いという報告もある。我々は、このエピジェネティクスの中でも特に DNA メチル化に着目し、自閉症におけるエピジェネティ

クスの異常を明らかにすることを目的として網羅的なメチル化解析を行った。

### B. 研究方法

1. 解析対象となる遺伝子  
連鎖解析で自閉症に関連することが複数の論文で報告されている 2 番、7 番、X 染色体、さらに染色体の部分重複が報告されている 15 番染色体長腕の領域で脳の機能に重要と考えられる 151 遺伝子を対象とした (図 1)。

2. DNA メチル化解析  
151 遺伝子のプロモーター領域近辺に位置する CpG アイランドのメチル化様式を、bisulfite direct sequencing 法により検討した。最初に、自閉症、正常対照からそれ

ぞれ 8 検体のリンパ芽球様細胞株を選んだ。

### 3. 発現量の検討

DNA メチル化解析により自閉症と正常対照で差がある可能性のある 46 遺伝子について遺伝子発現を検討した。リアルタイム PCR 法による遺伝子発現定量解析を行った。遺伝子発現定量解析には、自閉症 33 検体、正常 32 検体のリンパ芽球様細胞株を使用した。

#### （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。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

DNA メチル化解析の結果、84 遺伝子は正常対象、自閉症検体ともにメチル化をほとんど受けなかった（非メチル化）。5 遺伝子では、正常対象、自閉症検体ともにメチル化を強く受けていた。ゲノム刷り込み遺伝子の存在を示唆する differentially methylated region(DMR) (図 2) を示す遺伝子は既知の刷り込み遺伝子を含め 10 存在した。また、半数以上の検体でメチル化出現率が 10%を超える領域を「メチル化様式に個体差を認める領域」(Methylation Variable Positions 図 2) と定義すると、2 番染色体に 7 箇所、7 番染色体に 13 箇所、15 番染色体に 5 箇所、その他の染色体上に 13 箇所の計 38 箇所がそれにあてはまった。こ

れら個体差を認めた領域をもつ遺伝子、刷り込み候補ならびに既知の刷り込み遺伝子、計 48 遺伝子についてリンパ芽球様細胞株での遺伝子発現を検討した結果、33 転写物が解析可能であった。自閉症 33 検体、正常 32 検体を用い、リアルタイム PCR 法による発現量の比較解析を行ったところ、これまでに 2 遺伝子において罹患群における有意な発現量の低下を、3 遺伝子については有意な発現量の上昇を認めている。その例を図 3 に示す。現在さらに多くの検体で解析を検討中している。

### D. 考察

エピジェネティクスに注目して研究を行っているが、ゲノムインプリンティングを示す遺伝子は決して多くないことが明らかになってきている。しかし、今回の検討でメチル化の個体差を示す遺伝子が多数あることが明らかになり、それらの遺伝子に注目して研究を進めた。CpG アイランド領域のメチル化の変化は、遺伝子発現を変化させ疾患を引き起こす直接の引き金になることが予想される。今回、個体差を示した遺伝子を検討したところ 5 遺伝子で自閉症と正常対象の間で遺伝子発現に差があることが示された。これらの遺伝子は自閉症の発症に直接関わる重要な遺伝子と考えられるが、芽球化や培養による遺伝子発現変化の可能性、また性差や年齢など多くの要因も加味してさらに慎重に検討を行う必要がある。近年、さまざまな疾患がメチル化の個人差によって発症する可能性が示唆されており、そのためにエピゲノムプロジェクトも立ち上がっている。

今後さらに検討を行い、自閉症の診断や

治療法の開発を行ってゆく予定である。

## E. 結論

- A. エピジェネティクスに重要な 2,7,15 番染色体のメチル化の解析を行った。
- B. 検討した 151 遺伝子のうち 10 遺伝子が刷り込み候補、38 遺伝子に個体差が認められた。
- C. 個体差を示す 5 遺伝子で自閉症に有意な遺伝子発現量の変化が認められた。
- D. 今後、メチル化の個体差に着目し研究を進める。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kato C, Tochigi M, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim S-Y, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T. Association study of the commonly recognized breakpoints in chromosome 15q11-q13 in Japanese autistic patients. *Psychiatric Genet* (in press)

Kato C, Tochigi M, Ohashi J, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim S-Y, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T. Association study of the 15q11-q13 maternal expression domain in Japanese autistic patients. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatric Genet)* (in press).

