

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461762

研究課題名(和文) 血清メタボローム解析による自閉症脂肪酸代謝異常の解明と診断マーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of diagnostic marker and elucidation of fatty acid metabolism abnormality in autism by serum metabolome analysis

研究代表者

高貝 就 (takagai, shu)

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：10447807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児から学童までの末梢血血清を精査した結果、自閉症児の血中脂質VLDL分画濃度は学童期以降から低下すると判明した。この所見に関連の深い代謝産物を特定する目的で収集した自閉症児群・定型発達児群各30例の末梢血血清を対象にメタボローム解析を行った。血中の標的代謝産物1200種類を測定した結果、まず258種が検出され、うち83種で自閉症児群に有意な変化が認められた。代謝産物と中性脂肪VLDL分画との相関を調べたところ、脂質の分解を示唆する代謝物質20種類の濃度が有意に相関していた。これらの結果から自閉症者の末梢血中では、学童期以降にVLDL脂質の特異的な分解が後天的に生じていると推定された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the mechanism of VLDL down-regulation in autism spectrum disorder (ASD), we carried out measurements of free metabolite in plasma of children with ASD and examined correlation between VLDL triglyceride and the metabolites detected. By TOF-MS analysis, a total of 258 metabolites were detected in the serum of all set. Of these, 83 metabolites showed significantly different relative areas between the ASD children and the controls. The present study identified deviated serum metabolite levels associated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction in children with ASD. More, we found significant correlation between VLDL triglyceride decrease and 20 metabolites change in the ASD participants. These results suggested that VLDL-specific lipolysis due to aberrant -activation of fatty acid via oxidative stress and mitochondrial dysfunction may cause VLDL triglyceride decrease in serum of school-aged children with ASD.

研究分野：精神医学

キーワード：自閉症 メタボローム 早期診断 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

自閉症は社会性の障害、言語理解の障害、興味対象の制限を臨床的特徴とする発達障害である(Dover & Le Couteur 2007)。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ごされ、社会適応に問題が生じるケースが少なくない。自閉症の病態は不明のため、その有効な治療手段は療育(診断後の自閉症者の教育および、その家族に対する養育方法の指導)以外にない。しかも、より早期の療育によって症状の悪化予防が可能とされる(White et al 2007, Bauminger 2002)。この点から早期診断は自閉症臨床の最重要課題であるが、この領域の臨床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。

この現状を踏まえ、我々は自閉症者末梢血を用いて、生物学的診断マーカーの探索に取り組んできた。これまで下垂体前葉ホルモン、アミノ酸、成長因子、細胞接着因子等がその候補となることを公表してきたが、最近、末梢血中脂質の超低密度リポ蛋白質(VLDL)分画の低下を有力な生物学的診断マーカーとして同定した。この所見は特に中性脂肪で顕著に認められ、年少者ほど差が大きかった。この指標でカットオフ値を設定したところ、8歳未満で感度・特異度いずれも80%以上を記録し、自閉症早期診断に有用であることが分かった(特願2011-536046)。

血中のVLDL脂質は、肝臓において血中の遊離脂肪酸を材料として合成される。脂質解析の対象者全員の血中 GOT・GPT・GTP を測定したところ、全例に肝機能異常が認められなかったことから、VLDL低下の原因として血中遊離脂肪酸の減少が推定された。そこでVLDL分画の低下が著しい中学生以下の自閉症児童・定型発達児童を対象に、血清中の遊離脂肪酸組成をガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)により網羅的に測定した。その結果、6系に属するリノール酸(18:2)、リノレン酸(18:3)、アラキドン酸(20:4)のほか、ミスチン酸(14:0)、パルミチン酸(16:0)、オレイン酸(c18:1)の自閉症児童特異的かつ有意な低下が認められた。しかし、この脂肪酸組成の低下の原因は不明であり、精度の高い自閉症生物学的診断マーカーの確立には、児の発達との相関を含めた、さらなる解析が求められる。

