

DLX5 gene in Japanese patients with Rett syndrome. *Brain Dev.* 2007;29(8):491-5.

## 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、鷺野伸恵、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

大塚晋、前川真治、板場則子、押村光雄、難波栄二 自閉症候補遺伝子近傍に存在する CpG アイランドメチル化状況の解析 第 51 回日本人類異伝学会（米子）2006 年 10 月 17 日～20 日

Paraguison Rubigilda、檜垣克美、坂本裕美子、山本謙司、松本英夫、佐々木司、加藤進昌、難波栄二 HOXA1 遺伝子ポリヒスチジン多型と核内凝集体形成 第 51 回日本人類異伝学会（米子）2006 年 10 月 17 日～20 日

松本（板場）則子、前川真治、山縣英久、近藤郁子、押村光雄、難波栄二：レット症候群における DLX5 遺伝子の刷り込み異常の検討、第 29 回日本小児遺伝学会学術集会（鳥取）2006 年 10 月 21 日

Eiji Nanba: Biological studies of autism spectrum disorders-experience of Korea and

Japan. Genetic study of autism in Japan. 13th 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

## 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 東海大学医学部附属病院 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—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関門 (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

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

Bruff, 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

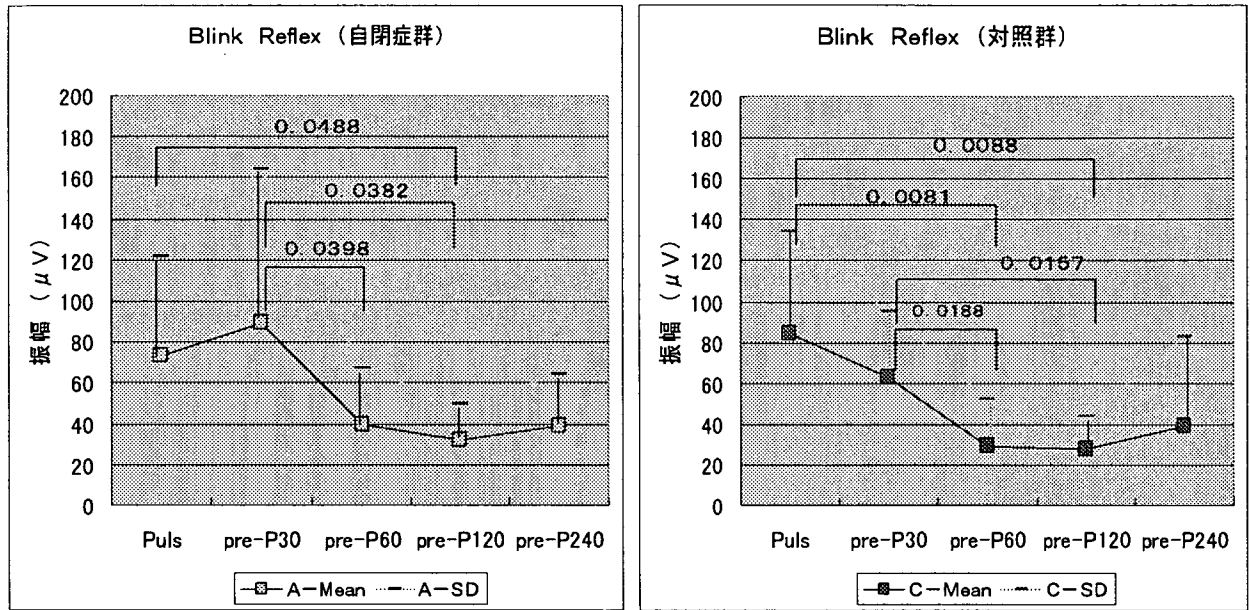


図 1

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。

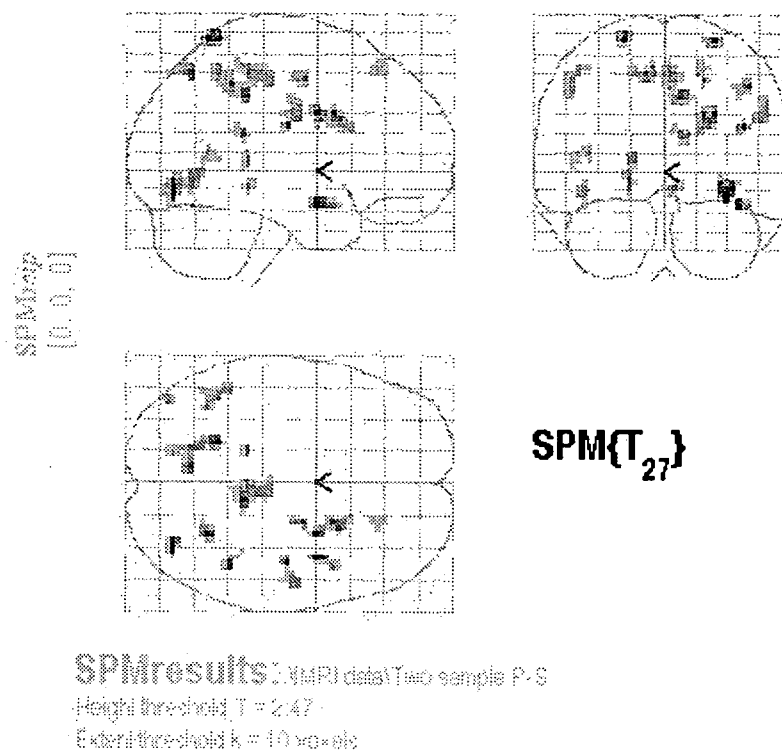


図 2

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。これらの障害の原因候補遺伝子を同定していく上で、われわれは①障害の原因候補領域に位置し、その病態への関与が想定される遺伝子の解析、②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が有用と考え、今日までに遺伝子解析研究を行ってきた。2005-2007年度は上記の中でも①自閉性障害の原因候補領域である 2q31-33 領域の CACNB4 (Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit) 遺伝子と SCN1A (Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit) 遺伝子、②神経伝達物質の動態に関与する Synapsin III 遺伝子を中心に解析研究を行った。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、各遺伝子上に存在する複数の SNPs をデータベースから抽出して genotyping を行い、連鎖不均衡伝達テスト (Transmission Disequilibrium Test) を行った。ど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。さらに、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、その病因や病態に関連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性疾患であるということを一層明らかにしてきた。

