

201442022A

厚生労働科学研究委託費

平成 26 年度 厚生労働科学研究委託事業
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

結節性硬化症における自閉症スペクトラム障害の

mTOR 阻害剤を用いた薬物治療に関する研究

平成 26 年度

委託業務成果報告書

業務主任者 佐藤 敦志

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度 厚生労働科学研究委託事業(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患実用化研究事業))による委託業務として、佐藤 敦志 が実施した平成26年度「結節性硬化症における自閉症スペクトラム障害のmTOR阻害剤を用いた薬物治療に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

平成 26 年度 厚生労働科学研究委託事業
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

結節性硬化症における自閉症スペクトラム障害の

mTOR 阻害剤を用いた薬物治療に関する研究

平成 26 年度

委託業務成果報告書

業務主任者 佐藤 敦志

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

結節性硬化症における自閉症スペクトラム障害の mTOR 阻害剤を用いた 薬物療法に関する研究	1
佐藤 敦志	

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 結節性硬化症モデル動物の行動薬理学的解析	6
池田 和隆	
2. 結節性硬化症の自閉症様症状と薬物療法の効果： ヒト患者とモデル動物における検討	14
水口 雅	
3. 結節性硬化症遺伝子変異による中枢神経系の異常と mTOR 阻害剤による 回復状況の検出	17
小林 敏之	
4. 結節性硬化症患者の自閉症スペクトラム障害に対するエベロリムスの 改善効果に関する臨床研究	20
波多野 孝史	
5. 結節性硬化症患者の自閉症スペクトラム障害に対するエベロリムスの 改善効果に関する臨床研究	23
油井 邦雄	

III. 学会等発表実績

25

IV. 研究成果の刊行物・別刷

29

I. 委託業務成果報告（総括）

委託業務成果報告 (総括)

結節性硬化症における自閉症スペクトラム障害の mTOR 阻害剤を用いた薬物治療に関する研究

業務主任者

佐藤 敦志 公益財団法人東京都医学総合研究所・依存性薬物プロジェクト・研究員

研究要旨

結節性硬化症 (TSC) は神経病変、皮膚病変、全身の過誤腫からなる難治性疾患であり、分子病態として mTOR シグナル系の活性亢進がある。自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、社会的相互交流の障害と反復的常同的行動等からなる発達障害であり、自閉症の合併は生命予後に関わる腎腫瘍等を克服した TSC 患者の QOL を大きく損なう。我々は先行研究で、TSC モデルマウスが脳病変をもたずに ASD 症状を示し、mTOR シグナル系の抑制によって改善することを示した。TSC は「分子メカニズムに基づく自閉症の根本的治療薬開発」の足掛かりとなり、TSC のよりよい克服につながりうる。本研究では、TSC 合併 ASD の克服へむけて基礎、臨床両面からアプローチしている。(1) mTOR 阻害剤による TSC 患者合併 ASD の治療効果: ASD を合併する TSC 患者において、エベロリムス (TSC 患者の上衣下巨細胞性星細胞腫、腎血管筋脂肪腫に保険適応あり) の投与 6 ヶ月後に ASD 症状が改善するか前向きに検討する研究を立ち上げた。(2) TSC モデルマウスにおける環境調整の有用性等の検討: TSC 変異マウスにおいて、生後早期より正常な仲間とペア飼育し、ASD 症状の改善効果が得られるか検討を開始した。また、ASD が生後早期から長期間治療されることを考慮し、幼弱マウスおよび培養細胞へのラパマイシン長期投与の影響を検討し、その問題点を明らかにすることができた。次年度以降、この問題点を克服する方法の検討を進めたい。

担当責任者・所属機関・職名

池田和隆 (東京都医学総合研究所 依存性薬物プロジェクト 参事研究員)

水口雅 (東京大学大学院医学系研究科 発達医学 教授)

小林敏之 (順天堂大学医学研究科 分子病理病態学 准教授)

波多野孝史 (慈恵会医科大学医学部 泌尿器科学 講師)

油井邦雄 (芦屋大学発達障害研究所 教授)

A. 研究目的

結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex, TSC) は神経病変、皮膚病変ならびに全身臓器の過誤腫性病変からなる神経皮膚症候群のひとつである。TSC1 および TSC2 を原因遺伝子とする常染色体優性遺伝疾患で、6,000 出生に 1 例と頻度が比較的高い疾患である。

分子生物学的には、TSC の主な病態は mTORC1 シグナル伝達系の過剰活性化である。これを抑制するラパマイシンなどの mTOR 阻害剤は、TSC に合併する脳腫瘍 (上衣下巨細胞性星細胞腫: subependymal giant cell astrocytoma, SEGA) または腎腫瘍 (腎血管筋脂肪腫: renal angiomyolipoma, renal AML) に対する抗腫瘍薬として臨床使用されている。

TSC 患者は発達障害のひとつである自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorder, ASD) を合併しやすく、最も頻度が高い ASD の原因のひとつである。ASD の「治療」には療育など非薬物対応を用いるしかなく、有効な根本的薬物治療の開発が求められている。

我々は疾患モデルマウスを用いた研究で、脳病変やてんかんを合併しないモデルマウスが ASD 様の行動異常を呈し、わずか 2 日間のラパマイシン投与後に正常化することを見出した (Sato, Nat

Commun 2012)。mTORC1 シグナル伝達系に異常をきたす他の遺伝性疾患でも、同様の知見が得られており、ASD の主要な分子病態ならびに asd 治療戦略のひとつと考えられる。

本研究班では腫瘍に限定されない TSC の総合的克服をめざし、TSC に合併する ASD の治療戦略の確立のために基礎・臨床両面からの検討を行った。臨床においては、国内ですでに報告がある mTOR 阻害剤による TSC 患者の精神神経症状の変化をレビューするとともに、ASD 症状について mTOR 阻害剤の投与前後における変化を検討する前向き観察研究の実施を計画した。基礎的な面では TSC モデルマウスを用いて、ASD の治療が小児期から始まることを想定して、幼弱動物に対する mTOR 阻害剤投与の影響を検討した。また、ヒトにおける療育に相当する飼育環境として正常マウスとのペア飼育を導入し、変異マウスの ASD 症状が飼育環境から受ける変化を検討した。薬物および環境調整による治療効果を詳細に検討するため、mTOR シグナル系蛋白質の機能解析も行った。

B. 研究方法

1. 臨床研究

1-1. 国内の文献レビュー

国内の学会抄録および雑誌論文において、SEGA または renal AML に対してエベロリムスを投与された TSC 患者について、投与前後の精神神経症状について記載があるものを検索収集した。

1-2. TSC-SEGA または TSC-AML に対するエベロリムス投与による ASD 症状の変化の観察研究

計画作成時点において本邦で使用可能であった mTOR 阻害剤エベロリムスを対象とした。その投与対象となる TSC 患者を対象として、ASD の診断および評価尺度を用いた評価方法、エベロリムス投与前後における ASD 症状の変化の追跡方法を検討した。

