

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659560

研究課題名（和文）末梢血質量分析と臍帯血出生コホートの連携による自閉症診断マーカーの検索

研究課題名（英文）Comprehensive search of diagnostic biomarker for autism based on mass analysis of peripheral blood and birth cohort study by cord blood

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）：本研究では自閉症児の末梢血血清を用いて、まず自閉症に特異的な血中タンパク質および血中代謝産物を質量分析による網羅的解析により探索し、ついで、運営する臍帯血出生コホートから採取される臍帯血で解析を進め、自閉症の早期診断に資するマーカー分子の同定を目指す計画を推進した。プロテオームでは上記の自閉症者群と健常者群の血清を用いて、二次元電気泳動による differential display を施行する計画を予定していたが、共同研究機器の故障により最終的に物質の同定に至らなかった。メタボロームについては自閉症者血中遊離脂肪酸やアシルカルニチンの増大が認められ、このことから自閉症者では血中脂質の分解が亢進していると結論した。臍帯血出生コホートの検証は交付期間内に実現しなかった。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we were executing analysis to search specific protein or analyte by mass analysis using serum of individuals with autism. Then, we had a plan to identify the candidate marker molecule for early diagnosis of autism based on the birth cohort by cord blood. In proteomics analysis, we expected to execute differential display by two-dimensional electrophoresis but failed because of the equipment disorder. In metabolome analysis, we identified that free fatty acid and acyl-carnitine were increased in serum of individuals with autism as compared controls, which concluded that lipolysis was progressing in serum of individuals with autism. The birth cohort by cord blood have not yet examined within this term of grant-in-aid.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：(1) 自閉症 (2) 質量分析 (3) 診断マーカー (4) 血清

1. 研究開始当初の背景

自閉症は社会的交流の障害、言語理解の障害、興味の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、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た時点で初めて障害が明らかとなる。自閉症の病態は不明であるため、その有効な治

療手段は、現時点では診断後の自閉症者の教育および自閉症者の家族に対する養育方法の指導以外にない（これを療育という）。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(Bauminger 2002, White et al 2007)。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、発症前の

乳幼児期の診断には客観性・信頼性の高いマーカーが求められてきた。しかし、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)。その理由はマーカーの出生時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①候補物質を探索する過程(Discovery Phase)と②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らによる先駆的な報告がある。彼らは質量分析法によって自閉症児童の血液中に特異的な分子の変動を見出した(Corbett et al 2007)。しかし、Validation Phaseの検証はなされておらず、早期診断マーカーとしての価値は不明である。

2. 研究の目的

本研究では質量分析に基づく網羅的解析技術を用いて、自閉症児の血清に含まれているプロテオームおよびメタボローム(主にアミノ酸・有機酸・脂肪酸)を健常群と比較解析し、自閉症者群に特異的な分子を複数選択する。ついで現在運営中である出生コホートでの臍帯血中の同分子群を同様に定量し、その後の児の発達や自閉症発症の有無との相関を追跡調査する。この両者の相関が有意に高いものを選ぶことで自閉症早期診断マーカーとして妥当性の高い分子を同定する。

3. 研究の方法

我々はNPO法人「アスペ・エルデの会」の協力を得て自閉症者血清を収集している。初年度に質量分析技術で自閉症児童群と健常児童群を比較解析し、両群において発現量に差がみられる分子を探索し、早期診断に資するマーカー候補として同定する。次年度に出生コホートで成長後の発達・自閉症発症の有無との相関を追跡し、相関の高いものを自閉症マーカーとして同定する。

1. 研究協力者のリクルート体制の確立と研究資源の確保(森・松崎・土屋、連携辻井)

①血清解析用のサンプル収集:我々は自閉症血清解析のため、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いる。近年では例年50例以上の収集を行い、その総数は既に200例を超え、対照となる健常者血清もほぼ同数確保している。質量分析はこれらのうち、6歳から10歳までの自閉症児童および健常児童の血清を用いて行なう。

②出生コホート用のサンプル収集:平成19年度より臍帯血の収集をはじめ、対照となる

臍帯血については100例以上収集した。継続中の出生コホート研究への協力登録者は、平成24年度末までに登録者数1200名に到達した。登録者に面接を行い、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、さらに約3年にわたる追跡的縦断調査への協力を依頼する。出産に際し、臍帯血血清を採取・保存し、母子手帳のデータを収集する。現在の日本で広汎性発達障害の発症率は2.1%(Sumi et al 2006)とされるため、この登録者の中から25人が自閉症を発症する可能性があると思込んでいる。

2. 末梢血血清の質量分析によるマーカー候補の特定(井上・松崎、連携:伊藤)

(プロテオーム解析)上記①の自閉症者群と健常者群の血清を用いて、静岡県立大学で二次元電気泳動によるdifferential displayを施行する。電気泳動条件確定後、収集した血清サンプルを蛍光二次元電気泳動で展開し、ゲル画像の比較から疾患特異的なタンパク質スポットを特定する。MALDI-TOF/MSによって特異的なスポットの質量分析を行い、これらの分子の配列を確定したのち、この配列についてホモロジーサーチを行い、ヒトでの同分子の遺伝子配列、アミノ酸配列、遺伝子座、モチーフ検索等の基本的情報を得る。

