

S01-3. 血中ラジカル消去活性に着目した 自閉症エネルギー代謝異常の研究

松崎 秀夫

福井大学・子どものこころの発達研究センター

I. はじめに

自閉症は、コミュニケーションの障害、社会的相互作用の障害、限局した興味と行動、感覚の異常を臨床的特徴とする神経発達障害である (Lord et al., 2000; Dover and Le Couteur, 2007; Volkmar and Pauls, 2003)。これらの特徴は3歳までに顕現化し、通常、生涯にわたる経過をたどる。2013年のDSM (米国精神医学会・精神障害/疾患の診断・統計マニュアル)の改訂により、従前の自閉症・広汎性発達障害の概念はDSM-5で「自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: 以後 ASD と略) に呼称が統一された。この基準では「社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的障害」「限定された反復する様式の行動、興味、活動」をASDの二大徴候としている。ASDの理解と診療技法の開発は多くの研究者の関心をよび、他分野から参入する研究者が増え、生物学・医学の中でもASDは研究対象として最も注目されるトピックの一つとなっている。近年、全世界でASD有病率は2~3%とするのがコンセンサスであるが、依然としてASDの明確な病態機序は不明であり、生物学的エビデンスに基づく診療手段がない。ことにASDのバイオマーカー候補には未だ診断に資するレベルのものが存在しない (Walsh et al., 2011)。このため私は「子どものこころの発達研究センター」事業の発足時よりASDのバイオマーカー探索に心血を注いできた。今回のシンポジウムではASD特異的なエネルギー代謝異常に着目して我々が取り組んだ研究の成果を紹介する。

II. ASDの脂質代謝

我々の研究は、ある先駆的な臨床報告から始

まった。Smith-Lemli-Opitz 症候群は先天的にコレステロール合成酵素 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7) を欠損するか、もしくは機能不全となる疾患である。この患者は体内でのコレステロール合成が不十分であるが、その約半数がASDを合併する (Bukelis et al., 2007)。この報告以降、ASDの脂質代謝に関心が高まり、アスペルガー障害の成人男性では血中のコレステロール・中性脂肪がともに高い (Dziobek et al., 2007) との報告や、ASD 男児では血中中性脂肪が高く、HDL コレステロールが低いなどの所見が報告された (Kim et al., 2010)。しかし、いずれも対象者は30例未満と、検証したサイズが小さい。我々は5歳から25歳まで200例以上のASD高機能例の血清を収集して、ゲル濾過HPLC法により血中のコレステロール・中性脂肪濃度を測定した。年齢を合わせた定型発達者の血清を対照として比較した結果、全例未服薬の未成年ASD者の血清ではコレステロール・中性脂肪の双方ともに総量が有意に減少していた。血中の脂質はリポタンパク質とよばれる粒子の中に抱合された状態で血中に分散しており、粒子の大きさによってカイロミクロン、VLDL, LDL, HDLの分画に分類される。そこで各分画別に濃度を測定したところ、ASDではVLDL分画濃度がコレステロール・中性脂肪の双方で著明に減少していた。とりわけ中性脂肪VLDL分画の差異が最も大きいため、年齢との相関を調べたところ、定型発達者の中性脂肪VLDL分画は年齢に関係なくほぼ一定だが、ASD者の中性脂肪VLDL分画濃度は5歳から8歳までの間で最も少なく、加齢とともに増大した。測定に用いた血清中の脂質粒子数を計測したところ、VLDL粒子のみASD者に有意な減少が認められた (投稿中)。Corbettらは質量分析法を用いて、4歳から6歳までのASD児血清と定型発達児血清の中のタンパク質を網羅的に捉えるプロテオーム解析を行い、ASD児に特異的なアポリポタンパク質B-100 (ApoB)濃度の減少、C1q, FHR1, fibronectin 1濃度の増大を見出している (Corbett et al., 2007)。