1-3. ASD 症状の改善を反映するバイオマーカー

一の検証

ASD 患者に対して ω -6 不飽和脂肪酸 (PUFA) のアラキドン酸/ ω -3 PUFA の比が 4/1 のアラキドン酸製品を投与し、投与前後での言語的コミュニケーション改善度を検討した。また、神経伝達バイオマーカーとして、transferrin, ceruloplasmin, superoxide dismutase 血漿濃度を調べた

研究実施にあたっては臨床研究に関する倫理指針を遵守し、研究参加施設の倫理委員会の審査を受けて承認を得て行った。

2. 基礎研究

2-1. ペア飼育による TSC 変異マウスの ASD 症状の変化の検討

Tsc1^{-/-}マウス (H) と同腹仔の野生型マウス (W) を、生後 3 週齢より遺伝子型に基づき W-W, W-H, H-H の 3 種類の同性ペアにして離乳飼育し、3 か月齢以降に行動実験を行った。

2-2. 幼弱期の TSC モデルマウスに対するラパマイシン投与の影響の検討

TSC 変異マウスおよび野生型マウスに対して、乳幼仔 (P8~P40) に rapamycin 1~6mg/kg を週 3 回腹腔内注射し、全身状態および行動を観察した。P40 以降に行動実験を施行した。

2-3. TSC モデルマウスの脳組織および培養細胞系を用いた mTOR シグナル系蛋白質の機能解析

Tsc1^{-/-}マウスと *Tsc2*^{-/-}マウスの交配により得られた野生型、*Tsc1*^{+/-}, *Tsc2*^{+/-}, *Tsc1/Tsc2* ダブルヘテロマウスを用いた。生後 3 か月齢以降の雄マウスにラパマイシン (5mg/kg) または溶媒を 1 日 1 回 2 日間腹腔内投与し、翌日に脳を摘出した。脳組織は液体窒素で凍結保存したのちに蛋白質を抽出し、ウェスタン・ブロット解析に供した。

Tsc2 KO マウス由来の *Tsc2* 欠損腎腫瘍細胞株 MKOC1-277 において、培養下にラパマイシン短期処理 (20 nM、24 時間)、及び、長期投与 (20 nM、

1/10 継代で 10 継代以上)を行い(コントロールは DMSO)、1)と同様に蛋白を抽出してウェスタン・ブロット解析を行った。

厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、動物実験等の実施に関する基本指針を遵守した。

C. 研究結果

1. 臨床研究

1-1. 国内の文献レビュー

ヒト TSC 患者で SEGA または AML 治療を主たる目的として投与されたエベロリムスは、腫瘍を縮小させる効果以外に、「笑顔が増えた、挨拶するようになった、人との関わりを楽しむようになった」など、ASD 症状の改善を思わせる記載があった(水口 2015)。

1-2. TSC-SEGA または TSC-AML に対するエベロリムス投与による ASD 症状の変化の観察研究

本年度は前向き観察研究の実施計画を作成した。要点は以下のとおりである。

- ・参加対象者：4 歳以上 TSC 確定診断例で、SEGA または renal AML を合併するもの。

- ・投薬前評価：エベロリムスの投与前検査とともに、精神科にて ASD の有無に関する診察をうけ、行動異常に関する評価尺度(SCQ, SRS-2, ABC-J)を併用する。

- ・投薬後の追跡：投薬前評価によって「ASD あり」と診断された参加者を、エベロリムスの投与開始後も定期的に追跡評価する。評価内容には ASD 症状の変化、治療対象である病変の変化等を含む。

- ・データ解析：得られたデータは匿名化のち東京都医学総合研究所で収集し、評価尺度スコアの投薬前後における変化等を解析する。

1-3. ASD 症状の改善を反映するバイオマーカーの検証

アラキドン酸製品を投与された ASD 患者において、transferrin, ceruloplasmin, superoxide dismutase の血漿濃度は上昇し、社会性障害を有意に改善した。しかし、10%の症例では言語的コミュニケーションの改善が社会適応レベルに至らなかった。

2. 基礎研究

2-1. ペア飼育による TSC 変異マウスの ASD 症状の変化の検討

本年度は野生型-野生型、Tsc1^{+/-}-Tsc1^{+/-}に対して、ASD 症状に関する行動実験を行った。

ホームケージを用いた社会性テストにおいて、野生型-野生型飼育マウスの interaction time は Tsc1^{+/-}-Tsc1^{+/-}飼育マウスよりも長い傾向があり、雌に限るとその差は有意であった。

3-チャンバーテストにおいては、野生型マウス、変異型マウスどちらも新奇物体よりも新奇マウスのいる区画の滞在時間が長かった。

ASD 症状以外の行動についても、検討を行った。不安傾向を評価する高架式十字迷路テスト、運動量を評価するオープンフィールドテストにおいて遺伝子型による明らかな行動の変化はみられなかった。

2-2. 幼弱期の TSC モデルマウスに対するラパマイシン投与の影響の検討

TSC マウス、対照マウスの両方において、rapamycin (1~6mg/kg、週 3 回)投与は体重増加不良 (1~6mg/kg)、運動量低下などの影響をもたらした。投薬終了後の TSC マウスにおいて、rapamycin 投与群と vehicle 投与群の間で、ホームケージにおける社会性テストおよび 3-チャンバーテストにおける社会性に関する差は認められなかった。

2-3. TSC モデルマウスの脳組織および培養細胞系を用いた mTOR シグナル系蛋白質の機能解析

Tsc1/Tsc2 ダブルヘテロ変異体マウスの脳にお

いて、Tsc1、Tsc2 単独のヘテロ変異体の脳よりも mTORC1 の活性 (S6K1 リン酸化を指標) がさらに亢進している様子は観察されなかった。

MKOC1-277 細胞に対してラパマイシン処理を行ったところ、はじめは細胞増殖の抑制が生じ、細胞の形態が平坦な状態になるものの、次第に細胞増殖が亢進し、細胞の形態もより上皮様に近い形態を示すようになることが解った。

D. 考察

・ヒトにおける知見

エベロリムス投与による精神神経症状の改善はたしかにあると認識されている。ASD 症状に対しても変化を与えるか、それ以外にも好影響をおよぼす行動異常があるのか、前向き観察研究によって明らかにしたい。また、ASD 症状の改善と関連するバイオマーカーの存在も示唆される。これが TSC という単一疾患においても同様の挙動を示すならば、治療効果のモニター等において非常に有用であり、応用の可能性が期待される。

