

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500956

研究課題名(和文) 母体のn-3系脂肪酸摂取の多寡が子どもの脳血液関門の脂肪酸輸送に与える影響

研究課題名(英文) Influence of maternal intake of n-3 fatty acid on fatty acid transport of fetal blood brain barrier

研究代表者

徳田 信子(TOKUDA, NOBUKO)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70227578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：母体のn-3系を中心とする脂肪酸の摂取不足が子どもの認知機能の低下や異常行動の誘因となる可能性が栄養学的に示唆されているが、分子機構は解明されていない。申請者らは脂肪酸結合蛋白質FABP3が胎盤に発現し、FABP3欠損マウスでは胎盤の脂肪酸輸送が有意に減少していることや、FABP3欠損マウスに情動行動の異常が見られることを明らかにした。また、FABP5やFABP7が、脳で神経線維周囲の髄鞘を作るオリゴデンドロサイトの分化に重要な役割を担うことを示した。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies suggest that maternal dietary poor intake of n-3 and some fatty acids may trigger certain mental disorders of fetus. However, the molecular basis of their actions is still unknown. Our findings show that fatty acid binding protein 3 (FABP3) controls fatty acid trafficking in mouse placenta and the transport is important for fetal development. FABP3 also regulates cognitive function and anxiety behaviors. In mouse brain, FABP5 and FABP7 are differentially expressed in oligodendrocyte lineage cells and regulate their proliferation and/or differentiation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：脂肪酸 胎盤 血管 血液脳関門 情動行動 脳 神経 オリゴデンドロサイト

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脳の高次機能や神経疾患と栄養摂取との関係が相次いで報告されている。その中でも特に注目されているのが、魚油に含まれるドコサヘキサエン酸(DHA)などのn-3系多価不飽和脂肪酸(n-3系脂肪酸、メチル基から3番目の炭素に2重結合が存在するもの)である。n-3系脂肪酸は出生前後の脳形成期に脳組織に蓄積する。n-3系脂肪酸の摂取不足は認知機能の低下や異常行動などの機能異常となって現れ、統合失調症や注意欠陥・多動性障害(ADHD)などの疾患を引き起こすことが栄養学的に知られている。

血液脳関門(Blood Brain Barrier, BBB)は胎児期・授乳期にかけて発達し、血液脳関門が未発達な子どもの脳は、体外から化学物質などが容易に通過してしまうために疾患に陥りやすいと考えられている。しかし、n-3系脂肪酸摂取が血液脳関門に与える影響およびその通過機構については殆ど解明されていない。

申請者はこれまでに、胎児期から新生児期の脳に高い発現を示す脂肪酸結合蛋白質FABPに着目し、これらの遺伝子欠損マウスが統合失調症や双極性障害などの精神疾患に類似した表現型を示すという知見を得た(Maekawa et al., 2009, 2010)。すなわち、胎生～周生期のBBBやその周囲の環境を形成する細胞の脂肪酸代謝および輸送機構の変化や破たんが、様々な神経精神疾患を引き起こす可能性がある、という着想に至った。

### 2. 研究の目的

各種FABP欠損マウスを用い、母体の脂肪酸摂取が胎児に与える影響をin vivoで明らかにする。また、培養系を用い、胎盤の脂肪酸輸送やBBBに影響を及ぼす因子をin vitroで明らかにする。

### 3. 研究の方法

動物はC57BL/6マウスおよび申請者らが作成したFABP3, 5, 7遺伝子欠損マウスを用いた。E11.5、E15.5およびE18.5の胎盤を取出し、組織及び細胞を解析した。細胞として、これらのマウスから初代培養した細胞を使用するとともに、胎盤trophoblastのcell line (BeWo細胞)や脳の血管内皮細胞のcell lineを用いた。培養系細胞に特定の脂肪酸の添加を行い、その動向についてRIを用いて検出した。細胞についてはRNAiによる各種FABPのknock downも行った。

