

第 111 回日本精神神経学会学術総会

教 育 講 演

精神科医のための分子生物学 ——自閉スペクトラム症の病態説明を中心に——

牧之段 学 (奈良県立医科大学医学部精神医学講座)

臨床に携わる精神科医にとり、分子生物学という学問はあまりなじみがないかもしれないが、近年一部の精神疾患の機序は分子生物学的解析により解明されつつある。精神疾患のうち、アルツハイマー型認知症や統合失調症の治療法開発には、これまで多くの精神科医、神経内科医、神経科学者らが注力してきたが、自閉スペクトラム症に対しては、その障害が“untreatable”であるという認識から、その治療法開発にそれほど高い関心が払われてこなかった。ところが、多面的な分子生物学的アプローチにより、自閉スペクトラム症の病態は徐々に明らかになりつつあり、またその薬物療法の可能性まで示唆されるほどである。本稿では、分子生物学がどのようにして自閉スペクトラム症の病態を解明してきたのか、またその知見に基づいて得られた薬物療法の可能性とはどのようなものなのかを解説する。

<索引用語：分子生物学，臨床精神医学，自閉スペクトラム症，精神疾患>

はじめに

分子生物学という言葉は、臨床精神科医にとりあまりなじみがないかもしれない。医学は自然科学だが、その中で精神医学は少々独特であり、その病態説明へのアプローチに人文学的な要素が少なからず含まれている。しかしながら、最近では生物学的な観点、とりわけ分子生物学的観点から精神疾患の病態を解明しようとする傾向が強くなっている。筆者は2015年6月に開催された第111回日本精神神経学会において、精神科における分子生物学につき教育講演を行ったが、本稿ではその内容の要点をご紹介させていただく。

I. 自閉スペクトラム症

(Autism Spectrum Disorder : ASD)

かつて自閉症やアスペルガー障害といわれた、こだわりが強かったり、対人的相互関係や言語的コミュニケーションの障害をもった方々の診断名は、2013年に刊行された診断基準(The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed : DSM-5)¹⁾では autism spectrum disorder (ASD) と呼ばれるようになった。スペクトラムという言葉からも、この診断名がつく患者は多様な症状を呈し、また様々な原因によることが前提となっている。

自閉症の発症率は、1975年には5,000人に1人

であったが、2009年には、なんと110人に1人となっている³³⁾。このように発症率が劇的に増加している原因は様々に検討されているが、診断率の向上や医療関係者の意識向上などの医療サイドの要因のみならず、何らかの病因・病態の変化が想定されている³³⁾。自閉症の原因として、遺伝要因と環境要因が考えられるが、1977年の報告では自閉症患者の一卵性双生児発症一致率は90%であり⁸⁾、その発症要因の大半が遺伝性であると認識されてきたが、2011年と2014年には、ASD患者の発症要因の50%以上が環境要因であると報告された^{12,28)}。これらの結果から、依然としてASD発症に遺伝要因が関与していることは間違いないが、環境要因も無視できない状況となってきた。

本稿では、まずASDの病態解明に向けた分子生物学的なアプローチにつき説明し、そしてその知見に基づいたASD治療の可能性につき述べる。

II. ASDのgenetics

遺伝子解析手法として、①染色体分析、②copy number variation (CNV) 解析、③連鎖解析、④genome wide association study (GWAS) 解析などがある。①にはFISH法やG-band法があり、ASD発症にかかわる染色体の欠損や重複についての多数の報告がある。15q11-13の重複がよく知られており、Nakataniらはマウスの同部位を重複させたマウスを作製し、自閉症様の症状を呈すことを報告している²⁴⁾。②は、塩基配列1kB以上の欠損や重複を意味し、シナプス関連因子であるNeurexin-1, Neuroligin-3, SHANK3などの領域におけるCNVが見つかり⁹⁾、Neurexin-1ノックアウトマウスが自閉症様症状を呈すことも報告された¹¹⁾。③においては、両親と子の3人の遺伝子配列を調べる(トリオ解析)ことにより、主にメンデルの法則に従うタイプの変異を検出することが可能である。ASDは多因子遺伝であると考えられており、この手法で自閉症発症の遺伝子を見いだすことは難しいが、脆弱X症候群や結節性硬化症などの自閉症様症状を呈す単一遺伝子疾患(症候性ASD)の原因遺伝子(それぞれFMR1,

