

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号: 13802

研究種目: 基盤研究(B)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22390222

研究課題名(和文) 自閉症の生物学的超早期診断法の開発に関する研究

研究課題名(英文) A study on the development of biological "very early" diagnosis of autism

研究代表者

森 則夫(MORI NORIO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00174376

研究成果の概要(和文): 本研究では、自閉症の生物学的超早期診断法の開発を目的に、自閉症児・者の末梢血中の早期診断マーカーの探索と、日本人自閉症トリオ(当事者とその両親) サンプルのゲノムの CNV 解析を行った。その結果、自閉症者の血清において IL-1 β をはじめとする 8 種のサイトカイン・ケモカインが増加していること、および、自閉症者の血漿ではグルタミン酸濃度が増加する一方でグルタミン濃度は低下しており、両濃度から自閉症診断判別式を求めたところ、感度 90%、特異度 91% の診断精度を示すことを見出した。さらに、日本人自閉症トリオサンプル 100 家系の CNV 解析により未知の de novo CNV を 18 個同定した。これらの成果に立つ更なる検討により、近い将来に自閉症の超早期診断法が確立されるものと期待される。

研究成果の概要(英文): The aim of the study was to explore biological markers in peripheral plasma samples from non-medicated subjects with high-functioning ASD. (Experiment 1) A multiplex assay for cytokines and chemokines was applied to plasma samples from male subjects with high-functioning ASD (n = 28) and matched controls (n = 28). Among a total of 48 analytes examined, the plasma concentrations of IL-1 β , IL-1RA, IL-5, IL-8, IL-12(p70), IL-13, IL-17 and GRO- α were significantly higher in subjects with ASD compared with the corresponding values of matched controls after correction for multiple comparisons. (Experiment 2) Plasma levels of 25 amino acids in male children (n = 23) with ASD and matched controls (n = 22) were determined using high-performance liquid chromatography. Compared with controls, subjects with ASD showed higher levels of plasma glutamate and lower levels of plasma glutamine. Using discriminant analysis with logistic regression, the two values of plasma glutamate and glutamine were shown to differentiate the ASD group from the control group; the rate of correct classification was 91%. These results suggest that abnormal immune responses as assessed by multiplex analysis and plasma glutamate and glutamine levels may serve as the biological markers for ASD.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2011 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード: 児童・思春期精神医学

1. 研究開始当初の背景

自閉症の原因はいまだ不明であり根治療法はないが、早期に療育を施すことにより社会適応を向上させることができる。療育は、その開始が早いほど効果が高いことから、生物学的方法による自閉症の早期診断法の開発と確立は焦眉の課題である。自閉症の遺伝寄与率は精神疾患の中で最も高く、したがって、遺伝子診断の可能性も高いと考えられるが、実際には両親の同意を得ること自体が困難である。一方、自閉症では末梢血中の様々な分子に異常が認められ、このような疾患マーカー研究に関しては、両親から十分な協力が得られ、強い期待が寄せられている。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では以下の4つの研究に取り組むことにした。(1) 末梢血中の生化学的マーカー候補物質の網羅的探索、(2) 臍帯血中における血清生化学的マーカー物質の解析、(3) 日本人トリオサンプルのゲノム解析、および、(4) 毛根、口腔内スワブを対象にした簡便型遺伝子診断法の開発である。

3. 研究の方法

(1) 末梢血中の生化学的マーカー候補物質の網羅的探索

申請者らが自閉症当事者の会「NPO アスペ・エルデの会」の協力を得て実施してきたこれまでの研究で選定した自閉症群（100例、年齢5～25歳）と健常対照群（100例、年齢5～25歳）を対象とした。なお、何らかの薬物療法を受けている者、他の精神疾患やてんかんを合併する者、および、IQが70以下の者は除外した。血清または血漿中のタンパク分子を、サスペンション・アレイ法により網羅的に解析し、性と年齢を一致させた健常対照者と比較した。健常者との有意な差がある分子については、ウェスタンブロット法で確認するとともに、自閉症群内で年齢との相関があるか否か、臨床的指標との相関の有無について検討した。

(2) 臍帯血中における血清生化学的マーカー物質の解析

「浜松母と子の出生コホート（最終登録者数1200名）」の参加者のうち、同意が得られた母子を対象とした。各母親への面接により、児の属する社会階層、児の性別、同胞数と同胞順位、児の両親の教育年数、両親の婚姻状況等の情報を得た。児の出生時に臍帯血を採取し、室温で30分間凝固させた後、1,000 Gで遠心分離し血清を得、200 μ Lずつ分注し、 -80°C に保存し、以後の解析に供した。全ての対象者について生後3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月の時点における発達指標を追跡調査し、生後24ヶ月において自閉症スペク

