

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6021187号

(P6021187)

(45) 発行日 平成28年11月9日 (2016. 11. 9)

(24) 登録日 平成28年10月14日 (2016. 10. 14)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/50 (2006. 01)

GO 1 N 33/50 Z

GO 1 N 33/68 (2006. 01)

GO 1 N 33/68

GO 1 N 27/62 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 V

GO 1 N 30/72 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 X

GO 1 N 30/88 (2006. 01)

GO 1 N 30/72 C

請求項の数 8 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-508294 (P2013-508294)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月29日 (2011. 4. 29)
 (65) 公表番号 特表2013-525801 (P2013-525801A)
 (43) 公表日 平成25年6月20日 (2013. 6. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/034654
 (87) 国際公開番号 W02011/139914
 (87) 国際公開日 平成23年11月10日 (2011. 11. 10)
 審査請求日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/329, 515
 (32) 優先日 平成22年4月29日 (2010. 4. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506223510
 ウィスコンシン・アルムニ・リサーチ・フ
 ァウンデーション
 WISCONSIN ALUMNI RE
 SEARCH FOUNDATION
 アメリカ合衆国53707-7365、ウ
 イスコンシン州マディソン、ビー・オー・
 ボックス・7365
 (73) 特許権者 512088718
 ステミナ バイオマーカー ディスカバリ
 ー, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
 19, マディソン, エス. ローザ
 ロード 504, スイート 150

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自閉症の代謝バイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自閉症についての代謝シグネチャであって、以下の表：

【表 2 A】

精密中性 質量	C18クロマトグラ フィーにおける 保持時間 (分)
136.5265	1.48
173.0308	0.33
180.0640	0.93
279.1636	0.4
286.1751	2.06
321.0561	1.5
356.2055	3.16
363.1455	1.33
366.1421	0.58
382.8678	1.22
408.2181	5.58
422.2482	4.83
426.1936	4.67
531.2841	1.14
597.2905	6.98
599.3340	1.07
806.0834	5.18
823.0550	6.85
823.7238	6.85

10

20

精密中性 質量	HILICクロマトグラ フィーにおける 保持時間 (分)
133.0168	8.74
133.0195	8.98
139.0609	1.33
143.0922	2.55
241.1764	5.76
255.0853	5.16
309.9921	5.68
317.1924	5.87
364.0987	4.07
418.0277	3.37
430.1120	7.66
438.0307	2.58
454.0045	2.6
464.0335	3.36
473.2109	4.06
501.9891	3.34
517.1560	4.09
522.0543	4.02
538.0278	3.96
543.0427	2.89
547.9951	3.41
568.0602	4.03
585.1485	4.10
590.0422	4.02
616.9752	2.61
636.0475	4.07
645.1668	7.67
658.0298	4.06
668.0565	2.79
674.0040	4.01
811.0869	4.15
860.2212	7.68
882.1976	7.67

10

20

30

における、精密中性質量と、C18またはHILICクロマトグラフィーにおける保持時間によって同定される少なくとも1つの細胞代謝産物を含む、代謝シグネチャ。

【請求項2】

N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンジホスフェート、3'-シアリルラクトサミン、3,4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、またはSAICAR((S)-2-[5-アミノ-1-(5-ホスホ-D-リボシル)イミダゾール-4-カルボキサミド]サクシネート)をさらに含む、請求項1に記載の代謝シグネチャ。

40

【請求項3】

請求項1に記載の自閉症についての代謝シグネチャを、ヒト試験対象における自閉症の指標とする方法であって、

a. 請求項1に記載の1つまたは複数の細胞代謝産物についてその個体由来の患者試料を

50

アッセイするステップと、

b. 該患者試料において対照と比べて識別的に産生される、該1つまたは複数の細胞代謝産物を検出するステップとを含む方法。

【請求項4】

前記細胞代謝産物が物理的分離法を使用してアッセイされる、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記物理的分離法が液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記患者試料が脳脊髄液、脳組織、または血漿である、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

前記細胞代謝産物が、セロトニン、システイン、メチオニン、ホモシステイン、トリプトファン、グルタメート、またはGABAについての細胞代謝経路由来の化合物を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項8】

自閉症についての代謝シグネチャであって、該自閉症についての代謝シグネチャが、自閉症において識別的に産生される、約10から約1500ダルトンまでの分子量を有する複数の細胞代謝産物を含み、該細胞代謝産物が、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベ
タイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンジホスフェート、3'-シア
リルラクトサミン、3,4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチ
ジルコリン、またはSAICAR((S)-2-[5-アミノ-1-(5-ホスホ-D-
リボシル)イミダゾール-4-カルボキサミド]サクシネート)のうちの1つまたは複数を含む、代謝シグネチャ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、自閉症ならびに自閉症および自閉症圏障害の診断に関する。具体的には、本発明は自閉症および自閉症圏障害を有する個体、特に小児を同定するための方法およびバイオマーカーを提供する。さらに具体的には、本発明は、自閉症に罹った個体の脳組織により分泌されて生体液に入る代謝産物を同定するための方法であって、そのような代謝産物が約10ダルトンから約1500ダルトンまでの分子量を有する方法を提供する。本発明は、自閉症の個体に存在し、非自閉症の個体に見出されるレベルとは診断的に著しく異なる1つまたは複数のそのような代謝産物を含む複数の収集物またはスペクトルを提供する。本明細書に提供される1つまたは複数の識別的に(differentially)分泌される代謝産物の収集物は、自閉症について診断する代謝シグネチャを含む。さらに、自閉症に特異的なバイオマーカーが本明細書において同定される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

自閉症は、社会的相互行為、言語発達、反復運動および行動様式の変化に特徴付けられる神経障害である。その有病率は、1980年代より前の2,325出生中1から現在では驚くべき101出生中1にまで増加している(非特許文献1)。自閉症は、厳密な遺伝的または決定論的病因に従わない極めて複雑な神経障害である(非特許文献2;非特許文献3;非特許文献4)。したがって、自閉症の発病における代謝の役割を定義することは前記障害の理解を発展させ前記疾患の正確な診断および患者管理を提供するのに重要であるが、これは、厳密に遺伝的原因は自閉症患者のほぼ10%しか占めていないからである。セロトニントランスポーター遺伝子(5HTT)、GABA受容体βサブユニット(G

10

20

30

40

50

A B R B 3)、ユビキチンリガーゼ3 (U B E 3 A)、ウィングレス型M M T V組込み部位ファミリーメンバー2 (W N T 2)、およびリーリン (R E L N)などの複数の候補感受性遺伝子が同定されている (非特許文献5 ; 非特許文献6 ; 非特許文献7)。変異および患者症状の根底にある遺伝的多様性にもかかわらず (非特許文献8 ; 非特許文献9 ; 非特許文献10)、症例全体で集束性代謝性機能障害があるように思われる (非特許文献11 ; 非特許文献12 ; 非特許文献9)。代謝および代謝性変化は、神経発生および自閉症発病中に重大な役割を果たすことがある (非特許文献13)。したがって、自閉症脳と非自閉症脳間の網羅的な生化学的差異を調べる比較研究により、自閉症発病および進行の一因となる特定の代謝経路を同定することが可能である (非特許文献9 ; 非特許文献14)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Blaylockら、2009年、Curr. Med. Chem. 16巻 : 157~170頁

【非特許文献2】Landerら、1994年、Science、265巻 : 2037~48頁

【非特許文献3】Baron-Cohenら、2005年、Science、310巻 : 819~23頁

【非特許文献4】Santangeloら、2005年、Am. J. Pharmacogenomic. 5巻 : 71~92頁

【非特許文献5】Folsteinら、2001年、Nat. Rev. Genet. 2巻 : 943~955頁 20

【非特許文献6】Buxbaumら、2004年、Mol. Psychiatry、9巻 : 144~150頁

【非特許文献7】Devlinら、2005年、Mol. Psych. 10巻 : 1110~1116頁

【非特許文献8】McCrackenら、2002年、N. Engl. J. Med. 347巻 : 314~321頁

【非特許文献9】Mooreら、2004年、Ann. Pharmacother. 38巻 : 1515~1519頁

【非特許文献10】Zhaoら、2005年、Intern. J. Neuroscience、115巻 : 1183~1191頁

【非特許文献11】Brysonら、1998年、Mental Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 4巻 : 97~103頁 30

【非特許文献12】Betancurら、2002年、Mol. Psychiatry、7巻 : 67~71頁

【非特許文献13】Pardoら、2007年、Brain Pathol. 17巻 : 434~447頁

【非特許文献14】Rasalamら、2005年、Dev. Med. Child Neurol. 47巻 (8号) : 551~555頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の概要

本発明は、自閉症患者において識別的に産生される複数の代謝化合物を同定するための試薬および方法、ならびに自閉症または自閉症圏障害の診断を提供するための1つまたは複数のそのような同定された代謝化合物を使用するための方法を提供する。患者の組織または生体液、特に脳脊髄液などの脳関連生体液において識別的に分泌される前記代謝産物は、本明細書に記載される方法を使用して見出される。これらの代謝産物は、非自閉症個体と比べた場合自閉症個体のほうが多い量でまたは少ない量で見出される。さらに、本発明は、自閉症個体、特に小児から生体液において識別的に検出される代謝産物を含むバイオマーカーを、個別にまたは複数の前記バイオマーカーのスペクトルの収集物で提供する。前記収集物またはスペクトルは、自閉症を診断するための本発明の方法の実行に有用である。

40

【0005】

50

本明細書に記載されるように、自閉症を含む複数の神経発生障害は、一般の代謝経路における変化を生じることがある。対照に対して自閉症試料に存在する代謝産物（たとえば、約10ダルトンから約1500ダルトンまでの小分子）は変動する相対レベルで検出することが可能であり、これにより患部組織にも健康な組織にも存在する化合物の生化学的スペクトルに関する情報が提供されることは当業者により理解されるであろう。そのようなスペクトルは、合わせると自閉症の特異的な指標として働くことができる変化を有する代謝産物の組合せを含む「生化学的指紋」を提供する。本明細書に示されるように、グルタメート、システイン、メチオニン、およびγアミノ酪酸（GABA）代謝に関与する代謝産物を含むある種の代謝産物は、自閉症の小脳発病に相乗的役割を果たすことができる。さらに、注釈なしのまたは未報告の代謝産物が、自閉症脳において統計的に有意な形態で存在することが見出され、自閉症および自閉症圏障害の有用な候補バイオマーカーも提供する。本明細書において同定される代謝産物は、前記障害の診断バイオマーカーとして有用である、自閉症の感度が良く特有の生化学的シグネチャを提供する。

10

【0006】

自閉症および自閉症圏障害のこれらの代謝シグネチャについての本明細書での本開示は、死後自閉症脳に対しメタボロミクスを初めて適用し、自閉症個体と非自閉症個体間の代謝産物の指紋およびその変化を提供するものである。本明細書に提供される研究により、非自閉症対照と比べた場合、自閉症対象の脳において著しく変化する代謝産物が同定された。さらに、自閉症組織において一般的に変化する代謝産物のサブセットが同定された。下にさらに詳細に説明されているように、約10ダルトンから約1500ダルトンまでの分子量を有する識別的に分泌される代謝産物が、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析（LC-ESI-TOF-MS）および／または親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）により同定されたが、熟練した研究者であれば、これらの方法が非限定的であり、自閉症患者由来の生体液において代謝産物を検出するための他の方法を本発明の方法の実行において利用することが可能であることを認識するであろう。しかし、熟練した研究者であれば、新鮮な凍結脳組織のメタボロミクス解析に適用される質量分析のこの様式は、高度に感度が良く（たとえば、3 ppmの分解能）代謝産物を極めて低量で（たとえば、マイクロモルからピコモル濃度まで）検出することができることも認識するであろう。さらに、核磁気共鳴（NMR）などの、メタボロミクス方法を実行するための当技術分野で公知の他の分析化学プラットフォームは、質量分析ほど感度が良くなく、著しく高い濃度で代謝産物を検出するにはさらに大量の生体試料が必要となる（Glishら、2003年、Nat. Rev. Drug Discov. 2巻：140～150頁に概説されている）が、にもかかわらず、本発明は、適切な状況下でそのような方法および当技術分野で公知の他の方法を使用することをはっきりと描いている。

