

中間表現型に neuroimaging を用いた自閉症スペクトラムの分子遺伝研究

遠藤太郎 (新潟大学大学院医歯学総合研究科精神医学分野)

田村 立 (新潟大学大学院医歯学総合研究科精神医学分野)

江川 純 (新潟大学大学院医歯学総合研究科精神医学分野)

染矢俊幸 (新潟大学大学院医歯学総合研究科精神医学分野)

<要 旨>

自閉症スペクトラム (ASD) は、対人的相互性やコミュニケーションの質的障害および常同・反復的な興味・行動で特徴付けられる生来の発達障害である。近年、ASD の neuroimaging 研究は飛躍的な進歩を遂げ、様々な病態仮説が提唱されているが、その真の病態はいまだ解明されていない。ASD の病態解明と有効な個別化された治療法の開発のためには、脳内の神経発達異常のような疾患に特異的な中間表現型を同定すると共に、異質性に関与する分子遺伝学的マーカーを特定することが強く望まれている。我々は、幅広い年齢層の ASD と定型発達者を対象として、最新の neuroimaging 技法を用いて、ASD の脳形態、脳内生化学代謝、および臨床症状などの中間表現型と疾患感受性遺伝子の遺伝子多型との関係を同定し、ASD の発症やその異質性に影響を与える因子を見出すことを目的に本研究を行った。その結果、ASD 者では①両側の視床体積が減少していること、②セロトニン 1A 受容体遺伝子の Gly272Asp 多型が視床の体積減少に関連していること、③右内側側頭葉 (海馬-扁桃体領域) の NAA/Cr が低下していること、④セロトニン・トランスポーター遺伝子のプロモーター領域における遺伝子多型がこの NAA/Cr 低下に関連していること、が明らかとなった。NAA は成熟神経細胞のマーカーであることから、NAA の相対的低下は海馬-扁桃体領域における神経発達障害を示唆しており、つまり、ASD 者では、視床の形態異常、内側側頭葉の神経発達障害を認め、これらの異常にセロトニン受容体およびセロトニン・トランスポーター遺伝子の多型が関与しているものと考えられた。

<キーワード>

自閉症スペクトラム、視床、内側側頭葉、MRI、MRS

【はじめに】

自閉症スペクトラム (ASD) は、対人的相互性やコミュニケーションの質的障害および常同・反復的な興味・行動で特徴付けられる生来の発達障害である。また、ASD は一卵性双生児の一致率が 60-90% と遺伝的な関与が強い疾患である

(Muhle et al. 2004) が、その反面、典型例の自閉症から定型発達と鑑別が困難な特定不能の広汎性発達障害まで連続性を持った幅広い疾患概念であり、非常に異質性の高い症候群である。

近年、ASD の neuroimaging 研究は飛躍的な進

歩を遂げ、扁桃体を中心とした神経系の神経発達障害説 (Endo et al. 2007) やミラーニューロン障害仮説 (Dapretto et al. 2006) などの様々な仮説が提唱されているが、その真の病態はいまだ解明されていない。ASD の病態解明と有効な個別化された治療法の開発のためには、脳内の神経発達異常のような疾患に特異的な中間表現型を同定すると共に、異質性に関与する分子遺伝学的マーカーを特定することが強く望まれている。

そこで我々は、幅広い年齢層の ASD と定型発達者を対象として、最新の neuroimaging 技法を用いて、幼児から成人までの脳形態、脳内生化学代謝を測定することで ASD と定型発達者との脳の発達の差異を明らかにし、同時に、対象者より DNA サンプルを収集し脳の発達に関与する遺伝子や先行研究で指摘されている ASD の疾患感受性遺伝子の多型解析を行い、さらに脳形態、脳内生化学代謝、および臨床症状などの中間表現型と関連遺伝子の多型との関係を同定し、ASD の発症やその異質性に影響を与える因子を見出すことを目的に本研究を行った。

【対象と方法】

1. 対象

新潟大学医歯学総合病院およびその関連病院の外来患者で、DSM-IV-TR にて自閉性障害、アスペルガー障害、特定不能の広汎性発達障害と診断されたもの、および公募によって集まったボランティアの定型発達者のうち、口頭および文章による十分な説明を行った後に保護者ならびに本人の書面による同意 (インフォームド・コンセント及びインフォームド・アセント) の得られた ASD 者 38 名 (自閉性障害 12 名、アスペル