Francks C, Maegawa S, Laurén J, Abrahams BS, Velayos-Baeza A, Medland

SE, Colella S, Groszer M, McAuley EZ, Caffrey TM, Timmusk T, Pruunsild P, Koppel I, Lind PA, Matsumoto-Itaba N, Nicod J, Xiong L, Joobor R, Enard W, Krinsky B, Nanba E, Richardson AJ, Riley BP, Martin NG, Strittmatter SM, Möller HJ, Rujescu D, St Clair D, Muglia P, Roos JL, Fisher SE, Wade-Martins R, Rouleau GA, Stein JF, Karayiorgou M, Geschwind DH, Ragoussis J, Kendler KS, Airaksinen MS, Oshimura M, Delisi LE, Monaco AP. LRRTM1 protein is located in the endoplasmic reticulum (ER) in mammalian cells. *Mol Psychiatry*. 2007;12(12):1057.

Tochigi M, Kato C, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim SY, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T. No evidence for significant association between GABA receptor genes in chromosome 15q11-q13 and autism in a Japanese population. *J Hum Genet*. 2007;52(12):985-9.

Francks C, Maegawa S, Laurén J, Abrahams BS, Velayos-Baeza A, Medland SE, Colella S, Groszer M, McAuley EZ, Caffrey TM, Timmusk T, Pruunsild P, Koppel I, Lind PA, Matsumoto-Itaba N, Nicod J, Xiong L, Joobor R, Enard W, Krinsky B, Nanba E, Richardson AJ, Riley BP, Martin NG, Strittmatter SM, Möller HJ, Rujescu D, St Clair D, Muglia P, Roos JL, Fisher SE, Wade-Martins R, Rouleau GA, Stein JF, Karayiorgou M, Geschwind DH, Ragoussis J, Kendler KS, Airaksinen MS,

Oshimura M, Delisi LE, Monaco AP. LRRTM1 on chromosome 2p12 is a maternally suppressed gene that is associated paternally with handedness and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2007;12(12):1129-39.

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 gene polymorphism and autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(4):940-3.

Florice F, Higaki K, Maki H, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K. Antisense suppression of TSC1 gene product, hamartin, enhances neurite outgrowth in NGF-treated PC12h cells. *Brain Dev*. 2007;29(8):502-9.

Marui T, 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*. 2007;29(8):510-3.

Itaba-Matsumoto N, Maegawa S, Yamagata H, Kondo I, Oshimura M, Nanba E. Imprinting status of paternally imprinted DLX5 gene in Japanese patients

with Rett syndrome. *Brain Dev*. 2007;29(8):491-5.

## 2.学会発表

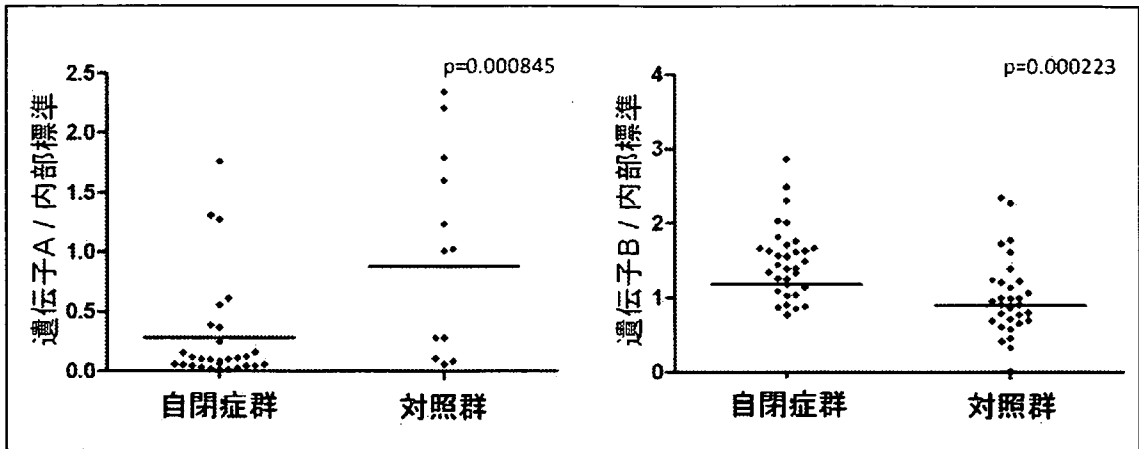
Eiji Nanba: Biological studies of autism spectrum disorders-experience of Korea and Japan. Genetic study of autism in Japan. 13<sup>th</sup> International Congress Bridging the Gaps. Integrating Perspectives in Child and Adolescent Mental Health ESCAP. Florence 2007年8月25日～29日

難波栄二：自閉症の臨床から脳科学への接近 「臨床医学から分子生物学へ」 第30回日本神経科学大会 Neuro2007 横浜 2007年9月10日～12日

大塚晋、板場則子、前川真治、押村光雄、難波栄二：自閉症候補領域に存在する遺伝子の DNA メチル化状態の解析。第52回日本人類遺伝学会、東京、2007年9月13日～15日