20

30

【0007】

本発明の特定の実施形態は、以下のある種の好ましい実施形態のより詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになる。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目1）

ヒトにおける自閉症に特徴的なメタボロミクスシグネチャを同定するための方法であって、

40

a. 約10ダルトンから約1500ダルトンまでの分子量を有する1つまたは複数の細胞代謝産物について自閉症患者から単離された生体試料をアッセイするステップと、

b. 約10ダルトンから約1500ダルトンまでの分子量を有する1つまたは複数の細胞代謝産物について非自閉症患者から単離された生体試料をアッセイするステップであって、ステップaおよびbが、該生体試料中に存在する細胞代謝産物の集団のメンバーを分離すること、および約10から約1500ダルトンまでの分子量を有する1つまたは複数の識別的に産生された細胞代謝産物を検出することをさらに含む、ステップと、

c. 自閉症患者において識別的に産生される、約10ダルトンから約1500ダルトンまでの分子量を有する1つまたは複数の代謝産物を選択するステップであって、該1つま

50

たは複数の識別的に産生された代謝産物が自閉症についてのメタボロミクスシグネチャを含む、ステップとを含む方法。

(項目 2)

前記細胞代謝産物が物理的分離法を使用してアッセイされる、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記物理的分離法が液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析法である、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

1 つまたは複数の前記細胞代謝産物について化学的特定名を決定するステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 5)

1 つまたは複数の前記細胞代謝産物の前記化学的特定名が、前記代謝産物の分子精密質量または前記代謝産物の質量分析断片化パターンを使用して決定される、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記生体試料が脳脊髄液、脳組織、羊水、または血漿である、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

前記細胞代謝産物が、セロトニン、システイン、メチオニン、グルタメート、ホモシステイン、トリプトファン、または γ アミノ酪酸 (GABA) についての細胞代謝経路由来の化合物を含む、項目 1 に記載の方法。

20

(項目 8)

前記細胞代謝産物が、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンジホスフェート、3'-シアリルラクトサミン、3,4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、または SAICAR ((S)-2-[5-アミノ-1-(5-ホスホ-D-リボシル)イミダゾール-4-カルボキサミド]サクシネート)である、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

項目 1 に記載の方法に従って作製される自閉症についてのメタボロミクスシグネチャ。

30

(項目 10)

前記細胞代謝産物が、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンジホスフェート、3'-シアリルラクトサミン、3,4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、または SAICAR ((S)-2-[5-アミノ-1-(5-ホスホ-D-リボシル)イミダゾール-4-カルボキサミド]サクシネート)である、項目 9 に記載のメタボロミクスシグネチャ。

(項目 11)

ヒト試験対象における自閉症を診断するための方法であって、

a. 約 10 ダルトンから約 1500 ダルトンまでの分子量を有する 1 つまたは複数の細胞代謝産物についてその個体由来の患者試料をアッセイするステップと、
b. 患者試料において対照と比べて識別的に産生される、自閉症についてのメタボロミクスシグネチャを含む 1 つまたは複数の細胞代謝産物を検出するステップとを含む方法。

40

(項目 12)

前記細胞代謝産物が物理的分離法を使用してアッセイされる、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記物理的分離法が液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型

50

質量分析である、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記患者試料が脳脊髄液、脳組織、または血漿である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記細胞代謝産物が、セロトニン、システイン、メチオニン、ホモシステイン、トリプトファン、グルタメート、または G A B A についての細胞代謝経路由来の化合物を含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記細胞代謝産物が、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオニン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンジホスフェート、3'-シアリルラクトサミン、3, 4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、または S A I C A R ((S) - 2 - [5 - アミノ - 1 - (5 - ホスホ - D - リボシル) イミダゾール - 4 - カルボキサミド] サクシネート) である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 7)

子宮内のヒト胎児における自閉症を診断するための方法であって、

- a. メタボロミクスシグネチャを含む 1 つまたは複数の細胞代謝産物について胎児試料をアッセイするステップと、
- b. 自閉症に罹った胎児を診断するステップであって、該試料が、自閉症メタボロミクスシグネチャを含む 1 つまたは複数の該細胞代謝産物を識別的に産生するステップとを含む、方法。

(項目 1 8)

前記メタボロミクスシグネチャが、セロトニン、システイン、メチオニン、ホモシステイン、トリプトファン、グルタメート、または G A B A の代謝経路由来の 1 つまたは複数の細胞代謝産物を含む、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記代謝シグネチャが、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオニン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンジホスフェート、3'-シアリルラクトサミン、3, 4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、または S A I C A R ((S) - 2 - [5 - アミノ - 1 - (5 - ホスホ - D - リボシル) イミダゾール - 4 - カルボキサミド] サクシネート) のうちの 1 つまたは複数を含む、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 0)

自閉症についての代謝シグネチャであって、該自閉症代謝シグネチャが、自閉症において識別的に産生される、約 1 0 から約 1 5 0 0 ダルトンまでの分子量を有する 1 つまたは複数の細胞代謝産物を含み、該複数の細胞代謝産物が、セロトニン、システイン、メチオニン、ホモシステイン、トリプトファン、グルタメート、または G A B A の代謝経路由来の代謝産物を含む、代謝シグネチャ。

(項目 2 1)

N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオニン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンジホスフェート、3'-シアリルラクトサミン、3, 4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、または S A I C A R ((S) - 2 - [5 - アミノ - 1 - (5 - ホスホ - D - リボシル) イミダゾール - 4 - カルボキサミド] サクシネート) のうちの 1 つまたは複数を含む、項目 2 0 に記載の代謝シグネチャ。

(項目 2 2)

自閉症に罹っているヒトを同定するための方法であって、

10

20

30

40

50

ヒト患者から単離された生体試料を、該生体試料から細胞代謝産物の集団のメンバーを分離することにより、約10ダルトンから約1500ダルトンまでの分子量を有する1つまたは複数の細胞代謝産物についてアッセイするステップ
を含み、自閉症患者において識別的に産生される、約10ダルトンから約1500ダルトンまでの分子量を有する該1つまたは複数の代謝産物の検出により、該ヒトが自閉症に罹っていると同定される、方法。

【0008】

本発明のこれらのおよび他の目的および特長は、図面と併せて採用される以下の詳細な説明からさらによく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

10

【0009】

【図1A】図1(A)および(B)は、死後脳試料すべての全イオンクロマトグラムである。図1(A)はHILICクロマトグラフィーを表し、図1(B)はC18クロマトグラフィーを表している。自閉症試料は灰色の線で示され、非自閉症対照は黒い線で示されている。

【図1B】図1(A)および(B)は、死後脳試料すべての全イオンクロマトグラムである。図1(A)はHILICクロマトグラフィーを表し、図1(B)はC18クロマトグラフィーを表している。自閉症試料は灰色の線で示され、非自閉症対照は黒い線で示されている。

【図2A】図2(A)および図2(B)は、標準化学物質対照の存在下での比較イオン断片化パターン(図2(A))および保持時間(図2(B))により試験試料代謝産物の化学的特定名(chemical identity)を検証したイオンクロマトグラム対照である。

20

【図2B】図2(A)および図2(B)は、標準化学物質対照の存在下での比較イオン断片化パターン(図2(A))および保持時間(図2(B))により試験試料代謝産物の化学的特定名を検証したイオンクロマトグラム対照である。

【図3A】図3(A)~図3(C)はL-シスタチオニンの抽出されたイオンクロマトグラム(EIC)であり、図3(D)は、自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの相対的存在量のプロットである。図3(A)は、自閉症の新鮮な凍結死後脳試料(灰色の線)および非自閉症対照(黒い線)のメタボロミクス解析の結果を示しており、自閉症脳の後小脳虫部および外側半球におけるL-シスタチオニン(精密質量222.0628)の存在量の著しい増加を示している。図3(B)は化学標準物質の保持時間を有するEICを示している。図3(C)は化学標準物質として同時に流された脳試料のEICを示しており、前記試料は図3(B)に示される化学標準物質の保持時間と適合していた。図3(D)は自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの存在量の平均プロットである。平均の差に関するANOVAは統計的に有意であった($p=0.019$)。エラーバーは平均値の標準誤差である。

30

【図3B】図3(A)~図3(C)はL-シスタチオニンの抽出されたイオンクロマトグラム(EIC)であり、図3(D)は、自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの相対的存在量のプロットである。図3(A)は、自閉症の新鮮な凍結死後脳試料(灰色の線)および非自閉症対照(黒い線)のメタボロミクス解析の結果を示しており、自閉症脳の後小脳虫部および外側半球におけるL-シスタチオニン(精密質量222.0628)の存在量の著しい増加を示している。図3(B)は化学標準物質の保持時間を有するEICを示している。図3(C)は化学標準物質として同時に流された脳試料のEICを示しており、前記試料は図3(B)に示される化学標準物質の保持時間と適合していた。図3(D)は自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの存在量の平均プロットである。平均の差に関するANOVAは統計的に有意であった($p=0.019$)。エラーバーは平均値の標準誤差である。

40

【図3C】図3(A)~図3(C)はL-シスタチオニンの抽出されたイオンクロマトグラム(EIC)であり、図3(D)は、自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの相対的存在量のプロットである。図3(A)は、自閉症の新鮮な凍結死後脳試料(

50

灰色の線) および非自閉症対照 (黒い線) のメタボロミクス解析の結果を示しており、自閉症脳の後小脳虫部および外側半球におけるL-シスタチオニン (精密質量222.0628) の存在量の著しい増加を示している。図3 (B) は化学標準物質の保持時間を有するEICを示している。図3 (C) は化学標準物質として同時に流された脳試料のEICを示しており、前記試料は図3 (B) に示される化学標準物質の保持時間と適合していた。図3 (D) は自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの存在量の平均プロットである。平均の差に関するANOVAは統計的に有意であった ($p=0.019$)。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図3D】図3 (A) ~図3 (C) はL-シスタチオニンの抽出されたイオンクロマトグラム (EIC) であり、図3 (D) は、自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの相対的存在量のプロットである。図3 (A) は、自閉症の新鮮な凍結死後脳試料 (灰色の線) および非自閉症対照 (黒い線) のメタボロミクス解析の結果を示しており、自閉症脳の後小脳虫部および外側半球におけるL-シスタチオニン (精密質量222.0628) の存在量の著しい増加を示している。図3 (B) は化学標準物質の保持時間を有するEICを示している。図3 (C) は化学標準物質として同時に流された脳試料のEICを示しており、前記試料は図3 (B) に示される化学標準物質の保持時間と適合していた。図3 (D) は自閉症および対照脳試料におけるL-シスタチオニンの存在量の平均プロットである。平均の差に関するANOVAは統計的に有意であった ($p=0.019$)。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図4A】図4 (A) ~図4 (D) はL-シスタチオニンおよびN-アセチルアスパルチルグルタミン酸の抽出されたイオンクロマトグラムである。脳試料 (図4 (A)) および化学標準物質 (図4 (B)) におけるL-シスタチオニンの液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析 (LC-ESI-TOF-MS) /MS断片化は適合する断片化パターンを有しており、L-シスタチオニンの同一性を確認している。N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の同一性は、脳 (図4 (C)) および化学標準物質 (図4 (D)) の適合するMS/MS断片化パターンにより確認された。

【図4B】図4 (A) ~図4 (D) はL-シスタチオニンおよびN-アセチルアスパルチルグルタミン酸の抽出されたイオンクロマトグラムである。脳試料 (図4 (A)) および化学標準物質 (図4 (B)) におけるL-シスタチオニンの液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析 (LC-ESI-TOF-MS) /MS断片化は適合する断片化パターンを有しており、L-シスタチオニンの同一性を確認している。N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の同一性は、脳 (図4 (C)) および化学標準物質 (図4 (D)) の適合するMS/MS断片化パターンにより確認された。

