(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-512113
(P2025-512113A)
(43)公表日　令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6851(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6851	Ｚ	２Ｇ０４１
Ｃ１２Ｑ	*1/686(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/686	Ｚ	２Ｇ０４５
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	Ｚ	４Ｂ０２９
Ｃ１２Ｑ	*1/06 (2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/06		４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｍ	*1/34 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/34	Ｚ	４Ｃ０８４

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全66頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-571973(P2024-571973)
(86)(22)出願日　令和5年2月17日(2023.2.17)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月21日(2024.10.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/062882
(87)国際公開番号　WO2023/159225
(87)国際公開日　令和5年8月24日(2023.8.24)
(31)優先権主張番号　63/311,757
(32)優先日　令和4年2月18日(2022.2.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　524309878
ピトン セラピューティクス，インコーポレーテッド
ＰＩＴＯＮ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣＳ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４７２、ウォータータウン、プレザント ストリート ３１３
３１３ Ｐｌｅａｓａｎｔ Ｓｔｒｅｅｔ，Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ ０２４７２，Ｕ．Ｓ．Ａ．
(74)代理人　110003971
弁理士法人葛和国際特許事務所
(72)発明者　ミルズ，ロバート ハーディ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　自閉スペクトラム症の微生物シグネチャー

(57)【要約】
本開示の側面は、自閉スペクトラム症（ＡＳＤ）の１つ以上の症状を有する対象もしくはＡＳＤを発症するリスクがある対象を診断および／または処置するための方法ならびに組成物に関する。いくつかの態様において、方法は、対象におけるコリスミ酸および／もしくはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを決定ならびに／または調節することを含む。いくつかの態様において、方法は、対象における微生物特徴量（例えばSarcina細菌）のレベルを決定および／または調節することを含む。いくつかの態様において、方法は、対象の胃腸管におけるプロトンフラックスのレベルを決定および／または調節することを含む。
【選択図】　図１１

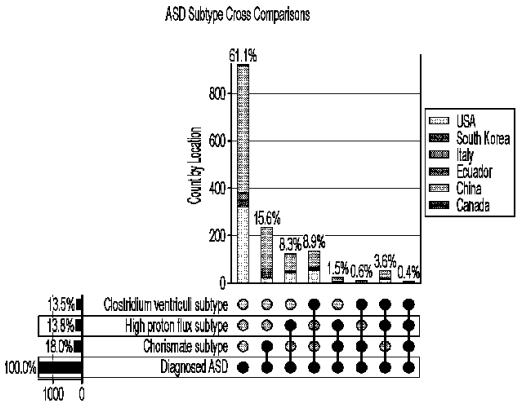


FIG. 11

【特許請求の範囲】
【請求項１】
方法が、対象から得られたサンプル中のコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを決定することを含む、自閉症の１つ以上の症状を有する対象の診断を支援する方法。
【請求項２】
コリスミ酸代謝経路内の分子がコリスミ酸の上流または下流代謝物である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
コリスミ酸の下流代謝物がトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、またはそれらの代謝物である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
コリスミ酸の下流代謝物がトリプトファンの下流代謝物であり、ここで、トリプトファンの下流代謝物がセロトニン、メラトニン、キヌレニン、および／またはインドールである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
コリスミ酸の下流代謝物が葉酸またはその誘導体である、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
コリスミ酸の下流代謝物がシデロホアである、請求項２に記載の方法。
【請求項７】
シデロホアがエンテロバクチンである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
コリスミ酸の下流代謝物がユビキノールまたはメナキノールである、請求項２に記載の方法。
【請求項９】
サンプルが糞便サンプルである、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
サンプルが胃腸サンプルである、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
胃腸サンプルが、胃吸引物、生検、腸液、内視鏡ブラシ、および／またはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションサンプルである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
サンプルが、唾液、口腔内、鼻腔内、尿、血清、または脳脊髄液サンプルである、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを決定することが、サンプル中に存在する１つ以上の核酸の１つ以上の部分を増幅および／またはシーケンシングすることを含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
１つ以上の核酸の１つ以上の部分が、サンプル中に存在する１６ＳリボソームＲＮＡの１つ以上の領域を含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
サンプルの１つ以上の核酸の１つ以上の部分を増幅および／またはシーケンシングすることが、サンプルの少なくとも一部に対して定量的ＰＣＲを実施することを含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
サンプルの１つ以上の核酸の１つ以上の部分を増幅および／またはシーケンシングすることが、サンプルの少なくとも一部に対してショットガンメタゲノムシーケンシングを実施することを含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１７】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを決定することが、ＨＰＬＣ、ＬＣ－ＭＳ、ＧＣ－ＭＳ、および／またはＭＡＬＤＩ－ＴＯＦを使用することを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルが閾値より高いまたは低い場合に、対象がＡＳＤを有するまたはＡＳＤを発症するリスクがあることを決定することをさらに含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９】

ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために、対象におけるコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することをさらに含む、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸、コリスミ酸（chorismic acid）、および／またはそのどちらかの塩もしくはエステルを含む組成物を対象に投与することを含む、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸プロドラッグを含む組成物を対象に投与することを含む、請求項１９～２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸代謝物を含む組成物を対象に投与することを含む、請求項１９～２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２３】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素の発現および／または活性を調節する組成物を対象に投与することを含む、請求項１９～２２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

組成物が、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素のアゴニスト、アンタゴニスト、活性化因子、および／または阻害剤を含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

１つ以上の酵素がコリスミ酸リアーゼを含む、請求項２３～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸のレベルを調節することを含む、請求項１９～２５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２７】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することを含む、請求項１９～２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２８】

方法が、対象におけるコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することを含む、ＡＳＤの１つ以上の症状を有するかまたはＡＳＤを発症するリスクがある対象を処置する方法。

【請求項２９】

レベルが対象の腸で調節される、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】

コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸、コリスミ酸（chorismic acid）、コリスミ酸プロドラッグおよび／または

コリスミ酸代謝物を含む組成物を対象に投与することを含む、請求項２８～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素の発現および／または活性を調節する組成物を対象に投与することを含む、請求項２８～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
１つ以上の酵素がコリスミ酸分岐点酵素を含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
コリスミ酸分岐点酵素がコリスミ酸リアーゼを含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
組成物が、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素のアゴニスト、アンタゴニスト、活性化因子、および／または阻害剤を含む、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することが、対象の胃腸管においてコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子を産生する微生物の量を調節する組成物を対象に投与することを含む、請求項２８～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
対象のＡＳＤステータスを予測および／または診断するために、対象から得られたサンプル中の１つ以上の微生物特徴量の存在量を決定することを含む方法。
【請求項３７】
１つ以上の微生物特徴量がSarcina細菌を含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
１つ以上の微生物特徴量がClostridium ventriculiを含む、請求項３６～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
１つ以上の微生物特徴量の存在量が閾値よりも高い場合に、対象がＡＳＤを有するまたは発症するリスクがあることを決定することをさらに含む、請求項３６～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために、対象における１つ以上の微生物特徴量の存在量を低減することをさらに含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
１つ以上の微生物特徴量の存在量を低減することが、１つ以上の抗生物質および／またはファージ治療を対象に投与することを含む、請求項３６～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
１つ以上の微生物特徴量の存在量が閾値よりも低い場合に、対象がＡＳＤを有するまたは発症するリスクがあることを決定することをさらに含む、請求項３６～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために、対象における１つ以上の微生物特徴量の存在量を増大させることをさらに含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
１つ以上の微生物特徴量の存在量を増大させることが、１つ以上のプレバイオティクスおよび／またはプロバイオティクスを対象に投与することを含む、請求項４３に記載の方

法。
【請求項４５】
方法が、対象から得られたサンプルから対象の胃腸管におけるプロトン流入のレベルを決定することを含む、自閉症の１つ以上の症状を有する対象の診断を支援する方法。
【請求項４６】
プロトン流入のレベルが閾値より高い場合に、対象がＡＳＤを有するまたは発症するリスクがあることを決定することをさらに含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために、対象の胃腸ｐＨを調節することをさらに含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
方法が、対象から得られたサンプル中の糞便マイクロバイオームの組成または１つ以上の微生物特徴量の存在を決定することを含む、ＡＳＤを有する対象のサブタイプを同定するための方法。
【請求項４９】
対象から得られたサンプル中の１つ以上の微生物特徴量を決定することと、治療的介入についての医学的意思決定のためのバイオマーカーとして１つ以上の微生物特徴量を使用することと、を含む方法。
【請求項５０】
対象において、微生物特徴量を、ＡＳＤのリスクもしくはリスクレベル、および／またはＡＳＤの処置の候補であることもしくは候補でないことと関連させるために、機械学習モデルを訓練することを含む方法。
【請求項５１】
少なくとも１つのプロセッサによって実行されるときに、少なくとも１つのプロセッサが前述の方法のいずれか１つまたはいずれかの組み合わせを行うことを引き起こす、実行可能な命令をその上にコードした非一時的コンピュータ可読記憶媒体。
【請求項５２】
少なくとも１つのプロセッサと、少なくとも１つのプロセッサによって実行されるときに、少なくとも１つのプロセッサが前述の方法のいずれか１つまたはいずれかの組み合わせを行うことを引き起こす実行可能な命令をその上にコードした少なくとも１つの非一時的コンピュータ可読記憶媒体と、を含む装置。
【請求項５３】
対象から得られたサンプル中の１つ以上の分子または微生物特徴量の存在量を決定することと、
ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために、１つ以上の分子または微生物特徴量の非存在および／または低い存在量に基づいて１つ以上の治療を投与することと、
を含む、方法。
【請求項５４】
自閉症の併存疾患および表現型を緩和するために、１つ以上の微生物特徴量の非存在および／または低い存在量に基づいて、１つ以上のプロバイオティクスおよび／またはプレバイオティクスを投与することを含む方法。
【請求項５５】
対象におけるＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためまたはＡＳＤを発症する対象のリスクを低減するために、１つ以上の微生物特徴量の存在および／または過剰に基づいて１つ以上の微生物特徴量を標的化することを含む方法。
【請求項５６】
１つ以上の微生物特徴量を標的化することが、１つ以上の抗生物質および／またはファージ治療を対象に投与することを含む、請求項５６に記載の方法。

【請求項５７】
対象におけるＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するために、１つ以上の微生物特徴量に関連する１つ以上の微生物分子を標的化することを含む方法。
【請求項５８】
１つ以上の分子が１つ以上の毒素を含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
対象が、ＡＳＤの１つ以上の徴候もしくは症状を有するか、またはＡＳＤを発症するリスクがある、請求項１～５８のいずれかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０２２年２月１８日出願の「Microbial Signatures of Autism Spectrum Disorder」と題する米国仮特許出願第６３／３１１，７５７号の米国特許法第１１９条（ｅ）に基づく利益を主張し、これは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
自閉スペクトラム症（ＡＳＤ）は、行動、発話、および社会性の障害のスペクトラムによって特徴付けられる神経発達障害の群を表す。最近の報告は、米国で診断が４４人中１人の小児（２．３％）に増大したことを示唆しており、ＡＳＤを有病率が増大している障害として強調している。自閉症の正確な病因は不明であるが、多因子性であると考えられている。
【０００３】
ヒト腸内微生物叢は、ＡＳＤなどの神経学的状態を包含する広範囲の疾患において重要な因子として浮上してきた。機構的には、微生物がＡＳＤにどのように関わり得るかについては複数の仮説があり、母体免疫活性化モデル、セロトニンまたはＧＡＢＡなどの神経伝達物質の産生、迷走神経シグナル伝達の調節、および４－エチルフェニル硫酸または短鎖脂肪酸などの分子の産生を包含する。しかしながら、いずれにせよ、これらのどのメカニズムがＡＳＤの発症を駆動するのかは不明確なままである。従って、ＡＳＤを診断および／または処置するための改善された方法および組成物が必要とされている。
【発明の概要】
【０００４】
いくつかの態様において、本発明の側面は、対象における自閉スペクトラム症（ＡＳＤ）に関連する１つ以上の分子および／または微生物特徴量(microbial features)を同定するためのシステムおよび方法に関する。いくつかの態様において、本発明の側面は、対象におけるＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を処置するためのまたは対象がＡＳＤを発症するリスクを低減するための方法および組成物に関する。
【０００５】
ＡＳＤを有する個体の腸マイクロバイオームをプロファイリングした研究の体系的メタ分析は、いくつかの側面において、ＡＳＤを有する個体の腸マイクロバイオームによって表される、共通に差次的に存在する(differentially abundant)代謝経路が、共通の前駆体分子であるコリスミ酸(chorismate)に関係することを明らかにした。
【０００６】
従って、いくつかの態様において、ＡＳＤを処置するための方法および組成物は、コリスミ酸に関係する経路（例えば、コリスミ酸代謝経路）内の分子を調節することを含む。いくつかの態様において、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する対象を処置する方法は、対象におけるコリスミ酸レベルを調節することを含む。いくつかの態様において、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する

対象を処置する方法は、対象におけるコリスミ酸代謝経路における１つ以上の分子のレベルを調節することを含む。いくつかの態様において、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する対象を処置する方法は、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素もしくは代謝物（例えば、表１または表２に列挙される分子の非限定的な例の１つ以上）の活性またはレベルを調節することを含む。いくつかの態様において、調節することは、酵素のレベルおよび／または活性を増大させること（例えば、アゴニストを投与すること）を含む。いくつかの態様において、調節することは、酵素のレベルおよび／または活性を減少させること（例えば、アンタゴニストを投与すること）を含む。いくつかの態様において、コリスミ酸ムターゼが調節される。いくつかの態様において、コリスミ酸リアーゼが調節される（例えば阻害される）。いくつかの態様において、イソコリスミ酸シンターゼが調節される（例えば阻害される）。いくつかの態様において、アミノデオキシコリスミ酸シンターゼ（ＰＡＢＡシンターゼとしてもまた公知）が調節される（例えば阻害される）。いくつかの態様において、アントラニル酸シンターゼが調節される。

【０００７】

いくつかの態様において、調節剤（例えば、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素もしくは他の分子のアゴニストまたはアンタゴニスト）が、１つ以上の症状もしくはＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する対象にまたは自閉症を発症するリスクがある対象に投与される。

【０００８】

いくつかの態様において、コリスミ酸またはコリスミ酸に関係する経路（例えばコリスミ酸代謝経路）内の１つ以上の分子のレベルは、対象の腸において（例えば対象の微生物叢内で）調節される。いくつかの態様において、コリスミ酸またはコリスミ酸に関係する経路（例えばコリスミ酸代謝経路）内の１つ以上の分子のレベルは、対象の血液または組織（例えば、脳、結腸、および／もしくは小腸）において調節される。

【０００９】

いくつかの態様において、コリスミ酸またはコリスミ酸に関係する経路（例えばコリスミ酸代謝経路）内の１つ以上の分子のレベルは、コリスミ酸代謝経路における（例えば、対象の腸の微生物内のまたは対象の血液もしくは組織内の）１つ以上の酵素の発現および／または活性を調節する組成物を投与することによって調節される。いくつかの態様において、組成物は、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素の１つ以上のアゴニストおよび／またはアンタゴニストを含む。

【００１０】

いくつかの態様において、コリスミ酸またはコリスミ酸に関係する経路（例えばコリスミ酸代謝経路）内の１つ以上の分子のレベルは、対象の腸内の微生物のレベルを調節する組成物を投与することによって調節される。ある種の態様では、微生物は、コリスミ酸および／または１つ以上のコリスミ酸代謝物を産生する。いくつかの態様において、組成物は微生物組成物である。いくつかの態様において、組成物は、対象の腸の異なる微生物の相対量を調節し得る１つ以上の抗生物質、プロバイオティクス、および／またはプレバイオティクスを含む。

【００１１】

いくつかの態様において、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有するかまたはＡＳＤを発症するリスクがある対象におけるＡＳＤの診断を支援するための方法および組成物は、対象から得られたサンプル中のコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の１つ以上の分子のレベルを決定することを含む。いくつかの態様において、例えばＡＳＤを有すると診断された対象からのデータの分析に基づいて、かかる分子の１つ以上のレベルがＡＳＤと統計学的に相関している場合に、対象はＡＳＤを有するかまたはＡＳＤのリスクがあることが同定される。

【００１２】

いくつかの態様において、サンプルは糞便サンプルである。いくつかの態様において、サンプルは血清サンプルである。いくつかの態様において、サンプルは、唾液、口腔内、

鼻腔内、尿、脳脊髄液、または胃腸サンプル（例えば、スワブまたは生検）である。
【００１３】
いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、対象は小児である。いくつかの態様において、対象は成人である。いくつかの態様において、対象は、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの１つ以上の併存疾患を発症するリスクがある。いくつかの態様において、対象は、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの１つ以上の併存疾患の１つ以上の徴候または症状を有すると診断される。
【００１４】
本発明の他の利点および新規の特徴は、添付の図面と併せて考慮されるとき、本発明の種々の非限定的な態様の次の詳細な記載から明らかになるであろう。本明細書および参照により組み込まれる文書が、対立するおよび／または整合しない開示を包含するケースでは、本明細書が優先するものとする。
【００１５】
本発明の非限定的な態様が、例として、添付の図面を参照して記載される。これらは概略的であり、一定の縮尺で描かれることを意図されない。図面において、図解される各同一のまたは同一に近い構成要素は、典型的には、単一の数字によって表される。明確にするために、あらゆる構成要素があらゆる図において標識されているわけではなく、当業者が本発明を理解することを許すために図解が必要でないところでは、本発明の各態様のあらゆる構成要素が示されているわけでもない。
【図面の簡単な説明】
【００１６】
【図１】図１は、シキミ酸（shikimate）経路の概略図を示す。
【図２】図２は、コリスミ酸代謝経路の概略図を示す。
【図３】図３は、いくつかの態様に従って、マイクロバイオームのアルファおよびベータ多様性に対するＡＳＤステータスの関連性を示す。図３Ａは、１７４０サンプルの重みなしＵｎｉＦｒａｃ距離行列からの主座標分析（ＰＣｏＡ）を示す。図３Ｂは、１７４０サンプルの重み付きＵｎｉＦｒａｃ距離行列からのＰｃｏＡを示す。図３Ｃは、重みなしおよび重み付きＵｎｉＦｒａｃ距離メトリクスからのＡＳＤ　ｖｓ．対照の、ＰＥＲＭＡＮＯＶＡベータ群有意性検定からの擬似Ｆ統計量を示す。完全不透明度の色のバーは、Ｐ＜０．０５のＰＥＲＭＡＮＯＶＡ検定を指す。図３Ｄは、有意性によってサイズ分けされた各コホートについてのＡＳＤ　ｖｓ．対照のアルファ多様性値のＬｏｇ２倍率変化を示す。ボックスプロットは、データ分布の中央値、四分位数、および１．５×四分位範囲を示す。Ｐ値は未調整の両側ｔ検定から生成された。
【図４Ａ－４Ｈ】図４は、いくつかの態様に従って、ＡＳＤと対照との間の分類学的および機能的違いを示す。図４Ａは、最も有意な門のＡＳＤ／対照の相対存在量(relative abundance)のＬｏｇ２倍率変化を示す。個々の点はコホートによって着色され、サイズは、ＡＳＤと対照との間の有意な違いを指示している（未調整の両側ｔ検定ｐ値＜０．０５）。図４Ｂは、図４Ａと同じ個々の点の着色およびサイズ分けによって、最も有意な属のＡＳＤ／対照の相対存在量のＬｏｇ２倍率変化を示す。図４Ｃ～４Ｅは、ＡＳＤステータスによって層別された、種々の綱および属についての各サンプルのｌｏｇ１０変換された相対存在量のサンプル毎のプロットを示す。ボックスプロットは、データ分布の中央値、四分位数、および１．５×四分位範囲を示す。図４Ｃは、ＡＳＤ　ｖｓ．対照の小児におけるActinobacteria綱の相対存在量を示す。図４Ｄは、ＡＳＤ　ｖｓ．対照の小児におけるPrevotella属の相対存在量を示す。図４Ｅは、ＡＳＤ　ｖｓ．対照の小児におけるBifidobacterium属の相対存在量を示す。図４Ｆは、ＡＳＤと対照とを比較したときの有意な微生物経路を示す。個々に処理された各コホートについて、最も共通に有意な細菌代謝経路について、ＡＳＤ／対照における正規化された経路の存在量値のｌｏｇ２倍率変化がプロットされている。研究および経路の階層的クラスタリングを、ユークリッド距離を使用して行った。点は、ｌｏｇ２倍率変化によって着色され、有意性によってサイズ分けされている（未調整の両側ｔ検定Ｐ＜０．０５）。図４Ｇは、個々にまたは集約して

処理された各コホートにおいて、メナキノンおよびユビキノンが関わるあらゆる経路について、ＡＳＤ／対照の正規化されたｌｏｇ２倍率変化値を示す。個々の点は、Ｌｏｇ２ＡＳＤ／対照倍率変化によって着色され、ＡＳＤと対照との間の統計学的有意性を指示するようにサイズ分けされている（不等分散の未調整の両側ｔ検定ｐ値＜０．０５）。図４Ｈは、個々にまたは集約して処理された各コホートからのコリスミ酸、芳香族アミノ酸、およびビタミンＢ経路についてのＡＳＤ／対照の正規化されたｌｏｇ２倍率変化値を示す。個々の点は、Ｌｏｇ２　ＡＳＤ／対照倍率変化によって着色され、ＡＳＤと対照との間の統計学的有意性を指示するようにサイズ分けされている（不等分散の未調整の両側ｔ検定ｐ値＜０．０５）。Ｌ－チロシン、Ｌ－トリプトファン生合成スーパー経路、Ｌ－トリプトファン生合成、Ｌ－チロシン生合成スーパー経路、およびＬ－フェニルアラニン生合成経路スーパー経路は芳香族アミノ酸に関係する。アデノシルコバラミン生合成およびテトラヒドロレート生合成スーパー経路は、ビタミンＢに関係する経路である。

【図５Ａ－５Ｄ】図５は、いくつかの態様に従って、ＡＳＤステータス予測についての機械学習性能の評価を示す。図５Ａは５０回反復からの平均ＡＵＣ±ＳＥＭの棒グラフを示す。１１の分類アルゴリズムを、集約されたＡＳＶレベルデータセットを使用して試験した。勾配ブースティング分類器およびアダブーストモデルは、最も良好に機能し、さらに試験された。図５Ｂは、集約データおよび個々の各研究の両方で、異なる分類学的レベルでコラプスされたリードカウントについて、訓練および試験された勾配ブースティング分類器モデルの平均正解率を示す。エラーバーは、１０回繰り返された５分割交差検証からの標準誤差を示す。図５Ｃは、ＡＳＶレベルにおいて集約データで訓練された勾配ブースティング分類器モデルからの、減少して行く特徴量の重要度でプロットされた上位２５個の特徴量の各サンプルについての相対存在量およびＳＨＡＰ値を示す。図５Ｄは、集約データおよび各コホートについて独立して訓練および試験された勾配ブースティング分類器モデルからの上位２５個の特徴量のＳＨＡＰ値によって生成および着色されたクラスタヒートマップである。ユークリッド距離の階層的クラスタリングを使用して、コホートと特徴量の両方のクラスタリングを行った。

【図６Ａ－６Ｇ】図６は、いくつかの態様に従って、機械学習モデルの性能および分類学的存在量に影響を及ぼす研究デザイン因子の評価を示す。図６Ａ～６Ｄは、（上）それぞれＶ４およびＶ３－Ｖ４超可変領域からシーケンシングされたデータの、Prevotella属（図６Ａ）、Prevotella対Bacteroidetesの比（図６Ｂ）、Desulfovibrionales目（図６Ｃ）、およびDeltaproteobacteria綱（図６Ｄ）のＡＳＤ対対照の研究毎のｌｏｇ２倍率変化、ならびに（下）Ｖ４およびＶ３－Ｖ４領域からの各サンプル中のPrevotella属（図６Ａ）、Prevotella対Bacteroidetesの比（図６Ｂ）、Desulfovibrionales目（図６Ｃ）、およびDeltaproteobacteria綱（図６Ｄ）のｌｏｇ１０変換された相対存在量を示す。ＡＳＤステータスによって分割されている（Ｖ４　ｎ＝１０２４、Ｖ３－Ｖ４　ｎ＝３５２）。Ｐ値は未調整のウィルコクソン両側ｔ検定により算出された。ボックスプロットは、データ分布の中央値四分位数、および１．５×四分位範囲を示す。図６Ｅは、シーケンシング深度および可変領域によって分割されたサンプルからＡＳＤステータスを予測するように訓練された勾配ブースティングクラリファイアモデルの機械学習ＡＵＣ、正解率、およびＦ１スコアを示す（シーケンシング深度：＞１４００００　ｎ＝８５１、＞６０００　ｎ＝６４０、可変領域：Ｖ３－Ｖ４　ｎ＝３５６、Ｖ４　ｎ＝１０３２、Ｖ１－Ｖ２　ｎ＝１０３）。図６Ｆは、対照の関係性、国、および性別によって分割されたサンプルからＡＳＤステータスを予測することにおける勾配ブースティングクラリファイアモデルのＡＵＣ、正解率、およびＦ１スコアを示す（対照の関係性：関係する対照ｎ＝４６２、無関係の対照ｎ＝１０２９；国：米国ｎ＝７６１、エクアドルｎ＝４６、中国ｎ＝６８４；性別：不明ｎ＝１６８、男性ｎ＝１０２１、女性ｎ＝３０２）。棒グラフは平均±ＳＥＭを示す。図６Ｇは、１～１６の各あり得る年齢範囲において、ビニングされたサンプルで訓練および試験されたＧＢＣモデルの平均ＡＵＣのヒートマップを示す。

【図７Ａ－７Ｄ】図７は、いくつかの態様に従って、コリスミ酸分岐点酵素の存在量を示

す。図７Ａは、５つの主なコリスミ酸分岐点酵素からのＡＳＤ／対照サンプルの正規化された酵素数存在量の研究毎のｌｏｇ２倍率変化を示す。図７Ｂは、コホートおよびＡＳＤステータスによって層別された、サンプル毎の予測および正規化されたコリスミ酸リアーゼＥＣ数のボックスプロットを示す。ウィルコクソンの両側ｔ検定を群間で行った。各コホートの右側に有意な違いが指示されている（＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１）。ボックスプロットは、データ分布の中央値、四分位数、および１．５×四分位範囲を示す。図７Ｃは、コホートおよびＡＳＤステータスによって層別された、サンプル毎の予測および正規化されたｍｅｎＦ遺伝子存在量のボックスプロットを示す。ウィルコクソン両側ｔ検定が群間で行われた（＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１）。図７Ｄは、ｍｅｎＦ遺伝子を含有する細菌特徴量の存在(presence)または非存在を図示するヒートマップを示し、最も多大な数の研究に存在する細菌特徴量を強調している。ヒートマップは、各コホートにおける細菌の存在（１）または非存在（０）を示す。

【図８Ａ】図８Ａは、いくつかの態様に従って、共通に変調した属についてのＡＳＤと対照の対象との間のＬｏｇ２倍率変化のプロットを示す。

【図８Ｂ】図８Ｂは、いくつかの態様に従って、ＡＳＤおよび対照の対象の腸マイクロバイオームにおけるSarcinaの組成存在量の分布を示すヒストグラムおよびＫＤＥ曲線を示す。

【図８Ｃ】図８Ｃは、いくつかの態様に従って、コホートおよび研究因子によって分けられたＡＳＤまたは対照の対象におけるSarcinaの存在量割合(fractional abundance)を記述するヒートマップを示す。

【図９Ａ】図９Ａは、いくつかの態様に従って、対照と比較してＡＳＤ対象の腸マイクロバイオームに見出される共通に有意な経路を示すバブルプロットを示す。

【図９Ｂ】図９Ｂは、いくつかの態様に従って、ＡＳＤおよび対照の対象の腸マイクロバイオームにおけるコリスミ酸代謝スーパー経路の組成存在量の分布を示すヒストグラムおよびＫＤＥ曲線を示す。

【図９Ｃ】図９Ｃは、いくつかの態様に従って、コホートおよび研究因子によって分けられた、ＡＳＤまたは対照の対象におけるコリスミ酸代謝スーパー経路の存在量割合を記述するヒートマップを示す。

【図９Ｄ】図９Ｄは、いくつかの態様に従って、コリスミ酸代謝スーパー経路とＡＳＤにリンクした種々の特徴量との間のオーバーラップを記述するベン図を示す。

【図１０Ａ】図１０Ａは、いくつかの態様に従って、対照と比較してＡＳＤ対象の腸マイクロバイオームにおいて見出される共通に有意な代謝流入の違いを示すバブルプロットを示す。

【図１０Ｂ】図１０Ｂは、いくつかの態様に従って、ＡＳＤおよび対照の対象の腸マイクロバイオームによるプロトン流入の分布を示すヒストグラムおよびＫＤＥ曲線を示す。

【図１０Ｃ】図１０Ｃは、いくつかの態様に従って、コホートおよび研究因子によって分けられた、腸マイクロバイオームによる閾値を超えるプロトン流入を含有するＡＳＤまたは対照の対象の存在量割合を記述するヒートマップを示す。

【図１１】図１１は、いくつかの態様に従って、ＡＳＤの３つのサブタイプの患者集団を相互比較するアップセット図を示す。

【図１２Ａ】図１２Ａは、いくつかの態様に従って、増大したコリスミ酸を与えられたときに増大したコリスミ酸代謝遺伝子を有するＡＳＤ対象において変調した上位３０の代謝物の棒グラフを示す。

【図１２Ｂ】図１２Ｂは、いくつかの態様に従って、シミュレーションされた食事で増大したコリスミ酸を与えられたときのコリスミ酸サブタイプのＡＳＤ対象について、Ｌ－チロシンについての流入の違いを示すボックスプロットを示す。

【図１２Ｃ】図１２Ｃは、いくつかの態様に従って、シミュレーションされた食事で増大したコリスミ酸を与えられたときのコリスミ酸サブタイプのＡＳＤ対象について、葉酸についての流入の違いを示すボックスプロットを示す。