そこで我々が脂質測定に用いた血清サンプル中のアポリポタンパク質サブタイプの全種類をサスペンションアレイで測定したところ、ASD者でApoBのみ血中濃度の減少が再確認できた。ApoBはVLDLとLDLに発現するがHDLには発現しない。また、ASD者のLDL分画は健常者と有意差がないため、以上を総合するとASD者でのVLDL分画低下によってApoBの血中濃度が二次的に減少した可能性が考えられる。こうした点からASD者でのVLDL分画低下のデータは、現在我々が得ている知見の中でASD早期診断マーカー候補として最も有望で、我々は既に米国特許を取得した（US PATENT 8518659）。ただ、このVLDL分画低下所見は、ASD疑い例のスクリーニングには有用だが、その他の疾患を除外できる特異性の有無については不明である。実用化には血液を用いたコホートによるValidation評価が必要である。

Ⅲ. ASDの脂肪酸代謝

ASD者の血中VLDL分画低下の原因は何か。VLDLは血中の脂肪酸をもとに肝臓で合成されるため、今回の研究で用いた血清中の肝機能の指標であるGOT/GPT/ γ GTPを測定したが、ASDと定型発達者の間に有意差はなかった。そこで、脂肪酸の血中代謝変化に関心を移して検討を行った。ASDの血中脂肪酸代謝については、一般にはEPA・DHAをはじめとする ω 3脂肪酸の低下が報告されてきた（Vancassel et al., 2001；Wiest et al., 2009）。末梢赤血球中の精査でもASD者でDHA低下が指摘されている（Bell et al., 2004）。中枢神経の発達においてはDHAおよびEPAが密接に関連すると考えられている（Kidd, 2007）。このことから発達障害にDHA・EPAなどの ω 3脂肪酸の臨床効果が期待された。しかし、最初の臨床報告では多動を若干抑制するにとどまり（Amminger et al., 2007）、その後の検討でも ω 3脂肪酸単独の経口投与による治療効果は認められていない（Politi et al., 2008）。SLOSにおいても、これまでコレステロールの末梢投与による臨床試

験が試みられた。しかし、いずれも有用な結果は得られておらず、末梢から投与したコレステロールがBBBを通過しないためだろうと推測されている（Porter, 2008）。

我々はこの観点から、小学生を対象に、ASD児童30例・定型発達児童30例から血漿を収集して、CE/LC-TOFMSによる血漿中メタボローム解析を行った。1200の標的代謝産物を測定したところ、まず258の代謝産物が検出され、うち83種の代謝産物でASD児群に有意な変化が認められた。さらに、この83種のp値にBonferroni補正を行い、 $p < 0.05$ で有意差の大きい代謝産物を選別したところ、上位群には脂質関連分子が多数を占めた。具体的には、長鎖不飽和アシルカルニチン群全ての有意な増大、リン脂質異化経路の中間代謝物であるBetaine, DMG, ケトン体である3-hydroxybutyric acid (3-HB), O-acetylcarnitine (ALCAR)の増大が認められた。血漿中脂質測定ではASD児群に中性脂肪VLDL分画の減少を再確認できたので、83種の代謝産物と中性脂肪VLDL分画との相関を調べたところ、20種の代謝産物濃度が有意に相関していた（Spearman, $p < 0.05$ ）。そのうちリポタンパク質外にある遊離脂肪酸12種、アシルカルニチン3種、2-hydroxybutyric acid (2-HB), 3-HB, ALCARはASD者で増大したが、一方でAla, LoganinはASD者で減少していた（投稿中）。

アシルカルニチンは、ミトコンドリア内の脂肪酸 β 酸化の際に産生され、虚血や酸欠の状態では血中濃度の上昇が報告されているため、脂質の分解・代謝が亢進している証拠と考えられる。さらにBetaine, DMG, ALCAR, 3-HBの増大も脂質の分解を示唆する所見といえる。ASD血漿中の全脂肪酸組成では ω 6脂肪酸が有意に減少していたが、リポタンパク質外にある遊離脂肪酸では全ての飽和脂肪酸が増加に転じていた。血漿中の脂肪酸は、血漿中の遊離脂肪酸以外にリポタンパク質中のリン脂質・中性脂肪を構成する脂肪酸が含まれる。飽和脂肪酸は食事由来の脂質に最も多く含まれる脂肪酸であるた