解析には、RT-PCRと定量PCR、Western blotting、免疫組織学的手法、Flow cytometry、を用いた。FABPの局所的な量を測定するための組織はLaser capture micro dissection (LCM)を用いて採取した。血管抵抗はtrans-epithelial electric resistance (TEER)で計測した。情動行動の解析には定法に従い、オープンフィールドテストや高架式十字迷路テストなどを用いて検出した。結果につい

ては統計学的に処理し有意差を検定した。

なお、本実験は日本学会が設定したガイドラインおよび本学医学部動物実験指針に従って行った。また、本学動物実験委員会の認可と大学内の倫理委員会の承認を受けている。

### 4. 研究成果

まず、マウス胎盤での各種FABPの発現について、免疫組織化学およびPCRを用いて発現を検討した。FABP4, FABP5およびFABP7の発現も見られたが、胎盤固有の細胞であるtrophoblastに特異的な発現が見られたのはFABP3(心臓型FABP)のみであった。そこで、FABP3欠損マウスと野生型マウスについて、胎盤の脂肪酸輸送について比較検討した。FABP3欠損マウスでは、n-3系やn-6系不飽和脂肪酸の輸送が有意に低下している一方、飽和脂肪酸の輸送には影響が見られなかった。また、trophoblastのcell lineでのFABP3の発現をknock downさせたところ、n-3系やn-6系不飽和脂肪酸の取り込みが有意に減少していた。また、FABP3欠損マウスには情動・認知行動調節に異常がみられることが確認できた。これらのことから、胎児期の母体からのFABP3を介した脂肪酸供給の不足が、生後の行動異常を引き起こす可能性が示唆された。

血液脳関門についての解析は、培養細胞を用いて行った。血液脳関門は主に脳の微小血管にある内皮細胞によって構成される。これを通過する分子を選択することにより、中枢神経系の細胞を取り巻く環境を、体の他の部位の環境と分ける働きを持つ。内皮細胞の分子の通過を規定する因子について検討したところ、冷却により血液脳関門が一時的に開くことを確かめるとともに、その際に血液脳関門を構成する主要分子の一つであるclaudin-5が細胞膜から細胞質へ移行することを見出した。血管内皮細胞において脂肪酸に直接関わる因子の移行については現在解明中である。

また、血液脳関門の周囲の環境を形成するオリゴデンドロサイトの分化を検討した。オリゴデンドロサイトはグリア細胞の一つで、神経軸索を包むミエリン(髄鞘)を形成することにより、神経伝導効率を高める。オリゴデンドロサイトの異常は、精神疾患の病態に深く関与していると考えられている。申請者らは、脂肪酸結合蛋白質FABP5とFABP7が、オリゴデンドロサイトの分化過程で、時間的多様性をもって発現し、その分裂・成熟過程に深く関与することを示した。胎児期の脂肪酸摂取不足により、オリゴデンドロサイトの分化異常が起こり、成熟後の精神疾患の誘因となる可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Suzuki, J., Owada, Y. ( 8 名、7 番目 ) (2014): Preservation of cochlear function in Fabp3 (H-Fabp) knockout mice. *Neurosci Res*, in press ( 査読有 )

2. Ishikawa, J., Owada, Y. ( 4 名、3 番目 ) (2014): Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. *Behavior Brain Res.* 264,197-206. ( 査読有 )  
doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.007.

3. Kizuka-Shibuya, F., Tokuda, N., Owada, Y. ( 11 名、2 番目と 10 番目 ) (2014): Involvement of bone marrow-derived vascular progenitor cells in neovascularization during follicular development in mice. *J Ovarian Res.* 7, 10. ( 査読有 ) doi: 10.1186/1757-2215-7-10.

4. Morihiro, Y., Tokuda, N., Owada, Y.\*. ( 15 名、10 番目と 14 番目 ) (2013): Fatty acid binding protein 7 as a marker for glioma stem cells. *Pathol Int.* 63,546-553. (\* corresp. author) ( 査読有 )  
doi: 10.1111/pin.12109.

