

2-7 発達障害の治療法の確立をめざすトランスレーショナルリサーチ

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター

一戸紀孝

総括研究報告

1. 研究目的

自閉スペクトラム症(ASD)は、人口の1%以上を占める発達障害で、人生早期より認められる対人相互作用と限局した興味、関心、活動によって特徴付けられる。しかし ASD は極めて異質性が大きく、ASD の治療のためには、ヒトの発達軸に沿った診断法およびその診断にともなう適切な治療法の開発が望まれる。

当研究は、遺伝学的・行動学的・構造的にヒトに近い霊長類マーマセットの ASD モデルによる研究と、ヒトの ASD の研究を並行して行い、それぞれのメリットを活かして、ASD の病因・病態・機能障害に関する理解を深め、診断法・バイオマーカー・治療法の開発とその病態生理に迫ろうとするものである。

発達障害臨床グループは、ASD の異質性に着目し、操作的診断基準で診断された自閉スペクトラム症について、表現型(対人反応性、注意欠如・多動症特性)と社会適応(内在化症状、外在化症状)、その背後にある認知特性、電気生理的手法とバイオイメージングによって得られたデータさらにはジェノタイプについてのデータを蓄積して、その関係性を明確化し、これまで自閉スペクトラム症という大きなくくりとして診断されてきた一群を、病因、病態、機能障害との関係性から類型化し、それに基づく治療法の開発を行うとする試みを行う。

動物モデル研究グループは、バルプロ酸をマーマセットの母体に投与して作成した比較的病因としては単一な ASD モデルにおいて、ヒトと同様なモデレーター・手法による多角的・縦断的研究と侵襲的実験の可能なモデル動物ならではの情報を用いて、総合的に当該 ASD モデルのフェノタイプの特性とその背後にある病因、病態生理にせまり、バイオマーカーの開発・治療法の開発を行う。解析手法としては、1) 治療法の効果の判定に有用な発達時期特有の ASD 様行動フェノタイプ抽出法の開発、2) 脳の transcriptome 解析・proteome 解析による分子的異常の解明、3) 血液成分の transcriptome/proteome 解析による分子的バイオマーカーの開発、4) 脳の電気生理学的検討による ASD での脳機能異常メカニズムの解明とバイオマーカーの開発、5) バイオイメージングを用いたエンドフェノタイプの抽出、6) 上記のマーカーの異常とゲノムの異常の関係性の探求、7) これまで開発され

てきた治療薬や近年注目を集めつつある間葉系幹細胞移植の効果判定による治療薬開発とそのメカニズムの解明がある。臨床研究班と動物研究班は緊密に情報交換を行いトランスレーショナル・リバーストランスレーショナルリサーチを展開する。

2. 研究組織

主任研究者
一戸紀孝 国立精神・神経医療研究センター

分担研究者
岡田 俊 国立精神・神経医療研究センター
中川栄二 国立精神・神経医療研究センター
熊崎博一 国立精神・神経医療研究センター
井上 健 国立精神・神経医療研究センター
川合伸幸 名古屋大学
郷 康広 自然科学研究機構・生命創成探求センター
山末英典 浜松医科大学
高橋英彦 東京医科歯科大学
高橋秀俊 高知大学

3. 研究成果

ASD モデルのマーマセットグループ：モデルマーマセットを用いて、大脳皮質の発達に沿った遺伝子発現異常を調べた。調べた時期は新生児期、ASD 症状の現れる小児期、思春期であった。これらのデータを、米国の Orphan ASD Genetic Aberration Bank の ASD の死後脳皮質の遺伝子発現異常と比較した。その結果、小児期と思春期の発現異常遺伝子は、ヒトの孤発性 ASD の異常遺伝子とよく相関していた。異常遺伝子をさらに 25 個の共発現モジュールによって解析すると、モデルマーマセットの遺伝子発現異常は神経細胞、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトそれぞれの細胞種に関連するモジュールにおいてヒト ASD と類似の遺伝子発現異常がみられることがわかった。これは、これまで開発された ASD モデルラット・マウス (Fmr1 KO, MeCP2 KO, BTBR mouse など) のどれも 4 つの細胞種に関するモジュールでヒトと類似したケースがなかったことと対照をなし、モデルマーマセットが孤発性 ASD のトランスレーショナル・リサーチに有用な動物であることが示唆された (Nat Commun, in revision)。新生児期に発現異常を示す遺伝子は、シナプス形成関連遺伝子が多く、それ

らの遺伝子は down-regulation していた。これと一致して、モデルマーマセットのシナプスの形成異常が新生児で起っていることを見出した。また、新生児期に down-regulation していた遺伝子は、思春期には up-regulation しており、これはモデル動物の思春期でシナプスが過形成していることと一致する。小児期は ASD の症状が発達し診断される時期であり、この時期またはその前からの治療が効果的であることが知られており重要である。この時期にモデルマーマセットで異常を示す遺伝子は臨界期関連遺伝子が多く含まれており、脳の可塑性に関する小児期 ASD 脳の異常があことを示唆していると思われる。ASD の症状は初期の注意や認知の障害が経験依存的な脳回路の異常をきたし社会性・言語発達に影響を与えらるが、この回路形成発達異常における臨界期の重要性が示唆された。班員の郷とともに、モデル動物の皮質の遺伝子異常を single cell level で調べている。班員の川合は、モデル動物への oxytocin の投与による行動異常の改善効果を探った。班員の高橋（秀俊）との協力で 92ch マーマセット用の ECoG をモデルマーマセットに装着し、多様な音刺激パラダイムを用いて脳活動を記録し、解析に着手した。

臨床グループ：電気生理学的研究に関する ASD の研究において、班員の高橋（秀俊）は小さな聴覚刺激に対する聴覚性驚愕反応（ASR）の大きさや ASR のピークの潜時などの ASR の指標は、ASD 特性や情緒・行動上の問題などの臨床指標に加え、アクチグラフで評価した身体活動動態と関連し、身体活動動態は ASD 特性とも関連することを見出した。班員の中川栄二は入眠時・睡眠時の EEG の記録により、ASD/ADHD 者のフェノタイプを検討し、治療介入が有効なグループの同定に有用と期待されるバイオマーカーを見出した。班員の井上健は 13 家系において精神疾患・発達異常との関連性が疑われる変異を認めた。このうち、TSPYL2 遺伝子に変異 (exon6:c.1399A>G;p.N467D) を持つ 1 家系に ASD の合併を認めた。TSPYL2 は X 染色体上に位置し、ASK/TBR1/TSPYL2 転写複合体を作り、シナプスの活動性に反応して遺伝子発現を調節することが知られている。班員の高橋英彦による脳画像解析は、道徳的葛藤を伴う状況において、認知的/情動的に柔軟な意思決定を行うには、外側前頭前野・側頭頭頂接合部・帯状皮質・楔前部などの脳領域が重要な働きをしていることを示した。また ASD では、これらの神経ネットワークに変調があり、他人の意図を推し量り、社会的文脈に応じて柔軟な意思決定をすることが困難になっていることが示唆された。

4. 研究成果刊行一覧

1. Komatsu M, Ichinohe N. Effects of Ketamine Administration on Auditory Information Processing in the Neocortex of Nonhuman Primates. Front

Psychiatry. 2020 Aug 19;11:826.

2. Miura M, Ishiyama A, Nakagawa E, Sasaki M, Kurosawa K, Inoue K, Goto Y. 13q13.3 microdeletion associated with apparently balanced translocation of 46,XX,t(7;13) suggests NBEA involvement. Brain Dev. 2020;42(8):581-586.

3. Benner S, 途中 12 名, Yamasue H*. Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. Molecular Psychiatry. 2021;26:710-20.