【図5A】図5 (A) ~図5 (C) は2-アミノオクタン酸の抽出されたイオンクロマトグラム (EIC) であり、図5 (D) は自閉症および対照脳試料における2-アミノオクタン酸の相対的存在量のプロットである。図5 (A) は自閉症の新鮮な凍結死後脳試料 (灰色の線) および非自閉症対照 (黒い線) のメタボロミクス解析の結果を示しており、抽出されたイオンクロマトグラム (EIC) により示されるように、自閉症脳の後小脳虫部および外側半球における2-アミノオクタン酸 (精密質量159.1253) の存在量の著しい減少を明らかにしている。図5 (B) は化学標準物質の保持時間を示すEICである。図5 (C) は化学標準物質と同時に流された脳試料のEICであり、前記試料は図5 (B) に示される対照の保持時間と適合している。図5 (D) は自閉症および対照脳試料における2-アミノオクタン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関するANOVAは統計的に有意であった ($p=0.027$)。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図5B】図5 (A) ~図5 (C) は2-アミノオクタン酸の抽出されたイオンクロマトグラム (EIC) であり、図5 (D) は自閉症および対照脳試料における2-アミノオクタン酸の相対的存在量のプロットである。図5 (A) は自閉症の新鮮な凍結死後脳試料 (灰色の線) および非自閉症対照 (黒い線) のメタボロミクス解析の結果を示しており、抽出されたイオンクロマトグラム (EIC) により示されるように、自閉症脳の後小脳虫部

および外側半球における 2-アミノオクタン酸（精密質量 159.1253）の存在量の著しい減少を明らかにしている。図 5（B）は化学標準物質の保持時間を示す EIC である。図 5（C）は化学標準物質と同時に流された脳試料の EIC であり、前記試料は図 5（B）に示される対照の保持時間と適合している。図 5（D）は自閉症および対照脳試料における 2-アミノオクタン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関する ANOVA は統計的に有意であった（ $p = 0.027$ ）。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図 5 C】図 5（A）～図 5（C）は 2-アミノオクタン酸の抽出されたイオンクロマトグラム（EIC）であり、図 5（D）は自閉症および対照脳試料における 2-アミノオクタン酸の相対的存在量のプロットである。図 5（A）は自閉症の新鮮な凍結死後脳試料（灰色の線）および非自閉症対照（黒い線）のメタボロミクス解析の結果を示しており、抽出されたイオンクロマトグラム（EIC）により示されるように、自閉症脳の後小脳虫部および外側半球における 2-アミノオクタン酸（精密質量 159.1253）の存在量の著しい減少を明らかにしている。図 5（B）は化学標準物質の保持時間を示す EIC である。図 5（C）は化学標準物質と同時に流された脳試料の EIC であり、前記試料は図 5（B）に示される対照の保持時間と適合している。図 5（D）は自閉症および対照脳試料における 2-アミノオクタン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関する ANOVA は統計的に有意であった（ $p = 0.027$ ）。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図 5 D】図 5（A）～図 5（C）は 2-アミノオクタン酸の抽出されたイオンクロマトグラム（EIC）であり、図 5（D）は自閉症および対照脳試料における 2-アミノオクタン酸の相対的存在量のプロットである。図 5（A）は自閉症の新鮮な凍結死後脳試料（灰色の線）および非自閉症対照（黒い線）のメタボロミクス解析の結果を示しており、抽出されたイオンクロマトグラム（EIC）により示されるように、自閉症脳の後小脳虫部および外側半球における 2-アミノオクタン酸（精密質量 159.1253）の存在量の著しい減少を明らかにしている。図 5（B）は化学標準物質の保持時間を示す EIC である。図 5（C）は化学標準物質と同時に流された脳試料の EIC であり、前記試料は図 5（B）に示される対照の保持時間と適合している。図 5（D）は自閉症および対照脳試料における 2-アミノオクタン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関する ANOVA は統計的に有意であった（ $p = 0.027$ ）。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図 6 A】図 6（A）～図 6（C）は N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（NAG）の抽出されたイオンクロマトグラム（EIC）であり、図 6（D）は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の相対的存在量のプロットである。図 6（A）は、後小脳虫部および外側半球における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（精密質量 304.0909）の自閉症の新鮮な凍結死後脳試料（灰色の線）および非自閉症対照（黒い線）のメタボロミクス解析の結果を示している。図 6（B）は化学標準物質の保持時間を示す EIC である。図 6（C）は化学標準物質と同時に流された脳試料の EIC であり、前記試料は図 6（B）に示される保持時間と適合していた。図 6（D）は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関する ANOVA は 0.05 未満の p では統計的に有意ではなかった（ $p = 0.054$ ）が、0.1 未満の p 値では統計的に有意であった。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図 6 B】図 6（A）～図 6（C）は N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（NAG）の抽出されたイオンクロマトグラム（EIC）であり、図 6（D）は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の相対的存在量のプロットである。図 6（A）は、後小脳虫部および外側半球における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（精密質量 304.0909）の自閉症の新鮮な凍結死後脳試料（灰色の線）および非自閉症対照（黒い線）のメタボロミクス解析の結果を示している。図 6（B）は化学標準物質の保持時間を示す EIC である。図 6（C）は化学標準物質と同時に流された脳試

料の E I C であり、前記試料は図 6 (B) に示される保持時間と適合していた。図 6 (D) は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関する A N O V A は 0.05 未満の p では統計的に有意ではなかった ($p = 0.054$) が、0.1 未満の p 値では統計的に有意であった。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図 6 C】図 6 (A) ~ 図 6 (C) は N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (N A A G) の抽出されたイオンクロマトグラム (E I C) であり、図 6 (D) は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の相対的存在量のプロットである。図 6 (A) は、後小脳虫部および外側半球における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (精密質量 304.0909) の自閉症の新鮮な凍結死後脳試料 (灰色の線) および非自閉症対照 (黒い線) のメタボロミクス解析の結果を示している。図 6 (B) は化学標準物質の保持時間を示す E I C である。図 6 (C) は化学標準物質と同時に流された脳試料の E I C であり、前記試料は図 6 (B) に示される保持時間と適合していた。図 6 (D) は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関する A N O V A は 0.05 未満の p では統計的に有意ではなかった ($p = 0.054$) が、0.1 未満の p 値では統計的に有意であった。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図 6 D】図 6 (A) ~ 図 6 (C) は N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (N A A G) の抽出されたイオンクロマトグラム (E I C) であり、図 6 (D) は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の相対的存在量のプロットである。図 6 (A) は、後小脳虫部および外側半球における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (精密質量 304.0909) の自閉症の新鮮な凍結死後脳試料 (灰色の線) および非自閉症対照 (黒い線) のメタボロミクス解析の結果を示している。図 6 (B) は化学標準物質の保持時間を示す E I C である。図 6 (C) は化学標準物質と同時に流された脳試料の E I C であり、前記試料は図 6 (B) に示される保持時間と適合していた。図 6 (D) は自閉症および対照脳試料における N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の存在量の平均プロットである。平均の差に関する A N O V A は 0.05 未満の p では統計的に有意ではなかった ($p = 0.054$) が、0.1 未満の p 値では統計的に有意であった。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【図 7 A】図 7 (A) および図 7 (B) はまだ同定されていない代謝産物の抽出されたイオンクロマトグラム (E I C) である。複数の未知の化合物が自閉症と対照脳試料間で有意に異なることが観察された。精密質量 366.1426 (図 7 (A)) および 422.2482 (図 7 (B)) を有する分子について 2 つのそのような代謝産物の E I C が示されている。

【図 7 B】図 7 (A) および図 7 (B) はまだ同定されていない代謝産物の抽出されたイオンクロマトグラム (E I C) である。複数の未知の化合物が自閉症と対照脳試料間で有意に異なることが観察された。精密質量 366.1426 (図 7 (A)) および 422.2482 (図 7 (B)) を有する分子について 2 つのそのような代謝産物の E I C が示されている。

【発明を実施するための形態】

【0010】

好ましい実施形態の詳細な説明

本発明は下にさらに具体的に説明されており、その数多くの改変および変化が当業者には明らかになるので、本明細書に記載される実施例は説明的なものとしてのみ意図されている。本明細書の記載においておよびそれに続く特許請求の範囲全体において使用されているように、「1 つ (「a」および「an」)」ならびに「その (「the」)」の意味は、文脈が他の方法で明確に指示していなければ、複数の参照物を含む。明細書において使用される用語は一般に、本発明の文脈内において、および各用語が使用される特定の文脈において、当技術分野でのその通常の意味を有する。一部の用語は、本発明の記載に関して実行者に追加の指示を与えるために下においてより具体的に定義されている。

【0011】

自閉症は、特にその病因およびその病因にとっての脳化学の任意の検出可能な変化の意味に関して、依然として十分に理解されていない疾患である。脳化学の多数の変化が自閉症脳（すべて死後脳）において検出されてきたが、そのような変化が前記疾患の発生もしくは進行と基本的に関連しているのかどうかまたはその結果として生じるのかどうかについて一貫して理解されてはいない。一方、本明細書に提供されるメタボロミクスシグネチャ（metabolomic signature）は、調査された自閉症脳における一貫した違いを反映しており、前記疾患に一貫して関連している特定の代謝経路を同定している。

【0012】

メタボロームは、細胞またはその周囲のマトリックスに存在する細胞代謝産物の全動的セットとして定義されるが、健康または疾患／傷害状態の産物である。メタボロミクスは、ゲノミクスおよびプロテオミクスなどの他の「オミック（omic）」研究領域と比べて特に環境効果に影響されやすい。細胞代謝産物には、糖、有機酸、アミノ酸および脂肪酸、特に、細胞から分泌される、排泄されるまたは他の方法で放出され（たとえば、とりわけ化学的もしくは物理的外傷の結果として）、病理学的または化学的傷害に対する細胞応答の機能的機序に関与する化学種が含まれるが、これらに限定されない。そのような細胞代謝産物は、正しく評価されたら、疾病または毒性応答のバイオマーカーとしての働きをすることが可能であり、生物体液中で検出することができる（Sogaら、2006年、J Biol Chem 281巻：16768～78頁；Zhaoら、2006年、Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 76巻：230～6頁）。「オミクス（omics）」科学内では、メタボロミクスは、代謝の最終産物を測定するために、他の「オミクス（omics）」と比べて表現型にもっとも近いプラットフォームであると想定されている（Detmerら、2007年、Mass Spectrom. Rev. 26巻：51～78頁）。

10
20

【0013】

自閉症患者生体液により識別的に産生されるメタボロミクスシグネチャ（すなわち、細胞代謝産物の集団）は、自閉症を検出するための信頼できる診断マーカーを提供する。本発明のある種の態様は、たとえば、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析（ESI-TOF）を含むがこれに限定されない、物理的分離法を使用する細胞代謝産物のアッセイを提供する。代謝産物は、その精密な分子質量、ならびに代謝産物の質量分析断片化パターンを使用して同定することが可能である。自閉症患者により産生される細胞代謝産物を検出することにそのような方法を適用する感度により、代謝生化学よりはむしろ生理学的、発生的および行動的評価に焦点を合わせてきた当技術分野のそれほど頑強ではない方法と比べて自閉症障害の改良された同定が提供される。遺伝子転写の変化すべてが表現型と相関しているわけではないという事実を考慮すると、メタボロミクス診断アプローチを使用することは、遺伝子特異的診断に対する自閉症表現型のより信頼できる指標となる。

【0014】

30
40
50

本発明の追加の実施形態には、自閉症に特有のメタボロミクスシグネチャが含まれる。一実施形態では、1つまたは複数の細胞代謝産物を含む代謝シグネチャが、および特定の実施形態では、セロトニン、システイン、トリプトファン、メチオニン、グルタメートまたはGABA代謝経路の1つまたは複数の細胞代謝産物が本明細書において提供される。ある種の実施形態では、本明細書に記載されるメタボロミクスシグネチャを含む代謝産物は、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオニン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシー-1-ヒドロキシプロピルチアミンニリン酸、3'-シアリルラクタサミン、3,4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、SAICAR（（S）-2-[5-アミノ-1-（5-ホスホ-D-リボシル）イミダゾール-4-カルボキサミド]サクシネート）、グルタメート、またはGABA中間体（たとえば、L-グルタミン、L-グルタメート、 α ケトグルタレート（ketoglutarate）、コハク酸セミアルデヒド、4-アミノブチルアルデヒド、4-グアニジノブタノエート、も