図 3



## 自閉症者のsensorimotor gatingに関するpreliminary study —prepulse inhibition (PPI)とfunctional MRIを用いて—

分担研究者 松本英夫 東海大学医学部付属病院 専門学系精神科 教授

### 研究要旨：

音などによる突然の強い感覚刺激の提示はヒト、ラットおよびマウスに驚愕反応を引き起こすことが知られている。しかしこの突然の強い感覚刺激によって引き起こされる驚愕反応が、刺激を与える直前に、それ自身では驚愕反応を引き起こさない程度の弱いプレパルス刺激 (prepulse) をあらかじめ負荷することにより低下する現象が確認されており prepulse inhibition (PPI) と呼ばれている (Hoffman & Ison, 1980)。このPPIはほとんどの健常者、正常なラットおよびマウスで認められる原始的な反応だが、統合失調症、強迫性障害、トゥレット障害などで減弱する報告がされており、数少ない生理学的な異常を示す反応として繰り返し報告されている (Braffら, 2001)。PPI の異常は、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ようになった。

自閉症とPPIに関してはMcAlonanら (2002) がアスペルガー障害でPPIが減弱し、前頭一線条体と小脳の灰白質量の有意な減少が認められることを報告しているのみである。そこで今回は自閉症者の知覚運動閉門 (sensorimotor gating) に関する研究の一環として、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。

また、聴覚刺激に対する脳内の活性部位とPPIをfMRIを施行し比較する。これにより自閉症における原始的神経回路の働きを評価できると考える。

### 対象および方法

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。本研究は東海大学医学部倫理委員会の承認を

得ており、研究への参加の同意は文書にて取得した。

実験は以下の2段階で行った。

第1段階：ヘッドホンより聴覚刺激を提示し、驚愕反応を計測するために瞬目反射 (blink reflex: BR) と交感神経皮膚反応 (galvanic skin response: GSR) を使用す



る。

第2段階：MRI装置内に横たわった被験者に、ヘッドホンより聴覚刺激を提示する。聴覚刺激に対する反応の確認としてGSRを使用する。MRIは東海大学附属病院MRIセンターの1.5T Philips社製MRI装置を使用する。

#### 第1段階

①聴覚刺激は図1のようにpulse：100 dB、2000Hz、40msec prepulse：70 dB、2000Hz、20msecの音を増幅器を介して、MRI室で使用できるヘッドホンから提示した。prepulse と pulseの間隔は30msec、60msec、120msec、240msecとする。聴覚刺激の間隔は15秒～60秒間でランダムに提示する。

②瞬目反射(blink reflex：BR)は左眼輪筋に電極を装着し筋電図を測定する。

③交感神経皮膚反応(galvanic skin response：GSR)は左手第三指に装着する。

#### 第2段階

標準脳に写像するために、まず全脳をT1強調画像で3mmスライスで撮像し、続いてevent-related functional MRI (fMRI) を施行した。撮像条件は小脳テントに平行に、スライス厚4 mm, gap 1.7 mm, 16 slices, FFE, single shot EPI, TR 3000 msec, TE 50 msec, flip angle 90°, FOV 230, Matrix size 64 x 64, 88回測定した。聴覚刺激はpulse、prepulse-pulse、pulse、prepulse-pulseの順で3、23、43、65スライス目にそれぞれ提示した。prepulse-pulseの間隔は120msで行った。fMRIで得られたデータについて

は3次元的画像解析 (statistic parametric mapping: SPM) を用いて標準脳図譜上への写像による解剖学的標準化と各座標ごとの統計学的検討を施した。

#### 結果

f MRI施行時に聴覚刺激に対する反応をGSRで確認できなかった高機能自閉症者2名、健常者1名は対象から除外した。図2で示したように健常者群ではprepulse-pulse間隔60msecからPPIを明確に認めたものの、自閉症群では120msecにおいて始めて減弱していた。

f MRI上では、健常群では自閉症群に比べてprepulse刺激で、優位半球の側頭葉から辺縁系にかけて賦活領域が有意に見られた。このことは自閉症でのPPIの減弱が辺縁系の機能異常と関連していることを示唆している。

#### 考察

高機能自閉症ではPPIの減弱が認められる。自閉症では単音の聴覚刺激に対する反応が健常者と異なり、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している。

#### 参考文献

Braff, D.L., Geyer, M.A. & Swerdlow, N.R.: Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* (2001) 156; 234-258.

Hoffman, H.S., & Ison, J.R.: Reflex modification in the domain of startle. 1: Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psycho. Rev.* (1980) 2; 175-189.

McAlonan, G.M., Daly, E., Kumari V., et al.: Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger's syndrome. *Brain* (2002) 125; 1594-1606.

Hugo D. Crischley, Eileen M. Daly., et al.: The functional neuroanatomy of social behavior changes in cerebral blood flow when people with autistic disorder process facial expressions, *BRAIN* 123: 2203-2212, 2000.