マーモセット自閉症モデルを用いたトランスレーショナルリサーチ

分担研究者 一戸 紀孝

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 微細構造研究部

緒言

高度な社会性/コミュニケーションと知性をもつ霊長類マーモセットは、精神・神経疾患モデルとしてげっ歯類よりも質的に高い評価に耐えらるると考えられる。我々は昨年度までの開発費の研究として、妊娠マーモセットの妊娠中期に抗てんかん薬バルプロ酸を1週間投与した際の産出仔が自閉症様行動を取ることを示した (Yasue et al., 2015, 2018)。我々はこのようにして産出した動物を自閉症スペクトラム障害 (ASD) のモデルマーモセットとしてさらなる研究を展開している。当該年度は、この ASD モデルマーモセットの行動異常の脳基盤を探るために、遺伝子発現検出法、スライスパッチクランプを用いた薬理学的手法、および免疫組織化学や DTI を用いた形態学的手法を用いて、集学的な研究を行った。また、ヒトと同様なバイオマーカーを検出するための技術開発を行った。

方法

①モデル動物の脳遺伝子発現の検討

自閉症の病態の背後には遺伝子自体の異常と、遺伝子発現の異常があると考えられている。本モデルは、遺伝子発現に影響を与える、エピジェネティックな手法で作成されている。その遺伝子発現の異常に関して調べた。解析に関しては、P0, 2M, 3M, 6M、成体 (1Y6M 以降) と発達に沿って、大脳皮質の6カ所から遺伝子発現解析のための検体を採取した。P0は新生児、2M, 3Mは小児期、6Mは思春期前期と考えられる。その検体からマイクロアレイを用いて、遺伝子発現のデータの取得を行なった。

a. モデル動物の遺伝子発現とヒト孤発性遺伝子発現との比較

本モデル動物の妥当性を調べるために、ヒト孤発性 ASD の遺伝子発現との比較を行なった。現在、ヒト孤発性 ASD に関しては、米国において大きな情報バンクがある。この情報バンクは診断が確定する小児期から成人のデータを含んでいる。このヒトの孤発性 ASD の遺伝子発現異常とマーモセットモデル動物の遺伝子異常の間の相関関係を調べた。

b. 新生児期の異常発現遺伝子の機能的検討

新生児期に特に発現の異常の程度が高い遺伝子を調べ、その機能的意義に関して新生児脳の形態に関して DTI

を用いて検討した。

c. 異常発現遺伝子のインフォーマティクスによる解析
異常発現遺伝子を gene ontology、pathway 解析ソフトなどを用いて機能的意義づけに関して検討した。

②モデル動物のシナプス解析

ASD はシナプス病であると言われている。そこでシナプスの形態と機能に関して調べた。

a. 大脳皮質細胞への興奮性入力量の解析

a-1. 解剖学的解析

皮質の錐体細胞の樹状突起棘 (スパイン) は興奮性入力を受ける構造であり、その数を数えることにより、興奮性入力の数を知ることができる。神経細胞に染色物質を注入して、神経細胞全体の形態を可視化し、基底樹状突起上のスパインの密度および総数に関して検討した。この検討も発達期の時間軸にそって、多数の皮質領野に関して行なった。

a-2. 電気生理学的解析

内側前頭前野の生体外スライスを作成し、電気生理学的に mEPSP を計測することにより興奮性の入力数を検討した。この際、検討した時期は新生児期 (0d)、小児期 (3M)、思春期 (6M) であった。以下の、シナプス関連の実験は、本実験と同じ条件で行われた。

b. 興奮性入力/抑制性入力比 (E/I ratio) の検討

E/I ratio は自閉症の発症にとって重要と考えられている。この E/I ratio を計算するために mIPSP を記録し、mEPSP/mIPSP を E/I ratio として計算した。

c. シナプスの可塑性の検討

シナプスの可塑性は脳回路の改変能力を検討するための重要なファクターである。これまで齧歯類 ASD モデル動物において、long-term depression (LTD) に異常があるという報告がある。そこで、マーモセットモデルでも、皮質の深部の 1 Hz 刺激を行い、EPSP の変化を調べた。

d. モデル動物のシナプスのフェノタイプと並行して動く発現異常遺伝子の同定

前頭前野からとった皮質組織のモデル動物と正常動物の遺伝子発現解析を行い発現異常遺伝子と発達時期にそったシナプスパラメーターの異常の相関を調べた。

e. 小児期における鳴き声の発達の異常

新生児期から小児期にすでにシナプス異常があることが示されたので、ヒトの ASD が診断される小児期にマーモセットのコミュニケーションの道具であるコールについて調べた。コールは防音室に隔離して5分間の録音が行われ、コールは12種類に分け、その頻度を調べた。

③ グリアの異常の検討

ジーンチップによって、グリア細胞関連遺伝子の発現異

常を調べた。また、
上のグリア関連遺伝子の発現異常の結果に相当する、形態的表現形があるかに関して、iba-1 免疫組織化学およびミエリンの電顕的解析によって検討した。

④脳の機能的異常のアクセス

a. イメージングによる解析

他のマーモセットが餌をとっている映像を見せ、上側頭溝において他者認知に関わる脳活動のモデル動物に関わる異常を、内因性光イメージングにより検討した。

b. 電気生理学的検討

モデル動物の脳活動の異常を検討するためにマーモセット用の ECoG 法の開発を行った。

結果—考察

ASD モデルのマーモセットグループ: モデルマーモセットを用いて、大脳皮質の発達に沿った遺伝子発現異常を調べた。調べた時期は新生児期、ASD 症状の現れる小児期、思春期であった。これらのデータを、米国の Orphan ASD Genetic Aberration Bank の ASD の死後脳皮質の遺伝子発現異常と比較した。その結果、小児期と思春期の発現異常遺伝子は、ヒトの孤発性 ASD の異常遺伝子とよく相関していた。異常遺伝子をさらに 25 個の共発現モジュールによって解析すると、モデルマーモセットの遺伝子発現異常は神経細胞、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトそれぞれの細胞種に関連するモジュールにおいてヒト ASD と類似の遺伝子発現異常がみられることがわかった。これは、これまで開発された ASD モデルラット・マウス (Fmr1 KO, MeCP2 KO, BTBR mouse など) のどれも 4 つの細胞種に関するモジュールでヒトと類似したケースがなかったことと対照をなし、モデルマーモセットが孤発性 ASD のトランスレーショナル・リサーチに有用な動物であることが示唆された (Nat Commun, in revision)。新生児期に発現異常を示す遺伝子は、シナプス形成関連遺伝子が多く、それらの遺伝子は down-regulation していた。これと一致して、モデルマーモセットのシナプスの形成異常が新生児で起っていることを見出した。また、新生児期に down-regulation していた遺伝子は、思春期には up-regulation しており、これはモデル動物の思春期でシナプスが過形成していることと一致する。小児期は ASD の症状が発達し診断される時期であり、この時期またはその前からの治療が効果的であることが知られており重要である。この時期にモデルマーモセットで異常を示す遺伝子は臨界期関連遺伝子が多く含まれており、脳の可塑性に関する小児期 ASD 脳の異常があことを示唆していると思われる。ASD の症状は初期の注意や認知の障害が

経験依存的な脳回路の異常をきたし社会性・言語発達に影響を与えると考えられているが、この回路形成発達異常における臨界期の重要性が示唆された。班員の郷とともに、モデル動物の皮質の遺伝子異常を single cell level で調べている。班員の川合は、モデル動物への oxytocin の投与による行動異常の改善効果を探った。班員の高橋 (秀俊) との協力で 92ch マーモセット用の ECoG をモデルマーモセットに装着し、多様な音刺激パラダイムを用いて脳活動を記録し、解析に着手した。

結論

本研究群により、モデル動物の遺伝子発現とそれに応ずる形態的・電気生理学的研究がフェノタイプとして一致していることを示した。これらが実際の ASD 者の病態とどのような関係にあるかを検討しつつ、至適な治療薬の開発への探索を開始し得ると考えている。

参考文献

1. Komatsu M, Ichinohe N. Effects of Ketamine Administration on Auditory Information Processing in the Neocortex of Nonhuman Primates. *Front Psychiatry*, 2020, 11:826
2. Arafune-Mishima A, Abe H, Tani T, Mashiko H, Watanabe S, Sakai K, Suzuki W, Mizukami H, Watakabe A, Yamamori T, Ichinohe N. Axonal Projections from Middle Temporal Area to the Pulvinar in the Common Marmoset. *Neuroscience*. 2020 446:145-156.

