

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21754

研究課題名（和文）フリーラジカルに着目した自閉症エネルギー代謝異常の研究

研究課題名（英文）The bioenergetic dysfunction in ASD focusing on free radicals

研究代表者

松崎 秀夫（MATSUZAKI, HIDEO）

福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号：00334970

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：自閉スペクトラム症（ASD）における酸化ストレスの役割に注目し、児童の末梢血中フリーラジカル消去活性を比較測定した。ASD児童39例と年齢を一致させた定型発達児童58例の末梢血血清を電子スピン共鳴装置スピントラップ法で評価比較したところ、一重項酸素、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシド、アルコキシラジカルの4種のフリーラジカル消去活性パターンが有意差を示した。このうちヒドロキシラジカル消去活性減少、スーパーオキシドとアルコキシラジカルの消去活性増大のパターンは学齢期と未就学の自閉症児童に共通していて、特に6歳以下の幼児の自閉症診断のための強力な非行動的ツールとして役立つと判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉スペクトラム症（ASD）は社会性・コミュニケーションの障害、興味対象の制限を臨床的特徴とする発達障害であるが、病態機序が不明で、ASDの早期診断に資するバイオマーカーは未だ存在しない（Uddin et al Transl Psychiatry 2017）。本研究で採用するフリーラジカル消去活性をふくむ多変量解析とコホートの組み合わせはASD研究の方法論としてこれまでに例がなく、この手法で特異度、敏感度、再現性の高いASD早期診断マーカーが確立できた場合、世界初の血液によるASD早期診断ツールの開発、予測に基づく早期介入が可能になる。ひいてはASD者の社会適応の促進につながる点も有益である。

研究成果の概要（英文）：We assessed oxidative stress alterations in autism spectrum disorder (ASD) by the MULTIS method, an electron spin resonance-based technique measuring multiple free radical scavenging activities simultaneously. Serum samples of 39 children with ASD and 58 age-matched children with typical development were analyzed. The ASD group showed decreased hydroxyl radical and singlet oxygen scavenging activity with increased serum coenzyme Q10 oxidation rate, indicating a prooxidative tendency in ASD. By contrast, scavenging activities against superoxide and alkoxyl radical were increased in the ASD group suggesting antioxidative shifts. In the subgroup analysis of 6-year-olds or younger, the combination of hydroxyl radical, superoxide, and alkoxyl radical scavenging activities predicted ASD with high odds ratio, positive likelihood, and percentage of correct classification (87.0%). MULTIS measurements may serve as a very powerful non-behavioral tool for the diagnosis of ASD in children.

研究分野：分子精神医学

キーワード：自閉症 酸化ストレス 社会性 フリーラジカル

### 1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症(ASD)は社会性の障害、コミュニケーションの障害、興味対象の制限を臨床的特徴とする発達障害である<sup>1</sup>。多くは3歳までに顕現化するが、乳幼児期の高機能例は障害が見過され、社会適応に問題が生じるケースが少なくない。より早期の療育によってASD症状の悪化予防が可能とされる<sup>2</sup>。この点から早期診断はASD臨床の最重要課題であるが、この領域の臨床医(発達小児科医、児童精神科医)が決定的に不足している現状から、早期診断には客観性・信頼性の高いバイオマーカーが求められてきた。

我々はASD児童の末梢血を用いて、生物学的診断マーカーの探索に取り組んできた。近年に得たASD児童はVLDL特異的低脂血症を呈する所見から酸化ストレスとミトコンドリア機能に着目し、末梢血中フリーラジカル消去活性の変化を有力な生物学的診断マーカー候補として同定した(特許6830578号)。5歳以下のASD(N=23)および定型発達児(N=34)の末梢血血清に含まれる各種フリーラジカル消去活性をESRによるスピントラップ法により測定したところ、ASD群は定型発達群に比べ、ヒドロキシラジカル消去活性が有意に低下した。一方、スーパーオキシドおよびアルコキシラジカル消去活性は有意に上昇した(図1)。この3つを測定していずれも検査陽性であった場合、事前確率が50%のときの事後確率は99%で、ASDの判定にきわめて有用であった(図2)。しかし、この所見の原因は不明であり、精度の高いASD診断マーカーの確立には、児の社会性・発達との相関を含めた、さらなる解析が求められる。

