

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開用】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		脳科学研究戦略推進プログラム
研究開発課題名		神経内分泌仮説に基づく知能障害を有する自閉症スペクトラム障害の診断と治療の展開研究
機関名		国立大学法人金沢大学
研究開発 担当者	所属 役職	国立大学法人金沢大学子どものこころの発達研究センター 特任教授
	氏名	東田 陽博

2. 研究開発成果の内容

①オキシトシン神経形成遺伝子の研究

脳オキシトシン産生神経細胞の発生やオキシトシン分泌等、オキシトシンに関連する分子メカニズム研究に焦点を合わせ研究してきた。平成 27 年度は、CD38 ノックアウトマウス、TRPM2 ノックアウトマウス及びウイルスベクターに組み込んだ CD38 と TRPM2 RNAi を処理したマウスから取り出した視床下部組織片からのオキシトシン遊離を観察した結果を論文としてまとめ、投稿した。また、社会的地位（弱者と強者）や open field によるストレスによる順化過程で脳内オキシトシン分泌への側坐核や扁桃体の関与を既に研究したので、その組織のオキシトシン濃度の変化のみ平成 27 年度に測定し研究した。

また、自閉症症状を示すノックアウトマウスの作製及びモデルマウス発見の研究として、CD38 のファミリーである CD157 を欠損する CD157 ノックアウトマウスを研究し、不安症状に加えて、社会性忌避などの特徴から自閉スペクトラム症のモデルになることを見出した。そこで、このノックアウトマウスの発達期に注目して研究すると、新生児期には 2 種類の音声でのみ発話すること、そしてそれが 14 週令以降は多種類の音声になることを見出した。これは、コミュニケーションの発達の遅れであり、ASD の主症状であるコミュニケーション障害の広いモデルと考えられた。さらに、それがオキシトシン投与によって発達が促進することも観察した。

一方、シナプトタグミン 4 ノックアウトマウスで報告されているような症状は確認できたが、新しい発見がないことから、オキシトシンの効果とコミュニケーション障害の有無を調査した。特徴ある行動障害は見出されず、9 個あるサブタイプの 1 種類をノックアウトしただけでは自閉スペクトラム症的行動変化が現れないと結論付けた。

オキシトシンの臨床試験に関連する基礎的実験としてオキシトシンが経鼻的投与により、どのような経路で、どのような分子機構で脳内に移行するか、今まで直接的な証拠が世界的に見ても全く無いので、2 年前からスタートしている脳血管内皮細胞に発現している糖化パターン認識分子受容体がオキシトシン脳内移行に関与するデータをまとめ、現在投稿中である。平成 27 年度はその分子のノックアウトマウスを使い、母親マウスの養育行動に関してのみ実験を行い、それに対するオキシトシンの効果を調査し、ノックアウトマウスへの皮下注入では行動異常が改善されないことから脳移行に関与していること

を証明した。加えて、国立大学法人東北大学の西森教授の脳内作用の基礎研究として、オキシトシン受容体蛍光発色マウスを用いて、脳血管内皮細胞にはオキシトシン受容体が発現していないことを見出した。

オキシトシン治療に関して、脂質添加型オキシトシン誘導体物質を新たに合成し、脂質膜親和性により脳内移行する効果が持続するオキシトシン作用を持つことを見出した。

5年間の成果をオキシトシンに関する国際学会（ニュージーランド）に出席し、発表する予定であったが、オキシトシン脳移行の論文を出版出来なかったことから発表を取りやめにした。エジンバラ大学生理学教授のルードウツヒ教授と、オキシトシンの信号伝達経路及び脱分極を必要としないオキシトシン分泌機構及びオキシトシン脳内移行を質量分析計により計測する方法について、学校法人金沢医科大学の出口教授と共同研究が可能になり、2年来の研究に対し、末梢投与のオキシトシンが中枢へ移行した証拠を得た。そのためエジンバラ大学を一度訪問する予定であったが、必要がなくなった。

① -1) オキシトシンの脳内移行の分子生物学的研究

世界中で行われているオキシトシンの臨床試験で一つ解決されていない疑問があった。それは、鼻腔（末梢）投与のオキシトシンが脳内へ移行し、その結果、効果を持つのか否かであった。オキシトシンは小さいとは言え、分子量は1,000もあり、血液中で電荷を持つことから血液脳関門を通過しないと考えられているからである。そこで我々はこの疑問にオキシトシンの脳内への移行分子を見出せば解決すると思い、研究を続けていた。そして糖化パターン認識分子受容体がそれを担うことを示すデータを得た。この答えは、オキシトシン臨床試験を行うときの「根本的な危惧」に対する答えを用意できたという点で大変大きな発見と言える。