発達障害の認知神経科学的アプローチに 基づく病態解明

国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 知的・発達障害研究部
岡田 俊

緒言

発達障害（神経発達症）は、生得的な脳機能の障害を基盤とした認知と行動の偏りにより日常生活に支障を来す状態であり、個々の発達障害に応じた神経心理学的機能の障害が示唆される。たとえば、自閉スペクトラム症では、視線や表情、身振り、他者の思考内容の表象化などの対人認知、注意欠如・多動症では、実行機能、報酬系、時間感覚、デフォルトモードネットワークの障害、学習症では文字認識、語認識、聴覚系のフィードバックの障害など、多様な障害が存在する。

しかしながら、個々の神経発達症は異質性が大きく、他方、複数の神経発達症あるいは閾値下の発達障害特性を合わせもつことも多い。

そのため、個々の障害カテゴリーを超えて、神経発達症のある児童青年・成人の認知機能により中間表現型を確立するとともに、介入効果との関係についても検討する。また、齧歯類モデルマウスについても検討を実施し、病態研究ならびに介入効果を検証する基盤を整備する。

方法

社会性課題として情動的表情の認識、各種の表情と視線方向を同時呈示する視線手がかり課題、実行機能系課題として報酬系を絡めた Go/No-Go タスク、時間知覚課題（時間識別課題、時間再生課題）を作成し、対人反応尺度、Conners 等の発達障害症状尺度との関連を調べる。その際、ウェクスラー知能検査、不安、抑うつを交絡因子とする。

また、齧歯類モデルでは、社会行動下におけるリーチング行動(Ukezono & Takano, in press)を指標としたモデル動物を確立し、介入効果の関係を調べることとした。

結果

COVID-19 感染拡大によって、来所でのデータ取得などに困難が生じたが、認知神経心理学的研究については、倫理委員会での承認を受け、定型発達者(成人)ならびに発達障害当事者(成人、小児)のデータ取得を開始することができた。

江頭らは、本実験で用いた実験手法について、日本 ADHD 学会で「注意欠如・多動症児の時間知覚機能に関する検討」と題する発表を行い、従来、タイミングしか検討されていなかった神経心理学的障害と、その他の時間知覚課題(時間識別課題、時間再生課題)の結果に乖離があることを示し、多面的な病態評価が必要であることを示した(最優秀発表賞を受賞)。

また、請園はリーチング行動を指標として、神経学的基盤との関係を確認した。

COVID-19 感染拡大という想定外の事態が生じたことから、神経発達症を持つ児童と家族の不安、抑うつと生活の質についても調べ、上田らが報告した。

考察

従前の研究では、対照群と個別の発達障害群を比較し、その際を検討した研究が多いが、発達障害の当事者の実態は、その特性や発達障害、他の精神疾患の併存においても多様性のある一群である。江頭らの研究は、その多様性の検討には小脳機能一つをとっても、単一の検査バッテリーで評価することは適切ではなく、複数の組み合わせることが大切であること、またそれらの神経基盤を比較することで個別の病態の差異を検討することが可能であることを示唆している。このような検討は、発達障害の病態の細分化、個別化治療へと道を拓くことになる。

しかしながら、そのためには、多くのサンプルサイズが必要となり、COVID-19 感染拡大の状況を見つつ、多機関連携を図っていきたい。

また、注意欠如・多動症の治療薬があるのに対

し、自閉スペクトラム症(中核症状)の治療薬はいまだ発売されていない状況にあるが、オキシトシンの有効性が検討されている状況にある。また、齧歯類においてはバルプロ酸による実験動物は頻用されている。しかしながら、治療薬開発に支障となっているのが、齧歯類における行動指標が確立していないことである。請園らのリーチング行動を用いた検討は、この状況に突破口を与えることになると思われる。

結論

神経心理学的指標を用いた発達障害病態解明を進めていくことは、病態の細分化とその解明、個別化治療に資すると考えられる。今後はデータ蓄積を続けるとともに多機関連携を図り、サンプルサイズを増やしていく。

また、齧歯類の行動指標を確立し、今後の治療薬開発に資する成果とする予定である。

参考文献

〔口頭発表〕

江頭優佳、林小百合、魚野翔太、加賀佳美、北村柚葵、北洋輔、山下裕史朗、岡田俊、稲垣真澄：注意欠如・多動症児の時間知覚機能に関する検討
日本 ADHD 学会第 12 回総会 2021 年 3 月 7 日
〔英文論文〕

Ukezono, M., & Takano, Y. (2021). An experimental task to examine the mirror neuron system in mice: Laboratory mice understand the movement intentions of other mice based on their own experience. *Behavioural brain research*, 398, 112970

Riyo Ueda, Takashi Okada, Yosuke Kita, Yuri Ozawa, Hisami Inoue, Mutsuki Shioda, Yoshimi Kono, Chika Kono, Yukiko Nakamura, Kaoru Amemiya, Ai Ito, Nobuko Sugiura, Yuichiro

Matsuoka, Chinami Kaiga, Masaya Kubota & Hiroshi Ozawa (2021) . The quality of life of children with neurodevelopmental disorders and their parents during the Coronavirus disease 19 emergency in Japan. *Scientific Reports* volume 11, Article number: 3042

Shota Uono , Sayaka Yoshimura, Motomi Toichi(2021). Eye contact perception in high-functioning adults with autism spectrum disorder *Autism* 25(1):137-147.

〔和文論文〕

江頭 優佳, 岡田 俊:注意欠如・多動症における時間知覚の最新知見 日本生理人類学会誌 25: 4;109-115, 2020 年 11 月

自閉スペクトラム症における入眠時脳波評価と治療法の開発

分担研究者

国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科
中川栄二

1. 研究の概要

自閉スペクトラム症 (ASD) に伴う睡眠障害の臨床病態の解明を目的として、内科的治療前後における脳機能の変化を長時間ビデオ脳波や睡眠ポリソムノグラフィ検査 (PSG) を用いて客観的所見に基づいた治療介入を行い、治療薬剤の解析 (抗てんかん薬、抗精神病薬) と長期治療効果について検討を行う。研究の最終目的は、睡眠障害をともなう ASD に対する新たな診断と治療法を提案し、その効果を脳科学知見から検討することである。ASD に伴う情緒・行動上の問題、多動、興奮、衝動性ならびに睡眠障害の改善を目指した安全で有効な発達障害に対する診断と薬物治療指針を提示する。

2. 研究の目的、必要性及び期待される成果

ASD の小児が示す情緒・行動上の問題、不安、興奮、抑うつ症状ならびに睡眠障害の問題に対して、抗精神病薬をはじめとして様々な薬物治療が行われている。ASD に付随する精神神経症状に対する小児への他の向精神薬の投与は高頻度で認められ、投与されている薬剤も抗精神病薬、抗うつ薬、抗不安薬、睡眠薬、抗てんかん薬など多岐にわたっている。このため、本研究では、長時間ビデオ脳波や PSG を用いて客観的所見に基づいた診断と治療指針を構築することで、有効で安全な薬物治療が行われることが期待される。

3. この研究に関する国内・国外における研究状況及びこの研究の特色・独創的な点

睡眠障害をともなう発達障害患者への向精神薬による薬物療法については、欧米では 1980 年代から薬物療法に関する有効性を実証する臨床研究が行われてきた。近年では、新規抗精神病薬が導入され、発達障害への情緒、行動上の問題に対する有効性が積極的に検証されてきている。しかしながら、わが国では欧米諸国と同様に発達障害の小児に薬物療法が行われて

いるのにもかかわらず、有効性や安全性に関する客観的指標に基づく臨床研究にいたっては皆無に等しい状況である。そこで本研究班では、長時間ビデオ脳波や PSG 等を用いた脳機能解析を行い、わが国における客観的評価に基づいた睡眠障害をともなう発達障害の新たな治療方法の提案を行う。

4. 今年度の研究報告

(1) 睡眠時脳波異常と睡眠障害

ASD は社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的障害と限定された反復する様式の行動、興味、活動を特徴とし、これらの症状は発達早期の段階で必ず出現するが、後になって明らかになるものもある。そして症状は社会や職業その他の重要な機能に重大な障害を引き起こしている。しかしその病態や原因については解明されていない。

これまでに我々は ASD、注意欠如多動症 (ADHD)、限局性学習症 (SLD)、知的障害 (ID) を含む神経発達症患者 354 人を対象として、睡眠時脳波と発作波の種類、部位、抗てんかん薬や抗精神病薬の内服状況と行動障害、精神症状、睡眠障害に対する薬物治療の検討を行った。対象とした神経発達症患者 354 人のうち男性 254 人 (71.8%)、女性 100 人 (28.2%) で、平均年齢は 13.9 ± 6.6 歳 (2~46 歳) であった。そのうち脳波異常は 293 人 (82.8%) に認め、男性 210 人 (59.3%)、女性 83 人 (23.4%) であった。脳波異常の内訳は前頭部の鋭波や徐波が 180 人 (50.8%)、前頭部の棘波が 52 人 (14.7%)、前頭部棘徐波が 32 人 (9.0%)、全般性鋭波 39 人 (11.0%)、全般性徐波 32 人 (9.0%)、その他 29 人 (11.4%) であった。睡眠障害は全体の 47.5% に認められ、ASD では 51.3%、ADHD では 46.5%、ASD と ADHD 併存では 58.0% で認められた。てんかんの合併は 226 人 (63.8%) に認められた。脳波異常がある神経発達症に対する抗てんかん薬と抗精神病薬の併用により、睡眠障害や興奮性、衝動性などの行動面での改善が認められた。