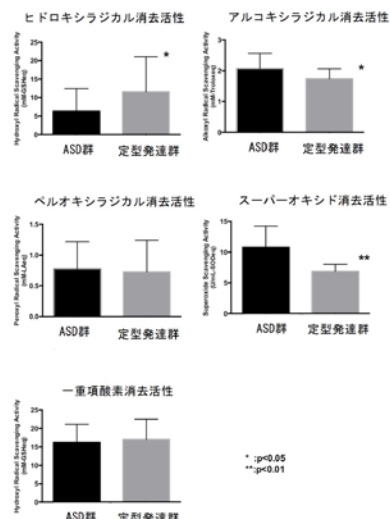


図1 ASD 児童の血中フリーラジカル消去活性

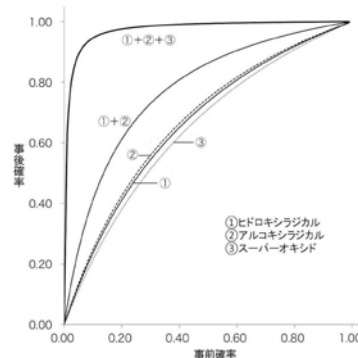


図2 フリーラジカル消去活性測定に基づくASDの事前確率と事後確率

### 2. 研究の目的

我々は、これまでのASD研究成果に基づき、酸化ストレスとミトコンドリア機能の障害に焦点を絞った臨床研究を展開している。その過程で多種類の血中フリーラジカル消去活性がASD児童の生物学的早期診断マーカーとして有望であることを見出した。本研究では、さらに多数のASD児の末梢血血清を用いて、この所見が真にASDの生物学的早期診断マーカーとなり得るかどうかを検証するために、まず児童の社会性を測るツールとして開発した注視点検出装置Gazefinder<sup>®3</sup>を導入して、血中フリーラジカル消去活性が児童の社会性を反映しているかどうかを調べる。ついで血中フリーラジカル消去活性の低下に関連の深い血中代謝産物をメタボローム解析法により探索し、血中フリーラジカル消去活性の原因を探る多変量解析と臍帯血コホート解析を行って、この所見の根底にあるエネルギー代謝異常の全容解明を目指す。

### 3. 研究の方法

令和元年度

(1) 研究資源の確保 (担当: 松崎・辻井・土屋)

① 就学児童のサンプル収集: 我々は辻井が主宰するNPO法人アスペ・エルデの会の全面的協力を得て、平成15年度から日本人ASD者の血液検体収集を開始し、サンプル管理を行ってきた。現在、その総数は300例を超え、対照となる定型発達者の血液検体も公募によってほぼ同数確保している。就学児童サンプルの分析は、このうち3歳から10歳までの未服薬の

ASD児童および、性別・年齢をマッチさせた定型発達児童の血清・リンパ芽球を各群60名分ずつ用いて行う。新たなリンパ芽球の樹立は、鎌倉テクノサイエンス(株)に委託する。

- ② 対象児童の臨床診断: ASD児童の臨床診断に際し、DSM-5に加えてADI-R・ADOSによる評価を行う。これらの研究用診断基準の使用は診断技法トレーニングを受けたうえでの国際ライセンス取得を要するが、土屋はその先駆けである。また、土屋の先導により診断基準の日本語訳の著作権と使用权も我々が所有している。

(2) 末梢血検体解析 (担当: 松崎・平山)

- ① 末梢血血清のフリーラジカル消去活性測定: 血液検体収集で得られた末梢血血清を電子スピン共鳴装置(Electron Spin Resonance: ESR、図3)にかけASD者群と定型発達群の多種類のフリーラジカル消去活性を測定する。活性酸素種は反応性が高く、安定に存在する時間が短い。ESRスピントラップ法によりその動態を各活性酸素種に特異的に反応する抗酸化物質に対する消去活性として測定し得る。一定量のフリーラジカルが生成できる溶液に試料を加え、発生するフリーラジカル量が減少すれば活性酸素消去活性ありと評価することができる。平山が担当する。



図3 電子スピン共鳴装置(日本電子)