め、血漿中の全脂肪酸で $\omega 6$ 脂肪酸が減る一方で血中遊離脂肪酸が増加する所見は、食事の影響を受けやすいVLDL脂質の分解によって脂質を構成する脂肪酸が血漿内に放出されていることを示唆すると考えられた。先行研究で示された $\omega 3$ 脂肪酸の低下でなく $\omega 6$ 脂肪酸の低下が認められた点は、食文化の違いが影響しているかもしれない。以上を総合すると、ASD者の末梢血中ではVLDL脂質分画の特異的な分解が生じているものと推定された。

IV. ASDのミトコンドリア機能

脂肪酸はミトコンドリアでATP合成を進めるうえでの材料となる。また、中性脂肪は体内で消費されなかったエネルギーの蓄積源としての役割を持っている。このため、これまで示してきたASDでの特異的な脂質・脂肪酸代謝は細胞のエネルギー生成にかかわるミトコンドリアの機能異常との関連が示唆される。近年のASD研究では末梢血中グルタチオンの低下がすでに複数の研究報告で共通している (James et al., 2004; Chauhan and Chauhan, 2006; James et al., 2009)。GiuliviらはASD者のミトコンドリア機能に注目し、カリフォルニア州のASD児364人と年齢・性別・人種などを合わせた健常児289人の中から10人ずつを選んでリンパ球を採取した。ミトコンドリアの機能とmtDNAを比較した結果、ASDでNADH酸化能は有意に低く、血漿中のピルビン酸濃度は有意に高かった (Giulivi et al., 2010)。さらにミトコンドリアの過酸化水素生産量も高く、遺伝子の過剰複製が半数に認められた (Giulivi et al., 2010)。また、ASD者の脳内では、ミトコンドリアの電子伝達系の異常により酸化ストレスが亢進している (Chauhan et al., 2011)。これらの結果はASDにおけるミトコンドリアの機能異常を示唆している。また、Fryeらは213人のASD児のうち17%に特定のアシルカルニチンの増大とグルタチオンの減少が認められることを示し、ASD者腸内細菌で産生が増大するプロピオン酸を与えたラットでも似通っ

たパターンが得られることから、特異的なアシルカルニチンのパターンはASDで腸内細菌がもたらすミトコンドリア機能異常のマーカーになると述べている (Frye et al., 2013)。アシルカルニチンは通常ミトコンドリア内に局在するが、虚血や酸欠状態などで血中濃度が上昇する (Bruder and Raff, 2010)。組織でのエネルギーの欠乏に伴い、脂肪酸の β 酸化が進むことで増大したアシルカルニチンが血中に漏出するためである。同様に、ASD者におけるアシルカルニチンの増大はミトコンドリアの機能異常によって脂肪酸代謝が亢進するためにおこる作用と考えられる。

V. ASDのフリーラジカル消去活性測定

ASDに認められる酸化ストレス・ミトコンドリア機能異常の原因あるいは中間表現型が何なのか明らかにできれば、診療標的として有望と考えられる。そこで、まず我々は先に検討したASD児童と定型発達児童から採取した血清の抗酸化活性・ミトコンドリア機能に関連した分子を質量分析にかけ、クラスタリング解析を行った。その結果、これまでに報告されている血中グルタチオンの減少が確認でき、その他の代謝プロファイルからASD児童はいくつかのサブグループに分類された。遺伝的要因による変化であれば細胞レベルで確認可能であるため、血清採取時に同時に採ったリンパ球を芽球化して、細胞外フラックスアナライザーなどでグルタチオンの減少につながる原因分子の検索を詳細に行ったが、結果としてASD児童でのリンパ芽球を使用した検討では、グルタチオン減少を解釈できる特徴的な変化は認められなかった。

