

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26590259

研究課題名(和文) 自閉症スペクトラム障害におけるメタボローム解析

研究課題名(英文) Metabolite Profiling of Autism Spectrum Disorders (ASD)

研究代表者

蒲生 啓司 (GAMOH, KEIJI)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授

研究者番号：90204817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで発見されていない自閉症特有の物質変化(代謝異常、酵素欠損等)を想定し、ASD(自閉症スペクトラム障害)のバイオマーカーを探索すべく、精密質量分析法を用いるメタボローム解析を行った。実験では、定型発達群と自閉症群の唾液に含まれるアミノ酸等低分子極性物質の質量分析を行い、2群間比較のためにSIEVE(多変量解析ソフト)による解析を行ったところ、有意差が0.001以下で自閉症群での存在量の多い低分子極性物質12種類が検索され、その中からセリンを特定することができた。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorders (ASD) are a behaviorally-defined group of neuro-development disorders characterized by impairments in communication and social interaction, and repetitive, overly-focused behaviors. While the syndrome has been found to be highly heritable, various theories have been investigated suggesting both genetic and environmental factors. Our basic interest was focused on the investigation of diagnosis markers of ASD based on an analytical chemical approach using a LC/MS method. Salivary samples were used for the exhaustive analysis of biological metabolites. In the present study, we demonstrated the metabolic exhaustive analysis of the salivary samples of both an ASD-diagnosed person and a physically unimpaired person using an electrospray ionization method of the LC/MS, in addition to the investigation of diagnosis markers of ASD based on a comparative analysis using multivariate statistics software, SIEVE. Serine was found as a diagnosis marker of ASD.

研究分野：分離化学

キーワード：発達障害 自閉症スペクトラム障害 低分子極性物質 アミノ酸 精密質量分析 多変量解析 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

自閉症やアスペルガー障害等を含む広汎性発達障害 (PDD) は、多遺伝子疾患と考えられているが、実質的に病因は不明である。例えば自閉症は、外側に現われる症状 (社会性・コミュニケーション・想像性の障害と、それらに基づく行動障害) をもって診断されるが、その発症原因には様々な可能性があると考えられる。そのため、自閉症は連続性を持つ広範な範囲にわたるものとして捉えられるようになり、自閉症スペクトラム障害 (以下、ASD) と呼ばれるに至っている。ASD や自閉症に対する研究は、教育支援と共に早期発見・早期診断・早期療育等の分野でも関心が高まっており、ASD の有病率が急増していると言われているが、病因が未解明であるが故に、化学的診断が確立されておらず早期発見が困難である。

生体内物質の観点からこれらの発達障害を見れば、定型発達児群と比較すると、自閉症児群では必須ミネラル・有害ミネラル共に有意に低値にある傾向を示したり、血漿中のオキシトシン濃度が有意に低いことが知られている。このことは、個々の生体内物質において、発達障害群と定型発達群との間に明確な「差異」が存在することを示しており、したがって発達障害の病因を知るためには、生体内物質の網羅的解析が必要であるという結論に至った。更にこの解析によって、発達障害群と定型発達群との物質的な差が明らかになれば、客観的な診断マーカー開発としての可能性が大きいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、LC/MS 法により唾液試料中の化学的成分を分析し、差異解析ソフトを用いる自閉症群と定型発達群の比較分析を行うことで、自閉症特有の診断マーカーを見出す、すなわち ASD の化学的診断を確立することを目的として、二つの内容を検討した：研究 I として、先行研究データの再解析を行うことと、研究 II として、LC/MS 法における低分子極性物質に着目した測定条件の検討を行うこととした。1) 研究 I として、これまで得られている分析結果を基に、差異解析の設定を変えることで、特定化される物質の再検索を行った。我々の先行研究データを用いて、統計解析ソフト SIEVE (Thermo Fisher 社製) により、自閉症群 12 検体と定型発達群 24 検体の比較解析を行った。定型発達群は全 50 検体のうちから、ランダムに 24 検体を選び、幾つかのパターンを設定して、2 群間の差異を統計的有意差と相対比によって表し、得られた測定精密質量からデータベース検索を行った。2) 研究 II として、新たに検索する対象を低分子極性物質に設定し、自閉症者と定型発達者の唾液サンプルを採取後、これまでと同様の前処理を行い、LC/MS 法により網羅的解析を行った。これまでの唾液サンプルとの違いは、被験者間の生活年齢