・動物における知見

ペア飼育の検証は、本年度は野生型どうしと変異型どうしの比較検討のみであった。マウス一般に、単独飼育によって行動が著しく変化してしまうが、2匹であればその行動は通常の群飼育と同様であることは確かめられた。そのうえで、先行研究 (Sato, Nat Commun 2012) と同様に変異マウスにおいて社会性の異常がみられ、この飼育系による研究の妥当性も保証されたと考えられる。

動物および細胞における mTOR 阻害剤の長期投与から、mTOR 阻害剤の投与時期あるいは期間による潜在的な問題点も浮かび上がってきた。マウスに対する投与時期は、ヒトではおよそ新生児から幼児期に相当する。この時期に mTOR 阻害剤を投与すること自体の問題か、反応性の問題であり発達期以降よりもずっと低用量で使用する必要があるのか、今後の検討を要するだろう。培養細胞

においては、mTOR 阻害剤の長期投与に伴う代償的な変化の存在が示唆される。抗腫瘍効果や脳機能改善効果が長期的には減弱する可能性もあり、その克服のためにも機序の解明が求められる。

E. 結論

臨床、基礎両面から、TSC における ASD に対して mTOR 阻害剤が与える影響を検討した。既報告からも、SEGA や renal AML に対する治療が ASD 等脳機能障害の改善をもたらす可能性はあり、今後の観察研究において明らかにされるものと思われる。一方、本年度の基礎研究の成果から、安易な mTOR 阻害剤の早期投与によって有害事象がおこる可能性や、漫然とした長期投与によって治療効果が減弱する可能性も示唆された。ASD など脳機能障害の改善薬として mTOR 阻害剤を用いる際の適切な投与戦略 (年齢、用量等) へも反映することであり、詳細な機序や克服方法の解明も求められるであろう。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 研究発表

1) 論文発表

<原著論文>

1. Yui K, Sato A. Mitochondrial Dysfunction and its Relationship with mTOR Signaling and Oxidative Damage in Autism Spectrum Disorders. *Mini Rev Med Chem*, in press.
2. Takamatsu Y, Hagino Y, Sato A, Takahashi T, Nagasawa SY, Kubo Y, Mizuguchi M, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. Improvement of learning and increase in dopamine level in the frontal cortex by methylphenidate in mice lacking dopamine transporter. *Curr Mol Med*, in press.
3. 佐藤敦志, 笠井慎也, 小林敏之, 高松幸雄,

樋野興夫, 池田和隆, 水口雅 (2014) 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動における mTOR シグナル系の関与. *日本神経精神薬理学会雑誌* 34: 51-52.

<その他総説・著書>

4. 古田島 (村上) 浩子, 佐藤敦志, 池田和隆. 自閉症スペクトラム障害の病態解明と治療薬開発を目指して 自閉症スペクトラム障害の分子薬理学的研究. *日本薬理学雑誌*, in press.
5. 佐藤敦志, 池田和隆 (2014) : mTOR. 精神科領域の用語解説. *分子精神医学*, pp 50 (294) - 52 (296), Vol 14, No. 4, 東京: 先端医学社.

2) 学会発表

6. 佐藤敦志 (2015) 自閉症スペクトラム障害の新規治療薬開発. 第4回研究交流フォーラム, 東京, [2015/2/2].
7. Sato A, Takamatsu Y, Miho T, Kasai S, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M (2014) Autistic-like behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex are severer in Tsc2 mutation than in Tsc1 mutation. 53rd annual Meeting of American College of Neuropsychopharmacology, Arizona, [2014/12/7-11].
8. 佐藤敦志 (2014) 結節性硬化症の脳機能障害と薬物治療の可能性. 第2回日本結節性硬化症学会学術総会, 東京, [2014/11/15].
9. 佐藤敦志 (2014) mTOR 阻害剤による自閉症治療の可能性. 第110回日本精神神経学会学術総会, 横浜, [2014/6/27].
10. Sato A, Takamatsu Y, Kasai S, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M (2014) Tsc2 haploinsufficiency is associated with the more severe autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex. 29th International College of

Neuropsychopharmacology, Vancouver, [2014/6/22-26].

11. 佐藤敦志, 高松幸雄, 小林敏之, 樋野興夫, 水口雅 (2014) 結節性硬化症モデルマウスにおいて Tsc2 変異はより重度の自閉症様行動と関連する. 第56回日本小児神経学会学術集会, 浜松, [2014/5/29-31].

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

委託業務成果報告 (業務項目)

1. 結節性硬化症モデル動物の行動薬理的解析

担当責任者

池田 和隆 公益財団法人東京都医学総合研究所・依存性薬物プロジェクト・参事研究員

研究要旨

結節性硬化症 (TSC) は全身の過誤腫からなる難治性疾患である。発症要因は *TSC1* あるいは *TSC2* のヘテロ欠損によって、mTOR シグナル系が亢進されることにある。TSC 患者は神経発達障害の一つである自閉症スペクトラム障害 (自閉症) を高い確率で発症することが知られている。自閉症の中核症状は社会性行動の障害であり、患者の QOL を阻害し家族の疾病負担の大きな一因となっている。当研究室において、成熟した *Tsc1*^{+/-} 及び *Tsc2*^{+/-} マウスは社会性行動の低下を示すが mTOR 阻害剤 (ラパマイシン) を投与することで、自閉症の中核症状である社会性行動に改善が認められることを初めて報告した (Sato et al., 2012)。しかしながら、薬物治療単独の効果は永続しない可能性があるため、自閉症を根本的に克服する方法の検討が必要である。

自閉症患者には治療の一つとして行動療法が行われており、患者の社会性行動に改善効果が見られることが報告されている。例えば、仲間媒介法 (peer-mediated program) は、自閉症児と健常児をペアにして、健常児からの指導や教示を行うもので、自閉症児の教科学習や作業課題、社会的相互作用に効果的なことが示されている (Eikeseth et al., 2002)。動物実験においては、自閉症モデル動物である BTBR マウスと野生型マウスを同ケージで飼育すると、BTBR マウスの社会性行動の改善が報告されている (Tang et al., 2011)。しかしながら、自閉症の症状に対する行動療法と薬物治療を併用することで、自閉症の症状にどのような影響が生じるのかについては調べられていない。そこで本研究においては、以下の3つのストラテジーを組み立て、実験を遂行している。1) *Tsc1*^{+/-} マウスと野生型マウスを幼若期から成熟期まで1対1のペア飼育を行うことにより、*Tsc1*^{+/-} マウスの行動にどのような影響が生じるのかを調べる。比較として、野生型マウス同士及び *Tsc1*^{+/-} マウス同士のペア飼育を行う。2) *Tsc1*^{+/-} マウスと野生型マウスのペア飼育により、*Tsc1*^{+/-} マウスに改善効果が認められた場合、ラパマイシン投与を行いマウスの行動に持続的な効果が生じるのかについて検討を行う。3) ペア飼育単独あるいはラパマイシンの併用で自閉症様行動における有効性が認められた場合、マウスの脳組織における mTOR シグナル系のタンパク及び遺伝子発現を調べる。本報告書においては、1) の幼若期から成熟期までペア飼育を行うことにより、マウスの行動にどのような影響が生じるのかを検討した実験について報告する。