ラム障害の有無を診断した。

(3) 日本人トリオサンプルのゲノム解析

「NPO アスペ・エルデの会」の協力を得て、300組を超える日本人自閉症トリオサンプル（自閉症児とその両親のゲノムサンプル）を収集した。CNV解析には、Affymetrix社 Genome-Wide Human SNP Array 6.0を用いた。まず、各発端者から末梢血を得て、Gバンディング検査を行い、次いでAffymetrix社のキットと自動サンプル処理装置およびデータ解析ソフトウェアを用いて(a) DNAのビオチン標識、(b) チップ上のプローブへのハイブリダイゼーション、(c) 蛍光標識アビジン結合、(d) 各プローブが示す蛍光量の測定、(e) CNVを示す領域の決定、を行った。

(4) 毛根、口腔内スワブを対象にした簡便型遺伝子診断法の開発

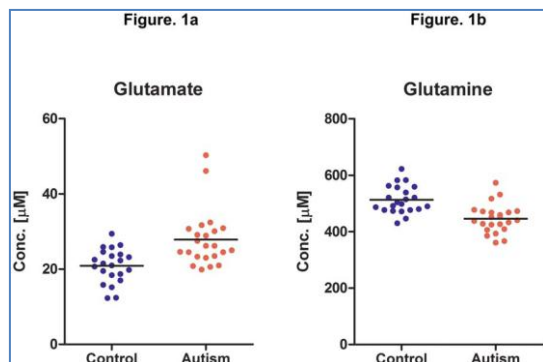
「浜松母と子の出生コホート」の登録者、および、「NPO アスペ・エルデの会」会員の兄弟（ハイリスク児）に協力を呼びかけ、毛根と口腔内スワブによるDNA採取を行った。

4. 研究成果

(1) 末梢血中の生化学的マーカー候補物質の網羅的探索

サスペンション・アレイ法を用い、血漿中サイトカイン、成長因子、細胞接着分子について網羅的に測定した。その結果、自閉症群においてIL-1 β 、IL-1RA、IL-5、IL-8、IL-12、IL-13、IL-17、GRO- α の8種のサイトカインが有意に増加していた。これらのサイトカインの血漿濃度と、臨床指標（年齢、IQ、臨床症状の重症度など）との関係について解析したが、有意な相関はなかった。これらサイトカインの上昇から、自閉症者において自然免疫の活性化、ヘルパーTリンパ球におけるTh1/Th2機能の不均衡、および、アレルギー反応の亢進が起きていることが示唆された。(Suzuki et al, 2010)。

また、アミノ酸、および、アミノ酸関連物質の血漿中濃度を網羅的に測定したところ、



自閉症児ではグルタミン酸が有意に増加し、

- Shimmura C, Kawai S, Yoshihara Y, Wakuda T, Takebayashi K, Takagai S, Matsumoto K, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One*. 2011;6(5):e20470.
- 9) Nakamura K, Iwata Y, Anitha A, Miyachi T, Toyota T, Yamada S, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Iwayama Y, Yamada K, Hattori E, Matsuzaki H, Matsumoto K, Suzuki K, Suda S, Takebayashi K, Takei N, Ichikawa H, Sugiyama T, Yoshikawa T, Mori N. Replication study of Japanese cohorts supports the role of STX1A in autism susceptibility. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Mar 30;35(2):454-8.
- 10) Thanseem I, Nakamura K, Miyachi T, Toyota T, Yamada S, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Anitha A, Iwayama Y, Yamada K, Hattori E, Matsuzaki H, Matsumoto K, Iwata Y, Suzuki K, Suda S, Kawai M, Sugihara G, Takebayashi K, Takei N, Ichikawa H, Sugiyama T, Yoshikawa T, Mori N. Further evidence for the role of MET in autism susceptibility. *Neurosci Res*. 2010 Oct;68(2):137-41.
- 11) Fujita-Shimizu A, Suzuki K, Nakamura K, Miyachi T, Matsuzaki H, Kajizuka M, Shinmura C, Iwata Y, Suda S, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Sugihara G, Iwata K, Yamamoto S, Tsujii M, Sugiyama T, Takei N, Mori N. Decreased serum levels of adiponectin in subjects with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 Apr 16;34(3):455-8.

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 岩田圭子, 中林一彦, 松崎秀夫, 中村和彦, 秦健一郎, 森則夫. 自閉症死後脳縫線核メチル化状態の網羅的解析. 第 39 回日本脳科学会. 2012 年 10 月 6 日, 北九州市.
- 2) 森則夫. 「精神障害の予防は可能か?」— 自閉症・統合失調症の早期診断と早期介入—. 第 106 回日本小児精神神経学会. 2011 年 11 月 26 日, 浜松.
- 3) 鈴木勝昭. バイオマーカーからみた自閉症スペクトラム障害. 第 104 回小児精神神経学会. 2010 年 11 月 14 日, 徳島.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 則夫 (MORI NORIO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00174376

(2) 研究分担者

鈴木 勝昭 (SUZUKI KATSUAKI)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00285040

土屋 賢治 (TSUCHIYA KENJI)
浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・准教授
研究者番号：20362189

蓑島 伸生 (MINOSHIMA SHINSEI)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授
研究者番号：90181966

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

中村 和彦 (NAKAMURA KAZUHIKO)
弘前大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80263911