2. 研究の目的

特定の組織・細胞に存在する全代謝産物をメタボロームという。本研究では、まず、これまでの研究で明らかにされた血中VLDL脂質分画・遊離脂肪酸の低下パターンの原因解明を目指し、CE-TOFMSによる血中代謝産物の網羅的メタボローム解析を行う。この解析結果と脂質所見の相関を調べることによって、自閉症固有の脂質・脂肪酸所見の原因に迫ることができる。ついで、臍帯血出生コホートでの追跡により、代謝産物を含めた脂質・脂肪酸所見の早期診断マーカーとしての精度の確認を行い、脂肪酸代謝異

常に基づく自閉症生物学的診断マーカーの確立を試みる。

本研究の特色は、第一に、発達障害者の脂質代謝に着目したことである。これまで発達障害を脂肪酸代謝の観点から網羅的に捉える研究は前例がなく、世界において我々のグループのみである。近年、胎生期の性ステロイド、シナプスの形成異常や脳内炎症の関与が有力な自閉症仮説をなすことから、出生前後の脂肪酸代謝異常はこれらに共通した中間表現型として独創的な病態仮説の根幹となる可能性を有している。かつて脂質は測定すら困難であったが、質量分析技術が飛躍的に発展した現在では、多変量解析との組合せによって代謝の過程をクラスター解析やパスウェイマッピングで捉えられるようになり、メタボローム解析は脂質分析の強力なツールとなった。本研究では、その利点を最大限に活かしている。

自閉症児童に認められる血中脂肪酸の低下の原因として、エネルギー代謝の側面から分解の亢進か合成の阻害、あるいはリン脂質の代謝異常、食細胞による貪食が考えられる。特に近年では自閉症におけるミトコンドリアの機能低下(Giulivi et al, JAMA 2010)が報告されており、

酸化の亢進、過酸化脂質の生成が原因として疑われる。末梢血中代謝産物の網羅的解析により、これらの代謝異常の関連が把握できる。また、脳内では脂肪酸アミド(内因性カンナビノイド)が脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH)によって脂肪酸に変換される。この酵素は海馬に多く分布しているため、この酵素の機能異常が自閉症に特異的であれば、脂肪酸アミドの蓄積により、血中の脂肪酸アミド濃度上昇が予想される。しかし長鎖脂肪酸のアミドあるいはエタノールアミドの中樞神経での機能は十分解明されておらず、精神疾患での役割はほとんどわかっていない。本研究の解析によってこの所見を見出すことができれば、自閉症の持つ精神症状と脂肪酸の低下を内因性カンナビノイドの代謝異常で説明できる可能性もある。

本研究の特色の第二は、末梢血での網羅的解析と臍帯血出生コホートを併行することで、自閉症者が将来備える症状を予見する末梢血中マーカー分子を同定する点にある。ヒトゲノム解析が終了した今日、疾患マーカー探索の有効な網羅的解析手段としてプロテオミクス・メタボロミクス等の質量分析の需要が高いが、これまで自閉症末梢血マーカー候補には、早期診断に資するものがない(Santangelo & Tsatsanis 2005, Bethea & Sikich 2007)。その理由は診断が確定する前のマーカーの値とその後の診断との相関が不詳であることに尽きる。マーカーの開発過程は、候補物質を探索する過程(Discovery Phase)と候補物質がマーカーとしての条件を満たすか否かを検証する過程(Validation Phase)に大別されるが、自閉症研究で後者が十分に検証された例はない。Discovery Phaseとしては、Sharpらによる先駆的なプロテオミクス研究報告がある。彼らは質量分析によって自閉症児童の末梢血液中に特異

的なタンパク質の変動を見出した (Corbett et al 2007)。しかし、感度・特異度ともに不十分であるばかりか、Validation Phase の検証がなされておらず、診断マーカーとしての価値は認められていない。本研究で採用する質量分析による血中代謝産物の網羅的解析と多変量解析の組み合わせは、自閉症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、感度、再現性の高い自閉症早期診断マーカー分子が確立できた場合、世界初の血液による自閉症早期診断ツールの開発につながるものと期待される。ひいてはバイオマーカーを用いた自閉症発症リスクの予測に基づく超早期診断・超早期介入が可能となり、自閉症者の社会適応の促進が図られる。自閉症者の中でも、とりわけ高機能自閉症者は言葉の遅れがなく、一見正常のようにみられるため、家族を含む近親者の訴えや反社会的な問題が顕在化しない限り、多くは現場で見過ごされている。今後も彼らによる反社会的な行動が事件となる可能性は高く、未然に防ぐ手立てが望まれる。すなわち社会医学的な観点からも本研究は貢献度が高いものと考えられ、こうした新規性と発展性から本研究を申請した。