Kumari, et al.: Structural brain correlates of PPI of the acoustic startle response in healthy humans, *NEUROIMAGE* 26: 1052-1058, 2005

Ring HA, Baron-Cohen.: Cerebral correlates of preserved cognitive skills in Autism, *Brain* 122: 1305-1315, 1999

Baron Cohen, Ring HA.: The amygdale theory of autism, *Neurosci Biobehav Rev* 24(3):355-64, 2000

Perry W, et al. Sensorimotor gating deficits in adults with autism, *Biological Psychiatry* 61: 482-486, 2007

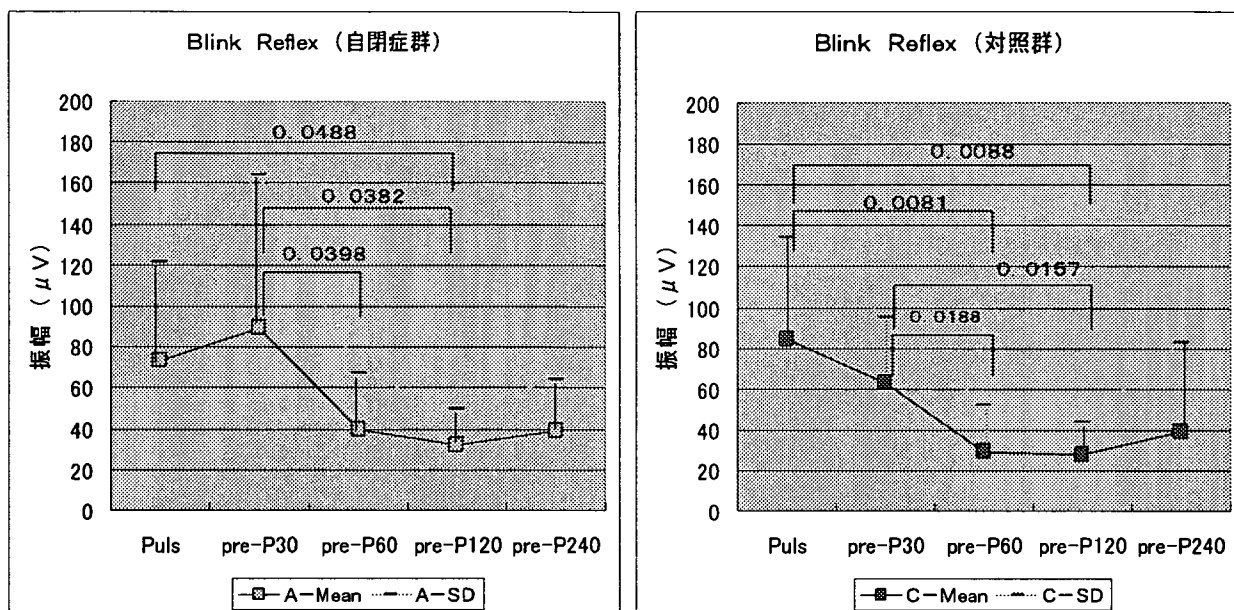


図 1

眼輪筋反射によるPPI反応。 健常対照群(右図)ではprepulse-pulse間隔60msecからPPIが明らかだったのに対し、自閉症群(左図)では60msecではPPIの減弱に有意差を認めず、120msecで有意差を認め(p<0.005)、先行研究と同様にPPIの減弱が確認された。