しくはL-オルニチンなど、GABAの同化または異化に関与する代謝産物)のうちの1つまたは複数を含む。

【0015】

自閉症を診断するための方法を含む、自閉症の細胞効果および特に生化学的効果を同定し測定するための方法および試薬が提供される。本明細書で使用される用語「代謝産物」、「細胞代謝産物」または複数形の「細胞代謝産物」とは、細胞により分泌され、組織試料または生体液中に存在する約10ダルトンから約1500ダルトンまでの範囲の任意の分子または質量フィーチャーのことである。細胞代謝産物は、以下の種類の分子：酸、塩基、脂質、糖、グリコシド、アミン、有機酸、脂質、アミノ酸、オキシム、エステル、ジペプチド、トリペプチド、脂肪酸、コレステロール、オキシステロール、グリセロール、ステロイド、および／またはホルモンを含むことができるが、これらに限定されない。一実施形態では、細胞代謝産物は、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸、L-シスタチオニン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンペタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンニリン酸、3'-シアリルラクトサミン、3,4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、SAICAR((S)-2-[5-アミノ-1-(5-ホスホ-D-リボシル)イミダゾール-4-カルボキサミド]サクシネート)、グルタメート、またはGABA中間体を含むことができるが、これらに限定されない。

10

【0016】

本明細書で使用される語句「識別的に産生される... 1つまたは複数の細胞代謝産物を同定する」および「識別的に産生する」は、自閉症ヒト由来の細胞または組織と非自閉症ヒト由来の細胞または組織との比較を含むが、これに限定されない。自閉症と非自閉症対照試料間の代謝産物集団または質量フィーチャーの変動の検出または測定は、この定義に含まれる。好ましい実施形態では、様々な代謝産物の産生の変化は、対照試料に対する自閉症試料における代謝産物分子の変化のプロファイルを決断することにより測定される。

20

【0017】

本明細書で使用される用語「物理的分離法」とは、本発明の方法に従って自閉症ヒトの組織または生体液（たとえば、外側半球、および後小脳虫部脳、脳脊髄液、血液、または血漿）において産生される代謝産物の変化および差異のプロファイルを検出するのに十分な、当業者に公知の任意の方法のことである。好ましい実施形態では、物理的分離法は、糖、有機酸、アミノ酸、脂肪酸、ホルモン、ビタミン、およびペプチド、ならびにそのイオン断片および他の細胞代謝産物（好ましくは、3000ダルトン未満、さらに具体的には10から1500ダルトンまで、さらに具体的には100から1000ダルトンまでの分子量を有する）を含むが、これらに限定されない細胞代謝産物の検出を可能にする。ある種の実施形態では、物理的分離法は、液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析(LC/ESI-TOF-MS)および／または親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)であるが、本明細書に記載される細胞代謝産物は、代替の分光測定法またはこのサイズ範囲のこれらの種類の細胞化合物を分析するための当技術分野で公知の他の方法を使用して検出することが可能であることは理解されるであろう。

30

40

【0018】

統計解析のためのデータは、Agilent Mass Hunterソフトウェア(製品番号G3297AA、Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA)などの統計解析パッケージを使用してクロマトグラム(すなわち、質量シグナルのスペクトル)から抽出することができるが、代わりに代替の統計解析法を使用することができることは理解されるであろう。質量は、それが10ppm内であり2分の保持時間枠内で溶出されたら、一緒にピーキングするのが都合がよい。ピーキングされた質量(本明細書では「精密質量」と呼ばれる)は、検出された質量が±10ppm内であれば、異なるLC/ESI-TOF-MS解析にわたり同一分子と見なすことが可能

50

である。データのビニングは、統計解析および実験全体の質量比較のために必要である。たとえば、Mass Hunterにより1個の試料内の同一保持時間で同一質量を有する複数のピークが検出された場合は、そのピークを平均化してデータ解析を支援することが可能である。天然の同位体分布を欠くまたは3未満のシグナル・ノイズ比を有する質量は、解析に先立ってデータから除かれる。これらのアッセイから得られる結果は、20 ppm以内の注釈付きの値に従って評価される相対値を提供し、化学データベースに従って検出される分子量には推定同一性を与えた。したがって、20 ppm内の質量変化は、イオン源および計測手段の差異（たとえば、異なる実験間または異なる計測手段を使用する）による当技術分野で公知の特定の注釈付き細胞代謝産物の同一性を決定することと一致すると見なされた。

10

【0019】

本明細書で使用されるように、質量は、まずデータを質量および保持時間により分類するアルゴリズムを使用して別々のLC/ESI-TOF-MS注入物にわたって同一であると思えることができる。分類後、化合物は、それが3分未満または3分に等しい保持時間差および加重式（ $0.00002 \times \text{質量}$ ）未満または加重式に等しい質量差を有する場合には唯一であると思えることができる。異なる分離物由来の一連の測定値がこの定義に一致する場合には、前記測定値は同一化合物の分離から生じると見なされる。質量または保持時間のどちらかが上に挙げられる限度以上に変動することが見出される場合には、その質量は異なる化合物であると思われ、それ独自の命名が与えられる。

【0020】

20

対数底2に基づくANOVAなどの有意性検定を使用して、各時点での非自閉症試料に対する自閉症試料に存在する特有の化合物の存在量値を変換することができる。診断、実験、および余剰項を含むANOVAモデルを使用する無作為完備型ブロック計画は、以下の式：

$\text{Log}_2(\text{存在量}_{tb}) = \text{診断}_t + \text{セクション}_b + \text{エラー}_{tb}$
を使用して表現することができる。

【0021】

欠陥データは試験から除かれ、自由度を変える（欠陥データは非存在であったと仮定するのではない）。Mass Hunterソフトウェアにより実施される広範なフィルタリングは、ある種のピークをそれが一定存在量閾値より下でありゼロではないという理由で見逃すまたは濾過することがあるために、この仮定が設けられた。ANOVA F検定は、そのp値が0.05未満である場合には、有意であると思われた。倍変化は、所与の時間および処置についての最小二乗平均を使用して計算された。

30

【0022】

本明細書で使用される用語「代謝シグネチャ」および「バイオマーカープロファイル」とは、本発明の方法により同定される1つまたは複数の代謝産物のことである。本発明に従った代謝シグネチャおよびバイオマーカープロファイルは、自閉症圏障害の分子「指紋」を提供し、自閉症圏障害に罹っている個体において著しく変化した細胞代謝産物の1つまたは好ましくは集団を同定することができる。好ましい実施形態では、代謝シグネチャまたはバイオマーカープロファイルを使用して、個体における自閉症を診断することができる。

40

【0023】

本明細書で使用される用語「バイオマーカー」とは、患部と対照の間で著しい変化を示す細胞代謝産物のことである。好ましい実施形態では、バイオマーカーは、LC/ESI-TOF-MSを含む方法により、上に記載される通りに同定される。メタボロミクスバイオマーカーは、その特有の分子質量および一貫性により同定され、したがって、バイオマーカーに一致する根底にある化合物の実際の同一性は本発明の実行のためには必要ではない。代わりに、ある種のバイオマーカーは、たとえば、リアルタイムPCR、RT-PCR、ノーザン解析、およびインサイツハイブリダイゼーションを含む遺伝子発現解析により同定することができるが、これらは、一般には本明細書に記載される用語「細胞代謝

50

産物」の定義内には含まれない。

【0024】

本明細書に記載される代謝産物プロファイリングは、生きた患者から収集される試料とは対照的に死後組織で行われた。最終的に、インビボで発見されたバイオマーカーは、たとえば、脳脊髄液、血液、血漿、羊水および尿、すなわち細胞外生体分子の複雑な混合物を含む生体液などの試料を分析するのに有用であると予想される。本発明の方法は、生体液中の代謝産物は（細胞内化合物と対照的に）非侵襲的に検出することができるために、組織生検などの侵襲的手技よりも有利である。さらに、質量分析のために細胞上清を処理することは細胞抽出物よりも頑強であり面倒が少ない。しかし、たとえば、組織生検または溶解された細胞由来の細胞抽出物は本発明の方法に包含される。用語「試料」または「生体試料」または「患者試料」は、脳脊髄液、脳組織、羊水、血液、または血漿を含むが、これらに限定されない。

10

【0025】

生体液解析に先立つ、自閉症（脳）において主に冒される器官中の差次的代謝産物の同定は、新規の診断学の発展に向けての目標を定めたアプローチを提供する。限定された組の候補なしで、脳脊髄液、尿または血漿などの生体液中の自閉症に特異的なバイオマーカーを同定するのは特に困難であると考えられる。生体液は、内在性と外来性要因の両方（遺伝学、食餌、環境）により影響を受ける全身的副産物の複雑な混合物である。本発明の方法を使用すれば、特定の分析化学プロトコルを、特定の候補バイオマーカーの限定された精密質量および保持時間について生体液を評価するために使用することが可能である。

20

【0026】

下の実施例においてより詳細に記載されるように、本明細書に記載される方法を使用する自閉症組織プログラム（Autism Tissue Program (ATP)）からの15件の新鮮な凍結試料（6件の自閉症および9件の対照）の解析により、死後自閉症と非自閉症脳試料間の複数の代謝産物の存在量に統計的有意差が検出された。親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）とそれに続いてポジティブモードESI-TOFイオン化を使用する予備実験では、自閉症と非自閉症脳間で識別的に産生された合計で98の代謝産物が同定された。たとえば、5-ヒドロキシリジン（精密質量162.0981）は有意な変化を示した（ $p < 0.05$ ）。C18クロマトグラフィーとそれに続いてポジティブモードESI-TOFイオン化を使用する並列予備実験では、47の統計的に有意な代謝産物を生じた（ $p < 0.05$ ）。これらの代謝産物の化学的特定名は、タンデム質量分析（MS-MS）により決定的に確認することが可能である。

30

【0027】

新鮮な凍結死後脳由来の代謝産物は、最初、液体クロマトグラフィー（LC）により分離され、その後イオン化されて、エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析（ESI-TOF-MS）により検出された。この質量分析の様式は、新鮮な凍結脳組織のメタボロミクスに特に適しているために選択された。すなわち、この様式は高度に感度が良く、小分子代謝産物を極めて低い存在量で検出し（たとえば、マイクロモルからピコモル濃度まで）、代謝産物の精密質量の高度に正確な測定値を3 ppmの分解能で提供する。NMR（核磁気共鳴）などの、メタボロミクスに用いられる他の分析化学プラットフォームは、質量分析ほど感度が良くなく、代謝産物を著しくより高い濃度で検出するためにはさらに大量の生体試料を必要とする（Glishら、2003年、Nat. Rev. Drug Discov. 2巻：140～150頁に概説されている）。本明細書に記載されるように、死後脳試料のメタボロミクス解析により、自閉症と非自閉症脳間に複数の生化学的差異が明らかにされた。自閉症脳により識別的に分泌される細胞代謝産物の同定により、本明細書に特に記載されているように、自閉症を診断するためのバイオマーカーが提供される。

40

【0028】

ある種の実施形態では、本発明は、自閉症のバイオマーカーとして単独で、集団として、または任意の情報価値のある組合せで採られる、以下の代謝産物：N-アセチルアスパ

50

ルチルグルタミン酸、L-シスタチオニン、2-アミノオクタン酸、5-ヒドロキシリジン、ビニルアセチルグリシン、プロリンベタイン、カフェイン、3-カルボキシ-1-ヒドロキシプロピルチアミンニリン酸、3'-シアリルラクタミン、3,4-ジヒドロキシベンジルアミン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン、SAICAR（（S）-2-〔5-アミノ-1-（5-ホスホ-D-リボシル）イミダゾール-4-カルボキサミド〕サクシネート）、グルタメート、またはGABA中間体を提供する。

【0029】

神経化学経路の異常は、自閉症の発病および／または臨床症状の潜在的基盤と仮定されてきた。セロトニン、キヌレニン、グルタメート、システイン、およびメチオニン代謝に対する攪乱が自閉症においてある役割を果たしている可能性があることが、様々な量の支持的な一般的事例証拠をもって推測されてきた。これとは対照的に、本明細書で提供される方法およびこれらの方法の実行に従って提供されるバイオマーカーは、1つまたは複数の前記バイオマーカーの検出を個体における自閉症または自閉症圏障害の存在と結び付けることに実験的な証拠に基づく基礎を提供する。

【実施例】

【0030】

以下に続く実施例は本発明の特定の実施形態およびその様々な使用を説明するものである。これらの実施例は説明目的のためだけに記載されており、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【0031】