【図１２Ｄ】図１２Ｄは、いくつかの態様に従って、シミュレーションされた食事で増大したコリスミ酸を与えられたときのコリスミ酸サブタイプのＡＳＤ対象について、インドールについての流入の違いを示すボックスプロットを示す。
【図１２Ｅ】図１２Ｅは、いくつかの態様に従って、シミュレーションされた食事で増大したコリスミ酸を与えられたときのコリスミ酸サブタイプのＡＳＤ対象について、メナキノン８についての流入の違いを示すボックスプロットを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
本発明の側面は、自閉スペクトラム症（ＡＳＤ）の１つ以上の症状を有する対象および／もしくはＡＳＤを発症するリスクがある対象を診断および／または処置するための方法ならびに組成物に関する。いくつかの態様において、対象におけるコリスミ酸レベルを調節する組成物は、ＡＳＤを処置するために有用である。いくつかの態様において、対象におけるコリスミ酸代謝（例えば、コリスミ酸の下流の分子の生合成）を調節する組成物は、ＡＳＤを処置するために有用である。いくつかの態様において、対象における（例えば対象の腸内における）微生物（例えばSarcina細菌、Clostridium ventriculi）の相対存在量を調節する組成物は、ＡＳＤを処置するために有用である。いくつかの態様において、対象の胃腸（ＧＩ）管におけるプロトンフラックスのレベルを調節する組成物は、ＡＳＤを処置するために有用である。
【００１８】
本発明の側面に従うと、ヒト腸内微生物叢内のコリスミ酸代謝スーパー経路内の１つ以上の遺伝子の存在量(abundance)を評価することは、自閉症の中核症状の１つ以上のための１つ以上の治療的介入を投与することの有用性を決定することを助け得る。いくつかの態様において、治療的介入は、単一の治療的介入または２つ以上の治療的介入の組み合わせを包含し得る。
【００１９】
いくつかの態様において、対象におけるＡＳＤの診断は、対象からのサンプル中のコリスミ酸代謝スーパー経路内の微生物叢（例えば腸内微生物叢）内の１つ以上の遺伝子（例えば、遺伝子の全てまたは遺伝子のサブセット）の存在量を評価（例えば、決定および／またはモニタリング）することによって補助される。いくつかの態様において、遺伝子の存在量は、遺伝子のＤＮＡおよび／またはＲＮＡレベルを決定することによって（例えば、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡ配列データを使用して）評価され得る。いくつかの態様において、遺伝子の存在量は、サンプル中の１つ以上の遺伝子産物のレベルを決定することによって評価され得る。
【００２０】
いくつかの態様において、対象におけるＡＳＤの診断は、対象からのサンプル中のコリスミ酸代謝スーパー経路の１つ以上の代謝物（例えば、かかる代謝物の組み合わせ）のレベルを評価（例えば、決定および／またはモニタリング）することによって補助される。
【００２１】
いくつかの態様において、ＡＳＤのリスクがある対象またはＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する対象を処置する方法は、例えば、コリスミ酸代謝スーパー経路内の遺伝子の１つ以上を含有する微生物の存在量を調節するために、プロバイオティクスおよび／またはプレバイオティクスを対象に投与することを含む。従って、いくつかの態様において、プロバイオティクスおよび／またはプレバイオティクスは、自閉症の中核症状の１つ以上を処置するために、治療的介入としてまたは１つ以上の追加の治療的介入と組み合わせて使用され得る。
【００２２】
いくつかの態様において、腸内微生物叢内のコリスミ酸分岐点酵素の１つもしくは組み合わせの活性を増大または減少させる分子の投与は、自閉症の中核症状の１つ以上のための治療的介入として使用され得る。
【００２３】

いくつかの態様において、調節された活性レベルを有するコリスミ酸分岐点酵素を含有するプロバイオティクスの投与は、自閉症の中核症状の１つ以上のための治療的介入として使用され得る。

【００２４】

いくつかの態様において、コリスミ酸、コリスミ酸（chorismic acid）、および／またはそのどちらかの塩もしくはエステルなどの分子の投与は、自閉症の中核症状の１つ以上のための治療的介入として使用され得る。いくつかの態様において、コリスミ酸代謝スーパー経路内の他の分子の投与が、自閉症の中核症状の１つ以上のための治療的介入として使用され得る。いくつかの態様において、コリスミ酸、コリスミ酸（chorismic acid）、および／またはそのどちらかの塩もしくはエステルと、コリスミ酸代謝スーパー経路内の１つ以上の他の分子との組み合わせの投与が、自閉症の中核症状の１つ以上のための治療的介入として使用され得る。

【００２５】

いくつかの態様において、対象の腸内微生物叢内のコリスミ酸分岐点酵素の活性を評価（例えば、決定および／またはモニタリング）することは、対象におけるＡＳＤの診断の補助として使用され得る。

【００２６】

いくつかの態様において、対象の腸内微生物叢内のコリスミ酸分岐点酵素の活性を評価（例えば、決定および／またはモニタリング）することは、対象に投与するべき適当な治療的介入または治療的介入の組み合わせの決定の補助として使用され得る。

【００２７】

本発明のこれらおよび他の側面は下でより詳細に記載される。

【００２８】

本明細書で使用される「ＡＳＤ」は、自閉スペクトラム症を指す。

【００２９】

本明細書で使用される「自閉症の中核症状」は、易刺激性、不眠、発話およびコミュニケーションの問題、攻撃性、消化の問題、社会化の問題、行動および興味の限定された繰り返しパターン、不安発作、自己攻撃性、および気分障害を包含するが、これらに限定されない。

【００３０】

本明細書で使用される「コリスミ酸代謝スーパー経路」は、Ｄ－エリトロース４－リン酸およびホスホエノールピルビン酸からのコリスミ酸の産生のための経路（すなわちシキミ酸経路）、ならびにコリスミ酸から下流代謝物（例えば、芳香族アミノ酸およびそれらの誘導体、ユビキノール、メナキノール、テトラヒドロ葉酸、エンテロバクチン）への変換のための経路を指す。本明細書で使用される「コリスミ酸代謝経路」は、コリスミ酸代謝スーパー経路またはコリスミ酸代謝スーパー経路内の経路を指す。

【００３１】

本明細書で使用されるコリスミ酸代謝スーパー経路の遺伝子は、Ｄ－エリトロース４－リン酸およびホスホエノールピルビン酸からのコリスミ酸の産生、ならびにセロトニン、メラトニン、キヌレニン、インドール、およびいずれかの中間分子を包含するがこれらに限定されないユビキノール、メナキノール、テトラヒドロ葉酸、エンテロバクチン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－フェニルアラニン、およびＬ－トリプトファンの代謝産物へのコリスミ酸の変換に関わるヒト腸内微生物叢からのいずれかの微生物の遺伝子を包含するが、これらに限定されない。遺伝子名の非限定的なリストは表１に見出され得る。

【００３２】

本明細書で使用されるコリスミ酸代謝スーパー経路の代謝物は、Ｄ－エリトロース４－リン酸およびホスホエノールピルビン酸からのコリスミ酸の産生に関わる中間分子、またはコリスミ酸に由来する分子のいずれかを包含するが、これらに限定されない。代謝物名の非限定的なリストは表２に見出され得る。

【００３３】
本明細書で使用される「コリスミ酸分岐点酵素」は、コリスミ酸ムターゼ、アントラニル酸シンターゼ、アミノデオキシコリスミ酸シンターゼ（パラ－アミノ安息香酸（ＰＡＢＡ）シンターゼとしてもまた公知）、イソコリスミ酸シンターゼ、メナキノン特異的イソコリスミ酸シンターゼ、コリスミ酸デヒドラターゼ、およびコリスミ酸リアーゼを包含するが、これらに限定されない。
【００３４】
本明細書で使用される「治療的介入」は、メラトニンサプリメント、葉酸サプリメント、プロバイオティクス、糞便移植、ビタミンＫ補充、トリプトファン補充、またはセロトニン、キヌレニン、もしくはインドールを調節するいずれかの発明、フルクトオリゴ糖、シキミ酸もしくはシキミ酸（shikimic acid）またはそのいずれかの塩もしくはエステル、コリスミ酸もしくはコリスミ酸（chorismic acid）またはそのいずれかの塩もしくはエステル、ならびにコリスミ酸分岐点酵素および／または表１もしくは表２の１つ以上の遺伝子もしくは蛋白質の調節因子（例えば、阻害剤またはアゴニスト）を包含するが、これらに限定されない。
【００３５】
本明細書には、自閉スペクトラム症（ＡＳＤ）を有するかまたは発症する対象のリスクを評価するための、ＡＳＤを発症するリスクを低減するためにまたはＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を鎮静もしくは緩和するために対象に提供するべき処置を同定するための、ならびに／あるいは同定された処置によって対象を処置するための、方法ならびに組成物の態様が記載される。
【００３６】
いくつかの態様に従うと、本明細書に記載される方法は、対象からサンプルを得ることを含む。いくつかの態様において、対象はヒト対象である。ある種の態様では、対象は男性である。ある種の態様では、対象は女性である。対象はいずれかの地理学上の場所からであり得る。ある種の態様では、対象は、北米（例えば米国）、アジア（例えば中国、韓国）、欧州（例えばイタリア）、および／または南米（例えばエクアドル）からである。
【００３７】
対象はいずれかの年齢であり得る。ある種の態様では、対象は小児（例えば１７歳以下）である。ある種の態様では、対象は成人（例えば１８歳以上）である。いくつかの態様において、対象は、１～５歳、１～７歳、１～１０歳、１～１５歳、１～１７歳、１～１８歳、１～２１歳、１～５０歳、１～７０歳、１～１００歳、２～７歳、２～１０歳、２～１５歳、２～１７歳、２～１８歳、２～２１歳、２～５０歳、２～７０歳、２～１００歳、５～１０歳、５～１５歳、５～１７歳、５～１８歳、５～２１歳、５～５０歳、５～７０歳、５～１００歳、１０～１５歳、１０～１７歳、１０～１８歳、１０～２１歳、１０～５０歳、１０～７０歳、１０～１００歳、１５～２１歳、１５～５０歳、１５～７０歳、１５～１００歳、１８～５０歳、１８～７０歳、１８～１００歳、２１～５０歳、２１～７０歳、２１～１００歳、５０～７０歳、５０～１００歳、または７０～１００歳からの範囲の年齢を有する。
【００３８】
いくつかの態様において、サンプルは糞便サンプルである。ある種の態様では、サンプルを得ることは、糞便サンプルを収集すること（例えば、大便サンプルを収集すること、直腸腔をスワブすること）を含む。いくつかの態様において、サンプルは胃腸サンプルである。ある種のケースでは、胃腸サンプルは、胃吸引物、生検（例えば、粘膜生検、胃組織生検）、腸液、内視鏡ブラシ、および／またはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションサンプルを含む。いくつかの態様において、対象からサンプルを得ることは、対象に対して生検、内視鏡検査、および／または結腸内視鏡検査を行うことを含む。いくつかの態様において、サンプルは、血清、脳脊髄液（ＣＳＦ）、尿、口腔内、鼻腔内、または唾液サンプルである。いくつかの態様において、対象からサンプルを得ることは、血清サンプルを収集すること、対象に対して脊椎穿刺を行うこと、尿サンプルを収集すること、

ならびに／または対象の頬、咽喉、および／もしくは鼻腔をスワブすることを含む。

【００３９】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、対象から得られたサンプルを分析して、対象のマイクロバイオームの１つ以上の特性を評価することを含む。いくつかのケースでは、１つ以上の特性は、マイクロバイオーム内に検出される１つ以上の微生物の識別、および／またはマイクロバイオーム内に検出される１つ以上の微生物の量もしくは相対量を含む。

【００４０】

いくつかのケースでは、マイクロバイオームは、対象の胃腸管のマイクロバイオーム（例えば、腸内微生物叢を含む腸マイクロバイオーム）であり得る。いくつかの態様において、サンプルは対象の胃腸管の特性を表し得る。いくつかの場合には、サンプルは糞便サンプルである。いくつかの場合には、サンプルは胃腸サンプルである。ある種のケースでは、胃腸サンプルは胃腸管（例えば、下部胃腸管、上部胃腸管）から取られる。サンプルは、結腸内視鏡検査、内視鏡検査、スワブ、または胃腸管の一部のブラシ採取を包含するがこれらに限定されない、いずれかの好適な手順の間に得られ得る。

【００４１】

本明細書に記載されるいくつかの例は、（上部および／または下部胃腸管の）胃腸マイクロバイオームに焦点を当てているが、態様はそれに限定されず、他の態様は、対象の解剖学的構造の他の部分（例えば、副鼻腔、皮膚、肺、口腔粘膜、または他のもの）についてのマイクロバイオームに関し得る。サンプルを得るための先に記載された技術のいずれかが、医学的に適当なときには、対象の解剖学的構造のこれらの他の部分からサンプルを得るために使用され得る。得られたサンプルは調製され、それからそれらの中の微生物が分析されて、微生物特徴量を決定し得る。いくつかのケースでは、態様は、対象の解剖学的構造の他の部分（例えば、血液、脳など）に存在するマイクロバイオーム産物（例えば、コリスミ酸およびその代謝物）に関し得る。

【００４２】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、対象からのサンプル中の分子（例えば、コリスミ酸、コリスミ酸代謝経路内の分子）および／または微生物特徴量（例えば微生物）のレベル（例えば存在量）を決定することを含む。

【００４３】

いくつかの態様において、中の分子および／または微生物特徴量のレベルを決定することは、対象からのサンプル中に存在する１つ以上の遺伝子（例えば、表１に列挙される１つ以上の遺伝子を包含するがこれらに限定されない、コリスミ酸代謝スーパー経路内の１つ以上の遺伝子）の存在量を決定することを含む。いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、サンプルの少なくとも一部からＤＮＡおよび／またはＲＮＡを抽出することを含む。当技術分野で公知のいずれかの核酸抽出方法が使用され得る。いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡの少なくとも一部を増幅して複数のアンプリコンを産生することをさらに含む。当技術分野で公知のいずれかの核酸増幅法が使用され得る。好適な核酸増幅法の非限定的な例は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）および等温増幅法（例えば、ループ介在等温増幅（ＬＡＭＰ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ））を包含する。いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、定量的核酸増幅法を行うことを含む。好適な定量的核酸増幅法の非限定的な例は、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）である。いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、１つ以上のアンプリコンをシーケンシングすることをさらに含む。いずれかの好適な核酸シーケンシング法が使用され得る。ある種の態様では、核酸シーケンシング法はロングリードシーケンシング法である。ある種の態様では、核酸シーケンシング法はショートリードシーケンシング法である。いくつかの態様において、核酸シーケンシング法は次世代シーケンシング法である。いくつかの態様において、核酸シーケン

シング法は、Illumina、Pacific Biosciences、Oxford Nanopore、および／またはRoche 454のシーケンシングプラットフォームを使用して行われる。

【００４４】

いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、サンプル中に存在する微生物の１６ＳリボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）の少なくとも一部をシーケンシングすること（例えば、１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子アンプリコン（１６Ｓ）シーケンシングを行うこと）を含む。いくつかのケースでは、１６Ｓシーケンシングを行うことは、サンプル中に存在する微生物の１６Ｓ　ｒＲＮＡゲノムの１つ以上の領域の少なくとも一部を増幅して、複数のアンプリコンを産生することを含む。いずれかの核酸増幅法（例えばＰＣＲ）が使用され得る。いくつかの態様において、１６Ｓ　ｒＲＮＡゲノムの１つ以上の領域は少なくとも１つの超可変領域（例えば、Ｖ４、Ｖ３－Ｖ４、Ｖ１－Ｖ２）を含む。いくつかのケースでは、１６Ｓシーケンシングを行うことは、複数のアンプリコンの１つ以上のアンプリコンをシーケンシングすることをさらに含む。いずれかの好適な核酸シーケンシング法が使用され得る。

【００４５】

いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、ショットガンメタゲノムシーケンシングを行って、サンプルのメタゲノム内容をシーケンシングすることを含む。いくつかのケースでは、ショットガンメタゲノムシーケンシング法は、サンプルからＤＮＡを抽出すること、抽出されたＤＮＡをＤＮＡ断片に断片化すること、およびＤＮＡ断片をシーケンシングすることを含む。いずれかの好適な核酸シーケンシング法が使用され得る。いくつかのケースでは、もたらされたＤＮＡ断片の配列が分析されて、サンプル中に存在する微生物を同定し得る。

【００４６】

いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、サンプル中の１つ以上の遺伝子産物（例えば酵素）のレベルを決定することを含む。１つ以上の遺伝子産物のレベルは、当技術分野で公知のいずれかの方法に従って決定され得、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）および他の抗体に基づくアッセイ、ならびに液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ－ＭＳ）に基づくプロテオミクスおよび他の蛋白質に基づく定量アッセイを包含するが、これらに限定されない。いくつかの態様において、サンプル中に存在する１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、（例えば基質または産物として）代謝経路における１つ以上の遺伝子産物（例えば酵素）と直接的または間接的に相互作用する、１つ以上の分子（例えば、コリスミ酸および／またはその代謝物）のレベルを決定することを含む。１つ以上の分子（例えば、基質、産物）のレベルは、当技術分野で公知のいずれかの方法に従って決定され得、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ－ＭＳ）、ガスクロマトグラフィー－質量分析（ＧＣ－ＭＳ）、および蛍光に基づくアッセイを包含するが、これらに限定されない。

【００４７】

いくつかの態様において、対象からのサンプル中の分子および／または微生物特徴量のレベルを決定することは、サンプル中の分子および／または微生物特徴量のレベルを測定することを含む。サンプル中の分子および／または微生物特徴量のレベルは、当技術分野で公知のいずれかの方法に従って測定され得る。好適な方法の非限定的な例は、ＨＰＬＣ、ＬＣ－ＭＳ、ＧＣ－ＭＳ、およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）を包含する。ある種の態様では、サンプル中の微生物特徴量のレベルは、サンプルの少なくとも一部を異なる培地上におよび／または異なる条件下でプレーティングして、微生物の成長を評価し、サンプル中に存在する１つ以上の微生物を同定することによって測定され得る。

【００４８】

いくつかの態様に従うと、方法は、分子または微生物特徴量のレベルが閾値よりも高いまたは低い場合に、対象がＡＳＤの少なくとも１つのサブタイプを有する、またはＡＳＤ

の少なくとも１つのサブタイプを発症するリスクがあることを決定することを含む。いくつかのケースでは、閾値は、１つ以上の神経学的定型の個体（例えば、ＡＳＤと診断されていない個体）における分子または微生物特徴量のレベルに基づいて決定され得る。いくつかのケースでは、閾値は、ＡＳＤと診断された個体の第１の集団と神経学的定型の個体の第２の集団との間の最適な判別境界を同定することによって決定され得る。

【００４９】

いくつかの態様に従うと、方法は、対象が有するかまたは有するリスクがあるＡＳＤのサブタイプを同定することを含む。いくつかの態様において、方法は、対象から得られたサンプル中の糞便マイクロバイオームの組成、または１つ以上の分子および／もしくは微生物特徴量の存在もしくはレベルを決定することを含む。いくつかの態様において、ＡＳＤのサブタイプはコリスミ酸サブタイプである。いくつかのケースでは、コリスミ酸サブタイプは、（例えば、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に）サンプル中のコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子（例えば、シキミ酸経路、コリスミ酸から芳香族アミノ酸およびそれらの誘導体、葉酸およびその誘導体、ユビキノール、メナキノール、ならびにエンテロバクチンへの変換のための経路）の変調したレベルによって特徴付けられ得る。いくつかのケースでは、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子の変調したレベルは、ある種の閾値よりも上または下であり得る。いくつかの態様において、ＡＳＤのサブタイプはSarcinaサブタイプである。いくつかのケースでは、Sarcinaサブタイプは、（例えば、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に）サンプル中のSarcina細菌の変調した（例えば上昇した）レベルによって特徴付けられ得る。いくつかの態様において、ＡＳＤのサブタイプはプロトン流入サブタイプである。いくつかのケースでは、プロトン流入サブタイプは、対象の胃腸管におけるプロトン流入の変調した（例えば上昇した）レベルによって特徴付けられ得る。

【００５０】

コリスミ酸

自閉症のコリスミ酸仮説

いくつかの側面では、（例えば、対象の微生物叢内の）対象におけるコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の１つ以上の分子のレベルの評価および調節は、ＡＳＤの治療および／または診断用途に有用であり得る。コリスミ酸が本明細書で使用されるところでは常に、文脈が別様に定めない限り、コリスミ酸（chorismic acid）、および／またはコリスミ酸もしくはコリスミ酸（chorismic acid）どちらかのいずれかの塩もしくはエステルもまた使用され得る。一般的に、そのイオン、プロトン化、塩、またはエステル形態の化合物の参照は、文脈が別様に定めない限り、他の形態を包摂し得ることが理解されるべきである。

【００５１】

いくつかの側面においては、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の１つ以上の分子の相対的な非存在または存在量どちらかが、ＡＳＤの１つ以上の症状を有する対象において検出され得る。いくつかの側面においては、コリスミ酸およびその関係する分子のレベルを調節するキャパシティを含有することが蓋然的な細菌の相対的な非存在または存在量どちらかが、ＡＳＤの１つ以上の症状を有する対象において検出され得る。

【００５２】

コリスミ酸はシキミ酸経路の最終産物であり、これは動物ではなく微生物および植物において見出される。シキミ酸経路の例示的な描像が図１に示されている。図１に示される通り、シキミ酸経路は７つの酵素ステップを含む：（１）３－デオキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロソン酸－７－リン酸シンターゼ（ＤＡＨＰＳ）は、Ｄ－エリトロース４－リン酸（例えば、ペントースリン酸回路の中間体）およびホスホエノールピルビン酸（例えば、解糖の中間体）を３－デオキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロソン酸－７－リン酸（ＤＡＨＰ）に変換し；（２）３－デヒドロキナ酸シンターゼ（ＤＨＱＳ）は、ＤＡＨＰを３－デヒドロキナ酸に変換し；（３）３－デヒドロキナ酸デヒドラターゼ（ＤＨＱ）は、３－デヒドロキナ酸を３－デヒドロシキミ酸に変換し；（４）シキミ酸５－デヒドロゲナーゼ（Ｓ

ＤＨ）は、３－デヒドロシキミ酸をシキミ酸に変換し；（５）シキミ酸キナーゼ（ＳＫ）は、シキミ酸をシキミ酸３－リン酸に変換し；（６）５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰＳ）は、シキミ酸３－リン酸を５－Ｏ－カルボキシビニル－３－ホスホシキミ酸（５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸（ＥＰＳＰ）ともまた言われる）に変換し；（７）コリスミ酸シンターゼ（ＣＳ）は、５－Ｏ－カルボキシビニル－３－ホスホシキミ酸をコリスミ酸に変換する。

【００５３】

それから、コリスミ酸はいくつかの生物学的に関連のある芳香族分子に変換され得、芳香族アミノ酸（例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）およびそれらの誘導体、葉酸およびその誘導体（例えばテトラヒドロ葉酸）、シデロホア（例えばエンテロバクチン）、ユビキノール（例えば補酵素Ｑ）、ならびにメナキノールを包含するが、これらに限定されない。図２は、５つのコリスミ酸依存的な経路の例示的な描像を示す。１つの経路においては、コリスミ酸ムターゼがコリスミ酸をプレフェン酸に変換し、これはフェニルアラニンおよびチロシンの前駆体である。別の経路では、アントラニル酸シンターゼがコリスミ酸をアントラニル酸に変換し、これはトリプトファンの前駆体である。別の経路では、アミノデオキシコリスミ酸シンターゼ（パラ－アミノ安息香酸（ＰＡＢＡ）シンターゼとしてもまた公知）がコリスミ酸をｐ－アミノ安息香酸に変換し、これは葉酸の前駆体である。別の経路では、イソコリスミ酸シンターゼが、コリスミ酸をイソコリスミ酸に変換し、これはエンテロバクチンの前駆体である。別の経路では、コリスミ酸リアーゼがコリスミ酸をｐ－ヒドロキシ安息香酸に変換し、これはユビキノールおよび／またはメナキノールの前駆体である。本発明の側面に従うと、コリスミ酸の１つ以上の下流代謝物のレベルは、ＡＳＤを有するかまたはＡＳＤのリスクがある対象において変調し得る。

【００５４】

ヒトにおけるシキミ酸経路の非存在ゆえに、シキミ酸経路およびコリスミ酸に依存的な経路上の各分子のレベルは、食事によって摂取される各分子の量または腸内微生物によって産生される量どちらかに依存的である。

【００５５】

シキミ酸経路の１つ以上の酵素を標的化するある種の薬品化合物はＡＳＤにリンクし得る。これの１つの例はグリホサートである（ラウンドアップとしてもまた公知）。グリホサートは酵素ＥＰＳＰＳを標的化し、５－Ｏ－(カルボキシビニル)－３－ホスホシキミ酸（これはコリスミ酸シンターゼによってコリスミ酸に変換され得る）の産生を妨げる。１つの研究は、自閉症の小児数の増大が、トウモロコシおよび大豆に適用されるグリホサートの量の増大に対応していることを観察している。Shaw, Elevated urinary glyphosate and clostridia metabolites with altered dopamine metabolism in triplets with autistic spectrum disorder or suspected seizure disorder: A case study, Integr Med (Encinitas), 16(1):50-57 (2017)を参照されたい。いくつかのケースでは、グリホサートは有益な細菌を死滅させ、有害な分子（例えば毒素）を産生し得る細菌（例えばClostridia）を残し得る。いくつかのケースでは、グリホサートはクラスＩＩ　ＥＰＳＰＳ酵素ではなくクラスＩ　ＥＰＳＰＳ酵素と競合し得る。従って、いくつかのケースでは、グリホサートに対する対象の曝露は、（例えば、対象の胃腸管における）クラスＩ　ＥＰＳＰＳ酵素に依拠する種の減少をもたらし得る。いくつかの態様において、グリホサートに対する対象の曝露は、（例えば、対象の胃腸管における）コリスミ酸の減少したレベルをもたらし得る。

【００５６】

いくつかの態様において、グリホサートに対する対象の曝露は、対象がＡＳＤの１つ以上の症状を見せることおよび／またはＡＳＤを発症するより高いリスクを有することをもたらし得る。ある種の態様では、方法は、（例えば、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に）対象におけるグリホサートの上昇したレベルに基づいて、対象がＡＳＤのサブタイプ（例えば、ＡＳＤのコリスミ酸サブタイプ）を有するまたは有するリスクがあ

ることを決定することを含む。
【００５７】
いくつかのケースでは、グリホサートに対する対象の曝露は、非ホジキンリンパ腫、成熟Ｂ細胞リンパ腫、成熟Ｔ細胞およびナチュラルキラー細胞リンパ腫、セリアック病、グルテン不耐症、病原性細菌の過剰成長、減少した有益な微生物、損なわれたセロトニンシグナル伝達、不妊、流産、先天性欠損、肥満、炎症性腸疾患、神経性やせ症、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、肝疾患、ＡＤＨＤ、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、癌、および／または悪液質に寄与し得る。
【００５８】
芳香族アミノ酸（およびそれらの下流産物）
いくつかの態様において、ある種の芳香族アミノ酸（例えば、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン）がコリスミ酸代謝経路内の分子の非限定的な例である。
【００５９】
いくつかの態様において、コリスミ酸はトリプトファン生合成経路を介してトリプトファンに変換され得る。トリプトファン生合成経路の第１のステップにおいては、アントラニル酸シンターゼがコリスミ酸をアントラニル酸に変換し得る。これはトリプトファンの上流代謝物（すなわち前駆体）である。いくつかのケースでは、トリプトファン生合成経路の変調は、個体におけるＡＳＤと関連し得る。従って、ある種のケースでは、（例えば、神経学的定型の個体に対して相対的に）トリプトファンおよび／またはトリプトファン生合成経路内の分子のレベルの変調は、ＡＳＤと関連し得る。いくつかのケースでは、（例えば、神経学的定型の個体に対して相対的に）トリプトファンおよび／またはトリプトファン生合成経路内の分子のより低いレベルは、ＡＳＤと関連し得る。いくつかのケースでは、（例えば、神経学的定型の個体に対して相対的に）トリプトファンおよび／またはトリプトファン生合成経路内の分子のより高いレベルは、ＡＳＤと関連し得る。従って、いくつかの態様において、方法は、１つ以上の神経学的定型の個体のレベルに対して相対的に変調（例えば、増大、減少）している対象からのサンプル中のトリプトファンおよび／またはトリプトファン生合成経路内の分子のレベルに基づいて、対象がＡＳＤの少なくとも１つのサブタイプ（例えば、コリスミ酸サブタイプ）を有するまたは発症するリスクがあることを決定することを含む。サンプルは、本明細書に記載されるいずれかのサンプル（例えば、糞便サンプル、胃腸サンプル、血清サンプル、ＣＳＦサンプル）であり得る。
【００６０】
いくつかのケースでは、トリプトファンの１つ以上の下流代謝物のレベルの変調は、ＡＳＤと関連し得る。トリプトファンは、少なくとも３つの主要な経路によって下流代謝物にさらに変換され得る。いくつかのケースでは、トリプトファンはキヌレニン経路によってキヌレニンまたはその誘導体に変換され得る。いくつかのケースでは、トリプトファンはセロトニン経路によってセロトニンまたはその誘導体に変換され得る。いくつかのケースでは、トリプトファンはインドール経路によってインドールに変換され得る。これらの経路の各々はＡＳＤにとって潜在的に興味深いものであり得る。
【００６１】
セロトニン経路において、酵素のトリプトファンヒドロキシラーゼ（ＴＰＨ）は、トリプトファンを５－ヒドロキシトリプトファン（５－ＨＴＰ）に変換し、それから、これは酵素の芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（ＡＡＡＤ）によってセロトニン（５－ＨＴ）に変換される。神経伝達物質のセロトニンは、その５－ＨＴ受容体の活性化によって脳および末梢における広範囲の生理学的機能を有する。それから、セロトニン自体はメラトニンを包含するいくつかの分子に変換され得る。
【００６２】
いくつかのケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、セロトニンの変調した（例えば、より高い、より低い）レベルを有し得る。ある種のケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相

対的に、（例えば血清サンプル中の）セロトニンのより高いレベルを有し得る。ある種の態様では、対象におけるセロトニンのレベルは、プロバイオティクスおよび／またはフルクトオリゴ糖の投与によって減少し得る。

【００６３】

いくつかのケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、メラトニンの変調した（例えば、より高い、より低い）レベルを有し得る。ある種のケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、メラトニンのより低いレベルを有し得る。いくつかのケースでは、メラトニンのより低いレベルは、睡眠困難に至り得る。ある種の態様では、対象におけるメラトニンのレベルはメラトニンサプリメントの投与によって増大させられ得る。

【００６４】

キヌレニン経路では、トリプトファンが、トリプトファンジオキシゲナーゼまたはインドールアミンジオキシゲナーゼによってキヌレニンに変換される。それから、キヌレニンはいくつかの分子に変換され得、キヌレン酸、キサンツレン酸、キノリン酸、ピコリン酸、およびヒドロキシアントラニル酸を包含するが、これらに限定されない。

【００６５】

いくつかのケースでは、キヌレニンのレベルはＡＳＤを有する個体において増大し得る。腸において、キヌレニンおよび他の関係する分子のレベルは、細菌および宿主のＩＤＯ１酵素の活性によって媒介される。キヌレニンならびにその下流代謝物（キヌレン酸、キサンツレン酸、キノリン酸およびピコリン酸を包含する）は、神経伝達、炎症免疫応答、および腸の粘膜保護効果を包含する種々の公知の生物学的プロセスを有する。ヒドキシアントラニル酸を包含するキヌレニンの他の下流代謝物は神経毒性の効果を有する。