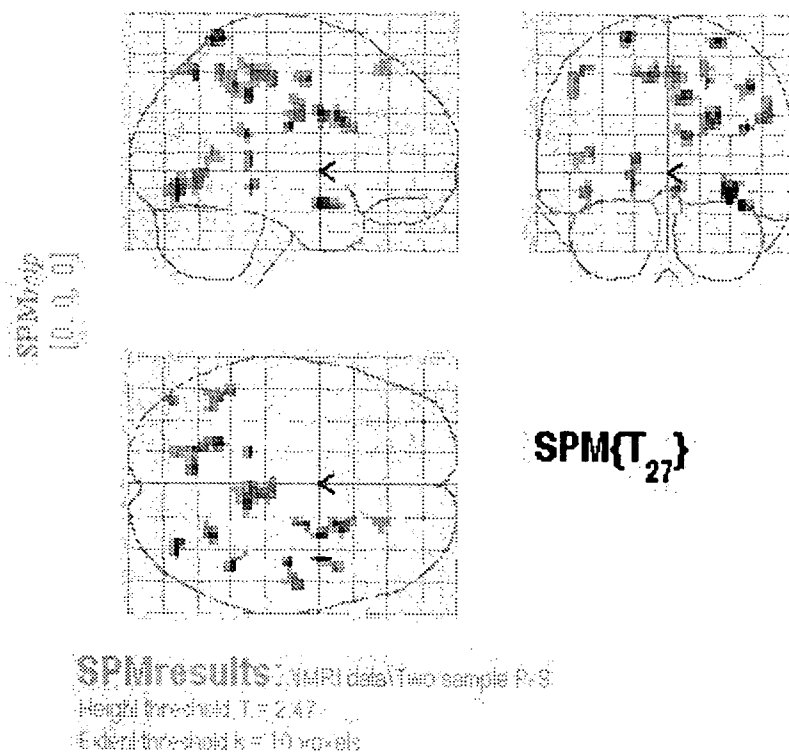


図 2

fMRI上では、健常群では自閉症群に比べてprepule刺激で、優位半球の側頭葉から辺縁系にかけて賦活領域が有意に見られた ( $p < 0.005$ )。

## 広汎性発達障害、注意欠陥多動性障害に対する遺伝子解析研究

分担研究者 山本賢司 北里大学医学部精神科学 講師

### 研究要旨；

広汎性発達障害や注意欠陥多動性障害は多因子遺伝性疾患であり、その原因候補遺伝子（群）の同定は、障害の原因や病態を明らかにしていく上で重要である。今回、われわれは本研究に対する同意の得られた自閉性障害患者およびその家族（n=104 trios）の DNA サンプルを用い、自閉症の原因候補領域である 2q 領域の遺伝子の中で CACNB4（Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit）遺伝子と SCN1A（Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit）遺伝子について解析（連鎖不均衡伝達テスト、Transmission Disequilibrium Test）を行った。どちらの遺伝子も有意な相関を示す結果は得られなかった。また、CACNB4 についてはてんかんの関係が報告されている点突然変異の解析を行ったが、患者群にはこの変異を有する症例は存在しなかった。また、自閉性障害、注意欠陥多動性障害についても遺伝子解析を進めていくために、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行うプロトコルを策定した。今後はどちらの障害についても、サンプルの収集を行いつつ、解析を進めていく予定である。

### A. 研究目的

小児期に明らかとなることが多い広汎性発達障害（Pervasive Developmental Disorder、以下 PDD）や注意欠陥多動性障害（Attention Deficit Hyperactivity Disorder、以下 AD/HD）については、その病因・病態に関して今日までに様々な研究報告がなされている。中でも、家族研究や双生児研究の結果は、これらの障害に遺伝的な要因の関与があることや、それらが多因子遺伝疾患であるということを明らかにしてきた。

近年行なわれた PDD に対する連鎖解析

の結果として、染色体の 2q, 7q, 15q, Xp 領域などが自閉性障害（Autistic Disorder、以下 AD）の原因候補領域として挙げられている。それ以外にもいくつかの領域が挙げられているが、人種間での結果の相違などもあり、未だ結論が得られていない。また、AD の生化学的な研究から各種神経伝達物質と AD の病因・病態などが今日までに数多く報告されており、それら神経伝達物質の動態に関連する蛋白の遺伝子と AD との相関に関する報告も今日までに数多くなされているが、実際に原因となる蛋白・遺伝子の同定はなされていない。

一方、AD/HDについては染色体上の4p, 5p, 6q, 11p, 16p, 17p領域などが原因候補領域として挙げられており、ADと同様に神経伝達物質の受容体蛋白質の遺伝的多型との相関などが報告されている。

われわれは今日までの知見を踏まえ、①ADの原因候補領域に位置し、ADの病態への関与が想定される遺伝子の解析、②ADの病態に関与する神経伝達物質の動態に関連する蛋白の遺伝子解析、③神経発達の観点から、胎生期・器官形成期に脳の発育に関与する遺伝子の解析などを行ってきた。近年はAD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）、SCN1A（Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit）遺伝子とADとの関係を明らかにするために以下の研究を行った。また、AD、AD/HDについてはマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析による原因候補遺伝子の絞込みを検討しており、そのプロトコルを策定した。

## B. 研究方法

### DNAサンプルの収集

#### 1. 対象

東海大学病院精神科外来に通院中で、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition（以下、DSM-IV, American Psychiatric Association）、International Classification of Disease（以下、ICD-10, World Health Organizat

ion）の2つの診断基準を用い、2名の児童精神科医により、ADと診断された患者（男性9名、女性12名。平均年齢17.4±10.5歳）およびその両親を対象にした。口頭および書面を用いて本研究に対するインフォームド・コンセントを行ったが、AD患者本人から同意が得られない場合にはその両親から同意を得た。

#### 2. 血液採取

上述の自閉症性障害患者およびその両親、健常対照者から静脈血20ccを通常の方法で採血した。

#### 3. DNAの抽出とセルライン化

得られた血液10ccから標準的な方法でDNAを抽出し、残りの10ccをEpstein-Barr virusによってリンパ球を形質転換し、セルライン化して保存した。

