

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19502

研究課題名（和文）脂肪組織由来生理活性物質による自閉症病態形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Adipocyte Insights into the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder

研究代表者

前川 素子（Maekawa, Motoko）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50435731

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は過去に、脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質Fatty acid binding protein 4 (FABP4)の機能低下が自閉症病態形成に関与する可能性を報告した。しかし、以前の研究ではFABP4機能低下が神経系に影響を与える時期が特定できなかった。本研究では、特に脳発達期に局限してFABP4機能低下の影響を調べた。その結果、FABP4機能低下群では、自閉症様の行動表現型、錐体細胞樹状突起スパイン密度の上昇を認めた。さらに、母体の血漿を用いた脂肪酸解析の結果、複数の脂肪酸組成の変化が見られた。これらの脂肪酸組成の変化が、自閉症のリスク形成につながる可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのFABP4研究は成人におけるメタボリックシンドロームや慢性炎症中心の研究であった。本研究により、脳発達期においてFABP4を阻害することが自閉症のリスク形成につながるが見出された。今後、それぞれの分野で培われてきた成果を「融合」させることで、将来的にブレークスルーや新たな研究領域の創出につながることを期待できる。本研究では、自閉症リスクとの関連が疑われる脂肪酸を同定した。今後これらの物質が神経発達に与える影響を調べることで、自閉症表現型を改善する物質であることがわかれば、将来的に自閉症の予防法や治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported that the loss of function of the adipocyte-type fatty acid binding protein, Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4), may be involved in the pathophysiology of autism spectrum disorder (ASD). However, previous studies have not identified the specific timing at which FABP4 dysfunction affects the nervous system. In the present study, we examined the effects of FABP4 hypofunction with a focus on the period of brain development. Our results showed that mice with reduced FABP4 function exhibited ASD-like behavioral phenotypes and increased spine density in the prefrontal cortex. Furthermore, maternal plasma fatty acid analysis revealed multiple changes in fatty acid composition. We speculate that these changes in fatty acid composition may contribute to the risk of autism.

研究分野：分子精神医学

キーワード：自閉症 FABP4 脂肪酸 超音波発声 樹状突起スパイン シナプス サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症(以下、自閉症と略す)は、社会性障害、コミュニケーション障害、こだわり行動、などを特徴とする脳機能障害による小児の発達障害である。自閉症の病因については、ゲノムの解析や死後脳の研究から、スパインやシナプスの異常が関連している可能性が指摘されている。またそれ以外にも、臨床的な知見から、脂質代謝異常が自閉症の病態生理に關与する可能性が示唆されている。しかし、詳しい分子メカニズムについては不明な点が多い。

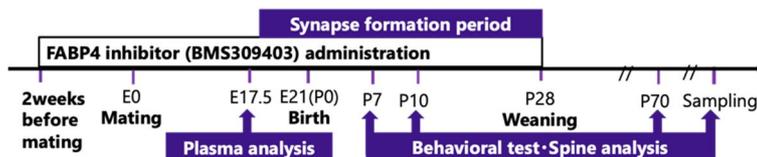
申請者はこれまでに、脂肪組織から分泌されるアディポカイン(脂肪組織から分泌される生理活性物質の総称)に注目して自閉症病態形成メカニズムの研究を行ってきた。具体的には、アディポカインの一つである「脂肪酸結合タンパク質 Fatty acid binding protein 4: FABP4」の血中の濃度が、低年齢の自閉症児で健常対照児と比較して低いこと、*FABP4* のナンセンス変異を持つ自閉症家系で変異と精神疾患が共分離すること、*Fabp4* ノックアウトマウスが自閉症様行動表現型や脳のシナプス形成異常を示すことを見出した。これらの結果は、FABP4 の機能不全が自閉症リスク形成に關わる可能性を示している(Maekawa et al., 2020)。一方で、ヒトおよびマウスの発達期の脳には *FABP4/Fabp4* の mRNA は極めてわずかしか認められないことから、なぜ FABP4 の機能低下が自閉症病態形成に關わるのか詳しいメカニズムが不明であった。そこで申請者は、「発達期の脳では脂肪組織由来の FABP4 及びそのリガンドが血流を介して神経系の発達に影響する」という仮説(「脂肪組織-脳軸」仮説)をたてた。