ガー障害 15 名、特定不能の広汎性発達障害 11 名)、定型発達者 16 名を対象とした。ASD 群は平均 10.9 ± 4.3 (6-20) 歳 (男 : 女 = 32 : 6) で、定型発達群は平均 12.4 ± 3.8 (6-19) 歳 (男 : 女 = 10 : 6) であった。

2. 脳画像

新潟脳外科病院に設置されている 1.5 テスラ magnetic resonance imaging (MRI) 装置 (General Electric 社製) を用いて、対象者の脳体積・脳内生化学代謝の測定を行った。

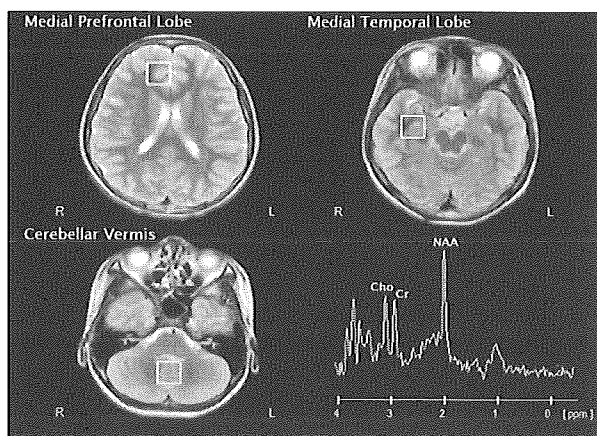
MRI では、脳全体にわたる高解像度三次元 T1 強調画像を高速撮影法の 3D-SPGR (spoiled gradient echo) で撮影した (撮影条件 : matrix size = 256×256 , pixel size = 0.937×0.937 mm, slice thickness = 1.0mm)。得られたデータをもとに、画像解析ソフト Dr. View を用いて用手的に両側の視床体積および頭蓋容積を測定した。

脳内生化学代謝は同じ MRI 装置を用いて proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) 法により測定した。ASD 者を対象とした先行研究で異常が指摘されている右内側前頭前野、右内側側頭葉、小脳虫部に各々 8ml ($2 \times 2 \times 2\text{cm}^3$) のボクセルを設定し、ボクセル内部の N-アセチルアスパラギン酸 (NAA)、コリン含有物 (Cho)、およびクレアチニン (Cr) を測定 (図 1、撮影条件 : TR = 35msec, TE = 2000msec) し、生体内の基準物質である Cr に対する NAA と Cho の比 (それぞれ NAA/Cr, Cho/Cr) を求めた。

3. 分子遺伝

唾液 DNA 抽出キット Oragene を用いて、2ml の唾液試料より対象者の DNA を採取した。先行

図1. ¹H-MRS の関心領域と MR スペクトラム



研究 (Brune et al. 2006) にて ASD の臨床症状との関与が報告されているセロトニン・トランスポーター遺伝子のプロモーター領域

(5-HTTLPR) の S/L 多型、およびセロトニン神経系の受容体であるセロトニン 1A 受容体

(5-HTR1A) 遺伝子の C1019G 多型、Gly272Asp 多型、セロトニン 2A 受容体 (5-HTR2A) 遺伝子の A1438G 多型、T102C 多型を解析し、脳形態、脳内生化学代謝との関連を検討した。多型解析には、PCR、TaqMan 法を用いた。

4. 臨床症状

ASD の臨床症状は、小児自閉症評価尺度-東京版 (CARS-TV ; Kurita et al. 1989) を用いて評価し、知能指数 (IQ) の評価には WISC-III および

WAIS-R を用いた。

5. 統計解析

統計処理には Dr. SPSS を用いた。対象のプロフィール比較には、ANOVA および Fisher の直接確立法を用い、MRI・MRS の解析には、t 検定もしくは年齢・IQ・頭蓋内容積を共変量とした ANCOVA を用い、多重比較には Scheffe の多重比較法を用いた。臨床症状と各種データとの関連は、Pearson の相関係数および重回帰分析を用いて解析した。

尚、本研究は、新潟大学医学部遺伝子倫理委員会より承認を受けている。

【結果】

1. 対象の背景

対象者の背景を表 1 に示した。ASD 各群と定型発達の 4 群比較で、年齢、性別、利き手、IQ では有意な群間差を認めなかったが、ASD 群間の比較で CARS-TV 総得点に有意な群間差を認めた ($P < 0.001$)。