（実施例1）

死後脳組織の調製

自閉症患者および同年齢の対照由来の死後脳組織は自閉症組織プログラム（ATP）から入手した。全部で、メリーランド大学の発達障害のための脳および組織バンク（the University of Maryland Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders）からの6件の自閉症および9件の非自閉症死後脳試料が調査された（表1参照）。上記試料由来の外側半球および後小脳虫部の新鮮な凍結切片を用いてメタボロミクスは実施された。小脳は、それが自閉症患者においてもっとも一貫性のある異常な神経解剖学的所見が局在している領域であるために選択された（Kemperら、1998年、J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57巻：645～652頁）。年齢、PMI（死後の間隔）および臨床症状の程度の違いは、メタボロミクスにより測定される代謝産物の存在量および性質の変動原因であると認められた。

【0032】

メタボロミクスに先立って、凍結脳検体は、30%ショ糖を使用するLeica SM200Rミクロトームの前冷却されたステージ上に載せられ、薄片にされて重量約50mgの均一な試料を作製した。代謝産物は、円錐形ガラスホモジナイザーにおいて試料をホモジナイズすることにより湿組織重量比あたりの容積に基づいて80%メタノール／20% 0.5%ギ酸に抽出された。次に、試料は-20℃で30分間保管されて、タンパク質および不溶性物質を沈殿させた。その後、冷却インキュベーション試料は、16,000×g、4℃で25分間遠心分離され、細胞片、タンパク質、および他の不溶性物質をペレット状にした。次に、上清は新しいチューブに移され、300μlの抽出バッファーを用いて再抽出された。試料は、乾燥して抽出バッファーを取り除くまで6～7時間回転式エバポレーターにおいて乾燥された。次に、抽出物は500μlの20%アセトニトリル／80% 0.1%ギ酸に溶解され、13,000×gで3時間Millipore 3kDa Microconカラム（Millipore）中で遠心分離されて、大きな分子量（>3kDa）の生体分子を取り除いた。フローズルーは回転式エバポレーターにおいて乾燥され、2μl/mgの95% 0.1%ギ酸／5%アセトニトリルに溶解され、LC-MSによる分析に先立って-80℃で保管された。

【0033】

液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析 (LC-ESI-TOF-MS) は、精密質量MSおよびMS/MSイオン断片化が可能なG6520AA QTOF高分解能質量分析計からなるAgilent QTOF LC/MSシステムを使用して、これらの抽出物で実施された。各試料の極性代謝産物画分は、最大分離および小分子分解能のために2つの異なるクロマトグラフィー法、すなわちa) 3×100mm Phenomenex 3μm Luna親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) およびb) 2.1×50mm Zorbax 1.8μm C18-SBカラム (C18) を使用して解析された。このアプローチは、分離されそれに続いてイオン化され測定される代謝産物の数を最大にした。超高压液体クロマトグラフィー (UPLC) 解析は、5%アセトニトリル/95%水/0.1%ギ酸から100%アセトニトリル/0.1%ギ酸までの15分勾配を流速400μl/分で使用してZorbax C18カラムを用いて実施された。HILIC HPLC法は、95%アセトニトリル/5%水/0.1%ギ酸から60%アセトニトリル/40%水/0.1%ギ酸までの16分勾配を500μl/分の流速で使用して実施された。エレクトロスプレーイオン化は、Agilent 均一濃度ポンプが内部質量基準溶液をほぼ0.01ml/分でソース内に絶えず送る二重ESIソースを使用して用いられた。機器の質量範囲は75~1500Daに設定され、データはダイナミックレンジを最大にするために2GHzモードで得られた。データ取得は、高分解能精密質量条件を使用するAgilent MassHunter B.02.00バージョンを用いて実施された。

【0034】

(実施例2)

自閉症脳において識別的に産生される代謝産物の同定

データ解析に先立って、各試料の全イオンクロマトグラム (TIC) は、MSシグナルの質および再現性について慎重に検査された。TIC存在量がLC-MS勾配全体の中央値から25%を超えて逸脱した試料では、LC-MS解析が繰り返された (図1)。データは、脱同位体化 (deisotoped) され、次にオープンソースmzDataフォーマットに変換された。

【0035】

データ解析は、オープンソース統計プログラミングおよび解析ソフトウェアRを使用して実施された。XCMSパッケージ (Smithら、2006年、Anal., Chem. 78巻: 779~787頁) を使用し、ピークピッキングのCentwaveアルゴリズムを使用してLC-ESI-TOF-MSから得られるファイルを解析した (Tautenhahnら、2008年、BMC Bioinf. 9巻: 504頁)。LC-MS試料全体の保持時間偏差は、すべてのLC-MS試料に共通のフィーチャーのレクター (保持時間補正) ロエス (loess) 回帰を使用して補正され、そのフィーチャーはXCMSにおける密度ベースの関数を使用してグループ化された。HILICクロマトグラフィーの最大観察偏差は15秒であり、C18クロマトグラフィーでは4秒であった。グルーピング関数を実施した後、LC-MS試料において失われたフィーチャーは、フィーチャーグループの範囲に基づくm/zおよび保持時間枠を使用して反復的に積分された。ピーク強度表は、単変量と多変量統計解析の両方を使用して評価された。汚染物イオンは、脳組織抽出物と偽抽出ブランクを比較することにより取り除かれた。脳組織抽出物と偽抽出ブランクの両方に存在するフィーチャーは、その存在量が抽出ブランクの5倍未満の場合にはデータセットから取り除かれた。個々の質量フィーチャーの統計的有意性は、対照脳と自閉症死後脳との間にはその存在量の差はないという帰無仮説の下で実施された。差次的代謝産物、またはフィーチャーは、複合脳領域に関するモデルlog2 (存在量) からセクション+診断を用いる不完備型ブロック計画ANOVAを使用して決定された。フィーチャーは、それがANOVAモデルの診断要因において25%を超える倍変化および0.05未満のp値を示す場合は統計的に有意と見なされた。各統計的に有意なフィーチャーの抽出されたイオンクロマトグラムはさらに評価されて、偽の結果の包含を減らすために自閉症と正常な抽出物間の観察可能な差を確認した。

【0036】

直接注入物は、XCMSにおける連続ウェーブレット変換 (Continuous Wavelet Transform) (Duら、2006年、Bioinformatics、22巻: 2059~2065頁) ピークピッキングアルゴリズムを使用して解析された。Agilent質量定性分析 (Mass Qualitative Analysis) ソフトウェアバージョン2.0.0Bを使用して、ベンダー特有の生データファイルをオープンソースmzDataファイルに変換した。1000に等しいまたはそれより大きい高さを有するフィーチャーは解析に含まれ、次に、質量フィーチャーを同定することに先立って脱同位体化された。質量フィーチャー (推定代謝産物) の作製は、R/Bioconductor由来のXCMS (Smithら、2006年、Anal., Chem. 78巻: 779~787頁) ライブラリー中に存在する方法を使用して実行された。各ESI極性は個別に処理された。高分解能高質量精度データにおけるピークの検出を目的とするcentwaveアルゴリズム (Tautenhahnら、2008年、BMC Bioinf. 9巻: 504頁) はピークピッキングのために利用された。centwaveアルゴリズムのための入力変数は、QTOF設定およびクロマトグラフィー法に基づいていた。ピークピッキングに続いて、保持時間における偏差はロエス回帰を使用して補正された。質量フィーチャーピンまたはグループは、LC-MS勾配に最適化されたパラメータを使用する密度ベースのグループ化アルゴリズムを使用して作製された。データを質量フィーチャーにグループ化した後、失われたフィーチャーは、XCMSにおける反復ピークフィリング法を使用して、フィーチャーの保持時間および質量範囲に基づいて積分された。

10

20

【0037】

個々のLC-MSにおいて検出される質量フィーチャーのビニングを使用して、注入物にわたって同一保持時間に存在しているフィーチャーを同定した。精密質量と保持時間の両方に基づくビニングアルゴリズムを使用して、質量フィーチャーは異なるLC/ESI-MS-QTOF実験を通じて同一であると見なした。ビニング基準は、より低い分子量でより大きな質量差を可能にするスライディング質量差スケールとクロマトグラフィーの再現性に基づく一定の保持時間枠の両方に基づいていた。

【0038】

個々の質量フィーチャーの統計的有意性試験は、順列ベースの検定統計量を使用して、対照と自閉症小脳虫部試料間にはその存在量の差はないという帰無仮説の下で実施された。この解析は、RにおけるpcaMethodsライブラリーを使用するローディングおよびスコアプロットにおけるメタデータの異なる組合せを探索することにより実施された (Stackliesら、2007年、PcaMethods: A collection of PCA methods. R package version 1.12.0., CRAN.R-project.org/から利用可能)。対照と自閉症死後脳試料間の一般差はウェルチt検定を使用して評価された。ベジアン主成分分析は、代謝の全体的変化が対照と自閉症脳組織間に存在するかどうかを決定する場合にこの方法が失われたデータを許容することができるために (Obaら、2003年、Bioinformatics、19巻: 2088~2096頁)、実施された。この解析は、RにおけるpcaMethodsライブラリーを使用するローディングおよびスコアプロットにおけるメタデータの異なる組合せを探索することにより実施された (Stackliesら、2007年、Pca Methods: A collection of PCA methods. R package version 1.12.0., CRAN.R-project.org/から利用可能)。

30

40

【0039】

統計的に有意なフィーチャーは、試料を教師なしの形態で分類するその能力を調べるために、主要クラスター分析 (Principal Cluster Analysis (PCA)) ベースの方法および階層的クラスタリングを使用してモデル化もされた。その結果、死後自閉症脳と非自閉症対照間の統計的に有意差のある低代謝産物の包括的リストが、実験あたり平均で6,000フィーチャーの統計的解析に続いて同定された。質量分析ベースのメタボロミクスプロファイリングまたはメタボロミクスにより、HILICを使用して98件の代謝産物およびC18クロマトグラフィーを使用して47件の代謝産物

50

において自閉症脳に有意な変化（ p 値＜0.05）が明らかにされた。

【0040】

【表1】

表1: 自閉症脳において統計的に有意に変化している代謝産物および経路を同定するための LC-ESI-TOF-MS メタボロミクスを受ける、自閉症組織プログラム (ATP) 承認死後試料。UMB# は記録保存試料番号を表す。

UMB#	凍結							
	小脳虫部	外側半球	診断	性別	年齢(歳)	日数	年齢	PMI(時間)
1182	+	+	自閉症	F	9	354	9.97	24
1185	+	+	対照	M	4	258	4.71	17
1349	+	+	自閉症	M	5	220	5.60	39
1407	+	-	対照	F	9	46	9.13	20
1500	+	+	対照	M	6	320	6.88	18
1541	+	+	対照	F	20	228	20.62	19
1638	+	+	自閉症	F	20	277	20.76	50
1674	+	+	対照	M	8	339	8.93	36
1706	+	+	対照	F	8	214	8.59	20
1708	+	+	対照	F	8	50	8.14	20
1860	-	+	対照	M	8	2	8.01	5
4231	+	+	自閉症	M	8	300	8.82	12
4671	+	+	自閉症	F	4	165	4.45	13
4721	+	+	自閉症	M	8	304	8.83	16
4898	+	+	対照	M	7	272	7.75	12
15	14	14	自閉症 = 6	男性8人				
			対照 = 9	女性7人			9.19	18.56

【0041】

(実施例3)

自閉症特異的代謝産物の化学的アノテーション

実施例2に記載される自閉症小脳において識別的に分泌される代謝産物の同定に続いて、これらの分子の化学的アノテーションは、イオン断片化パターン解析(MS-MS)によりさらに精密にされた。具体的には、上で同定された各小分子の断片化パターンおよび保持時間は、分析用化学標準物質と比較された。各小分子の化学的特定名の確認は自閉症バイオマーカー決定には必要ではないが、注釈付きの同一性は、それが小分子バイオマーカーごとにより均一な命名法を与えるという点で都合がよい。識別的に産生される代謝産物のそれに続く化学的同定により、バイオインフォマティクス(GeneGoソフトウェア)による特定の経路上への代謝産物のインシリコマッピングも可能になる。したがって、この情報により、自閉症の死後脳と非自閉症年齢適合対照間の生化学的差異の根底にある全身的代謝経路および／またはネットワークが明らかにされた。