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、①障害の原因候補領域に位置し、その病態への関与が想定される遺伝子の解析、②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が、ADやAD/HDの原因候補遺伝子を同定する上で有用と考えている。2005-2007年度は上記の中でも①自閉性障害の原因候補領域である2q31-33領域のCACNB4 (Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit) 遺伝子とSCN1A (Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit) 遺伝子、②神経伝達物質の動態に関与するSynapsin III 遺伝子を中心に解析研究を行った。

また、AD、AD/HDについて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、そのプロトコールを策定した。

## 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 Organization)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93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/ge>



tmap. 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ズ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試みた。

### （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 文部科学省・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に対する遺伝子解析

#### TDT 解析

2q領域：

#### 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、いずれも明らかな連鎖不均衡を示唆する結果は得られなかった。

#### 点突然変異解析

CACNB4 遺伝子上の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。

#### 神経伝達物質関連：

#### Synapsin III 遺伝子

SNP ID	Location	Results
rs133946 (-631C/G)	Promotor	n. s.
rs133945 (-196G/A)	Promotor	n. s.

どちらのSNPも明らかな連鎖不均衡を示唆する結果は得られなかった。

## 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ールの概要

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

### 2q31-33領域の遺伝子について

今回は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SynaptotagminI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が見つかっている（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原因とな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。

#### 神経伝達物質関連の遺伝子について

Synapsin III は Synapsin family に属するニューロンに特異的なリン酸化蛋白質のひとつであり、主に脳で発現し、神経細胞終末の細胞質にあるシナプス小胞の表面に存在している。Synapsin は神経伝達物質の短期的放出の調節やニューロンの可塑性などに関係していると考えられている。Synapsin III 遺伝子は 22q13 に位置し、13 exons で構成され、581 Amino Acids をコードしている。今日までにこの Synapsin III 遺伝子と統合失調症との相関解析がいくつか行われているが、有意な結果は得られていない。自閉症は幼小児期に神経伝達物質の Serotonin が健常者よりも高値を示す傾向にあり、以前から Serotonin Transporter 遺伝子との相

関が報告されている（われわれも Serotonin Transporter 遺伝子の遺伝的多型と自閉症との連鎖不均衡伝達テストを今回と同じサンプルで行ったが有意な所見は認めていない；Koishi S. et al., Brain Dev. 2006, 28(4):257-260）。このように、これらの神経伝達物質の放出に関与する蛋白は自閉症の原因候補遺伝子として重要と考えられる。今回、われわれは Synapsin III 遺伝子のプロモーター領域にある複数の SNP と自閉症との相関解析を行ったが有意な結果は得られなかった。しかし、神経伝達物質の放出にはさらに多くの蛋白や複雑な相互作用が報告されており、今後も自閉症の病態解明の糸口になり得るものと考えられる。

#### マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

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。現在、解析は進行中であり、こちらも今後の成果に期待が持たれる。

#### **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。

## 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, 28(4):257-60.

### 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。

### 3. その他

特になし。

## 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

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）

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）

### A. 研究目的

甲状腺ホルモンは胎生期から哺乳類の中  
枢神経系の発達に必須である。甲状腺ホル  
モンの著しい異常であるクレチン症は、身  
体発達の障害とともに精神発達遅滞を伴い、  
生後すぐに甲状腺ホルモン補充を行わない  
と不可逆的な結果となることはよく知られ  
ている。最近、新生児スクリーニング検査  
において甲状腺刺激ホルモン濃度がわずか  
に上昇を示す、すなわち胎生期に軽度の甲  
状腺ホルモン低下状態にあったと考えられ  
る例が全国的に増えているという。一方で、  
先進国では自閉症の発症率が増加している  
という報告が相次いでおり、この原因は不  
明である。われわれは出生直後に低甲状腺  
ホルモン状態においたラットが成長後多動、  
学習障害、社会性の障害、固執などヒト自  
閉症症状に似た障害を持つようになること  
から、このラットを自閉症症状モデル動物  
として、甲状腺ホルモンと自閉症発症機序  
とのかかわりについて検討した。

一方で、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  
てきたが、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。発達の過程で、一過性にセ  
ロトニン陽性細胞が異所性に出現すること  
が知られており、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。甲状腺ホルモ  
ンは特に小脳の発達に及ぼす影響が大きく、  
これらの事実から、自閉症症状モデル動物  
においてセロトニン神経系発達について、  
小脳を中心に検討することとした。

### B. 研究方法

新生児ラットに、母乳を介して 0.02%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。出生後時系列的に脳を灌流  
固定して組織学的検討を行った。セロトニ  
ンの関与を検討するため、仔ラットの一部  
については 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。これらのラッ  
トについて、行動解析としては、オープン  
フィールドテスト、social interaction を行

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

#### 1) 行動実験について

PTU ラットではコントロールラットに比べて、相手になれにくいという特徴が明らかになった（図1）。PTU ラットが多動傾向を示すことは社会的行動についても一致しており、コントロールラットが相手になれて徐々に社会的探索行動、あるいは play behavior が減少していくのに比して PTU ラットはいつまでも慣れずに多動を示しており、新規の相手ラットが出現してもそれまでの行動量とほとんど変化を認めない。特にPTUラットにSSRIを投与した群では、最初と最後でほとんど運動量が変わらず、環境に慣れていない。立ち上がり行動についても同様であったが、Nが少ないこと、施行が3日と短めであったため、有意な結果にはいたらなかった。

社会性行動についても同様の結果を認めた（図2）。2匹のラットを同じケージに入れ相手に対する働きかけを観察すると、コントロール群では、同じラットに対しては徐々に慣れて働きかけが減少するのに対し、PTUラットは変化を認めない。しかし、新規の相手に対してコントロール群では働きかけが増加するのに対し、PTUラットは変化をみとめなかった。

#### 2) 組織学的検討

小脳の外顆粒細胞層の migration を検討すると、5-HTP 投与群はほぼコントロール群と同様の細胞層の厚みを示しており、対照的に SSRI 投与群では migration の遅れが顕著であった（図3）。5-HTP, SSRI 投与の効果はコントロール、PTU ともに差はなく、元来 PTU ラットで見られていた migration の遅れは5-HTP 投与によってもコントロール群ほどには回復していなかった。

PTU 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. 4）、14日目では矢印に示すように EGL 内へ樹状突起の異常伸長（ingrowth）が認められた。さらに、この異常伸長は5-HTP の投与で促進され、SSRI の投与で抑制された（Fig. 5A, B）。

PTU ラットでは、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、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 SSRI によってそれが抑制されることが認められた（Fig. 5C）。

### D. 考察

出生後低甲状腺ホルモン状態においた自閉症モデルラットについて、以前に報告した多動、学習障害に加えて社会性の異常を認めた。組織学的にはセロトニンニューロン形成の異常を認めた。

セロトニン前駆物質である5-HTP や SSRI を PTU と同時期に投与して脳内セロトニン濃度を操作し、発達におけるセロトニンの関与について検討した。セロトニン前駆物質が体重や脳体積を含めてモデルラ

ットの発達の遅れを回復させた。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う報告などから、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、それ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。