2. 研究の目的

本研究では、どの時期の FABP4 機能低下が自閉症病態形成に影響を与えているかを調べるために、マウス母獣に FABP4 阻害剤を投与し、仔の自閉症病態形成への影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) FABP4 阻害剤投与と動物の作製: FABP4 機能低下の影響を調べるため、FABP4 阻害剤として知られる BMS309403 (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ) を用いた。BMS309403 は、まず 50mg/ml の濃度で DMSO に溶解してストック溶液として調製した。このストック溶液を、5 µg/µl の濃度になるようにコーン油 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で希釈した。等量の DMSO をコーン油に溶解して対照溶液を調製した。これらの溶液を用いて、妊娠の少なくとも 2 週間前から雌マウス (C57BL/6J) に BMS309403 を 15mg/kg の用量で経口投与した。その後、雌マウスを雄マウスと交配させた。母マウスには出生後 28 日目まで溶液を経口投与した。同様の手順で同量の対照溶液を投与する群も作製した。生後 28 日目で離乳し、その後は通常の飼育環境で仔を飼育した。BMS309403 投与による神経系への影響を評価する実験には、BMS309403 投与マウス(母獣)あるいは対照マウス(母獣)から生まれた仔マウスを用いた。



(2) シナプス形態解析: 生後 14 週齢の BMS309403 投与マウス(仔)あるいは対照マウス(仔)をイソフルランで麻酔し、キットに付属するアルデヒド固定液で灌流固定した。脳を摘出し、ビプラトーム VT1200S (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 100µm の切片を作製した。切片は 0.1 M PBS に回収した。sliceGolgi Kit (Bioenno Tech LLC) を用いて Golgi 染色を行った。組織切片は BX61 顕微鏡 (Evident Corporation, Tokyo, Japan) を用いて観察および撮影した。錐体細胞樹状突起スパインの定量には、6 匹のマウスから合計 36 切片を用いた。錐体細胞は形態によって識別し、内側前頭前皮質の第 V 層から無作為に選択した。画像は cellSens Standard software (Evident Corporation) を用いて撮影した。錐体細胞樹状突起の第 2 分岐 50-100µm の範囲で画像を取得し、長さあたりのスパイン密度を求めた。解析はブラインドで行った。

(3) 行動解析

超音波発声 (Ultrasonic vocalization: USV) 試験: BMS309403 投与マウス(仔) 対照マウス(仔)について、生後 7 日目 (Postnatal day 7: P7)、10 日目 (P10) の時点で母子分離時の超音波発声を録音した。超音波発声は、Avisoft Bioacoustics CM16/CMPA (Avisoft Bioacoustics, Germany) で録音した。録音した音声は、Avisoft SASLab Pro (Avisoft Bioacoustics) で解析した。母獣とその仔を入れたホームケージは、少なくとも 1 時間前に実験室に移した。試験の際には、防音ボックスの中に設置されたプラスチック製容器に仔を入れた。超音波は 3 分間録音した。

マーブル埋め試験: 透明なプラスチック製のケージに、白い紙製の床敷 (Paperclean, Japan SLC) を深さ 4 cm まで入れた。Habituation trial として、生後 10-14 週齢の BMS309403 投与マウス

ウス（仔）あるいは対照マウス（仔）をテストケージに 30 分間入れた。その後ホームケージに戻した。次に、15 個のガラス製のマープルをテストケージの床敷上に均等に配置した。Test trial として、マウスをテストケージに 30 分間入れた。表面積の 3 分の 2 以上が埋もれたマープルの数をカウントした。

強制水泳試験:水深 10cm まで水を満たした透明なアクリル製シリンダーの中で、生後 10-14 週齢の BMS309403 投与マウス（仔）あるいは対照マウス（仔）を 6 分間泳がせた。最初の 1 分間のデータは除外し、残りの 5 分間を測定に用いた。マウスが動かなかった時間を ANY-maze video tracking software (Stoelting Co., IL, USA) で測定した。