睡眠は脳の成熟にも重要な因子として知られており、ASD、睡眠障害、睡眠時脳波異常は密接に関係していると想定される。入眠時の脳機能の評価について脳波を用いて行い、定量的な評価を行うことで、客観的な評価指標に乏しい ASD 診断のバイオマーカーになる可能性がある。

(2) 睡眠障害とバルプロ酸(VPA)治療効果

神経発達症では、てんかんの合併を認めることが多く脳波異常を認める割合はさらに高い。神経発達症における入眠時脳波異常と睡眠障害に対するバルプロ酸(VPA)の治療効果について検討した。当院てんかん・神経発達症外来通院中(2011年9月から2020年10月)の神経発達症患者608人を対象として、睡眠時脳波と発作波の種類、部位、VPAの内服状況と睡眠障害に対する薬物治療の検討を行った。神経発達症患者608人のうちASD患者数は261人で、ASD患者にVPAを投与している総数は216人(男性178人、女性38人、平均年齢13.2歳(3~33歳))であった。ASD患者に対するVPAを投与している割合は82.8%であった。VPAにより193人で生活の質の改善が認められた。中止は39例で副作用として易興奮性、夜尿、下痢認められた。VPA血中濃度の検討では、効果ありでの血中濃度平均は、43.4 µg/mlで、てんかんが併存している患者では、56.5 µg/ml、てんかんの併存のない患者では29.0 µg/mlであった。脳波異常を認めるASDにVPA少量投与を行うことで、睡眠障害や興奮性、衝動性などの行動面での改善が認められた。特に、幼児期からのVPA内服は発達障害に合併する睡眠障害を改善させる可能性がある。

5. 今後の研究の進め方について

ASDの睡眠時脳波を解析し、年齢を合わせた定型発達、ASDを伴わないADHDやてんかんの睡眠時脳波と比較することで、ASDに特有の所見を探索的に調査する。神経発達症外来に通院・入院中の患者の中から、診断基準に基づき、被験者の候補患者の選定が行われる。脳波が実施済みの対象患者については、stage IIの最低10分の脳波データから各種脳波成分(δ 、 θ 、 α 、 β 、 γ 波)の強度およびコヒーレンスの解析を行い、ASDの児に特有な脳波を探索的に調査する。ASDとそのほかの群(ADHDのみ、てんかんのみ、ADHD+てんかん、定型発達群)で強度解析を行い、ASDで特有な所見を探索する。群ごとの特徴として、年齢分布、性別、眠剤の影響がないかを統計学的に検討する。ASDで有意な所見が得られれば、ASD群の中で年齢ごとに変化があるか、PARSの結果、合併症などに相関があるかどうかを探索する。

解析には、Matlab(Mathworks社)を用い、強度の解析にはpwelch関数、コヒーレンス解析にはmscohere関数を用いて計算する。各種脳波成分の強度とコヒーレンスは周波数帯域範囲の平均値として算出する。また、ASD児に関して各種脳波成分の強度もしくはコヒーレンスとPARS得点の間のPearsonの相関係数の算出および回帰分析により相関性を評価する。

6. 研究成果の発表(原著論文、学会発表他)

【論文】英文(15)編、和文(7)編、総説(12)編
(1) 英文論文

1. Saito T, Sugai K, Takahashi A, Ikegaya N, Nakagawa E, Sasaki M, Iwasaki M, Otsuki T. Transient water-electrolyte disturbance after hemispherotomy in young infants with epileptic encephalopathy. *Child's Nervous System*. 2020 May;36(5):1043-1048. doi: 10.1007/s00381-019-04452-1. Epub 2019 Dec 16.
2. Tabata K, Iida A, Takeshita E, Nakagawa E, Sato N, Sasaki M, Inoue K, Goto Y. A novel pathogenic NFIX variant in a Malan syndrome patient associated with hindbrain overcrowding. *Journal of the Neurological Sciences*. 2020 May 15;412:116758. doi: 10.1016/j.jns.2020.116758. Epub 2020 Feb 22.
3. Ozaki A, Sasaki M, Hiraide T, Sumitomo N, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sato N, Nakashima M, Saitsu H. A case of CLCN2-related leukoencephalopathy with bright tree appearance during aseptic meningitis. *Brain Dev*. 2020 Jun;42(6):462-467. doi: 10.1016/j.braindev.2020.02.008.
4. Miura M, Ishiyama A, Nakagawa E, Sasaki M, Kurosawa K, Inoue K, Goto Y. 13q13.3 Microdeletion Associated With Apparently Balanced Translocation of 46,XX,t(7;13) Suggests NBEA Involvement. *Brain Dev*. 2020 Jun 4;S0387-7604(20)30147-9. doi: 10.1016/j.braindev.2020.05.006. Online ahead of print.
5. Saito Y, Kaga Y, Nakagawa E, Okubo M, Kohashi

- K, Omori M, Fukuda A, Inagaki M. Association of Inattention With Slow-Spindle Density in Sleep EEG of Children With Attention Deficit-Hyperactivity Disorder. *Brain Dev.* 2019 Oct;41(9):751-759. doi: 10.1016/j.braindev.2019.05.004. Epub 2019 Jun 14. (表彰論文)
6. Ishikawa M, Omachi Y, Sato N, Nakagawa E. Bipolar disorder in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: a case report. *BMC Psychiatry.* 2020 3;20(1):349. doi: 10.1186/s12888-020-02750-6.
 7. Kaga Y, Ueda R, Tanaka M, Kita Y, Suzuki K, Okumura Y, Egashira Y, Shirakawa Y, Mitsuhashi S, Kitamura Y, Nakagawa E, Yamashita Y, Inagaki M. Executive dysfunction in medication-naïve children with ADHD : A multi-modal fNIRS and EEG study. *Brain & Development* 2020 Sep;42(8):555-563. doi: 10.1016/j.braindev.2020.05.007. Epub 2020 Jun 10.
 8. Ueda R, Kaga Y, Kita Y, Tanaka M, Iwasaki M, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Okada T, Inagaki M. Postoperative improvement of executive function and adaptive behavior in children with intractable epilepsy. *Brain Dev.* 2020 Aug 29;S0387-7604(20)30218-7. doi: 10.1016/j.braindev.2020.08.005. Online ahead of print.
 9. Ogasawara M, Nakagawa E, Takeshita E, Hamanaka K, Miyatake S, Matsumoto N, Sasaki M. Clonazepam as an Effective Treatment for Epilepsy in a Female Patient with NEXMIF Mutation: Case Report. *Molecular Syndromology.* 2020 Nov;11(4):232-237. doi: 10.1159/000510172. Epub 2020 Sep 1.
 10. Ikegaya N, Iwasaki M, Kaneko Y, Kaido T, Kimura Y, Yamamoto T, Sumitomo N, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Takahashi A, Otsuki T. Cognitive and developmental outcomes after pediatric insular epilepsy surgery for focal cortical dysplasia. *J Neurosurg Pediatr.* 2020 Aug 7;1-9. doi: 10.3171/2020.5.PEDS2058. Online ahead of print.
 11. Hayase Y, Amano S, Hashizume K, Tominaga T, Miyamoto H, Kanno Y, Ueno-Inoue Y, Inoue T, Yamada M, Ogata S, Balan Shabeesh, Hayashi K, Miura Y, Tokudome K, Ohno Y, Nishijo T, Momiyama T, Yanagawa Y, Takizawa A, Mashimo T, Serikawa T, Sekine A, Nakagawa E, Takeshita E, Yoshikawa T, Waga C, Inoue K, Goto Y, Nabeshima Y, Ihara N, Yamakawa K, Taya S, Hoshino M. Down Syndrome Cell Adhesion Molecule Like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility. *Acta Neuropathologica Communications.* 2020 8:206. doi.org/10.1186/s40478-020-01082-6
 12. Ueda R, Kaga Y, Kita Y, Iwasaki M, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Inagaki M. Adaptive behavior and its related factors in children with focal epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2020 Apr 19;108:107092. doi: 10.1016/j.yebeh.2020.107092. Epub ahead of print. PMID: 32320922.
 13. Ueda R, Kaga Y, Takeichi H, Iwasaki M, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Inagaki M. Association of lack of functional connectivity between fronto-parietal pairs in children with frontal lobe epilepsy and poor executive function. *Epilepsy & Behavior.* 10.1016/j.braindev.2020.08.005 査読有
 14. Hayase Y, Amano S, Hashizume K, Tominaga T, Miyamoto H, Kanno Y, Ueno-Inoue Y, Inoue T, Yamada M, Ogata S, Shabeesh Balan, Hayashi K, Miura Y, Tokudome K, Ohno Y, Nishijo T, Momiyama T, Yanagawa Y, Takizawa A, Mashimo T, Serikawa T, Sekine A, Nakagawa E, Takeshita E, Yoshikawa T, Waga C, Inoue K,