A. 研究目的

本研究の目的は、*Tsc1*^{+/-} マウスを用いた基礎実験により難治性疾患の TSC に高確率で併発する自閉症の根本的治療を検討し、開発することである。また TSC と類似した病態を持つ難治性疾患 (神経線維腫症など) も自閉症を高確率で発症するため、この研究は TSC 患者に限らず一部の自閉症患者にも有効な基礎実験となる可能性が考えられる。

B. 研究方法

Tsc1^{+/-} マウスと *Tsc1*^{+/-} マウスを掛け合わせ、生まれてきた仔マウスを生後 2-3 週齢に genotyping を行い、genotype を決定した後、1 対 1 のペア飼育を 3 週齢から 3 か月齢まで行った。ペア飼育のパターンは 3 種類 (野生型-野生型、野生型-*Tsc1*^{+/-}、*Tsc1*^{+/-}-*Tsc1*^{+/-}) である。3 か月齢から、オープンフィールドテスト (行動量)、高架式十字迷路テスト (不安様行動)、ワ

イヤハンギングテスト(筋出力)、ホットプレートテスト(痛覚)、ホームケージを用いた社会性テスト(社会性)、3-チャンバーテスト(社会性)を行い、ペア飼育によるマウスの行動への影響を調べた。マウスの飼育における明暗サイクルは8-20時であり、餌、水は自由摂取させた。

オープンフィールドテストは高さ49 cm で囲われた50 × 50 cm (縦×横)のフィールド(Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)を用いて行われた。フィールドの端にマウスを置き、マウスの行動を20分間ビデオカメラにて撮像し、ソフトウェアのANY-maze (Stoelting Co., IL, U.S.A)を用いて、総移動距離、総行動時間を自動解析した。高架式十字迷路テストは高架式十字迷路テスト装置(Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)を用いて行った。床から高さ40 cm 上方に十字のアームが設置されており、各アームは側壁のあるクローズドアーム(側壁高さ: 15 cm, アーム長: 30 cm, 走路幅: 6 cm)と側壁のないオープンアームで構成されている。アームがクロスする中心のニュートラルゾーンにオープンアームにマウスの顔を向けるように置き、マウスの行動を10分間ビデオカメラにて撮像した。各アームにおける滞在時間はソフトウェアのANY-maze (Stoelting Co., IL, U.S.A)を用いて自動計測した。ワイヤハンギングテストは高さ30 cm 上方に金網が設置された装置(O' Hara & Co., Tokyo, Japan)を用いて、マウスが金網から落下するまでの潜時をストップウォッチを用いて計測した。ホットプレートテスト(Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)は天板の温度を55°Cに設定し、マウスを天板の上へのせ、前肢をなめる、後肢をばたつかせる、後肢をなめる、ジャンプする、などいずれかの痛み刺激に対する応答が見られるまでの潜時を測定した。ホームケージを用いた社会性テストにおいては、被検体となるマウスを1匹ホーム

ケージ内に15分間入れた後、これまでに出会ったことのないマウス(1匹)を入れた。ビデオカメラにて10分間撮像し、出会ったことのないマウスへのinteraction time を目視にて解析した。3-チャンバーテストは3-チャンバーテスト装置(Neuroscience, Inc. Tokyo, Japan)を用いて行った。60 × 40 cm (縦×横)のボックス内が透明な2つの仕切りで区切られ、3つの区画に分かれている。各区画は自由に行き来ができるように、透明な仕切りの中心に約8 × 5 cm (縦×横)の穴が開いている。3つの区画の内、左右の区画の中心にはワイヤーケージ(直径: 9 cm, 高さ: 約17.5 cm)が置かれている。3-チャンバーテストは3つのセッション(Habituation, Mouse-Object, Familiar mouse-Novel mouse)から構成されている。最初に、被検体となるマウスの装置への馴化が行われる(Habituation)。このセッションにおいては、マウスは仕切りで区切られた3つの区画を10分間探索する。次のセッションでは、マウスが入れられたケージとObjectが入れられたケージのどちらを好むのかを測定する(Mouse-Object)。左右いずれかのケージ内に被検体となるマウスがこれまでに出会ったことのないマウスを入れ、もう片方のケージ内にはobjectとして、緑色のレゴブロックをいれた。最後のセッションでは、すでに前のセッションで出会ったマウスと新奇なマウスのどちらにより興味を示すのかを測定する(Familiar mouse-Novel mouse)。緑色のレゴブロックをいれたケージ内に被検体となるマウスがこれまでに出会ったことのない新たなマウスをいれ、前のセッションでケージに入れたマウスは引き続きケージ内に入れたままにする。いずれのセッションにおいても、各区画における滞在時間、ケージに対するsniffing time、総移動距離はビデオカメラにて10分間撮像し、ANY-maze

(Stoelting Co., IL, U.S.A)を用いて自動計測した。

(倫理面への配慮)

本研究は、痛覚テストにホットプレートテストを用いているが、設定温度は55°Cであり、より高温を照射するテールフリックテスト(80°C-110°C)や、後肢に注射を行うホルマリンテストと比較して、マウスの皮膚の損傷を起こしにくいと考えられる。

C. 研究結果

現在まで野生型-野生型(♂2ペア, ♀5ペア)、 $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ (♂3ペア, ♀3ペア)の行動実験を行ったので、その結果を報告する。

オープンフィールドテストにおいては、雄の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの総移動距離に有意な差はなかった(野生型: 4093 ± 755 cm, $Tsc1^{+/-}$: 5243 ± 441 cm, $t(8) = -1.859$, $p = 0.100$)。また、雌の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの総移動距離に有意な差はなかった(野生型: 4655 ± 444 cm, $Tsc1^{+/-}$: 4970 ± 755 cm, $t(13) = -0.384$, $p = 0.707$)。これらの結果から、雌雄ともに野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの総移動距離に有意な差はなく、行動量における異常が認められないことが示された。

高架式十字迷路テストにおいては、雄の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスのオープンアームにおける滞在時間に有意な差はなかった(野生型: 22 ± 10 s, $Tsc1^{+/-}$: 27 ± 12 s, $t(8) = -0.308$, $p = 0.766$)。また、雌の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスのオープンアームにおける滞在時間に有意な差はなかった(野生型: 75 ± 17 s, $Tsc1^{+/-}$: 68 ± 28 s, $t(10) = 0.196$, $p = 0.849$)。これらの結果から、雌雄ともに野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスのオープンアームにおける滞在時間

