

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ウモセットの 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。

1995 年に初めて ASD のマウスモデルが作成されて以来、げっ歯類モデルによる精力的な研究が行われてきたが、ASD の治療法の実用化は遅々として進んでいない。その理由の一つとして、げっ歯類がヒト ASD をうまく再現できないからではないかと考えられるようになった。霊長類のマウモセットは進化的にヒトに近く、高度な社会的スキルを持ち、それを支える前頭前野がヒトと同様に高度に発達している。また、マウモセットは脳内の遺伝子発現パターンもヒトと類似しており、ASD のモデル動物として高いポテンシャルを持つと近年期待されてきた。

我々は 10 年前より、バルプロ酸 (VPA) の母体投与による ASD モデルマウモセットの開発を続けてきた。2021 年、我々はこの ASD モデルマウモセットの発達過程における遺伝子発現パターンの探索を行いヒト ASD と極めて近いフェノタイプを示すことがわかり、*Nat Communication* にて発表をおこなった (Watanabe et al., 2021)。この先進的な ASD マウモセットモデルを生物学的レベルでの表現型やその背景にある病因・病態を包括的に探求し、臨床グループの得意とするヒトに近い非侵襲的な手法によるトランスレータブルな多面的・縦断的研究を展開し、ASD のバイオマーカーや治療法の実用化を目指す。

臨床グループは、ASD の異質性に着目する。臨床グループはこれまで ASD の異質性の問題を解決するために、操作的診断基準で診断された自閉症スペクトラムの表現型 (対人反応性、注意欠陥・多動性障害の特性)、社会適応 (内面化・外面化症状)、その背景にある認知特性、電気生理的手法やバイオイメージングに

より得られた遺伝子型に関するデータを蓄積してきた。ASD の表現型 (対人反応性の特性) と社会適応 (内面化・外面化症状)、その背景にある認知特性、電気生理的手法やバイオイメージングで得られる遺伝子型についてデータを蓄積し、その関係を明らかにする。この過程において、VPA 誘導 ASD モデルマウモセットの多面的な情報との統合を行う。

上記の様に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 モデルマウモセットグループ

1. 自閉症モデルマウモセットの開発: 妊娠中のマウモセット母体にバルプロ酸を投与し、自閉症モデルを作成した。バルプロ酸は、母親が妊娠中に摂取すると自閉症のリスクを増加させることが知られている。このモデルの大脳皮質の遺伝子発現とヒトの自閉症の遺伝子発現との間に高い相関が見つかった。ラットの自閉症モデルと比較し、霊長類モデルはヒトの自閉症の共通病態をより精確に再現することが確認された。

2. 自閉症の脳分子発達停滞の発見: バルプロ酸マウモセットとヒト自閉症者の遺伝子発現の成長軌道は非常に類似していた。しかし、遺伝子発現の正常な成長に伴う変化が見られず、その結果、遺伝子発現異常が成長と共に増加することが示された。これは、ヒト自閉症者の脳の遺伝子発現が"未成熟"なままにとどま

っていることを示唆している。さらに、ヒト自閉症者の epigenome のデータを取得し、ヒストンアセチル化の発達による異常が自閉症特有の脳の発達遅延の背景にある可能性を示唆した。

3. この仮説を試すために、我々は自閉症と非自閉症の脳組織からの遺伝子発現データを NIMH から取得し、クラスター解析を実施した。その結果、自閉症者は遺伝子発現のパターンに基づき、三つのクラスター、すなわちサブグループに分けられることが明らかとなった。これらは我々がグループ 1、2、3 と名付けたものである。この結果から特に注目すべき点は、グループ 2 の自閉症者のほぼ全員がてんかんを合併していたという事実である。さらに、グループ 1 と 2 はバルプロ酸との間で遺伝子発現が高い相関を示していたが、グループ 3 ではそのような相関は見られなかった。さらなる主成分分析の結果は、バルプロ酸マーモセットは特にグループ 1 と高い類似性を示すことが明らかとなった。このグループ 1 は自閉症全体の約 1/3 を占めると見られている。

4. 自閉症のサブタイプに対するバイオマーカーの探求」では、三つの明確な自閉症のサブタイプを、特定の遺伝子発現に基づいて区分けし、それぞれの特徴をバイオマーカーとして抽出した。グループ 1 は炎症関連遺伝子の上昇が、グループ 2 は神経関連遺伝子の下降とミエリン関連遺伝子の上昇が、そして特徴が少ないグループ 3 が存在する。バルプロ酸マーモセットはグループ 1 と類似の分子フェノタイプを有していたので、バルプロ酸マーモセットを用いて、遺伝子発現とイメージングフェノタイプの検証を行った。その結果、ミエリン形成に関わる遺伝子 OLIG1 と MBP が、DTI による FA 値、TSPO リガンドを用いた PET 解析、EEG を用いた mismatch negativity が自閉症のサブタイプを非侵襲的に探索するバイオマーカーとして利用できる可能性があることが示された。

5. 自閉症治療薬スクリーニングシステムの開発
前臨床モデルとして、バルプロ酸マーモセットを確立するために行動フェノタイプのスクリーニング法の開発は重要である。我々は小児期のバルプロ酸マーモセットの他者への視線の程度が極めて再現性のよい行動フェノタイプであることを見いだした (Nakagami et al., 2022)。AI ベースのアルゴリズムである DeepLabCut を用いて Araya 社との共同研究により、視線方向を 3 度以下の精度でモニターする方法を開発した。
分子生物学的解析は郷が、行動学的解析は川合がおこなった。

臨床グループ では：脳波 (中川、高橋秀俊)、fMRI (高橋英彦、山末)、PET (山末)、ゲノム解析 (井上)、認知機能検査 (岡田)、ロボットを用いた ASD 治療法の評価 (熊崎) と多様な手法を用いてヒト ASD の検討をおこなった。これと並行して、動物グループは

ASD モデルマーモセットの脳波 (ECoG)、構造 MRI の研究をおこなった。現在、PET 研究を始めている。脳波研究は高橋 (秀俊) が、小さな聴覚刺激に対する聴覚驚愕反応 (ASR) の大きさや ASR のピークの潜時などの指標を発見した。中川は、ASD における入眠時脳波異常と睡眠障害に対する少量バルプロ酸 (VPA) の治療効果について検討した。脳波異常を認める ASD に VPA 少量投与を行うことで、睡眠障害の改善と昼間の指示の入りやすさ、興奮性、衝動性の軽減などの行動面での改善が認められた。高橋秀彦は ASD 群では TD 群と比較して、損得勘定に関する意思決定を行っている最中の左下前頭回の脳活動が低下していることを示した。山末はドパミン D2/3 受容体へのリガンドを用いた PET 実験によって、広い領域における D2/D3 のバインディングの低下を観察した。とりわけ、扁桃核、前部帯状皮質において中等度以上、視床枕で、効果量が最大であることを示した。また、D2/3 受容体密度低下は ASD 者に特異的に視床-上側頭溝の安静時機能結合性と関連していることを示した。井上健はゲノムの解析から ACTR2 と言語発達障害との関連性について新たな知見を見出した。これらの知見は将来 ASD モデルマーモセットのデータと比較・統合されていく予定である。

結論

本研究は、VPA ASD モデルマーモセットがヒト孤発性 ASD と極めて似た病態を持っていることを示唆している。この事実は本モデルマーモセットはバイオマーカーの探索や、病態の解明、治療法の開発にとってこれまでにないパワフルなツールであることを示している。動物モデルにおける遺伝子発現とそれに対応する分子・細胞・システム構造・生理学・行動の研究によって、最適な治療薬開発のための新たな道を開くと考えている。

4. 代表的研究成果刊行物

1. Watanabe S., (途中 9 名) & Ichinohe, N (2021) Functional and molecular characterization of a non-human primate model of autism spectrum disorder shows similarity with the human disease. *Nature Communications* 12, 5388 (2021)
2. Yamasue H* (Corresponding author), (途中 39 名) & Okada T. Effect of a novel nasal oxytocin spray with enhanced bioavailability on autism: A randomised trial. (2022) *Brain*, 145(2):490-499(2022)

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

1995年に初めてASDのマウスモデルが作成されて以来、げっ歯類モデルによる精力的な研究が行われてきたが、ASDの治療法の開発は遅々として進んでいない。その理由の一つとして、げっ歯類がヒトASDをうまく再現できないからではないかと考えられるようになった。霊長類のマーモセットは進化的にヒトに近く、高度な社会的スキルを持ち、それを支える前頭前野がヒトと同様に高度に発達している。また、マーモセットは脳内の遺伝子発現パターンもヒトと類似しており、ASDのモデル動物として高いポテンシャルを持つと近年期待されてきた。我々は昨年度までの開発費研究により、妊娠中のマーモセットにバルプロ酸を投与することによりASD様の行動を示すマーモセットの子供を得ることができることを世界で初めて示した。今年度は、このASDモデルマーモセットの発生過程における遺伝子発現パターンの探索を行い、ヒトASDと極めて近いフェノタイプを示すことがわかり、*Nat Communication*にて発表した。二光子によるシナプス動態の観察、行動解析、ECoGによる電気生理学的解析などを行った。また、血液バイオマーカーを探索する研究も行った。