① -2) オキシトシン作働性ペプチド化合物の合成研究

オキシトシンは体内にて10分程度で分解されることから、その薬効を高める工夫の必要性が考えられていた。プレドラッグを投与し、体内で代謝され、効果物質となり、有効性を示すような化合物が薬としては優れている。我々は、パルミチン酸を付加したオキシトシン（LOT-1）を合成し、それが長時、血中オキシトシン濃度を上昇させることや自閉症モデルマウスの社会性障害を改善することを見出した。この独自の研究により日本でオキシトシンの新しい治療薬を開発できることから、経済産業省の起業家支援事業（NEDO）の支援を受け、開発を行う企業“株式会社スカイシーファーマ”を札幌市で設立し、今後この企業を通してオキシトシン新薬の開発を持続していけることとなった。

② 自閉症 DNA サンプル集積と CD38SNP 解析開発

平成27年度は、国立大学法人金沢大学におけるオキシトシン臨床試験の被験者30名、脳磁計(MEG)による脳機能計測の被験者約70名(ASD児40名、定型発達児30名)、およびその家族の染色体DNAサンプルを集積し、一塩基多型(SNP)を解析したが、R140W型のSNPは検出できなかった。結局、人口流動が比較的少ない石川県周辺の患者群は、CD38の2か所のSNPに相関を示した。一方、比較的人口が新しく構成され、流動性が高い点で金沢地区と異なるため、札幌地区の自閉症者の遺伝子多型の発生頻度を把握し、金沢地区でのそれと比較する目的で公立大学法人札幌医科大学に出張し、21症例の血液検体を得て、SNP解析研究を行っている。これまでに、てんかんを併発する症例のSNP解析を行いイオンチャンネルの特定部位にSNPが存在することを見出した。

CD38のファミリー遺伝子であるCD157遺伝子については、ASD社会性障害やコミュニケーション障害の良いモデルと考えられたので、SNP解析を行い、ASDとの相関を見出し、既に論文化した。オ

キシトシン受容体遺伝子については、SNP によって生じるアミノ酸多型 R376G (rs35062132, c.1126C>G)が ASD と関連し、細胞内カルシウム濃度とイノシトール三リン酸産生を抑制することを見出している。加えて、オキシトシン受容体のアミノ酸多型をマウスで再現し、社会性行動に与える影響を調べる目的で、CRISPR/Cas システムを用いて正常なマウスの遺伝子改変を行う予定であったが、ヒト型変異オキシトシン受容体ノックイン操作に技術的問題を見出し共同研究に至らなかった。

コピー数変異 (CNV) 解析とリンパ芽球様細胞株樹立の研究では、国立大学法人名古屋大学と協議し、前年度分の解析に集中することとし、検体の新たな追加はしなかった。

③ 環境因子エピゲノム研究

自閉症発症機序におけるエピゲノムの役割を明らかにするため、平成 27 年度は OXTR 遺伝子のメチル化状態と自閉症の症状との相関関係を明らかにした。

具体的には、OXTR 遺伝子の-934 サイトの CpG メチル化が OXTR の遺伝子発現にどのように影響を与えるかについて、神経芽細胞腫株 A172 細胞および乳がん細胞株 MCF7 を DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2-deoxycytidine や RNA ポリメラーゼ II 阻害剤である α -amanitin で処理し、OXTR 遺伝子の遺伝子発現とメチル化状態の相関を解析したが、論文化作業までには至らなかった。

臨床試験を実施した知的障害を有する ASD 者 30 名において、オキシトシン投与の 8 週間の OXTR 遺伝子の CpG メチル化変動を解析した。これまでの予備的解析において、オキシトシン投与で症状の改善が認められた患者群では、臨床試験期間中、OXTR 遺伝子の CpG メチル化変動が認められなかったのに対し、オキシトシン投与の効果が小さかった患者群では OXTR 遺伝子の-934 サイトの CpG メチル化の低下が認められた。これらの解析結果について統計学的解析から有意な変化であることを見出し、論文作成業務に入った。

また、協同研究者のカリフォルニア大学デービス校 (カリフォルニア州) の Dr. Janine LaSalle は、自閉症の原因遺伝子の一つである *Mecp2* 欠損モデルマウス (*Mecp2_308/y*) を用いて自閉症発症機序を実験的に証明してきた。そこで、国立大学法人金沢大学では飼育していない、カリフォルニア大学デービス校で作られた自閉症モデルマウス (*Mecp2_308/y*) を用いた実験系で、別予算で現地を訪問し、OXTR と CD38 遺伝子の解析を行い、エピゲノム変化を見出した。