Goto Y, Nabeshima Y, Ihara N, Yamakawa K, Taya S, Hoshino M. Down syndrome cell adhesion molecule like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility. *acta neuropathol commun* 8, 206 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01082-6>

15. Abe-Hatano C, Iida A, Kosugi S, Momozawa Y, Terao C, Ishikawa K, Okubo M, Hachiya Y, Nishida H, Nakamura K, Miyata R, Murakami C, Takahashi K, Segawa K, Sakamoto H, Ohta S, Kubota M, Takeshita E, Ishiyama A, Nakagawa E, Sasaki M, Kato M, Matsumoto N, Kamatani Y, Kubo M, Takahashi Y, Natsume J, Inoue K, Goto Y. Whole genome sequencing for 45 Japanese patients with intellectual disability. *American Journal of Medical Genetics Part A*. DOI: 10.1002/ajmg.a.62138

自閉スペクトラム症者への会話補助ロボットの開発

国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 熊崎博一

緒言

外見がヒトに酷似したヒト型ロボットである Geminoid は、眉寄せ、頬引き、呼吸といった自律動作の他に喜び、驚き、悲しみといった表情を呈することが可能である。声の音量・高さ・声質を調整することで感情的要素を軽減でき、状況・場面・体調・感情によって対応がぶれることもなく、不安が強く変化に敏感な自閉スペクトラム症患者 (ASD) 者にとっても安心して関わるのが期待できる。一方で ASD 者は多様性が大きいのも事実である。本研究では、多くの ASD 者にとって心地の良い Geminoid のノンバーバルコミュニケーションを設定し、コミュニケーション補助に用いることを目的とする。

方法

Geminoid のノンバーバルな表出は、そのパラメータを調整可能な形で事前にプログラミングして行う。被験者のインタラクションの最中の自律神経機能を生理信号トラックリストバンドで測定する。被験者の対人恐怖症状評価、認知機能・言語能力・適応行動・感覚特性及び当日の精神状態評価といった患者情報を収集する。対人恐怖症患者に Geminoid とインタラクションしていただき、1)インタラクションの際の安心感に関する自己記入質問紙、2)ビデオカメラによるインタラクションの質の分析、3)生理

学的評価にて評価を行う。収集したデータを総合的に分析し、Geminoid の視線提示において目／頬／口の向きなどの要素を組み合わせるかを色々と変え、スピードや動きを調整するなど、被験者が Geminoid と対面する際に心地よく自己開示できるように Geminoid の動きのプログラムのパラメータを調整する。その後同じ対象者に実験を再開し、個々の被験者がストレスをほとんど感じることなくインタラクションできるようになるまで、実験を繰り返し、個々の患者の特性・状態に最適なパラメータを設定し、患者情報・会話及び生理データ・個々の患者に最適なパラメータから成るデータベースを作成する。その後開発した Geminoid が陪席してのコミュニケーションと不在のコミュニケーションにおける面談時の ASD 者のストレスを比較し Geminoid 陪席の効果を実証する。

結果

現在 15 名の被験者に対して Geminoid とインタラクションする予備実験を行っている。音量、話速、まばたきの頻度、表情 (笑顔度)、語尾、視線、うなずきの好みは ASD 者によって多様であることが示唆されている。

考察

予備実験の結果は、想定以上に ASD 者の Geminoid のノンバーバル表出に対する好みは多様である。今後は多様性について統一的に説明可能なパラメータを新たに導入することも検討し、研究を進めていく。

発達障害を伴う知的障害児の遺伝学的多様性に関する研究

分担研究者：

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
疾病研究第二部 井上 健

【緒言】

発達障害の原因と病態には遺伝学的な因子が大きな要因となっている。しかし、発達障害の臨床的多様性と遺伝的異質性や多因子遺伝に伴う複雑性から、分子レベルでの解明を進めることが困難となっている。発達障害者の多くに知的障害を合併することが知られている。知的障害は遺伝的異質性が高いが、単一遺伝子異常が原因であることが多く、分子レベルでの病態解明へのアプローチが比較的容易であることから、知的障害を合併する発達障害を対象とする遺伝学的解析により、発達障害の病態に解明に関する重要な知見を見いだすことができる可能性が高い。そこで本研究では、知的障害の遺伝学的解析研究の一環として実施しているアレイ CGH を用いたゲノム構造異常解析や全エクソーム/全ゲノム解析を用いた SNV 解析の結果から、知的障害を発達障害の症例を抽出し、発達障害に関連する遺伝子異常に関する分子遺伝学的知見を明らかにする。

【方法】

NCNP 知的障害バイオバンクに登録されている症例のうち、発達障害を合併する症例が本研究の対象となる。バイオバンクにはこれまで 600 家系以上の症例が蓄積されており、これらの約 3 割に発達障害が合併することが知られている。これらの症例の多くは、遺伝学的診断のための解析として、バイオバンクに登録された後にアレイ CGH 解析、全エクソーム/全ゲノム解析による網羅的ゲノム解析を実施し、疾患原因遺伝子のゲノム構造異常や塩基配列置換の探索を行う。本年度は、アレイ CGH 解析に加え、44 家系を対象に実施した全ゲノム解析の結果から発達障害を伴う知的障害の原因となる遺伝子変異について検討を行った。

【結果】

13 家系において疾患との関連性が疑われる変異を認めた。このうち、*TSPYL2* 遺伝子に変異 (exon6:c.1399A>G;p.N467D) を持つ 1 家系に ASD の合併を認めた。*TSPYL2* は X 染色体上に位置し、*CASK/TBR1/TSPYL2* 転写複合体を作り、シナプスの活動性に反応して遺伝子発現を調節することが知られている。本遺伝子変異は、過去に報告はなく、新規の変異であった。患者は、8 歳の男児で DQ52、

5 歳時に ASD と診断されている。別の 1 家系では ASD 関連遺伝子として知られている *PTEN* に変異 (exon4:c.253dupG;p.R84fs*7) を同定した。当該患者は DQ20 と重度の知的障害を呈したが、現在まで ASD 症状は見られなかった。また別途実施したアレイ CGH 解析では、ASD および知的障害の 1 症例において *NBEA* を含む 3.2Mb の欠失を認めた。

【結論】

TSPYL2 にアミノ酸置換変異を持つ知的障害と ASD を呈する 1 家系を見出した。本遺伝子はこれまで統合失調症や知的障害などを持つ少数の患者で報告されているが、疾患関連性についての生物学的な知見は確立されておらず、今後、基礎的な解析が待たれる。また重度の知的障害を呈する 1 例で、ASD 関連遺伝子 *PTEN* の変異を同定した。フレームシフト変異であることから LoF と推測され、重症型の表現形となったと思われる。*NBEA* を含む欠失を同定した 1 家系では、他に 16 遺伝子が欠失していたが、最近発達障害との関連性が明らかになった *NBEA* が知的障害と発達障害に関与していることが示唆された。

【考察】

発達障害の遺伝学的多様性を明らかにするために、NCNP バイオバンクに登録された症例を用いた WGS 解析およびアレイ CGH 解析から得られた 3 症例に関する知見を報告した。

【参考文献】

Miura M, Ishiyama A, Nakagawa E, Sasaki M, Kurosawa K, Inoue K, Goto Y. 13q13.3 microdeletion associated with apparently balanced translocation of 46,XX,t(7;13) suggests *NBEA* involvement. *Brain Dev.* 2020;42(8):581-586. doi: 10.1016/j.braindev.2020.05.006.