を一致させたことである。低分子極性物質の分析に適した分離カラムとして、SS-C18 (Imtakt 社製) を用いた。分析により得られたデータは、差異解析ソフト SIEVE により 2 群間の唾液試料中の全成分の比較解析を行い、差異物質を検出した。低分子極性物質の分離に適したカラムを選択したが、カテコールアミン類やアミノ酸等 15 成分 (ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミン、ドーパ、DOPAC、ホモバニリン酸、バニリルマンデル酸、メラトニン、メチオニン、グリシン、グリシルグリシン、グルタミン酸、フェニルアラニン、アラニン、りんご酸) を分析の対象とし、一斉分析が可能となる移動相条件を検討した。

3. 研究の方法

研究方法としては、唾液試料を採取後 LC/MS 法による分析を行い、分析データを SIEVE により解析する。研究 I では、先行研究のデータを基に、SIEVE における解析方法を検討することとし、研究 II では、LC/MS 法におけるカラムや移動相などの分析条件を検討し、更に新たに唾液試料を採取し分析することとした。

3-1 唾液試料のサンプリング

唾液は、血液や尿と比べて測定に必要な量を簡便に採取出来るばかりでなく、血液採取と異なり患者に対してストレスがかかり難い利点がある。自閉症群と定型発達者群とのメタボローム解析にあたり、定型発達群として公立小学校の児童・生徒から、自閉症群として特別支援学校の児童・生徒から唾液試料提供の協力を得た。

3-2 LC/MS 分析と統計解析ソフト SIEVE によるメタボローム解析方法

研究 I で焦点を当てた SIEVE は、独自のアルゴリズムにより保持時間のずれを補正する。また、保持時間と測定精密質量で定義されたフレームを作成し、同じフレームのピーク強度を比較し、横軸に統計的有意差、縦軸に存在比で定義された結果を視覚的に表示することができる。マスクロマトグラムでは、横軸が保持時間、縦軸が測定精密質量、高さがピーク強度の 3 次元により表されており、ここでフレームを作成する。保持時間と測定精密質量のフレーム幅を設定し、ピーク強度の下限値を決めることによって作成され、このフレーム毎に含まれるピーク強度の面積値を測定データ毎に抽出し、その値を用いて t 検定を行う。研究 I の SIEVE における解析の検討については、先行研究で用いた定型発達群の検体数を替えて、数パターンの解析を行うことで解析結果の実証性を高めることとした。解析データから候補物質を抽出する方法として、定型発達者の検体を全検体の分析データからランダムに選択し、3 つのパターンで行った。使用した統計解析ソフト SIEVE は、2 群間における差異解析のための LC/MS 専用ソフトであり、LC/MS によ

って得られる測定データを解析することにより、2 群間の差異のある化合物を検索するものである。高分解能 LC/MS と SIEVE を組み合わせ、自閉症群と定型発達者群の唾液サンプルを測定することで、自閉症群と定型発達者群の差異化合物を発見することができ、その差異化合物を推定することが可能になる。

3-3 高分解能 LC/MS による測定

今回使用した LC/MS は、分解能 100,000 のフーリエ変換型の高分解能質量分析装置である。イオン化法には ESI (エレクトロスプレーイオン化) を採用し、両極性 (positive 及び negative) 同時分析を行った。唾液中成分の代謝物は極性物質が多いことから、計測感度を高めるために移動相に酢酸を用いた。

3-4 統計解析

統計解析には 2 群間の差異解析ソフトである SIEVE を用いた。今回の解析ははじめに定型発達群と自閉症群で比較を行い、ここで有意差のある成分を見つけ、その後定型発達群及び自閉症群間の有意差をエクセルにて処理を行った。SIEVE では、有意差のある化合物が見つかった際、測定時に得た測定精密質量から化合物を推定することができるので、測定時に得た測定精密質量からデータベースにアクセスし、化合物の推定をすることができる。今回用いた LC/MS は、化合物の質量電荷比を小数点第 3 位までを確実に測定できるため、ここから化合物の組成を推測することができる。