図 1

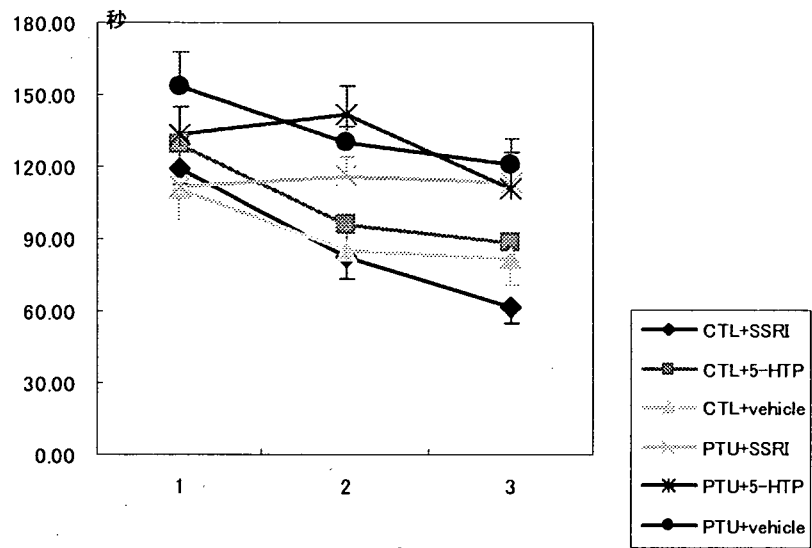


図 2

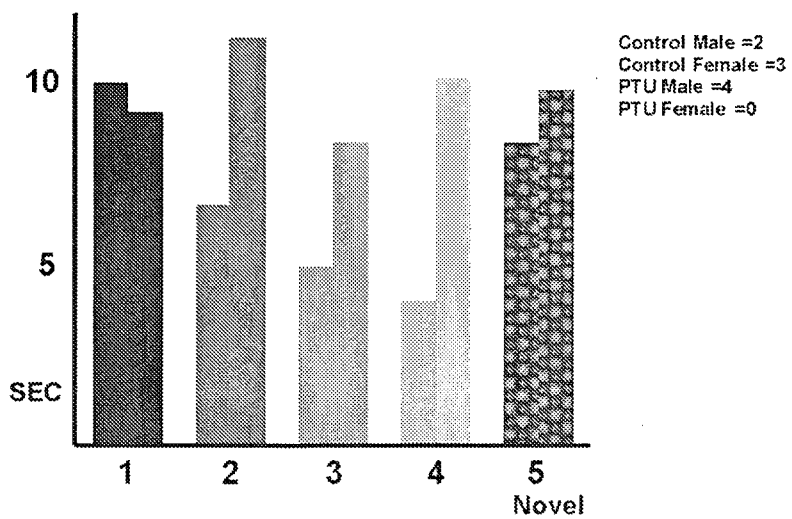




図 3

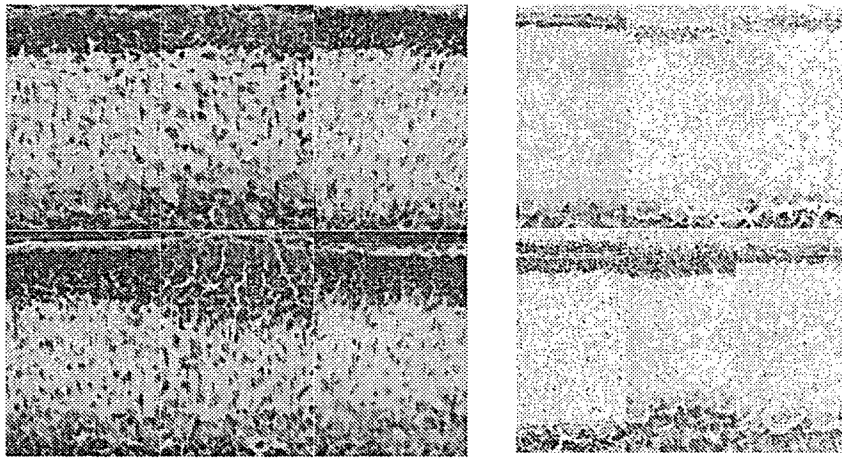


図 4

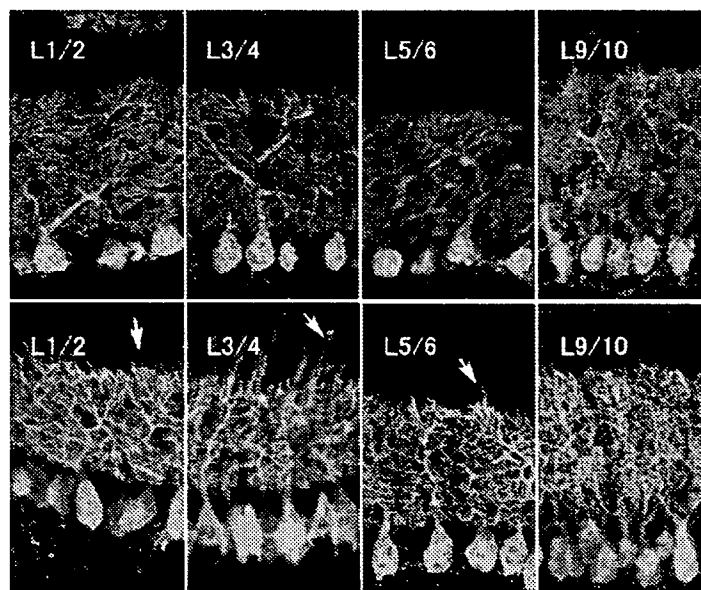
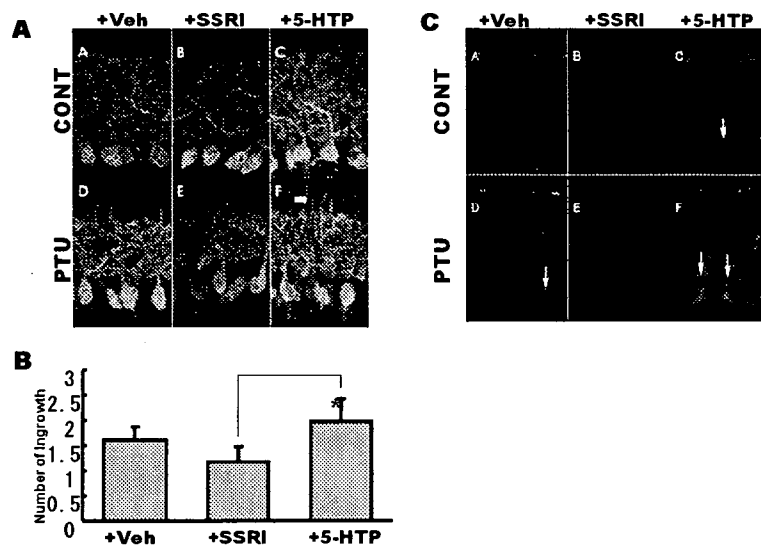


図 5



## **Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表**

【原著論文】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Tochigi M, Kato C, 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.	No association between the ryanodine receptor 3 gene and autism in a Japanese population.	Psychiatr Clin Neurosci			in press
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			in press
Yamasue H, Abe O, Suga M, Yamada H, Inoue H, Tochigi M, Rogers M, Aoki S, Kato N, Kasai K.	Gender-Common and -Specific Neuroanatomical Basis of Human Anxiety-Related Personality Traits.	Cereb Cortex	18	46-52	2008
Yamasue H, Abe O, Suga M, Yamada H, Rogers M, Aoki S, Kato N, Kasai K.	Sex-Linked Neuroanatomical Basis of Human Altruistic Cooperativeness.	Cereb Cortex		2008 [Epub ahead of print]	

<p>Saito Y, Toyoshima M, Oka A, Zhuo L, Moriwaki SI, Yamamoto O, Kanzaki S, Hanaki KI, Ninomiya H, Nanba E, Kondo A, Maegaki Y, Ohno K.</p>	<p>Mental retardation, spasticity, basal ganglia calcification, cerebral white matter lesions, multiple endocrine defects, telangiectasia and atrophic skin: A new syndrome?</p>	<p>Brain Dev</p>	<p>2007 [Epub ahead of print]</p>		
<p>Tochigi M, Kato C, Koishi S, Kawakubo Y, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Kim S-Y, Watanabe K, Kano Y, Nanba E, Kato N, Sasaki T.</p>	<p>No evidence for significant association between the GABA receptor genes in chromosome 15q11-q13 and autism in a Japanese population.</p>	<p>Hum Genet</p>	<p>52</p>	<p>985-989</p>	<p>2007</p>
<p>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, Joobert 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.</p>	<p>LRRTM1 on chromosome 2p12 is a maternally suppressed gene that is associated paternally with handedness and schizophrenia.</p>	<p>Mol Psychiatry</p>	<p>12</p>	<p>1129-1139</p>	<p>2007</p>