

発達障害のメタボローム解析、エクソーム解析、臨床データの多変量解析での特徴や相関

中村和彦

弘前大学大学院 医学研究科 神経精神医学講座

【研究の背景】

自閉スペクトラム症 (ASD) や注意欠如・多動症 (ADHD) などの神経発達症群に対しては様々な生物学的研究が進んでおり、病態解明、関連遺伝子解析、バイオマーカー探索、画像研究などが行われている。我々も同様に共同研究を進め、例えば遊離脂肪酸の濃度と自閉症児の社会性障害との正の相関、脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質 FABP4 が自閉症児では濃度が低いこと、自閉症家系で認めた突然変異 (*de novo* 変異) を網羅的に解析し ATP2B2 などの新規原因遺伝子候補を報告した (*Brain Commun.* 2020, *EBioMedicine.* 2020, *Cell Rep.* 2018, *Nat Commun.* 2017)。そして、コミュニティーベースで5歳児発達健診を施行し、各種心理検査、臨床的診断ツールなどを行い、ASD、ADHD、発達性協調運動症、知的障害の有病率や併存の多さを明らかにした (*Molecular Autism.* 2020)。さらに、神経発達症群と睡眠障害と情緒障害の相関 (*Behav Sleep Med.* 2020)、神経発達症群の早期兆候 (*Autism Res.* 2021) を報告した。神経発達症群の診断のためのバイオマーカーは各種報告されているが、診断に有効なバイオマーカーは開発途上であり、臨床的診断ツールを用いた臨床診断の信頼性が現状では一番高い状況である。我々はそれを補完する、診断に有効なバイオマーカーを探索してきたが、対象群の範囲や年齢によって、感度が異なり、診断に有効なバイオマーカーは得られていない。ゆえにこの研究では網羅的なメタボローム解析を行うことによって、バイオマーカーの探索を行った。

【目的】

本研究では、1) ADOS などの自閉症診断ツール、注意欠如・多動症診断ツールなどの各種診断ツールを用いて臨床的診断が確立した5歳児における末梢血由来の血漿を対象とする。2) これらの血漿を質量分析でのメタボローム解析を施行する。そしてこれらのデータの多変量解析を行い、各神経発達症の特徴や各種神経発達症間の相関を明らかにする。これにより、診断に有効なバイオマーカーの探索を行う。

【方法】

健常群 66 例、ASD 群 118 例、ADHD 群 50 例を対象とする。各々の末梢血由来の血漿に対して 188 種の代謝物を標的とした解析キットを用いて、ターゲットメタボローム解析を行う (Absolute IDQ p180 kit, Biocrates 社)。有意差のある代謝物を取り上げ、MetaboAnalyst5.0 を用いてそれらが臨床診断に有効であるかどうかを検討する。また、パスウェイ解析を行うことで、生体内での生物学的意義を明らかにする。さらに、ASSQ (ASD スクリーニング)、ADHD-RS (ADHD スクリーニング)、AQ (自閉症スペクトラム指数) などのスコアとの多変量解析を行ない、各種症状との関連性を調べる。

【結果】

健常群と ASD 群で最も有意に変動のあった代謝物は A 因子であった。この代謝物のバイオマーカーとしての有効性を判定するために、ROC 曲線を解析したところ、カットオフ値 82.8 ng/ml で感度 77.2%、特異度 71.2% であった。また、パスウェイ解析を行なったところ、酸化ストレスや脂質代謝異常が示唆され、さらに A 因子は ASD 群の AQ の下位項目全てと有意に