【００６６】

いくつかのケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、キヌレニンおよび／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上の変調した（例えば、より高い、より低い）レベルを有し得る。ある種のケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、キヌレニンおよび／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のより高いレベルを有し得る。ある種のケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、キヌレニンおよび／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のより低いレベルを有し得る。

【００６７】

インドールは、トリプトファンに由来する分子の第３の主要なカテゴリーである。インドールのケースでは、微生物叢はインドールを産生することに主な役割を果たす。例えば、いくつかのケースでは、細菌Clostridium sporogenesはトリプトファンを神経伝達物質トリプタミンに変換する。いくつかのケースでは、インドールは、ＡｈＲからのシグナル伝達を誘発し得、これは種々の免疫応答を誘発し得る。

【００６８】

いくつかのケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、インドールおよび／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上の変調した（例えば、より高い、より低い）レベルを有し得る。ある種のケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、インドールおよび／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のより高いレベルを有し得る。ある種のケースでは、ＡＳＤを有する個体は、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、インドールおよび／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のより低いレベルを有し得る。

【００６９】

いくつかの態様において、コリスミ酸はチロシンおよび／またはフェニルアラニンに変換され得る。いくつかのケースでは、コリスミ酸ムターゼが、コリスミ酸を、チロシンおよびフェニルアラニンの前駆体であるプレフェン酸に変換し得る。いくつかの場合には、

チロシン生合成および／またはフェニルアラニン生合成の変調が、個体におけるＡＳＤと関連し得る。従って、ある種のケースでは、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、チロシン、フェニルアラニン、および／またはそれらの代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のレベルの変調は、ＡＳＤと関連し得る。いくつかのケースでは、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、チロシン、フェニルアラニン、および／またはそれらの代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のより低いレベルは、ＡＳＤと関連し得る。いくつかのケースでは、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、チロシン、フェニルアラニン、および／またはそれらの代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のより高いレベルは、ＡＳＤと関連し得る。従って、いくつかの態様では、方法は、１つ以上の神経学的定型の個体のレベルに対して相対的に、変調（例えば、増大、減少）している対象からのサンプル中のチロシン、フェニルアラニン、および／またはそれらの代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のレベルに基づいて、対象がＡＳＤの少なくとも１つのサブタイプ（例えばコリスミ酸サブタイプ）を有するまたは発症するリスクがあることを決定することを含む。サンプルは、本明細書に記載されるいずれかのサンプル（例えば、糞便サンプル、胃腸サンプル、血清サンプル、ＣＳＦサンプル）であり得る。

【００７０】

従って、いくつかの態様において、芳香族アミノ酸（および／またはそれらの下流産物）のレベルは、対象におけるＡＳＤの診断および／または処置を支援するために、対象からのサンプル中において評価および／または対象において調節され得る。

【００７１】

葉酸

いくつかの態様において、葉酸は、コリスミ酸代謝経路内の分子の非限定的な例である。いくつかのケースでは、酵素のアミノデオキシコリスミ酸シンターゼ（ＰＡＢＡシンターゼとしてもまた公知）がコリスミ酸を葉酸生合成の方へと変換する。葉酸（ビタミンＢ９としてもまた公知）はＤＮＡおよびＲＮＡ合成ならびにアミノ酸の代謝に要求される。葉酸の欠如は神経管の欠陥に至り得る。この理由から、歴史的にいくつかのトランスジェニック食品に補充されている。ヒト腸内微生物叢の一部は、葉酸を産生および改変することができる遺伝子を所有する。コリスミ酸を葉酸に変換することに関わる１２の酵素があり、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）の活性が律速ステップとして作用する。葉酸は、Ｎ５－メチルテトラヒドロ葉酸から葉酸の活性形態のテトラヒドロ葉酸（ＴＨＦ）への変換のために、ビタミンＢ１２（コバラミン）にもまた依存的である。コバラミンは、重要な転写制御因子の補因子として作用することによって、葉酸およびユビキノン生合成においてもまた重要な制御上の役割を果たす。

【００７２】

いくつかのケースでは、葉酸、その誘導体（例えばテトラヒドロ葉酸）の１つ以上、および／または葉酸生合成に関わる１つ以上の分子（例えばコバラミン）のレベルは、神経学的定型の個体と比較して、ＡＳＤを有する個体において変調（例えば、増大、減少）する。ある種のケースでは、ＡＳＤを有する個体は、血液脳関門を通して葉酸を輸送するために必要とされる葉酸受容体に対する循環中の増大した自己抗体を有し得る。これは、脳における葉酸の減少した取り込み、およびＡＳＤ病態生理学に関係する下流の帰結に至り得る。ある種のケースでは、葉酸、その誘導体の１つ、および／または葉酸生合成に関わる１つ以上の分子を投与することを含むＡＳＤを有する個体を処置する方法は、ＡＳＤの１つ以上の症状（例えば、言語およびコミュニケーションの困難）を緩和し得る。

【００７３】

従って、いくつかの態様において、葉酸のレベルは、対象におけるＡＳＤの診断および／または処置を支援するために、対象からのサンプルにおいて評価および／または対象において調節され得る。

【００７４】

ユビキノール及びメナキノール

いくつかの態様において、ユビキノールおよびメナキノールはコリスミ酸代謝経路内の

分子の非限定的な例である。いくつかのケースでは、コリスミ酸は、コリスミ酸リアーゼによってｐ－ヒドロキシ安息香酸に変換されるときに、ユビキノールおよびメナキノール産生の方へと分岐し得る。これらの分子は典型的には細胞膜に見出され、電子輸送鎖の一部である。ユビキノン（補酵素Ｑともまた言われる）は好気呼吸に利用され、メナキノンは嫌気呼吸および乳酸発酵のために細菌によって共通に使用される。メナキノンはビタミンＫ２ともまた呼ばれ、それらのイソプレノイド炭素鎖の長さに依存して様々であり得る。メナキノン－４（ＭＫ４）は脳におけるビタミンＫの主な形態であり、ＭＫ４の血清濃度はＡＳＤの小児においてより低くなり得る。ＭＫ４の約７５％は腸で産生され、それは報告では女性よりも男性において高い。神経発生におけるＭＫ４の役割から、それはＡＳＤ病態生理学にとって重要であり得るいくつかの仮説がある。ビタミンＫレベルと自閉症重症度の改善との間の相関の報告もまたある。いくつかの同じケースでは、腸内微生物叢によるユビキノールおよび／またはメナキノール産生の変調したレベルは、男性の脳の発達に対する不均衡な効果を有し得る。

【００７５】

いくつかのケースでは、ユビキノールおよび／またはメナキノール生合成の変調は、個体におけるＡＳＤと関連し得る。従って、ある種のケースでは、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、ユビキノール（例えば、補酵素Ｑ、６～１３炭素イソプレノイド鎖のユビキノール）および／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のレベルの変調は、ＡＳＤと関連し得る。ある種のケースでは、１つ以上の神経学的定型の個体に対して相対的に、メナキノール（例えば、メナキノン－４、６～１３炭素イソプレノイド鎖のメナキノール）および／またはその代謝物（例えば下流代謝物）の１つ以上のレベルの変調は、ＡＳＤと関連し得る。いくつかのケースでは、（例えば、神経学的定型の個体に対して相対的に）ユビキノール、メナキノール、および／またはその代謝物のより低いレベルは、ＡＳＤと関連し得る。いくつかのケースでは、（例えば、神経学的定型の個体に対して相対的に）ユビキノール、メナキノール、および／またはその代謝物のより高いレベルは、ＡＳＤと関連し得る。従って、いくつかの態様において、方法は、１つ以上の神経学的定型の個体におけるレベルに対して相対的に変調（例えば、増大、減少）している、対象からのサンプル中のユビキノール、メナキノール、および／またはその代謝物のレベルに基づいて、対象がＡＳＤの少なくとも１つのサブタイプ（例えばコリスミ酸サブタイプ）を有するまたは発症するリスクがあることを決定することを含む。サンプルは、本明細書に記載されるいずれかのサンプル（例えば、糞便サンプル、胃腸サンプル、血清サンプル、ＣＳＦサンプル）であり得る。

【００７６】

従って、いくつかの態様において、ユビキノールおよびメナキノールのレベルは、対象におけるＡＳＤの診断および／または処置を支援するために、対象からのサンプルにおいて評価および／または対象において調節され得る。

【００７７】

シデロホア

いくつかの態様において、シデロホアがコリスミ酸代謝経路内の分子の非限定的な例である。シデロホアの非限定的な例はエンテロバクチンである。いくつかのケースでは、イソコリスミ酸シンターゼ酵素（例えばＥｎｔＣ）が、コリスミ酸からエンテロバクチンを産生する方への第１のステップにおいて、コリスミ酸をイソコリスミ酸に変換する。シデロホアは、典型的には、金属をかけたヒトと細菌との間の戦いにおける病原性因子と考えられる。しかしながら、いくつかの研究はC. elegansの成長に対するエンテロバクチンの有益な役割を示している。C. elegansにおけるこの表現型はミトコンドリア機能にリンクしており、ミトコンドリア機能不全はＡＳＤの小児で観察されている。

【００７８】

いくつかのケースでは、シデロホア（例えばエンテロバクチン）のレベルは、神経学的定型の個体に対して相対的に、ＡＳＤを有する個体において変調（例えば、増大、減少）し得る。いくつかのケースでは、神経学的定型の個体に対して相対的に、シデロホア（例

えばエンテロバクチン）のより低いレベルがＡＳＤと関連し得る。いくつかのケースでは、神経学的定型の個体に対して相対的に、シデロホア（例えばエンテロバクチン）のより高いレベルがＡＳＤと関連し得る。従って、いくつかの態様において、方法は、１つ以上の神経学的定型の個体におけるレベルに対して相対的に変調（例えば、増大、減少）している対象からのサンプル中のシデロホア（例えばエンテロバクチン）のレベルに基づいて、対象がＡＳＤの少なくとも１つのサブタイプ（例えばコリスミ酸サブタイプ）を有するまたは発症するリスクがあることを決定することを含む。サンプルは、本明細書に記載されるいずれかのサンプル（例えば、糞便サンプル、胃腸サンプル、血清サンプル）であり得る。

【００７９】

従って、いくつかの態様において、シデロホアのレベルは、対象におけるＡＳＤの診断および／または処置を支援するために、対象からのサンプルにおいて評価および／または対象において調節され得る。

【００８０】

コリスミ酸サブタイプおよび介入

いくつかの態様は、ＡＳＤのコリスミ酸サブタイプを診断および／または処置するための方法および組成物を対象とする。

【００８１】

いくつかの態様に従うと、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する対象の診断を支援する方法は、対象から得られたサンプル中のコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを決定することを含む。いくつかの態様において、方法は、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルが閾値よりも高いまたは低い場合に、対象がＡＳＤ（例えば、ＡＳＤのコリスミ酸サブタイプ）を有するまたは発症するリスクがあることを決定することをさらに含む。

【００８２】

いくつかの態様において、コリスミ酸代謝経路内の分子はコリスミ酸の上流または下流代謝物である。コリスミ酸の上流代謝物の非限定的な例は、Ｄ－エリトロース－４－リン酸、ホスホエノールピルビン酸、３－デオキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロソン酸－７－リン酸、３－デヒドロキナ酸、３－デヒドロシキミ酸、シキミ酸、シキミ酸３－リン酸、および５－Ｏ－(カルボキシビニル)－３－ホスホシキミ酸を包含する。コリスミ酸の下流代謝物の非限定的な例は、芳香族アミノ酸（例えば、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン）およびそれらの代謝物（例えば、セロトニン、メラトニン、キヌレニン、インドール）、葉酸およびその誘導体（例えばテトラヒドロ葉酸）、ユビキノール（例えば補酵素Ｑ）、メナキノール、ならびにシデロホア（例えばエンテロバクチン）を包含する。

【００８３】

いくつかの態様において、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを決定することは、対象から得られたサンプル中に存在するコリスミ酸代謝スーパー経路内の１つ以上の遺伝子の存在量を決定することを含む。ある種の態様では、１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、サンプル中に存在する１つ以上の核酸の少なくとも一部を増幅して、複数のアンプリコンを形成することを含む。１つ以上の核酸は、当技術分野で公知のいずれかの核酸増幅法（例えばＰＣＲ、ｑＰＣＲ）に従って増幅されて、複数のアンプリコンを形成し得る。いくつかの態様において、１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、複数のアンプリコンの１つ以上のアンプリコンをシーケンシングすることをさらに含む。１つ以上のアンプリコンは、当技術分野で公知のいずれかの核酸シーケンシング法（例えば、ロングリードシーケンシング法、ショートリードシーケンシング法）に従ってシーケンシングされ得る。

【００８４】

いくつかの場合において、対象から得られたサンプル中に存在するコリスミ酸代謝スーパー経路内の１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、サンプル中に存在する微生物の１６Ｓリボソーム ＲＮＡ（ｒＲＮＡ）の少なくとも一部をシーケンシングすること（例

えば、１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子アンプリコン（１６Ｓ）シーケンシングを行うこと）を含む。いくつかの場合において、対象から得られたサンプル中に存在するコリスミ酸代謝スーパー経路内の１つ以上の遺伝子の存在量を決定することは、ショットガンメタゲノムシーケンシングを行ってサンプルのメタゲノム内容をシーケンシングすることを含む。

【００８５】

いくつかの態様において、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを決定することは、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを測定することを含む（例えば、ＨＰＬＣ、ＬＣ－ＭＳ、ＧＣ－ＭＳ、および／またはＭＡＬＤＩ－ＴＯＦを使用する）。

【００８６】

いくつかの態様は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有するかまたはＡＳＤを発症するリスクがある対象を処置する方法を対象とする。ＡＳＤの併存疾患の例は、強迫性障害（ＯＣＤ）、注意欠陥障害（ＡＤＤ）、注意欠陥多動性障害（ＡＤＨＤ）、てんかん、統合失調症、睡眠障害、胃腸障害、肥満、易刺激性、不安、抑うつ、および摂食障害を包含するが、これらに限定されない。

【００８７】

ある種の態様では、対象はＡＳＤのコリスミ酸サブタイプを有する。いくつかのケースでは、対象から得られたサンプルは、対象がコリスミ酸に基づく介入に応答することが蓋然的であり得ることを指示する組成存在量の１つ以上の分子および／または微生物特徴量を含み得る。ある種のケースでは、１つ以上の分子および／または微生物特徴量は、enterobacteriales、Ｌ－アルギニン分解産物、および／またはエンテロバクチンを含む。ある種のケースでは、１つ以上の分子および／または微生物特徴量はコリスミ酸代謝スーパー経路の１つ以上の代謝物を含み、シキミ酸、コリスミ酸、トリプトファン、セロトニン、メラトニン、フェニルアラニン、チロシン、葉酸（例えばテトラヒドロ葉酸）、ユビキノール（例えば補酵素Ｑ）、およびメナキノールを包含するが、これらに限定されない。いくつかのケースでは、対象から得られたサンプルは、対象がコリスミ酸に基づく介入に応答することが蓋然的であり得ることを指示する存在量の１つ以上の遺伝子（例えば、コリスミ酸代謝スーパー経路内の１つ以上の遺伝子）を含み得る。

【００８８】

いくつかの態様において、対象を処置する方法は、対象におけるコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節して、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和することまたはＡＳＤを発症するリスクを低減することを含む。いくつかの態様において、レベルを調節することは、レベルを増大させることを含む。いくつかの態様において、レベルを調節することは、レベルを減少させることを含む。いくつかのケースでは、レベルは対象の腸で調節される。

【００８９】

いくつかの態様において、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することは、コリスミ酸、コリスミ酸（chorismic acid）、および／またはそのどちらかの塩もしくはエステルを含む組成物を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することは、コリスミ酸プロドラッグを含む組成物を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することは、コリスミ酸代謝物（および／またはコリスミ酸代謝経路に関わる別の分子）を含む組成物を対象に投与することを含む。ある種の態様では、組成物は、コリスミ酸、コリスミ酸（chorismic acid）、および／またはそのどちらかの塩もしくはエステル、ならびに１つ以上のコリスミ酸プロドラッグを含む。ある種の態様では、組成物は、コリスミ酸、コリスミ酸（chorismic acid）、および／またはそのどちらかの塩もしくはエステル、ならびに１つ以上のコリスミ酸代謝物（および／またはコリスミ酸代謝経路に関わる１つ以上の他の分子）を含む。ある種の態様では、組成物は、１つ以上のコリスミ酸プロドラッグおよび１つ以上のコリスミ酸代謝物（および／またはコリスミ酸代

謝経路に関わる１つ以上の他の分子）を含む。１つ以上のコリスミ酸代謝物は、１つ以上の上流コリスミ酸代謝物（例えばシキミ酸）および／または１つ以上の下流コリスミ酸代謝物（例えば、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、セロトニン、メラトニン、インドール、ユビキノール、メナキノール、例えばメナキノン－４、テトラヒドロ葉酸、エンテロバクチン）を含み得る。コリスミ酸代謝経路に関わる１つ以上の他の分子は、１つ以上の酵素（例えば、１つ以上のコリスミ酸分岐点酵素）および／またはコリスミ酸代謝経路の制御に関わる１つ以上の分子（例えば、アデノシルコバラミン、コバラミン（ビタミンＢ１２としてもまた公知））を含み得る。

【００９０】

いくつかの態様において、組成物は、１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、塩、添加剤、または他の薬剤を含む医薬組成物として提供され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、経腸的に、非経口的に、またはいずれかの他の好適な経路を介して投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、経口的に、直腸に、静脈内に、筋肉内に、吸入を介して、および／または局所的に投与され得る。いくつかの場合には、組成物（例えば医薬組成物）は、錠剤形態、ゼラチンカプセル形態、カプセル形態、液体形態、または経口投与に好適ないずれかの他の形態であり得る。いくつかのケースでは、組成物（例えば医薬組成物）は、組成物の活性成分のｐＨ依存的なおよび／または時間依存的な放出を提供するように構成されたコーティングまたは他のシステムを含み得る。ある種の場合において、組成物（例えば医薬組成物）は、ｐＨ依存的な結腸放出コーティングを含むカプセルを含み得る。いくつかの場合には、組成物（例えば医薬組成物）は静脈内投与のために構成される。

【００９１】

いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、薬学的に許容される担体（例えば、組成物が共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または基剤）を含む。かかる薬学的担体は、無菌の液体、例えば水および油であり得、鉱油などの石油、落花生油、大豆油、およびゴマ油などの植物油、動物油、または合成起源の油のものを包含する。生理食塩水溶液ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液もまた、液体担体として採用され得る。

【００９２】

いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、有効量で、例えば、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和する（例えば、その始まり、進行、および／もしくは重症度を遅延または低減する）ために十分な量で、対象に投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、対象がＡＳＤを発症するリスクを低減するために十分な量で対象に投与される。いくつかの場合には、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することは、コリスミ酸摂取を増大させるために対象の食事を改変することを含む。

【００９３】

ある種の態様では、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを調節することは、コリスミ酸代謝経路における１つ以上の酵素の発現および／または活性を調節する（例えば、増大させる、減少させる）組成物（例えば医薬組成物）を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、１つ以上の酵素のアゴニスト、アンタゴニスト、活性化因子、および／または阻害剤を含む。いくつかの態様において、１つ以上の酵素はコリスミ酸分岐点酵素を含む。いくつかの態様において、コリスミ酸ムターゼが調節される。いくつかの態様において、コリスミ酸リアーゼが調節される（例えば阻害される）。いくつかの態様において、イソコリスミ酸シンターゼが調節される（例えば阻害される）。いくつかの態様において、アミノデオキシコリスミ酸シンターゼ（ＰＡＢＡシンターゼとしてもまた公知）が調節される（例えば阻害される）。いくつかの態様において、アントラニル酸シンターゼが調節される。

【００９４】

ある種の態様では、コリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子のレベルを

調節することは、対象の胃腸管においてコリスミ酸および／またはコリスミ酸代謝経路内の分子を産生する微生物の量を調節する（例えば、増大させる、減少させる）組成物（例えば医薬組成物）を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、１つ以上の抗生物質、プレバイオティクス化合物、および／またはプロバイオティクス化合物を含む。ある種のケースでは、１つ以上の抗生物質はバンコマイシン、フィダキソマイシン、および／またはメトロニダゾールを含む。

【００９５】

いくつかの態様において、ＡＳＤを発症するリスクを低減ならびに／あるいはＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を処置する方法は、コリスミ酸に関係する遺伝子の典型的な描像を模倣するならびに／あるいはコリスミ酸に関係する遺伝子の典型的な描像を回復させる様式でマイクロバイオームを調節する微生物を提供することを含む。いくつかの態様において、１つ以上のコリスミ酸に関係する分子のサプリメントを提供することは、コリスミ酸に関係する遺伝子の典型的な描像の方へとマイクロバイオームを導くために有用であり、よって、自閉症の症状の１つ以上を処置することを助け得る。

【００９６】

組成物（例えば医薬組成物）はいずれかの年齢の対象（例えば、小児、成人）に投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は慢性的に投与され得る。ある種の態様では、組成物（例えば医薬組成物）は、３０日、３ヶ月、６ヶ月、９ヶ月、１年、３年、５年、１０年、または２０年を超える期間にわたって投与され得る。ある種の態様では、組成物（例えば医薬組成物）は、１～３ヶ月１～６ヶ月、１～９ヶ月１ヶ月～１年、１ヶ月～３年、１ヶ月～５年、１ヶ月～１０年、１ヶ月～２０年、３～６ヶ月、３～９ヶ月、３ヶ月～１年、３ヶ月～３年、３ヶ月～５年、３ヶ月～１０年、３ヶ月～２０年、６～９ヶ月、６ヶ月～１年、６ヶ月～３年、６ヶ月～５年、６ヶ月～１０年、６ヶ月～２０年、１～３年、１～５年、１～１０年、１～２０年、３～５年、３～１０年、３～２０年、５～１０年、５～２０年、または１０～２０年の期間にわたって投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、毎日、毎週、毎月、またはより短いもしくはより長い時間間隔で投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、ＡＳＤリスクの指標の１つ以上のバイオマーカーが低減されるまで投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために十分な量で投与される。

【００９７】

微生物

いくつかの態様に従うと、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する対象の診断を支援する方法は、対象から得られたサンプル中の１つ以上の微生物特徴量（例えば微生物）および／またはそれらの副産物（例えば毒素）の存在量を決定することを含む。いくつかの態様において、方法は、１つ以上の微生物特徴量（例えば微生物）および／またはそれらの副産物（例えば毒素）の存在量が閾値よりも高いまたは低い場合に、対象がＡＳＤ（例えば、ＡＳＤのSarcinaサブタイプ）を有するまたは発症するリスクがあることを決定することをさらに含む。

【００９８】

微生物の非限定的な例は、Sarcina、Prevotella（例えばP. stercorea）、Bifidobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Proteobacteria、Eggerthella lenta、Enterobacteriaceae、Aeromonas、Agrobacterium、Enterococcus、Actinobacillus、Lactobacillus、および／またはStreptococcusを包含する。ある種の態様では、微生物はSarcina細菌である。ある種の態様では、微生物はSarcina ventriculi（Clostridium ventriculiとしてもまた公知）を含む。ある種の態様では、微生物はClostridium perfringensを含む。いくつかのケースでは、そのサンプルが（例えば、神経学的定型の個体に対して相対的に）Sarcina細菌の上昇したレベルを有する対象は、ＡＳＤのSarcinaサブタイプを有すると言われ得る。

【００９９】
いくつかの態様は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有するかまたはＡＳＤを発症するリスクがある対象を処置する方法を対象とする。ある種の態様では、対象はＡＳＤのSarcinaサブタイプを有する。いくつかの態様において、方法は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために、対象における１つ以上の微生物（例えば、S. ventriculiおよび／または他のSarcina細菌）のレベルを調節することを含む。いくつかのケースでは、１つ以上の微生物のレベルが対象の腸で調節される。いくつかの態様において、１つ以上の微生物のレベルを調節することは、レベルを減少させることを含む。ある種の場合において、レベルを調節することは、１つ以上の抗生物質および／またはファージ治療を含む組成物を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、レベルを調節することは、レベルを増大させることを含む。ある種の場合において、１つ以上の微生物のレベルを調節することは、１つ以上のプレバイオティクスおよび／またはプロバイオティクスを含む組成物を対象に投与することを含む。

【００１００】
いくつかの態様において、組成物（例えば、１つ以上の抗生物質、バクテリオファージ、プレバイオティクス化合物、および／またはプロバイオティクス化合物を含む組成物）は、１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、塩、添加剤、または他の薬剤を含む医薬組成物として提供され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、経腸的に、非経口的に、またはいずれかの他の好適な経路を介して投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、経口的に、直腸に、静脈内に、筋肉内に、吸入を介して、および／または局所的に投与され得る。いくつかの場合には、組成物（例えば医薬組成物）は、錠剤形態、ゼラチンカプセル形態、カプセル形態、液体形態、または経口投与に好適ないずれかの他の形態であり得る。いくつかのケースでは、組成物（例えば医薬組成物）は、組成物の活性成分のｐＨ依存的なおよび／または時間依存的な放出を提供するように構成されたコーティングまたは他のシステムを含み得る。ある種の場合において、組成物（例えば医薬組成物）は、ｐＨ依存的な結腸放出コーティングを含むカプセルを含み得る。いくつかの場合には、組成物（例えば医薬組成物）は静脈内投与のために構成される。

【００１０１】
いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、薬学的に許容される担体（例えば、組成物が共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または基剤）を含む。かかる薬学的担体は、無菌の液体、例えば水および油であり得、鉱油などの石油、落花生油、大豆油、およびゴマ油などの植物油、動物油、または合成起源の油のものを包含する。生理食塩水溶液ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液もまた、液体担体として採用され得る。

【００１０２】
いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、有効量で、例えば、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和する（例えば、その始まり、進行、および／もしくは重症度を遅延または低減する）ために十分な量で、対象に投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、対象がＡＳＤを発症するリスクを低減するために十分な量で対象に投与される。

【００１０３】
組成物（例えば医薬組成物）はいずれかの年齢の対象（例えば、小児、成人）に投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は慢性的に投与され得る。ある種の態様では、組成物（例えば医薬組成物）は、３０日、３ヶ月、６ヶ月、９ヶ月、１年、３年、５年、１０年、または２０年を超える期間にわたって投与され得る。ある種の態様では、組成物（例えば医薬組成物）は、１～３ヶ月１～６ヶ月、１～９ヶ月１ヶ月～１年、１ヶ月～３年、１ヶ月～５年、１ヶ月～１０年、１ヶ月～２０年、３～６ヶ月、３～９ヶ月、３ヶ月～１年、３ヶ月～３年、３ヶ月～５年、３ヶ月～１０年、３ヶ月～

２０年、６～９ヶ月、６ヶ月～１年、６ヶ月～３年、６ヶ月～５年、６ヶ月～１０年、６ヶ月～２０年、１～３年、１～５年、１～１０年、１～２０年、３～５年、３～１０年、３～２０年、５～１０年、５～２０年、または１０～２０年の期間にわたって投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、毎日、毎週、毎月、またはより短いもしくはより長い時間間隔で投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、ＡＳＤリスクの指標の１つ以上のバイオマーカー（例えばSarcina細菌のレベル）が低減されるまで投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために十分な量で投与される。

【０１０４】

プロトンフラックス

いくつかの態様に従うと、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有する対象の診断を支援する方法は、対象から得られたサンプルから、対象の胃腸管におけるプロトンフラックスのレベルを決定することを含む。いくつかの態様において、方法は、プロトンフラックスのレベルが閾値よりも高い場合に、対象がＡＳＤ（例えば、ＡＳＤのプロトンフラックスサブタイプ）を有するまたは発症するリスクがあることを決定することをさらに含む。

【０１０５】

いくつかの態様は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を有するかまたはＡＳＤを発症するリスクがある対象を処置する方法を対象とする。ある種の態様では、対象はＡＳＤのプロトンフラックスサブタイプを有する。いくつかの態様において、方法は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために、対象の胃腸ｐＨを調節することを含む。いくつかの態様において、ｐＨを調節することは、ｐＨを増大させることを含む。いくつかの態様において、ｐＨを調節することは、ｐＨを減少させることを含む。いくつかの態様において、胃腸ｐＨを調節することは、対象の胃腸ｐＨを調節するように構成された組成物または処置を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、組成物または処置は１つ以上のプロトンポンプ阻害剤を含む。プロトンポンプ阻害剤の非限定的な例は、オメプラゾール、ランソプラゾール、パントプラゾール、ラベプラゾール、エソメプラゾール、デクスランソプラゾール、およびそれらの誘導体を包含する。いくつかの態様において、組成物または処置は、結腸放出のために製剤された次サリチル酸ビスマスまたはその誘導体を含む。

【０１０６】

いくつかの態様において、組成物（例えば、１つ以上のプロトンポンプ阻害剤および／または次サリチル酸ビスマスもしくはその誘導体を含む組成物）は、１つ以上の薬学的に許容される緩衝剤、塩、添加剤、または他の薬剤を含む医薬組成物として提供され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、経腸的に、非経口的に、またはいずれかの他の好適な経路を介して投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、経口的に、直腸に、静脈内に、筋肉内に、吸入を介して、および／または局所的に投与され得る。いくつかの場合には、組成物（例えば医薬組成物）は、錠剤形態、ゼラチンカプセル形態、カプセル形態、液体形態、または経口投与に好適ないずれかの他の形態であり得る。いくつかのケースでは、組成物（例えば医薬組成物）は、組成物の活性成分のｐＨ依存的なおよび／または時間依存的な放出を提供するように構成されたコーティングまたは他のシステムを含み得る。ある種の場合において、組成物（例えば医薬組成物）は、ｐＨ依存的な結腸放出コーティングを含むカプセルを含み得る。いくつかの場合には、組成物（例えば医薬組成物）は静脈内投与のために構成される。

【０１０７】

いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、薬学的に許容される担体（例えば、組成物が共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または基剤）を含む。かかる薬学的担体は、無菌の液体、例えば水および油であり得、鉱油などの石油、落花生

油、大豆油、およびゴマ油などの植物油、動物油、または合成起源の油のものを包含する。生理食塩水溶液ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液もまた、液体担体として採用され得る。

【０１０８】

いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、有効量で、例えば、ＡＳＤおよび／またはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和する（例えば、その始まり、進行、および／もしくは重症度を遅延または低減する）ために十分な量で、対象に投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、対象がＡＳＤを発症するリスクを低減するために十分な量で対象に投与される。