方法・結果・考察

1. 世界初の自閉症モデルマーモセットの開発

抗てんかん薬のバルプロ酸をマーモセット母体に投与し、自閉症モデルを作成した。バルプロ酸は、母親が妊娠中に摂取すると自閉症のリスクを増加させることが知られている。バルプロ酸マーモセットの脳皮質の遺伝子発現とヒトの自閉症の遺伝子発現との間に高い相関が見つかった。ラットの自閉症モデルと比較し、霊長類モデルはヒトの自閉症の共通病態をより精確に再現することが確認された。バルプロ酸マーモセットモデルは、稀なバルプロ酸母体暴露による自閉症ケースだけでなく、より一般的な孤発性自閉症の共通特徴を再現することが示された。

2. 自閉症の脳分子発達停滞の発見

バルプロ酸マーモセットとヒト自閉症者の遺伝子発現

の成長軌道は極めて類似していた。自閉症者とバルプロ酸マーモセットでは、遺伝子発現の正常な成長に伴う変化が見られず、その結果、遺伝子発現異常が成長と共に増加することが示された。バルプロ酸マーモセットでも同様の結果が得られ、自閉症者の脳の遺伝子発現が"未成熟"なままにとどまっていることが確認された。この発見は、自閉症における重要な生物学的特徴とされ、今後の自閉症研究の新たなパラダイムとなる可能性がある。ヒト自閉症者のepigenomeのデータを取得し、ヒストンアセチル化の発達による異常が自閉症特有の脳の発達遅延の背景にある可能性を示唆した。

3. ヒト自閉症の3つの分子サブグループの発見

自閉症はその症状、病態、そして病因において非常に異質性が高いと言われており、これが治療法開発における大きな障害となっている。その一部の理由として、全ての自閉症に共通する病態変化のパターンが確認できないという事実がある。

バルプロ酸マーモセット型自閉症の遺伝子発現がヒト自閉症の遺伝子発現と高い相関を示し、これはバルプロ酸マーモセットと類似の自閉症が一つのメジャーなサブタイプを形成していることを示唆していた。

この仮説を試すために、我々は自閉症と非自閉症の脳組織からの遺伝子発現データをNIMHから取得し、クラスター解析を実施した。その結果、自閉症者は遺伝子発現のパターンに基づき、三つのクラスター、すなわちサブグループに分けられることが明らかとなった。これらは我々がグループ1、2、3と名付けたものである。

この結果から特に注目すべき点は、グループ2の自閉症者のほぼ全員がてんかんを合併していたという事実である。さらに、グループ1と2はバルプロ酸との間で遺伝子発現が高い相関を示していたが、グループ3ではそのような相関は見られなかった。さらなる主成分分析の結果は、バルプロ酸マーモセットは特にグループ1と高い類似性を示すことが明らかとなった。このグループ1は自閉症全体の約1/3を占めると見られている。

4. 自閉症のサブタイプに対するバイオマーカーの考察

自閉症の3つの明瞭なサブタイプが死後脳解析により明らかになり、これらの生体区別法の開発が重要となる。各グループ特異的な遺伝子をリストアップし、特性を確認した。グループ1は炎症関連遺伝子のup-regulation、グループ2は神経関連遺伝子のdown-regulationおよびミエリン関連遺伝子のup-regulationが特徴、グループ3の特徴はあまりない。ミエリン関連遺伝子、炎症性ミクログリア関連遺伝子TSPO、抑制性ニューロンマーカ

ー (GAD1, PVALB) は、MRI や PET、EEG/MEG を用いた非侵襲的な検討により、バイオマーカー候補となる。バルプロ酸マーモセットは、グループ1と同様の遺伝子発現パターンを示し、バルプロ酸マーモセットを用いて遺伝子発現とイメージングで捉えられるフェノタイプを検証した。ヒト自閉症の同様な手法によるデータも収集中で、これらの手法と指標がヒト自閉症のサブタイプを非侵襲的に探索するためのバイオマーカーとなる可能性がある。以下にそれぞれの検索を詳述する。

4-1: MRI (DTI 解析)

自閉症のサブタイプによる遺伝子発現の違いを解析した結果、ミエリン形成に重要な遺伝子である OLIG1 と MBP は、グループ2で特異的にアップレギュレーション(活性上昇)を示し、他のグループではダウンレギュレーション(活性低下)を示した。ミエリンの形成の程度はMRI/DTIでFA値を指標として計測できる。バルプロ酸マーモセットにおいても、これらのミエリン関連遺伝子の発現がグループ1と同様に低下し、FA値が多く、の皮質下経路で低下していたことが確認された。一方、ヒト自閉症においては、COCORO projectで解析されたDTIデータをクラスター解析し、FA値によって3つの大きなグループに分離されることが明らかになった。これは、ミエリン形成の程度を示すFA値が自閉症のサブタイプを区別する有力なバイオマーカーとなる可能性を示している。

4-2: PET 解析

次に、脳の炎症マーカーであるTSPOの発現について解析した。TSPOはグループ1,2でアップレギュレーションを示し、これによりグループ1,2と3を区別するバイオマーカーと考えられる。バルプロ酸マーモセットでは、TSPOの遺伝子発現が増加し、PETによってその増加が確認できた。この結果は、2013年の浜松医科大学のSuzukiらによる研究で報告された自閉症者のTSPOのアップレギュレーションと一致している。この現象は自閉症における脳炎症のエビデンスとされている。今後、バルプロ酸マーモセットとヒト自閉症のTSPOバインディング部位の詳細な比較研究を行う予定である。

4-3. ECoG 解析

抑制性神経伝達物質GABA関連の遺伝子GAD1は、グループ1,2で低下している。脳の興奮抑制のバランスの乱れはEEG/MEGで捉えることができると予測される。我々は我々が開発した(Komatsu and Ichinohe, 2020)マーモセット用の96ch高密度皮質脳波法(ECoG)を用い

て、バルプロ酸マーモセットの聴覚oddball課題を用いてmismatch negativityの低下があることを確認した。ヒト自閉症においてはmismatch negativityに関して、一貫した結果はないがメタ解析の結果としては、低下傾向にあると報告されている。

5. 自閉症治療薬スクリーニングシステムの開発

前臨床モデルとして、バルプロ酸マーモセットを確立するために行動フェノタイプのスクリーニング法の開発は重要である。我々は小児期のバルプロ酸マーモセットの他者への視線の程度が極めて再現性のよい行動フェノタイプであることを見いだした(Nakagami et al., 2022)。AIベースのアルゴリズムであるDeepLabCutを用いてAraya社との共同研究により、視線方向を3度以下の精度でモニターする方法を開発した。

結論

本研究は、VPA ASDモデルマーモセットがヒト孤発性ASDと極めて似た病態を持っていることを示唆している。この事実は本モデルマーモセットはバイオマーカーの探索や、病態の解明、治療法の開発にとってこれまでにないパワフルなツールであることを示している。動物モデルにおける遺伝子発現とそれに対応する分子・細胞・システム構造・生理学・行動の研究によって、最適な治療薬開発のための新たな道を開くと考えている。

参考文献

1. Nakagami, A., Yasue, M., Nakagaki, K., Nakamura, M., Kawai, N., & Ichinohe, N. (2022). Reduced childhood social attention in autism model marmosets predicts impaired social skills and inflexible behavior in adulthood. *Frontiers in psychiatry*, 13, 885433.
2. Nakamura, M., Nakagami, A., Nakagaki, K., Yasue, M., Kawai, N., & Ichinohe, N. (2022). Prenatal valproic acid-induced autism marmoset model exhibits higher salivary cortisol levels. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16, 943759.
3. Satoshi Watanabe, Tohru Kurotani, Tomofumi Oga, (10人) & Noritaka Ichinohe: Functional and molecular characterization of a non-human primate model of autism spectrum disorder shows similarity with the human disease. (2021) *Nature Communications* 12, 5388

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、限局性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、新規行動指標を確立することを目的とした。

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、バルプロ酸自閉症モデル動物を用いてリーチング行動が社会性のモデルとなり得るかを検討した。

結果

現在 338 名（ADHD65 名（小児 7 名）、ASD58 名（小児 13 名）、ASD・ADHD 併存 82 名（小児 18 名）、定型発達群 133 名（小児 53 名））の検査を終了している。国立国際医療研究センター国府台病院との連携で併存障害との関連を、また脳病態統合イメージングセンターとの連携で脳構造・脳機能画像を 22 名について取得しており、さらにその数を増やしている。