正の相関関係にあることがわかった。

【考 察】

最も有意に変動のあった代謝物である A 因子は、酸化ストレスやミトコンドリアの膜障害で血中に放出されることが知られている。ASD 患者の一部では酸化ストレスやミトコンドリア障害が生じているとされていることから、病態と関連した結果であると推測する。酸化ストレスは神経伝達の効率低下、細胞の老化促進などを引き起こす。また、ミトコンドリアの膜障害は、酸化ストレスやアポトーシスの誘導、エネルギー産生能の低下などを誘発する。これらが引き起こされることによる神経伝達回路の障害が疾患に関連している可能性がある。また、A 因子の濃度が高いほど、AQ のスコアが高いという結果は、酸化ストレスやミトコンドリア障害の程度が強いほど症状も強いと推測でき、診断に有効な生物学的 trait マーカーかつ、症状の重症度の state マーカーにも利用できる可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究によって ASD や ADHD の診断とメタボローム解析のデータを複合して解析し特徴的な結果が得られた。ASD 患者では血中の A 因子濃度と AQ スコアが正の相関関係にあることから、症状の重症度を示す state マーカーの可能性が示唆された。さらに対象群を増やし年齢層を広げることで、この因子の trait マーカー、state マーカーとしての感度、特異度を明らかにすることで、臨床診断の補助としてのバイオマーカーとして貢献できる可能性がある。

【参考・引用文献】

1. Maekawa M, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto-Mitsuyama C, Hamazaki K, Balan S, Wada Y, Esaki K, Takagai S, Tsuchiya KJ, Nakamura K, Iwata Y, Nara T, Iwayama Y, Toyota T, Nozaki Y, Ohba H, Watanabe A, Hisano Y, Matsuoka S, Tsujii M, Mori N, Matsuzaki H, Yoshikawa T. A potential role of fatty acid binding protein 4 in the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Brain Commun.* 2020 Sep 10;2(2):fcaa145.
2. Usui N, Iwata K, Miyachi T, Takagai S, Wakusawa K, Nara T, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Kurita D, Kamenno Y, Wakuda T, Takebayashi K, Iwata Y, Fujioka T, Hirai T, Toyoshima M, Ohnishi T, Toyota T, Maekawa M, Yoshikawa T, Maekawa M, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N, Matsuzaki H. VLDL-specific increases of fatty acids in autism spectrum disorder correlate with social interaction. *EBioMedicine.* 2020 Aug;58:102917.
3. Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y, Fukai R, Miyatake S, Koshimizu E, Kushima I, Okada T, Morikawa M, Uno Y, Ishizuka K, Nakamura K, Tsujii M, Yoshikawa T, Toyota T, Okamoto N, Hiraki Y, Hashimoto R, Yasuda Y, Saitoh S, Ohashi K, Sakai Y, Ohga S, Hara T, Kato M, Nakamura K, Ito A, Seiwa C, Shirahata E, Osaka H, Matsumoto A, Takeshita S, Tohyama J, Saikusa T, Matsuishi T, Nakamura T, Tsuboi T, Kato T, Suzuki T, Saitsu H, Nakashima M, Mizuguchi T, Tanaka F, Mori N, Ozaki N, Matsumoto N. Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Rep.* 22(3):734-747. 2018
4. Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama KI, Hatayama M, Tomioka NH, Odagawa M, Kamiya A, Iwayama Y, Maekawa M, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsujii M, Yamada K, Yoshikawa T, Aruga J. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrfr2/SALM1*-deficient mice. *Nat Commun.* Jun 12;8:15800. 2017
5. Saito M, Hirota T, Sakamoto Y, Adachi M, Takahashi M, Osato-Kaneda A, Kim YS, Leventhal B, Shui A, Kato S, Nakamura K. Prevalence and cumulative incidence of autism spectrum disorders and the patterns of co-occurring neurodevelopmental disorders in a total population sample of 5-year-old children. *Mol Autism.* 2020 May 14;11(1):35.
6. McGinnis WR. Oxidative stress in autism. *Altern Ther Health Med.* 2005 Jan-Feb;11(1):19.
7. Filipek PA, Juranek J, Smith M, Mays LZ, Ramos ER, Bocian M, Masser-Frye D, Laulhere TM, Modahl C, Spence MA, Gargus JJ. Mitochondrial dysfunction in autistic patients with 15q inverted duplication. *Ann Neurol.* 2003 Jun;53(6):801-4. doi: 10.1002/ana.10596.