5. Sharifi, K., Tokuda, N., Owada, Y. ( 12 名、10 番目と 12 番目 ) (2013): Differential expression and regulatory roles of FABP5 and FABP7 in oligodendrocyte lineage cells. *Cell Tissue Res.* 354, 683-695. ( 査読有 ) doi: 10.1007/s00441-013-1730-7.

6. Kida, H., Owada, Y. ( 6 名、5 番目 ) (2013): The effect of hypothermia therapy in neonatal mice on the cortical laminar disruption following ischemic injury in neonatal mice. *PLoS One.* 8,e68877. ( 査読有 ) . doi: 10.1371/journal.pone.0068877.

7. Sadahiro, H., Owada, Y. ( 9 名、7 番目 ) (2013): Pathological features of highly invasive glioma stem cells in a mouse xenograft model. *Brain Tumor Pathol.* 31,77-84. ( 査読有 )  
doi: 10.1007/s10014-013-0149-x.

8. Inamura, A., Tokuda, N., Owada, Y.\*. ( 12 名、5 番目と 11 番目 ) (2013): Cooling treatment transiently increases the permeability of brain capillary endothelial cells through translocation of claudin-5. *Neurochem Res.* 38, 1641-1647. (\*corresp. author) ( 査読有 )  
doi: 10.1007/s11064-013-1066-4.

9. He, Y., Owada, Y. ( 14 名、8 番目 ) (2013): Neuroprotective effects of focal brain cooling on photochemically-induced cerebral infarction in rats: analysis from a neurophysiological perspective. *Brain Res.* 1497, 53-60. ( 査読有 )  
doi: 10.1016/j.brainres.2012.11.041.

10. Miyake, T., Owada, Y. ( 10 名、9 番目 ) (2012): Epidermal-type FABP is a predictive marker of clinical response to systemic treatment and ultraviolet therapy in psoriatic skin lesions. *J Dermatol Sci.* 68, 199-202. ( 査読有 )  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.09.002.

11. Sugawara, T\*., Nemoto, K\*., Tokuda, N., Owada, Y. ( 10 名、3 番目と 10 番目 ) (2012): Reduced size of sebaceous gland and altered sebum lipid composition in mice deficient in the fatty acid-binding protein 5 gene. *Exp Dermatol.* 21,543-6. (\* equally contributed) ( 査読有 )  
doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01514.x.

12. Kizuka, F., Tokuda, N., Owada, Y. ( 12 名、2 番目と 11 番目 ) (2012): Involvement of bone marrow-derived vascular progenitor cells in neovascularization during the corpus luteum formation in mice. *Biol Reprod.* 87:55,1-7. ( 査読有 )  
doi: 10.1095/biolreprod.112.099960.

13. Adachi, Y\*., Hiramatsu, S\*., Tokuda, N., Owada, Y. ( 11 名、3 番目と 11 番目 ) (2012): Fatty acid-binding protein 4 (FABP4) and FABP5 modulate cytokine production in the mouse thymic epithelial cells. *Histochem Cell Biol.* 138, 397-406. (\*equally contributed) ( 査読有 )  
doi: 10.1007/s00418-012-0963-y.

14. Matsumata, M., Sakayori, N., Maekawa, M., Owada, Y., Yoshikawa, T. and Osumi, N. ( 6 名、4 番目 ) (2012): The effects of Fabp7 and Fabp5 on postnatal hippocampal neurogenesis in the mouse. *Stem Cells.* 30, 1532-43. ( 査読有 )  
doi: 10.1002/stem.1124.

15. Fujii, M., Owada, Y. ( 14 名、8 番目 ) (2012): Cooling of the epileptic focus suppresses seizures with minimal influence on neurologic functions. *Epilepsia.* 53, 489-493. ( 査読有 )  
doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03388.x.

16. 徳田信子、大和田祐二 (2012). 脂肪酸結合タンパク質 7 型、脳科学辞典、脳科学辞

典編集委員会編 (編集委員長: 田中啓治、御子柴克彦) <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/> (査読有)

17. Sharifi, K., Tokuda, N., Owada, Y. (12名、8番目と12番目) (2011): FABP7 expression in normal and stab injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochem Cell Biol.* 136, 501-13. (査読有)  
doi: 10.1007/s00418-011-0865-4.