- ② 末梢血血清メタボローム解析による代謝産物の特定: 上記の血清を用いてCE-TOFMS(図4)によるメタボローム解析を施行する。この機器では、キャピラリー電気泳動で短い分析時間と高い分離効率を実現しながら、質量選択検出器により分子量および分子構造の情報を得ることができる。解析結果をASD者群と定型発達群とで比較することにより、ASD者群に特異的な濃度変化を有する代謝産物を検索する。CE-TOFMSのデータベースには解糖系やTCA回路など主要な代謝経路の代謝物質データが約800例収録されており、このデータベースからのライブラリサーチにより血液サンプルでは200種類の代謝物質のヒットが見込まれる。代謝物質定量ののち、ESR測定値を交えたクラスター解析(図5)の多変量解析によって、ASD特異的かつ酸化ストレス・ミトコンドリア機能の異常と関連の深い代謝産物を同定する。松崎が担当する。



図4 CE-TOFMS 7100 (Agilent)

- ③ 末梢血リンパ芽球の遺伝子解析: 上記の代謝産物について関連が深い遺伝子を選び、同じ被験者検体のリンパ芽球中の遺伝子発現変化を定量リアルタイムPCRで評価する。遺伝子mRNAの発現量測定にはTaqMan assaysを用いる。松崎が担当する。

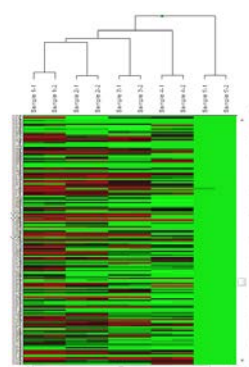


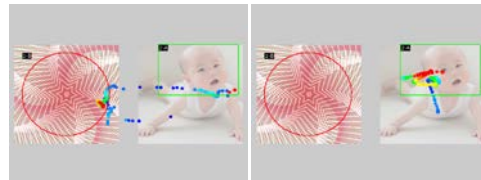
図5 クラスター解析

### (3) 注視点検出装置を用いた社会性評価(担当:小坂・土屋)

乳幼児に人物の顔を含む視覚刺激を提示し、児の注視点の分布を解析すると、ASD児では定型発達児よりもその注視点が目周りに集まりにくい。この点に着目して、土屋はJVCケンウッドと共同で注視点検出装置Gazefinder®を開発した(図6)。この傾向は目に注視したくなるような動画を用意しても減弱しない明瞭な**trait**であったことから、社会性の指標になると見込まれる。頭部の固定が不要なため、乳幼児でもデータ取得が可能で、成人例ではASDの判別に利用できる<sup>3</sup>。本研究では定型発達児、ASD児各60例(3~10歳)で注視点検出を行い、乳児と幾何学的模様による標準視覚刺激を用いた場合の注視点パターン(図7)から「目周囲領域滞留時間」「口周囲領域滞留時間」「その他の領域滞留時間」を測定する。ついで、ESR測定値との相関解析によって、児童の血中フリーラジカル消去活性が社会性を反映するかどうかを調べる。



図6 注視点検出装置(Gazefinder®)



ASD 児童 定型発達児童  
図7 Gazefinder®で検出される注視点分布

令和2年度

### (4) 臍帯血出生コホート(担当:松崎・平山・土屋)

土屋は、新生児を対象とした追跡的縦断コホート調査を行う目的で平成19年度より臍帯血の収集を始め、平成23年度末までに1,200名の新生児を登録した。児の母親に面接を行い、児の両親の生年月日、年齢、性別、社会階層などの人口統計学的情報を取得し、さらに3年にわたる追跡的縦断調査への協力を依頼している。児の出産に際して臍帯血血清を採取・保存し、母子手帳のデータを収集している。出生後1、4、6、10、14、18、24、36ヶ月の時点でMullen Scales of Early Learning行動評価および小児科診察を行い、14ヶ月以上の児に対してASDスクリーニングテスト(M-CHAT)を行っており、いずれかで異常所見を呈した24ヶ月の児に対してADI-R・ADOSを施行し、ASD診断を満たすかどうかを追跡している<sup>4</sup>。現時点で登録された児童のうち約30名にASDの疑いがある。