視線方向への注意定位では、同時提示した表情のモダリティによらず、強い視線方向への注意シフトが見られることを示したほか、時間知覚課題では、併存群では ADHD 群よりも時間認知の歪みが重篤で、外的時間の認識が正しく出来ない、または、外的時間と内的時間のずれを修正出来ない可能性が示されている。

また、リーチング行動試験にて、健常個体は、リーチング行動を行っている他個体に対して注視することを報告した。バルプロ酸（VPA）自閉症モデル動物に対して、リーチング行動試験を実施しており、本モデルの妥当性を示す複数の有用な知見を得た。

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。一連の研究において、障害カテゴリーを超えた発達

障害特性とその神経基盤を明らかにしつつあり、このような検討は、発達障害の病態の多様性の理解に資する知見と思われる。

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病態の解明を可能にして、今後の個別化治療に道を開くものと考えられる。さらに前方視的検討や脳画像との連携により、病態解明をさらに進めることが可能になる。

参考文献

[口頭発表]

- 1) Egashira Y, Hayashi S, Uono S, Ukezono M, Takada M, Okada T: Possible different cognitive processing in time perception tasks. The 15th International Congress of Physiological Anthropology(ICPA), Oregon, 2022.9.17.
- 2) Hayashi S, Uono S, Egashira Y, Ukezono M, Takada M, Okada T: Does seeing others' smiles improve executive function in adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD)? An experimental psychology study. The 15th International Congress of Physiological Anthropology (ICPA), Oregon, 2022.9.17.
- 3) Egashira Y, Hayashi S, Uono S, Takada M, Ukezono M, Okada T: Time perception deficits in individuals with comorbidity of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Neuroscience 2022, Online*, 2022.11.14.
- 4) Hayashi S, Egashira Y, Uono S, Ukezono M, Takada M, Okada T: Does feedback of a happy face improve response inhibition in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Neuroscience 2022, Online*, 2022.11.14.

[英文論文]

- 1) Uono S, Egashira Y, Hayashi S, Takada M, Ukezono M, Okada T: No influence of emotional faces or autistic traits on gaze-cueing in general population. *Frontiers in Psychology 13*: 864116. 2022.4.26. DOI: 10.3389/fpsyg.2022.864116
- 2) Egashira Y, Kaga Y, Gunji A, Kita Y, Kimura M, Hironaga N, Takeichi H, Hayashi S, Kaneko Y, Takahashi H, Hanakawa T, Okada T, Inagaki M: Detection of deviance in Japanese kanji compound words. *Frontiers in Human Neuroscience 16* 913945, 2022.8.15. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.913945>
- 3) Ishii-Takahashi A, Kawakubo Y, Hamada J, Nakajima N, Kawahara T, Hirose A, Yamaguchi R, Kuwabara H, Okada T, Kano Y: Changes in child behavioral problems and maternal attachment towards children with attention-deficit/hyperactivity disorder following behavioral parent training: A pilot study. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 2023 Apr 28. doi: 10.1111/pcn.13558.

研究課題

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

てんかん診療部、小児神経診療部

中川栄二

研究協力者

国立精神・神経医療研究センター病院

てんかん診療部、小児神経診療部

渡辺詩絵奈、住友典子

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. 研究報告

(1) 自閉スペクトラム症の睡眠障害における少量バルプロ酸の効果

(はじめに)

自閉スペクトラム症 (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。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。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。入眠時の脳機能の評価について脳波を用いて定量的な評価を行い、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。

(方法と対象)

ASD における入眠時脳波異常と睡眠障害に対する少量バルプロ酸 (VPA) (5-10 mg/kg/日 夕食後) 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 2022 年 12 月) の神経発達症患者 667 人を対象として、入眠時脳波異常と 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。睡眠障害の判定は、本人又は養育者が睡眠障害に対する問題意識を持っており、入眠時刻が 8 歳未満で 22:00 以降、9-11 歳で 22:30 以降、12 歳以上で 23:30 以降である入眠潜時が 30 分以上の状態が週 3 日以上、3 か月以上継続している患者を対象とした。薬物治療効果判定は、臨床全般改善度 (Clinical Global

Impression-Improvement : CGI-I) の家族による評価を指標として CGI-I の中等度改善以上を効果ありと判定した。

(結果)

神経発達症患者 667 人のうち ASD 患者数は 317 人で、ASD 患者に VPA を投与している総数は 303 人(男性 240 人、女性 63 人、平均年齢 13.6 歳 (4-36 歳))であった。てんかんと ASD 併存例 103 人、てんかん非併存例 200 人であった。ASD 患者に対する VPA を投与している割合は 95.6%であった。少量 VPA 投与により 275 人 (90.8%) で睡眠障害と生活の質の改善が認められた。中止は 54 例で副作用として易興奮性、夜尿、下痢が認められた。VPA 血中濃度の検討では、生活の質が改善した患者での血中濃度平均は、39.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、てんかんが併存している患者では、56.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、てんかんの併存のない患者では 26.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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、睡眠障害の改善と昼間の指示の入りやすさ、興奮性、衝動性の軽減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 ASD における睡眠障害を改善させる可能性が認められた。

(考察)

入眠時脳波異常を認める ASD に対する少量バルプロ酸の投与が、睡眠障害の改善と指示の入りやすさ、興奮性、衝動性の軽減など昼間の行動面での改善が認められた。また、入眠時脳波による神経機能評価を行うことで、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示唆された

(2) 自閉スペクトラム症における入眠時脳波を用いたバイオマーカーの探索

(目的・意義)

ASD 児の睡眠時脳波を解析し、年齢を合わせた定型発達児、ASD 非合併の神経発達症児、ASD 非合併のてんかんの児の睡眠時脳波と比較することで、ASD 児に特有の所見を探索的に調査する。本研究を通じ ASD の病態理解が進み、疾患の予防、病態改善・新規治療開発につながる可能性がある。

(研究の実施概要)

ASD 患児と定型発達児の睡眠脳波の違いを探索的に検討した。

(研究対象者)

ASD 患児：2011 年 04 月 1 日より 2020 年 10 月 31 日までの間、NCNP 発達障害外来 (中川担当) に通院中の患者の中から DSM-5 の ASD の診断基準を満たしている症例 (非 ADHD、非てんかん) で、かつ年齢は 3 歳から 10 歳、ASD 診断時に睡眠脳波検査を 10 分以上実施している症例を対象とした。

定型発達児：定義は、てんかん等神経疾患を認めず、DSM-5 の ASD、ADHD の診断基準をみたさない (簡易版 PARS を用いて ASD の傾向がないことを確認する)、家庭内と地域社会 (幼稚園や小学校等) の中でコミュニケーションの問題が存在しない児とした。

* 臨床上脳波検査を実施している症例はオプトアウト、新たにこの研究のために脳波検査を実施する場合はインフォームドコンセントを実施した。

(研究対象者数)

ASD 患児：男児 16 人 (年齢 6.19 +/- 0.62 y)、女児 17 人 (年齢 6.92 +/- 0.52 y)

定型発達児：男児 19 人 (年齢 5.29 +/- 0.41 y)、女児 9 人 (年齢 5.11 +/- 0.81 y)

(方法)

脳波検査実施方法 (10-20 法)：患者脳波は診察上必要な時に検査実施しているもの (眠剤使用は問わず、検査科での 30 分程度の脳波もしくは長時間ビデオ脳波検査実施時の脳波) を使用。健常群については、外来検査室で行い、侵襲性の観点から自然睡眠での検査を基本とした。

脳波解析方法：小児神経科医が脳波を判読し、睡眠脳波、徐波睡眠 10 分間抽出した。アーチファクトをマーキングした。徐波睡眠開始直後から最大 10 分後までの脳波の時間周波数スペクトラム解析を実施した。周波数帯域は、OHBM の推奨を基本に以下の定義を用い、各種脳波成分の強度およびコヒーレンスの解析を実施した。なお、解析にあたっては年齢あるいは、年齢および診断を共変量とした共分散分析を用いた。また、多重性補正は Bonferroni 法にしたがった。

(結果)

全電極平均パワーを定型発達児 (TD) /ASD 患児間で比較したところ、ASD 男児においてシータ帯域のパワーの有意な低下が認められた。全電極平均のベータとシータのパワー比を定型発達児 /ASD 患児間で比較したところ、男児女児ともに ASD 患児において同指標の

有意な上昇が認められた。脳の左右対となる全電極ペアの平均コヒーレンスを定型発達児/ASD 患児間で比較したところ、男児女児ともに ASD 患児においてシータ帯域のコヒーレンスの有意な低下が認められた。

5. 倫理面における配慮の状況（生命倫理・安全対策等の遵守）

当センター倫理委員会（A2020-104 神経発達症に関する脳波研究、B2022-077 小児てんかん患者における睡眠と認知機能との関連に関する研究）で承認を得た。