その他: 生後 10-14 週齢の BMS309403 投与マウス（仔）対照マウス（仔）について、精神疾患関連行動試験（オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、Y 字迷路試験、高架式十字迷路試験、プレパルス抑制試験、チューブテスト）を行なった。全ての行動試験は 10:00-18:00 の間に行った。

(4) マウス血漿の解析

採血: BMS309403 投与マウス（母獣、仔）あるいは対照マウス（母獣、仔）を、イソフルランで麻酔した。妊娠 17.5 日目で、母体の心臓の左心室から血液を直接採取した。胎児血液サンプルは体幹から採取し、同じ母獣からの全ての仔の血液をプールして 1 つの検体とした。母体血、胎児血、いずれについても、EDTA を含む血液サンプルを 1800rpm で 10 分間遠心分離した。得られた血漿サンプルは、解析するまで -80 °C で保存した。血液は、約 4 時間の絶食の後、採取した。

脂肪酸組成分析: 妊娠 17.5 日目の母獣およびその胎児から採取した血漿サンプル 20 μ l を使用した。ナカライテスク社製脂肪酸メチル化キットにてメチル誘導化し、サンプル溶液とした。GC/MS 装置を用いて、血漿中の脂肪酸組成を調べた。分析には、GC8890/MSD5977B (アジレントテクノロジー社製) を用いた。カラムは VF-WAXms の 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m (アジレントテクノロジー社製) を用いた。

マルチプレックスサスペンションアレイ解析: 妊娠 17.5 日目の母体および胎児から採血した血漿サンプルを用いて、Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay (Bio-Rad, Melbourne, Victoria, Australia) で以下のサイトカインおよびケモカインの測定を行った。IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RNATES, and TNF- α を測定した。

4 . 研究成果

(1)

脳発達期における FABP4 機能低下による影響を明らかにするため、Fabp4 阻害剤として知られる BMS309403 を母獣に投与し、その仔の脳発達への影響を調べた。BMS309403 または対照溶液を雌マウスに 1 日 1 回、交配前の 2 週間経口投与した。その後、雄マウスと交配させ、仔が生後 28 日目になるまで薬物投与を行った。BMS309403 投与した母獣から生まれた仔を実験に利用した。出生した仔は健康で、体全体や脳の形態に目に見える異常は認められなかった。

(2)

脳発達期における Fabp4 機能の低下が、仔の脳の微細構造に及ぼす影響を調べるため、14 週齢の BMS309403 投与マウス（仔）と対照マウス（仔）の大脳皮質を用いて、錐体細胞樹状突起スパイン密度を評価した。BMS309403 投与マウス（仔）では、対照マウス（仔）に比べて、内側前頭前第 V 層内の錐体ニューロンの樹状突起において、スパイン密度の有意な増加が観察された。これらの結果は、自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorder: ASD) の死後脳で報告されている表現型と類似していた。

(3)

妊娠中および生後早期の Fabp4 機能障害が仔の行動に及ぼす影響を調べるため、我々は BMS309403 投与マウス（仔）の行動を評価した。まず、BMS309403 投与マウス（仔）あるいは対照マウス（仔）について、P7 および P10 における音声コミュニケーション能力を評価した。BMS309403 投与マウス（仔）の雄は、P10 において対照マウス（仔）と比較して鳴き声の数が減少傾向を示した。BMS309403 投与マウス（仔）の雄は、P7 において対照マウス（仔）と比較して鳴き声の持続時間が有意に増加した。この結果は、BMS309403 投与マウス（仔）における言語的コミュニケーション能力の変化を示している。一方、雌の BMS309403 投与マウス（仔）では、鳴き声の数、持続時間ともに変化は見られなかった。この結果は、BMS309403 の影響は雄に特有のものであることを示唆している。

BMS309403 投与マウス（仔）の雄については、さらに成体期でも行動解析を行った。ビー玉埋め試験において、BMS309403 投与マウス（仔）は埋められたビー玉の数が有意に増加した。この結果は、反復行動の亢進を示している。強制水泳試験において、BMS309403 投与マウス（仔）では、無動時間が有意に増加した。この結果は、うつ様行動の亢進を示している。オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、高架式十字迷路試験、Y 迷路試験、プレパルス抑制試験、チュ