緒言

現在、自閉症の治療に用いられている医薬品では、コミュニケーション障害への根本的な改善効果は認められていない。そのため、コミュニケーション障害の治療に貢献する医薬品開発は急務であり、ヒトの臨床治験に加えて、コミュニケーション障害を示す自閉症動物モデルを用いた治療薬の検証が必要である。これまで多くのげっ歯類モデルと候補遺伝子は提案されているが、いずれも症候群のある一面を再現・説明しようとするものであり、ヒト自閉症モデルとして確立しているとは言いがたい。そこで本研究では、高次な知能と高い社会性を有しヒトに近縁な霊長類であるマーモセットを用いて、行動評価系の確立を行い、ヒト実症例に近いモデル動物の開発に繋がる研究を目指した。

方法

①オキシトシン投与による行動試験評価

ある個体が別の個体と同じ課題をしたときに、別の個体の方がより価値の高い餌を得るのを見ると、従来と同じ餌を得られるにも関わらず課題を遂行しなくなる（あるいは餌の受け取りを拒否する）ことを「不公平忌避」という。我々は平成 29 年度に世界で初めてマーモセットが雌雄ともに不公平忌避を示すことを証明した。また、同時に自閉症モデル動物である、胎児期バルプロ酸曝露群（VPA 群）では不公平忌避を示さないという社会認知機能障害を明らかにした。そこで、コミュニケーション障害治療薬としての可能性が示唆されているオキシトシンを、社会認知機能障害をもつ VPA 群に投与することで他個体への注意が変化するかを、他個体と自身の報酬の差を反映する不公平忌避課題を指標として評価した。オキシトシンを経鼻投与するにあたり、実験開始日より以前に被験個体に対して経鼻投与の馴化を行い、実験日には行動試験評価の 30 分間にオキシトシンまたは生理食塩水を経鼻投与した。

②ストレス事象に対する応答性の検証

自閉症をはじめとする発達障害では、その障害特性がストレス脆弱性を高めていることが報告されている。本実験では、まずストレス事象と警戒音声との連合が認められるかを確認するため、マーモセットのストレス事象となり得る映像（野生では天敵に当たるヘビが動く様子）とコントロール映像（哺乳動物が動く様子）をスクリーン上の左右に呈示しながら他個体の警戒音声を再生し、各映像への注視時間を調べた。

結果

①オキシトシン投与による行動試験評価

被験個体（ターゲット）と、目の前で同じ課題を行う個体（パートナー）が、同等の報酬を得られる条件を 2 日間（ET session）、パートナーだけが高価値な報酬を得られる条件を 2 日間（IT session）実施し、計 4 日間は投与前に生理食塩水を投与した。その後パートナーを交代しオキシトシン投与後に同様の流れ（ET→IT）で行動試験を 4 日間実施したところ、VPA 群では生理食

塩水投与時と比較して、オキシトシン投与時に IT session での不公平忌避を示す傾向が認められた。しかし、定型発達群に対して同様の行動試験評価を行ったところ、オキシトシン投与時には IT session において不公平忌避を示さなかった。

②ストレス事象に対する応答性の検証

ヘビと哺乳動物（キリンまたはゾウ）を同時にスクリーン上で呈示しているときに、他個体の警戒音声を同時呈示した結果、定型発達群ではストレス事象の映像が再生されると画面とは体を背け視線を外す時間が長くなったが、VPA 群では各映像への注視時間に差が見られなかった。このことから VPA 群では他個体の発する警戒音声とストレス事象映像との連合に障害があることが示唆された。ただし統計的に有意な差ではなかった。

考察

上記の結果から、ヒトの臨床治験において自閉スペクトラム症の治療薬として効果を示すと報告されているオキシトシンが、自閉症モデルマーモセットである VPA 群に対しても、コミュニケーション障害に対して有効な治療薬である可能性が示唆された。また、VPA 群では警戒音声とストレス事象との連合に障害が認められる可能性が示唆された。どちらの実験においても例数が十分でないため、次年度には更なる追加実験を行い、十分な統計結果が得られるかを確認する予定である。

今後の研究の進め方

今年度は飼育棟改装工事による動物搬出などもあり実験を約 8 か月中断したが、上記の①と②については動物帰還後に例数を追加することができた。次年度は①と②の例数追加に加え、前年度までに明らかにした VPA 群における過活動性に関しても、更なる活動量分析と、過活動抑制に関する候補治療薬試験にも着手していく予定である。また、自閉症者は対人距離を短く取る（パーソナルスペースが狭い）と言われているため、②のスクリーンを用いた実験方法を活用して他個体が接近する映像を呈示し、VPA 群が自閉症様症状を示すかの確認試験を実施する予定である。

参考文献

- [1] Kawai, N., Yasue, M., Banno, T., & Ichinohe, N. (2014). Marmoset monkeys evaluate third-party reciprocity. *Biology letters*, 10(5), 20140058.
- [2] Yasue, M., Nakagami, A., Banno, T., Nakagaki, K., Ichinohe, N., & Kawai, N. (2015). Indifference of marmosets with prenatal valproate exposure to third-party non-reciprocal interactions with otherwise avoided non-reciprocal individuals. *Behavioural Brain Research*, 292, 323-326.
- [3] Yasue, M., Nakagami, A., Nakagaki, K., Ichinohe, N., & Kawai, N. (2018). Inequity aversion is observed in common marmosets but not in marmoset models of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Behavioural Brain Research*, 343, 36-40.
- [4] Kawai, N., Nakagami, A., Yasue, M., Koda, H., & Ichinohe, N. (2019). Common marmosets (*Callithrix jacchus*) evaluate third-party social interactions of human actors but Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) do not. *Journal of Comparative Psychology*.

自閉症様モデルマーマーモセットを用いた遺伝子解析によるトランスレータブル指標の開発

郷康広

自然科学研究機構

緒言

ヒトの疾患、特に高次認知機能に関わる病態機序の解明を目的とした研究においては、ヒト脳との形態や機能分化に大きな差異があるマウス脳で得られた結果を、ヒトに外挿する方法論の限界も指摘されている。一方、ヒトにおいては、実験的な操作や侵襲的な実験が不可能なため、病態と遺伝子・分子の因果律の解明まで踏み込むことが極めて難しい現状にある。そこで本研究では、ヒトにより近縁で、高度の社会性・認知機能をもつマーマーモセットを対象とし、ヒト自閉症スペクトラム症の分子基盤解明およびトランスレータブル分子マーカーの開発を行うことを目的とした。国立精神・神経医療研究センター・微細構造研究部の一戸研究室においては、世界に先駆けてバルプロ酸曝露マーマーモセットの作出に成功しており、作出されたマーマーモセットは自閉症様行動を示すことが明らかになっている。また、自閉症スペクトラム症の一つの中間表現型と考えられるシナプスの刈り込み不全によるシナプス形成異常がバルプロ酸曝露マーマーモセットでは観察されており、マウスではこのシナプス形成異常は観察されないため、その点においても本研究で用いるマーマーモセットの有用性は非常に高いものと考えられる。本研究では、それらの利点を最大限に活かし、薬理的に作出された自閉症様マーマーモセット脳におけるトランスクリプトーム・エピゲノムの動態変化を次世代シーケンサーを用いたオミックス解析により明らかにするとともに、ヒト自閉症スペクトラム症を含む発達障害へのトランスレータブル分子マーカーの開発を行うことを目的とし

た。

方法

国立精神・神経医療研究センター・微細構造研究部において薬理的に作出された自閉症様行動を示す胎生期バルプロ酸曝露マーマーモセット（VPA 個体）の脳を用いた単一細胞核遺伝子発現解析を行った。定型発達群（バルプロ酸非曝露マーマーモセット:UE 個体）との比較解析により、霊長類疾患モデルとしてのマーマーモセット脳内における遺伝子動態を単一細胞レベルで明らかにし、ヒト自閉症スペクトラム症を含む発達障害の治療法の基盤となるトランスレータブル分子マーカーの開発を行った。

バルプロ酸を母体投与した3ヶ月齢のマーマーモセット脳の眼窩前頭前野（area12）と前部帯状皮質（area24）を対象とし、それぞれの脳領域から調整した細胞核を用いた解析を行った。

結果

3ヶ月齢のUE 個体とVPA 個体の眼窩前頭前野（area12）と前部帯状皮質（area24）を用いて単一細胞核トランスクリプトーム解析を行った。UE およびVPA 個体それぞれ1個体から細胞核を調整し、DAPI染色を行った後、DAPI 陽性細胞核をセルソーターで回収し、単一細胞ライブラリ作成装置（10xGenomics社 Chromium）を用いて、area12 から3,846細胞核（UE 個体）、1,958細胞核（VPA 個体）、area24 から4,853細胞核（UE 個体）、8,728細胞核（VPA 個体）の単一細胞核における遺伝子発現データを取得した。教師なし学習によるクラスタリングとその後の細胞種特異的分子マーカーによる細胞種の同定を行った結果、30種類（12種類の興奮性神経細胞、11種類の抑制性神経細胞、2種類のアストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞、成熟オリゴデンドロサイ