3. 研究の方法

本研究は、研究資源の確保、自閉症児童末梢血血清の解析、臍帯血出生コホートの3つから構成される。まず初年度には自閉症児童・定型発達児童の末梢血血清を収集して、脂質所見に関連の深い代謝産物をメタボローム解析によって特定する。次年度以降に、臍帯血を用いて脂質解析・メタボローム解析を行い、自閉症児童特異的にみられた脂質所見・関連を特定した代謝産物について、自閉症早期診断マーカーとしての精度をコホートで追跡する。

平成 25 年度

1. 研究資源の確保 (高貝・土屋、連携: 辻井・杉山)

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 年度から日本人自閉症者血清の収集を開始し、浜松医科大学にてサンプル管理を行ってきた。現在、その総数は 200 例を超え、対照となる健常者(定型発達者)の血清も公募によって同数確保している。就学児童サンプルの分析は、このうち 6 歳から 10 歳までの未服薬の自閉症児童および、性別・年齢をマッチさせた定型発達児童の血清を用いて行なう。

未就学児童を対象としたサンプル収集: 浜松市内の天竜病院・発達医療総合福祉センターの外来を訪れる 6 歳未満の自閉症児童を対象に血液サンプルを収集する。対照となる児童の血清も上記同様に公募で収集を進める。

対象児童の診断: 自閉症児童の臨床診断に際し、Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) と Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) による評価を行う。この研究用診断基準の使用には診断技法の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。現在、この国際ライセンス取得者は国内に約 10

名いるが、分担の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版權と使用権も当研究チームが所有している。

臍帯血出生コホート登録者の追跡: 土屋ら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自閉症スクリーニングテスト(M-CHAT)を行う。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 を施行して、発達の様態および自閉症診断を満たすかどうかを追跡する。現時点で登録者のうち約 50 名に自閉症の疑いがある。

2. 自閉症児童末梢血血清の解析 (松崎、連携: 真島)

末梢血血清の脂質解析: 上記サンプル収集により得られた末梢血血清の脂質プロファイルを測定する。まず Bligh & Dyer 法によって総脂質を抽出し、HPLC 法によって中性脂肪の脂質分画を測定する。脂肪酸組成はメチルエステル化した脂質を GC-MS 分析に供して定量する。

末梢血血清のメタボローム解析による代謝産物の特定: 上記の自閉症者群と定型発達群の血清を用いて、CE-TOFMS 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。これらの解析の結果を自閉症者群と健常者群とで比較することにより、自閉症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 回路などの主要な代謝経路に含まれる代謝物質のデータが約 800 例収載されており、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 例の代謝物質名のヒットが見込まれる。代謝物質定量ののち、パスウェイマッピング・クラスター解析などの多変量解析によって、自閉症特異的かつ VLDL 脂質分画・脂肪酸組成の推移と関連の深い代謝産物を同定する。

平成 26 年度以降

3. 臍帯血出生コホート (高貝・松崎・土屋)

臍帯血血清の脂質解析: 収集した臍帯血血清全例について昨年同様に HPLC・GC-MS で脂質プロファイルを測定する。

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、平成 25 年度に特定した代謝産物の濃度を測定する。

臍帯血出生コホートによる脂質・代謝産物の追跡: 測定した臍帯血血清の脂質所見・脂質関連代謝産物が自閉症の超早期診断 (出生時診

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、脂質所見・脂質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。また、マーカー陽性児で、自閉症の確定診断が付く前の種々の行動特性を、過去の診察・評価の記録、およびビデオテープの記録から精査し、分子マーカー固有の初期表現型の特定も行う。