に有意な差はなく、不安様行動の亢進や低下が認められないことが示された。

ワイヤハンギングテストにおいては、雄の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの潜時に有意な差はなかった(野生型: 313 ± 71 s, $Tsc1^{+/-}$: 201 ± 82 s, $t(8) = 0.956$, $p = 0.367$)。また、雌の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの潜時に有意な差はなかった(野生型: 538 ± 35 s, $Tsc1^{+/-}$: 552 ± 47 s, $t(13) = -0.230$, $p = 0.822$)。これらの結果から、雌雄ともに野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの潜時に有意な差はなく、筋出力に異常が認められないことが示された。

ホットプレートテストにおいては、雄の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの潜時に有意な差はなかった(野生型: 6.4 ± 0.8 s, $Tsc1^{+/-}$: 7.3 ± 0.7 s, $t(8) = -0.787$, $p = 0.454$)。また、雌の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの潜時に有意な差はなかった(野生型: 8.3 ± 0.6 s, $Tsc1^{+/-}$: 7.9 ± 0.9 s, $t(14) = 0.315$, $p = 0.757$)。これらの結果から、雌雄ともに野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの潜時に有意な差はなく、痛み刺激に対する応答に亢進や低下が認められないことが示された。

ホームケージを用いた社会性テストにおいては雄の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの interaction time に有意な差はなかった(野生型: 133 ± 19 s, $Tsc1^{+/-}$: 93 ± 24 s, $t(8) = 1.165$, $p = 0.277$)。また、雌の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの interaction time においては、 $Tsc1^{+/-}$ マウスの interaction time は野生型マウスに比べて有意に短かった(野生型: 146 ± 14 s, $Tsc1^{+/-}$: 68 ± 7 s, $t(9) = 3.050$, $p = 0.014$)。これらの結果から、雌の $Tsc1^{+/-}$ マウスは野生型マウスに比べて社会性の低下を示した。

3-チャンパーテストの Mouse-Object においては、雄の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスは object のある区画より、mouse のいる区画における滞在時間が有意に長かった(野生型: mouse 294 ± 18 s, object 206 ± 17 s, $t(6)=3.499$, $p=0.013$, $Tsc1^{+/-}$: mouse 309 ± 24 s, object 187 ± 16 s, $t(10)=4.096$, $p=0.002$)。雌の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスは object のある区画より、mouse のいる区画における滞在時間が有意に長かった(野生型: mouse 310 ± 26 s, object 198 ± 23 s, $t(18)=3.148$, $p=0.006$, $Tsc1^{+/-}$: mouse 364 ± 42 s, object 132 ± 31 s, $t(10)=4.421$, $p=0.001$)。これらの結果から、雌雄ともに野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスの社会性の低下は認められないことが示された。

3-チャンパーテストの Familiar-Novel においては、雄の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスは前のセッション(Mouse-Object)で出会ったマウス(Familiar mouse)のいるケージのある区画と新奇なマウス(Novel mouse)がいるケージのある区画における滞在時間に有意な差はなかった(野生型: Familiar mouse 194 ± 17 s, Novel mouse 238 ± 22 s, $t(6)=-1.202$, $p=0.275$, $Tsc1^{+/-}$: Familiar mouse 215 ± 23 s, Novel mouse 241 ± 22 s, $t(10)=-0.819$, $p=0.432$)。雌の野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスは Familiar マウスのいるケージのある区画と Novel mouse がいるケージのある区画における滞在時間に有意な差はなかった(野生型: Familiar mouse 257 ± 21 s, Novel mouse 263 ± 25 s, $t(18)=-0.197$, $p=0.846$, $Tsc1^{+/-}$: Familiar mouse 244 ± 33 s, Novel mouse 237 ± 28 s, $t(10)=0.173$, $p=0.866$)。これらの結果から、雌雄ともに野生型-野生型飼育と $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$ 飼育マウスにおいて社会的な新奇探索性が示されなかった。

D. 考察

行動量、不安様行動、筋出力、痛覚刺激に対する潜時には、野生型と $Tsc1^{+/-}$ マウスに差はなかった。ホームケージを用いた社会性テストにおいては雌の $Tsc1^{+/-}$ マウスは野生型マウスに比べて社会性の低下を示した。また、3-チャンパーテストの Mouse-Object においては、雌雄ともに野生型マウスと $Tsc1^{+/-}$ マウスの社会性には差がないことが示された。Familiar-Novel においては、雌雄ともに野生型マウスと $Tsc1^{+/-}$ マウスの新奇なマウスに対する社会的な新奇探索性が示されなかった。

野生型と $Tsc1^{+/-}$ マウスの運動機能と痛覚刺激に対する潜時を解析した先行研究においては、両マウスに有意な差は認められないことが示されていた(Sato et al., 2012)。このため、本研究においてペア飼育を行った野生型と $Tsc1^{+/-}$ マウスにおいても、行動量、筋出力、痛覚刺激に対する潜時に有意な差が見られなかったことから、先行研究の結果を支持した。本研究は、高架式十字迷路テストを用いて不安様行動の測定を行った。先行研究においては、明暗箱テストを用いて、雄の $Tsc1^{+/-}$ マウスの暗側の滞在時間が野生型マウスの滞在時間よりも短いことから、雄の $Tsc1^{+/-}$ マウスに不安の低下が認められたことを報告している(Sato et al., 2012)。同研究は、雌の $Tsc1^{+/-}$ マウスと野生型マウスの暗側の滞在時間に有意な差はないことを示している。このことから、不安様行動の測定に関しては複数のテストを用いて評価を行う必要がある。本研究においては、オープンフィールドテストのセンター滞在時間あるいは辺縁における滞在時間を解析する必要がある。

自閉症の主な中核症状は社会性の障害である。 $Tsc1^{+/-}$ マウスとそのマウスがこれまでに出会ったことのないマウスを同じケージにいれ、15分間測定すると、野生型マウスの interaction time よ