【０１０９】

組成物（例えば医薬組成物）はいずれかの年齢の対象（例えば、小児、成人）に投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は慢性的に投与され得る。ある種の態様では、組成物（例えば医薬組成物）は、３０日、３ヶ月、６ヶ月、９ヶ月、１年、３年、５年、１０年、または２０年を超える期間にわたって投与され得る。ある種の態様では、組成物（例えば医薬組成物）は、１～３ヶ月１～６ヶ月、１～９ヶ月１ヶ月～１年、１ヶ月～３年、１ヶ月～５年、１ヶ月～１０年、１ヶ月～２０年、３～６ヶ月、３～９ヶ月、３ヶ月～１年、３ヶ月～３年、３ヶ月～５年、３ヶ月～１０年、３ヶ月～２０年、６～９ヶ月、６ヶ月～１年、６ヶ月～３年、６ヶ月～５年、６ヶ月～１０年、６ヶ月～２０年、１～３年、１～５年、１～１０年、１～２０年、３～５年、３～１０年、３～２０年、５～１０年、５～２０年、または１０～２０年の期間にわたって投与され得る。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、毎日、毎週、毎月、またはより短いもしくはより長い時間間隔で投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、ＡＳＤリスクの指標の１つ以上のバイオマーカー（例えば高いプロトンフラックス）が低減されるまで投与される。いくつかの態様において、組成物（例えば医薬組成物）は、ＡＳＤおよび／もしくはＡＳＤの併存疾患の１つ以上の症状を緩和するためにまたはＡＳＤを発症するリスクを低減するために十分な量で投与される。

【０１１０】

ＡＳＤを有するかまたは発症する対象のリスクを評価するための技術およびシステム

いくつかの態様において、ひとたび１つ以上の特性（例えば、分子および／または微生物特徴量の存在量）が対象からのサンプルから決定されると、１つ以上の特性は、ＡＳＤを有するかもしくは発症する対象のリスクを評価するためにおよび／または対象に提供するべき処置を同定するために、リスク分析手段によって分析され得る。リスク分析手段は、ソフトウェアに、例えば１つ以上のサーバ、１つ以上の実験デバイス（例えば、糞便サンプルなどのサンプルを受容、調製、および分析する実験デバイス）、１つ以上のパーソナルコンピューティングデバイスもしくはモバイルコンピューティングデバイス、または他のデバイスによって実行される実行可能な命令に実装され得る。

【０１１１】

リスク分析手段によって動作するいくつかのかかる態様では、ＡＳＤを有するかもしくは発症する対象のリスクの分析および／または処置を同定するための分析は、いくつかの態様において、１つ以上のルールを使用して行われ得る。例えば、ルールまたはルールの組み合わせが満たされるときに、対象は、ＡＳＤのより高いもしくはより低いリスクを有することが決定され得るか、または特定の処置の候補であることもしくはないことが見出され得る。かかるルールは、いくつかのケースでは、対象のマイクロバイオーム内に検出される１つ以上の分子のレベルおよび／もしくは微生物の型、または分子および／もしくは微生物の量もしくは相対量に関し得る。１つの特定の例として、対象の糞便サンプルが、糞便サンプル内の特定の微生物のある相対存在量を実証する場合に、患者は、ＡＳＤの増大したリスクがあることが見出され得る。

【０１１２】

いくつかの態様において、ルールに基づく分析に加えてまたは代替として、リスク分析手段は、ＡＳＤを有するかもしくはＡＳＤを発症する対象のリスクを評価するためにまた

は患者に提供するべき処置を同定するために、訓練された機械学習モデルを活用し得る。機械学習モデルを実装するいくつかの態様において、かかる機械学習モデルは、ＡＳＤと診断された人々の集団およびＡＳＤと診断されなかった人々の集団の１つ以上の特性（例えば、分子および／または微生物特徴量の存在量）に基づいて訓練され得る。訓練の結果として、サンプル特性（例えば、分子および／または微生物特徴量の存在量）とＡＳＤの存在もしくは非存在および／またはある種の特性の成功または成功の欠如との間の関係性を学習し得る。いくつかのかかる態様では、ひとたびサンプルを分析することによって１つ以上の特性が得られると、１つ以上の特性は機械学習モデルに入力され得る。いくつかのかかる態様では、機械学習モデルは、クラスのセットの特定のクラスへの対象のマイクロバイオームのまたは対象の分類を出力することによって応答し得る。各クラスは、ＡＳＤを有するかもしくは発症するリスクもしくは特定のリスクレベル、および／または特定の処置の候補であることもしくはないことと関連し得る。他の態様では、各クラスは、加えてまたは代替的に、ＡＳＤのサブタイプに関係し得る。ここで、ＡＳＤの各サブタイプはリスクレベル、対象が有し得るかまたは発症し得るＡＳＤの型、対象が経験し得る症状の蓋然的な組み合わせ、症状の重症度、あるいは対象が有するかまたは発症するリスクがあり得るＡＳＤ状態の他の特性に対応する。いくつかの態様においては、単一のクラスを出力するよりもむしろ、機械学習エンジンは、１つ以上のクラスのセットと、各クラスについて、対象がそのクラスに正しく分類される機械学習エンジンによって計算された尤度を指示するクラスに関連した信頼レベルとを出力し得る。それから、各々、リスク分析手段によって尤度が評価されて、対象が分類されることが同定されるであろうクラスの１つ以上を同定し得る。例えば、最も高い尤度を有するクラスは、対象が当てはまるクラスとして同定され得る。別の例として、第１の閾値よりも上の尤度を有するクラスのみがさらに分析され、対象がマッチングすることが同定されるであろうクラス（単数または複数）であるクラスの中から決定がなされ得る。例えば、最も高いものが同定され得るか、または閾値量を超える１つ以上のクラスが他のクラスよりも蓋然的であり得る。

【０１１３】

リスク分析手段を使用する態様では、ひとたび対象が何らかの基準（単数または複数）に当てはまることがリスク分析手段によって同定されると（例えば、ルール分析、機械学習分析、例えば分類、または別の分析によって）、リスク分析手段は、それから、基準（単数または複数）と整合する診断または処置ワークフローを開始し得る。例えば、ワークフローは、満たされた基準（単数または複数）の決定を臨床医（例えば、検査技師、医師、看護師など）に出力することを包含し、それらの基準（単数または複数）の満足と関連するリスク、診断、処置推奨、または他の情報を関連させ得る。別の例として、ワークフローは、処置を処方すること、例えば、基準（単数または複数）にまたはリスクもしくは処置推奨に関連する処置のための処方オーダーを開始することを包含し得る。別の例として、ワークフローは、発達モニタリングもしくはスクリーニング、または医師（例えば、心理学者、神経科医、もしくは他の医師）による他の評価などのフォローアップ分析をオーダーして、リスクもしくは処置推奨を確認することまたは処置計画に情報提供するためのリスクについての追加の情報を得ることを包含し得る。ＡＳＤもしくはＡＳＤの併存疾患を発症するリスクを低減するためにまたはその症状を鎮静もしくは緩和するために対象に提供するべき処置を同定する態様では、種々の好適な治療が活用され得る。いくつかの態様において、治療は、対象のリスクを評価するか、またはＡＳＤを有するもしくは発症することに使用される微生物特徴量などの微生物特徴量に関係し得る。かかる治療は、特定の微生物の成長を促すために、患者のマイクロバイオームに１つ以上の特定の微生物をまたは１つ以上の化合物（例えば、薬物、薬など）を導入するための処置を包含し得る。成長を促すためのかかる処置は、プロバイオティクスまたはプレバイオティクスの投与を包含し得る。かかる治療は、加えてまたは代替的に、例えば抗生物質またはファージ治療によって、対象のマイクロバイオームから微生物を除去することまたは特定の微生物の成長を阻止することを試みるための処置を包含し得る。かかる治療は、さらに、加えてまたは代替的に、微生物に関連する微生物分子または他の化合物（例えば、微生物から産生さ

れるかまたは派生する有益な化合物、あるいは微生物から産生されるかまたは派生する毒素または有害もしくは非有益な化合物）を導入もしくはその存在率(prevalence)を増大させるかまたは除去もしくはその存在率を減少させるための処置を包含し得る。微生物特徴量に基づく治療は、例えば、患者の現在のマイクロバイオーム組成よりも標的マイクロバイオームの組成に類似する微生物の組成を有することによって、患者のマイクロバイオームが標的マイクロバイオームにより類似するようになることを促すための治療を包含し得る。

【実施例】

【０１１４】

例１

この例では、既存のＡＳＤマイクロバイオームデータの定量的メタ分析を実施した。１６ＳリボソームＲＮＡ遺伝子アンプリコン（１６Ｓ）シーケンシング法、性別、地理学上の場所、対照の型、および年齢がＡＳＤマイクロバイオームの違いを検出すること対して有する効果、ならびにこれらの因子がＡＳＤステータスの機械学習予測の結果にどのように影響を及ぼし得るかを評価した。データは、１３の公開された症例対照コホートおよびアメリカン・ガット・プロジェクト（ＡＧＰ）からの１つのキュレーションされたコホートに由来した。コホートを個々におよび全体として分析して、ＡＳＤ腸マイクロバイオームが発達上神経学的定型の個体とどのように異なるかについての結論を導出した。

【０１１５】

包含された研究とサンプルデモグラフィック

体系的レビューおよびメタ分析のための優先的報告項目（ＰＲＩＳＭＡ）を踏襲して、１４の異なる症例対照コホートからなるデータセットをキュレーションした。もたらされたデータセットは、トータルで１，７４０のサンプルを有し、それらのうち８８８がＡＳＤと診断され、８５２は定型発達の対照であった。最も大きいコホートは、Dan et al.（ｎ＝２８６）およびChen 2020（ｎ＝２４６）からの他の大きいコホートと共に、ＡＧＰからの参加者から手作業でキュレーションされた（ｎ＝５２４）。対照の対象は、種々の選択された変数に基づく最良のマッチングを見出しながら、技術的ばらつきを厳格に管理する様式でＡＧＰから選択された。このアプローチは、ＡＧＰのＡＳＤ対象のデモグラフィックを大きく反映する対照コホートをもたらした。トータルでは、サンプルの大部分は男性からであった。これは男性における増大したＡＳＤ率の一般的傾向を踏襲している。研究は典型的には２～６歳の年齢の間の参加者を包含した。目立った例外はKong et al.およびKang et al.であり、これらはより年長を包含した。コホートのうち１３は米国（ｎ＝１０７９）および中国（ｎ＝８６６）からのサンプルを表し、Zurita et al., 2019の１つの研究はエクアドルで実施された。加えて、多数のサンプル（ｎ＝１２８０）は１６Ｓ　Ｖ４超可変領域を標的化して処理され、３５７のサンプルは１６Ｓ　Ｖ３－Ｖ４領域からシーケンシングされ、１０３はＶ１－Ｖ２領域から処理された。ほとんどの研究は、無関係な対照からの年齢および性別をマッチングしたサンプルを利用したが、２つの研究はＡＳＤの小児の兄弟を利用し、２つの研究は母親を利用した。

【０１１６】

ＡＳＤマイクロバイオームの多様性の違いの評価

マイクロバイオームの多様性がＡＳＤにおいて変調するかどうかという疑問に対処するために、複数のアルファおよびベータ多様性メトリクスを、研究毎のアプローチおよび集約データセットのアプローチの両方で評価した。ベータ多様性では、２つの共通に利用される距離メトリクスの重みなしＵｎｉＦｒａｃおよび重み付きＵｎｉＦｒａｃを試験した。これらのメトリクスは、データセットの元のレポートの全てにおいて使用されたわけではない系統学的に情報提供されたメトリクスである。集約では、重みなしＵｎｉＦｒａｃ距離メトリクスおよび重み付きＵｎｉＦｒａｃ距離メトリクスの両方について、研究による有意なクラスタリングが観察されたが、効果は、重みなしＵｎｉＦｒａｃ距離で目立って強かった（重みなしＵｎｉＦｒａｃ　ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ　Ｐ＜０．００１、擬似Ｆ＝４２．１５；重み付きＵｎｉＦｒａｃ　ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ　Ｐ＜０．００１、擬似Ｆ＝

１８．５４）（図３Ａ～３Ｂ）。この観察は、低い存在量の研究固有の微生物が研究の分離を増大させ、研究の相違を駆動し得ることを指示し得る。研究効果よりも著しくはないが、ＡＳＤステータスによる有意なクラスタリングが、重みなしＵｎｉＦｒａｃ距離で観察されたが（ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ　Ｐ＜０．００１、擬似Ｆ＝３．９９）、重み付きＵｎｉＦｒａｃ距離では観察されなかった（ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ　Ｐ＝０．１６２、擬似Ｆ統計量＝１．４８）。強い分離もまた、使用された１６Ｓ超可変領域に関係して観察され、どの可変領域が使用されたのかを考慮に入れることの重要度が強調された。重みなしＵｎｉＦｒａｃ距離におけるシーケンシングの深度および地理学上の場所に関係する違いもまた観察されたが、これらの結果は、可変領域および研究の効果によって交絡された。

【０１１７】

サンプルがどの研究から来たのかによって駆動されるベータ多様性結果に対する強い交絡効果があったことから、各コホートをさらに個々に分析した。１４のコホートのうち８つは、重み付きまたは重みなしＵｎｉＦｒａｃ距離メトリクスどちらかからの神経学的定型の対照と比較して、ＡＳＤ腸マイクロバイオームの統計学的に有意な違いを示した（ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ　Ｐ＜０．０５）（図３Ｃ）。これらの結果は、ＡＳＤと対照との間のベータ多様性の違いを検出することにはばらつきがあるが、大部分の研究では、および集約して研究を分析するときには、それは検出され得ることを指示した。

【０１１８】

各研究を、サンプル内の微生物多様性に対するＡＳＤステータスの効果についてもまた分析した。４つのアルファ多様性メトリクスを利用した：フェイスの系統学的多様性、シャノンの多様性、均等度、および観察された特徴量（observed features）。全てのメトリクスについて、研究効果は大きく、個々に１４のコホートの各々の分析を要求した。利用した４つのアルファ多様性メトリクスの各々について、ＡＳＤと神経学的定型の対照との間のアルファ多様性値の統計学的に有意な違いを示す少なくとも３つの研究があった（スチューデントのｔ検定、Ｐ＜０．０５）（図３Ｄ）。１４のコホートのうち７つは、４つのメトリクスのうちの少なくとも１つにおいて、ＡＳＤと神経学的定型の対照との間のアルファ多様性の統計学的に有意な違いを示した（図３Ｄ）。一般的に、研究は、ＡＳＤ対象において軽度に減少したアルファ多様性を示した（観察された特徴量におけるＡＳＤ／対照の違いの中央値＝＋０．０４％、均等度＝－２．５％、シャノン＝－０．０９％、およびフェイス＝－１．２％）。これらの結果は、ＡＳＤとアルファ多様性との間の不明確な関連性を示唆した。この相違のあり得る理由はこの例で後で記載する。

【０１１９】

ＡＳＤと対照との間の微生物相対存在量の違い

ＡＳＤおよび対照の対象の間の微生物相対存在量の違いを、研究毎のレベルで評価し、異なる系統学的レベルでデータを集約した。門は一貫して有意な違いはほとんどなかった。最も共通に有意な門はBacteroidetesであり、４つの研究が統計学的有意性に達した（図４Ａ）。統計学的有意性に達しなかったにもかかわらず、コホートの大部分は増大したActinobacteriaおよびProteobacteriaを示した（図４Ａ）。特定の門の比もまた検討した。Firmicutes対Bacteroidetesの比は、Berding et al., 2020、Cao et al., 2021、Dan et al., 2020、David et al., 2021、Huang et al., 2021、Fouquier et al., 2021、Kong et al., 2019、Liu et al., 2019、およびSon et al., 2015では、ＡＳＤ個体において上昇していることが見出された（図４Ａ）。対照的に、Firmicutes対Bacteroidetesの比は、Zou et al., 2021、Chen et al., 2020、およびKang et al., 2017では減少した（図４Ａ）。この比の有意な違いは、米国および中国のサンプル間では見出されなかった。

【０１２０】

その相対存在量の有意な違いを有する最も共通の属はPrevotellaであり、これについては、５つのコホートが統計学的有意性に達した（未調整Ｐ＜０．０５）（図４Ｂ）。しかしながら、研究は、ＡＳＤ対象においてPrevotellaが増大または減少したかどうかについて分割された（図４Ｂ）。共通のＡＳＤ関連性は綱および目レベルでもまた非一貫的

に増大または減少したが、ほとんどの研究は、ＡＳＤ対象におけるEnterobacteriales綱の増大した存在量を示した。

【０１２１】

データを集約して分析したときには、データセット全体に一般化したタクソンもまたほとんどなかった。少数の目立った例外は、対照と比較してＡＳＤの小児において有意に高かったActinobacteria綱を包含する（ウィルコクソンｔ検定Ｐ＝０．００１４、図４Ｃ）。Prevotellaについての非一貫的な研究毎の知見にもかかわらず、一般的な傾向は、対照と比較してＡＳＤサンプルにおける減少を指示することが見出された（ウィルコクソンｔ検定、Ｐ＝０．０４４、図４Ｄ）。集約データの中で最も強い知見の１つは、ＡＳＤ対象における増大したBifidobacteriumとの過去の関連性を確認した（ウィルコクソンｔ検定、Ｐ＝０．０００１５、図４Ｅ）。

【０１２２】

コリスミ酸はＡＳＤで共通に変調するいくつかの微生物経路をリンクする

研究間の分類学的な非一貫性にもかかわらず、ＡＳＤ対象のマイクロバイオームによってコードされる機能的な経路は、より一般化可能であり得る。この可能性を試験するために、各サンプルの代謝経路存在量を評価し、ＡＳＤおよび対照の対象について比較した。最も共通に有意な経路を評価した後に、ＡＳＤ対象において一般的に減少しているのに対して一般的に増大している経路の２つの主要なクラスタリングパターンが観察された（図４Ｆ）。特に興味深いことに、共通に同定された経路のいくつかは、共通の分子前駆体のコリスミ酸を共有した。

【０１２３】

コリスミ酸は、ヒトには存在しないシキミ酸経路の産物である。コリスミ酸は、メナキノールおよびユビキノールを包含するいくつかの重要な分子に変換され得る。３つ以上の研究において有意であった種々のメナキノールおよびユビキノールの生合成が関わる１８の経路が同定された（図４Ｇ）。これらの経路はメナキノール６～１３の生合成を包含した。これらは、ＡＳＤ対象における有意な減少を示したZou et al.を除いて、ＡＳＤにおいて大きく増大した（図４Ｇ）。

【０１２４】

メナキノンおよびユビキノンはそれぞれ細菌の嫌気および好気呼吸に関わる不可欠な分子であり、コリスミ酸から合成され得る。

【０１２５】

芳香族アミノ酸（ＡＡＡ）もまたコリスミ酸を起源とする産物である。分析から、Ｌ－トリプトファン生合成は、４つの研究において有意に変調し（Ｐ＜０．０５）、１４の研究のうち９つにおいてＡＳＤ対象において増大した（図４Ｆ）。しかしながら、他の芳香族アミノ酸のＬ－チロシンおよびフェニルアラニンに関係する経路はそれほど共通に有意ではなかったが、Ｌ－チロシン分解は１４のコホートのうち８つにおけるＡＳＤにおいて増大した（図４Ｈ）。Ｌ－トレオニン生合成ならびにＬ－グルタミン酸およびＬ－グルタミン生合成などの他のアミノ酸に関係する経路は、各々５つのコホートにおいて有意に減少したこともまた認められた（図４Ｆ）。これらの結果は、ＡＳＤ患者のアミノ酸代謝における先に指摘された違いを支持し、分析を新たなコホートに拡張する。

【０１２６】

コリスミ酸に由来する他の分子はシデロホアおよび葉酸を包含し、これらもまたいくつかのＡＳＤ研究において変調することが見出された。エンテロバクチンは金属をキレートするシデロホアであり、これはDan et al.、Huang et al.、およびZou et al.において有意に変調することが同定された（図４Ｈ）。テトラヒドロ葉酸生合成は、４つの研究において有意に減少することがさらに同定された（図４Ｈ）。さらに、アデノシルコバラミン生合成（ビタミンＢ１２としてもまた公知）は１４のうち１０のコホートで減少し、４つのコホートは一致性のある有意性に達した（図４Ｆ）。ビタミンＢ１２は、ホモシステインからメチオニンおよびテトラヒドロ葉酸への変換を触媒し、葉酸レベルに対して律速ステップを果たす。

【０１２７】
ＡＳＤステータス予測について機械学習性能の評価
マイクロバイオームとＡＳＤとの間の関係性は非線形であり、還元主義的アプローチによって同定されることが非蓋然的であり得る。よって、種々の機械学習アプローチを利用して、ＡＳＤ腸マイクロバイオームが神経学的定型の個体のものと弁別可能であるかどうかを評価した。ＡＳＤステータスを予測する性能および正解率を、１４のデータセットの集約に対して１１の異なる分類アルゴリズムを使用して評価した（図５Ａ）。全ての１１のモデルは、０．５よりも多大な受信者動作特性曲線下面積を有することによって決定される通り、偶然よりも少なくともわずかに良好に機能した（図５Ａ）。上位の性能のモデルの勾配ブースティング分類器（ＧＢＣ）およびアダブースト分類器（ＡＢＣ）は、０．６よりも多大な曲線下面積（ＡＵＣ）で対照からＡＳＤ個体を弁別することができた（ＧＢＣ；ＡＵＣ＝０．６２±０．０３、ＡＢＣ；ＡＵＣ＝０．６１±０．０２）（図５Ａ）。適合率と再現率の両方を評価するために各モデルのＦ１スコアを使用して、ＧＢＣとＡＢＣモデルがそれぞれ０．６２±０．０３および０．６２±０．０２で機能することが見出された。各モデルの性能を、各モデルの分類正解率を評価することによって評価した。ＧＢＣおよびＡＢＣモデルの両方が、それぞれ６２％±０．０３および６１％±０．０２の最も大きいパーセントの正解率を報告した。全てのメトリクスについて、ＧＢＣはＡＳＤステータスを分類することにおいて最も良好に機能し、よって、下流分析のために選択された。

【０１２８】
初期の機械学習モデル比較はアンプリコンシーケンシングバリアント（ＡＳＶ）に対して行われたため、分類学的解像度がモデルの性能および正解率にどのようにインパクトを及ぼすかを見ることは興味深かった。７つの異なる分類学的レベル（界、門、綱、目、科、属、種、ＡＳＶ）で集約されたまたはコラプスされていないどちらかのリードカウントデータによって、ＧＢＣモデルを利用した５０回反復のランダム化された訓練・試験分割を行った。分類学的解像度を増大させることはモデルの正解率を改善し、属レベル分類を過ぎるとわずかなゲインのみを有した（図５Ｂ）。類似の傾向が、アダブースト分類器および決定木分類器の両方で同じ分析を行ったときに観察された。各データセットを個々に訓練および試験すると、ＧＢＣモデルは、３つを除く全てのデータセットで偶然よりも良好に機能し（ＡＵＣ＞０．５）、５つは０．７０よりも上のＡＵＣを有した（図５Ｂ）。これらの結果は、ＡＳＤ腸マイクロバイオームがＡＳＤステータスを評価することに有益であろう情報を含有し得ることを指示する。

【０１２９】
次に、ＡＳＤを有する個体を対照と弁別することにおける重要な特徴量を検討した。集約ＡＳＶレベルデータセットで訓練および試験されたＧＢＣモデルからの上位３つの特徴量は、Sarcina属（Clostridiaceae科）、Eggerthella lenta、およびPrevotella stercoreaからのＡＳＶであった（図５Ｃ）。上位２５の特徴量の中で、Sarcina、Pseudomonas属、およびUruburuella suisからのＡＳＶの増大した相対存在量はＡＳＤ分類にとって重要であり、TM7-3綱、Bacteroidetes門、Coporobacillus catenifomis、およびClostridium clostridioformeからのＡＳＶの増大した存在量は対照の分類にとって重要であった（図５Ｃ）。より多くの文脈を知見に提供するために、集約データセットからの上位２５の特徴量を、各個々のデータセットで生成されたＧＢＣモデル内でＡＳＤステータスを予測することに対するそれらの重要度についてさらに評価した。各データセットに対するこれらの特徴量の重要度スコアの階層的クラスタリングは、２つの主なグループ分けを明らかにした（図５Ｄ）。特に興味深いのは、全てのデータセットについて類似に高い重要度スコアを含有する特徴量の群であった。この群は、Eggerthella lenta、Sarcina属、Bilophila属、Veilonella parvula、およびMegasphaera属からのＡＳＶを包含した。これらの上位の特徴量は、研究間の結果の不均一性にもかかわらず、ＡＳＤ分類のために一貫して利用され得るいくつかの微生物特徴量があることを強調する。

【０１３０】
研究アウトカムに対する研究デザインの影響の評価
文献で報告され、この例で強調されたＡＳＤマイクロバイオームの結果のばらつきに対処するために、研究デザインの因子がＡＳＤマイクロバイオーム研究の知見にどのようにインパクトを及ぼし得るかを評価しようとした。これらの因子のいくつかは、１６Ｓシーケンシング法、地理学上の場所、性別、年齢、およびＡＳＤ対象に対する対照の対象の関係性を包含するが、これらに限定されない。１６Ｓシーケンシング法の種々の技術的選択肢について、１６Ｓ超可変領域のシーケンシング深度および選択肢の効果を評価した。
【０１３１】
データに包含された１６Ｓ超可変領域のうち、１つの研究はＶ１－Ｖ２領域を標的化し、５つの研究はＶ３－Ｖ４領域を利用し、８つの研究はＶ４領域を使用した。その可変領域を利用して実施された研究の限定された数から、Ｖ１－Ｖ２サンプルはこの分析から除外した。Ｖ３－Ｖ４可変領域を利用した研究は、ＡＳＤ対象においてPrevotella属の有意に高い相対存在量を有したが（Ｐ＝４．６１Ｅ－３）、Ｖ４領域を標的化した研究は、ＡＳＤ対象においてこの属の有意に低い相対存在量を有した（Ｐ＝５．６Ｅ－４）ことが見出された（図６Ａ）。これは、研究毎の観点からPrevotellaについてのＡＳＤ／対照の相対存在量の比を比較したときにもまた一貫していた（Ｐ＝０．０１１）（図６Ａ）。また、Prevotella属対Bacteroidetes門の比、Desulfovibrionales目、およびDeltaproteobacteria綱は、Ｖ３－Ｖ４およびＶ４領域の間で異なることが見出された（それぞれ、研究毎のウィルコクソンｔ検定Ｐ＝０．０１７、０．０１１、および０．０１１）（図６Ｂ～６Ｄ）。研究毎とは反対に、データを集約して分析すると、Ｖ３－Ｖ４研究ではDesulfovibrionalesおよびDeltaproteobacteriaについて有意な違いが見出され得るが、Ｖ４サンプルでは違いは見出されないことが指摘された（両方ともＰ＝０．０１５でＶ３－Ｖ４　ＡＳＤで減少した）。
【０１３２】
シーケンシングされた可変領域によるＡＳＤとの分類学的関連性の間の相違を同定したにもかかわらず、両方のデータセットで訓練された機械学習モデルは偶然を良好に上回って機能し、Ｖ３－Ｖ４データはＶ４データをしのいだ（それぞれ、Ｖ４およびＶ３－Ｖ４モデルについて０．６５および０．７０の平均ＡＵＣ）（図６Ｅ）。これらの結果は、シーケンシングされる１６Ｓ超可変領域に依存して生起し得る目立った分類学的違いがあり、しかしながら、Ｖ４またはＶ３－Ｖ４超可変領域どちらかを利用するときには、ＡＳＤ分類のために構築された機械学習モデルが可能であることを示唆する。
【０１３３】
シーケンシング深度について、データセットの分割が指摘された。ここでは、６つの研究が比較的低いシーケンシング深度でシーケンシングされ（サンプルあたり６，０００リード前後をシーケンシング）、８つはより高いシーケンシング深度でシーケンシングされた（サンプルあたり最小で１４，０００リードをシーケンシング）。ＡＵＣ、正解率、およびＦ１統計量によって評価された通り、最小で６，０００によるコホートのサンプルに対して、サンプルあたり最小で１４，０００リードによるコホートからのサンプルで訓練されたモデルの性能には目立った違いがあった（図６Ｅ）。高いシーケンシング深度を使用した研究からのデータで訓練されたモデルは０．７５の平均ＡＵＣを有し、低いシーケンシング深度による研究は０．５９の平均ＡＵＣを有した。しかしながら、分類学的観点からは、対照に対するＡＳＤの相対存在量の違いに対するシーケンシング深度の有意な効果は見出されなかった。これらの結果は、増大したシーケンシング深度は正確なＡＳＤ分類にとっては重要であり得るが、分類学的結果にはインパクトを及ぼさないことを示唆する。
【０１３４】
次に、研究参加者のデモグラフィックに関係する側面がＡＳＤマイクロバイオームの結果をどのように変調させ得るかを評価した。地理学上の場所の効果について、コホートは、各研究の対象がどの国からであったかによって分割された。米国の研究対中国の研究か

らのＡＳＤ対対照の相対存在量比には、統計学的に有意な違いは見出されなかった。しかしながら、国に依存してＧＢＣモデルがＡＳＤおよび対照サンプルを分類する能力には著しい違いが見出された（図６Ｆ）。モデルは、米国のサンプルでの０．６ＡＵＣに対して０．７８平均ＡＵＣで、中国のサンプルでより良好に機能することが見出された。これらの結果は、地理学上の場所が腸マイクロバイオームを利用したＡＳＤ分類の重要な因子であり得ることを示唆する。

【０１３５】

いくつかの研究は年齢および性別マッチング対照を利用したが、他の研究は兄弟または母親などの家庭内対照を使用した。対照としての関係ありの個体対無関係の個体によるものからのＡＳＤ対対照の相対存在量比には、統計学的に有意な違いは見出されなかった。関係ありの対照によるものと比較して、無関係の対照を利用したコホートからのＡＳＤおよび対照を分類するＧＢＣモデルの能力には、目立った違いが観察された（図６Ｆ）。モデルは、０．５４の平均ＡＵＣを有した関係ありの対照によるコホートと比較して、０．７１の平均ＡＵＣで、無関係の対照によるコホートのサンプルで良好に機能した。これは、対照がＡＳＤ個体と無関係であるときには、対照と比較して、ＡＳＤ個体の微生物プロファイルに大きい違いがあり得ることを指示している。

【０１３６】

性別が微生物プロファイリングならびにＡＳＤおよび対照個体の機械学習モデルの診断正解率にどのように影響を及ぼすかもまた評価した。サンプルを性別によって分割し、女性のＡＳＤステータスを予測するためのモデルのＡＵＣを男性と比較した（図６Ｆ）。男性サンプルからのＡＳＤステータスを予測することについては、より多大な正解率が観察され、女性サンプルからの０．５５のＡＵＣに対して０．６７の平均ＡＵＣを有した（図６Ｆ）。研究毎に基づくＡＳＤ　ｖｓ．対照の分類学的違いは、各データセット内の女性の限定された数を原因として調べなかった。しかしながら、女性のものと比較して、男性サンプルからのＡＳＤステータスの予測正解率の違いは、微生物プロファイリングおよびその後の予測精度に対する性別の影響を指示し得る。