- ① 臍帯血血清のフリーラジカル消去活性測定: 収集した臍帯血血清全例について、前年度同様にESRを用いたスピントラップ法でフリーラジカル消去活性を測定する。
- ② 臍帯血血清のメタボローム解析: 収集した臍帯血血清全例についてCE-TOFMSによるメタボローム解析を施行し、前年度に特定した代謝産物の濃度を測定する。
- ③ 臍帯血出生コホートによるフリーラジカル消去活性・代謝産物の追跡: 測定した臍帯血血清のフリーラジカル消去活性・代謝産物がASDの超早期診断マーカーとして有用となるかどうかの検証を行う。平成25年度までに確定した登録者の診断を基にコホートで登録児童の発達の動向を追跡のうえ、フリーラジカル消去活性所見・酸化ストレス・ミトコンドリア機能関連代謝産物の敏感度、特異度、陽性結果予測値を評価して、発症予測性の精度等を確認する。



#### 4. 研究成果

フリーラジカルの末梢血中消去活性測定が未就学 ASD 児童の早期診断に役立つ可能性を見出して論文投稿を行ったところ、当初サンプルサイズが小さい、年齢層が限られている等のコメントがあった。そこで学齢期(6 歳以上)の ASD 児童の血液検体を追加で収集して、複数の活性酸素種について ESR によるフリーラジカル消去活性測定を行った。最終的に学齢期と未就学の児童で、計 39 例の ASD 児童検体、計 58 例の定型発達児童検体を ESR スピントラップ法で評価比較したところ、一重項酸素、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシド、アルコキシラジカルのフリーラジカル消去活性パターンが有意差を示した(Figure 1)。

このうちヒドロキシラジカル消去活性減少、スーパーオキシドとアルコキシラジカルの消去活性増大のパターンは学齢期と未就学の ASD 児童に共通していて、ROC 解析によって特に 6 歳以下の子供における ASD の診断のための非常に強力な非行動的ツールとして役立つと確認できた(Figure 2)。令和 2 年度には論文を *Scientific Reports* 誌に投稿して受理された<sup>5</sup>。国内出願中だった特許も受理され、令和 3 年 1 月 29 日に登録された。

なお、注視点検出装置を用いた社会性評価については一部施行したが、測定環境によって評価結果が安定せず、中止された。メタボローム解析、末梢血リンパ芽球の遺伝子解析を用いた評価は COVID-19 拡大防止のための研究環境集約措置によって行われなかった。臍帯血解析は一部実施されたが、予定の研究期間中に解析を終えることができなかった。

(引用文献)

1. Dover, C. J. & Le Couteur, A. How to diagnose autism. *Arch. Dis. Child.* **92**, 540–5 (2007).
2. Bauminger, N. The facilitation of social-emotional understanding and social interaction in high-functioning children with autism: intervention outcomes. *J. Autism Dev. Disord.* **32**, 283–98 (2002).
3. Fujioka, T. *et al.* Gazefinder as a clinical supplementary tool for discriminating between autism spectrum disorder and typical development in male adolescents and adults. *Mol. Autism* **7**, 1–14 (2016).
4. Takagai, S. *et al.* Cohort profile: Hamamatsu Birth Cohort for mothers and children (HBC study). *Int. J. Epidemiol.* **45**, (2016).
5. Hirayama, A. *et al.* Simultaneous evaluation of antioxidative serum profiles facilitates the diagnostic screening of autism spectrum disorder in under-6-year-old children. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).