ト、ミクログリア、周皮細胞、内皮細胞)を同定することができた。

それぞれの細胞種において、UE 個体と VPA 個体における遺伝子発現量に有意な違いが認められる遺伝子群を解析した。その結果、興奮性神経細胞では 224~554 遺伝子、抑制性神経細胞では 59~243 遺伝子、アストロサイトでは 147 遺伝子、オリゴデンドロサイト前駆細胞では 117 遺伝子、成熟オリゴデンドロサイトでは 444 遺伝子、ミクログリアでは 85 遺伝子において統計的に有意な遺伝子発現量の違いを認めた。また、VPA 個体において興奮性神経細胞では発現抑制、抑制性神経細胞およびグリア細胞では発現亢進が認められ自閉スペクトラム症における興奮性神経細胞と抑制性神経細胞のバランスの乱れ (E/I imbalance) 仮説の傍証を遺伝子発現動態からも得ることができた。

考察

比較トランスクリプトーム解析において定型発達群 (UE 個体) とバルプロ酸暴露群 (VPA 個体) において、シナプス関連遺伝子群に発現差を示す遺伝子が多く同定できた。これらの遺伝子オントロジー、生物学的パスウェイは自閉症スペクトラムを含む多くの精神疾患との関連が示されているため、今回の作出されたマーマセットモデルは、自閉症スペクトラム症のモデル動物となる可能性を示唆する。同時に、今回同定した遺伝子はトランスレータブルな分子マーカーとなり得る。

過去 4 年間の研究開発費により行ったトランスクリプトーム解析において興味深い遺伝子候補が同定できた。シングルセルレベルでの遺伝子発現解析は、まだそれぞれ 2 個体の 2 領域の比較にとどまっているため、個体数と領域数、さらに各発達段階における比較解析をさらに進め、ヒト自閉スペクトラム症患者

者の死後脳を用いたシングルセル発現解析との比較解析を行い、より精度の高いトランスレータブル分子マーカーの同定を進める。

結論

本研究では、シナプス刈り込み不全、およびヒト自閉症スペクトラム症様の行動を示すバルプロ酸暴露マーマセットの発達に応じた脳内遺伝子発現変動を明らかにし、その分子基盤とトランスレータブル指標の開発を目的とした。定型発達個体群とバルプロ酸暴露個体群との発現変動を示す遺伝子がシングルセルレベルで同定することが可能となった。その多くがシナプス機能と関連し、また自閉症スペクトラム症との関連が示唆される遺伝子であったことは特筆すべき点である。これらの研究結果から、今回作出された自閉症様マーマセット個体群は自閉スペクトラム様のモデルとなり、精度の高いトランスレータブル分子マーカーの開発につながる可能性を示すことができた。

脳画像解析の応用による社会的コミュニケーションの障害の治療薬開発

山末英典

浜松医科大学 精神医学講座

緒言 自閉スペクトラム症 (ASD) 中核症状に対する初の治療薬としてオキシトシンは大きな期待を集めているが、その治療効果発現のメカニズムは十分に解明されていない。セロトニン系神経伝達は ASD の病態にもオキシトシンの中枢作用にも関与していると考えられており、動物研究から側坐核のセロトニン 1B 受容体が媒介メカニズムとして注目されている。本研究では、ヒト ASD 当事者を対象にオキシトシン投与後のセロトニン 1B 受容体機能を頭部 PET で解析する。これによって、セロトニン-オキシトシン相互作用と ASD 中核症状改善の関連を明らかにし、MRI 測定を含む多角的な生理情報から ASD 中核症状に対する新たな治療シーズの創出を図ることをねらいとしている。

方法 1. ASD 当事者 20 名と定型発達者 20 名を対象に、セロトニン 1B 受容体に対するトレーサーによる頭部 PET 測定を行い、ASD 当事者と定型発達者で結合能の差異及び、ASD 中核症状、トリプトファン代謝物、脳内のグルタミン酸・GABA 濃度、内側前頭前野をシーズとした安静時機能的結合性 (rsFC) と相関する脳部位を明らかにする。

2. ASD 当事者 20 名をクロスオーバー法で無作為に割付けて、二重盲検で薬剤を投与した後にセロトニン 1B 受容体に対するトレーサーによる PET 測定を行い、オキシトシン投与後とプラセボ投与後を比較し、結合能の差異及び、結合能の変化度が ASD 中核症状、脳内のグルタミン酸・GABA 濃度、rsFC の変化度と相関す

る脳部位・トリプトファン代謝物を明らかにする。

結果 令和 2 年度は、浜松医科大学と浜松ホトニクス PET 検診センターで施設内倫理承認を得て、PET リガンド合成と安全性試験を行なった。その上で、方法 1 に記載した症例対照研究のデータ収集を開始した。そして、年度内で ASD 当事者 4 名と定型発達者 8 名の研究参加について書面での説明同意を得て、臨床評価と MRI および PET 撮像を行なった。

考察 今年度確立した研究体制でデータ収集を進めていける見通しがついた。本研究で焦点を当てているセロトニン系神経伝達経路は、ASD 当事者で異常が報告されオキシトシンとの相互作用も見出しているグルタミン酸系 (参考文献 1, 2)、GABA 系や脳部位間の機能的結合性とも関連する。従って本研究結果から、ASD 中核症状に対するオキシトシン投与の治療効果発現メカニズムが解明されるのみならず、オキシトシンに基づくあるいは他の物質との併用による新たな治療シーズの創出が期待できる。

参考文献 (*Corresponding author)

1. Benner S, 途中 12 名, Yamasue H*. Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. *Molecular Psychiatry*. 2021;26:710-20.
2. Kato Y, 途中 15 名, Yamasue H*. Oxytocin-induced increase in N,N-dimethylglycine and time course of changes in oxytocin efficacy for autism social core symptoms. *Molecular Autism*. 2021;12:15.

2-7 発達障害の社会的行動障害に関するマルチモーダル MRI 研究

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
精神行動医科学分野
高橋英彦

【緒言】

自閉スペクトラム症(ASD)や注意欠如多動症(ADHD)などの発達障害では、共感性や意思決定などの社会行動に関わる障害が広く認められる[1]。こうした社会行動には、道徳観・曖昧性・公平性などの葛藤を引き起こす要素が影響するが、これまではこのような要素を質問紙で評価することに留まっていることが多く、質問紙法では様々なバイアスの他、実際の行動を予測しきれないという問題を指摘されてきた[2]。

近年、経済数理モデルを用い、このような意思決定や行動選択を実証的に評価する行動経済学が興隆した。これに伴い、同手法を用いて、精神疾患の意思決定を検証する研究が急増している。申請者らも、行動経済学アプローチを応用し、ASDにおける柔軟性や文脈感受性の低さを明らかにしてきた[2-4]。しかし、その背景にある神経メカニズムに関しては十分に明らかになっていない。

【方法】

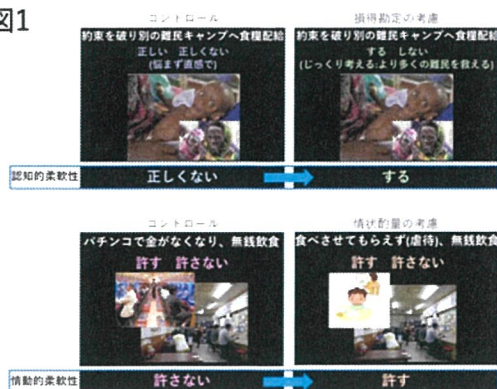
ASDにおける柔軟性や文脈感受性の低下に関する神経基盤を検証することを目的に、成人男性のASD当事者と定型発達(TD)者を対象に、機能的MRI(fMRI)実験を行なった。

fMRI課題では、道徳的葛藤を伴う場面で、他人の意図や文脈を考慮して柔軟に意思決定を行う際の脳活動を、認知的および情動的側面から検証した。

認知的柔軟性セッションでは、例示された行動が道徳的に正しいか正しくないか判断する条件と、現実的な問題を考慮したうえで道徳的に正しくなくてもその行動を起こすか起こさないか、選択する条件を評価した。情動的柔軟性セッションでは、例示された行動が道徳的に許されるか許されないか判断する条件と、道徳的に許されなくてもそうせざるを得ない心情を考慮したうえで、例示された行動が許されるか許されないか、判断する条件を評価した(図1)。