### 遺伝子解析

#### 1. ADの原因候補領域である2q領域に存在する遺伝子の選定と解析方法

National Center of Biotechnology Information (NCBI) のホームページ上にある Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) の OMIM gene map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmap.cgi>) から2q31-33領域に存在する遺伝子を明らかにし、その遺伝子のプロフィールなどから、CACNB4とSCN1Aを選定した。CACNB4とSCN1A 遺伝子に存在するSNPはやはりNCBIのホームページから情報量が豊富なSNPを1つの遺伝子について3つずつ選定した。Genotypingや統計解析については従来から報告されている方法で行

った。

CACNB4については、従来からてんかんと関連が示唆されているC104FやR482Xの2つの変異について(Escayg A et al., Am J Hum Genet, 66, 1531-1539, 2000)、AD患者30例に対して、ダイレクトシーケンスによって確認を行った。

## 2. AD/HDに対するマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析のプロトコル策定

疾患や障害の原因候補遺伝子を同定するために、近年はマイクロアレイを用いた研究が行われるようになってきている。今回、われわれはAffymetrix社のGenechipを用い、既知の遺伝子について発現量情報を得ることでAD/HDの原因候補遺伝子(群)の同定する方法について検討し、一卵性双生児のサンプルを用いたプロトコルの策定をした。

### (倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究であり、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日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守することを前提として、東海大学・北里大学に設置されている両施設の倫理委員会の承認をすでに受けている。

## C. 研究結果

### 1. ADに対する2q領域の遺伝子解析

#### TDT解析

##### CACNB4 遺伝子

SNP ID	Location	Results
rs6433680	Intron 12	n.s.
rs3768655	Intron 10	n.s.
rs770609	Intron 5	n.s.

##### SCN1A 遺伝子

SNP ID	Location	Results
rs1542484	intron 7	n.s.
rs6731591	intron 12	n.s.
rs2298771	exon 16	n.s.

CACNB4、SCN1A 遺伝子についてSNP解析を行ったが、いずれも有意な相関を示唆する結果は得られなかった。

#### 点突然変異解析

C104F や R482X どちらの点突然変異もAD患者30例の中には認められなかった。

## 2. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析のプロトコルの概要

対象：一卵性双生児のAD、AD/HDの不一致例。

(可能なら患者はメチルフェニデートでの治療前後でも比較)

方法：

#### サンプリング

一卵性双生児それぞれから採決を行う。

⇒ 一部はDNAを抽出して遺伝子解析へ(Cell line化を含む)

⇒ 一部は新鮮血からRNA抽出し、microarrayを用いたexpression analysis (Cell line化したものを用いる可能性も)

\*現在、一組の一卵性双生児一致例の協力を得て、解析進行中である。

#### 網羅的遺伝子発現解析

Affymetrix社製のGenechip Probe Array(Human Genome U133A 2.0 array)を用いてScanningを行い、解析を行う。

#### D. 考察

今回、AD に対する 2q 領域の原因候補遺伝子として CACNB4 と SCN1A についての解析を行った。

CACNB4 は 2q22-31 領域に位置しており、13 exons から構成され、いくつかの alternative splicing forms の存在が知られている。蛋白は 58 kDa, 520 A.A. で、基礎的な研究では、この蛋白が Synaptotagmin I などと結合して、presynapse での神経伝達物質の分泌に関係していることが示唆されている (Vendel AC et al., J. Neuroscience, 26, 2635-2644, 2006)。また、マウスではこの遺伝子の第一ドメインに点突然変異が入ることで Absence epilepsy や Ataxia などを起こすことが知られており (McEnery MW et al., J Biol Chem, 273, 21435-21438, 1998)、ヒトでもミスセンス変異である C104F や R482X などの存在が Generalized epilepsy, Juvenile myoclonic epilepsy, Episodic ataxia, Migrainous vertigo の家系で報告されている (Escayg A et al., Am J Hum Genet, 66, 1531-1539, 2000; Brevern M et al., Headache, 46, 1136-1141, 2006)。今回、われわれは AD 患者の trios のサンプルを用いて TDT を行ったが、結果としては有意な相関を認めなかった。また、CACNB4 で報告されている点突然変異 C104F や R482X もわれわれが解析した AD 患者の中には存在しなかった。

SCN1A は Sodium channel を構成する蛋白質のひとつである。いくつかのてんかん (generalized epilepsy with febrile seizures plus, Epilepsy, intractable childhood, with generalized tonic-clonic seizures) の患者でこの遺伝子に点突然変

異が報告されており (Baulac, S. et al., Am. J. Hum. Genet. 65: 1078-1085, 1999; Escayg, A. et al., Nature Genet. 24: 343-345, 2000)、また、自閉症家系を用いた Mutation Search で、Coding region に 5 つの coding variants、1 つの branchpoint mutation がみついている (Weiss LA et al., Mol Psychiatry, 8, 186-194, 2003)。今回、この遺伝子についても SNP 解析を行ったが、結果としては有意な相関を示唆する所見は得られなかった。