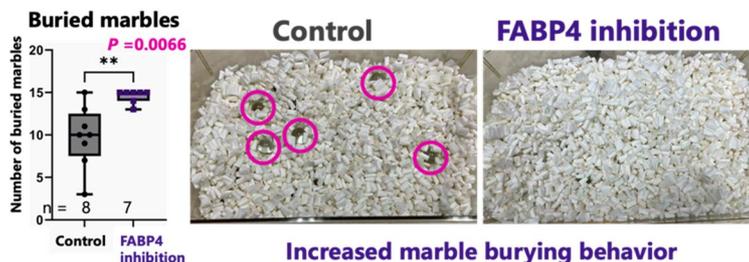
ープ試験では、BMS309403 投与マウス（仔）と対照マウス（仔）の間に有意な変化は認められなかった。以上、BMS309403 投与マウス（仔）の雄は、言葉のコミュニケーションの変化、反復行動の増加、抑うつ症状の増加など、自閉症様の行動変化を示した。

(4)

FABP4の機能障害が妊娠中の母獣および胎児の血中の脂肪酸組成に及ぼす影響を調べるため、BMS309403 投与マウス（母獣、仔）と対照マウス

（母獣、仔）から血液を採取した。血漿中の脂肪酸組成（38種類の脂肪酸）を調べた結果、母獣の血中では13の脂肪酸を検出した。BMS309403 投与マウス（母獣）では、対照マウス（母獣）と比較して、アラキドン酸が有意に上昇し、リノール酸は有意な減少を示した。ミリスチン酸とステアリン酸は増加傾向を示したが、オレイン酸は減少傾向を示した。他の脂肪酸については、両群間で有意差は認められなかった。BMS309403 投与マウス（仔）および対照マウス（仔）の血液では12種類の脂肪酸を検出したが、両群間で有意差を示すものはなかった。