6. 研究成果の発表（原著論文、学会発表他）

【論文】英文（29）編、

（1）英文論文 すべて査読有

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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
10. 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
 11. Ishihara S, Okamoto Y, Tanabe H, Yoshimura A, Higuchi Y, Yuan JH, Hashiguchi A, Ishiura H, Mitsui J, Suwazono S, Oya Y, Sasaki M, Nakagawa M, Tsuji S, Ohya Y, Takashima H. Clinical features of inherited neuropathy with *BSCL2* mutations in Japan. *J Peripher Nerv Syst*. 2020 Jun;25(2):125-131.
 12. Toki T, Shimizu-Motohashi Y, Komaki H, Takeshita E, Ishiyama A, Saito T, Mori-Yoshimura M, Sumitomo N, Hirasawa-Inoue A, Nakagawa E, Nishino I, Goto YI, Sasaki M. Hyperglycemic crisis in patients with mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Pediatr Neurol*. 2021 Jan;114:1-4.
 13. Ueda R, Iwasaki M, Kita Y, Takeichi H, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Okada T, Sasaki M. Improvement of brain function after surgery in infants with posterior quadrant cortical dysplasia. *Clin Neurophysiol*. 2021 Feb;132(2):332-337.
 14. 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.
 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
 16. Yokosako S, Muraoka N, Watanabe S, Kosugi K, Takayama Y, Iijima K, Kimura Y, Kaneko Y, Sumitomo N, Saito T, Nakagawa E, Iwasaki M. Corpus callosotomy in pediatric patients with non-lesional epileptic encephalopathy with electrical status epilepticus during sleep: experience with three cases. *Epilepsy Behav Rep*. 2021 Jun 8;16:100463. doi: 10.1016/j.ebr.2021.100463.
 17. Iwasaki M, Iijima K, Kawashima T, Tachimori H, Takayama Y, Kimura Y, Kaneko Y, Ikegaya N, Sumitomo N, Saito T, Nakagawa E, Takahashi A, Sugai K, Otsuki T. Epilepsy surgery in children under 3 years of age: surgical and developmental outcomes. *J Neurosurg Pediatr* August 13, 2021.
 18. Ueda R, Kaga Y, Kita Y, Nakagawa E, Okada T, Inagaki M. Clinical profile of reading ability and reading and writing achievement of children with borderline full-scale intellectual quotient: a prospective study. *BMC Pediatr*. 2021 Sep 7;21(1):389. doi: 10.1186/s12887-021-02865-z.
 19. Yamamoto H, Nakagawa E, Kita Y, Kaga Y, Inagaki M. Effect of anti-attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) medication on

- clinical seizures and sleep EEG: A retrospective study of Japanese children with ADHD. received: 15 July 2021 | Revised: 23 September 2021 | Accepted: 4 October 2021 DOI: 10.1002/npr2.12215
20. Hashimoto K, Baba S, Nakagawa E, Noriko Sumitomo, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Abe-Hatano C, Inoue K, Iida A, Sasaki M, Goto Y. Long-term changes in electroencephalogram findings in a girl with a nonsense SMC1A variant: A case report. *Brain Dev.* 2022 Sep;44(8):551-557. doi: 10.1016/j.braindev.2022.04.011.
 21. Kato M, Kada A, Shiraishi H, Tohyama J, Nakagawa E, Takahashi Y, Akiyama T, Kakita A, Miyake N, Fujita A, Saito A, Inoue Y. Sirolimus for epileptic seizures associated with focal cortical dysplasia type II. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2022 Feb;9(2):181-192. doi: 10.1002/acn3.51505. Epub 2022 Jan 18.
 22. Kuroda N, ..., Nakagawa E, et al. Impact of COVID-19 pandemic on epilepsy care in Japan: A national-level multicenter retrospective cohort study. *Epilepsia Open.* 2022 May 28;7(3):431-41. doi: 10.1002/epi4.12616. Online ahead of print.
 23. Kosugi K, Iijima K, Yokosako S, Takayama Y, Kimura Y, Kaneko Y, Sumitomo N, Saito T, Nakagawa E, Sato N, Iwasaki M. Low EEG Gamma Entropy and Glucose Hypometabolism After Corpus Callosotomy Predicts Seizure Outcome After Subsequent Surgery. *Front Neurol.* 2022 Mar 24;13:831126. doi: 10.3389/fneur.2022.831126. eCollection 2022.
 24. Chiba E, Kimura Y, Shimizu-Motohashi Y, Miyagawa N, Ota M, Shigemoto Y, Ohnishi M, Nakaya M, Nakagawa E, Sasaki M, Sato N. Clinical and neuroimaging findings in patients with lissencephaly/subcortical band heterotopia spectrum: a magnetic resonance conventional and diffusion tensor study. *Neuroradiology.* 2022 Apr;64(4):825-836. doi: 10.1007/s00234-021-02836-2. Epub 2021 Oct 25.
 25. Fujii H, Sato N, Kimura Y, Mizutani M, Kusama M, Sumitomo N, Chiba E, Shigemoto Y, Takao M, Takayama Y, Iwasaki M, Nakagawa E, Mori H. MR Imaging Detection of CNS Lesions in Tuberous Sclerosis Complex: The Usefulness of T1WI with Chemical Shift Selective Images. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2022 Jul 14;43(8):1202-1209. doi: 10.3174/ajnr.A7573. Online ahead of print.
 26. Watanabe S, Ming Lei, Nakagawa E, Takeshita E, Inamori K, Shishido F, Sasaki M, Mitsuhashi S, Matsumoto N, Kimura Y, Iwasaki M, Takahashi Y, Mizusawa H, Migita O, Ohno I, Inokuchi J. Neurological insights on two siblings with GM3 synthase deficiency due to novel compound heterozygous ST3GAL5 variants. *Brain Dev.* 2023 Sep;45(5):270-277. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2023.01.002>
 27. Akahoshi K, Nakagawa E, Goto Y, Inoue K. Duplication within two regions distal to MECP2: clinical similarity with MECP2 duplication syndrome. *BMC Med Genomics.* 2023 Mar 6;16(1):43. doi: 10.1186/s12920-023-01465-3.
 28. Kawano O, Saito T, Sumitomo N, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Nakagawa E, Mizuma K, Tanifuji S, Itai T, Miyatake S, Matsumoto N, Takahashi Y, Mizusawa H, Sasaki M. Skeletal anomaly and opisthotonus in early-onset epileptic encephalopathy with KCNQ2 abnormality. *Brain Dev.* 2023 Apr;45(4):231-236. doi: 10.1016/j.braindev.2022.12.004.
 29. Yamamoto K, Baba S, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Iwasaki M, Fujita A, Fukuda H, Mizuguchi T, Kato M, Matsumoto N, Sasaki M. Synchronous heart rate reduction with

suppression-burst pattern in KCNT1-related developmental and epileptic encephalopathies. *Epilepsia Open*. 2023 Feb 5. doi: 10.1002/epi4.12705. Epub ahead of print.

【学会発表】 国際学会 (14) 回
国際学会

1. Iwasaki M, Iijima K, Takayama Y, Kimura Y, Muraoka N, Yokosako S, Sumitomo N, Saito T, Nakagawa E, Sasaki M. Seizure Outcome and Complications in Surgical Treatment of Infantile Epilepsy. The 21st Annual Meeting of the ISS, the International Symposium on Pathophysiology of Developmental and Epileptic Encephalopathy (ISDEE2020). Tokyo, Japan, June 19-21, 2020.
2. Watanabe S, Ming Lei, Nakagawa E, Takeshita E, Mitsuhashi S, Matsumoto N, Takahashi Y, Mizusawa H, Sasaki M. ST3GAL5 mutation in two Chinese sisters with epilepsy, developmental delay, and involuntary movements. The 21st Annual Meeting of the ISS, the International Symposium on Pathophysiology of Developmental and Epileptic Encephalopathy (ISDEE2020). Tokyo, Japan, June 19-21, 2020.
3. Yamamoto A, Komaki H, Segawa K, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Ishiyama A, Sumitomo N, Saito T, Nakagawa E, Sasaki M. Variability of cardiac function in patients with Duchenne muscular dystrophy experiencing sudden onset of chest pain and electrocardiographic changes. The 25th International Annual Congress of the World Muscle Society. 28. Sep-2. Oct, 2020. <https://www.wms2020.com/>
4. Tabata K, Ishiyama A, Sugai K, Iwasaki M, Sumitomo N, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M. A predictor for developmental and epileptic postsurgery prognosis in patients with hemimegalencephaly; A pre- and postsurgery study with N20 at non-HME side of median nerve short latency somatosensory evoked potentials. 13th Asian & Oceania Epilepsy Congress (AOEC), June 10-13, 2021.
5. Ikegaya N, Iwasaki M, Kaneko Y, Kimura Y, Iijima K, Takayama Y, Yamamoto T, Sumitomo N, Saito T, Nakagawa E, Sasaki M. Neuropsychological and neurological sequelae after pediatric insular epilepsy surgery. 13th Asian & Oceania Epilepsy Congress (AOEC), June 10-13, 2021.
6. Watanabe S, Nakagawa E, Saito T, Iwasaki M. The analysis of suppression-burst pattern in hemimegalencephaly patients who underwent hemispherotomy. 13th Asian & Oceania Epilepsy Congress (AOEC), June 10-13, 2021.
7. Nakagawa E, Yamamoto H. Effect of methylphenidate and atomoxetine on electroencephalogram sleep studies in children with attention deficit hyperactivity disorder. 13th Asian & Oceania Epilepsy Congress (AOEC), June 10-13, 2021.
8. Nakagawa E, Fukumura S, T. Language dominance in Children with epilepsy using near-infrared spectroscopy. 34th International Epilepsy Congress, Virtual Congress, 28 August-1 September, 2021.
9. Sugai K, Otsuki T, Saito T, Nakagawa E, Sasaki M, Iwasaki M, Takumi I. Outcome of medical treatment of postsurgical residual or relapsing seizures. 75th American Epilepsy Society Annual Meeting, Dec 3-7, 2021.
10. Ueda R, Iwasaki M, Kita Y, Takeichi H, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Okada T, Sasaki M. Improvement of brain function after surgery in infants with posterior quadrant cortical dysplasia. 75th American Epilepsy Society Annual Meeting (AES)., Dec 3-7, 2021.
11. Watanabe S, Nakagawa E, Saito T, Iwasaki M. A clinical report on the pathogenesis of suppression-burst by analyzing EEG from hemimegalencephaly patients who underwent hemispherotomy. The Lancet Summit:

Presymptomatic Prevention and Treatment of Neurodegenerative Diseases, Dec 14-16, 2021.

12. Sugai K, Arai N, Saito T, Nakagawa E, Sasaki M, Yamamoto H. Medical treatment of focal epileptic spasms. 34th International Epilepsy Congress., 34th International Epilepsy Congress. Aug 28-Sep 1, 2021.
13. Nakagawa E. National model project for epilepsy regional medical cooperation system in Japan. 17th International Child Neurology Congress. Antalya, Turkey, October 3-7, 2022. (Online)
14. Nakagawa E. National model project for epilepsy regional medical cooperation system in Japan. 14th Asian & Oceanian Epilepsy Congress (AOEC) , November 17-19, 2022. (Online)

7. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況 特になし

8. 受賞 (3回)

(1) 2020年度日本小児神経学会 令和2年度福山幸夫
アワード (上田理誉)

小児医学研究振興財団 優秀論文賞 (上田理誉)
表彰論文

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.

(2) 加藤英生、宮川 希、谷口 豪、中川栄二. 第55回日本てんかん学会「多彩な発作症状とてんかん発作との鑑別が困難な焦点てんかんの一例」 「高橋剛夫賞 (優秀演題賞)」受賞

(3) 中川 栄二. 第76回国立病院総合医学会 2022年10月7日 熊本『てんかん診療支援コーディネーター認定制度の進捗状況』 「ベストポスター賞」受賞

9. 英文要約

(1) Effects of low dose valproic acid on sleep disorders in autism spectrum disorder

Eiji Nakagawa

Department of Epileptology, Department of Child Neurology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan

(Background) Although clinical experience has demonstrated the effects of antiepileptic drugs such as valproic acid (VPA) on mood swings, irritability and sleep disorders, there is not enough evidence available supporting this.

Here, we studied the effects of VPA on irritability, compulsiveness and sleep disorders in developmental disorders particularly autism spectrum disorder (ASD).

(Methods) Subjects comprised adults and children with developmental disorders, excluding cases with comorbidity of epilepsy who visited our developmental disorder clinic between September 2011 and December 2022. We retrospectively studied symptoms such as irritability, compulsiveness and sleep disorders, electroencephalography (EEG) at sleep onset, drug administration and pharmacotherapeutic effects of low dose VPA (5-10mg/kg/day after dinner) administration from medical records. We evaluated therapeutic effects by assessing symptomatic changes during the day and improvement of the sleep disorder using the Clinical Global Impressions (CGI-I). We also comparatively studied the results of EEG before and after administration of the drug. Consent was obtained from the patients, or their family and this study was approved by the institutional review board.

(Results) The male to female ratio between the total 303 patients who were administered VPA was 240 : 63, and the ages of subjects ranged from 4 years to 36 years. The mean age was 13.6

years. Abnormalities in EEG at sleep onset were observed in 85.1%, and high-voltage sharp waves/slow-waves were observed in the frontal region in many cases. There were 95.6% whose symptoms during the day improved after starting low dose VPA therapy. In terms of changes in sleep orders before and after starting VPA, we observed that out of the 90.8% who had sleep disorders before starting the drug, improvement was seen in 91.6%. Administration of the drug was discontinued in 54 cases before the end of the study for reasons such as exacerbated irritability or hyperphagia.

(Results) We observed improvement in problems such as behavioral issues and sleep disorders as a result of administering low dose VPA to subjects with developmental disorders particularly ASD. VPA may improve symptoms accompanying developmental disorders, and prospective studies, among other types of research, needs to be conducted to accumulate data on more cases.

(2) Searching for Biomarkers in Autism Spectrum Disorders Using Sleep Onset

Eiji Nakagawa

Department of Epileptology, Department of Child Neurology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan

(Background) We will analyze the sleep EEG of children with ASD and compare it to the sleep EEG of age-matched children with typical development, children with neurodevelopmental disorders without ASD, and children with epilepsy without ASD, in order to explore and investigate findings specific to children with ASD. This research will advance our understanding of the pathophysiology of ASD and may lead to prevention of the disease, improvement of the pathophysiology and

development of new treatments.

(Methods) We conducted an exploratory study of differences in sleep EEG between ASD-affected and typically developing children.

<Study Subjects>

Children with ASD: Patients who were attending NCHNP Dr. Nakagawa from 04/01/2011 to 10/31/2020 who met the diagnostic criteria for ASD in DSM-5 (non-ADHD, non-epilepsy), aged 3 to 10 years, and who had a sleep EEG test of at least 10 minutes at the time of ASD diagnosis. Cases were included in the study.

Typically developing children: Defined as children who did not have epilepsy or other neurological disorders, did not meet DSM-5 diagnostic criteria for ASD or ADHD (a simplified version of PARS was used to confirm the absence of ASD tendencies), and had no communication problems both at home and in the community (kindergarten, elementary school, etc.).

*Cases with clinically available EEG testing were opted out, and informed consent was given for new EEG testing for this study.

(Results) Number of study subjects

ASD patients: 16 males (age 6.19 +/- 0.62 y), 17 females (age 6.92 +/- 0.52 y)

Definitive development: 19 males (age 5.29 +/- 0.41 y), 9 females (age 5.11 +/- 0.81 y)

Method of conducting EEG examination (10-20 method): Patient EEG was conducted when necessary for examination (regardless of the use of sleeping pills, 30-minute EEG in the examination department or EEG during prolonged video EEG examination). For the healthy group, the examination was performed in an outpatient laboratory and was based on examination in spontaneous sleep from the viewpoint of invasiveness. EEG analysis method: The pediatric neurologist decoded the EEG and extracted 10 minutes of sleep EEG and slow wave sleep. Artifacts were marked.

We performed time-frequency spectrum analysis of the EEG from immediately after the onset of slow-wave sleep to a maximum of 10 minutes later. The frequency bands were analyzed for intensity and coherence of the various EEG components using the following definitions based on OHBM recommendations. Analysis of covariance was performed using age or age and diagnosis as covariates. The Bonferroni method was used to correct for multiplicity.

(Results)

When all-electrode mean power was compared between typically developing (TD)/ASD children, a significant decrease in theta band power was observed in ASD boys. When the ratio of beta to theta power averaged over all electrodes was compared between TDs and ASD patients, a significant increase in this measure was observed in both boys and girls with ASD. A comparison of the average coherence of all paired electrode pairs in the left and right sides of the brain between children with typical development and children with ASD showed a significant decrease in the coherence of the theta band in both boys and girls with ASD.