ヒト染色体の 2q31-33 領域は AD との連鎖が確認されたという報告は今日までに数多くなされている。この領域には神経細胞の発達や分化に必要な転写因子 (TBR-1; T-box brain 1, DLX1,2; Distal-less 1, 2 など) や、細胞の位置情報の担い手である HOX family の遺伝子 (HOXD1-13)、神経細胞内の signal transduction に関係する遺伝子 (cAMP-GEFII; cAMP guanine nucleotide exchange factor II, CHN1; Chmerin1 など) が含まれており、発達障害としての AD の病因や病態を考える上で病因・病態と関連がありそうな遺伝子が数多く存在している。しかし、今のところ原因候補遺伝子として有意な結果を得ているものは少なく、原因遺伝子として同定されるところには至っておらず、今後も更なる解析が期待される。

また、AD、AD/HD については網羅的遺伝子発現解析を行って、原因候補遺伝子(群)の同定を試みた報告は未だに認められていない。こちら今後の研究に期待が持たれる。



## E. 結論

今回、染色体の 2q 領域に存在している CACNB4、SCN1A 遺伝子と AD 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。また、CACNB4 についてはてんかんとの関係が報告されている点突然変異の解析を行ったが、患者群にはこの変異を有する症例は存在しなかった。今後も 2q 領域の解析は積極的に進めていく予定である。一方で、近年の科学技術の進歩に伴う効率的な解析方法の検討や、人種間の相違を比較するための国際共同研究が必要となってくるものと思われる。

## 3. その他

特になし。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし。

### 2. 学会発表

山本賢司、星野俊弥、宮地伸吾、井上勝夫、小石慎子、松本英夫、佐々木司、難波栄二、加藤進昌、宮岡等：自閉性障害と 2q31-33 領域の原因候補遺伝子との関連について。第 29 回日本生物学的精神医学科医学会、第 37 回日本神経精神薬理学会合同大会。2007 年 7 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

## 自閉症症状モデルにおける神経発達とセロトニンの関連についての研究

分担研究者 金井裕彦 滋賀医科大学 精神医学講座 講師（平成 19 年～）

分担研究者 定松美幸 奈良医科大学 精神医学教室 准教授（平成 17・18 年度）

### 研究要旨：

自閉症症状モデルとして、出生から離乳まで抗甲状腺ホルモン剤（プレピオチオウラシル、PTU）を投与し、一過性甲状腺機能低下を起こした神経発達障害モデルを作製した。この PTU 投与モデルは粗大な神経学的異常を示さないが、多動・学習障害・社会行動障害（固執）を示し、高次脳機能障害のモデルとして適している。また、小脳発達では組織学的に明瞭で特異的な神経発達障害を観察することができる。今年度は、セロトニン前駆物質あるいは臨床薬物（SSRI）の投与を平行して行い、自閉症で多く見られる高セロトニン血症の病理学的意義について、小脳における神経構築過程を対象に解析した。

### A. 研究目的

セロトニン神経系はこれまで多くの精神障害治療薬のターゲットとされてきたばかりではなく、自閉症においてもセロトニン・トランスポーターの遺伝子多型の研究から関連性を指摘されていることや、高セロトニン血症が自閉症児に見られることから注目されている。

また、げっ歯類ではひげの触覚と脳皮質に一過性に出現するセロトニン陽性神経細胞群が場所的に対応し、バレル構造を作っていることが知られている。セロトニンを産生可能な raphe nucleus 以外

のこうしたセロトニン陽性細胞はセロトニンを外部から取り込んで蓄積するとされ、セロトニン前駆体（5-hydroxytryptophan; 5-HTP）の投与により、その蓄積が増強し、serotonin reuptake inhibitor (SSRI) によってそれが抑制されることが皮質のバレル構造では示されている。同様に、小脳ではプルキンエ細胞にセロトニンの一過性の細胞内蓄積が見られることが報告されている。

この研究では、小脳を対象にセロトニンの細胞蓄積を操作し、セロトニンの小脳発達への関与を探った。

濃度の PTU を生後から離乳（21 日目）まで投与した。この時期に extragranular cell layer (EGL) における神経細胞の増

### B. 研究方法

新生児ラットに、母乳を介して 0.02%

殖、intragranular cell layer (IGL) への細胞移動に伴うシナプス形成が起こり、離乳期までに完成する。この PTU 投与ラットに 5-HTP (30mg/kg) あるいは、SSRI である Fluoxetine (20mg/kg) を生後 7 日目から 21 日目まで皮下投与した時に起こる変化を行動解析と組織学的解析から検討し、セロトニンの神経発達における役割を検討した。とくに、組織学的解析では小脳虫部の外顆粒細胞の migration とプルキンエ細胞の樹状突起の発達を対象とした。また、3M 以上の各群のアダルトマウスを対象に行動実験を行い比較した。