り $Tsc1^{+/-}$ マウスの interaction time が減少することから、 $Tsc1^{+/-}$ マウスは社会性の低下を示すことが報告されていた (Goorden et al., 2007)。また我々の研究室においても、ホームケージを用いた社会性テストにおいて $Tsc1^{+/-}$ マウスは野生型マウスに比べて社会性行動の低下を示すことを報告した (Sato et al., 2012)。本研究においてペア飼育を行った雌の野生型と $Tsc1^{+/-}$ マウスにおいても、 $Tsc1^{+/-}$ マウスの社会性の低下が見られたことから、先行研究の結果を支持した。ペア飼育を行った雄の野生型と $Tsc1^{+/-}$ マウスにおいては、interaction time に有意な差はなかったが、現時点では匹数が少ないため、今後は各ペアの匹数を増やし検討をしていく必要がある。3-チャンバーテストの Mouse-Object において、雌雄ともに野生型マウスと $Tsc1^{+/-}$ マウスは object よりも mouse のいる区画への滞在時間が長く、Familiar-Novel においては、雌雄ともに野生型マウスと $Tsc1^{+/-}$ マウスの社会的な新奇探索性が示されなかった。同じ mTOR シグナル系に存在する $Tsc2$ のヘテロ欠損である $Tsc2^{+/-}$ マウスは Mouse-Object においては、object よりも mouse のいるケージへの sniffing time が野生型マウスと同様に長いこと、しかし $Tsc2^{+/-}$ マウスの mouse のいるケージへの sniffing time は、野生型マウスの mouse のいるケージへの sniffing time より、短いことが示されている (Tang et al., 2014)。また同研究においては、Familiar-Novel において、新奇なマウスのいるケージの sniffing time が Familiar マウスのケージより野生型マウスが長いものに対して、 $Tsc2^{+/-}$ マウスは Familiar マウスのいるケージと新奇なマウスがいるケージへの sniffing time に有意な差はなかったことが示されている。先行研究におけるこれらの結果と比較すると、本研究における $Tsc1^{+/-}$ マウスは、3-チャンバーテストの Mouse-Object における社会性の低下は示さないが、Familiar-Novel における社会的な新奇探索性は

障害されている可能性がある。しかし、本研究結果においては、野生型マウスにおいても社会的な新奇探索性が示されなかったため、今後は匹数を増やすとともに、ペア飼育による影響があるのかを検討していく必要がある。

E. 結論

1対1のペア飼育において、雌の野生型マウスに比べて雌の $Tsc1^{+/-}$ マウスは社会性の低下を示した。また各ペア飼育 (野生型-野生型、野生型- $Tsc1^{+/-}$ 、 $Tsc1^{+/-}$ - $Tsc1^{+/-}$) の匹数を増やし、行動解析を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

<原著論文>

1. Takamatsu Y, Hagino Y, Sato A, Takahashi T, Nagasawa SY, Kubo Y, Mizuguchi M, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. Improvement of learning and increase in dopamine level in the frontal cortex by methylphenidate in mice lacking dopamine transporter. *Curr Mol Med* in press.
2. Aoki Y, Nishizawa D, Hasegawa J, Kasai S, Yoshida K, Koukita Y, Ichinohe T, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Hayashida M, Fukuda K, Ikeda K. Association between the rs1465040 single-nucleotide polymorphism close to the transient receptor potential subfamily C member 3 (TRPC3) gene and postoperative analgesic requirements. *J Pharmacol Sci* in press.
3. Yoshida K, Nishizawa D, Ichinomiya T, Ichinohe T, Hayashida M, Fukuda K, Ikeda K. (2015) Prediction formulas for individual opioid analgesic requirements based on genetic polymorphism analyses. *PLoS ONE* 10:e0116885.
4. Hagino Y, Kasai S, Fujita M, Setogawa S, Yamaura H, Yanagihara D, Hashimoto M, Kobayashi K, Meltzer HY, Ikeda K. Involvement of cholinergic system in hyperactivity in dopamine-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* in press.
5. Ide S, Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Hayashida M, Minami M, Ikeda K (2014) Haplotypes of P2RX7 gene

- polymorphisms are associated with both cold pain sensitivity and analgesic effect of fentanyl. *Mol Pain* 10:75.
6. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Ogai Y, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Sugimura H, Hayashida M, Ikeda K (2014) Association between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphism rs2835859 and post-operative analgesia, pain sensitivity, and nicotine dependence. *J Pharmacol Sci* 126:253-263.
 7. Iwahashi K, Nishizawa D, Narita S, Numajiri M, Murayama O, Yoshihara E, Onozawa Y, Nagahori K, Fukamauchi F, Ikeda K, Ishigooka J. (2014) Haplotype analysis of GSK-3beta gene polymorphisms in bipolar disorder lithium responders and non-responders. *Clin Neuropharmacol* 37:108-110.
 8. Koga M, Nakamoto Y, Nakamura K, Ikeda K, Yoshii M, Kawana S (2014) Stress sensitivity in patients with atopic dermatitis in relation to the translocator protein 18 kDa (TSPO). *J Nippon Med Sch* 81(3):148-156.
 9. Aoki Y, Yoshida K, Nishizawa D, Kasai S, Ichinohe T, Ikeda K, Fukuda K (2014) Factors that affect intravenous patient-controlled analgesia for postoperative pain following orthognathic surgery for mandibular prognathism. *PLoS ONE* 9:e98548.
 10. Nishizawa D, Ohi K, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Yano-Umeda S, Takeda M, Ikeda K (2014) Association between genetic polymorphism rs2952768, close to the *METTL21A* and *CREB1* genes, and intellectual ability in healthy subjects. *J Addict Res Ther* (doi: 10.4172/2155-6105.1000178)
 11. 成田心, 永堀健太, 西澤大輔, 吉原英児, 川合厚子, 村山洋, 池田和隆, 岩橋和彦 (2014) ノルエピネフリントランスポーター遺伝子多型とアルコール依存症との関連研究. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 49(6):330-339.
- <その他総説・著書>
12. 古田島 (村上) 浩子, 佐藤敦志, 池田和隆. 自閉症スペクトラム障害の病態解明と治療薬開発を目指して 自閉症スペクトラム障害の分子薬理学的研究. *日本薬理学雑誌*, in press.
 13. 宮田久嗣, 樋口進, 廣中直行, 池田和隆, 伊豫雅臣, 小宮山徳太郎, 松本俊彦, 鈴木勉, 高田孝二, 和田清, 齋藤利和 (2014) 物質関連障害および嗜癮性障害群. *精神神経学雑誌* 116(11):950-954.
 14. 佐藤敦志, 池田和隆 (2014) mTOR. 精神科領域の用語解説. *分子精神医学*, pp 50(294)-52(296), Vol 14, No. 4, 東京: 先端医学社.
 15. 西澤大輔, 池田和隆 (2014) 痛みと遺伝子多型. In: 痛みのマネジメントupdate—基礎知識から緩和ケアまで—日本医師会雑誌 第143巻・特別号(1) (花岡一雄・田中栄監修・編集, 小川節郎・紺野慎一・下山直人・山本隆充編集), ppS46-S47. 東京: 日本医師会.
 16. 池田和隆 (2014) 病態生理 1. 神経科学. In: 最新医学別冊 新しい診断と治療のABC 83/精神9 アルコール依存症 (齋藤利和編), pp44-50. 大阪: 最新医学社.
 17. 西澤大輔, 池田和隆 (2014) 多様な依存性物質の作用に共通して影響する遺伝子多型. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 49:83-91.
 18. 笠井慎也, 西澤大輔, 長谷川準子, 佐藤直美, 谷岡書彦, 梶村春彦, 池田和隆 (2014) 喫煙行動と相関するオピオイド受容体関連遺伝子多型の解析. *日本神経精神薬理学会雑誌* 34:53-54.
 19. 佐藤敦志, 笠井慎也, 小林敏之, 高松幸雄, 樋野興夫, 池田和隆, 水口雅 (2014) 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動におけるmTORシグナル系の関与. *日本神経精神薬理学雑誌* 34:51-52.
- 2) 学会発表
20. 池田和隆 (2014) 歯科とゲノム医療. 第4回臨床ゲノム医療学会“東京水道橋大会”, 東京 [2014/11/30].
 21. 池田和隆 (2014) 依存性物質の作用機序解明と医療応用. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 横浜 [2014/10/03].
 22. Ikeda K, Hagino Y, Kasai S, Yamamoto H (2014) Involvement of NMDA receptor GluN2D subunit in phencyclidine effects. ISAM2014, 横浜 [2014/10/03].
 23. 池田和隆 (2014) Genomic mechanisms underlying individual differences in sensitivity to pain and opioids. 第8回都医学研国際シンポジウム—痛みの調節とオピオイド機能—, 東京 [2014/09/05].
 24. Ikeda K, Nishizawa D, Hayashida M, Fukuda K (2014) Personalized pain control. 2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium, Soul, Korea [2014/06/20].
 25. 笠井慎也, 萩野洋子, 池田和隆 (2015) 疾患モデルとしてのマウスとドーパミン関連遺伝子改変マウスの解析. 第10回日本統合失調症学会, 東京 [2105/03/27-28].
 26. 池田和隆 (2015) 喫煙関連遺伝子多型の同定とその機能解析. 財団法人喫煙科学研究財団, 特定研究「ヒト発がん遺伝子多型、喫煙との関連」中間検討会, 東京 [2015/01/30].
 27. Sora I, Sasaki K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Kasahara Y, Ikeda K, Hall FS, Uhl GR, Watanabe M, Kawashima R (2014) Specific regions display altered grey matter volume in mu-opioid receptor knockout mice: mri voxel-based morphometry. The 53rd Annual Meeting of American College of Neuropsychopharmacology (ACNP 53rd Annual Meeting), Phoenix, USA [2014/12/07-11].