【0042】

各化合物のニュートラル精密質量は、候補同一性については、公開の検索可能なデータベースMETLIN(metlin.scripps.edu)、ヒトメタボロームデータベース(www.hmdb.ca)、および遺伝子とゲノムの京都エンサイクロペディア(www.genome.jp/kegg/)、または生物学磁気共鳴バンク(www.bmrwisc.edu/metabolomics/)に対して照合された。測定された質量フィーチャーは、その精密質量が注釈付きのデータベース分子の百万分の20(0.00002×質量)以内である場合は、データベースに存在する代謝産物と適合すると見なされる。バイオマーカー候補の化学的特定名は、以下の3種類の基準：(1

分子精密質量、(2) MS/MS断片化パターンおよび(3)クロマトグラフィー保持時間のうちの1つまたはそれよりも多くを使用して確認された。エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析(LC-ESI-TOF-MS/MS)(すなわち、タンデム質量分析)データの解釈により決定される、各候補バイオマーカーの精密質量(すなわち、質量フィーチャー)は、推定分子同一性について上に記載される様々な公開の検索可能なデータベースに対して照合された。次に、注釈付きの候補は、候補分子イオンについてのMS/MSプロダクトイオンスペクトルを獲得し、次に公知の分析用標準的基準化合物について得られるプロダクトイオンスペクトルに対してMS/MS断片化パターンを適合させることにより検証された(Cummingsら、2009年、J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.、877巻:1221頁)。

10

【0043】

L-シスタチオニン、2-アミノオクタン酸およびN-アセチルアスパルチルグルタミン酸の分析用化学標準物質は、比較質量分析のためにSigma Chemical Co.、St. Louis、MOから購入された。化学基準物質は、原試料のメタボロミクス解析において使用される同一クロマトグラフィー法を使用して評価された。さらに、7つの原試料(4つの自閉症および3つの対照)は、保持時間およびイオン断片化適合を保証するために、化学標準物質との比較のため再解析された。化学基準物質は適切なバッファーに溶解され、100 μ M標準物質は、95% 0.1%ギ酸/5%アセトニトリルに希釈することにより調製された。実験試料および化学標準物質は、衝突エネルギーを決定するための以下の式: 衝突エネルギー = (前駆体のm/z - 100) / 100 * 3 V + 10 Vを使用して断片化された。推定アノテーションは、原試料における保持時間および断片化パターンが化学基準と適合する場合は、正しいと見なされた。推定代謝産物が、断片化される試料抽出物において存在量が不十分である場合には、保持時間だけがアノテーションを確認するために使用された。

20

【0044】

第三の確認基準は、化学標準物質のクロマトグラフィー保持時間およびイオン化断片化パターン(図2)がバイオマーカー候補の保持時間と適合するかどうかを決定するために、内在性代謝産物を公知の基準化合物と一緒に同時注入する(すなわち、スパイクすること)により確立された。タンデム質量分析、またはMS-MSを使用して、これらの実験における内在性代謝産物の同一性を確認した。データ解析が完了した後、統計的に有意な代謝産物のサブセットを公知の化学標準物質に対して確認するために選択した。

30

【0045】

これらのアッセイでは、上記の質量フィーチャーを同定するために使用される新鮮な凍結脳抽出物は1 mMの化学標準物質でスパイクされ、次にMS-MSにより解析された。残りの未使用の試料またはスパイクされた試料はLC-ESI-MS/MSにより処理されて、推定的に同定された化合物のイオンの構造および存在量を確認した。これらの実験で対照として使用された標準物質は公知の保持時間を有していた。スパイクされた試料において観察された並行保持時間により、代謝産物同一性がさらに確認された。候補バイオマーカーの化学的特定名の最終確認は、断片イオンの検出(図2、A)と保持時間(図2、B)の両方に基づいて行われた。ヒットの分類は、分析(新鮮な凍結脳抽出物)と化学基準MS/MSスペクトル間で共有される断片イオンの質量を同定する「共有ピークカウント」法に基づいていた。

40

【0046】

統計的な有意差は、死後自閉症と非自閉症脳試料間の複数の代謝産物の存在量において検出された(表2)。有意である高い可能性のある代謝産物に焦点を合わせ、潜在的な誤った人為的結果を排除するために、各データセット(HILICおよびC18クロマトグラフィー)は、対照と自閉症脳試料間の存在量の25%倍変化の中等度フィルターを使用してフィルターされた。HILICクロマトグラフィーとそれに続くポジティブモードESI-QTOFイオン化により25%を超える倍変化を示す988件の質量フィーチャーが同定され、そのうちの98件の代謝産物が自閉症と非自閉症脳間で統計的に有意差があ

50

った ($p < 0.05$)。さらに、C18クロマトグラフィーとそれに続くポジティブモードESI-QTOFイオン化により、少なくとも25%の倍変化を有する938件の質量フィーチャーが測定され、47件の統計的に有意な代謝産物が生じた ($p < 0.05$)。表2は、自閉症と対照死後脳試料間で存在量に少なくとも25%の変化を有する測定された有意な代謝産物のサブセットを示しており、対応する抽出されたイオンクロマトグラム (EIC) は自閉症と対照脳試料間で際立った差を示している。メタボロミクス研究のもっとも厄介な面の1つは測定された小分子の多くが公開されたデータベースではまだ注釈が付いていないことである。現在の方法は、特有の質量による小分子代謝産物の同定を可能にしているが、化合物名による同定はさらに厄介である。同定された代謝産物は新規のバイオマーカーを表しており、重要なことに、自閉症の病因の一因となる追加の経路を指摘している。

【0047】

【表2-1】

表2: 死後自閉症脳試料と非自閉症脳試料との間で有意差のあるレベルを示した代謝産物

精密中性質量	保持時間 (分)	自閉症脳試料における変化	推定アノテーション	生化学的経路	p値
C18 クロマトグラフィー					
136.5265	1.48	↑	不特定		0.049
143.0939	0.33	↓	ビニルアセチルグリシン/ プロリンベタイン	ホモシステイン	0.01
159.1253	2.72	↓	DL-2アミノオクタン酸 (確認済み)		0.02
173.0308	0.33	↓	不特定		0.04
180.0640	0.93	↓	不特定		0.0005
194.0805	3.62	↓	カフェイン		0.034
279.1636	0.4	↓	不特定		0.03
286.1751	2.06	↑	不特定		0.012

【0048】

【表 2 - 2】

321.0561	1.5	↑	不特定		0.02
356.2055	3.16	↑	不特定		0.05
363.1455	1.33	↑	不特定		0.05
366.1421	0.58	↑	不特定		0.016
382.8678	1.22	↑	不特定		0.035
408.2181	5.58	↓	不特定		0.029
422.2482	4.83	↑	不特定		0.023
426.1936	4.67	↑	不特定		0.039
531.2841	1.14	↑	不特定		0.049
597.2905	6.98	↓	不特定		0.012
599.3340	1.07	↑	不特定		0.032
632.2266	0.56	↑	3-カルボキシ-1- ヒドロキシプロピル チアミンジホスフェート/ 3'-シアリルラクトサミン		0.037
806.0834	5.18	↓	不特定		0.027
823.0550	6.85	↑	不特定		0.016
823.7238	6.85	↑	不特定		0.034
HILIC クロマトグラフィー					
87.0139	8.74	↑	3,4-ジヒドロキシベンジル アミン		0.02
133.0168	8.74	↑	不特定		0.008
133.0195	8.98	↑	不特定		0.016
139.0609	1.33	↓	不特定		0.03
143.0922	2.55	↓	不特定		0.049
162.0981	9.37	↑	5-ヒドロキシリジン		0.008
222.0628	8.74	↑	L-シスタチオニン (確認済み)	トリプトファン	0.019
241.1764	5.76	↓	不特定		0.019
255.0853	5.16	↑	不特定		0.039
304.0909	1.23	↑	N-アセチルアスパルチル グルタミン酸 (確認済み)	神経ペプチド	0.054
309.9921	5.68	↓	不特定		0.046
317.1924	5.87	↑	不特定		0.002
364.0987	4.07	↑	不特定		0.042
418.0277	3.37	↑	不特定		0.018
430.1120	7.66	↑	不特定		0.047
438.0307	2.58	↑	不特定		0.013
454.0045	2.6	↑	不特定		0.02
454.0692	4.04	↑	SAICAR		0.042
464.0335	3.36	↑	不特定		0.018
473.2109	4.06	↑	不特定		0.025
501.9891	3.34	↑	不特定		0.012
517.1560	4.09	↑	不特定		0.027

【 0 0 4 9 】

【表 2 - 3】

522.0543	4.02	↑	不特定	0.012
527.0686	2.63	↑	3-カルボキシ-L- ヒドロキシプロピルチア ミンジホスフェート	0.014
538.0278	3.96	↑	不特定	0.007
543.0427	2.89	↑	不特定	0.017
547.9951	3.41	↑	不特定	0.008
568.0602	4.03	↑	不特定	0.004
585.1485	4.10	↑	不特定	0.035
590.0422	4.02	↑	不特定	0.001
616.9752	2.61	↑	不特定	0.015
636.0475	4.07	↑	不特定	0.032
645.1668	7.67	↑	不特定	0.041
658.0298	4.06	↑	不特定	0.031
668.0565	2.79	↑	不特定	0.044
674.0040	4.01	↑	不特定	0.015
733.5650	0.79	↓	ジパルミトイル- ホスファチジルコリン	0.044
811.0869	4.15	↑	不特定	0.038
860.2212	7.68	↑	不特定	0.042
882.1976	7.67	↑	不特定	0.049

【0050】

識別的に分泌された代謝産物の化学的アノテーション

化学的アノテーションは、識別的に分泌された代謝産物の以下のサブセットについて確認された。

【0051】

L-シスタチオニン

システインおよびメチオニン代謝経路におけるいくつかの代謝産物は、対照と比べて自閉症脳において著しく増加していた。HILICクロマトグラフィーを使用して、自閉症脳試料の後小脳虫部でも外側半球でもL-シスタチオニン（精密質量222.067）では統計的有意差が検出された（ $p=0.019$ 、図3（A）および3（D））。L-シスタチオニンの化学的特定名は、死後脳試料（図4（A））と化学標準物質（図4（B））間の保持時間（図3（B）および3（C））ならびにイオン断片化パターンの比較により二次的に確認された。

【0052】

2-アミノオクタン酸

L-シスタチオニンとは対照的に、代謝産物2-アミノオクタン酸（精密質量159.125）の存在量は、自閉症患者の後小脳虫部でも外側半球でも著しく減少していた（ $p=0.027$ 、図5（A）および5（D））。2-アミノオクタン酸の全体脳減少は、自閉症と対照試料間で144%であった。2-アミノオクタン酸はこれまで脳試料において調べられたことがなく、したがって、2-アミノオクタン酸濃度の変化が自閉症と関係している初めての証拠が本明細書で提供される。以前の研究では尿中でのこの化合物が報告され測定されているだけである（Parryら、1957年、Clinica Chimica Acta、2巻：115～125頁）。化学標準物質（図5（B））と死後脳試料（図5（C））間の比較質量分析により、代謝産物保持時間の適合が実証された。死後脳試料における2-アミノオクタン酸の低い存在量範囲は、本研究における他の代謝産物について用いられた標準MS-MS法に従ってそのイオン断片化を得る障害となっていた。

【0053】

N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（NAG）

N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（精密質量304.091）の存在量は、正常な対照と比べて死後自閉症脳において増加していた。これらの結果は、自閉症のヒトインビトロモデルについて以前報告されたグルタメート経路の攪乱（Cezarら、2007年、*Stem Cells Dev.* 16巻：869～882頁）、ならびに他の臨床研究（Blaylockら、2009年、*Curr. Med. Chem.* 16巻：157～170頁；Friedmanら、2006年、*Arch. Gen. Psychiatry*、63巻：786～794頁；Kleinhansら、2007年、*Brain Res.* 1162巻：85～97頁；Pardoら、2007年、*Brain Pathol.* 17巻：434～447頁；Shinoheら、2006年、*Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*、30巻：1472～1477頁）と一致している。しかし、以前の報告と違って、本明細書に記載される結果は、グルタメート代謝中間体であるN-アセチルアスパルチルグルタミン酸に対する以前は認識されていなかった直接的攪乱を示している。統計的有意性を示して（ $p = 0.054$ 、図6（A）および6（D））、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の化学的特定名は、死後脳試料（図4（C））と化学標準物質（図4（D））間の保持時間（図6（B）および6（C））とイオン断片化パターンの両方を明らかにしている比較質量分析により確かめられた。