4. 研究成果

4-1 研究 I における統計解析

本研究では、パターン毎の解析結果を基に t 検定を行った。質量数を調べていく中で、さらに保持時間の短い低分子極性物質に的を絞り、ピーク形状から ASD のバイオマーカーとなる候補物質を検出した。検出したものを表に示し、測定精密質量とその質量数を示す組成式を記した。また、表の中の測定精密質量の中でも、3 パターンの解析で同じ質量数を示したものが全部で 12 種類ヒットし、これらを ASD のバイオマーカーとなる候補物質とし、12 種類の測定精密質量からデータベース検索を行い、物質の選定を行った。更にそれらの物質から、明らかに生体内物質ではないものを排除し、測定精密質量とその質量数を示す物質名をまとめた。3 パターンでの解析結果から示された 12 種類の質量数を示す物質は、有力な ASD 診断マーカー候補物質であると考えられる。これらの候補物質を特定するためには、それらの標準品を入手し、その保持時間の挙動から検討していく必要がある。候補物質の中には、例えばウロソニン酸由来の物質が多く含まれており、ウロソニン酸はウイルスや毒素などに作用することが知られているため、それについても定性的な分析を基に検討していきたい。今回、自閉症の検体が少なかったため、今後更にサン

ル数を確保し分析することで、ASD 診断マーカー候補物質としての確実性が実証されるのではないかと考えられる。

4-2 研究 II における唾液試料の分析と統計解析

本研究では、唾液中の保持し難い低分子極性物質をターゲットにしているため、低分子極性物質の分離に適したカラムを選択した。低分子極性物質として、カテコールアミン類やアミノ酸、またその代謝物などを含めて標準試料 15 成分を分析対象とした。唾液試料の分析については、中学生以下の子どもから自閉症群と定型発達群を採取した。先行研究では、知能年齢に基づいて自閉症と定型発達の唾液試料を採取したが、今回は生活年齢を同一にするために、自閉症群と定型発達群を分析の対象とした。唾液試料は、夾雑物やタンパク質などを取除く処理を施した上で LC/MS により分析を行った。分析の結果から SIEVE による解析を行い、自閉症と定型発達の 2 群間に得られた測定精密質量に基づく差異物質 (15 群に分類) をまとめた。更に SIEVE 検索の結果からヒットしたアミノ酸 3 種 (グルタミン酸 Glu, セリン Ser, チロシン Tyr) と X (: 2-ケトグルタラミン酸) に加えて、存在量の多いフェニルアラニン Phe を選び、それらの個々の面積値に基づいて、検体毎の存在量の割合として、自閉症と定型発達に分けてグラフ化した (図 1. 及び図 2.)。

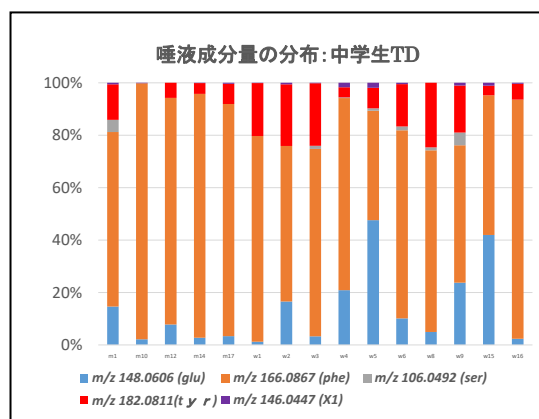


図 1. 唾液成分量の分布 (中学生定型発達)