(倫理面への配慮)

日本神経科学学会の動物実験に関する指針を遵守し、滋賀医科大学動物実験委員会の承認を得て行っている。

### C. 研究結果・考察

離乳に至るまでに、開眼 (14 日頃) が見られ、そして生後の運動機能獲得過程と平行して神経細胞のシナプス構築がおこる。EGL の細胞は外側が S 期のマーカーである PCNA 陽性で増殖が起こり、内側が G 期のマーカーの p27 陽性でプルキンエ細胞の樹状突起とシナプスを形成しながら、IGL に下降して神経系が完成する。このため、多くのイベントが有機的に関連して起こるといえる。

実験結果として、

①分子層の厚みを L5 で計測したところ、PTU 投与ラットでは 5-HTP 投与群では正常と変わらないのに対し、SSRI 投与群ではこれが薄い (Fig. 1)。

②Fig. 2, 3 はカルビンジン (FITC) によりプルキンエ細胞を染色したものである。PTU 投与ラットの 7 日目ではプルキンエ細胞の樹状突起の分岐が少なく (Fig. 2)、14 日目では Fig. 3 の矢印に示すように EGL 内へ樹状突起の異常伸長 (ingrowth) が認められた (Fig. 3)。これは小脳の前部 (1-4 葉) で明瞭であり、EGL の migration に遅れが PTU 投与モデルで認められることはよく知られているが、migration が最も遅れる部位は L5-7 であり、ingrowth は 5-7 葉や後部には少なく、migration に遅れのみでは説明できない。

③さらに、この異常伸長はセロトニン前駆体 5-HTP の投与で促進され、SSRI の投与で抑制された (Fig. 3A, B)。カルビンジンとシナプトフィジンとの 2 重染色ではこうした異常な突起には成熟したシナプスは (光学顕微鏡レベルでは) 認められず、PTU 投与が中止され migration が完成すると EGL 自体がなくなるため、プルキンエ細胞自体は光学的顕微鏡レベルでは正常と区別できなくなった (図は省略)。

④PTU モデルでは、小脳構築の完成過程前半に一過性に発現する異所性セロトニンは、時期が遅れて現れ 14 日目にも認められる。皮質のバレル構造同様に、セロトニン前駆体 (5-hydroxytryptophan; 5-HTP) の投与により、プルキンエ細胞にセロトニン蓄積が増強し、逆に serotonin reuptake inhibitor (SSRI) によってそれが抑制されることが認められた (Fig. 3C)。

⑤最後に、このプロトコールではアダルトマウス(3M)における対照群、PTU 投与群ともに 2 週間の vehicle、SSRI、または 5-HTP の薬物投与による行動実験上の群間差を見出すことはできなかった（詳細省略）。

#### D. 考察

小脳構築が有機的に起こることとセロトニンの役割は多様であることから、最終的な outcome から推測するしかないが、2 週間の投与期間内では 5-HTP 投与群では分子層の厚みが正常と変わらないのに対し、SSRI 投与群ではこれが薄いことから migration→シナプス形成→分子層構築の流れに何らかの障害による遅れが見られたと思われる。

また、プルキンエ細胞樹状突起の異常な伸長は、migration の遅れにより残っている EGL 層内に見られるものであり、EGL 層がなくなったあとは正常との区別は組織学的になくなる。このため、甲状腺ホルモン欠乏による神経発達障害において特有に生じる過形成と解釈することもできる。この他に、この PTU 投与モデルは、よく知られているミエリン形成の遅れを始め、ノルアドレナリン系の投射の遅れも今回確認した。

甲状腺ホルモンにより誘導される蛋白は多く、発達遅延も複合的であるが、セロトニンは新生児の初期学習の時期にしか、特定の細胞（皮質のバレル構造やプルキンエ細胞）にしか現れないという特徴や、新生児期に SSRI を投与すると永続的行動異常がおこるとい報告などから、脳高次機能に永続的に影響する何らかの

刻印を残すのではないかと考えられる。プルキンエ細胞の樹状突起の EGL 内への侵入は異常な過形成と考えられるが、これを 5-HTP が促進し、SSRI が抑制したことはセロトニンが神経発達に促進的に作用していることを示すと同時に、そのみでは神経構築の正常化に寄与しないことを示唆している。

今回の研究では、神経発達の最終的完成段階におけるセロトニンの役割について、高セロトニン血症やセロトニン・トランスポーターの病態的意義と関連を探ったが、さらに TR $\alpha$ 、 $\beta$  ノックアウトマウスを用いて同様の異常が認められるかを検討する予定である。