代謝産物からのアプローチが困難になったことを契機に、我々は体内の酸化ストレスで中心的な役割を果たしているフリーラジカルの末梢血中動態の確認を進めた。フリーラジカルの直接的な測定は技術的に困難であるため、これまでASDのフリーラジカル動態は明らかにされていなかった。そこでASDのための新しい診断ツールとして、複数のフリーラジカル消去活

性 (MULTIS) 測定値の可能性を検討した。この研究では、宮城県立こども病院 (仙台市) に通院する23人の未就学 ASD 児童 (2~6歳) および年齢を合わせた34人の定型発達児童からインフォームドアセントを得て末梢血を採取した。末梢血から分離した血清を用いて、スピントラップ法により5つの活性酸素種、すなわち、ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカル、スーパーオキシド、一重項酸素に対する消去活性を測定した結果、ASD 群において、血中のヒドロキシラジカル消去活性が健常群に比して有意に低下した。その一方で、アルコキシラジカル、スーパーオキシドに対する消去活性は ASD 群で有意に増加した。ペルオキシラジカル、一重項酸素では差異は認められなかった (投稿中)。

有意差を認めた3項目を用いて ASD 判定に有用かどうかについて ROC 解析を行ったところ、陽性尤度比は157.6であった。この数値は VLDL 脂質分画評価による数値をも上回るもので、我々はすでに特許出願を終えた (特願2016-170479)。MULTIS 法による血清中のフリーラジカル消去活性の測定は、ASD 児童の診断のための非常に強力な非行動的ツールとなる可能性がある。今後はこの所見の精度の確認を行い、これまでに示した脂質・脂肪酸代謝特性とともに ASD の新たな診療標的となり得るかどうかの検討を進めていきたい。

COI 開示

本稿の執筆に関して開示すべき利益相反 (Conflict of Interest, COI) はありません。

文 献

- Amminger GP, Berger GE, Schäfer MR et al. (2007): Omega-3 fatty acids supplementation in children with autism: A double-blind randomized, placebo-controlled pilot study. *Biol Psychiatry*, **61**, 551-553. doi:10.1016/j.biopsych.2006.05.007.
- Bell JG, MacKinlay EE, Dick JR et al. (2004): Essential fatty acids and phospholipase A2 in autistic spectrum disorders. *Prostaglandins Leukot Essential Fatty Acids*, **71**, 201-204. doi:10.1016/j.plefa.2004.03.008.
- Bruder ED & Raff H (2010): Cardiac and plasma lipid profiles in response to acute hypoxia in neonatal and young adult rats. *Lipids Health Dis*, **9**, 3. doi:10.1186/1476-511X-9-3.
- Bukelis I, Porter FD, Zimmerman AW et al. (2007): Tierney E. Smith-Lemli-Opitz syndrome and autism spectrum disorder. *Am J Psychiatry*, **164**, 1655-1661. doi:10.1176/appi.ajp.2007.07020315.
- Chauhan A & Chauhan V (2006): Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*, **13**, 171-181. doi:10.1016/j.pathophys.2006.05.007.
- Chauhan A, Gu F, Essa MM et al. (2011): Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J Neurochem*, **117**, 209-220. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07189.x.
- Corbett BA, Kantor AB, Schulman H et al. (2007): A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins. *Mol Psychiatry*, **12**, 292-306. doi:10.1038/sj.mp.4001943.
- Dover CJ & Le Couteur A (2007): How to diagnose autism. *Arch Dis Child*, **92**, 540-545. doi:10.1136/adc.2005.086280.
- Dziobek I, Gold SM, Wolf OT et al. (2007): Hypercholesterolemia in Asperger syndrome: Independence from lifestyle, obsessive-compulsive behavior, and social anxiety. *Psychiatry Res*, **149**(1-3), 321-324. doi:10.1016/j.psychres.2006.02.003.
- Frye RE, Melnyk S & Macfabe DF (2013): Unique acyl-carnitine profiles are potential biomarkers for acquired mitochondrial disease in autism spectrum disorder. *Transl Psychiatry*, **3**(1), e220. doi:10.1038/tp.2012.143.
- Giulivi C, Zhang Y-F, Omanska-Klusek A et al. (2010): Mitochondrial dysfunction in autism. *JAMA*, **304**(21), 2389-2396.
- James SJ, Cutler P, Melnyk S et al. (2004): Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children