【０１３７】

腸マイクロバイオームの微生物組成はヒトの発達中に遷移することが公知である。それゆえに、サンプルの年齢がＡＳＤステータスを予測する能力にどのように影響を及ぼすかを評価した。これをするために、データを、１～１６歳のあらゆるあり得る年齢範囲でサブセット化し、ＡＳＤステータスを予測することにおけるＧＢＣモデルの性能を比較した（図６Ｇ）。２～７歳の年齢からのサンプルが最も多大な予測正解率を得ることと、個体の年齢が増大するにつれて、モデルのＡＵＣが同時に減少することとが観察された（図６Ｇ）。知見が単純に各年齢範囲で利用可能な対応するサンプルサイズを原因とするのではないことを検証するために、第１に、ＧＢＣモデル性能に対するサンプルサイズの効果を決定し、それから、対応するサンプルサイズをプロットした。より若い対象からのサンプルは、ＡＳＤステータス予測においてサンプルサイズによって予想されるよりも良好に機能することが観察された。

【０１３８】

コリスミ酸代謝分岐点酵素

上に列挙したコリスミ酸に由来する経路の違いを評価することに加えて、コリスミ酸代謝の６つの分岐点酵素がＡＳＤ腸マイクロバイオームにおいて変調したかどうかを評価した。コリスミ酸をユビキノール生合成の方向に拘束する酵素のコリスミ酸リアーゼは、１４のコホートのうち１１においてＡＳＤ腸マイクロバイオームにおいて上方制御されることが観察され、これらについて、２つは統計学的有意性に達した（図７Ａ）。他の分枝点酵素のいずれかよりも、分枝点酵素コリスミ酸リアーゼについては、対照と比較したＡＳＤ腸マイクロバイオームのかなり大きい違いがあることが観察された。ＡＳＤサンプルが、それらの対照のカウンタープロットよりも多大な数のコリスミ酸リアーゼ酵素を有するかどうかを見るために、正規化された酵素数を各サンプルについて算出し、ＡＳＤ個体および対照についての数を各研究について比較した（図７Ｂ）。５つのコホートは、ＡＳＤ

腸マイクロバイオームにおいて、予測されるコリスミ酸リアーゼ酵素数の統計学的に有意な違いを示したことが示された（図７Ｂ）。

【０１３９】

最後に、コリスミ酸に関係する最も共通に有意な経路の１つは、種々のメナキノールの生合成であった。これが、メナキノール特異的イソコリスミ酸シンターゼであるメナキノールの産生にコリスミ酸を拘束することを担う分岐点酵素の増大または減少を原因とし得るかどうかを検討することが望まれた。イソコリスミ酸シンターゼはコリスミ酸をエンテロバクチン生合成およびメナキノール生合成の両方に変換することが立証されており、同じ酵素番号（ＥＣ　５．４．４．２）に分類される。いくつかの細菌種に見出され、コリスミ酸をメナキノール生合成に拘束する、イソコリスミ酸シンターゼｍｅｎＦをさらに検討した。ｍｅｎＦの予測される遺伝子カウントを調べ、それが対照と比較してＡＳＤ糞便サンプルにおいて多少とも濃縮されていたかどうかを評価した。３つの研究は、ｍｅｎＦの予測される遺伝子存在量の統計学的に有意な違いを示した（図７Ｃ）。有意性には達しなかったが、研究の大部分は、ＡＳＤ腸マイクロバイオームにおけるメナキノール特異的イソコリスミ酸シンターゼの増大を示した（図７Ｃ）。この傾向は、先に言及されたメナキノール生合成経路全体について観察されたものに匹敵する（図４Ｈ）。

【０１４０】

次の目標は、どの細菌がｍｅｎＦ遺伝子を含有するかを同定することであった。各コホートのｍｅｎＦ遺伝子を含有する細菌が同定された。細菌のヒートマップを作成して、各コホートにおいてそれらがどのくらいの存在率であるかを評価した（図７Ｄ）。ｍｅｎＦ遺伝子を持つ細菌のうちの４つは、機械学習モデルから対照のＡＳＤ分類にとって重要な細菌であった（図５Ｃ）。機械学習分類モデルのためのこれらの細菌の増大した重要度は、コリスミ酸、コリスミ酸に関係する代謝物、またはコリスミ酸変換酵素がＡＳＤ腸マイクロバイオームにおいて重要であり、有望な治療標的をなし得ることをさらに解明した。

【０１４１】

結果の考察

この例では、既存のＡＳＤ腸マイクロバイオームデータを再分析し、データセット間の共通性および相違の綿密な報告を提供するための体系的アプローチを取った。研究デザインの側面がＡＳＤ分類のために設計された機械学習モデルの分類学的知見および正解率に影響を及ぼす程度を試験した。異なるデータ処理アプローチにおける種々の選択肢、およびこれらの選択が導入するばらつきから、一貫した方法論を使用してデータを再分析することが重要であった。異なる分類学的レベルにおけるマイクロバイオームのアルファ多様性、ベータ多様性、および相対存在量の違いに対処するために、データセットによって、ＡＳＤマイクロバイオームが対照個体とどのように異なるかについての共通の疑問を再検討した。アルファ多様性の違いが観察されたかどうかでは、混合した結果が見出され、対照と比較したＡＳＤ個体のベータ多様性の違いにはやや多くの一貫性を有した。共通に報告されていることを、可変領域、対照関係性、年齢、性別、および地理学上の場所などの因子に基づいてデータを分析することによって、ならびに機械学習モデルを利用することによって拡張し、マイクロバイオームデータを使用するＡＳＤステータスの分類に対するこれらの因子のインパクトを推定した。

【０１４２】

この例は、技術的選択肢およびコホートデモグラフィックの両方が結果をどのように変調させるかを評価することによって、ＡＳＤマイクロバイオーム技術分野をコンテキスト化する。微生物組成は、異なるヒト集団間においておよび技術的選択肢に基づいて様々であることが公知である。注目すべきことに、米国のコホートからのデータｖｓ．中国のコホートからのデータに基づく機械学習モデルの診断能の有意な相違が観察された。１つの可能な説明は、米国よりも中国におけるより重症のＡＳＤコホートの収集である。これを支持するのは、中国におけるＡＳＤの有病率が過小評価され得ることと、真の有病率の率は米国のものにより近くあり得ることとを示唆する報告である。これは、中国におけるＡＳＤ診断の小児は、それらの西洋のカウンターパートよりも重症のケースを表し得ること

を指示し得る。代替的には、その結果は、異なる国が社会経済的なステータス、食事、生活条件、および環境因子が異なる集団を表すことの結果でもまたあり得る。

【０１４３】

より若い年齢でのＡＳＤステータスを予測する増大した能力もまた、特に興味深いことが見出された。これは、マイクロバイオームに基づく診断スクリーニングツールを開発することが早期診断を容易にし得ることを示唆し、今日までＡＳＤに利用可能な限定された診断ツールから、これは多大に興味深くあり得る。これらの結果が、ＡＳＤの病態における年齢のクリティカルウィンドウを表すこともまた可能である。しかしながら、サンプルが属した研究におけるバイアス、または２～７歳のＡＳＤのケースがより年長の小児のものよりも重症のケースを表す潜在的可能性を包含する、多くの交絡因子が存在する。

【０１４４】

ＡＳＤとの分類学的関連性における研究の相違について、最も重要な因子は１６Ｓ超可変領域の選択肢であることが見出された。Ｖ４コホートに対するＶ３－Ｖ４コホートの ＡＳＤ　ｖｓ．対照におけるPrevotella対Bacteroidetesの比、Prevotella属、Desulfovibrionales目、およびDeltaproteobacteria綱について、研究毎およびサンプル毎の相対存在量の両方に、一致性のない結果が見出された。Prevotellaは、Ｖ４データセットではＡＳＤにおいて増大したように見えるが、それはＶ３－Ｖ４コホートではＡＳＤにおいて減少したということは、特に興味深かった。Ｖ３－Ｖ４領域はＤＮＡのより大きい部分（これらの研究では約３００ｂｐ　ｖｓ．約１５０ｂｐ）を表し、そのため、これについての１つのあり得る説明は、より長いまたはより短いリード長に基づくリードの様々な分類学的割り当てであり得る。

【０１４５】

大きい研究のばらつきにもかかわらず、ＡＳＤ腸マイクロバイオームのいくつかの一貫した傾向がコホート間で同定された。最も大きい分類学的な一貫性は、ＡＳＤ個体において、門および綱レベルの両方におけるActinobacteriaの濃縮、ならびに増大したBifidobacterium、およびPrevotellaの一般的な減少であった。Bifidobacterium属（Actinobacteria門）は、一生の早期のヒトの発達に重要であるが、その後、それは絶対嫌気細菌に取って代わられる。いくつかのケースでは、Bifidobacteriumの増大した存在率は、未発達の腸マイクロバイオームの指標であり得る。

【０１４６】

ＡＳＤ腸マイクロバイオームによってコードされる予測される機能的な経路の間のいくつかの一貫性もまた見出された。コリスミ酸は、ＡＡＡ、メナキノン、ユビキノン、エンテロバクチン、および葉酸を包含するいくつかの生物学的に関連のある分子の合成のための共通の分岐点である。これらの下流代謝物に関係するいくつかの経路は、ＡＳＤ腸マイクロバイオームにおいて変調することが見出された。興味深いことに、コリスミ酸生合成は酵素の５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰＳ）に依存的であり、これはグリホサートの標的である。いくつかのケースでは、グリホサートレベルは、ＡＳＤ率および変調したマイクロバイオームにリンクし得る。

【０１４７】

方法

文献検索戦略と選択基準

自閉スペクトラム症および腸マイクロバイオームを評価する適用可能な研究を同定するために、発足から２０２１年７月１５日までのＰｕｂＭｅｄデータベースの体系的な文献検索を行った。次の検索語句を、フリーテキストの単語のみとしてまたはキーワードとして使用した：ＡＳＤ（または自閉スペクトラム症もしくは自閉症）および（腸マイクロバイオームもしくは腸内微生物叢または糞便マイクロバイオーム）。他の検索機能または高度な言語制限は使用しなかった。このメタ分析では、（ａ）自閉症患者の糞便微生物叢サンプルおよび／または定型発達の個体のものが取られ；（ｂ）データおよびそれぞれのメタデータがリトリーブ可能かつ解釈可能であり；かつ（ｃ）自閉症診断がヘルスケア専門家によって与えられた場合の論文が包含された。文献検索から、トータルで２４４の研究

を組み入れについて評価した。２４４の研究のうち、３６の研究は、ＡＳＤにおけるマイクロバイオームの役割が研究されたコホートを指示し、それらの組み入れ適格性を評価するために詳しく読まれた。トータルで１２の研究が上に記載された組み入れ基準を満たし、この分析に包含された。まだ公開されていなかったが原稿準備中に公開されたそのメタデータと共にシーケンスリードアーカイブ（ＳＲＡ）に寄託された１つのデータセットが同定された。最後に、アメリカン・ガット・プロジェクト（ＡＧＰ）から生成されたオープンソースデータを利用して、ＡＳＤの小児および対照の追加のデータセットをカルティベーションした。傾向スコアアルゴリズムを設計して、各ＡＳＤ対象について最良のマッチングの対照の対象を同定した。一緒にすると、これらの１４のコホートは、広範囲の年齢および地理学上の場所からの、トータルで８８８のＡＳＤサンプルおよび定型発達の個体の８５２の対照サンプルを生じた。

【０１４８】

除外基準

公知の技術的効果を最小化することを目標として、ショットガンメタゲノムシーケンシング法、Ｒｏｃｈｅ　４５４シーケンシング、および／または１６Ｓ　ｒＲＮＡパイロシーケンシングのみを利用した研究は包含されなかった。それゆえに、１５の研究は、不適合なシーケンシング法のため、分析から除外された。他の８つの研究は組み入れ基準を満たしたが、公的に利用可能なメタデータを有さなかった。全ての８人の著者に問い合わせたが、メタデータの要求に返信はなく、それゆえに分析に包含することはできなかった。

【０１４９】

アメリカン・ガット・プロジェクトからコホートをコンパイル

ＡＧＰデータセットは、１５，０００を超える参加者からのサンプルを含有し、それゆえに、標的のコホートをコンパイルするための多様なデータセットを表す。全ての利用可能な１６Ｓデータおよびメタデータは、Qiita.ucsd.edu（https://qiita.ucsd.edu/study/description/10317）からダウンロードされた。医師によってＡＳＤと診断された対象からの糞便サンプルを第１に同定し、各ＡＳＤ対象の特徴量に基づく対照コホートをコンパイルした。よって、２つの主なステップ：スコア付けおよびマッチングからなる傾向スコアマッチングに基づく方法を適合させた。特定のメタデータ特徴量（実行日、サンプルタイプ、および性別）の完全なマッチングを有すること、ならびに他のメタデータ特徴量（年齢、ＢＭＩ、シー・セクション、国、糖尿、抗生物質歴、プロバイオティクス頻度、調理済み食品の頻度、アレルギー、調理方法頻度、赤肉頻度、発酵食品消費、全粒穀物の頻度、ビタミンＢ補充頻度、植物蛋白質頻度、ビタミンＤ頻度、野菜の頻度、てんかん、または発作障害）から算出された最も近い「類似性スコア」を有することに基づき、ＡＳＤコホートの各サンプルについて、対応する対照サンプルを選択した。完全なマッチングは、選ばれた特徴量が管理されることを許容した。例えば、シーケンシングラン間の技術的ばらつきを管理するために、対照サンプルがＡＳＤサンプルと同じシーケンシング実行日から来ることが要求された。他方で、類似性スコアは、単純に、メタデータ特徴量のベクトルを与えられたコホート割り当ての条件付き確率であった。このやり方で、マッチングした対照サンプルは、ＡＳＤサンプルのものと同じではないにしても類似のメタデータ特徴量分布を有する対照コホートのサブセットを表した。

【０１５０】

類似性スコアを算出するためには、各特徴量を、第１に、scikit-learnバージョン0.24.2からのOneHotEncoderクラスを使用してバイナリ化した（https://scikit-learn.org/）。それから、これらの特徴量をscikit-learnのロジスティック回帰クラスを使用して当てはめた。ここで、従属変数はコホートステータスであった（すなわち、ＡＳＤコホートについて１；対照コホートについて０）。類似性スコアはシグモイド関数の出力であり、これもまたＡＳＤコホートに割り当てられることの予測された確率であった。

【０１５１】

マッチングプロセスの間には、ＡＳＤコホートの各サンプルからの類似性スコアを、その「完全なマッチング」の変数が同じであったあらゆる対照サンプルからの類似性スコア

と比較した。それから、最も近い類似性スコアを有する対照サンプルを対照コホートに入れ、その後のマッチングラウンドのための可能な対照サンプルとして除去した。あらゆるＡＳＤサンプルをマッチングした後に、固有のサンプルの、そのサンプルサイズがＡＳＤコホートのものと同じであった対照コホートを得た。

【０１５２】

データ取得

ＮＣＢＩシーケンスリードアーカイブ（ＳＲＡ）に公的に寄託されたデータについて、サンプルメタデータを、SRA Run Selectorツールを使用して各プロジェクトからダウンロードした（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces）。github（https://github.com/mortonjt/GetData）で利用可能なカスタムスクリプト（process_experiment.py）を使用して、データテーブルに体系的にダウンロードし、プライマーをトリミングし、サンプルを処理した。データおよびサンプルメタデータがＳＲＡに寄託されなかったケースでは、それらは元の研究の著者らから直接提供され、下に記載される同一のパラメータを使用して処理された。

【０１５３】

標準化された１６Ｓ処理パイプライン

１つの目標は、体系的かつ調和的なやり方で各研究を収集し、再処理して、異なる処理方法によって課される誤差を低減し、ＡＳＤ腸マイクロバイオームおよび全体としてのデータセットについてのより良好な結論の導出を可能にすることであった。各研究は、個々にQIIME 2（v.2020.8）ソフトウェアによる同じ処理ステップを利用して処理された。全てのサンプルもまたを同じパイプラインで一緒に処理して、結論を導出し、全体としての集約データについての傾向を暴いた。体系的処理パイプラインの第１のステップは、必要とされたときのプライマーの除去およびデマルチプレックスであり、カスタムスクリプトprocess_experiment.pyを利用した。次に、全ての配列を１５０ｂｐの長さにトリミングした。トリミング後に、配列をデブラーQIIME 2 2020.8プラグインを使用してデノイズおよびフィルタリングした。分類学的な分類は、QIIME 2（QIIME 2 v.2020.8）によって提供される全長１６Ｓで予めフィッティングされたGreenGenesによって訓練されたナイーブ・ベイズ分類器（gg-13-8-99-nb-classifier.qza）で、QIIME 2 q2-feature-classifierプラグインによって行った。系統学的な配置はQIIME 2（v.2020.8）からのSEPP fragment insertionプラグインによって割り当てられた。SEPPは、短いリードを参照系統に割り当てることによって超可変領域の効果を最小化するように選ばれた。ツリーにアラインメントされていない全ての特徴量は、q2-fragment-insetion filter-features QIIME 2 2020.8プラグインによって除去された。もたらされたテーブルはＡＳＶレベルリードカウントであり、これらは全ての下流分析に使用された。

【０１５４】

アルファおよびベータ多様性分析に先行して、リード数が非常に低いいずれかのサンプルをフィルタリングしながら、各コホートからの配列を、最大のリード数を可能な限り保持するために必要な深度まで独立して希薄化した。集約データについて、もたらされたテーブルを、core-phylogenetic QIIME 2 v.2020.8プラグインによって６０００のシーケンシング深度に希薄化した。アルファ多様性を、core-phylogenetic QIIME 2 v.2020.8プラグインからのフェイスの系統学的多様性、シャノンの多様性、種の均等度、および観察された特徴量によって評価した。重みなしＵｎｉＦｒａｃおよび重み付きＵｎｉＦｒａｃ距離行列もまた、core-phylogenetic QIIME 2 v.2020.8プラグインを使用して算出し、ベータ多様性距離および対応する主座標分析（ＰＣｏＡ）プロットを計算するために使用した。

【０１５５】

アルファ多様性、ベータ多様性、分類学的および機能的違いの分析

集約データおよび研究毎のレベルの分析の両方について、全ての倍数変化、相対存在量、経路存在量、および機械学習比較分析の前に、サンプルあたり６，０００リード未満を

含有する全てのサンプルをフィルタリングした。カスタムPython（バージョン3.6.0）スクリプトを使用して分析を行った。群間のベータ多様性距離の統計学的有意性を、QIIME 2 beta-group-significanceを使用して算出し、報告されたp値を、並べ替え多変量分散分析（ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ）を使用して算出した。ＡＳＤおよび対照の対象のアルファ多様性の間の違いは、研究間の大きいばらつきを原因として、コホート毎のみに基づいて行った。SciPyバージョン1.5.2（https://scipy.org/）を使用して算出されたＡＳＤおよび対照の対象の平均値から、ＡＳＤ対対照のアルファ多様性ｌｏｇ２比をNumPyバージョン1.19.1で行った（https://numpy.org/）。各コホートについてのｌｏｇ２倍率変化の有意性を、SciPyバージョン1.5.2において、仮定された不等分散による未調整の両側ｔ検定によって評価した。

【０１５６】

言及された各分類学的レベルの研究毎のｌｏｇ２倍率変化について、サンプルを、第１に、サンプルあたりのトータルリードによってＡＳＶリードカウントを割ることによって、相対存在量に対して正規化した。相対存在量は、Pandasバージョン0.25.3（https://pandas.pydata.org/）を使用して各分類学的レベルで合計した。研究毎のレベルで、ＡＳＤおよび対照の対象の平均値のｌｏｇ２比をSciPyバージョン1.5.2を使用して算出し、NumPyバージョン1.19.1でｌｏｇ変換した。統計学的有意性は、上に記載されたアルファ多様性のものと同じ様式で評価した。強調された有意なタクソンについての各サンプルにおけるｌｏｇ１０変換された相対存在量は、Pandasバージョン0.25.3で行った。ｌｏｇ１０変換を原因とする無限大の場合を回避するために、NumPyバージョン1.19.1を利用して、最小の非ゼロに正規化された相対存在量値を全てのサンプルに追加した。次に、プロットの前に、各サンプルの正規化された相対存在量をNumPyバージョン1.19.1でｌｏｇ１０変換した。

【０１５７】

微生物の機能的なプロファイルを、Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States（Picrust2）ソフトウェア（v.2019.1）を使用して１６Ｓデータから推定した。もたらされた経路存在量のテーブルを、上に記載された通り、ＡＳＤおよび対照の対象の間の違いについて分析した。全ての数値は、Rバージョン4.0.5のggplot2バージョン3.3.3を使用して生成された。

【０１５８】

ＡＳＤステータスの機械学習分類

マイクロバイオームからＡＳＤステータスを予測するために、scikit-learnパッケージバージョン0.24.2（https://scikit-learn.org/）からの１１の異なる分類モデル、評価メトリクス、および補助機能を使用した。特に明記しない限り、１０回繰り返される５分割交差検証を使用して、異なる性能メトリクスの平均および分散を推定した。ハイパーパラメータ最適化は行わなかった。報告された結果は、各モデルのＲＯＣ曲線の曲線下面積（ＡＵＣ）、ならびに正解率およびＦ１スコアを包含した。

【０１５９】

異なる機械学習モデルの初期評価の間には、集約ＡＳＶレベルデータセットを使用し、各機械学習モデルを訓練および評価する前に相対存在量が合計で１になるように正規化した。次に、各研究（集約データセットを包含する）について、各タクソン（例えばClostridium）をグループ化すること、それらの生リードカウントを合計すること、および相対存在量が合計で１になるように正規化することによって、データセットを分類学的階層の異なるレベル（例えば属）でコラプスした。それから、この処理されたデータセットを、scikit-learnからのＧＢＣ、ＡＢＣ、および決定木分類器を訓練および試験するために使用した。報告された結果は、各モデルのＲＯＣ曲線の曲線下面積（ＡＵＣ）、ならびに正解率およびＦ１スコアを包含する。

【０１６０】

各特徴量の重要度を決定するために、Shapley additive explanations（ＳＨＡＰ）パッケージ（https://github.com/slundberg/shap）を、集約ＡＳＶデータセッ

トで訓練された勾配ブースティング分類器モデルに適用した。累積のＳＨＡＰ値による上位２５の最も重要な特徴量は、ＳＨＡＰパッケージのビースウォームプロット機能を使用して表示された。上位２５の特徴量の各々からの絶対ＳＨＡＰ値を各研究について平均し、seabornパッケージバージョン0.11.0（https://seaborn.pydata.org/）を使用してクラスターマップとして表示した。異なるメタデータ変数の効果を決定するために、データセット全体を、それらの対応するメタデータ特徴量によって分離した。データセットの各パーティションを５分割交差検証を使用してさらに分割し、このデータを使用して、ＡＳＤまたは対照ステータスを予測するように訓練された勾配ブースティング分類器を訓練および評価した。ＲＯＣのＡＵＣ、Ｆ１スコア、および正解率を使用してモデル性能を評価した。プロセス全体を５０回繰り返して、各性能メトリクスの標準誤差を推定した。

【０１６１】

異なる年齢範囲におけるＡＳＤの予測可能性を推定するために、１～１６歳の異なる年齢範囲にわたるＡＳＤの予測可能性を評価した。つまり、各年齢ビン（例えば１～３歳）に入るデータのサブセットのみを使用した。各年齢ビン内の十分なデータを保証するために、各ビンの下限および上限は２年分離されなければならなかった。このデータのサブセットの５分割交差検証を使用して、３０例のＧＢＣモデルを訓練し、評価した。各年齢ビンのＲＯＣ曲線の平均ＡＵＣを、seabornヒートマップを使用して表示した。無効であった年齢範囲（例えば、３～１歳）を除外し、灰色の正方形として表示した。

【０１６２】

データの利用可能性

この例で利用されたデータは、シーケンシングランアーカイブ（ＳＲＡ、https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra）に寄託された公的に利用可能なデータセットからであった。データは次の研究識別子を使用してアクセスされ得る：PRJNA282013、PRJNA578223、PRJNA642975、PRJNA453621、PRJNA644763、PRJNA687773、PRJNA624252、PRJEB27306、PRJEB27306、PRJNA529598、PRJEB42687。他のデータセットは、David et al. 2021からのデータ（http://files.cgrb.oregonstate.edu/David_Lab/ASD_study1/において利用可能）および研究識別子１０３１７でQiitaから利用可能なＡＧＰからのデータ（https://qiita.ucsd.edu/study/description/10317）を包含した。

【０１６３】

コードの利用可能性

データ処理スクリプトはGithub（https://github.com/mortonjt/GetData）で利用可能である。データ分析とビジュアル化の両方のためのノートブックもまた、Github（https://github.com/erxw/ASD_16S_metaanalysis）で利用可能である。

【０１６４】

例２

この例では、さらなるメタ分析を追加のコホートで実施した。例１で使用されたデータセットは１４のコホートからの１,７４０サンプルからなったが、この例で使用されたデータセットは、ＡＳＤおよび対照の対象についての１６Ｓシーケンシングデータの２２のコホートからの３,５８９サンプルからなった。対象の微生物叢に生起する共通に変調したタクソン、腸マイクロバイオームの間の機能的な違い、および予測される代謝フラックスを同定するためのメタ分析フレームワークを確立した。

【０１６５】

Sarcina

分類学的分析は、Sarcina属からのシーケンシングデータの存在下で、ＡＳＤステータスの潜在的なバイオマーカーを同定した。この例の成果は、全てのＡＳＤ対象の１４％前後が種の閾値存在量を含有し、対照の対象の６．４％のみが種の類似の存在量を含有したことを示唆する。

【０１６６】

図８ＡはＡＳＤおよび対照の対象の間の共通に変調した属を示す。コンパイルされた１６Ｓシーケンシングデータを属レベルでコラプスし、サンプルについての異なるメタデータ特性間で分割して、種々の因子に基づくＡＳＤと対照との間の違いを比較した。ＡＳＤ／対照の組成比較のＬｏｇ２変換された倍率変化を各因子についてプロットし、多重仮説検定のための調整された順位和検定に従う有意性を各点のサイズによって表した。四分位範囲（ＩＱＲ）を表示するボックスプロットは、データの一般的な分布を示す。目立って、SarcinaのＩＱＲは全体的に０を超えており、様々な研究因子に対してレジリエンスがあるＡＳＤステータスのバイオマーカーを示唆した。

【０１６７】

Sarcinaバイオマーカーは、Clostridium ventriculi、またはこの種と近縁であり得る。他の近縁種はClostridium perfringensを包含し、これは、頻脈、脱水、拒食症、ＧＩの問題、震え、だるさ、抑うつ、嗜眠、知覚過敏、多動性、易刺激性、発作、神経炎症、透過性の腸／血液脳関門、およびオリゴデンドロサイト細胞死を包含するＡＳＤ様症状を誘導し得るいくつかの毒素を含有することが公知である。よって、毒素（単数もしくは複数）または細菌は、ＡＳＤにおける治療的介入のための標的であり得る。

【０１６８】

図８Ｂは、ＡＳＤおよび対照の対象について、腸マイクロバイオームにおけるSarcinaの組成存在量（存在するとき）のヒストグラムを示す。図８Ｂは、ＡＳＤおよび対照の対象についての重ね合わせたカーネル密度推定（ＫＤＥ）曲線をもまた示す。ＡＳＤ　ｖｓ．対照を分類するための最適な判別境界を決定し、図８Ｂにプロットした。

【０１６９】

図８Ｃは、それらの腸マイクロバイオーム中に、閾値を超える存在量のSarcinaを含有するＡＳＤまたは対照の対象の存在量割合を記述するヒートマップである。データセットはコホートおよび研究因子によって分けられている。加えて、ＡＳＤの存在量割合と対照の存在量割合との間の違いをプロットし、この特徴量がＡＳＤ対象において高度に濃縮されたコホートおよび研究因子を示した。

【０１７０】

コリスミ酸

この例の拡張されたデータセットのメタ分析は、例１からの知見を大きく支持し、請求を強化し、コリスミ酸が蓋然的には多くのＡＳＤ対象の腸において減少する鍵分子であることを示唆した。最も共通に有意な経路の再分析では、コリスミ酸に関係する経路が高頻度であった。

【０１７１】

コリスミ酸代謝経路は、全てではないにしてもほとんどの腸マイクロバイオームに存在することが同定されており、ＡＳＤ対象は、これらの経路に向けられたそれらのマイクロバイオームのより高い割合を有した。コリスミ酸代謝に基づく判別境界の同定は、コリスミ酸代謝がＡＳＤおよび対照の対象を判別することにおいて特に良好であるコホートおよび研究因子を同定した。これらの知見は、コリスミ酸周りに基づく介入がイタリアなどの場所で特に関連性があり得、ＡＳＤ対象の性別には区別がなく、胃腸症状には関係し得ないことを示唆する。

【０１７２】

図９Ａは、ＡＳＤ腸マイクロバイオームおよび対照の横断コホートにおいて見出される最も共通に有意な経路を示すバブルプロットである。各点は、ＡＳＤ対象と対照の対象との間のＬｏｇ２組成倍率変化によって着色され、関連性が、多重仮説検定の調整なしに、順位和検定でＰ＜０．０５の有意性閾値に合格したかどうかによってサイズ分けされる。コリスミ酸に関係する経路を矢印で指示する。これらの経路は、メナキノール－７生合成スーパー経路、コリスミ酸代謝スーパー経路、ベーター－ケトアジピン酸を介する芳香族化合物の分解、メナキノール－１２生合成スーパー経路、メナキノール－１１生合成スーパー経路、デメチルメナキノール－８生合成スーパー経路、メナキノール－８生合成スーパー経路、メナキノール－１３生合成スーパー経路、およびエンテロバクチン生合成を包含