2. MRI 解析 (視床体積)

ASD 各群および定型発達群の両側視床の体積を測定し、年齢、IQ、頭蓋内容積を共変量とし

表 1. 対象の背景

	自閉性障害 (n = 12)	アスペルガー 障害 (n = 15)	特定不能の広汎性 発達障害 (n = 11)	定型発達 (n = 16)	P
年齢 (歳)	13.1 ± 4.3	13.3 ± 2.8	12.0 ± 4.5	11.5 ± 4.2	0.55
性別 (男/女)	10/2	12/3	10/1	10/6	0.39
利き手 (右/左)	10/2	14/1	10/1	15/1	0.85
IQ	83.9 ± 17.1	97.3 ± 15.4	86.4 ± 15.9	95.1 ± 9.4	0.06
CARS-TV 得点	35.2 ± 3.6	29.3 ± 3.0	29.3 ± 3.1	-	< 0.001

表 2. ASD 各群と定型発達群の視床体積 (cm³)

	自閉性障害 (n = 12)	アスペルガー 障害 (n = 15)	特定不能の広汎性 発達障害 (n = 11)	定型発達 (n = 16)	P
右視床	3.10 ± 0.59	3.22 ± 0.68	2.97 ± 0.84	4.26 ± 0.83	< 0.001
左視床	3.13 ± 0.53	3.30 ± 0.63	3.10 ± 0.76	4.22 ± 0.83	< 0.001
両側視床	6.24 ± 1.10	6.52 ± 1.28	6.07 ± 1.59	8.49 ± 1.63	< 0.001
頭蓋内容積	1376	1477	1478	1496	0.27

て各群間の比較を行った。その結果、左右各視床体積および両側視床の合計体積のいずれも有意な群間差を認め (表 2、全て P < 0.001)、多重比較にて ASD 各群は定型発達群に比し左右および両側の視床体積が有意に小さいことが示された (全て P < 0.05)。

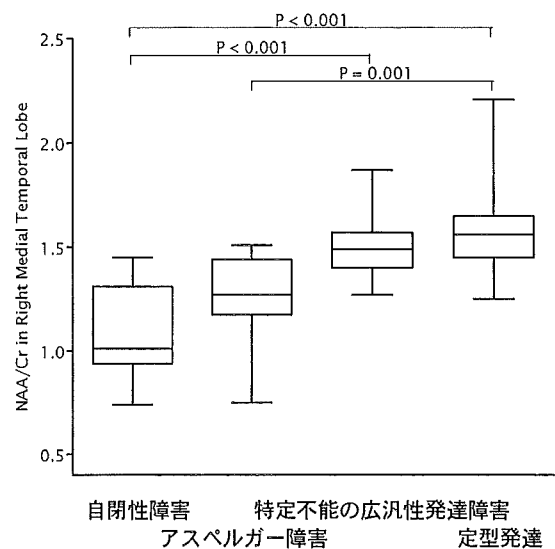
3. ¹H-MRS 解析 (内側前頭前野、内側側頭葉、小脳虫部の生化学代謝)

扁桃体と海馬の一部を含む右内側側頭葉のボクセルにおいて、ASD 群の NAA/Cr は定型発達群に比して有意に低下していた (P < 0.001)。さらに同領域の NAA/Cr は、自閉性障害、アスペルガー障害、特定不能の広汎性発達障害、定型発達の 4 群比較でも有意な群間差が示され (図 2、P < 0.001)、多重比較で、右内側側頭葉における自閉性障害群の NAA/Cr は、特定不能の広汎性発達障害、定型発達群に比し有意に低く (いずれも P < 0.001)、アスペルガー障害群は定型発達群に比し有意に低かった (P = 0.001)。

臨床症状との関係では、ASD 群の右内側側頭葉の NAA/Cr 比は、CARS-TV 総得点との間に負の相関を認め (r = -0.44、P = 0.01)、自閉症症状が重篤であるほど、右内側側頭葉の NAA/Cr 比が低いことが示された。さらに、重回帰分析を用いた解析では、CARS-TV の下位項目のうち、情緒反