Tsc1/2)が見つかっている^{25,26)}。④は現在最も盛んに行われている手法であり、多因子遺伝であるASD研究に適しているといえる。しかし、検出された一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)のオッズ比は小さい場合が多く、その遺伝子1つではASD発症を論ずることはできず、原因遺伝子とは呼ばず、感受性遺伝子と呼ばれる。よって、これらの遺伝子をマウスなどでノックアウトしてもASD様の表現型が発現する可能性は低く、単一遺伝子欠損による動物モデル作製には至らない。最近では、薬物感受性につきGWASを用いて検討する薬理遺伝学(pharmacogenetics)が盛んに行われており、精神医学においてはカルバマゼピン誘発性薬疹やクロザピン誘発性無顆粒球症が生ずるHLAなどの遺伝子型の検討が行われている^{4,5)}。

III. ASDのepigenetics

前述のとおり、近年ASD発症に関する環境要因に注目が集まっている。つまり、遺伝プログラム以外の要因が関与しているということになる。エピジェネティクスとは、DNA配列によらない遺伝子発現を制御するシステムであり、ASD発症にこのエピジェネティクスが関与していることを示すデータが集積している。エピジェネティクスのメカニズムは概してメチル化とヒストンアセチル化に分けられる。プロモーター領域のメチル化やヒストンのアセチル化の程度が変化すると、それに対応する遺伝子発現が影響を受ける。環境ホルモンの1つとされるビスフェノールA(缶詰内側の塗料)は、ASDに関する有害作用についての決定的なデータが乏しいものの、妊娠マウスがビスフェノールAを投与されると、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)プロモーター領域のメチル化が促進されることでその発現量が低下し、行動はASD様となると報告されている^{18,34)}。また、意外と知られていないが、バルプロ酸は神経科学の分野ではヒストンのアセチル化を促進させる薬剤(ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤)であり、母体がバルプロ酸に曝露される

とその子らが ASD 症状を呈するというエビデンスがあり、また動物実験においても母体マウスにバルプロ酸を投与すると、その母マウスから生まれた仔マウスは ASD 様の行動異常を示すと報告されている²⁷⁾。

IV. ASD の proteomics

生体内で実際に機能する分子は、セントラルドグマ (DNA-mRNA-protein) の最終分子であるタンパク質であり、その機能解析が重要であることは言うまでもない。従来、pH と分子量でタンパク質を分別する二次元電気泳動と質量分析法を中心にプロテオミクスは行われてきたが、最近では高速液体クロマトグラフィと質量分析を組み合わせた手法や enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) などが主流となっている。Nakamura らは、ASD 患者脳を positron emission tomography (PET) により解析し、ASD 患者脳内では健常者に比べセロトニントランスポーターが低下していることを報告しているが²³⁾、同グループはさらに踏み込んだ研究を行い、PET の結果は遺伝子発現の相違によるのではなく、セロトニントランスポーターの膜輸送にかかわる因子である N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF) の障害による可能性を示唆する結果を得て報告している¹⁵⁾。

V. ASD の molecular neuroimaging

精神疾患は基本的に脳の疾患であるため、脳画像解析は必須である。分子生物学的なアプローチによる画像解析は、molecular neuroimaging といわれ、single photon emission computed tomography (SPECT) や前述の PET がある。SPECT や PET 解析により、ASD 患者脳における様々な機能障害が明らかにされているが、紙面の都合上その説明は割愛させていただく。注目すべきは、Suzuki らによる PET 解析の報告だが、彼らは ASD 患者脳では健常者と比べ、マイクログリアが著明に活性化していることを見いだした³²⁾。

VI. ASD の induced pluripotent stem cells (iPSCs) study

iPSCs を用いた医学研究は盛んに行われている。精神医学においてもその潮流はあり、統合失調症やアルツハイマー型認知症研究で活用されている^{3,17)}。ASD 研究に関してもいくつか報告されているが、そのほとんどは ASD 様症状を呈す単一遺伝子疾患の症候性 ASD 研究に限られ、ASD の大部分を占める非症候性 ASD に関する iPSCs 研究の報告はわずかである。代表的な症候性 ASD であるレット症候群患者の iPSCs から作製した培養ニューロンのシナプス形成の検討により、レット症候群患者由来のニューロンでは、健常者由来のそれよりもシナプス数が減少していることが明らかにされている²¹⁾。