する。
【０１７３】
図９Ｂは、ＡＳＤおよび対照の対象について、腸マイクロバイオームにおけるコリスミ酸代謝スーパー経路の組成存在量（存在するとき）のヒストグラムを示す。図９Ｂは、ＡＳＤおよび対照の対象についての重ね合わせたＫＤＥ曲線をもまた示す。ＡＳＤ　ｖｓ．対照を分類するための最適な判別境界を決定し、図９Ｂにプロットした。
【０１７４】
図９Ｃは、対象の腸マイクロバイオーム中に、閾値を超える存在量のコリスミ酸代謝スーパー経路を含有するＡＳＤまたは対照の対象の存在量割合を記述するヒートマップである。データセットはコホートおよび研究因子によって分けられている。加えて、ＡＳＤ存在量割合と対照存在量割合との間の違いをプロットし、この特徴量がＡＳＤ対象において高度に濃縮されるコホートおよび研究因子を示した。
【０１７５】
図９Ｄは、コリスミ酸代謝およびマイクロバイオームの他の特徴量の相互比較を示す。ＡＳＤステータスにリンクした種々の特徴量について判別閾値を同定し、各カテゴリーの高いレベルを有することが同定されたＡＳＤ対象を、コリスミ酸代謝の増大したレベルを有することが同定されたＡＳＤ対象と比較した。図９Ｄは、列挙された各特徴量の増大した存在量を有するとしてカテゴライズされた対象間のオーバーラップを記述するベン図を示す。図９Ｄに示される通り、増大したエンテロバクチン遺伝子、メナキノール－１１遺伝子、芳香族化合物分解、およびＬ－アルギニン分解を有する患者において、強いオーバーラップが同定された。増大したenterobacterialesを有する患者は、ほぼ全体的に、増大したコリスミ酸代謝を有する患者によって表されるので、コリスミ酸代謝表現型は多くの場合にenterobacterialesによって駆動され得る。従って、いくつかの態様において、enterobacteriales、Ｌ－アルギニン分解、および／またはエンテロバクチンの組成存在量を使用して、患者がコリスミ酸介入に応答することが蓋然的であるかどうかを評価し得る。
【０１７６】
代謝フラックスの違い
ＡＳＤ対象と対照の対象との間の代謝フラックスの違いを、計算ツールＭＩＣＯＭを使用して分析した。ＭＩＣＯＭは、微生物内の代謝経路および要求される公知の栄養素の周りに構築された代謝モデルを使用し、マイクロバイオーム中に同定される総体的な種が、摂取されようとする食事を与えられて、どのように互いに相互作用するかをシミュレーションする。これらの研究では、標準「西洋食」を利用した。食事から利用可能なコリスミ酸の量を増大させたカスタマイズされた「西洋食」もまた開発された。
【０１７７】
図１０Ａは、ＡＳＤ腸マイクロバイオームおよび対照の横断コホートにおいて見出される最も共通に有意な経路を示すバブルプロットである。各点は、ＡＳＤ対象と対照の対象との間のＬｏｇ２倍率変化によって着色され、関連性が、多重仮説検定の調整なしに、順位和検定でＰ＜０．０５の有意性閾値に合格したかどうかによってサイズ分けされている。ＡＳＤおよび対照の対象の間で最も共通に異なる代謝フラックスの違いには、ニコチンアミドモノヌクレオチド（ＮＭＮ）、３－メチル－２－オキソペンタン酸、Ｌ－フェニルアラニン、ニコチンアミド、フマル酸、コリスミ酸、Ｌ－チロシン、Ｌ－セリン、グリシル－Ｌ－チロシン、およびグリシルフェニルアラニンがあった。
【０１７８】
ＡＳＤ対象のサブグループに対応するそれらの潜在的可能性について、異なる特徴量を調べると、プロトンフラックスは有望な候補であるように見え、ここでは、ＡＳＤ対象のマイクロバイオームの１４％が自由なプロトンの高い流入を指示した。この表現型は、Ding2020およびKong2019コホートにおいて、ならびにエクアドル、韓国で実施され、腸マイクロバイオームをプロファイリングするためにＶ３Ｖ４可変領域を使用した研究において特に顕著であった。図１０Ｂは、ＡＳＤおよび対照の対象の腸マイクロバイオーム

によるプロトンの流入（存在するとき）の分布を記述する重ね合わせたＫＤＥ曲線を有するヒストグラムを示す。ＡＳＤ　ｖｓ．対照を分類するための最適な判別境界を決定し、図１０Ｂにプロットした。

【０１７９】

図１０Ｃは、それらの腸マイクロバイオームによるプロトンの閾値を超える流入を含有するＡＳＤまたは対照の対象の存在量割合を記述するヒートマップである。データセットはコホートおよび研究因子によって分けられている。加えて、ＡＳＤの存在量割合と対照の存在量割合との間の違いをプロットし、この特徴量がＡＳＤ対象において高度に濃縮されたコホートおよび研究因子を示す。

【０１８０】

コリスミ酸に関係する代謝物は、ＡＳＤ対象の腸内微生物叢による差次的摂取を有する分子として高頻度で同定されるため、代謝流入分析は、ＡＳＤ腸マイクロバイオームの機能的な分析に基づく主張（ＡＳＤ処置のためにコリスミ酸経路分子を調節すること）をさらに支持する。これらの分子はＬ－フェニルアラニン、Ｌ－チロシン、およびコリスミ酸を包含する。結果は、ＮＭＮ、フマル酸、および／またはプロトンがＡＳＤ病理学にとって重要であり得ることをさらに示唆する。例えば、いくつかのＡＳＤ対象において見出される増大したプロトンフラックスは、それらの腸ｐＨがより酸性であることを指示し得る。これらの対象のためのあり得る介入は、ＧＩ　ｐＨを減少させることであり得る。従って、いくつかの態様において、治療的介入は、ＡＳＤを有するかまたはそのリスクがある対象のＧＩ　ｐＨを減少させるために、１つ以上の組成物を投与することを含む。

【０１８１】

主要サブタイプの相互比較

ＡＳＤのいくつかの有望なバイオマーカーを同定したため、各群内の対象を相互比較して、これらがＡＳＤの別個のサブタイプであるかどうかを同定した。この分析のために、コリスミ酸代謝スーパー経路について設定された閾値を超えたＡＳＤ対象を、バイオマーカー「Sarcina」を含有するＡＳＤ対象と、および高いレベルのプロトン流入を含有する患者と比較した。結果は、これらのＡＳＤ集団における非常に少しだけのオーバーラップを見出し、それらが、どの標的化された治療薬が個体にとって最も良好に働き得るかを同定するために各サブタイプを同定するための診断アプローチを必要とし得るＡＳＤの別個のサブタイプであり得ることを示唆した。最も大きいサブタイプについては、ＡＳＤ対象の少なくとも１８％が、コリスミ酸に基づく介入から利し得ることが推定された。さらに、ＡＳＤ対象の少なくとも１３．８％がＧＩ　ｐＨ調整に基づく介入から利し、ＡＳＤ対象の１３．５％が、Clostridium ventriculiを標的化する介入から利し得ることが推定された。

【０１８２】

図１１は、この例からのＡＳＤの３つの最も主要なサブタイプの患者集団を相互比較するアップセット図を示す。左下の棒グラフは、各サブタイプの患者数を対応するパーセンテージと共に示す。右下は、上の各棒グラフに対応する特定のサブタイプへの参加を指示している。各棒グラフは、各サブタイプへの参加を有するＡＳＤ対象の数を示し、各バーはＡＳＤ対象の国に依存して着色されている。各亜集団によって表されるトータルの集団のパーセンテージが各バーの上にプロットされている。

【０１８３】

コリスミ酸介入

コリスミ酸およびコリスミ酸に由来する分子を代謝するためのより高いキャパシティを有するＡＳＤの亜集団を同定したため、これらの患者の食事中のコリスミ酸を増大させることが患者のマイクロバイオームの代謝の摂取に対して有するであろうインパクトを評価した。この分析のために、コリスミ酸の食事フラックスを１桁増大させ、ＭＩＣＯＭシミュレーションをメタ分析研究の全ての対象で再実行した。腸内微生物叢による各代謝物のトータルの流入を、標準食から得られる流入と比較した。ＡＳＤのコリスミ酸サブタイプにおける流入の違いを他の全てのＡＳＤ対象と比較し、これらの群間の最も高い統計学的

に有意な代謝物をランク付けした。分析は、ＡＳＤの病理学の鍵であり得るいくつかの代謝物の著しい有意な違いを同定し、行動上のインパクトを有するトリプトファンの誘導体のインドール、葉酸、コリスミ酸、Ｌ－チロシン、およびメナキノン８を包含した。これらの研究は、公知の神経毒である３－メチル－２－オキソペンタン酸およびＮＭＮを包含する他の興味深い代謝物の違いをもまた同定した。これらの代謝物の各々の平均の流入は、これらの対象におけるコリスミ酸介入によって減少したが、より多大な集団では有意には変化しなかった。腸内微生物叢によるこれらの代謝物のこの減少した流入は、コリスミ酸の増大した利用可能性が、コリスミ酸の下流代謝物を分解するためのある種の種の必要性を排することを指示し得る。これはさらに、この患者集団に対するコリスミ酸の介入が、グリホサート曝露または他の機序を原因とするコリスミ酸の減少した利用可能性の補償として、コリスミ酸の下流の種々の代謝物の分解量を減少させることによって意図された作用機序を有し得ることを指示する。

【０１８４】

図１２Ａは、増大したコリスミ酸を与えられたときに増大したコリスミ酸代謝遺伝子を有するＡＳＤ対象において変調した上位３０の代謝物を示す。コリスミ酸および非コリスミ酸ＡＳＤサブタイプについて、コリスミ酸で改変された西洋食の有無によるフラックスの違いの間の平均の順位和統計比較に基づく－Ｌｏｇ１０（ＦＤＲ調整ｐ値）の棒グラフを図示する。

【０１８５】

図１２Ｂ～１２Ｅは、それらのシミュレーションされた食事中の増大したコリスミ酸を与えられたときの、コリスミ酸サブタイプまたは他の対象のＡＳＤについてのフラックスの違いの分布を示すボックスプロットを示す。各ボックスプロットの上には、対応のない補正されたウェルチのＴ検定に基づく有意性マーカーがある。

【０１８６】

シミュレーションされたコリスミ酸介入研究は、コリスミ酸が、ある種のＡＳＤ対象における鍵代謝物（例えば、Ｌ－チロシン、葉酸、インドール、メナキノン８）のレベルを変調させるために利用され得ることを指示している。それらは、コリスミ酸の投与が、コリスミ酸の下流代謝物の摂取に対する腸内微生物の依拠を減少させることが蓋然的であり得ることを実証している。ＡＳＤの種々の症状または併存疾患におけるこれらの下流代謝物についての先行する知見から、それはコリスミ酸がこれらの機構により介入し得ることを示唆する。

【０１８７】

例３

この例では、コリスミ酸が、ＡＳＤの２つの別個のげっ歯類モデル：グリホサート（ラウンドアップともまた言われる）またはバルプロ酸どちらかに対する出生前曝露を処置するために投与される。

【０１８８】

自閉スペクトラム症は、別個の病因：変調したマイクロバイオーム、ウイルス感染、および遺伝学から出現する。ＡＳＤ患者のあるサブセットは、それらの腸内微生物叢によってコードされるコリスミ酸代謝経路上の変調を所有し得る。コリスミ酸補充はＡＳＤ症状を緩和し得、ＡＳＤの少なくとも「コリスミ酸サブタイプ」のための可能な処置であり得る。この例では、コリスミ酸が、ＡＳＤの２つの別個のげっ歯類モデル：グリホサート（ラウンドアップともまた言われる）またはバルプロ酸どちらかに対する出生前曝露を処置するために投与される。グリホサートはシキミ酸経路によるコリスミ酸の合成に直接的に干渉し、げっ歯類においてＡＳＤ様行動を誘導することが示されている。バルプロ酸の厳密な作用機序は不明確なままであるが、バルプロ酸に曝露された母親から産まれたげっ歯類もまた、多くのＡＳＤ様行動表現型を見せる。

【０１８９】

この例は、ＡＳＤのげっ歯類モデルの行動の主症状の社会性の欠如に焦点を当てている。これは下に記載される３チャンバーアッセイを使用して測定される。二次的な尺度は、

腸マイクロバイオームの代謝および微生物プロファイルを包含する。
【０１９０】
実験方法
誘導－バルプロ酸
交配日指定妊娠Ｃ５７Ｂ１／６匹の雌に、妊娠１２．５日目に基剤（０．９％生理食塩水）またはバルプロ酸（ＶＰＡ）（５００ｍｇ／ｋｇ；５００μＬ；腹腔内）を投与する。雄の仔は３週齢（Ｐ２１）で離乳させ；雌の仔は安楽死させる。
【０１９１】
誘導－グリホサート
交配日指定妊娠Ｃ５７Ｂ１／６匹の雌に、胎生５日目（Ｅ５）から生後２１日目（Ｐ２１）まで、定期的な飲料水またはグリホサート添加水（１７５ｍｇ／ｋｇ；約０．１％）をトータルで３７日間投与する。雄の仔は３週齢（Ｐ２１）で離乳させ；雌の仔は安楽死させる。
【０１９２】
処置－コリスミ酸
離乳時（Ｐ２１）に、動物を群飼し、体重測定し、毎日モニタリングし、糞便サンプルを毎週収集する。各群の動物の半分に、定期的な飲料水または飲料水中のコリスミ酸のどちらかを投与する。２４時間毎に飲料水を交換する。
【０１９３】
リードアウト－社会性
行動の一次リードアウトは、３チャンバーアッセイを使用した動物の社会性である。このアッセイでは、長方形のアリーナが３つのチャンバーを有し、対象マウスはチャンバー間を自由に歩くことを許される。
【０１９４】
Ｐ５６で、マウスがチャンバー内で５分間慣れることを許す。それから、一対の空の小さいワイヤケージを左右のチャンバーの両側に置く。ワイヤケージの１つには、見知らぬ（よそ者）マウスが導入される。対象マウスが、３つのチャンバー間を１０分間自由に探索することを許す。ビデオ追跡が、対象マウスが各チャンバーで過ごす時間の量を記録する。
【０１９５】
Ｐ６６で、動物を安楽死させる。血液（血漿）、結腸内容（瞬間凍結）、盲腸内容（瞬間凍結）、および脳（瞬間凍結）を安楽死時に収集する。
【０１９６】
予想される結果
先の研究は、対照の対象マウス（誘導および処置のための対照）が、空のケージを有するチャンバーよりも、よそ者マウスを有するチャンバーにおいて２～５×多くの時間を過ごすことを好むことを示している。
【０１９７】
これらの研究は、バルプロ酸またはグリホサートに対する出生前曝露を有する対象マウスが、鍵のＡＳＤ様行動表現型の、チャンバー間で大体等しい時間を過ごし、社会的選好を見せないこととをもまた示している。
【０１９８】
対照的に、バルプロ酸またはグリホサートに対する出生前曝露を有するがコリスミ酸によって処置された対象マウスは、対照マウスのものに類似の社会的選好を見せ、空のケージを有するチャンバーよりも、よそ者マウスを有するチャンバーにおいて２～５×多くの時間を過ごすはずである。
【０１９９】
コリスミ酸は正常な神経発生に必要であるが、社会性を促進するための基質ではないという仮説もまた立てられる。つまり、コリスミ酸で処置された対照マウス（誘導の対照）は、対照マウス（誘導および処置の対照）と比較されたときに高まった社会性を見せない

。

【０２００】

【表１－１】

表1. コリスミ酸代謝スーパー経路に関わる遺伝子

遺伝子ID	遺伝子アクセッション	遺伝子名		反応 EC	酵素活性
EG10508	b0421	ispA	GPPSYN-RXN	2.5.1.1	ゲラニルニリン酸シンターゼ
EG10079	b0754	aroG	DAHPSYN-RXN	2.5.1.54	3-デオキシ-7-ホスホヘプツロン酸シンターゼ
EG10080	b1704	aroH	DAHPSYN-RXN	2.5.1.54	3-デオキシ-7-ホスホヘプツロン酸シンターゼ
EG10078	b2601	aroF	DAHPSYN-RXN	2.5.1.54	3-デオキシ-7-ホスホヘプツロン酸シンターゼ
EG10262	b0583	entD	ENTDB-RXN	2.7.8.7	ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ
EG12221	b3475	acpT	ENTDB-RXN	2.7.8.7	ホロ-[アシルキャリア蛋白質]シンターゼ
EG10247	b2563	acpS	ENTDB-RXN	2.7.8.7	ホロ-[アシル-キャリア-蛋白質]シンターゼ
EG10264	b0586	entF	ENTF-RXN	EC# なし	L-セリン-[ホロEntF]リガーゼ
EG10260	b0595	entB	ENTF-RXN	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10262	b0583	entD	ENTF-RXN	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10264	b0586	entF	ENTF-RXN	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10263	b0594	entE	ENTF-RXN	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10262	b0583	entD	RXN-15889	2.7.8.7	ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ
EG11375	b2153	folE	GTP-CYCLOHYDRO-I-RXN	3.5.4.16	GTPシクロヒドロラーゼI
EG11138	b1865	mudB	H2NEOPTERINP3PYROPHOSPHOHYDRO-RX	3.6.1.67	ジヒドロネオプテリン三リン酸ジホスファターゼ
EG11673	b3058	folB	H2NEOPTERINALDOL-RXN	4.1.2.25	ジヒドロネオプテリンアルドラーゼ
EG11374	b0142	folK	H2PTERIDINEPYROPHOSPHOKIN-RXN	2.7.6.3	2-アミノ-4-ヒドロキシ-6-ヒドロキシメチルジヒドロプテリジンジホスホキナーゼ
EG10264	b0586	entF	RXN-15890	EC# なし	L-セリン-[ホロEntF]リガーゼ
EG10260	b0595	entB	RXN-15890	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10262	b0583	entD	RXN-15890	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10264	b0586	entF	RXN-15890	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10263	b0594	entE	RXN-15890	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10074	b3389	aroB	3-DEHYDROQUINATE-SYNTHASE-RXN	4.2.3.4	3-デヒドロキナ酸シンターゼ
EG10076	b1693	aroD	3-DEHYDROQUINATE-DEHYDRATASE-RXN	4.2.1.10	3-デヒドロキナ酸デヒドラターゼ
EG10077	b3281	aroE	SHIKIMATE-5-DEHYDROGENASE-RXN	1.1.1.25	シキミ酸デヒドロゲナーゼ
EG10082	b0388	aroL	SHIKIMATE-KINASE-RXN	2.7.1.71	シキミ酸キナーゼ
EG10081	b3390	aroK	SHIKIMATE-KINASE-RXN	2.7.1.71	シキミ酸キナーゼ
EG10073	b0908	aroA	2.5.1.19-RXN	2.5.1.19	3-ホスホシキミ酸1-カルボキシビニルトランスフェラーゼ
EG10075	b2329	aroC	CHORISMATE-SYNTHASE-RXN	4.2.3.5	コリスミ酸シンターゼ
EG11028	b1264	trpE	ANTHRANSYN-RXN	4.1.3.27	アントラニル酸シンターゼ
EG11027	b1263	trpD	ANTHRANSYN-RXN	4.1.3.27	アントラニル酸シンターゼ
EG11027	b1263	trpD	PRTRANS-RXN	2.4.2.18	アントラニル酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ
EG11026	b1262	trpC	PRAISOM-RXN	5.3.1.24	ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ
EG11026	b1262	trpC	IGPSYN-RXN	4.1.1.48	インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ

【表１－２】

EG11024	b1260	trpA	RXN0-2381	4.1.2.8	インドールグリセロールリン酸アルドラーゼ
EG11024	b1260	trpA	RXN0-2381	4.1.2.8	トリプトファンシンターゼ
EG11025	b1261	trpB	RXN0-2381	4.1.2.8	トリプトファンシンターゼ
EG11025	b1261	trpB	RXN0-2382	4.2.1.122	トリプトファンシンターゼ
EG11024	b1260	trpA	RXN0-2382	4.2.1.122	トリプトファンシンターゼ
EG11025	b1261	trpB	RXN0-2382	4.2.1.122	トリプトファンシンターゼ
EG10707	b2599	pheA	CHORISMATEMUT-RXN	5.4.99.5	コリスミ酸ムターゼ
EG11039	b2600	tyrA	CHORISMATEMUT-RXN	5.4.99.5	コリスミ酸ムターゼ
EG10707	b2599	pheA	PREPHENATEDEHYDRAT-RXN	4.2.1.51	プレフェン酸デヒドラターゼ
EG10497	b3770	ilvE	RXN-10814	2.6.1.1/2.6.1.27/2.6.1.57	フェニルアラニントランスアミナーゼ
EG10096	b0928	aspC	RXN-10814	2.6.1.1/2.6.1.27/2.6.1.57	フェニルアラニントランスアミナーゼ
EG11040	b4054	tyrB	RXN-10814	2.6.1.1/2.6.1.27/2.6.1.57	フェニルアラニンアミノトランスフェラーゼ
EG11039	b2600	tyrA	PREPHENATEDEHYDROG-RXN	1.3.1.12	プレフェン酸デヒドロゲナーゼ
EG10096	b0928	aspC	TYROSINE-AMINOTRANSFERASE-RXN	2.6.1.1/2.6.1.5/2.6.1.27/2.6.1.57	チロシンアミノトランスフェラーゼ
EG11040	b4054	tyrB	TYROSINE-AMINOTRANSFERASE-RXN	2.6.1.1/2.6.1.5/2.6.1.27/2.6.1.57	チロシンアミノトランスフェラーゼ
EG10261	b0593	entC	ISOCHORSYN-RXN	5.4.4.2	イソコリスミ酸シンターゼ
EG12362	b2265	menF	ISOCHORSYN-RXN	5.4.4.2	イソコリスミ酸シンターゼ
EG10579	b2264	menD	2.5.1.64-RXN	2.2.1.9	2-スクシニル-5-エノールピルビル-6-ヒドロキシ-3-シクロヘキセン-1-カルボン酸シンターゼ
EG12438	b2263	menH	RXN-9310	4.2.99.20	(1R,6R)-2-スクシニル-6-ヒドロキシ-2,4-シクロヘキサジエン-1-カルボン酸シンターゼ
EG11532	b2261	menC	O-SUCCINYLBENZOATE-COA-SYN-RXN	4.2.1.113	o-スクシニル安息香酸シンターゼ
EG12437	b2260	menE	O-SUCCINYLBENZOATE-COA-LIG-RXN	6.2.1.26	o-スクシニル安息香酸—CoAリガーゼ
EG11368	b2262	menB	NAPHTHOATE-SYN-RXN	4.1.3.36	1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトイル-CoAシンターゼ
G6912	b1686	menI	RXN-9311	3.1.2.28	1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトイル-CoAヒドロラーゼ
EG11880	b3930	menA	DMK-RXN	2.5.1.74	1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸オクタプレニルトランスフェラーゼ
EG11473	b3833	ubiE	ADOMET-DMK-METHYLTRANSFER-RXN	2.1.1.163	デメチルメナキノンメチルトランスフェラーゼ
EG10260	b0595	entB	ISOCHORMAT-RXN	3.3.2.1	イソコリスマターゼ
EG10259	b0596	entA	DHBDEHYD-RXN	1.3.1.28	2,3-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ安息香酸デヒドロゲナーゼ
EG10263	b0594	entE	DHBAMPLIG-RXN	EC# なし	2,3-ジヒドロキシ安息香酸-[アリール-キャリア蛋白質]リガーゼ
EG10263	b0594	entE	RXN0-6442	EC# なし	2,3-ジヒドロキシ安息香酸-[アリール-キャリア蛋白質]リガーゼ
EG10264	b0586	entF	RXN-15891	EC# なし	2,3-ジヒドロキシベンゾイル-[EntB]-セリル-[EntF]2,3-ジヒドロキシ安息香酸トランスフェラーゼ
EG10260	b0595	entB	RXN-15891	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10262	b0583	entD	RXN-15891	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10264	b0586	entF	RXN-15891	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10263	b0594	entE	RXN-15891	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10264	b0586	entF	ENTG-RXN	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10260	b0595	entB	ENTG-RXN	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10262	b0583	entD	ENTG-RXN	EC# なし	エンテロバクチンシンターゼ

【表１－３】

EG10264	b0586	entF	ENTG-RXN	EC#なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10263	b0594	entE	ENTG-RXN	EC#なし	エンテロバクチンシンターゼ
EG10683	b1812	pabB	PABASYN-RXN	2.6.1.85	4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸シンターゼ
EG10682	b3360	pabA	PABASYN-RXN	2.6.1.85	4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸シンターゼ
EG11493	b1096	pabC	ADCLY-RXN	4.1.3.38	アミノデオキシコリスミ酸リアーゼ
EG50011	b3177	folP	H2PTEROATESYNTH-RXN	2.5.1.15	ジヒドロプテロイン酸シンターゼ
EG10327	b2315	folC	DIHYDROFOLATESYNTH-RXN	6.3.2.12	ジヒドロ葉酸シンテターゼ
EG10326	b0048	folA	DIHYDROFOLATEREDUCT-RXN	1.5.1.3	ジヒドロ葉酸レダクターゼ
G6862	b1606	folM	DIHYDROFOLATEREDUCT-RXN	1.5.1.3	ジヒドロ葉酸レダクターゼ
EG10508	b0421	ispA	FPPSYN-RXN	2.5.1.10	ファルネシルニリン酸シンターゼ
EG10017	b3187	ispB	RXN-8992	2.5.1.90	全-トランス-オクタプレニル-ニリン酸シンターゼ
EG11369	b4039	ubiC	CHORPYRLY-RXN	4.1.3.40	コリスミ酸リアーゼ
EG11370	b4040	ubiA	4OHBENZOATE-OCTAPRENYLTRANSFER-RXN	2.5.1.39	4-ヒドロキシ安息香酸オクタプレニルトランスフェラーゼ
EG11396	b3843	ubiD	3-OCTAPRENYL-4-OHBENZOATE-DECARBOX-RXN	4.1.1.98	3-オクタプレニル-4-ヒドロキシ安息香酸デカルボキシラーゼ
EG11333	b2906	ubiI	2-OCTAPRENYLPHENOL-HYDROX-RXN	1.14.13.240	2-オクタプレニルフェノール6-ヒドロキシラーゼ
EG11143	b2232	ubiG	2-OCTAPRENYL-6-OHPHENOL-METHY-RXN	2.1.1.222	2-オクタプレニル-6-ヒドロキシフェノールメチラーゼ
EG11324	b2907	ubiH	2-OCTAPRENYL-6-METHOXYPHENOL-HYDROX-RXN	1.14.13.M56	2-オクタプレニル-6-メトキシフェノール4-ヒドロキシラーゼ
EG11473	b3833	ubiE	2-OCTAPRENYL-METHOXY-BENZOQ-METH-RXN	2.1.1.201	2-オクタプレニル-6-メトキシ-1,4-ベンゾキノールメチラーゼ
G6365	b0662	ubiF	OCTAPRENYL-METHYL-METHOXY-BENZOQ-OH-RXN	1.14.99.60	2-オクタプレニル-3-メチル-6-メトキシ-1,4-ベンゾキノールヒドロキシラーゼ
EG11143	b2232	ubiG	DHHB-METHYLTRANSFER-RXN	2.1.1.64	3-デメチルユビキノン-8 3-O-メチルトランスフェラーゼ

【０２０１】

【表２－１】

表２．コリスミ酸代謝スーパー経路に関わる代謝物

分子	同義語	部分経路
D-エリトロース4-リン酸	エリトロース-4P；トレオース4-リン酸；エリトロース-4-リン酸；エリトロース-4-P；D-エリトロース-4-P	シキミ酸経路
3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロソン酸7-リン酸	3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロソン酸-7-P,3-デオキシ-アラビノ-ヘプツロソン酸7-リン酸,3-デオキシ-アラビノ-ヘプツロソン酸-7-P,2-デヒドロ-3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプトン酸7-リン酸,3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプタ-2-ウロソン酸7-リン酸,3-デオキシ-アラビノ-ヘプツロン酸7-リン酸,DAHP	シキミ酸経路

【表２－２】

3-デヒドロキナ酸（dehydroquinate）	デヒドロキナ酸;3-デヒドロキナ酸（dehydroquinic acid）;5-デヒドロキナ酸（dehydroquinic acid）;5-デヒドロキナ酸（dehydroquinate）;5-デ-H-キナ酸;rel-(1R,3R,4S)-1,3,4-トリヒドロキシ-5-オキソシクロヘキサンカルボン酸	シキミ酸経路
3-デヒドロシキミ酸（dehydroshikimate）	3-デヒドロシキミ酸（dehydroshikimic acid）;5-デヒドロシキミ酸（dehydroshikimic acid）;5-デヒドロシキミ酸（dehydroshikimate）	シキミ酸経路
シキミ酸	シキミ酸（shikimic acid）;(3R,4S,5R)--3,4,5-トリヒドロキシシクロヘキサ-1-エン-1-カルボン酸	シキミ酸経路
シキミ酸3-リン酸	シキミ酸5-リン酸;シキミ酸-5-P;3-ホスホシキミ酸;シキミ酸-3-P	シキミ酸経路
5-エノールピルボイル-シキミ酸3-リン酸	3-エノールピルビル-シキミ酸5-リン酸;3-エノールピルビル-シキミ酸-5-P;5-O-(1-カルボキシビニル)-3-ホスホシキミ酸;5-エノールピルビル-シキミ酸3-リン酸	シキミ酸経路
コリスミ酸	コリスミ酸（chorismic acid）	シキミ酸経路
アントラニル酸（anthranilate）	アントラニル酸（anthranilic acid）;2-アミノ安息香酸（aminobenzoic acid）;ビタミンL1;o-アミノ安息香酸（aminobenzoic acid）;2-アミノ安息香酸（aminobenzoate）;o-アミノ安息香酸（aminobenzoate）	L-トリプトファン生合成
N-(5-ホスホリボシル)-アントラニル酸	N-(5-ホスホ-D-リボシル)-アントラニル酸;N-(5-ホスホ-β-D-リボシル)-アントラニル酸;5-ホスホリボシル-アントラニル酸;5-P-リボシル-アントラニル酸;5'-ホスホリボシル-アントラニル酸;5'-P-リボシル-アントラニル酸;N-(5-ホスホリボシル)-アントラニル酸	L-トリプトファン生合成
1-(2-カルボキシフェニルアミノ)-1-デオキシ-D-リブロース5-リン酸	1-(o-カルボキシフェニルアミノ)-1-デオキシリブロース-5'-P;1-(2-カルボキシフェニルアミノ)-1-デオキシ-D-リブロース-5-P;1-(o-カルボキシフェニルアミノ)-1'-デオキシリブロース5'-リン酸	L-トリプトファン生合成
(1S,2R)-1-C-(インドール-3-イル)グリセロール3-リン酸	C1-(3-インドリル)-グリセロール3-リン酸;インドール-3-グリセロール-P;1-(インドール-3-イル)グリセロール-3-P;1-(インドール-3-イル)グリセロール-3-リン酸;インドールグリセロールリン酸;インドール-3-グリセロール-リン酸	L-トリプトファン生合成
インドール		L-トリプトファン生合成
L-セリン	S;セリン;L-ser	L-トリプトファン生合成
L-トリプトファン	W;トリプタシン;trofan;トリプトファン;2-アミノ-3-インドリルプロパン酸;L-trp;trp	L-トリプトファン生合成
L-グルタミン	Q;プログルミド;glum;グルタミン;glumin;2-アミノグルタラミン酸;グルタミン酸5-アミド;L-gln	L-トリプトファン生合成
5-ホスホ-α-D-リボース1-二リン酸	5-ホスホリボシル1-ピロリン酸;5-ホスホリボシル二リン酸;5-ホスホリボシル-1-PP;5-ホスホリボシル-PP;5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸;5-ホスホリボシルピロリン酸;ホスホリボシルピロリン酸;5-ホスホ-リボシル-ピロリン酸;α-D-5-ホスホリボシルPP;α-D-5-P-リボシルPP	L-トリプトファン生合成