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アンドロイドは、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(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。ASD者によって、適切なアンドロイドのノンバーバルな表現を設定するにあたり、対象者の状態推定は重要となる。本研究では、多くのASD者にとって心地の良くアンドロイドと対話するためのアンドロイドの状態推定を目的とする。

方法

ASD者とアンドロイドが対面し、予め設定されたスクリプトに基づいてインタラクティブした。アンドロイドのノンバーバルな表現は、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った。被験者の対人



恐怖症状評価、認知機能・言語能力・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した。ASD者にアンドロイドとインタラクティブしていただき、1)インタラクティブ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ティブの質の分析を行った。ビデオカメラデータについては2名のトレーニングを受けた心理士が収集したデータを総合的に分析し、収集したデータに対し被験者の状態(集中度合い (Arousal))、快-不快度合い (Valence)、興味度合い (Engagement))を表すラベル付けを行いデータから被験者の状態を推定できるモデルを作成した。また、アンドロイドの振る舞い方の違いによって、ASD者の話やすさや心地よさはどのように変化するか、収集したデータをもとに分析し、考察を行った。

結果

42名のASD者が参加した。視線情報については17名のASD者において正確な評価が難しかった。残った25名を評価の対象とした。解析方法には機会学習アルゴリズムとしてLightGBM (Light Gradient Boosting Machine)を用いた。またArousal (AUC値 0.82), Valence (AUC値 0.20), Engagement (AUC値 0.86)の分類精度を示した。音声×骨格×視線に被験者の対人恐怖症状評価、認知機能・言語能力・感覚特性評価を加えることで、より高い分類精度を示すことが明らかとなった。

考察

音声、骨格、視線情報に被験者の対人恐怖症状評価、認知機能・言語能力・感覚特性評

価を加えること ASD 者の高い状態推定を行うことができた。また同じ音声、骨格、視線情報でも、被験者の背景情報により状態が異なることが推定された。被験者の背景情報の重要性が明らかになった意義は大きい。

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

研究協力者：

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 阿部ちひろ、後藤雄一

国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科 田畑健士郎、竹下絵里、中川栄二

【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①アレイ CGH 解析により

同定された *MECP2* 遠位領域の重複を認められた発達障害を伴う知的障害の 1 家系および②全ゲノム解析により同定された *WDR45* 変異を持つ症例を報告する。

【結果】

①症例は 17 歳男性。38 週で出生。知的発達遅滞でのため、2 歳 4 ヶ月時初診。小さな口、扁平足、低緊張あり。易感染性あり。5 歳時の IQ=63。6 歳時にてんかん発作あり。EEG にて異常指摘。自閉症、攻撃的行動異常あり。徐々に知的に退行。11 歳時に下肢の痙性対麻痺が出現。頭部 MRI にて小頭症、脳梁、小脳、脳幹の低形成、白質高信号を認めた。アレイ CGH にて Xq28 の *MECP2* 遠位に 1.2Mb の重複を同定し、母親も保因者であることが示された。

②2 歳 4 か月女性で主訴は発達遅滞、てんかん。4 か月で筋緊張低下を指摘され、5-6 か月で定頸獲得、1 歳 6 か月で spasm を認めてんかんと診断。2 歳時、発達検査 DQ22 (遠城寺)。頭部 MRI で脳梁低形成、髄鞘化遅延を認めた。全ゲノム解析にて *WDR45* 遺伝子に c.1051delG:p.(Val351Cysfs*60) を同定した。

【結論】

① *MECP2* を含まない Xq28 の重複が知的障害、発達障害、てんかん、易感染性などを呈する疾患の原因となることが近年報告されている。この領域には 2 組の対になる segmental duplication が存在し、それぞれを介した重複症候群が K/L-mediated 重複症候群、int22h1/int22h2-mediated 重複症候群として報告されているが、本例はこの両方の領域を含む重複による稀少な症例である。これらの症例の臨床症状の比較から *RAB39B* が自閉症症状の責任遺伝子である可能性が示唆された。*RAB39B* は Rab family small GTPases の 1 つで neuronal membrane traffic や autophagy に関与することが知られている。

② *WDR45* は幼少時には知的障害、発達遅滞、自閉症、てんかん等を呈し、成人期にはジストニア、パーキンソン症候群、認知症に進行する X 連鎖性顕性疾患 Static Encephalopathy of Childhood with Neurodegeneration in Adulthood (SENDA) の原因遺伝子として知られている。本症例で見出された変異は、最終エクソンのフレー

ムシフト変異による stop-loss 変異となる。同様の stop-loss 変異は数症例で報告されているが、幼児期には比較的軽症で経過する症例から本例のように重症となる例までであるが、その分子病態機序は明らかになっていない。WDR45 は autophagy における早期 autophagosome 形成に関わることが知られている。

【考察】

MECP2 を含まない Xq28 の 1.2Mb の重複症例の発達障害に関連する遺伝子として *RAB39B* に注目した。*RAB39B* 変異は autophagy の調節障害を介して、ASD あるいは Parkinson 病を引き起こすことが知られている。一方、*WDR45* 変異は、autophagosome の調節障害をきたし、小児期に ASD (知的障害とてんかんも合併)、成人期に Parkinson 病を含む変性疾患をきたすことが知られている。さらに Parkinson 病の原因遺伝子 *PARK2* の欠失が、ASD に関連することも報告されていることから、Autophagy-ASD-Parkinson 病の関連性は注目すべき病態機序となるかもしれないと考えた。

【参考文献】

1. Akahoshi K, Nakagawa E, Goto YI, Inoue K. Duplication within two regions distal to *MECP2*: clinical similarity with *MECP2* duplication syndrome. BMC Med Genomics. 2023 Mar 6;16(1):43. doi: 10.1186/s12920-023-01465-3. PMID: 36879246

自閉症様マーモセットの hoch 社会認知機能解明に向けた行動評価系の開発

川合伸幸・佐藤知子・中村月香
名古屋大学大学院 情報学研究科

緒言

自閉スペクトラム症 (ASD) は 1000 人に 1-2 人の割合で生じる先天性の脳機能発達障害と考えられているが、脳機能上の異常から行動の問題へと至る具体的なメカニズムは未だ解明されていない。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。そのため、ヒト hoch 機能のモデル動物は、 hoch な知能と高い社会性を有するヒトに近縁な動物で検討する必要がある。マーモセットを用いた本研究による行動評価系の確立は、ヒト実症例に近いモデルの開発に繋がる研究である。

方法

①幼少期における他個体への注視時間と成長後の社会性障害との関連

マーモセットは視線を用いて両親や兄妹から群れ社会におけるコミュニケーション手法を学ぶ。ヒト自閉症者の「視線が合わない」という特性が ASD モデル動物である胎児期バルブプロ酸曝露群 (VPA 群) においても観察されるかを調べるため、3 か月齢の幼若個体を見知らぬ成獣個体と透明の板越しに対面させ、その際他個体への注視時間を計測した。

②治療候補薬投与による hoch 社会認知の行動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報酬を得るのを見ると、それを見た個体が従来と同じ報酬が貰えるのに関わらず課題を遂行しなくなる (または餌の受け取りを拒否する) ことを不公平忌避という。マーモセットは雌雄ともに不公平忌避を示し、VPA 群は他個体への関心が弱く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が^[1]、その症状に対して、近年ヒトの臨床治験で ASD の候補治療薬とされているオキシトシン (脳下垂体後葉から分泌されるホルモン) を VPA 群に経鼻投与することで治療効果が確認されるかを検討した。

③過活動性の微細解析とコルチゾール値との関連 ASD を含めた発達障害では様々な合併症状が認められることが多く、ASD における過活動性 (多動性) はその主症状である。本研究では VPA 群の

活動量を計測するため、マーモセットに首輪型の加速度センサーを装着しホームケージでの活動量を 3 週間測定して定型発達群 (UE 群) との比較を行った。また、加速度センサー装着期間外に起床直後と就寝直前に採取した唾液からコルチゾール値を計測し、過活動性との関連を調べた。

④ストレス応答性と他個体の脅威状況への認識 軽度の自閉症者においても認められる症状の一つにストレス脆弱性が挙げられる。ASD 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も報告されている。本研究ではマーモセットのストレス事象となり得る映像 (天敵であるヘビが動く様子) とコントロール映像を同時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。また、マーモセットは他個体の傍にヘビ玩具が置かれているとき (他個体が脅威状況に晒されているとき) に警戒音声を発するか、またその頻度に UE 群と VPA 群で違いがあるかを調べた。

⑤他個体の行動に基づく意志決定の予備的検討

これまでの研究で、マーモセットはヒト第三者間の互惠的 / 非互惠的交渉を弁別し^[2]、隣の個体が受け取る報酬に比べて自身の報酬の価値が低いときには課題の遂行をしないが、これらの社会的な影響は VPA 群では示されないことを明らかにしてきた。しかし、これらの社会的な影響は間接的なものであり、他個体の行動が直接、自身の報酬の獲得に影響するものではなかった。VPA が投与されたマーモセットや投与されていないマーモセットは、他個体の行動にあわせて自身の行動を調整するかどうかを検討するための予備的検討を行った。

他個体が (自身から見て) 右の餌を取った場合、自身は左を選択しなければならない状況の行動を検討するために、VPA 群と非投与群はいずれも単純な位置弁別課題において、その成績に違いがないことを示さねばならない。そこで位置弁別実験を実施した。

結果

①幼少期における他個体への注視時間と成長後の社会性障害との関連

ヒトの年齢では 2-3 歳程度に当たる、3 か月齢の VPA 群において、成獣を注視する時間が UE 群と比較して短いことが明らかになった。また、その幼少期の他個体注視時間と、成長後の社会性障害や固執的行動に強い負の相関があることを見出した^[3]。

②治療候補薬投与による高次社会認識の行動評価被験個体（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が、有意な差は認められなかった。