(メタボローム解析)上記①の自閉症者群と健常者群の血清を用いて、浜松医科大学でガスクロマトグラフ質量分析を施行する。カラムにはそれぞれ対応したキャピラリーカラムを用いる。脂肪酸の解析の場合Bligh&Dyer法によって総脂質を抽出し、メチルエステル化した脂質をGC分析に供して定量する。アミノ酸の解析の場合、EZ:faast®によって試料の前処理と誘導体化作業を行い、GC分析に供して定量する。有機酸の解析の場合、TMS誘導体化作業を行い、GC分析に供して定量する。TMS誘導体化を行った有機酸類はマススペクトルの類似性が高いため、マススペクトルのみでの検索だと70以上の成分が候補化合物となるが、保持指標を用いたシミュラティ検索で、1候補化合物に絞り込むことが可能である。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分子を特定する。

3. 臍帯血出生コホートによるマーカー妥当性の検討(土屋)

新生児を対象とした追跡的縦断調査を行う。上記にて同定された分子診断マーカーを臍帯血において測定し、その値が超早期診断(出生時診断)マーカーとして有用であるかを経時的に検討する。臍帯血中の分子濃度の測定には、タンパク質の場合は特異的抗体によるELISAを行い、代謝産物はガスクロマトグラフ質量分析計を用いる。

(コホートの運営)母親からの同意取得後、

臍帯血サンプルの提供を受ける。出生後 1、4、6、10、14、18、24、36 ヶ月の時点で行動評価及び小児科診察を行う。診察・行動評価は親の許可を得て、ビデオテープに記録する。さらに 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 ヶ月の児に対して自閉症観察尺度 (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し、データを蓄積する。

(有用性の評価) 上記 2 で特定された分子診断マーカー濃度を臍帯血で測定して、その有用性(敏感度、特異度、陽性結果予測値)の検証を行う。某マーカーが陽性の児童について発達の動向を追跡し、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

初年度に質量分析技術で自閉症児童群と健常児童群を比較解析し、両群において発現量に差がみられる分子を探索した。

末梢血血清のプロテオーム解析では、上記の自閉症者群と健常者群の血清を用いて、二次元電気泳動による differential display を施行する計画を予定していた。電気泳動条件確定後、収集した血清サンプルを蛍光二次元電気泳動で展開し、疾患特異的なタンパク質スポットを特定し、MALDI-TOF/MS によって特異的なスポットの質量分析を行い、確定した分子の配列のホモロジーサーチを経て、ヒトでの同分子の基本的情報を得る予定であった。しかし初年度は分担研究者・伊藤邦彦、井上和幸 (静岡県立大学) の機器の故障により遂行できず、最終的にこの分担研究者の計画離脱によって交付期間内の特定のタンパク質同定には至らなかった。

一方、メタボローム解析では自閉症者群と健常者群の血清を用いて、ガスクロマトグラフ質量分析を施行した。脂肪酸に特化した解析を進めるため、Bligh&Dyer 法によって血清中の総脂質を抽出し、メチルエステル化した脂質を GC 分析に供して定量した。初年度は自閉症者 50 例・健常者 52 例で行い、特定の脂肪酸組成に自閉症者特異的な低下を見出した。これに加えて、6 例ずつの検体で CE-TOF/MS による代謝産物のパスウェイマッピング解析を施行し、セロトニン機能に関連した代謝産物の有意な変化を得た。この結果を基に、次年度では 10 歳以下の児童の検体 30 例ずつでメタボロームの網羅的検索を行った。血清中においてリポタンパク質外に分散するメタボロームの状態を検証するため、血清を 1%ギ酸-アセトニトリル溶液で処理

し、中性脂肪を含まない分画を抽出し、さらに固相抽出を用いてリン脂質を除去した検体を解析に用いた。その結果、セロトニン関連代謝産物の差異は消失してしまったが、自閉症児童検体における遊離脂肪酸およびアシルカルニチンの濃度増大が顕著に認められた。以上の結果より、自閉症児童では血中のリポタンパク質およびその中に含まれる脂質の分解亢進が生じており、血清中に分散する遊離脂肪酸の濃度が増大しているものと考えられた。

期間中に臍帯血出生コホートをを用いての検証には至らなかったが、今後この研究で得られた結果を基に検証を続けていく。

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 2 件)

1. Iwata K, Izumo N, Matsuzaki H, et al. Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. Mol Autism. 3(1):11, 2012.
2. Tsuchiya KJ, Mori N, et al. Reliability and validity of autism diagnostic interview revised, Japanese version. J Autism Dev Disord.43:643-662, 2013

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

浜松医科大学・精神医学講座

<http://hmup.jpn.org/>

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

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

岩田 圭子 (IWATA KEIKO)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・特命助教

研究者番号：30415088

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 (TSUJII MASATSUGU)

中京大学・現代社会学部・教授

研究者番号：20257546