VII. ASD の microbiome study

腸内細菌研究は iPSCs 研究と比肩する精神医学研究のトピックである。平均的な大人が腸内に保持する腸内細菌は 1.5 kg にも及ぶ。このような大量の生物が腸内に棲息しながら身体機能に影響を与えないと考えるのはそもそも無理がある。近年、腸内細菌の組成と精神機能との関連性が盛んに議論されるようになり⁷⁾、ASD 患者でもその腸内細菌叢の組成が健常者と異なることが明らかになってきた³⁰⁾。動物モデルを用いた研究により、自閉症モデルマウスの腸内細菌叢を変化させると、その ASD 様行動が変化すると報告されている¹³⁾。

VIII. ASD の novel molecular biology

臨床研究にはヒトサンプルが必要な場合が多いが、精神医学の主な研究対象である脳を生体から採取することは困難である。そこで、前述のように iPSCs から作製されたニューロンで代用したりし脳の研究を行うことになるが、最新の研究手法の 1 つとして、脳と同じ外胚葉由来である毛髪を使った研究がある。健常者や患者から毛髪を 10 本程度採取し、その毛根から RNA を抽出し解析する。Maekawa らは、ASD 患者の毛髪における遺

伝子発現を健常者のそれと比較し、興味深いことに、脳で発現しているシナプス関連遺伝子 (contactin associated protein-like 2: CNTNAP2, calcium-dependent secretion activator 2: CADPS2) が ASD 患者で低下していることを報告している¹⁹⁾。

IX. ASD の animal model

精神疾患の動物モデル研究においては、その疾患の遺伝子解析結果を受け、その関連遺伝子を欠損させたり過剰発現させたりしてモデルマウスを作製し、その解析が行われる。動物モデル研究の利点は、脳の病態を詳細に検討できること、治療反応性などの再現性を容易に確認できることなどが挙げられる。「マウスにころろはあるのか?」「マウスの幻聴とはどのようなものか?」といった話をたまに耳にするが、精神疾患の動物モデル研究には、そもそも人間以外の動物が“ころろ”をもつのかという深遠な問題があり、たとえ霊長類を用いたとしても、精神医学における動物のモデルはあくまで類似性の追求でしかないという前提を忘れてはいけない。

前述のように ASD 動物モデルの大半は、ヒトの遺伝子解析結果を踏まえて作製されている。GWAS などによって得られた一塩基多型などの情報は、そのオッズ比の低さから、1つの遺伝子が欠損する遺伝子改変マウス作製には有用でない。染色体解析、CNV 解析、関連解析などによって得られた遺伝子の情報をもとに作製される。代表的な非症候性 ASD モデルとしては、染色体 15q11-13 部位重複マウス²⁴⁾、Neuroigin-3 欠損マウス¹¹⁾などが挙げられ、症候性 ASD モデルとしては、レット症候群マウス (MeCP2 欠損マウス)²²⁾、結節性硬化症マウス (Tsc1/2 欠損マウス)¹⁰⁾がある。

これらのマウスは ASD モデルとして認知されているが、前述のようにあくまで ASD に類似しているとしかたえないため、1つのモデルのみならず複数の ASD モデルマウスで共通する現象が見つかり、実際の ASD 患者脳で何が生じてい

るのかを論ずる際に説得力が生まれる。Isshiki らは、上述の 15q11-13 部位重複マウス、Neuroigin-3 欠損マウスおよびもう1つの ASD モデルマウス (BTBR マウス) で、健常マウスと比べシナプスのターンオーバーが亢進していることを明らかにした¹⁴⁾。このように複数の ASD モデルマウスで共通する異常が見つかり、実際の ASD 患者脳でも同様の異常がある程度の可能性をもって生じていることが推定される。事実、遺伝子研究などにより、ASD 患者におけるシナプス異常は繰り返し報告されている⁶⁾。