Figure 1

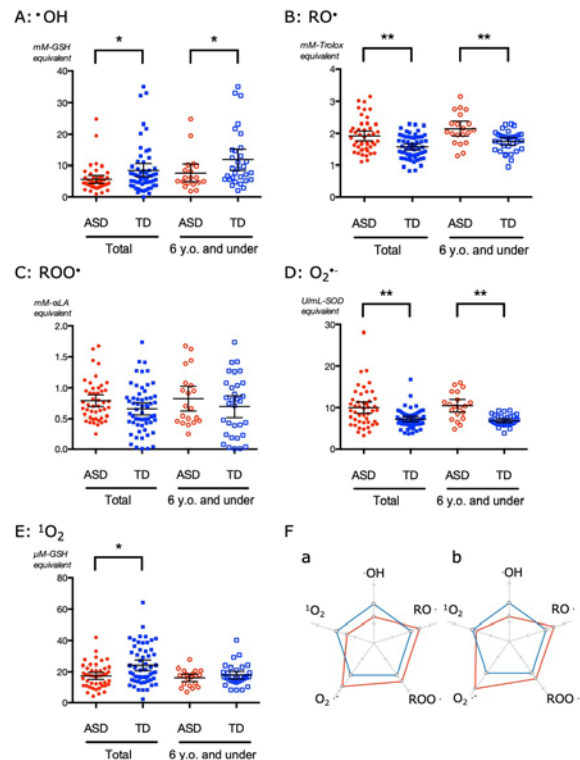
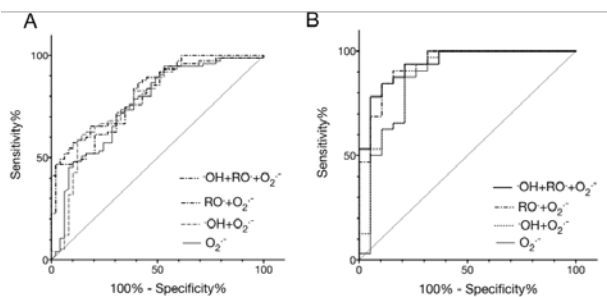


Figure 2



Hirayama et al. *Scientific Reports* 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Usui N, Iwata K, Miyachi T, Takagai S, Wakusawa K, Nara T, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Kurita D, Kamen Y, Wakuda T, Takebayashi K, Iwata Y, Fujioka T, Hirai T, Toyoshima M, Ohnishi T, Toyota T, Maekawa M, Yoshikawa T, Maekawa M, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N, Matsuzaki H*.	4. 巻 58
2. 論文標題 VLDL-specific increases of fatty acids in autism spectrum disorder correlate with social interaction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2020.102917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama A, Wakusawa K, Fujioka T, Iwata K, Usui N, Kurita D, Kamen Y, Wakuda T, Takagai S, Hirai T, Nara T, Ito H, Nagano Y, Oowada S, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Matsuzaki H*.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Simultaneous evaluation of antioxidative serum profiles facilitates the diagnostic screening of autism spectrum disorder in under-six-year-old children.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77328-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松崎秀夫
2. 発表標題 自閉スペクトラム症のエネルギー代謝異常の研究
3. 学会等名 第11回自閉症学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuzaki H, Iwata K, Usui N.
2. 発表標題 VLDL-specific increases of fatty acids in autism spectrum disorders correlate with social interaction.
3. 学会等名 第63回日本神経化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎秀夫
2. 発表標題 自閉症の科学
3. 学会等名 発達障害研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎秀夫
2. 発表標題 自閉症エネルギー代謝異常の研究
3. 学会等名 第10回自閉症学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsuzaki H, Hirayama A.
2. 発表標題 Measurement of Multiple Radical Scavenging Activity as a diagnostic method for autism spectrum disorder in children.
3. 学会等名 The 16th ASMRM and The 19th J-mit（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎秀夫
2. 発表標題 ミトコンドリアに着目した自閉症の診療技法の開発
3. 学会等名 第20回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎秀夫
2. 発表標題 自閉症の科学
3. 学会等名 名古屋市立大学医学部：医療・保健学びなおし講座（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎秀夫
2. 発表標題 自閉スペクトラム症の酸化ストレス
3. 学会等名 シンポジウム4 自閉症学の魅力．第41回日本生物学的精神医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 2.自閉症スペクトラム障害の判定方法、自閉症スペクトラム障害の判定用キット及び測定データ取得方法	発明者 平山暁、松崎秀夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6830578	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

本研究の成果は福井大学、筑波技術大学にてプレスリリースされ、特許取得の内容について福井新聞で報道された。



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平山 暁  (HIRAYAMA AKI)  (20323298)	筑波技術大学・保健科学部・教授    (12103)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	土屋 賢治  (TSUCHIYA KENJI)  (20362189)	浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・教授   (13802)	
研究協力者	辻井 正次  (TSUJII MASATSUGU)  (20257546)	中京大学・現代社会学部・教授   (33908)	
研究協力者	小坂 浩隆  (KOSAKA HIROTAKA)  (70401966)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授   (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関