[学会発表](計23件)

1. 帯状皮質の脂肪酸結合蛋白質は GABA 作動性ニューロン調節を介して神経可塑性に関与する 山本由似、徳田信子、大和田祐二 (5名、2番目と5番目) 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(下野市、自治医科大学) (2014. 3. 27. - 3. 29.)

2. Fatty acid binding protein 3 (FABP3) regulates cognitive function and anxiety behaviors. Yamamoto, Y., Tokuda, N., Owada, Y. (12名、10番目と12番目) *Neuroscience 2013 (USA, San Diego, San Diego Convention Center)* (2013. 11. 9. - 11. 13.)

3. FABP7-deficiency altered membrane lipid raft formation in astrocytes. Kagawa, Y., Tokuda, N., Owada, Y. (11名、10番目と11番目) *Neuroscience 2013 (USA, San Diego, San Diego Convention Center)* (2013. 11. 9. - 11. 13.)

4. Fatty acid-binding protein 7 (FABP7) regulates lipid raft formation in astrocytes. Kagawa, Y., Tokuda, N., Owada, Y. (14名、10番目と14番目) 第86回日本生化学会大会(横浜市、パシフィコ横浜) (2013. 9. 11. - 9. 13.)

5. Fatty acid-binding protein controls lipid raft formation in astrocytes. Kagawa, Y., Tokuda, N., Owada, Y. (12名、7番目と12番目) 第36回日本神経科学大会(京都市、国立京都国際会館) (2013. 6. 20. - 6. 23.)

6. Neuronal plasticity is regulated by glial fatty acid binding protein (FABP7). Ebrahimi, M., Tokuda, N., Owada, Y. (12名、10番目と12番目) 第36回日本神経科学大会(京都市、国立京都国際会館) (2013. 6. 20. - 6. 23.)

7. 脂肪酸結合蛋白質 FABP3 欠損マウスにおける情動行動とシグナル伝達異常 山本由似、徳田信子、大和田祐二 (5名、2番目と5番目) 第118回日本解剖学会総会(高松市、サンポートホール高松・かがわ国際会

議場) (2013. 3. 28. - 3. 30.)

8. FABP7 regulates LPS-induced TNF-production through lipid raft formation in the astrocytes. Kagawa, Y., Tokuda, N., Owada, Y. (7名、3番目と7番目) 第118回日本解剖学会総会(高松市、サンポートホール高松・かがわ国際会議場) (2013. 3. 28. - 3. 30.)

9. 肝 Kupffer 細胞における脂肪酸結合蛋白質(FABP7)の発現と貪食能への関与 宮崎啓史、徳田信子、大和田祐二 (5名、3番目と5番目) 第118回日本解剖学会総会(高松市、サンポートホール高松・かがわ国際会議場) (2013. 3. 28. - 3. 30.)

10. 神経膠腫幹細胞における FABP7 の発現について 安本有希、徳田信子、大和田祐二 (7名、4番目と7番目) 第118回日本解剖学会総会(高松市、サンポートホール高松・かがわ国際会議場) (2013. 3. 28. - 3. 30.)

11. FABP7 as a regulator of reactive astrocyte proliferation. Hara, T., Tokuda, N., Owada, Y. (10名、9番目と10番目) 第118回日本解剖学会総会(高松市、サンポートホール高松・かがわ国際会議場) (2013. 3. 28. - 3. 30.)

12. FABP5 and FABP7 as novel markers and biological regulators for oligodendrocyte lineage. Sharifi, K., Tokuda, N., Owada, Y. (8名、7番目と8番目) 第35回日本分子生物学会年会(福岡市、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡) (2012. 12. 11. - 12. 14.)

13. Control of neuronal dendritic formation by brain-type fatty acid binding protein (FABP7). Ebrahimi, M., Tokuda, N., Owada, Y. (11名、10番目と11番目) *Neuroscience 2012 (USA, New Orleans, Convention Center)* (2012. 10. 13. - 10. 17.)