【0054】

不特定化合物

上に記載される代謝産物に加えて、本明細書に記載されるメタボロミクス解析により、複数の注釈なしの代謝産物（すなわち、公開されたデータベースでは注釈が付いていない）の変化が同定された。これらの代謝産物の存在量は、対照と比べた場合、自閉症脳試料において有意に増加しているまたは減少していた（ $p < 0.05$ ）。2つのそのような不特定小分子代謝産物の抽出されたイオンクロマトグラムは図7（A）および7（B）に示されている（それぞれ、精密質量366.1426および422.2482）。これらの注釈なしの内在性代謝産物の両方とも自閉症脳領域において著しく増加していた。フィーチャーA（精密質量366.1426）は自閉症と対照脳試料間で存在量が42%増加していた。フィーチャーB（精密質量422.2482）の存在量は自閉症脳試料において181%増加していた。公開されているデータベースにこれらの代謝産物のアノテーションが現在ないからといって、自閉症についての候補診断バイオマーカーとしてこれらの代謝産物が排除されることはない。本明細書で用いられる分析化学検出システムの高度に感度が良く定量的性質は、測定可能なエンドポイント（すなわち、精密質量）を提供し、このエンドポイントは自閉症患者由来の患者試料（たとえば、組織または生体液）において測定することが可能である。さらに、NMRなどの他の分析プラットフォームを使用して、これらの化合物の化学式を確認することができる。化学的アノテーションがないと特定の生化学経路上へのその分子のマッピングが妨げられるだけである。

【0055】

要約すると、死後自閉症と非自閉症脳試料間で約10から約1500ダルトンまでサイズに幅がある複数の代謝産物の存在量において統計的有意差が検出された（表2）。HILICクロマトグラフィーとそれに続くポジティブモードESI-QTOFイオン化により、自閉症脳と非自閉症対照間で統計的な有意差（ $p < 0.05$ ）のある合計で98件の代謝産物が同定された。さらに、C18クロマトグラフィーとそれに続くポジティブモードESI-QTOFイオン化により、47件の統計的に有意な代謝産物（ $p < 0.05$ ）が生じた。この包括的シグネチャは、これらの内在性化学物質に対する攪乱を生体液においても定量的な形態で測定されるかどうかを調べるトランスレーショナルアプローチに即時的手段を提供する。

【0056】

（実施例4）

患者生体液において分泌される代謝産物の同定および評価

自閉症により主に冒される器官である脳組織を評価すれば本明細書に記載される自閉症バイオマーカーの同定が可能であるが、本発明の方法は脳組織の検査に限定されない。たとえば、脳脊髄液、血液、血漿、羊水および尿を含む生体液、すなわち、細胞外生体分子

の複雑な混合物などの患者試料を分析すれば、識別的に分泌される代謝産物の同定および評価も可能になる。この方法は、生体液中に存在する小分子を非侵襲的に（細胞内化合物とは対照的に）検出することができるために、組織生検などの侵襲的手法よりも都合がよい。さらに、質量分析のために細胞上清を処理するのは細胞抽出物よりも頑強であり手間がかからない。たとえば、組織生検または溶解された細胞由来の細胞抽出物は本発明の方法に包含されている。

【0057】

さらに、当業者であれば、脳代謝産物の周囲の脳脊髄液への分泌を認識しているであろう。今度は、記載された方法（すなわち、メタボロミクス解析）による脳脊髄液の収集および評価により、識別的に発現される代謝産物の解析および同定が可能になる。本発明の方法を使用すれば、特定の候補バイオマーカーの定義された精密質量および保持時間について脳脊髄液および他の生体液を評価するために特定の分析化学プロトコールを使用することが可能である。

10

【0058】

したがって、本発明の方法のこれらの態様では、従来の技法（たとえば、腰椎穿刺）を使用して脳脊髄液などの生体液が得られ、その生体液は本明細書に記載される通りに処理されて、タンパク質および約3000ダルトンを超える分子量を有する他の生体物質を取り除く。分離法、たとえば、LC-TOF質量分析は、処理された生体液およびそこで検出された代謝産物に適用される。自閉症に特徴的な1つまたは複数の識別的に産生される代謝産物の検出を使用して、自閉症に罹っているまたは自閉症になるリスクのある対象を同定し、追加の行動学的方法および他の診断法が指示される必要を示す。

20

【0059】

同様に、当業者であれば、脳小代謝産物の血液脳関門を越える分泌を認識しているであろう。血漿のメタボロミクス解析は、記載されている通りに哺乳動物から得られる血液試料で実施されてきた。すなわち、血漿を解凍し、450 μ lの氷冷MeOH対H₂O（8対1 v/v）を添加し、2～8℃で10分間攪拌する。次に、試料を18,400×g、4℃で20分間遠心分離し、上清をチューブに移し、ペレットが観察されなくなるまでステップ3および4を繰り返す。試料を乾燥させ、次に50 μ lの50対50のACN対0.1%ギ酸に再溶解し、続いて代謝解析をする。要約すると、本発明の方法は、2つの例として脳脊髄液および血漿を含む生体液に適用される。

30

【0060】

（実施例5）

自閉症脳において変化した生化学および代謝経路の同定

その化学的特定名が上記の通りに確認された統計的に有意な代謝産物は、遺伝子とゲノムの京都エンサイクロペディア（KEGG）経路データベースと比較されインシリコでマッピングされた。フィッシャー直接検定を使用して、統計的に大きな比率を占める生化学経路を見つけた。試料全体で共通の傾向を示すフィーチャーのグループ化も、カノニカルKEGG経路上に表されていない分子間に何か生化学的相互作用が存在するかどうかを決定するためにKEGGデータベースを使用して評価された。このアプローチにより、インビボで観察される代謝変化の根底にある機構的経路を同定することができた。差次的メタボロミクスプロファイルを、遺伝子とゲノムの京都エンサイクロペディア（KEGG, release 41.1, www.genome.jp/kegg）に概要が述べられているそのそれぞれの生化学経路にマッピングすることにより、非自閉症対照と比べて自閉症対象の小脳において上方調節されているまたは下方調節されている特定の代謝経路が明らかになった。非自閉症対照と比べて自閉症脳において、グルタメート、システイン、メチオニン、トリプトファンおよびGABA代謝経路への著しい変化が検出された。

40

【0061】

本明細書に記載されるメタボロミクス法の結果は、複数の生化学経路およびネットワークにおける同時変化を測定しており、特定の自閉症脳領域の量的事実上の生化学シグネチャを提供している。自閉症患者の死後脳と非自閉症対照間の比較メタボロミクスにより

50

、頑強なバイオマーカー、ならびに自閉症の初期診断のための手段を提供する生化学変化が明らかにされた。本明細書に提供される識別的に分泌される代謝産物は、自閉症についてのいくつかの候補診断バイオマーカーを含む。

【0062】

本発明は、本発明の開示された実施形態に限定されることを意図していない。前述の開示は本発明のある種の特定の実施形態を強調しており、あらゆる改変またはそれと同等の代替手段は、添付される特許請求の範囲に記載されている本発明の精神および範囲内であることは理解されるべきである。