FABP4 機能障害が血漿中のサイトカインあるいはケモカインの値に及ぼす影響を評価するため、BMS309403 投与マウス（母獣、仔）と対照マウス（母獣、仔）から採血を行った。これらの血漿を用いて、23種類のサイトカインあるいはケモカインの測定を行った。母獣の血中では、21のサイトカインを検出した。BMS309403 投与マウス（母獣）では、対照マウス（母獣）と比較して、IL-10とIL-12(p40)は減少傾向を示したが、他の物質は両群間で有意差は認められなかった。胎児血中では、23サイトカインのうち22サイトカインを検出した。BMS309403 投与マウス(仔)では、対照マウス(仔)と比較して、TNF α が有意に低く、KCが減少傾向を示した。その他のサイトカインについては、両群間で有意差は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maekawa Motoko	4. 巻 -
2. 論文標題 統合失調症の新規治療標的分子としての核内受容体PPAR	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.22142	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umaru Banlanjo Abdulaziz, Kagawa Yoshiteru, Ohsaki Yuki, Pan Yijun, Chen Chuck T., Chen Daniel K., Abe Toshiaki, Shil Subrata Kumar, Miyazaki Hirofumi, Kobayashi Shuhei, Maekawa Motoko, Yamamoto Yui, Wannakul Tunyanat, Yang Shuhan, Bazinet Richard P., Owada Yuji	4. 巻 290
2. 論文標題 Oleic acid bound FABP7 drives glioma cell proliferation through regulation of nuclear lipid droplet formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1798 ~ 1821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 前川素子	4. 巻 282
2. 論文標題 多価不飽和脂肪酸に着目した統合失調症病態メカニズムの理解と創薬の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 736-739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前川 素子、大和田 祐二
2. 発表標題 統合失調症の治療標的としての核内受容体PPAR の可能性
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 切替 日奈子、Florian Pans Francois Marie Corneille、前川 素子、大和田 祐二
2. 発表標題 母体免疫活性化に着目した自閉症モデルマウスの作製
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉町 文子、生田 美徳、大西 哲生、吉川 武男、前川 素子、大和田 祐二
2. 発表標題 薬理学的統合失調症モデル動物を用いた統合失調症の新規治療薬の開発
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 孫 正康、大西 哲生、吉川 武男、前川 素子、大和田 祐二
2. 発表標題 脳発達期のFABP4機能低下による自閉症病態形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motoko Maekawa, Sun Zhengkang, Tetsuo Ohnishi, Takeo Yoshikawa, Yuji Owada
2. 発表標題 Hypofunction of FABP4 in mothers and children in the pathophysiology of autism spectrum disorder
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumiko Yoshimachi, Motoko Maekawa, Tetsuo Ohnishi, Takeo Yoshikawa, Yuji Owada
2. 発表標題 Development of therapeutic drugs for schizophrenia targeting PPAR alpha
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川素子
2. 発表標題 動物モデル研究 最前線
3. 学会等名 第17回日本統合失調症学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前川 素子, 生田 美徳, 吉町 文子, 大和田 祐二
2. 発表標題 PPAR alphaがシナプス形成に与える影響の解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮崎啓史, Yang Shuhan, Yang Dandan, 前川素子, 大和田 祐二
2. 発表標題 脂肪酸結合蛋白質FABP7は肝マクロファージの抗炎症性機能を制御し, 線維芽細胞の活性化とCD4陽性T細胞浸潤に關与する
3. 学会等名 第129回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Dandan Yang, Hirofumi Miyazaki, Motoko Maekawa, Yuji Owada
2. 発表標題 Colorectal cancer inhibits the expression of FABP5 in tumor associated macrophage through NOTCH signaling pathway
3. 学会等名 第129回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hongbo Wang, Motoko Maekawa, Mai Sakai, Zhiqian Yu, Hiroaki Tomita, and Yuji Owada
2. 発表標題 Altered dendritic spine morphology and schizophrenia-related behaviors in the offspring of fasted mice during pregnancy
3. 学会等名 第129回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hinako Kirikae, Florian Pans, Mai Sakai, Zhiqian Yu, Noriko Osumi, Hiroaki Tomita, Motoko Maekawa, Yuji Owada
2. 発表標題 Investigating the effects of maternal immune activation on behavioral and histological phenotypes in mouse offspring
3. 学会等名 FENS-Hertie Winter School 2023 "Neuroscience of Mental Health"
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前川 素子
2. 発表標題 DOHaD仮説に基づいた統合失調症の分子基盤の理解と治療法の開発
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hinako Kirikae, Florian Pans, Mai Sakai, Zhiqian Yu, Noriko Osumi, Hiroaki Tomita, Motoko Maekawa, Yuji Owada
2. 発表標題 Investigating the effects of maternal immune activation on behavioral and histological phenotypes in mouse offspring
3. 学会等名 11th IBRO World Congress of Neuroscience
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 孫 正康, 前川 素子, 坂井 舞, 兪 志前, 大隅 典子, 富田 博秋, 大和田 祐二
2. 発表標題 脳発達期のFABP4 機能低下が自閉症様表現型に与える影響の解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第69回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 切替日奈子, Florian Pans, 生田美徳, 内堀永梨果, 坂井舞, 兪志前, 大隅典子, 富田博秋, 前川素子, 大和田 祐二
2. 発表標題 妊娠中期の母体免疫活性化が仔の自閉症様表現型に与える影響の解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第69回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生田美徳, 吉町文子, 島田莉名, 黒崎円花, 坂井舞, 兪志前, 富田博秋, 前川素子, 大和田 祐二
2. 発表標題 核内受容体PPARαに着目した統合失調症新規治療薬の開発
3. 学会等名 日本解剖学会 第69回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 孫 正康, 前川 素子, 坂井 舞, 兪 志前, 大隅 典子, 富田 博秋, 大和田 祐二
2. 発表標題 脳発達期のFABP4機能低下による自閉症病態形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 切替 日奈子, Florian Pans, 坂井 舞, 兪 志前, 大隅 典子, 富田 博秋, 前川 素子, 大和田 祐二
2. 発表標題 母体免疫活性化が仔マウスの組織学的、行動学的表現型に与える影響の検討
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 「認知機能改善剤、及び認知機能障害を治療又は予防するための医薬組成物」	発明者 前川素子, 大和田祐二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/023819	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------