28. 池田和隆 (2014) アジアにおける神経精神薬理学の発展と日本への波及効果. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/22].
29. 永堀健太, 岩橋和彦, 成田心, 沼尻真貴, 吉原英児, 西澤大輔, 池田和隆, 石郷岡純 (2014) GSK3beta遺伝子多型と若年者の喫煙習慣との関連. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
30. 成田心, 岩橋和彦, 永堀健太, 吉原英児, 西澤大輔, 川合厚子, 池田和隆, 石郷岡純 (2014) ノルエピネフリントランスporter遺伝子多型とアルコール依存症との関連研究. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
31. 萩野洋子, 笠井慎也, 藤田雅代, 瀬戸川将, 山浦洋, 柳原大, 橋本款, 小林和人, 池田和隆 (2014) ドーパミン欠損マウスの多動におけるアセチルコリン神経の関与. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
32. 藤田雅代, 萩野洋子, 笠井慎也, 橋本款, 小林和人, 池田和隆 (2014) ドーパミン欠乏マウスモデルを用いたドーパミン非存在下の運動亢進メカニズムの解析. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
33. 長澤セーラ幸恵, 高松幸雄, 佐藤敦志, 柏井洋文, 久保有美子, 水口雅, 曾良一郎, 池田和隆 (2014) ドーパミントランスporter欠損マウスにおけるメチルフェニデートとアトモキセチンの週齢別効果. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
34. Kubo Y, Kasahara Y, Arime Y, Hall FS, Takamatsu Y, Ikeda K, Uhl GR, Sora I, Tomita H (2014) Differences in responsiveness between methamphetamine, nisoxetine and methylphenidate may reflect specific developmental characteristics in juvenile DAT KO mice. Society for Neuroscience 2014, Washington DC, USA [2014/11/15-19].
35. Nishizawa D, Kobayashi D, Takasaki Y, Kasai S, Aoki Y, Hasegawa J, Kakizawa T, Ikeda K, Fukuda K (2014) Genome-wide association study of sensory disturbances in the inferior alveolar nerve after bilateral sagittal split ramus osteotomy. The American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting, San Diego, USA [2014/10/19].
36. Ogai Y, Aikawa Y, Yumoto Y, Umeno M, Sakakibara S, Kadowaki A, Saito T, Morita N, Ikeda K (2014) Prediction of relapse using implicit association test to Japanese alcohol dependence inpatients. ISAM2014, 横浜 [2014/10/06].
37. Sugaya N, Ogai Y, Aikawa Y, Yumoto Y, Takahama M, Tanaka M, Haraguchi A, Umeno M, Ikeda K (2014) A randomized and rater-blinded study of the effect of ifenprodil on alcohol reuse in patients with alcohol dependence. ISAM2014, 横浜 [2014/10/06].
38. 西澤大輔, 笠井慎也, 佐藤直美, 谷岡書彦, 長島誠, 氏家寛, 橋本亮太, 田中雅嗣, 梶村春彦, 池田和隆 (2014) ゲノムワイド関連解析によるオレキシン2受容体遺伝子多型 Val308Ile とニコチン依存との関連の同定. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 横浜 [2014/10/03].
39. 笠井慎也, 梶村春彦, 池田和隆 (2014) ニコチン依存脆弱性に影響を及ぼすオピオイド受容体関連遺伝子. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 横浜 [2014/10/03].
40. Yamamoto H, Kamegaya E, Hagino Y, Takamatsu Y, Mishina M, Yamamoto T, Ikeda K (2014) Genetic deprivation of GluN2D subunit induced impairments of emotion and social recognition. 第57回日本神経化学会, 奈良 [2014/09/30].
41. 久保有美子, 笠原好之, 富田博秋, 有銘預世布, 高松幸雄, 池田和隆, 曾良一郎 (2014) メチルフェニデートによるドーパミントランスporter欠損マウスのADHD様行動の改善は発達段階によって異なる. 第37回日本神経科学大会, 横浜 [2014/09/13].
42. 大谷保和, 合川勇三, 湯本洋介, 梅野充, 榊原聡, 門脇亜理紗, 斎藤環, 森田展彰, 池田和隆 (2014) アルコール依存症入院患者における潜在的態度と退院後再飲酒との関連. 日本心理学会第78回大会, 京都 [2014/09/11].
43. 吉田香織, 西澤大輔, 高北義彦, 長谷川準子, 笠井慎也, 青木謙典, 一戸達也, 福田謙一, 池田和隆 (2014) 鎮痛関連遺伝子多型の情報に基づく術後24時間内フェンタニル投与量の個別化. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].
44. 天野功二郎, 吉田香織, 西澤大輔, 福田謙一, 林田眞和, 池田和隆 (2014) 遺伝子多型判定に基づくオピオイド必要量予測式の応用性の検証. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].
45. 村岡渡, 西澤大輔, 長谷川準子, 笠井慎也, 和嶋浩一, 中川種昭, 福田謙一, 池田和隆 (2014) 外科的顎矯正手術におけるUGT2B7遺伝子多型とフェンタニル薬剤感受性の関連について. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].
46. 曾良一郎, 佐々木一益, 住吉晃, 野中博意, 笠原好之, 池田和隆, 渡辺雅彦, 川島隆太 (2014) MRI画像解析による mu オピオイド受容体欠損マウスの大脳灰白質体積の変化. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].