③過活動性の微細解析とコルチゾール値との関連加速度センサーの測定値から、UE群に比べてVPA群では24時間の活動量が有意に高いことが明らかになり、起床時の活動量の立ち上がりが定型発達群よりも急激で、夕刻の消灯時には活動量が急に減少する傾向がみられた。また、VPA群は活動の間欠性に低下がみられ、一度休息姿勢に入っても長続きしないことが観察された。エントロピーを指標にした活動量解析では、VPA群のオスにおいて、他の3群（VPAメス/UEオス/UEメス）と比較して複雑性の増大が認められた。さらに、生理学的指標としてストレスホルモンであるコルチゾール値を起床直後と就寝直前に採取した唾液から測定したところ、定型発達群と比較してVPA群では一日を通してコルチゾール値の上昇が観察された⁹⁾。活動量との関連を調べたところ、活動量が多い個体ほど起床直後のコルチゾール値が高いという正の相関も確認された。

④ストレス応答性と他個体の脅威状況への認識ヘビとキリンをモニターに同時呈示しているときに警戒音声を再生すると、UE群ではストレス事象の映像画面から体を背け視線を外す時間が長くなったが、VPA群では各動物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との連合に障害があることが示唆されたが統計的に有意な差ではなかった。他個体の脅威状況への認識については、個体単独でヘビ玩具を呈示された際に警戒音声を発した7頭を対象にしたところ、警戒音声発声数は1)単独・ヘビあり（385回）、2)単独・ヘビなし（38回）、3)非血縁個体・ヘビあり（310回）、4)血縁個体・ヘビあり（432回）と、血縁個体がいるときに警戒音声が発せられた（ $F(3, 15) = 3.64, p < .05$ ）が、個別の条件間では有意差は見られなかった。

⑤佐藤さんの実験

学習基準に到達するまでの平均到達セッション数は、非投与群が5.8回、VPA群が4.8回で大きな違いはなかった。なお、逆転学習では、7.8回と6.6回であったが、再逆転では非投与群が6.6回であるのに対し、VPA群は9.0回と多くのセッションを要した。この結果は先行研究と一致している⁹⁾。

考察

上記の結果から、自閉症児の社会的注意障害がその後の社会脳発達を障害する可能性が示唆され、本モデル動物がASDの早期介入・早期治療法の開発に有用であることが明らかとなった。また、ヒトの臨床治験においてASD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、自閉症モデルマーマセットである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。さらに、VPA群において有意なコルチゾール値の上昇が観察されたことから、行動パターンや脳病理だけでなく、ホルモン調節においても本モデル動物とヒト自閉症に類似性があることを示唆している。

結論

本研究では、一貫して胎生期のバルプロ酸投与による自閉症モデルを作出し、自閉症との表面妥当性を示した。さらに、自閉症の基準とされない高次社会認知機能においても、非投与個体よりも社会認知能力が低下していることを示した。

自閉症はスペクトラムであり、ヒトの自閉症のあり方はかならずしも一様ではないが、少なくともバルプロ酸による自閉症者のモデルとしては有用であると考えられる。

間接的な社会行動に障がいがあることを示したものの、直接自身の利益にかかわるような社会交渉においても障がいが見られるかを検討するところであったが、期間内に研究を終えることができなかった。

今後は、バルプロ酸以外の方法による自閉症モデルの作成や、ヒト自閉症者が潜在的に有している社会認知機能の低下をあきらかにするような、霊長類モデル研究の実施が待たれる。

参考文献

- [1] 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.
- [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 interaction with otherwise avoided non-reciprocal individuals. *Behavioural Brain Research*, 292, 323-336.

[3] Nakagami, A., Yasue, M., Nakagaki, K., Nakamura, M., Kawai, N., & Ichinohe, N. (2022). Reduced childhood social attention in an autism model marmoset predicts impaired social skills and inflexible behavior in adulthood. *Frontiers in Psychiatry*, 13, 885433

[4] Nakamura, M., Nakagami, A., Nakagaki, K., Yasue, M., Kawai, N., & Ichinohe, N. (2022). Prenatal valproic acid-induced autism marmoset model exhibits higher salivary cortisol levels. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 943759

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）および成体マーマーモセット脳の前頭眼野（area8a）と側頭葉（TE 野）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

胎生期バルプロ酸曝露マーマーモセット（以後、VPA マーマーモセット）と定型発達・バルプロ酸非曝露マーマーモセット（以後、UE マーマーモセット）を比較対象とし、最もシナプス形成が盛んな3ヶ月齢のマーマーモセット8個体（UE: 4個体、VPA: 4個体）の2脳領域（内側前頭前野、前帯状皮質）、成体マーマーモセット8個体（UE: 4個体、VPA: 4個体）の2脳領域（前頭眼野、側頭葉）を用いた1細胞遺伝子発現解析を行った。各サンプルから平均11,334個（1,961～36,941個）の1細胞発現データと平均4,352遺伝子（2,385～5,648遺伝子）の発現デー

タを取得した。取得した発現データをもとに、UMAP法による次元圧縮・グラフクラスタリングによる細胞のクラスタリングを行った。その結果、13種類の興奮性ニューロン、10種類の抑制性ニューロン、3種類のアストロサイト、2種類のミクログリアに加えてそれぞれ1種類のオリゴデンドロサイト前駆細胞、オリゴデンドロサイト、内皮細胞、周皮細胞に分類されるクラスターを同定することができた。興奮性・抑制性ニューロンに関しては皮質層構造や発生過程を反映したクラスタリングパターンを同定することができた。同定した細胞タイプごとに、VPAマーモセットとUEマーモセットの発現比較を行った結果、VPAマーモセットの興奮性ニューロンでは発現低下、逆に抑制性ニューロンにおいて発現亢進が認められた。このことは、興奮性・抑制性ニューロンの適切なバランスの乱れがヒト自閉症の要因の一旦として考えられている点と類似していた。

また、先行研究によりデータが公開されているヒト自閉症患者の死後脳から得られた1細胞発現データとの比較統合解析を行った結果、ヒト自閉症患者脳とバルプロ酸暴露マーモセット脳で細胞タイプごとに共通して認められる発現変動遺伝子を多数同定することができた。同定された遺伝子には、自閉症関連遺伝子が多数含まれていた。

今後は、自閉症と関連が多く報告されている、抑制性ニューロンやミクログリア・アストロサイトなどを中心とした解析をさらに進める。

考察

胎生期バルプロ酸暴露による自閉症マーモセットモデルの1細胞発現解析を行ったところ、各細胞タイプにおいて定型発達群と比較して数十から数百の発現差を示す遺伝子が同定できた。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モセットモデルは、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。また、ヒト自閉症患者死後脳からの1細胞発現データとの統合解析を行うことで、細胞タイプかつ遺伝子特異的なトランスレータブルな分子マーカー候補の発見が可能となった。これらの分子マーカー候補の発見は今後の核酸医療に向けた大きな一歩である。

過去6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。今後は、異なる発達段階における1細胞遺伝子発現解析をさらに進めるとともに、バルプロ酸の作用機序（ヒストン脱アセチル化阻害剤）に直結するヒストン修飾解析（single-cell ATAC-seq）解析も進める。さらに、ヒト自閉症死後脳を用いた研究・データも増えてきたため、ヒトのデータとの統合解析の大規模化を計り、バルプロ酸投与マーモセットモデルがヒト自閉症のどのサブタイプのモデルと成り得るのか、層別化を行う。

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モ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。

発達障害の治療法の確立に向けたトランスレーショナルリサーチ

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 (1, 2)。セロトニン系やドパミン系の神経伝達は 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 受容体やドパミン D2 受容体が媒介メカニズムとして注目されている (3)。本研究では、ヒト ASD 当事者を対象に、ASD の脳分子病態とオキシトシンの相互作用と 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 ASD 当事者 20 名と定型発達者 20 名を対象に、ASD 脳分子病態の候補としてセロトニン 1B 受容体やドパミン D2/3 受容体およびミトコンドリア複合体 I (MC-I) 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。

結果 令和 3 年度は、方法に記載した症例対照研究のデータ収集を行なった。そして、セロトニン 1B 受容体の PET については年度内で ASD 当事者 20 名と定型発達者 20 名まで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 撮像を完了させた。

ASD の脳分子病態の候補として検討した MC-

I の PET については、23 名の ASD 当事者と 24 名の定型発達者のデータを収集して解析し、ASD 者では前部帯状皮質で MC-I 活性が低下しており、Autism Diagnostic Observation Schedule で評価したコミュニケーションの障害が顕著であることと相関していた (4)。

考察 これらの結果は、これまで死後脳や血液を用いた研究の結果から推測されていた ASD の「ミトコンドリア機能障害仮説」を生体脳内における検討によって裏付けるものである。さらに、脳内のミトコンドリア機能の改善を図ることが治療薬の標的となる可能性を支持すると考えられた。

参考文献 (*Corresponding author)

1. Yamasue H* et al. Effect of a novel nasal oxytocin spray with enhanced bioavailability on autism: a randomized trial. *Brain* 2022 Jan 24;awab291. doi: 10.1093/brain/awab291. Online ahead of print.
2. Benner S, (途中 12 名), Yamasue H*. Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. *Molecular Psychiatry* 2021 Feb;26(2):710-720.
3. Murayama C, … (途中 12 名), Yamasue H* Extrastriatal dopamine D2/3 receptor binding, functional connectivity, and autism socio-communicational deficits: a PET and fMRI study. *Molecular Psychiatry* 2022 Apr;27(4):2106-2113.
4. Kato Y, … (途中 14 名), Yamasue H* Lower availability of mitochondrial complex I in anterior cingulate cortex of autism: a positron emission tomography study. *American Journal of Psychiatry* 2023 Apr 1;180(4):277-284.