4. 研究成果

乳幼児から学童までの末梢血を精査した結果、自閉症児童の血中脂質 VLDL 分画濃度は、学童期以降から低下すると判明した。この所見に関連の深い代謝産物を特定する目的で、新たに収集した自閉症児童群・定型発達児童群各 30 例の末梢血血清を対象にメタボローム解析を行った。血中の標的代謝産物 1200 種類を測定した結果、まず 258 種が検出され、うち 83 種で自閉症児童群に有意な変化が認められた。代謝産物と中性脂肪 VLDL 分画との相関を調べたところ、脂質の分解を示唆する代謝物質 20 種類の濃度が有意に相関していた。これらは ROC 解析によって新たな自閉症判定のマーカー候補としても有望と期待された。これらの結果から自閉症者の末梢血中では、学童期以降に VLDL 脂質の特異的な分解が後天的に生じていると推定された。

一方、浜松で運営する臍帯血出生コホートにエントリーした 1110 例のうち、29 名の児童が長じて自閉症と診断された。しかし、児の臍帯血中脂質濃度とその後の児の発達を追跡照合したところ、出生の段階の血中 VLDL 脂質濃度で自閉症の発症を予測することはできなかった。このため、臍帯血中の自閉症特異的メタボロームの解析は行われなかった。

また、本研究計画で収集した自閉症児童の検体より、脂質以外でのマーカー候補となる知見が得られ、論文として発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計3件)

1. Kameno Y, Iwata K, Matsuzaki H, Miyachi T, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Maekawa M, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. Serum levels of soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are decreased in subjects with autism spectrum disorder. *Mol Autism*. 4(1):19, 2013
2. Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M,

Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, and Yoshikawa T. Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses. *Biol Psychiatry* 78(2):116-25, 2015.

3. Maekawa M, Iwayama Y, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Hisano Y, Toyota T, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Takagai S, Yamada K, Ota M, Fukuchi S, Okada Y, Akamatsu W, Tsujii M, Kojima N, Owada Y, Okano H, Mori N and Yoshikawa T. Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes SLC27A3 and SLC27A4 in autism *Sci Rep*. 5: 16239, 2015.

(学会発表) (計2件)

1. Matsuzaki H, Iwata, K. and Mori, N. Specific hypolipidemia pattern in individuals with autism spectrum disorder. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Jun 24, 2013, Kyoto.
2. Matsuzaki H, Iwata K, Nakamura K, Tsujii M and Mori N. Specific Hypolipidemia Caused By VLDL Lipolysis in Children with ASD. ポスター (174.087), 2014 International Meeting for Autism Research (May 14-17), 2014 年 5 月 17 日, Atlanta, Georgia, USA.

(図書) (計0件)

(産業財産権)

出願状況(計1件)

名称:精神関連疾患の検査方法及び検査キット
発明者:吉川武男、前川素子、森則夫、松崎秀夫、中村和彦

権利者:独立行政法人理化学研究所、国立大学法人浜松医科大学

種類:特許権

番号:PCT/JP2013/078703

出願年月日:2013年10月23日

国内外の別:国際

取得状況(計2件)

名称: Method for determination of degree of risk of onset of high-functioning autism
発明者:森則夫、中村和彦、鈴木勝昭、土屋賢治、岩田圭子、松崎秀夫

権利者:国立大学法人浜松医科大学

種類:US PATENT

番号:#8518659 B2

取得年月日:2013年8月27日

国内外の別:米国

名称: 判定高機能自閉症的友病危陰度的方法及析沓物

発明者: 森則夫、中村和彦、鈴木勝昭、土屋賢治、岩田圭子、松崎秀夫

権利者: 国立大学法人浜松医科大学

種類: CN PATENT

番号: #ZL201080046519.3

取得年月日: 2014年9月3日

国内外の別: 中国

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高貝 就 (Takagai, Shu)

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: 10447807

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

辻井 正次 (Tsuji, Masatsugu)

中京大学・現代社会学部・教授

研究者番号: 20257546

杉山 登志郎 (Sugiyama, Toshirou)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60216348

真島 和志 (Mashima, Kazushi)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号: 70159143