これまで ASD を薬物で治療しようとするアイデアすら多くの精神科医にはなかったが、近年、ASD モデルマウスを用いた薬物治療反応性についての報告が相次ぎ、その薬物治療の可能性につき注目が集まっている。2007年、Jin らはオキシトシン分泌にかかわる分子 CD38 を欠損させたマウスは社会性障害などの ASD 様症状を呈すが、それらの症状はオキシトシン投与によって軽減されることを報告している¹⁶⁾。さらに、それらの実験結果を受けた臨床研究により、ASD 患者の症状はオキシトシンの点鼻によって改善することが明らかにされた²⁾。2012年には、症候性 ASD である結節性硬化症マウス (Tsc1/2 欠損マウス) に、結節性硬化症患者で実際に異常となっている mTOR pathway に作用する薬剤であるラパマイシンを投与すると、同マウスの社会性障害が改善することが報告されている²⁹⁾。

これらの結果から、ASD 症状に対する薬物治療の可能性が見いだされ、盛んに研究されるようになっていく。非症候性 ASD は多因子遺伝病であると考えられており、前述のとおり環境要因も強くかかわっている可能性が高いため、単一遺伝子病である結節性硬化症に随伴する ASD 症状の病態や治療法を解明しても意味がないであろうという意見も無論あるが、非症候性 ASD の病態に関与する多くの分子カスケードに共通の分子が存在するならば、ASD 研究としての症候性 ASD 研究の価値は十分にあるだろう。

X. ASD と social experience-dependent myelination

前述のように、ASD 発症には環境要因が強く関与している。最新の双生児研究から、環境要因のうち非共有環境要因の影響が特に強く、その影響は 54% に上る²⁸⁾。非共有環境とは、一卵性双生児が共有しない保育園や塾などの環境を指す。つまり、最近の研究では ASD 発症には家庭環境ではなく、家庭外の環境が重要であるといえる。

我々はマウスを用いた研究により、幼若期社会的経験が前頭前野の機能およびミエリンの形成に重要であることを報告したが²⁰⁾、前頭前野機能が障害されたマウスは社会性やワーキングメモリの障害を示した。社会性やワーキングメモリの障害は ASD 様症状であるといえるが、幼若期の不適切な経験（虐待など）による精神障害である被虐待児症候群は第四の発達障害といわれるほどその精神症状が発達障害と酷似している場合がある³¹⁾ ことから、近年の ASD 患者数の増加に幼少期の社会環境の変化が関与している可能性は十分にあるといえるだろう。

おわりに

筆者は研修医の頃、知的障害の方々接触到際、脳を治そうというアイデアはなく、ただただその方が生きやすいように環境を整えたり、薬物で情動を調整したりすることで、その治療としていた。また、知的障害と ASD が重畳しているかどうかを考えを及ぼすこともそれほどなかった。しかしながら、本稿で紹介したように、少なくとも ASD の病態は最新の分子生物学により徐々に明らかにされつつあり、それらの知見に基づいた具体的な治療法も検討される段階になっている。すなわち、ASD は分子生物学的に “treatable” な疾患になるかもしれず、その際には精神科医はこれまで以上に ASD の諸症状を知り、その診断法を熟知し、治療に結びつけていかねばならない。

なお、本論文に関連して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) American Psychiatric Association : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed. American Psychiatric Publishing, Arlington, 2013
- 2) Aoki, Y., Yahata, N., Watanabe, T., et al. : Oxytocin improves behavioral and neural deficits in inferring other' social emotions in autism. *Brain*, 137 ; 3073-3086, 2014
- 3) Brennand, K. J., Simone, A., Jou, J., et al. : Modeling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473 ; 221-225, 2011
- 4) Chen, P., Lin, J. J., Lu, C. S., et al. : Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan. *N Engl J Med*, 364 ; 1126-1133, 2011
- 5) Chowdhury, N. L., Remington, G., Kennedy, J. L., et al. : Genetics of antipsychotic-induced side effects and agranulocytosis. *Curr Psychiatry Rep*, 13 ; 156-165, 2011
- 6) Delorme, R., Ey, E., Toro, T., et al. : Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat Med*, 19 ; 685-694, 2013
- 7) Finegold, G. M., Downes, J., Summanes, P. H. : Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*, 18 ; 260-262, 2012
- 8) Folstein, S., Rutter, M. : Infantile autism : a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry*, 18 ; 297-321, 1977
- 9) Glessner, J. T., Wang, K., Cai, G., et al. : Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, 459 ; 569-573, 2009
- 10) Goorden, S. M., van Woerden, G. M., van der Weerd, L., et al. : Cognitive deficits in Tsc1+/- mice in the absence of cerebral lesions and seizures. *Ann Neurol*, 62 ; 648-655, 2007
- 11) Grayton, H. M., Missler, M., Collier, D. A., et al. : Altered social behaviors in neurexin 1 α knockout mice resemble core symptoms in neurodevelopmental disorders. *PLoS One*, 8 ; e67114, 2013
- 12) Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., et al. : Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*, 68 ; 1095-1102, 2011
- 13) Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., et al. : Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders.