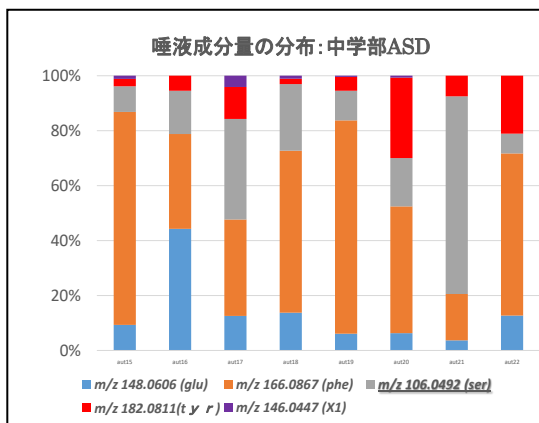


図 2. 唾液成分量の分布 (中学部自閉症)

この結果より、自閉症と定型発達との2群間の比較において、アミノ酸レベルでは、グルタミン酸、フェニルアラニンおよびチロシンで2群間の差は見られないが、自閉症においてセリンの存在量が多いことは注目に値する。グルタミン酸は、カテコールアミン類と同じく中枢神経系において重要な役割を果たしている神経伝達物質の一つである。またD-セリン（遊離型）は、西川らの統合失調症の研究の過程で、高濃度でラット脳に存在することが発見されている。統合失調症にはグルタミン酸仮説が報告されており、Kimらは、統合失調症患者の脳脊髄液中のグルタミン酸濃度が低下していることを見出した。一方、双極性障害の病態におけるD-セリンの関わりが示されている。これらの研究の背景を基に、上里らは、グルタミン酸/D-セリン系の異常と精神神経疾患の病態との関連を追究している。本研究における研究結果は、セリンの存在量と自閉症の関係を考え得る上で有用な知見を与えるものと思われる。

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. 蒲生啓司, 須貝一貴, 唾液中の代謝物濃度の比較分析に基づく自閉症スペクトラム障害のバイオマーカー, 高知大学学術研究報告, 査読無, **63**, 183-191 (2014).
2. 蒲生啓司, 日野真綸, 明石拓実, 唾液中代謝物濃度の比較分析に基づく自閉症スペクトラム障害 (ASD)の診断に関する研究, 高知大学学術研究報告, 査読無, **65**, 181-191 (2016).

〔学会発表〕（計 7 件）

1. 蒲生啓司, 西脇芳典, 唾液試料を用いる自閉症スペクトラム障害のメタボローム解析, 日本分析化学会第74回分析化学討論会, 2014年5月24-25日, 日本大学(郡山市).
2. K. GAMOH, Y. NISHIWAKI, Biomarkers of Autism Spectrum Disorders (ASD) Based on the Comparative Analysis of the Metabolite Concentrations in Saliva, The 20th International Mass Spectrometry Conference, Geneva International Conference Centre, 24-29th August (2014).
3. 日野真綸, 須貝一貴, 蒲生啓司, LC/MS法を用いた自閉症スペクトラム障害のバイオマーカーに関する研究, 2015年日本化学会中国四国支部大会, 2015年11月14-15日, 岡山大学.
4. 蒲生啓司, 自閉症スペクトラム障害のバイオマーカーに関する研究, 日本分析化学会第76回分析化学討論会, 2016年5月28-29日, 岐阜薬科大学・岐阜大学.
5. 明石拓実, 茂原美穂, 三井真一, 西脇芳典, 蒲生啓司, 発達障害モデルマウスを用いた社会行動変化と生体内物質濃度変化との関係

に関する研究, 2016年日本化学会中国四国支部大会, 2016年11月5-6日, 香川大学.

6. 蒲生啓司, 三井真一, Motopsin欠損マウスの血清アミノ酸分析, 日本質量分析学会第65回質量分析総合討論会, 2017年5月17-19日, つくば国際会議場.

7. 蒲生啓司, 明石拓実, 西脇芳典, 三井真一, Motopsin欠損マウスを用いた社会行動変化と血清中アミノ酸濃度との関係に関する研究, 日本分析化学会第77回分析化学討論会, 2017年5月27-28日, 龍谷大学.

6. 研究組織

(1)研究代表者

蒲生 啓司 (GAMOH KEIJI)

高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授

研究者番号：90204817

(4)研究協力者

三井 真一 (MITSUI SHINICHI)

群馬大学大学院保健学研究科・教授

寺田 信一 (TERADA SHINICHI)

高知大学教育研究部人文社会科学系教育学部門・教授