両群の年齢、利き手、知能指数(IQ)をマッチし、fMRIの解析にはSPM12(Wellcome Trust Center for Neuroimaging, London, UK)を用いた。

図1



【結果および考察】

本年度は、TD ($N=19$), ASD ($N=18$)の結果を解析した。

行動解析では、ASDにおいて、特に認知的柔軟性が低下していることが示された。

脳画像解析により、道徳的葛藤を伴う状況において、認知的/情動的に柔軟な意思決定を行うには、外側前頭前野・側頭頭頂接合部・帯状皮質・楔前部などの脳領域が重要な働きをしていることが示された。ASDでは、これらの神経ネットワークに変調があり、他人の意図を推し量り、社会的文脈に応じて柔軟な意思決定をすることが困難になっていることが示唆された。

【今後の展望】

今後解析対象を増やすことで、ASDの柔軟性や文脈感受性の低下に関する神経基盤を、多面的に検証していく予定である。また、課題fMRIのみならず、安静時脳活動・灰白質体積および白質線維の統合性との関連についても調べることで、同疾患群の心理社会的介入、新規治療法開発の基盤としたい。

【参考文献】

1. Farmer GD, Baron-Cohen S, Skylark WJ (2017) People with autism spectrum conditions make more consistent decisions. *Psychol Sci* 28:1067–1076.
2. Fujino J, Tei S, Hashimoto RI et al (2017) Attitudes toward risk and ambiguity in patients with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 8:45.
3. Tei S, Fujino J, Itahashi T et al (2019) Egocentric biases and atypical generosity in autistic individuals. *Autism Res* 12:1598–1608.
4. Fujino J, Tei S, Itahashi T et al (2020) Impact of past experiences on decision-making in autism spectrum disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 270:1063–1071.

発達障害の聴覚情報処理特性に応じた治療法の確立をめざす臨床的基盤研究

分担研究者：高橋秀俊^{1,2,3)}

- 1) 高知大学医学部寄附講座児童青年期精神医学
- 2) 国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 児童・予防精神医学研究部
- 3) 国立精神・神経医療研究センター 脳病態統合イメージングセンター 先進脳画像研究部

緒言

本研究の目的は、発達障害や併存精神障害に関わる聴覚情報処理特性に応じた治療法の開発である。近年、都市化の進展やインターネットの普及などにより聴覚情報処理に関する環境的負荷はますます増している。発達障害や精神障害における聴覚情報処理の脆弱性は古くから報告されているが、ともに病因の異種性が大きいこと、発達障害における思春期・成人期発症精神障害の高い併存率のため、治療には個々の特性に応じたアプローチが必要である。そのため聴覚情報処理特性の簡便な生理学的評価法と、それを基に動物実験でも応用可能な神経生理学的マーカーを特定し、治療法の開発につなげる必要性は高く、このような成果は社会実装にもつなげやすい。

方法および結果

本分担研究課題では、これまで分担研究者らが主に多摩地域で行ってきたコホート研究の参加児童（ASD・定型発達）を対象として取得した、発達障害や併存精神障害に関連する臨床指標（精神医学的診断、定量的自閉症特性、精神症状、社会機能）、神経生理学的指標（聴覚性驚愕反応検査・ミスマッチ陰性電位・聴覚誘発脳磁界反応等）、アクチグラフを用いた行動動態指標、腸内・唾液内細菌などのデータをもとに、発達過程におけるASDの病態メカニズムの変遷を検討し、ASDや併存精神障害の発症や介入に有用な神経生理学的マーカーの同定を行う。有力なマーカーに関しては、マーモセットで皮質脳波やアクチグラフなどを用いて類似の指標を検証し、聴覚情報処理特性に関する神経生理学的指標や音環境調整法の確立に向けた研究に着手する。なお、本研究課題で行った研究は全て臨床研究に関する倫理指針及びヘルシンキ宣言の指針に基づく手続きを遵守し、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得ている。全ての被験者およびその保護者に対して研究の目的及び内容を十分に説明し書面によるインフォームド・コンセントを得て行われた。これまで倫理的な問題は特に生じていない。

初年度である令和2年度は、これまでのコホート研究で得たデータを中心に英文論文発表にむけて解析を進めながら、マーモセットにおける脳皮質電位や行動動態に関するデータを主任研究者の一戸らと検討した。

これまで分担研究者らは、小さな聴覚刺激に対する聴

覚性驚愕反応（ASR）の大きさやASRのピークの潜時などのASRの指標は、ASD特性や情緒・行動上の問題などの臨床指標¹⁾に加え、アクチグラフで評価した身体活動動態²⁾と関連し、身体活動動態はASD特性とも関連³⁾することを報告したが、ASRの指標や自閉症特性、情緒・行動上の問題は、糞便・唾液内の様々な細菌叢と関連する結果も得つつある。開眼安静時の脳波α帯域の電位源は、右縁上回を中心とする側頭頭頂接合部において、定型発達児に比べASD児で亢進していた。さらに、聴性ミスマッチ陰性電位の右下前頭回の電位源の大きさや、脳磁計で評価した聴性定常ガンマ律動の同期の側性は、情緒・行動上の問題と負の相関を認めた。また、保育所に通所する児童の身体活動動態解析から、同じ午睡環境の中で感覚特性の問題の大きさは、午睡の指標に影響した。

考察および結論

ASD児に認める聴覚過敏性など低次知覚処理の非定型性を反映するASRの指標は、ASDの重要な臨床指標と関連するエンドフェノタイプ候補と考えられ¹⁾、開眼時脳波やアクチグラフで評価された身体活動動態、腸内・口腔内細菌叢の菌種など基礎研究に応用しやすい指標も同様にASDの有用な生物学的マーカーの候補と考えられる。今後、これらの指標の発達の变化を多次元的・総合的に評価しながら、マーモセットにおける類似の指標を用いて、発達過程におけるASDの病態メカニズムの変遷や、併存精神障害の発症や介入時期の予測への応用について主任研究者らと検討することで、ASDの聴覚特性や併存精神障害への有効な支援法の開発につながると考えられる。

参考文献

- 1) Takahashi H, Kamio Y. Acoustic startle response and its modulation in schizophrenia and autism spectrum disorder in Asian subjects. *Schizophr Res.* 2017; in press. doi: 10.1016/j.schres.2017.05.034.
- 2) Takahashi H, Nakamura T, Kim J, et al. Acoustic Hyper-Responsivity and Negatively Skewed Locomotor Activity in Children With Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Study. *Front Psychiatry.* 9, 355, 2018.
- 3) Ogino K, Takahashi H, Nakamura T, et al. Negatively Skewed Locomotor Activity Is Related to Autistic Traits and Behavioral Problems in Typically Developing Children and Those With Autism Spectrum Disorders. *Front Hum Neurosci.* 12, 518, 2018.

Translational Research for developing of therapy of developmental disorder

Noritaka Ichinohe

National Institute of Neurological and Psychiatry

Using ASD model marmosets, we examined gene expression abnormalities along the development of the cerebral cortex. The time periods studied were neonatal period, childhood when ASD symptoms appear, and adolescence. These data were compared with gene expression abnormalities in the postmortem brain cortex of ASD patients from the Orphan ASD Genetic Aberration Bank in the United States. The results showed that the aberrantly expressed genes in childhood and adolescence correlated well with the aberrant genes in human idiopathic ASD. Further analysis of the aberrant genes by 25 co-expression modules revealed that the aberrant gene expression in the model marmoset was similar to that of human ASD in modules associated with neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes, respectively. This is in contrast to the previously developed rat and mouse models of ASD (Fmr1 KO, MeCP2 KO, BTBR mouse, etc.), in which the modules related to only few cell types were similar to those in humans. It was suggested that the model marmoset is a useful animal for translational research of idiopathic ASD. In collaboration with group member Dr. Takahashi, we attached 92ch ECoG to model marmosets, and recorded brain activity using various sound stimulation paradigms. We have started analysis of this data. Dr. Hidetoshi Takahashi, a member of the group, found that ASD indicators such as the magnitude of the auditory startle response (ASR) to small auditory stimuli and the latency of the peak of the ASR were related to physical activity and behavior as assessed by actigraphy, in addition to clinical indicators such as ASD characteristics and emotional and behavioral problems.