④ オキシトシン学内臨床試験に向けた研究

国立大学法人金沢大学、国立大学法人福井大学、国立大学法人東京大学の 3 つの大学にて ASD 患者に対し、オキシトシン点鼻の臨床試験が行われた。我々の大学で行われた ASD 30 名に対するオキシトシン臨床試験について平成 27 年度は、論文化に取り組み、臨床試験計画に書かれた内容に沿って、カルテに書かれた家庭内での対人交流頻度を、試験に参加しなかった当センターの 2 名の職員による抽出作業をした。オキシトシンおよび偽薬投与期における対人交流頻度を計算し、オキシトシン投与中に増加することを見出した。しかしそのほかの標準的自閉症指標ではオキシトシン投与による有意な変化を見出せなかった。これらの内容を論文化し *Frontiers in Psychiatry* に発表した。平成 26 年の 6 月から、参加大学である国立大学法人福井大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人名古屋大学、および我々の大学の 4 大学により、OXT の有用性を確認するための多施設臨床試験の具体的な準備が始められた。同年 10 月 30 日、対象者募集のためのプレスリリースが行われ、12 月下旬から対象候補者が受診を始めた。平成 28 年 1 月末にて患者募集を終了し、平成 28 年 6 月末までに投薬等の試験を終え、7 月

中に血中オキシトシン濃度測定を終了する予定である。

⑤ MEG 画像による診断法確立

早期介入により ASD の予後が改善する事から、早期診断のための医学的要請が年々高くなってきている。そのために、幼児において脳機能評価を行うことが必要である。近年は脳磁計 (MEG) や簡易型のも含め近赤外線スペクトロスコピー (NIRS) で、幼児にストレスがほとんどかからない状態で、簡単に脳機能評価を行えるようになってきた。加えて、国立大学法人金沢大学には日本の技術が完成させた幼児用 MEG 測定装置を用いて、幼児の脳機能のデータベース化を進めてきた。今までは、頭部の形状を推定した幼児脳構造を活用し、画一的な皮質レベルの電流源推定の解析を進めていた。これは、正確な信号源を知る上では大変大きな問題で、個々人の小児の頭の形態情報に基づいて行う必要性に気付いた。平成 27 年度は、MEG 計測をした 6 歳以上の小児は 60 秒、6 歳未満は 5 秒間の粗い MRI 画像から、頭部形状情報を得る研究に絞り、その結果 MEG 情報とのすり合わせが上手くいった。そして、5 年間の MEG 計測研究を完成させ、診断に使える見通しをもった。

⑥ MEG-NIRS 統合機による早期診断および社会関係性ストレスへのオキシトシン治療モニター研究

オキシトシン治療の客観的モニターシステムとしての検討を平成 26 年末において、被験者エントリ一数が 10 名に達し、7 名は既に完了した。平成 27 年度には、残り 3 人の計測を終えた。特に、オキシトシン Responder の性格や自閉症傾向に合わせ、その解析を行い、論文化した。一方、ASD 者の高次機能を対象として研究を進めていくに従って、MEG-NIRS のセンサー部が前頭葉部を構造上カバーしていないことと、NIRS 信号に対する理論の欠如から解析を進めることが出来なかった。その代償として、1 チャンネルの NIRS を前頭部に置いて測定し、そのデータを使った解析をスタートさせた。

⑦ プロジェクトの総合的推進

本プロジェクトは、国立大学法人金沢大学チームと国立大学法人浜松医科大学チームの合同研究チームであり、東田が 2 つのチームのリーダーとされ、参加 6 大学 (国立大学法人金沢大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人東北大学、国立大学法人浜松医科大学、国立大学法人大阪大学、国立大学法人福井大学) 間の調節を行った。平成 27 年度においては、4 大学 (国立大学法人金沢大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人東北大学、国立大学法人名古屋大学) 合同のオキシトシン臨床試験においても環境を整え、研究推進を促してきた。臨床試験がスタートした後は研究参加当事者間で連絡を取り合った。また、ASD の診断法の確立のための研究として、MEG、NIRS、PET、fMRI、Gaze Finder を用いた研究は、それぞれ、国立大学法人金沢大学、国立大学法人浜松医科大学、国立大学法人福井大学、国立大学法人大阪大学で行われると共に、4 大学の合同臨床試験でも使用される Gaze Finder を利用した文献の公表に助力した結果、それに関して初めての論文が出版されるに至った。オキシトシンの有効性の脳内生理学的機序や関連分子の分子神経科学的解明は、国立大学法人大阪大学や国立大学法人東北大学を含む全ての大学で行われるため、知識の共有化など行われるようテレビ会議等を活用した。遺伝子研究においては、各大学間のサンプルなどの提供に便宜が図られるようにした。また、国立大学法人名古屋大学の遺伝子 (CNV) 研究に全面的に協力するよう努めた。P S、P O との連絡を密にし、助言を仰いだ。