47. 池田和隆 (2014) ドーパミンシグナルを介した精神疾患病態に関するマイクロエンドフェノタイプの解明. 新学術領域「マイクロ精神病態」班会議, 宮城県蔵王町 [2014/07/21].
48. Kasai S, Hagino Y, Fujita M, Yanagihara D, Kobayashi K, Ikeda K (2014) Dopamine-independent motor control and hyperactivity involving acetylcholine systems. 新学術領域「マイクロ精神病態」班会議, 宮城県蔵王町 [2014/07/20].
49. Yamawaki S, Hashimoto H, Ikeda K, Kato T, Kanba S, Ozaki N, Kusumi I (2014) A view on the new nomenclature from the perspective of the drugs developed in Japan. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/25].
50. Uno K, Nishizawa D, Seo S, Sasaki N, Ohi K, Nabeshima T, Hashimoto R, Ozaki N, Ikeda K, Miyamoto Y, Nitta A (2014) PCLO SNP rs13438494 regulates DA and 5-HT uptake, accompanied with splicing efficiency and dependence-like behaviors in genomic association studies. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/24].
51. Sato A, Takamatsu Y, Kasai S, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M (2014) Mouse models of tuberosus sclerosis complex show autism-related behavioral deficits severer in Tsc2 than Tsc1 haploinsufficiency. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/24].
52. Kasai S, Ikeda K (2014) Reduced supraspinal nociceptive responses and distinct gene expression profile in CXBH recombinant inbred mice. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/23].
53. Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Nagashima M, Ujike H, Hashimoto R, Tanaka M, Sugimura H, Ikeda K (2014) Associations of an orexin (hypocretin) receptor 2 gene polymorphism with nicotine dependence found in genome-wide and following association studies. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/23].
54. Amano K, Yoshida K, Nishizawa D, Fukuda K, Hayashida M, Ikeda K (2014) Applicability of calculation formulas for opioid requirement estimation based on genetic polymorphisms. 2014 YONSEI BK21 PLUS-CBSM International Joint Symposium, Andong, Korea [2014/06/21].
55. Hua J, Takamatsu Y, Ikeda K (2014) Altered reward system in dopamine transporter knock-out mice, a model for attention deficit/hyperactivity disorder. 2014 YONSEI BK21 PLUS-CBSM International Joint Symposium, Andong, Korea [2014/06/21].
56. Amano K, Yoshida K, Nishizawa D, Fukuda K, Hayashida M, Ikeda K (2014) Applicability of calculation formulas for opioid requirement estimation based on genetic polymorphisms. 2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium, Soul, Korea [2014/06/19-20].
57. Hua J, Takamatsu Y, Ikeda K (2014) Altered reward system in dopamine transporter knock-out mice, a model for attention deficit/hyperactivity disorder. 2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium, Soul, Korea [2014/06/19-20].
58. 住谷昌彦, 西澤大輔, 池田和隆, 山田芳嗣, 厚生労働省TR-Cancer Pain研究班 (2014) がん性疼痛に対するオピオイド鎮痛薬感受性には GABA transaminase 遺伝子多型が関与する. 日本麻酔科学会第61回学術集会, 横浜 [2014/05/15-17].

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

委託業務成果報告 (業務項目)

2. 結節性硬化症の自閉症様症状と薬物療法の効果：ヒト患者とモデル動物における検討

担当責任者

水口 雅 国立大学法人東京大学・大学院医学系研究科国際保健学専攻・教授

研究要旨

結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex、以下TSC)で高率に見られる自閉症症状を改善しうる薬物として、mTOR阻害薬はきわめて有望である。治療のトランスレーショナルリサーチを推進するため、本研究ではヒトTSC患者におけるeverolimusの効果とTSCモデルマウスにおけるrapamycinの効果の両者を比較検討しながら研究する。本年度はヒト患者の症例報告をレビューし、自閉症症状の改善を示す記載を複数の症例で見いだした。またモデルマウスに対するrapamycin投与の量と期間を検討した。

A. 研究目的

近年、結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex、以下 TSC)に合併する脳腫瘍、腎腫瘍に対して mTOR 阻害薬を用いた薬物療法を行うことが可能となった。mTOR 阻害薬には腫瘍を縮小させる効果の他に、TSC に高率に合併するてんかん、自閉症などの精神神経症状をも改善する効果も期待される。実際に私たちはこれまでに、TSC モデル動物 (Tsc1 ノックアウトマウス、Tsc2 ノックアウトマウス) を用いた行動薬理学実験でマウス成獣に対する mTOR 阻害薬投与が自閉症様症状を改善することを見いだしている (Sato *et al.* 2013)。

本研究では、mTOR 阻害薬を用いた自閉症治療のトランスレーショナルリサーチを次の段階に進めるべく、ヒト TSC 患者および TSC モデルマウス乳幼仔において mTOR 阻害薬が自閉症 (様) 症状に及ぼす効果について検討する。今年度はヒト患者 (脳腫瘍または腎腫瘍を合併) における効果の文献的考察とモデルマウスにおける投与の予備実験を進めた。

B. 研究方法

1) ヒト TSC 患者の自閉症における効果の検討

日本では2012年からTSCに合併する脳腫瘍(上衣下巨細胞性星細胞腫 subependymal giant cell astrocytoma、以下 SEGA) および腎腫瘍 (血管筋脂肪腫 angiomyolipoma、以下 AML) の治療薬として mTOR 阻害薬の一種である everolimus が保険適用された。SEGA と AML に対する治療に新しい有力な選択肢が加わり、everolimus が日本の TSC 患者に投与されはじめた。いっぽう TSC では自閉症の合併率が 50%以上とされ、SEGA や AML と同時に自閉症の症状を有する患者も少なからず存在する。そこで SEGA や AML に対する治療の副次的効果として自閉症症状のどれが、どの程度改善したかについて、国内の症例報告 (学会抄録や雑誌論文) をレビューすることにより定性的に把握し、今後の定量的評価の基礎資料とすることを目指した。

(倫理面への配慮)

今年度の研究は、国内の他施設からの症例報告をレビューするのみであり、私たちの施設の倫理委員会における対応は必要とならなかった。