【図面】

【図１】

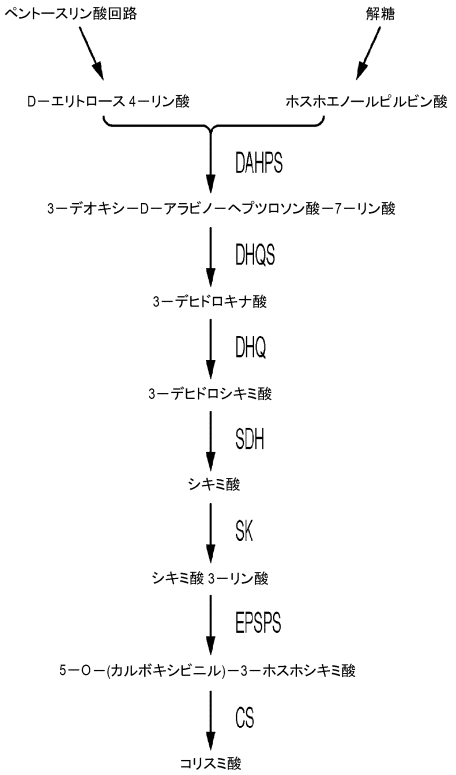


図1

【図２】

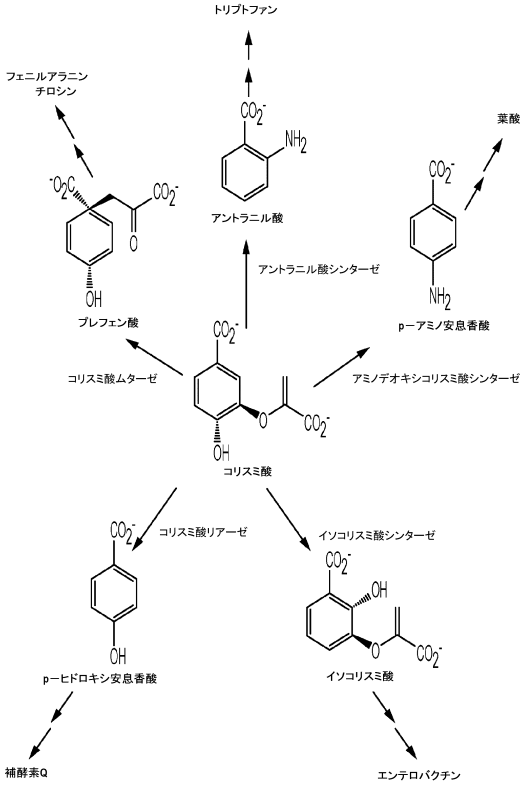


図2

【図３Ａ－３Ｂ】

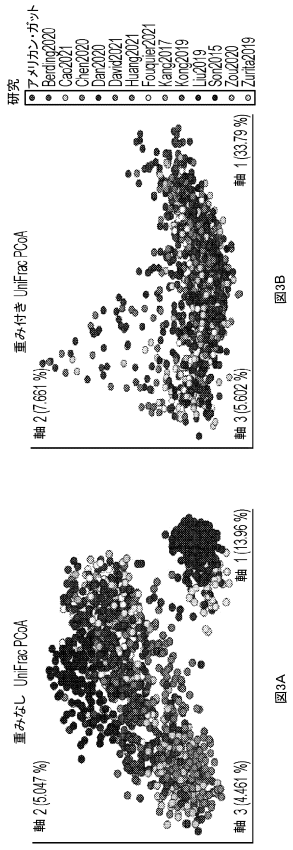


図3A

図3B

【図３Ｃ－３Ｄ】

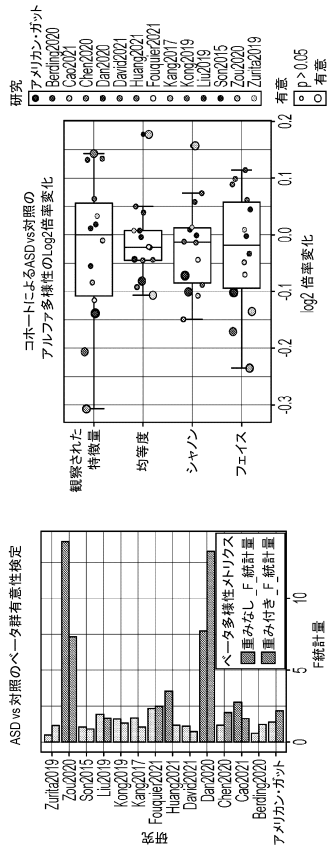


図3D

図3C

【図４Ａ】

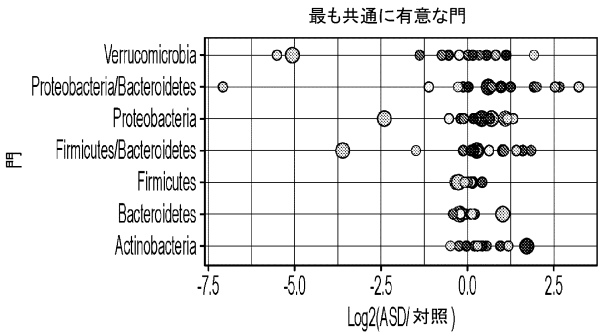


図4A

【図４Ｂ】

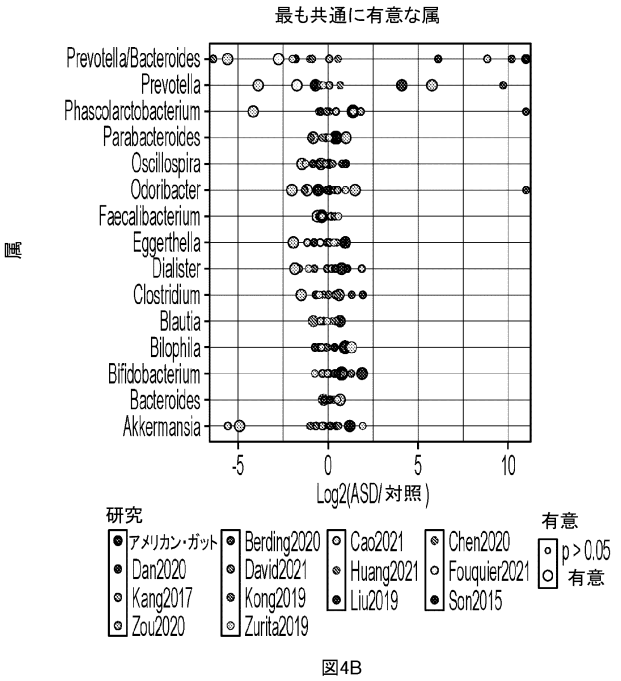


図4B

【図４Ｃ－４Ｄ】

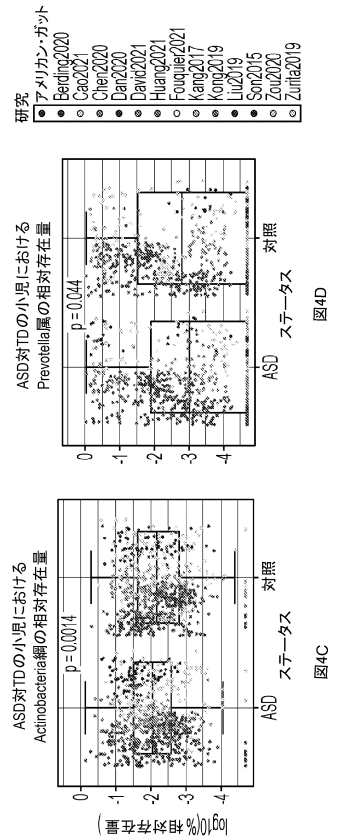


図4D

図4C

【図４Ｅ】

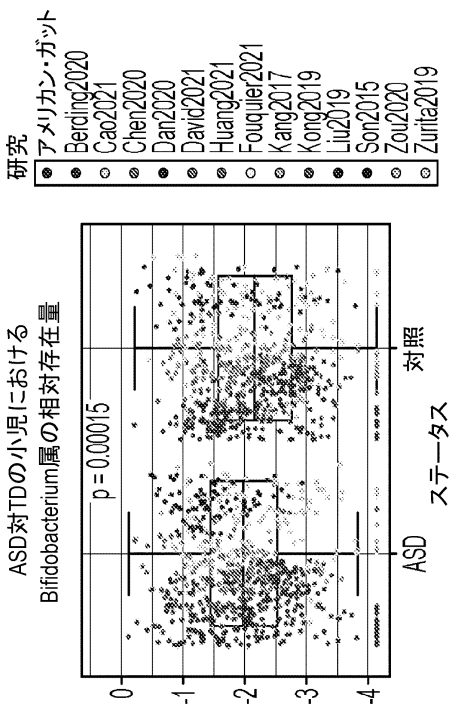


図4E

【図４Ｆ】

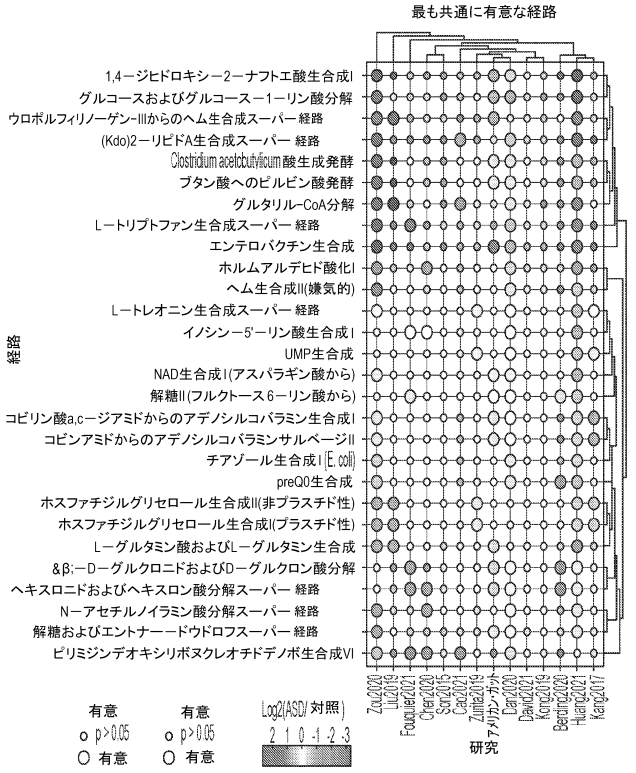


図4F

【図４Ｇ】

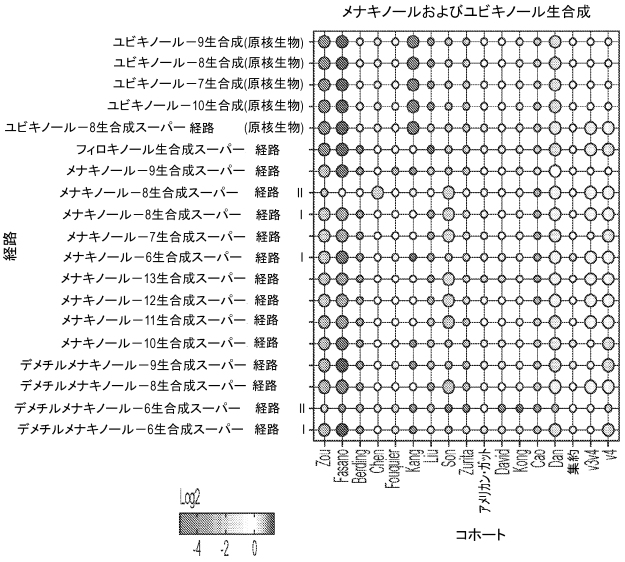


図4G

【図４Ｈ】

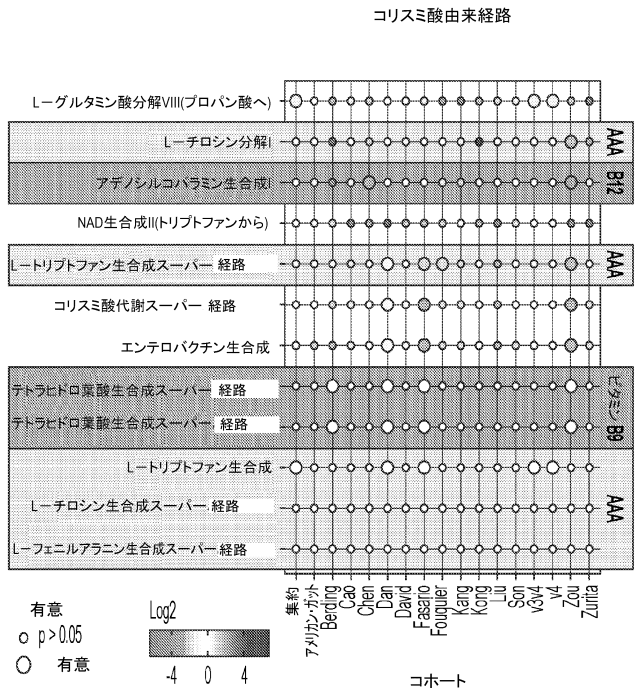


図4H

【図５Ａ】

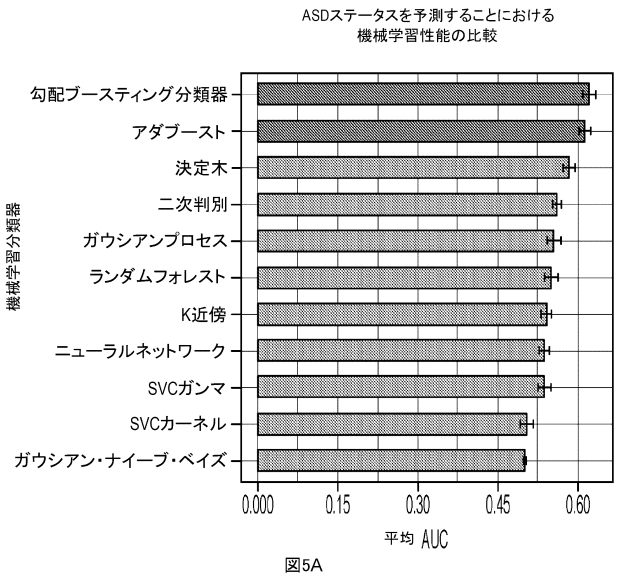


図5A

【図５Ｂ】

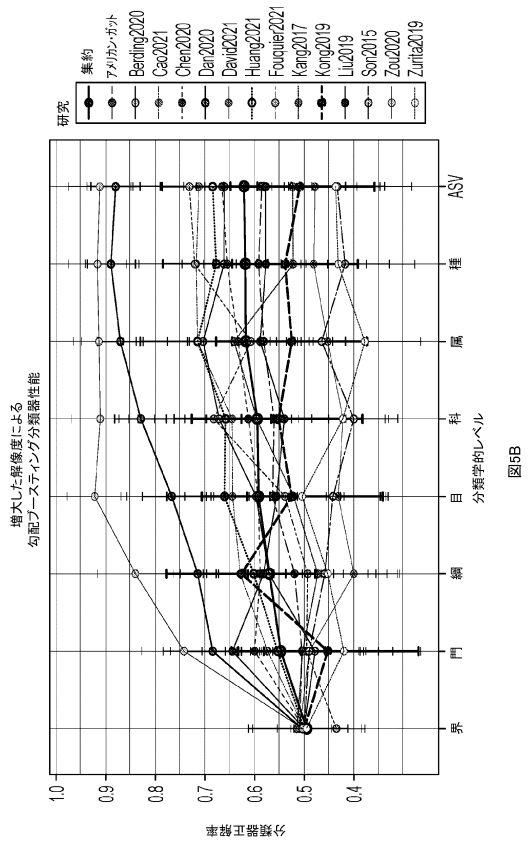


図5B

【図５Ｃ】

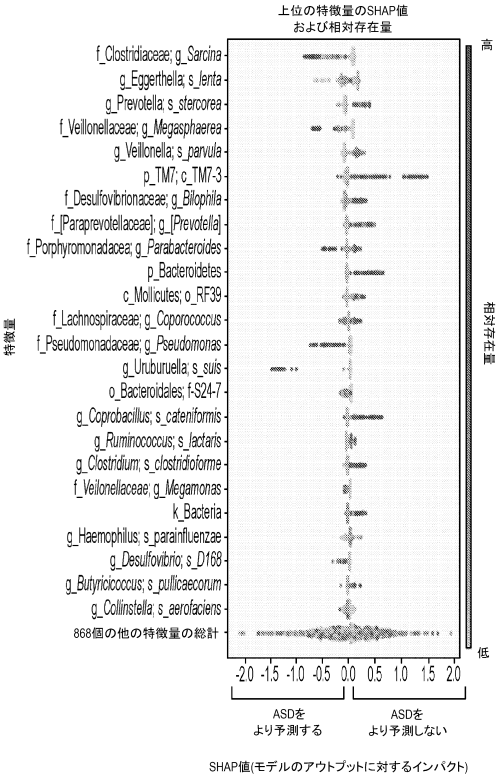


図5C

【図５Ｄ－１】

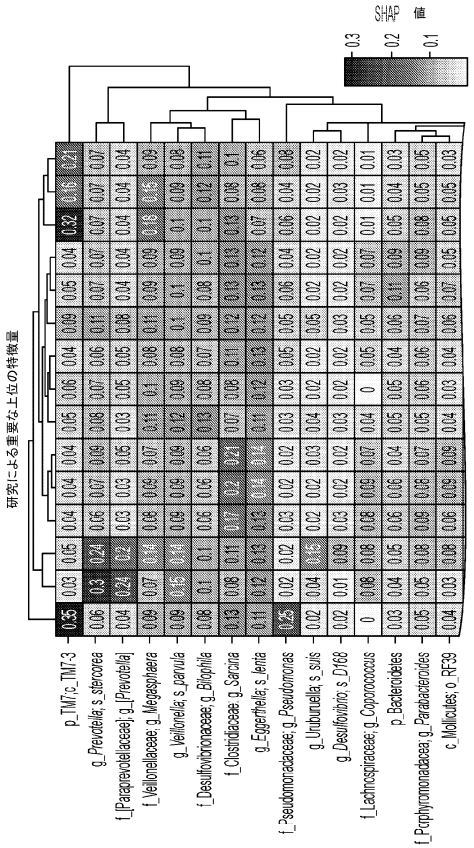


図5D

【図５Ｄ－２】

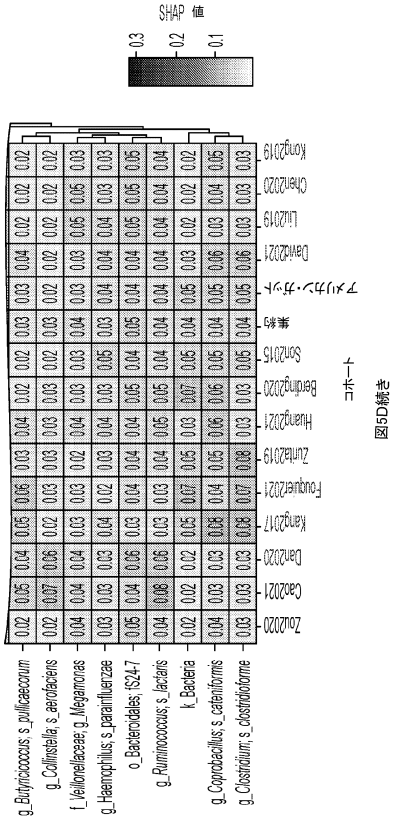


図5D続き

【図６Ａ－６Ｂ】

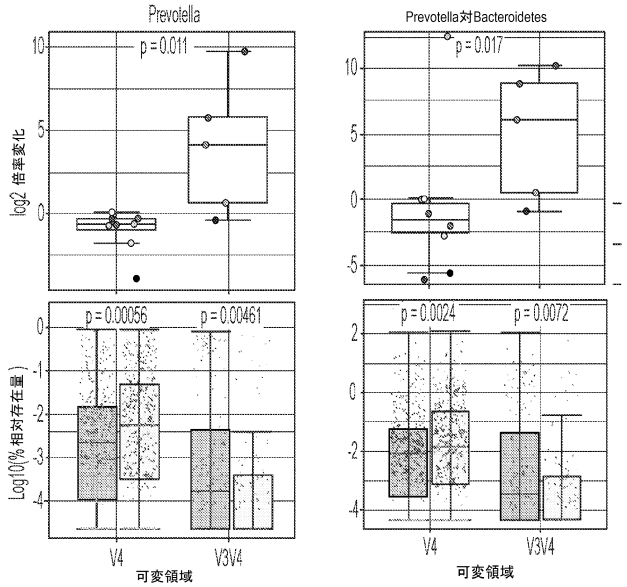


図6A　図6B

【図６Ｃ－６Ｄ】

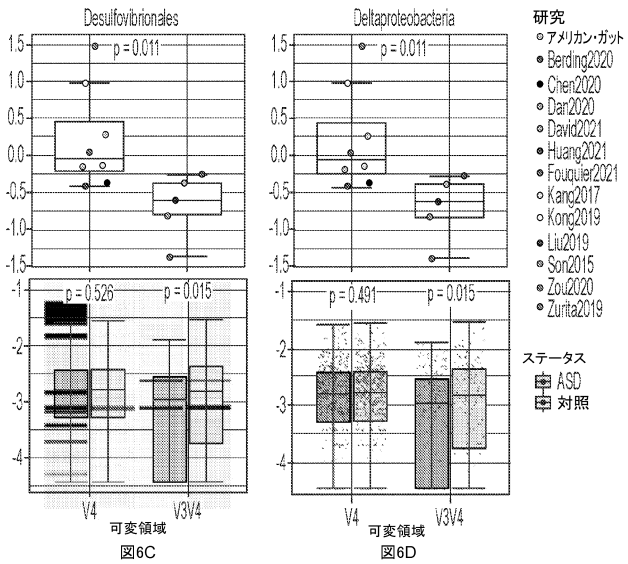


図6C　図6D

【図６Ｅ－６Ｆ】

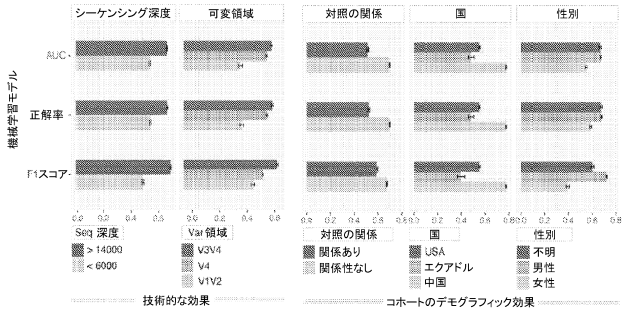


図6E　図6F

【図６Ｇ】

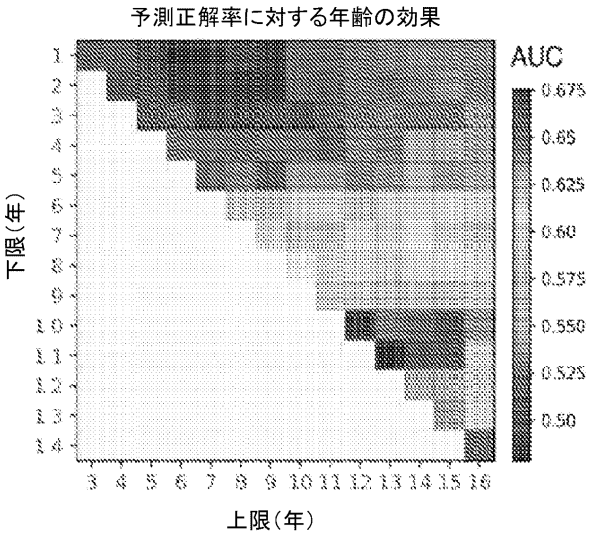


図6G

【図７Ａ－１】

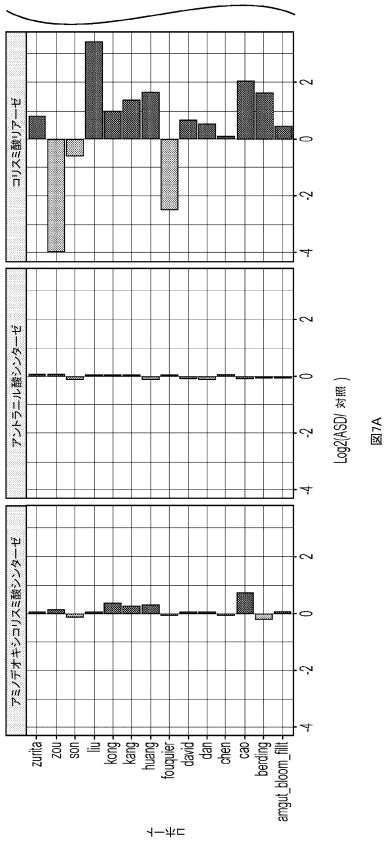


図7A

【図７Ａ－２】

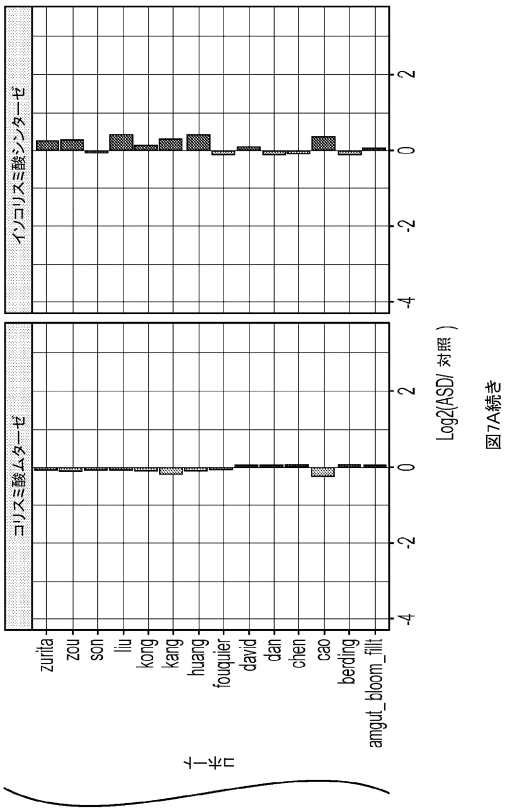


図7A続き

【図７Ｂ】

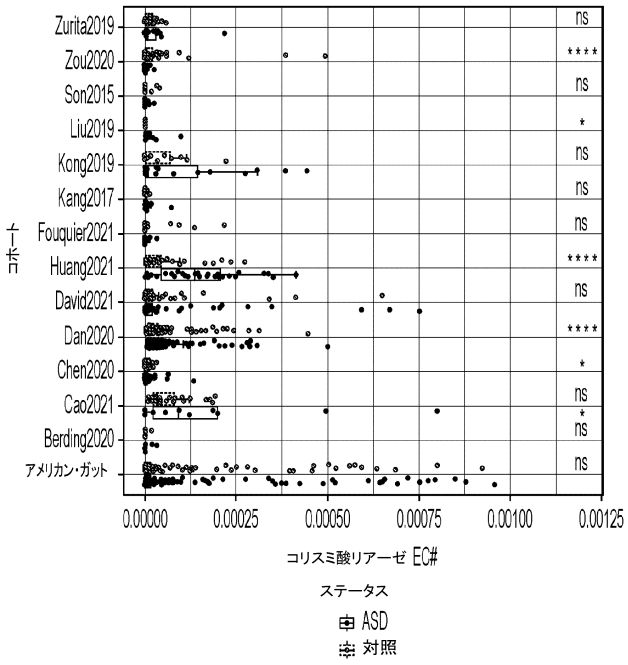


図7B

【図７Ｃ】

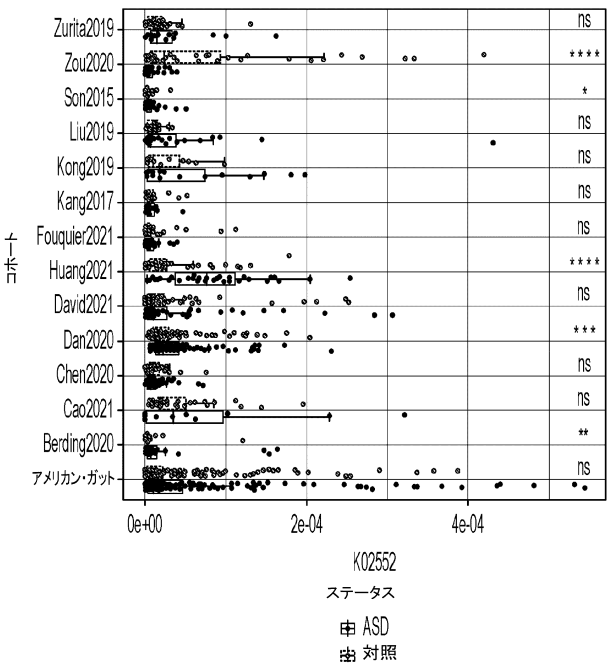


図7C

【図７Ｄ】

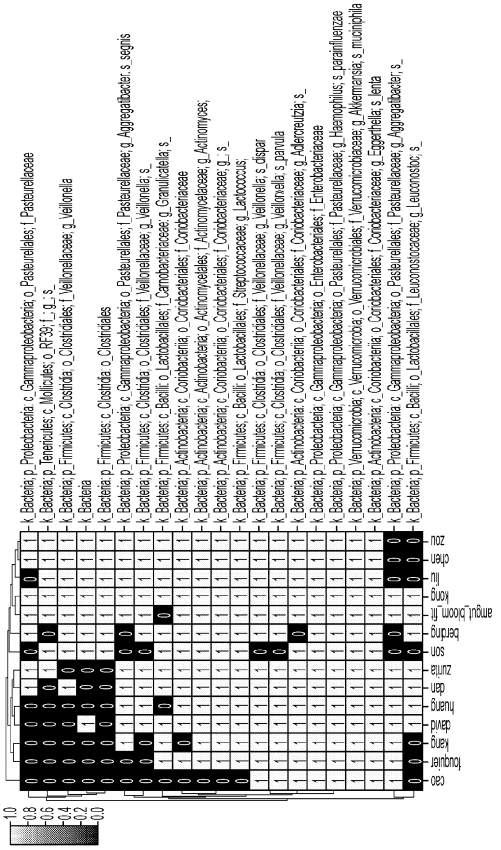


図7D

【図８Ａ】

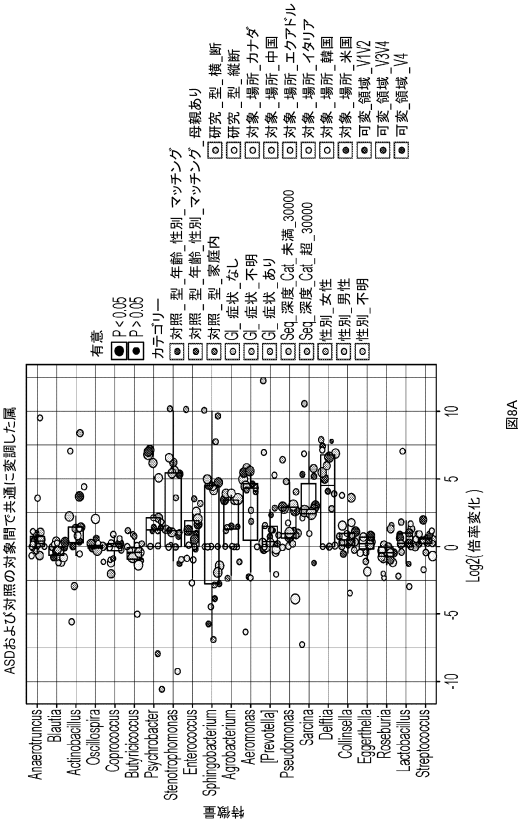


図8A

【図８Ｂ】

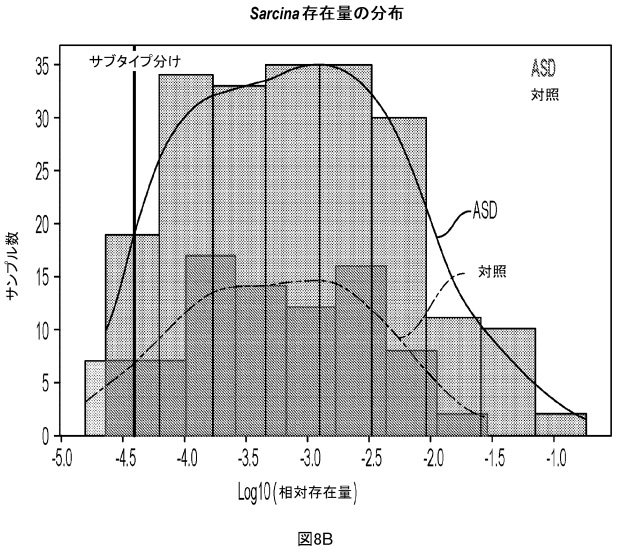


図8B

【図８Ｃ－１】

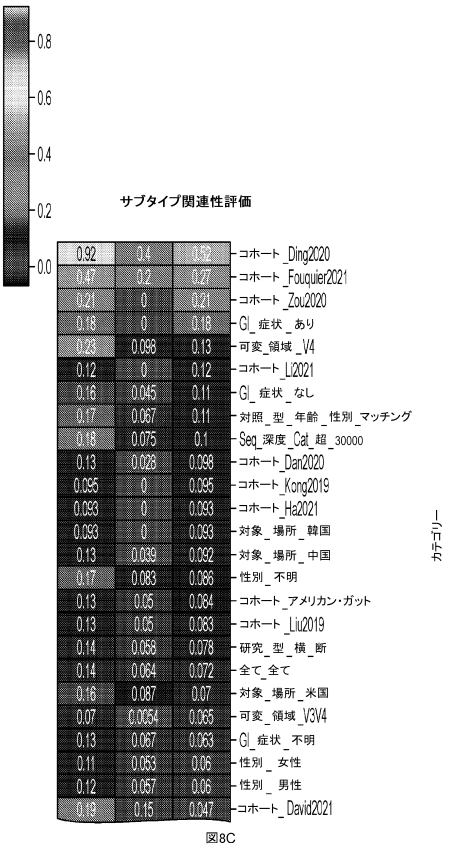


図8C

【図８Ｃ－２】

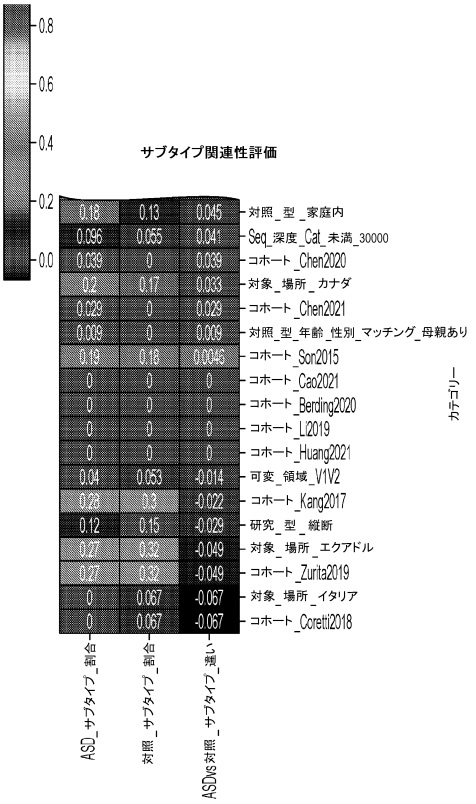


図8C続き

【図９Ａ－１】

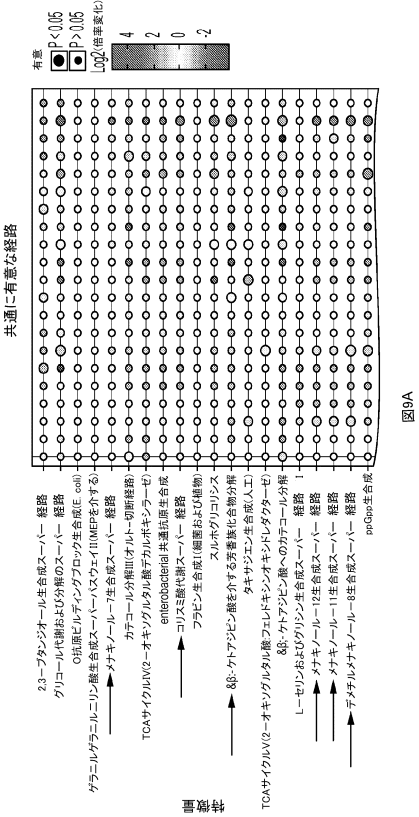


図9A

【図９Ａ－２】

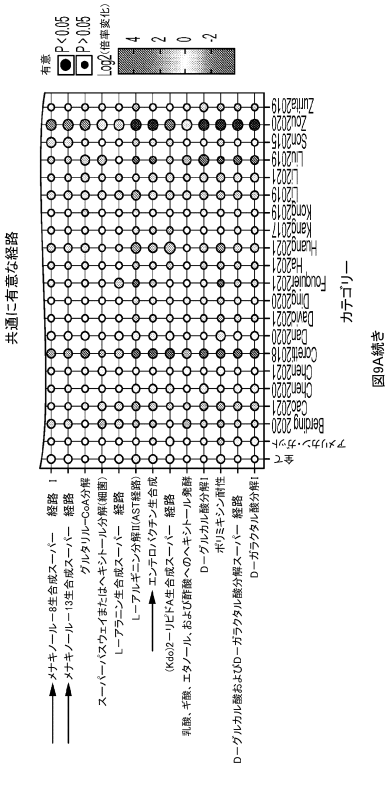


図9A続き

【図９Ｂ】

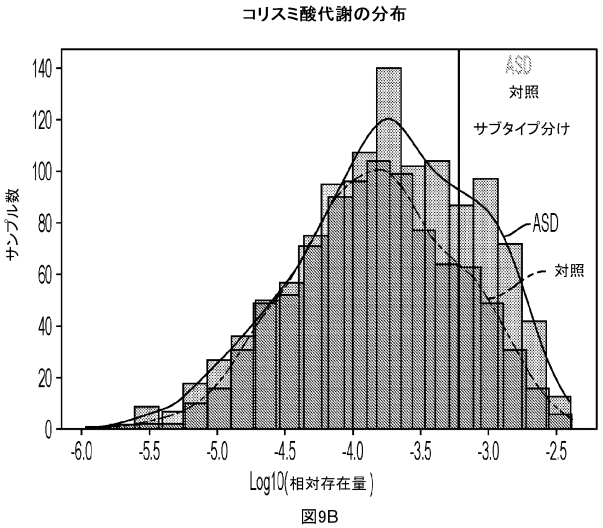


図9B

【図９Ｃ－１】

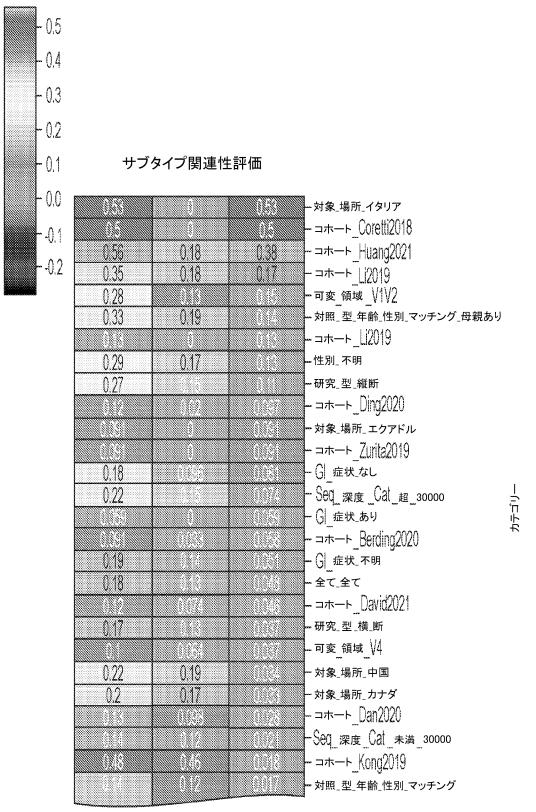


図9C

【図９Ｃ－２】

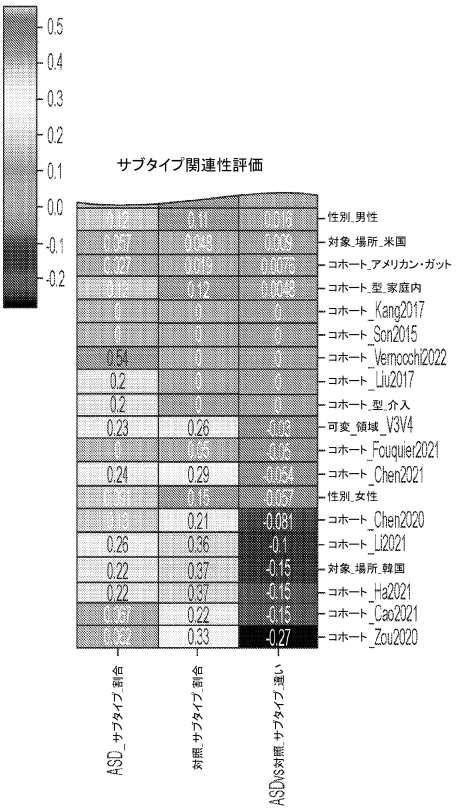


図9C続き

【図９Ｄ】

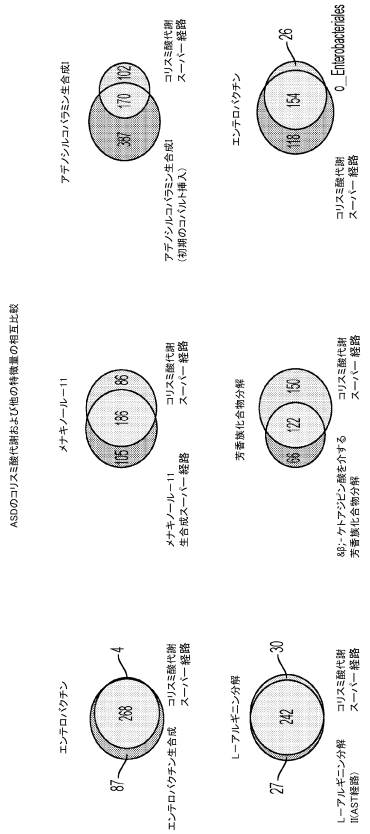


図9D

【図１０Ａ－１】

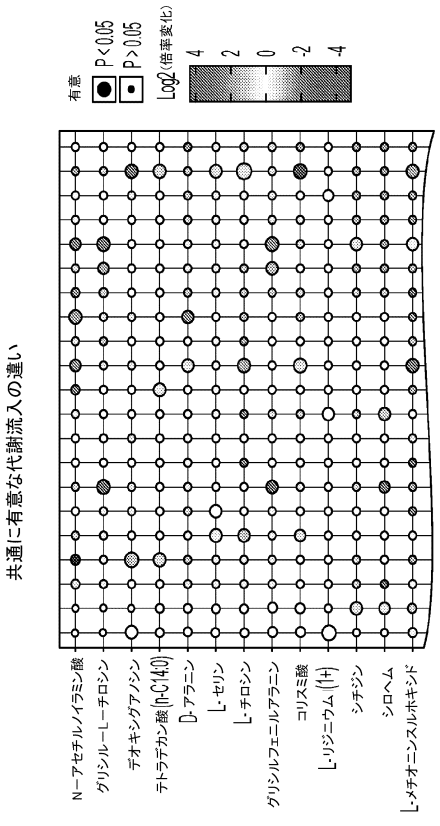


図10A

【図１０Ａ－２】

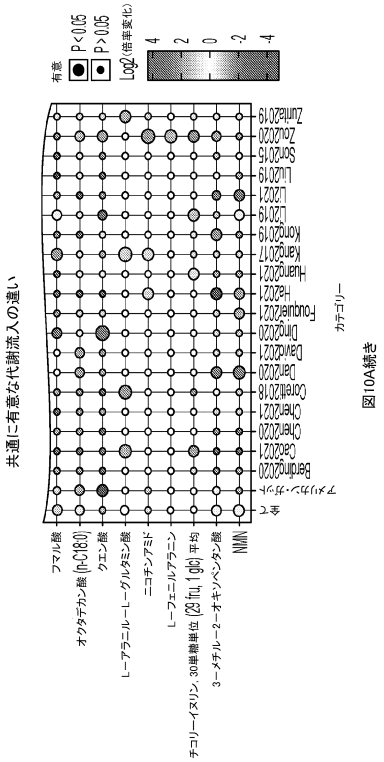


図10A続き

【図１０Ｂ】

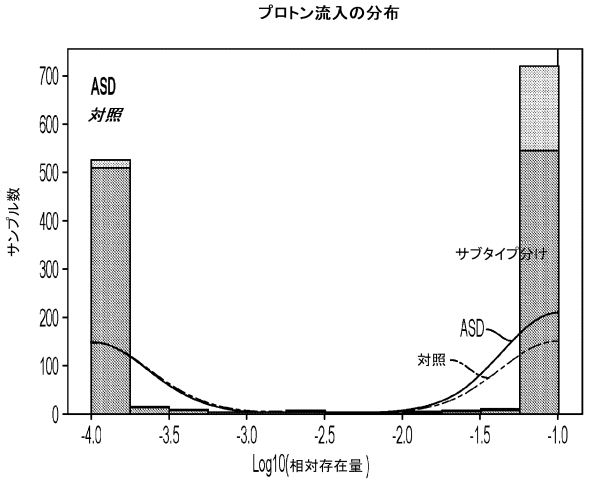


図10B

【図１０Ｃ－１】

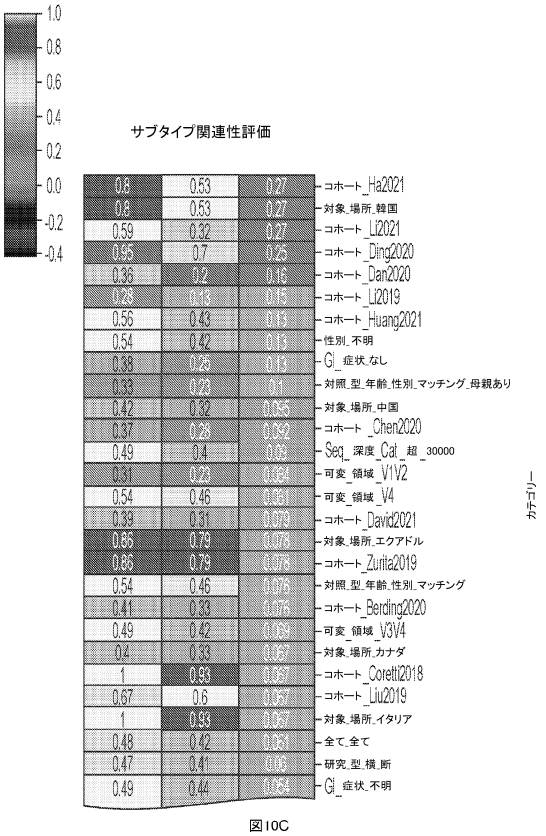


図10C

【図１０Ｃ－２】

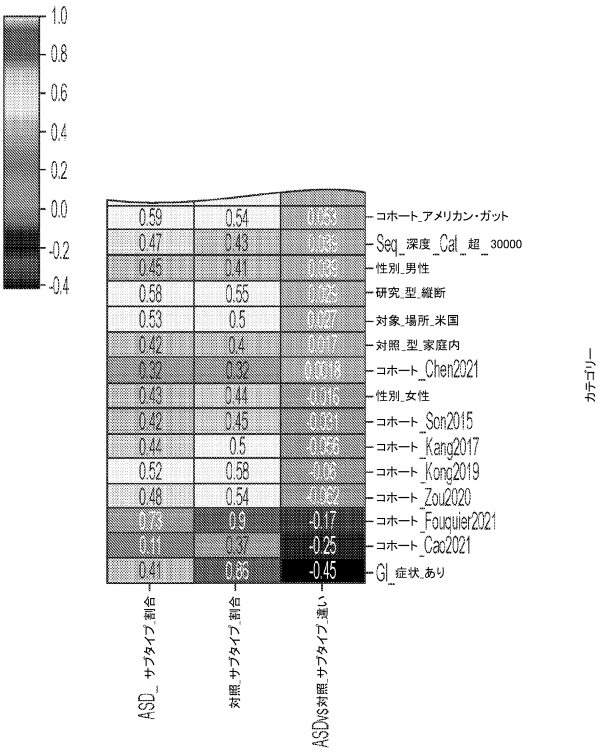


図10C続き

【図１１】

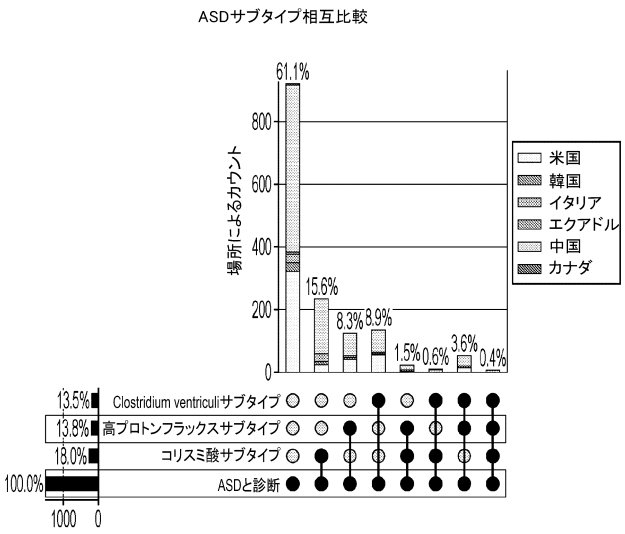


図11

【図１２Ａ】

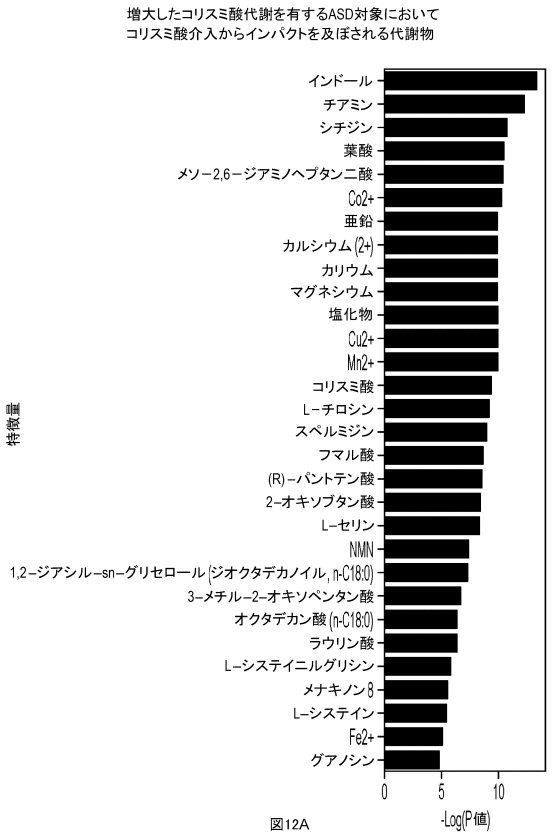


図12A

【図１２Ｂ－１２Ｅ】

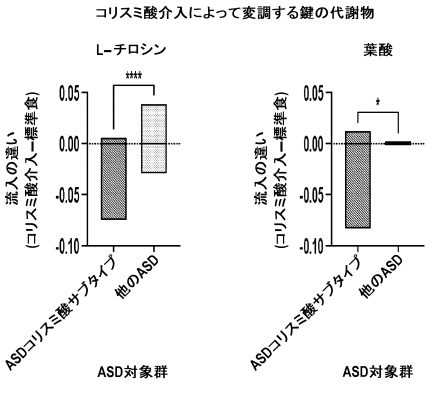


図12B　図12C

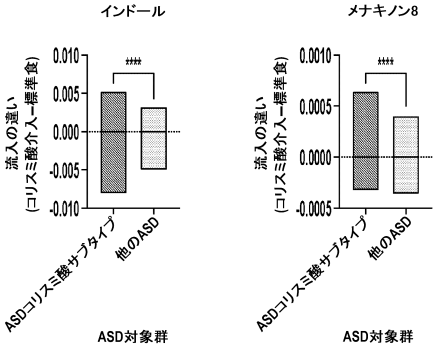


図12D　図12E

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/62882

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61K 31/404, A61K 31/395, A61K 31/33 (2023.01)
ADD. A61K 31/405 (2023.01)

CPC - INV. A61K 31/404, A61K 31/395, A61K 31/33

ADD. A61K 31/405

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	WO 2020/160183 A1 (HOLOBIOME, INC.) 6 August 2020 (06.08.2020) - entire document especially para [0271], [0413], [0264], [0413], [0395], [0269]	1-4, 6-7, 9-12 – 5, 8
Y	Frye, R.E., Llonnard, L., Singh, I. et al. "Mitochondrial morphology is associated with respiratory chain uncoupling in autism spectrum disorder" Transl. Psych. 11, 527. 13 October 2021 (13.10.2021) - entire document especially page 1, 2, 3	5, 8
A	US 2020/0199674 A1 (HATCHWELL ET AL.) 25 June 2020 (25.06.2020) - entire document	1-12
A	US 2013/0109583 A1 (PIRAYE YURTTAS BELM) 2 May 2013 (02.05.2013) - entire document	1-12
A	WO 2021/254299 A1 (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG) 23 December 2021 (23.12.2021) - entire document	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 April 2023	JUL 25 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/62882

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 13-27, 31-35, 39-44, 51-52, 59
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
see extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/62882

Continuation of Box III (Observations where unity of invention is lacking)

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-12 are directed towards a method of assisting in the diagnosis of a subject having one or more symptoms of autism, the method comprising determining a level of chorismate and/or a molecule within a chorismate metabolic pathway in a sample obtained from the subject.

Group II: Claims 28-30, 36-38, 48-49 and 53-58 are directed towards a method of treating a subject having one or more symptoms of ASD or at risk of developing ASD, the method comprising modulating a level of chorismate and/or a molecule within a chorismate metabolic pathway in the subject; a method, comprising: determining an abundance of one or more molecules or microbial features in a sample obtained from a subject; and targeting one or more microbial features/administering one or more therapies/probiotics and/or prebiotics based on the absence and/or low abundance of the one or more molecules or microbial features to alleviate one or more symptoms of ASD and/or comorbidities of ASD or to reduce the risk of developing ASD; a method for identifying a subtype of a subject with ASD, the method comprising determining a composition of fecal microbiome or a presence of one or more microbial features in a sample obtained from the subject; and a method comprising determining one or more microbial features in a sample obtained from a subject and using the one or more microbial features as biomarkers for medical decision making regarding therapeutic interventions.

Group III: Claims 45-47 are directed toward a method of assisting in the diagnosis of a subject having one or more symptoms of autism, the method comprising determining a level of proton influx in a gastrointestinal tract of the subject from a sample obtained from the subject.

Group IV: Claim 50 is directed toward a method comprising training a machine learning model to associate microbial features with a risk or risk level of ASD and/or with candidacy or non-candidacy for a treatment for ASD in a subject.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I requires determining a level of chorismate and/or a molecule within a chorismate metabolic pathway in a sample obtained from the subject, not required by Group II, III or IV.

Group II requires modulating a level of chorismate and/or a molecule within a chorismate metabolic pathway in the subject; a method, comprising: determining an abundance of one or more molecules or microbial features in a sample obtained from a subject; and targeting one or more microbial features/administering one or more therapies/probiotics and/or prebiotics based on the absence and/or low abundance of the one or more molecules or microbial features to alleviate one or more symptoms of ASD and/or comorbidities of ASD or to reduce the risk of developing ASD; a method for identifying a subtype of a subject with ASD, the method comprising determining a composition of fecal microbiome or a presence of one or more microbial features in a sample obtained from the subject; and a method comprising determining one or more microbial features in a sample obtained from a subject and using the one or more microbial features as biomarkers for medical decision making regarding therapeutic interventions, not required by Group I, III or IV.

Group III requires determining a level of proton influx in a gastrointestinal tract of the subject from a sample obtained from the subject, not required by Group I II, or IV.