【図 1 A】

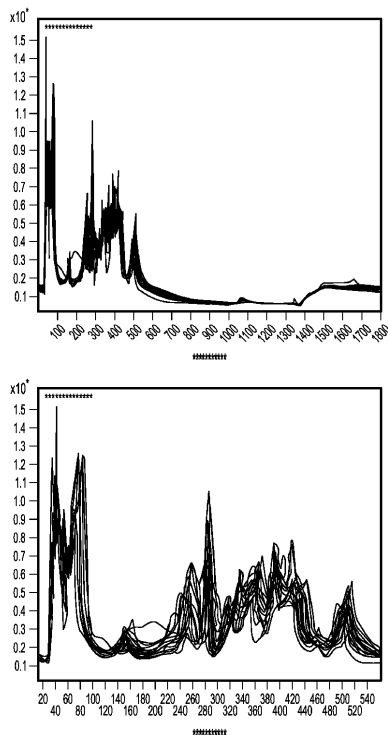


FIG. 1A

【図 1 B】

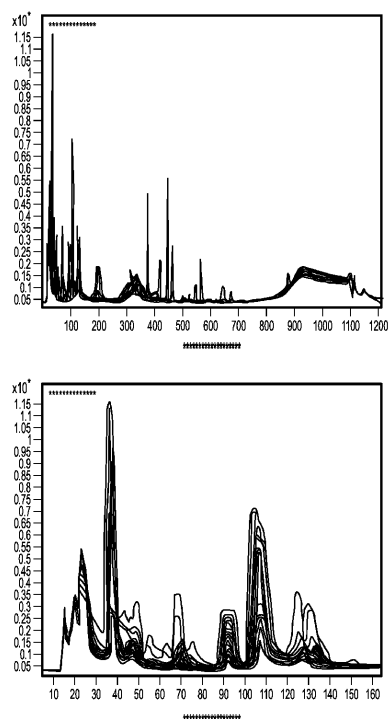


FIG. 1B

【図 2 A】

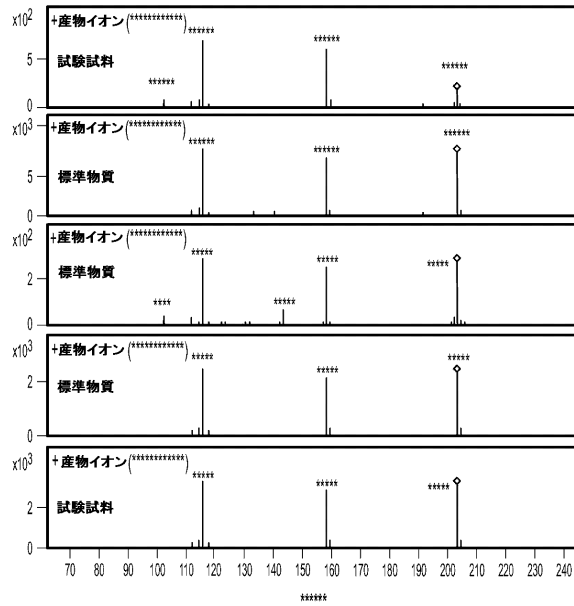


FIG. 2A

【図 2 B】

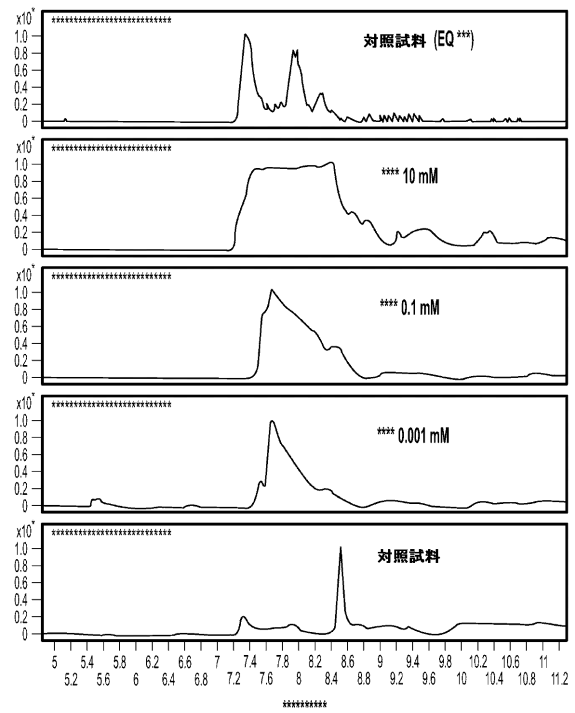


FIG. 2B

【図 3 A】

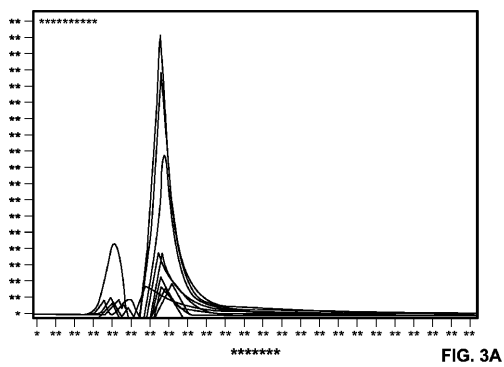


FIG. 3A

【図 3 C】

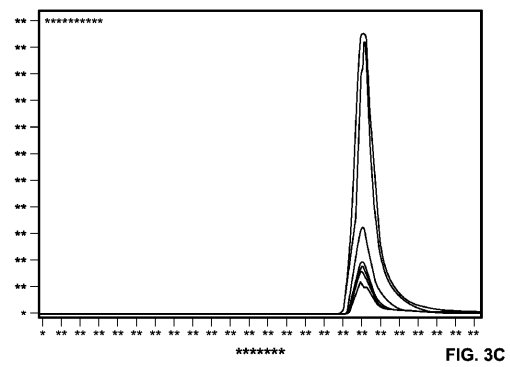


FIG. 3C

【図 3 B】

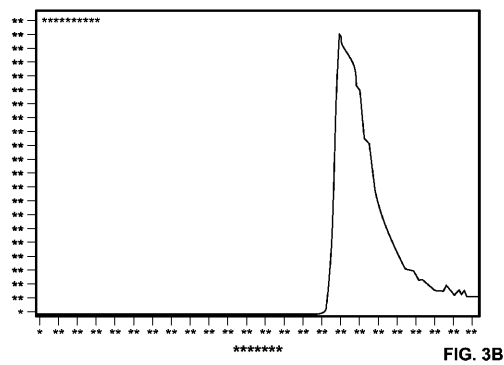


FIG. 3B

【図 3 D】

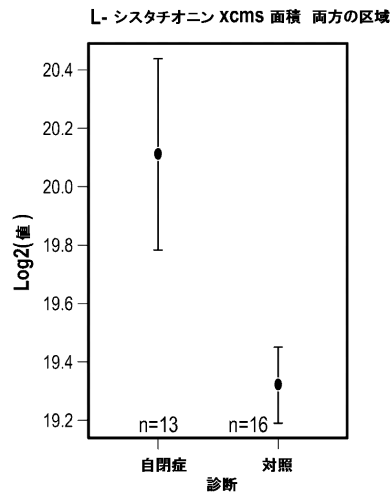


FIG. 3D

【図 4 A】

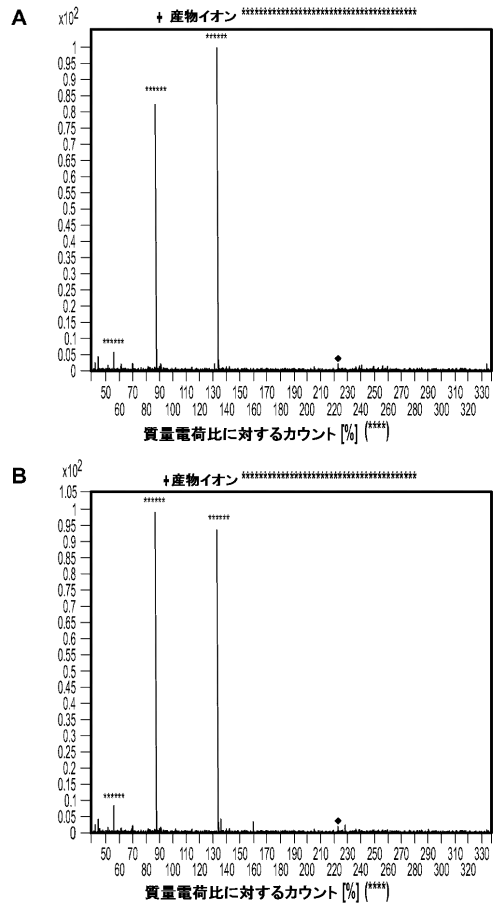


FIG. 4A

【図 4 B】

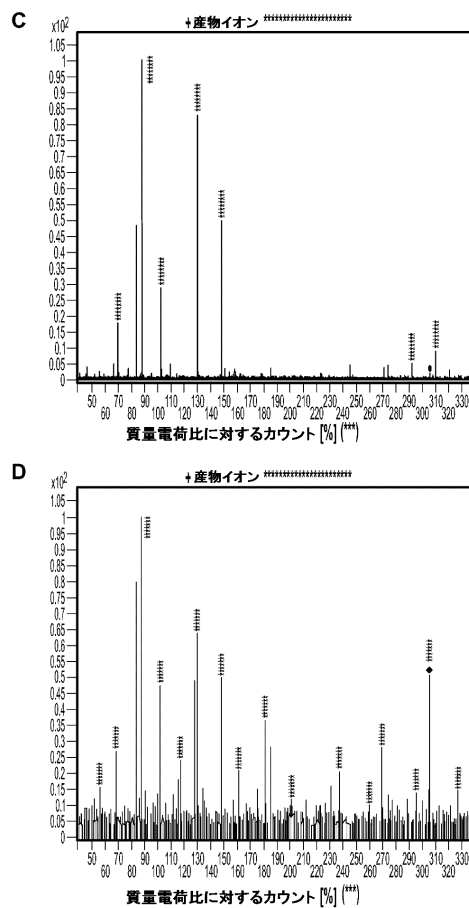


FIG. 4B

【図 5 A】

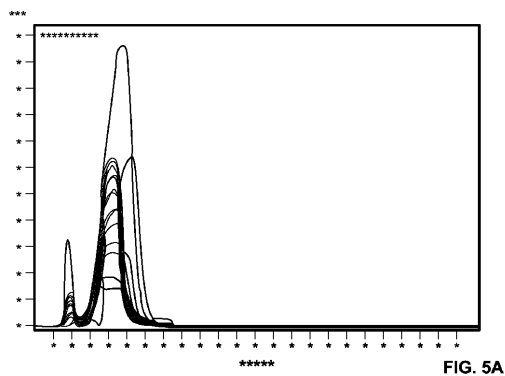


FIG. 5A

【図 5 B】

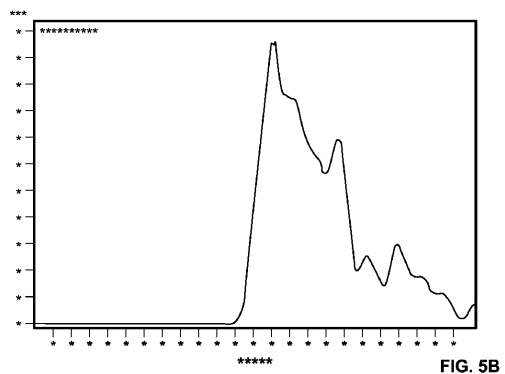


FIG. 5B

【図 5 C】

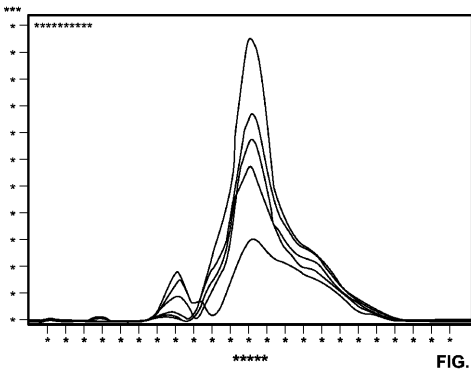


FIG. 5C

【図 6 A】

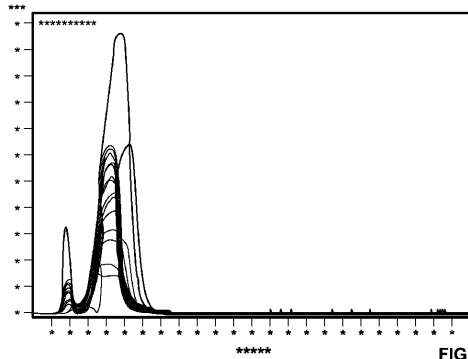


FIG. 6A

【図 5 D】

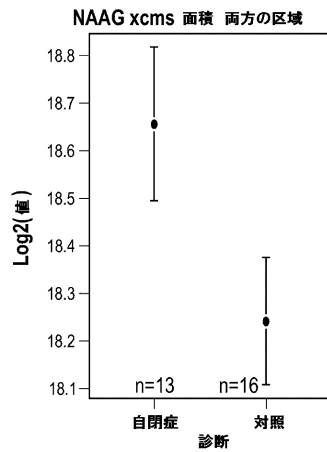


FIG. 5D

【図 6 B】

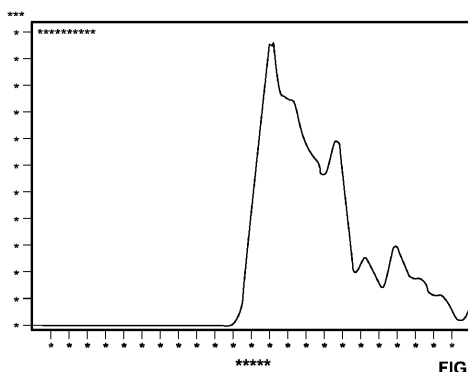


FIG. 6B

【図 6 C】

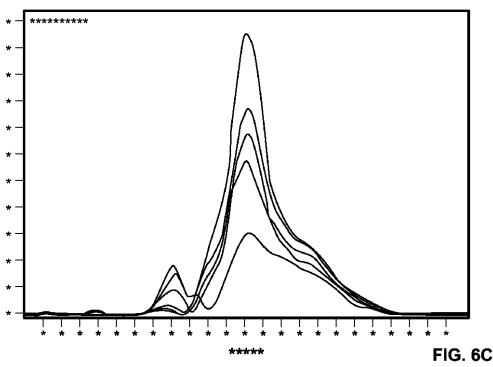


FIG. 6C

【図 7 A】

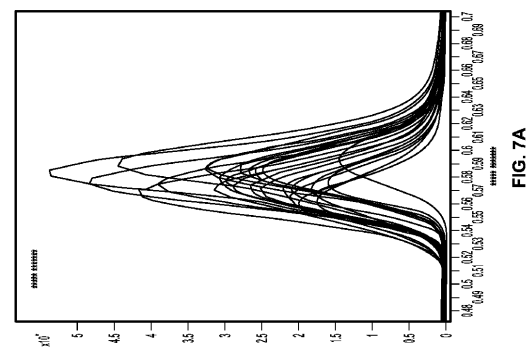


FIG. 7A

【図 6 D】

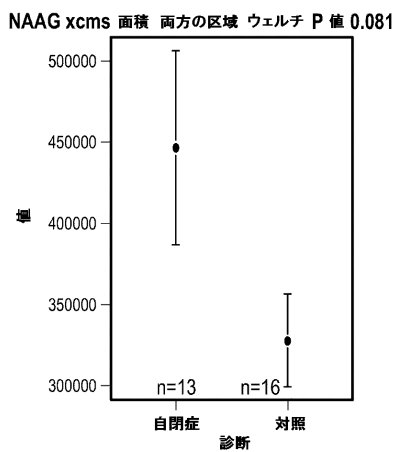


FIG. 6D

【図 7 B】

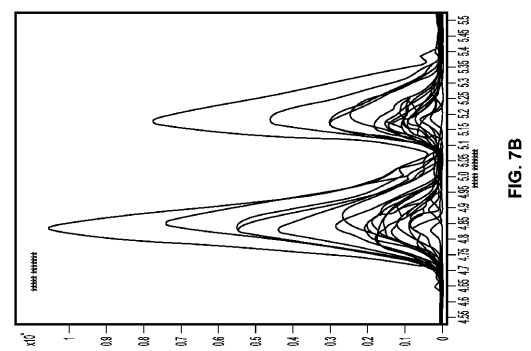


FIG. 7B

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 30/88 E

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 セザー, ガブリエラ ゲブリン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53563, ミドルトン, ラムジー ロード 6924

(72)発明者 スミス, アラン エム.

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53715, マディソン, エリン ストリート 1146

審査官 藤田 都志行

(56)参考文献 特表2009-533056 (JP, A)

国際公開第2009/012595 (WO, A1)

国際公開第2009/043178 (WO, A1)

特開2000-221191 (JP, A)

S Jill James et al., "Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism", The American Journal of Clinical Nutrition, American Society for Clinical Nutrition, 2004年12月, Vol. 80, No. 6, pp. 1611-1617

東田 陽博ら, 「自閉症分子マーカー探索 ―自閉症の遺伝子・分子生物・実験動物学的研究」, 医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社, 2009年12月 5日, Vol. 231, No. 10, pp. 1072-1078

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 27/62

G 0 1 N 30/72

G 0 1 N 30/88

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

CiNii