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) などの発達障害では、共感性や意思決定などの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。これまで、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、その神経基盤を検証する神経経済学が興隆した。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、行動経済学的手法を応用し、ASD における柔軟性や文脈感受性の低下を明らかにしてきた[2, 3]。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】申請者らは、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) 実験を行ってきた。

fMRI 課題では、道徳的葛藤を伴う場面で、損得勘定と情状酌量を考慮して柔軟な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。

損得勘定に関するセッションでは、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。情状酌量に関するセッションでは、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。

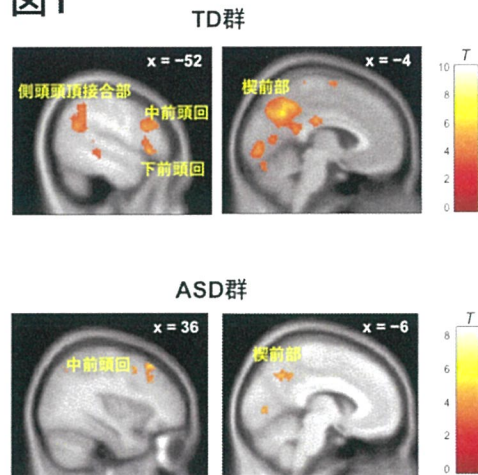
両群の年齢、利き手、知能指数 (IQ) をマッチし、fMRI の解析には SPM12 (Wellcome Trust Center for Neuroimaging, London, UK) を用いた。

【結果】TD ($n = 28$, 29.4 ± 6.9 歳), ASD ($n = 22$, 30.4 ± 6.2 歳) を解析対象とした。

行動解析より、ASD において、損得勘定に関する柔軟性が低下していることが示された ($p < 0.05$)。情状酌量に関する意思決定に関しては、TD 群と ASD 群で有意な差を認めなかった。

損得勘定に関する意思決定を行なっている最中の脳活動として、下前頭回、中前頭回、内側前頭前野、楔前部、側頭頭頂接合部などの脳領域が同定された (図 1)。情状酌量に関する意思決定を行なっている最中の脳活動としては、中前頭回、側頭頭頂接合部を中心とした脳領域が同定された。ASD 群では、TD 群と比較して、損得勘定に関する左下前頭回の脳活動が低下していたが、情状酌量に関する脳活動は両群で有意な差を認めなかった[4]。

図 1



【今後の展望】

本研究結果をもとに、柔軟性や文脈感受性に関わる神経ネットワークに着目し、ASD の多角的な病態解明、新規治療法開発の基盤としたい。

【参考文献】

1. Farmer et al. People with autism spectrum conditions make more consistent decisions. *Psychol Sci* 28:1067-1076, 2017.
2. Fujino et al. Attitudes toward risk and ambiguity in patients with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 8:45, 2017.
3. Fujino et al. Impact of past experiences on decision-making in autism spectrum disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 270:1063-1071, 2020.
4. Tei et al. Decision flexibilities in autism spectrum disorder: An fMRI study of moral dilemmas. *Soc Cogn Affect Neurosci* 17: 904-911, 2022.

分担研究課題名

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を中心として行ってきたコホート研究の参加児童（自閉スペクトラム症[autism spectrum disorders: 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 [acoustic startle response: ASR] 検査および安静時開眼・ミスマッチ陰性電位・聴覚誘発脳磁界反応等の脳波・脳磁図検査）、アクチグラフを用いた行動動態指標、腸内・口腔内の菌種組成等、動物実験にも応用可能な指標のデータをもとに、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候補を検討した。有力なマーカーに関しては、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などの類似の指標を主任研究者らと検証し、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した。なお、本研究課題で行った研究は全て臨床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行った。全ての被験者および未成年では保護者からは、研究に関する説明（研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解に関わる状況等）を行った後、書面で同意を得た。

これまで分担研究者らは、小さな聴覚刺激に対する

ASR の大きさや ASR のピークの潜時などの ASR の指標が、ASD 特性や情緒・行動上の問題などの臨床指標¹⁾やアクチグラフで評価した身体活動動態²⁾と関連するエンドフェノタイプの有力な候補と考えられることを報告したが、糞便・唾液内の様々な細菌叢の組成は、このような指標や ASD 特性などと有意な関連を認めた。

安静開眼時脳波において、 α 帯域の電位源は、右縁上回を中心とする右側頭頭頂接合部（心の理論などと関連）において、定型発達児に比べ ASD 児で亢進していたが、1年後に有意差は認めなかった、そして、安静開眼時脳波において、ASD 児は定型発達児に比べ、右側頭葉から前頭葉にかけて connectivity (coherence) が有意に低下していたが、1年後に有意差は認めなかった。また、脳磁計を用いて評価した聴性定常ガンマ律動の power 値の側性が児童の行動上の問題などの臨床指標と有意な関連を認めた。

アクチグラフを用いて同じ保育所に通所し共通の午睡環境で過ごす児童の身体活動動態解析から、感覚特性の問題の大きさは午睡の睡眠効率の減少や中途覚醒時間の増加といった指標と有意な関連を認め、感覚特性に応じた生活環境の調整が睡眠などメンタルヘルスに影響する可能性が示唆された。

音環境調整法の確立に向け、廊下側に壁のないオープンプラン教室を採用している小学校や僻地の小学校および児童精神科入院病棟などの視察を行い、教職員のヒアリングなど行った後、建築音響工学に関する知見を応用し、吸音材やパーティションなどを用いて音環境保全対策を行った。また、学校や水族館、映画館などの施設において音環境保全対策の普及に向けた取り組みを行った。

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⁾、安静開眼時脳波の活動源や connectivity、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 や併存精神障害と関連する生物学的マーカーになる可能性が考えられた。特に安静開眼時脳波の活動源や connectivity が、ASD 児において非定型的な発達過程をたどる可能性が考えられ、感覚情報処理特性の発達状況に関連して簡便に測定できる指標の候補と考えられた。さらに、聴覚過敏のある子どもには、生活環境の中の音環境保全が簡便に実施でき有用である可能性が考えられた。

今後、これらの神経生理学的指標の発達の変化を多次元的・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、非定型的な ASD の臨床特性の発達に影響する脳内神経ネットワークを解明し、生活環境調整など、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

らえる。さらに、聴覚過敏などに配慮した生活環境調整に向けて、音環境保全対策などの普及も行う必要があると考えられる。

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-Reactivity and Negatively Skewed Locomotor Activity in Children With Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Study. *Front Psychiatry.* 9, 355, 2018.

Translational Research for developing of therapy of developmental disorder

Noritaka Ichinohe

National Institute of Neurological and Psychiatry

We have developed the world's first model marmoset of autism spectrum disorder (ASD) exposed to valproic acid *in utero* (VPA marmosets). Its gene expression and autism symptoms are highly correlated with human ASD, providing a more accurate model than rodents. The growth trajectories of gene expression in this marmoset and human ASD cases are very similar, indicating a developmental stagnation of molecular activity in the brain. This stagnation is also associated with abnormal histone acetylation and is considered an important biological feature of ASD. ASD is highly heterogeneous, making it difficult to develop treatments. Cluster analysis of big data of ASD transcriptome identified three ASD subgroups (G1, G2 and G3) based on gene expression patterns. Notably, all of the ASD individuals in G2 examined had epilepsy. VPA marmosets were similar to G1, accounting for about 1/3 of all autistics. To distinguish between these ASD subtypes, potential biomarkers were explored. G1 was characterized by up-regulation of inflammation-related genes, G2 by changes in neural and myelin-related genes, and Group 3 by being less well defined; MRI, PET, and EEG/MEG studies suggested several potential biomarkers in each group. We have developed ASD drug screening methods using VPA marmosets, possible behavioral phenotypes by monitoring head direction using AI. We have confirmed certain effects of small amounts of VPA, which is HDAC inhibitor, on sleep disturbances and behavioral problems of ASD. In summary, the VPA marmoset has a pathology similar to that of human ASD and is a powerful tool for biomarker exploration, pathophysiological elucidation, and therapeutic development.