Group IV requires training a machine learning model to associate microbial features with a risk or risk level of ASD and/or with candidacy or non-candidacy for a treatment for ASD in a subject, not required by Group I, II or III.

Shared Technical Features:

Group I-II share the common technical features of a method involving a subject having one or more symptoms of ASD or at risk of developing ASD and a level of chorismate and/or a molecule within a chorismate metabolic pathway in the subject. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art because the shared technical features are anticipated by WO 2020/160183 A1 to Holobiome, Inc. (hereinafter "Holobiome"). Holobiome teaches a method involving a subject having one or more symptoms of ASD or at risk of developing ASD (para [00271], a subject in need of treatment with a composition described herein can be diagnosed as being dysbiotic or in need of queuine supplementation; para [0413], There is a reported association between autism spectrum disorder (AS) and dysbiosis; para [00266], the method of treatment can comprise first diagnosing a subject or patient who can benefit from treatment by a composition described herein; para [0264], the queuine associated mental illness or disease that can be treated by administration of a composition described herein is...autism spectrum disorders) and a level of chorismate and/or a molecule within a chorismate metabolic pathway in the subject (para [00271], a subject in need of treatment with a composition described herein can be diagnosed as being dysbiotic or in need of queuine supplementation by analysis of blood or tissue for the amounts or ratios of...Tyr; para [0413], There is a reported association between autism spectrum disorder (AS) and dysbiosis; see instant claim 3, wherein the downstream metabolite of chorismate is...tyrosine).

Groups I-III share the common technical features of a method of assisting in the diagnosis of a subject having one or more symptoms of autism. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art because the shared technical features are anticipated by Holobiome. Holobiome teaches a method of assisting in the diagnosis of a subject having one or more symptoms of autism (para [00271], a subject in need of treatment with a composition described herein can be diagnosed as being dysbiotic or in need of queuine supplementation; para [0413], There is a reported association between autism spectrum disorder (AS) and dysbiosis; para [00266], the method of treatment can comprise first diagnosing a subject or patient who can benefit from treatment by a composition described herein; para [0264], the queuine associated mental illness or disease that can be treated by administration of a composition described herein is...autism spectrum disorders).

--see extra sheet--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/62882

Continuation of Box III (Observations where unity of invention is lacking)

Groups I-IV share the common technical features of a method comprising a subject with autism/ASD. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art because the shared technical features are anticipated by Holobiome. Holobiome teaches a method (para [00266], the method of treatment can comprise first diagnosing a subject or patient who can benefit from treatment by a composition described herein) comprising a subject with autism/ASD (para [0264], the queuine associated mental illness or disease that can be treated by administration of a composition described herein is...autism spectrum disorders).

Groups II-III share the common technical features of a method involving a subject having one or more symptoms of ASD and determining an abundance of one or more molecules in a sample obtained from a subject. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art because the shared technical features are anticipated by Holobiome. Holobiome teaches a method involving a subject having one or more symptoms of ASD (para [00266], the method of treatment can comprise first diagnosing a subject or patient who can benefit from treatment by a composition described herein; para [0264], the queuine associated mental illness or disease that can be treated by administration of a composition described herein is...autism spectrum disorders) and determining an abundance of one or more molecules in a sample obtained from a subject (para [00271], a subject in need of treatment with a composition described herein can be diagnosed as being dysbiotic or in need of queuine supplementation by analysis of blood or tissue for the amounts or ratios of...Tyr; para [0413], There is a reported association between autism spectrum disorder (AS) and dysbiosis; see instant claim 3, wherein the downstream metabolite of chorismate is...tyrosine).

Groups II-IV share the common technical features of a method a method comprising a subject with autism/ASD. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art because the shared technical features are anticipated by Holobiome. Holobiome teaches a method (para [00266], the method of treatment can comprise first diagnosing a subject or patient who can benefit from treatment by a composition described herein) comprising a subject with autism/ASD (para [0264], the queuine associated mental illness or disease that can be treated by administration of a composition described herein is...autism spectrum disorders).

Groups III-IV share the common technical features of a method comprising a subject with autism/ASD. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art because the shared technical features are anticipated by Holobiome. Holobiome teaches a method (para [00266], the method of treatment can comprise first diagnosing a subject or patient who can benefit from treatment by a composition described herein) comprising a subject with autism/ASD (para [0264], the queuine associated mental illness or disease that can be treated by administration of a composition described herein is...autism spectrum disorders).

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups. Therefore, Groups I-III lack unity under PCT Rule 13.

Claims 13-27, 31-35, 39-44, 51-52, and 59 are determined unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61K 31/194 (2006.01)		C12M	1/34	B	4C206
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	31/194		
A61K 38/51 (2006.01)		A61K	45/00		
A61P 25/00 (2006.01)		A61K	38/51		
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	25/00		
G01N 33/68 (2006.01)		A61P	43/00	111	
G01N 33/50 (2006.01)		G01N	33/68		
G01N 27/62 (2021.01)		G01N	33/50	P	
		G01N	27/62	V	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

２４７２、ウォータータウン、プレザント ストリート ３１３、ケア オブ ピトン セラピューティクス，インコーポレーテッド

(72)発明者 ワン，エリック ホウ－ジェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４７２、ウォータータウン、プレザント ストリート ３１３、ケア オブ ピトン セラピューティクス，インコーポレーテッド

(72)発明者 チャビラ，アリーズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４７２、ウォータータウン、プレザント ストリート ３１３、ケア オブ ピトン セラピューティクス，インコーポレーテッド

Ｆターム（参考） 2G041 CA01 DA04 EA04 EA06 FA10 LA08
2G045 AA25 CA26 CB03 CB07 DA13 DA14 DA35 FB06
4B029 AA07 BB02 BB20 FA03 FA12
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QQ52 QQ61 QQ80 QR32 QR35 QR39 QR41 QR49 QR72 QR75 QS17 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02 QX10
4C084 AA02 AA17 BA44 DC26 NA14 ZA02 ZC192 ZC202
4C206 AA01 AA02 DA37 MA04 NA14 ZA02