応と聴覚反応が右内側側頭葉の NAA/Cr と有意な関連を持つ因子として検出された (R² = 0.46、それぞれ β = -0.42、P < 0.01、β = 0.56、P < 0.001)。また、内側前頭前野、小脳虫部におけるその他の代謝産物においては、各群間で有意な差を認めなかった。

図 2. 右内側側頭葉における ASD 各群と定型発達群の NAA/Cr



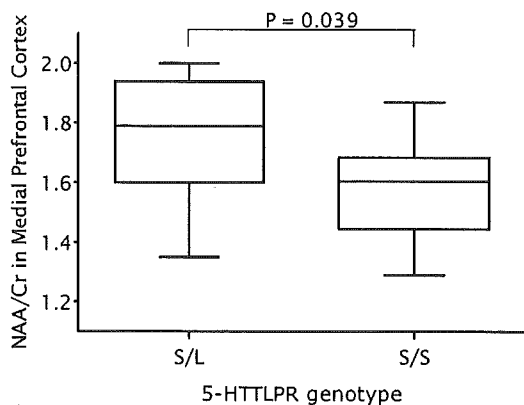
4. 分子遺伝学的検討

a. 5-HTTLPR 遺伝子

研究対象者のうち、26 名の ASD 者より DNA が採取され、うち 10 名が S アレルを 1 つ持つ S/L 型、16 名が S アレルをホモで持つ S/S 型であっ

た。S/L、S/S 群の比較では、S/S 群は S/L 群に比し右内側側頭前野の NAA/Cr が有意に低下していた (図 3、 $P = 0.039$)。その他の代謝産物や左右視床の体積については有意な差を認めなかった。

図 3. ASD 群の右内側側頭葉における NAA/Cr と 5-HTTLPR 遺伝子の S・L 多型の関係



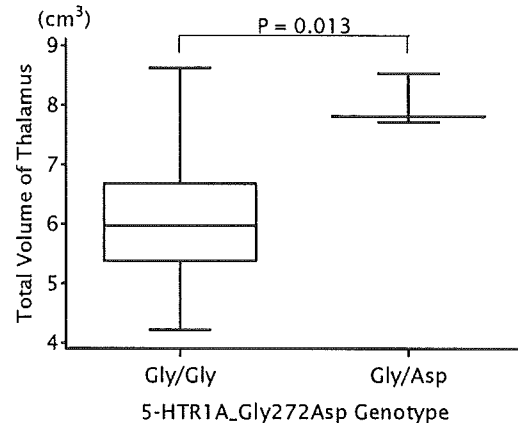
b. 5-HTR1A 遺伝子

DNA が採取された 26 名の ASD 者のうち、5-HTR1A 遺伝子の C1019G 多型に関しては、C/C 群は 1 名、C/G 群が 10 名、G/G 群が 13 名 (2 名は解析不能) であり、Gly272Asp 多型に関しては、Gly/Gly 群が 23 名、Gly/Asp 群が 3 名であった。MRI・MRS データとの関連を調査した結果、5-HTR1A 遺伝子の C1019G 多型については有意な関連を認めなかったが、Gly272Asp 多型については、Gly/Gly 群で Gly/Asp 群に比して有意に視床の体積が低下していることが示された (図 4、 $P = 0.013$)。

c. 5-HTR2A 遺伝子

DNA が採取された 26 名の ASD 者のうち、5-HTR2A 遺伝子の A1438G 多型に関しては、A/A 群は 7 名、A/G 群が 13 名、G/G 群が 5 名 (1 名は

図 4. ASD 群の両側視床体積と 5-HTR1A 遺伝子 Gly272Asp 多型の関係



解析不能) であり、T102C 多型に関しては、T/T 群が 5 名、T/C 群が 12 名、C/C 群が 7 名 (2 名解析不能) であった。MRI・MRS データとの関連を調査した結果、いずれの遺伝子多型も有意な関連を認めなかった。

【考察】

本研究にて、ASD 者では①両側の視床体積が減少していること、②5-HTR1A 遺伝子の Gly272Asp 多型が視床の体積減少に関連していること、③右内側側頭葉 (海馬-扁桃体領域) の NAA/Cr が低下していること、④5-HTTLPR 遺伝子多型がこの NAA/Cr 低下に関連していることが明らかとなった。NAA は成熟神経細胞のマーカーであることから、NAA の相対的低下は海馬-扁桃体領域における神経発達障害を示唆しており、つまり、ASD 者では、視床の形態異常、内側側頭葉の神経発達障害を認め、これらの異常にセロトニン受容体およびセロトニン・トランスポーター遺伝子の多型が関与しているものと考えられた。

