

## 自閉スペクトラム症の CD4<sup>+</sup> 細胞研究

牧之段学

奈良県立医科大学医学部 精神医学講座

### 【研究の背景】

一部の CD4<sup>+</sup>細胞 (Th17 細胞) 異常が ASD の病態形成に関与することは複数の研究報告によって示されている (Wang et al, Nature, 2017 など)。また、Th17 細胞が分泌する IL-17A が ASD の治療薬になる可能性も示唆されているが (Reed et al, Nature, 2020)、CD4<sup>+</sup>細胞機能と ASD 病態の間をつなぐ分子機序は明らかになっていない。

ASD の CD4<sup>+</sup>細胞関連の報告は ASD モデルマウスの解析結果に基づくものがほとんどであり、患者サンプルを解析した報告は散見されるものの、多くは ASD 者と TD 者との二群比較による結果報告である。

### 【目 的】

本研究では、ASD 者および TD 者由来の CD4<sup>+</sup>細胞を単離して解析し、ゲノムから精神症状までの多階層で得られる情報と併せて深層学習分析を行い、CD4<sup>+</sup>細胞関連情報に基づいた ASD の症状関連分子パスウェイおよび層別化分子マーカーを同定する。

### 【方 法】

定型発達者 20 名、高機能 ASD 者 40 名の PBMC および血漿を採取し、シングルセル ATACseq およびシングルセル RNAseq および血漿サイトカイン解析を行った。全例に MRI (T1/T2, DTI, NODDI, fMRI)、NIRS、ERP、眼球運動検査、巧緻運動検査、知能指数テスト (WAIS-III)、自閉特性評価 (AQ-J, SRS-2, ADOS-2)、ADHD 評価 (CAARS, ADHD-RS)、PTSD 評価 (IES-R)、成人感覚プロファイルテスト (AASP)、小児期体験評価 (ACEs, CATS)、社会経済的地位評価 (SES)、引きこもり評価 (HQ-25)、親子関係評価 (P-PASS)、意欲評価 (BPNSFS)、気質評価 (BIS/BAS)、自己価値観評価 (Singelis scale)、主観的社会的ランク評価 (Anderson's scale)、ロールシャッハテストを施行した。

### 【結 果】

まず、ヒト PBMCs のシングルセル ATACseq およびシングルセル RNAseq のフィージビリティを確立し、安定した結果が得られる条件を確立した。この過程で、死細胞が一定の割合以上であると解析に支障をきたすことが明らかになり、これまで取得済みサンプルの一部は使用できなくなった。定型発達者 20 名、高機能 ASD 者 40 名の PBMC を使用し、シングルセル ATACseq およびシングルセル RNAseq を施行し、現在解析中である。Cytometric Bead Assay により血漿サイトカイン解析 (IL-4, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) を行ったが、予想外に検出感度未満のサンプルが多く、解析困難であったため、IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  に関しては ELISA で再測定した。高機能 ASD 者では血漿 IFN- $\gamma$  値と Singelis scale の independent スコアとの間に正の相関を、血漿 IFN- $\gamma$  値と Singelis scale の interdependent スコアとの間に負の相関を認めたと、定型発達者ではこれらの相関は認めなかった (検出感度以上のサンプル定型発達者 20 名、高機能 ASD 者 27 名)。

## 【考 察】

ヒト PBMCs の死細胞率が高いとシングルセル ATACseq とシングルセル RNAseq へのフィージビリティが得られないことが明らかになった。その後 PBMCs の採取法を改善し、死細胞率を著減させることができたことから、本研究は以後の研究推進に大きな役割を果たした。

現在、ヒト PBMCs のシングルセル ATACseq とシングルセル RNAseq は安定して施行できるようになっており、本報告のメ  
切日までに間に合わなかったが、以後の研究推進は加速されると思われる。

血漿 INF- $\gamma$  量が ASD 者の文化的自己観の相互独立性と関連していたことは興味深い。INF- $\gamma$  は主に Th1 細胞、CD8T 細胞、NK 細胞で産生されるサイトカインであり、その異常はこれらの3種類の免疫細胞異常が原因であると考えられる。つまり、ASD 者の文化的自己観はこれらの免疫細胞によって規定される可能性が示されたといえ、今後に得られる PBMCs シングルセル解析結果の解釈に有用な結果が得られた。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

ASD 病態は依然として不明な点が多く、症状の個別性を説明できる生物学的知見は不十分である。本研究では、ASD 者で異常があるといわれる免疫細胞、とりわけ CD4 陽性細胞に着目して、PBMCs のシングルセル解析および血漿サイトカイン解析を行い、新規病態の追究を試みた。今後の解析結果が待たれるが、現在までに得られた血漿 INF  $\gamma$  量と文化的自己観の相関結果は、血漿成分によって ASD 者の個別性が説明できる可能性を示唆するものである。