- with autism 1, 2. *Am J Clin Nutr*, **80**, 1611-1617.
- James SJ, Rose S, Melnyk S et al. (2009): Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism. *FASEB J*, **23**, 2374-2383. doi:10.1096/fj.08-128926.
- Kidd PM (2007): Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: Clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev*, **12**, 207-227. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18072818>.
- Kim E-K, Neggers YH, Shin C-S et al. (2010): Alterations in lipid profile of autistic boys: A case control study. *Nutr Res*, **30**, 255-260. doi:10.1016/j.nutres.2010.04.002.
- Lord C, Cook EH, Leventhal BL et al. (2000): Autism spectrum disorders. *Neuron*, **28**, 355-363.
- Politi P, Cena H, Comelli M et al. (2008): Behavioral effects of omega-3 fatty acid supplementation in young adults with severe autism: An open label study. *Arch Med Res*, **39**, 682-685. doi:10.1016/j.arcmed.2008.06.005.
- Porter FD (2008): Smith-Lemli-Opitz syndrome: Pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet*, **16**, 535-541. doi:10.1038/ejhg.2008.10.
- Vancassel S, Durand G, Barthélémy C et al. (2001): Plasma fatty acid levels in autistic children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **65**(1), 1-7. doi:10.1054/plef.2001.0281.
- Volkmar FR & Pauls D (2003): Autism. *Lancet*, **362**(9390), 1133-1141. doi:10.1016/S0140-6736(03)14471-6.
- Walsh P, Elsabbagh M, Bolton P et al. (2011): Singh I. In search of biomarkers for autism: Scientific, social and ethical challenges. *Nat Rev Neurosci*, **12**, 603-612. doi:10.1038/nrn3113.
- Wiest MM, German JB, Harvey DJ et al. (2009): Plasma fatty acid profiles in autism: A case-control study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **80**, 221-227. doi:10.1016/j.plefa.2009.01.007.

S01-4. mTOR 阻害薬を用いた ASD の薬物治療

水口 雅

東京大学大学院医学系研究科発達医科学

I. 自閉症と mTOR 情報伝達系

自閉症は「社会的コミュニケーション及び相互関係における持続的障害」と「限定された反復する様式の行動、興味、活動」を主徴とする発達障害である。症状は発達の早期に出現し、社会や職業その他の機能に重大な障害をもたらす。小児神経領域で認められる臨床的特徴として、てんかんの合併頻度が高く (Hara, 2007), 乳幼児期に大頭を呈する例が多い (Fukumoto et al., 2011)。後者はシナプス形成期の脳の過成長を反映した症状と考えられる。

自閉症では遺伝要因の関与が強く、同胞における再現率は 2 ~ 8 %, 一卵性双生児における一致率は 90% と高い (Bailey et al., 1995)。男に多く、男女比は 3 ~ 4 : 1 である。自閉症患者の 80% は基礎疾患のない非症候性自閉症, 20% は既知の疾患に伴う症候性自閉症である (Benvenuto et al, 2009)。後者の中で最も多いのは脆弱 X 症候群, 次いで結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex, 以下 TSC), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog/mutated in multiple advanced cancer 1) 遺伝子変異の順である (Rosti et al., 2014)。興味深いことに、これら 3 疾患の病因はいずれも mammalian target of rapamycin (mTOR) 情報伝達系の遺伝子変異である (図 1)。また非症候性自閉症の原因遺伝子のひとつである *neuroligin* も mTOR 系の下流で翻訳調節を受ける (Gkogkas et al., 2014)。このように mTOR 系は自閉症との関わりがきわめて深い。

mTOR 系は上流でインスリンその他の成長因子に反応, 栄養やエネルギーのレベルを検知し, 下流で細胞の成長や増殖, 細胞骨格形成, 栄養の取り込みを促進し, 細胞死を抑制する働きを有し, 形態形成, 代謝, 免疫, 脳機能に重