14. Fatty acid-binding protein 7(FABP7) regulates LPS-induced TNF- production in astrocytes. Kagawa, Y., Tokuda, N., Owada, Y. (10名、9番目と10番目) *Neuroscience 2012 (USA, New Orleans, Convention Center)* (2012. 10. 13. - 10. 17.)

15. Fatty acid binding protein3 (FABP3) as a cellular regulator of fatty acid transport from mother to fetus in rodent placenta. Islam, A., Tokuda, N., Owada, Y. (8名、2番目と8番目) *International Federation of Placenta Association (IFPA) 2012 congress (広島市、広島国際会議場)* (2012. 9. 18- 9. 21.)

16. FABP5 and FABP7; novel markers in oligodendrocyte lineage. Sharifi, K., Tokuda, N., Owada, Y. (8名、7番目と8番目) 第35回日本神経科学大会(名古屋市、名古屋国際会議場)(2012.9.18. - 9.21.)

17. アストロサイトで Fatty acid-binding protein 7 は LPS 刺激による TNF- $\alpha$  の産生を制御する 香川慶輝, 徳田信子, 大和田祐二(7名、6番目と7番目) 第35回日本神経科学大会(名古屋市、名古屋国際会議場)(2012.9.18. - 9.21.)

18. FABP7 is involved in the control of neuronal dendritic formation. Ebrahimi, M., Tokuda, N., Owada, Y. (9名、8番目と9番目) 第35回日本神経科学大会(名古屋市、名古屋国際会議場)(2012.9.18. - 9.21.)

19. Fatty acid binding protein 7 regulates the functions of murine macrophages. Miyazaki, H., Tokuda, N., Owada, Y. (7名、5番目と7番目) 12th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology (福岡市、ヒルトン福岡シーホーク)(2012.7.9. - 7.13.)

20. Differential expression of FABP7 and FABP5 in mouse oligodendrocyte lineage cells. Sharifi, K., Tokuda, N., Owada, Y. (10名、9番目と10番目) 第10回国際幹細胞学会 (ISSCR) 年次総会(横浜市、パシフィコ横浜)(2012.6.13.-6.16.)

21. 肝クッパー細胞における脂肪酸結合蛋白質(FABP7)の発現とサイトカイン産生への関与 宮崎啓史, 徳田信子, 大和田祐二(7名、5番目と7番目) 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(甲府市、山梨大学)(2012.3.26.-3.28.)

22. FABP7 in astrocytes is involved in control of neuronal dendritic formation. Ebrahimi, M., Tokuda, N., Owada, Y. (7名、6番目と7番目) 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(甲府市、山梨大学)(2012.3.26.-3.28.)

23. Localization of fatty acid binding protein in mouse placenta and its possible role of fatty acid transport through trophoblasts. Islam, A., Tokuda, N., Owada, Y. (5名、3番目と5番目) 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(甲府市、山梨大学)(2012.3.26.-3.28.)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 難聴が生じにくいモデル動物  
発明者: 大隅典子、高田雄介、鈴木淳、大和田祐二

権利者: 国立大学法人東北大学、国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/074940

出願年月日: 2012年9月13日

国内外の別: 国外

名称: 脳疾患の診断及び予後予測方法並びにそれらに使用するキット

発明者: 大和田祐二、鈴木倫保、柏原昌次  
権利者: 国立大学法人山口大学、DSファーマバイオメディカル株式会社

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/083381

出願年月日: 2012年12月25日

国内外の別: 国外

名称: 乾癬治療効果の経過観察及び早期の予測方法並びにそれらに使用するキット

発明者: 大和田祐二、奥山隆平、細江宏彰  
権利者: 国立大学法人東北大学、国立大学法人山口大学、DSファーマバイオメディカル株式会社

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/063521

出願年月日: 平成23年6月13日

国内外の別: 国外

取得状況

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~org-anat/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 信子 (TOKUDA NOBUKO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70227578

(2) 研究分担者

大和田 祐二 (OWADA YUJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20292211

(3) 連携研究者

なし