本研究で異常が指摘された視床と内側側頭葉は、それぞれ感覚の統合中枢および社会性を司

る脳領域であり、先行研究(Hardan et al. 2006、Spencer et al. 2006、Kleinmans et al. 2009、Amaral et al. 2008) で繰り返し ASD との関連が指摘されている部位である。我々の研究結果は、先行研究の所見を裏付けると共に、新たに右内側側頭葉の神経発達が自閉性障害から定型発達までのスペクトラム性に関与し、この領域の神経発達障害の程度により ASD のサブタイプを分類しうる可能性を示唆している。また視床の体積減少に関しては、ASD サブタイプ間で差異はなく、ASD と定型発達を区別しうる疾患マーカーになり可能性がある。

また以前より ASD 者では、血小板中のセロトニン濃度が上昇していること(Cook et al. 1996) やセロトニン合成能の発達が定型発達者と異なること (Chugani et al. 1999) が報告されており、最近では、5-HTTLPR 遺伝子の S アレルが自閉症者の前頭葉皮質の過形成に関連することが報告されている (Wassink et al. 2007)。さらには、セロトニンは 5-HTR1A および 5-HTR2A を介して、神経細胞の樹状突起の発達を調整することが動物実験にて確認されている (Kondoh et al. 2004)。本研究の結果と以上の知見を併せて考慮すると、セロトニンの受容体やトランスポーターの遺伝子における多型が、ASD の中のある一群に関しては、発症を規定するような脳内の神経発達障害を来しうる可能性が示唆された。

しかしながら、図 2 の結果からも明らかのように、ASD は疾患内の異質性が非常に高い疾患である。本研究で明らかにされた 5-HTTLPR 遺伝子多型や 5-HTR1A 遺伝子多型のような、ASD の中間表現型に関与する分子遺伝学的マーカーを探索し、臨床的のみならず生物学的にも ASD のサブタイプを細分化し、ASD の病態解明、ならびによ

り個別化された治療アプローチの解明を目指すことが今後の課題であると考えられる。

【参考文献】

- Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. (2008): Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci* 31(3):137-45.
- Brune CW, Kim SJ, Salt J, Leventhal BL, et al. (2006): 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. *Am J Psychiatry* 163(12):2148-56.
- Chugani DC, Muzik O, Behen M, et al. (1999): Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol* 45(3):287-95.
- Cook EH, Leventhal BL. (1996): The serotonin system in autism. *Curr Opin Pediatr* 8(4):348-54.
- Dapretto M, Davies MS, Pfeifer JH, et al. (2006): Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Nat Neurosci* 9(1):28-30.
- Endo T, Shioiri T, Kimura T, et al. (2007): Altered chemical metabolites in the amygdala-hippocampus region contribute to autistic symptoms of autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry* 62(9):1030-7.
- Hardan AY, Girgis RR, Adams J, et al. (2006): Abnormal brain size effect on the thalamus in autism. *Psychiatry Res* 147(2-3):145-51.
- Kleinmans NM, Johnson LC, Richards T, et al. (2009): Reduced neural habituation in the

- amygdala and social impairments in autism spectrum disorders. *Am J Psychiatry* 166(4):467-75.
- Kondoh M, Shiga T, Okado N. (2004): Regulation of dendrite formation of Purkinje cells by serotonin through serotonin1A and serotonin2A receptors in culture. *Neurosci Res* 48(1):101-9.
- Kurita H, Miyake Y, Katsuno K. (1989): Reliability and validity of the Childhood Autism Rating Scale-Tokyo version (CARS-TV). *J Autism Dev Disord* 19(3):389-96.
- Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I (2004) The genetics of autism. *Pediatrics* 113(5):e472-86.
- Spencer MD, Moorhead TW, Lymer GK, et al. (2006): Structural correlates of intellectual impairment and autistic features in adolescents. *Neuroimage* 33(4):1136-44.
- Wassink TH, Hazlett HC, Epping EA, et al. (2007): Cerebral cortical gray matter overgrowth and functional variation of the serotonin transporter gene in autism. *Arch Gen Psychiatry* 64(6):709-17.