Cell, 155 ; 1451-1463, 2013

14) Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., et al. : Enhanced synapse remodeling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nat Commun*, 5 ; 4742, 2014

15) Iwata, K., Matsuzaki, H., Tachibana, T., et al. : N-ethylmaleimide-sensitive factor interacts with the serotonin transporter and modulates its trafficking : implications for pathophysiology in autism. *Mol Autism*, 5 ; 33, 2014

16) Jin, D., Liu, H. X., Hirai, H., et al. : CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature*, 446 ; 41-45, 2007

17) Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., et al. : Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, 12 ; 487-497, 2013

18) Kundakovic, M., Gudsruk, K., Herbstman, J. B., et al. : DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112 ; 6807-6813, 2015

19) Maekawa, M., Yamada, K., Toyoshima, M., et al. : Utility of scalp hair follicles as a novel source of biomarker genes for psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry*, 78 ; 116-125, 2015

20) Makinodan, M., Rosen, K. M., Ito, S., et al. : A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science*, 337 ; 1357-1360, 2012

21) Marchetto, M. C., Brennand, K. J., Boyer, L. F., et al. : Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling : progress and promises. *Hum Mol Genet*, 20 ; R109-115, 2011

22) Moretti, P., Bouwknecht, J. A., Teague, R., et al. : Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, 14 ; 205-220, 2005

23) Nakamura, K., Sekine, Y., Ouchi, Y., et al. : Brain serotonin and dopamine transporter binding in adults

with high-functioning autism. *Arch Gen Psychiatry*, 67 ; 59-68, 2010

24) Nakatani, J., Tamada, K., Hatanaka, F., et al. : Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell*, 137 ; 1235-1246, 2009

25) Oostra, B. A., Verkerk, A. J. : The fragile X syndrome : isolation of the FMR-1 gene and characterization of the fragile X mutation. *Chromosoma*, 101 ; 381-387, 1992

26) Povey, S., Burley, M. W., Attwood, J., et al. : Two loci for tuberous sclerosis : one on 9q34 and one on 16p13. *Ann Hum Genet*, 58 ; 107-127, 1994

27) Rouillet, F. I., Lai, J. K., Foster, J. A. : In utero exposure to valproic acid and autism—a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol Teratol*, 36 ; 47-56, 2013

28) Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., et al. : The familial risk of autism. *JAMA*, 311 ; 1770-1777, 2014

29) Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., et al. : Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nat Commun*, 3 ; 1292, 2012

30) Schmidt, C. : Mental Health : thinking from the gut. *Naure*, 518 ; S12-15, 2015

31) 杉山登志郎 : 子ども虐待という第四の発達障害. 学習研究社, 東京, 2007

32) Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., et al. : Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 70 ; 49-58, 2013

33) Weintraub, K. : The prevalence puzzle : Autism counts. *Nature*, 479 ; 22-24, 2011

34) Wolstenholme, J. T., Taylor, J. A., Shetty, S. R., et al. : Gestational exposure to low dose bisphenol A alters social behavior in juvenile mice. *PLoS One*, 6 ; e25448, 2011

Molecular Biology on the Mechanisms of Autism Spectrum Disorder for Clinical Psychiatrists

Manabu MAKINODAN

Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Nara Medical University

While, in general, a certain number of clinical psychiatrists might not be familiar with molecular biology, the mechanisms of mental illnesses have been uncovered by molecular biology for decades.

Among mental illnesses, even biological psychiatrists and neuroscientists have paid less attention to the biological treatment of autism spectrum disorder (ASD) than Alzheimer's disease and schizophrenia since ASD has been regarded as a developmental disorder that was seemingly untreatable. However, multifaceted methods of molecular biology have revealed the mechanisms that would lead to the medication of ASD.

In this article, how molecular biology dissects the pathobiology of ASD is described in order to announce the possibilities of biological treatment for clinical psychiatrists.

< Author's abstract >

< **Keywords** : molecular biology, clinical psychiatry, autism spectrum disorder, mental illness >
