

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15436

研究課題名(和文) 自閉症における胎盤・胎児脳脂肪酸トランスポーター「ダブルヒット」仮説の可能性追究

研究課題名(英文) Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes SLC27A3 and SLC27A4 in autism

研究代表者

吉川 武男 (YOSHIKAWA, TAKEO)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：30249958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸輸送における母体血から胎児の脳までの血液関門には、FATP3、4が重要と考えられている。両遺伝子ともヒトiPS細胞から分化させた神経幹細胞塊およびさらに分化させた神経細胞で発現していた。また両遺伝子とも、胎児脳における毛細血管内皮のモデルにおいて発現していた。FATP3遺伝子のリシークエンス解析では47個の変異、FATP4遺伝子においては30個の変異を検出した。これらの変異のうち、p.Gly209Serは遺伝解析においても自閉症と関連が見られた。機能解析では、FATP4のp.Gly209Ser多型は脂肪酸の取り込み能に影響を与えていた。

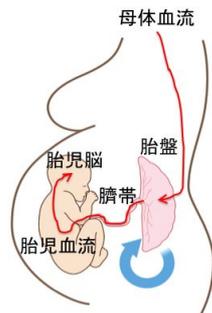
研究成果の概要(英文)：The FATP gene family encodes fatty acid transport proteins. We investigated functional abnormalities of FATP genes in terms of the pathogenesis of autism spectrum disorders (ASD). We confirmed the expression of FATP3 and FATP4 in human neural stem cells derived from iPS cells, which suggested their involvement in the developmental stage of the central nervous system. Additionally, we resequenced the FATP3 and FATP4 genes using 267 ASD patient and 1140 control samples and detected 47 and 30 variants for the FATP3 and FATP4, respectively, revealing that they are highly polymorphic with multiple rare variants. The FATP4 Ser209 allele was more frequently represented in ASD samples. We showed that a FATP4 Ser209 mutant resulted in significantly higher fluorescently-labeled fatty acid uptake into bEnd3 cells, a mouse brain capillary-derived endothelial cell line, compared with FATP4 Gly209, suggesting that the functional change may contribute to ASD pathophysiology.

研究分野：精神医学、精神科遺伝学、分子生物学

キーワード：自閉症 脂肪酸 脂肪酸トランスポーター FATP3 FATP4 iPS

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害は、脳の発達障害が関係する疾患と考えられており、遺伝的要因が発症リスクに大きく影響することが示されている。ただ通常の遺伝解析は、case と control 間でゲノム多型頻度を比較することが多く、親の性別とカップルさせた解析は少ない。また、脳の発達障害の具体的なメカニズムについては、我々の取り組み (Shimamoto *et al.*, *Hum Mol Genet* 2014) も含めて脂肪酸/脂質代謝との関連が想定されているが、詳細は不明である。胎児の脳発達には脂肪酸の供給が必要であると考えられているが、胎児期の脳への脂肪酸輸送には、



臍帯血管内皮細胞、脳血管内皮細胞がバリアになる(図1)ため、これらの場所に発現して脂肪酸を能動輸送している FATP (Fatty Acid Transporter) と呼ばれる脂肪酸トランスポーターが、自閉症の病態に関与している可能性を考えた。

図1: 2つの関門

### 2. 研究の目的

FATP には6つのファミリーメンバーが存在するが、それらの中で、胎盤-臍帯血液関門、脳血液関門に発現している FATP 分子を同定し、それら遺伝子について、母-子間の対立遺伝子伝達を中心に解析を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) FATP ファミリー遺伝子のうち、臍帯血管内皮細胞および脳の血管内皮細胞の2つの組織由来の細胞で発現しているものを *in vivo*, *in vitro* 実験で確かめる: *In vivo*: FATP ファミリー遺伝子には1から6までの6種類あるが、それらのタンパク産物の発現と局在(血管内皮細胞に発現しているかどうか)を野生型マウスの組織(脳および胎盤)を用いて免疫染色で確かめる。抗体は、Abcam, R&D Systems, Atlas antibodies, Santa Cruz Biotechnology, ATLAS Antibodies などから入手する。 *In vitro*: 臍帯血管内皮細胞としては、HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) を用いる。脳の血管内皮細胞検体としては、脳微小血管内皮細胞 (bEnd3 cell) を用いる。これらの細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR (TaqMan 法) により FATP/Fatp ファミリー遺伝子の発現解析を行う。

(2) 発現が確かめられた遺伝子につき、リシークエンス解析をして変異を探索する: タンパクの読み枠を含むエクソンおよび近傍のイントロン部分をサンガー法でシークエンス解析をする。

(3) 検出された変異については、日本人自閉症約300家系を用いて伝達の偏りを調べる: 検出された変異の機能予測を、PANTHER (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoringForm.jsp>), Pmut (<http://mutpred.mutdb.org/>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutPred (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/PMut.jsp>) 等のアルゴリズムを用いて評価する。Damaging な変異を持つ自閉症者は、その両親をジェノタイプする。それらの結果を元に、伝達の偏りを two degree-of-freedom likelihood ratio test (*Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156: 139-144, 2011) を用いて検討する。

(4) 再現性が得られた FATP 遺伝子の変異については、*in vitro* 実験系で脂肪酸の取り込み能、および取り込んだ脂肪酸の細胞内分布の観点から機能評価を行う: 脂肪酸の取り込み能については、培養細胞を用いて基質として BODYPY® 結合脂肪酸(蛍光色素である BODIPY に脂肪酸をつないだもの)を用いて QBT™ 解析を行う(図2)。

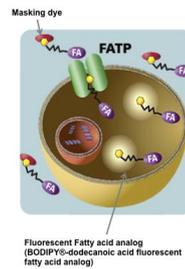


図6: QBT™ 解析の概念図 (Molecular Devices 社 HP より参照)

BODYPY® 結合脂肪酸に masking dye がついた基質を培養液に添加し、それが細胞内に取り込まれると、masking dye がはずれ蛍光を発する。発する蛍光強度

で、細胞内に取り込まれた基質の量を測定出来る。

(5) 取り込まれた脂肪酸の細胞内分布を調べる: 細胞内局在検討の方法としては、変異を導入しかつ V5 タグをつけたコンストラクトを作製、培養細胞にコンストラクトをトランスフェクションし、C1-BODYPY-C12 を取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察すると共に BODYPY-positive area/cell を ImageJ を用いて算出する、等の方法で進める。

### 4. 研究成果

#### (1) FATP3, FATP4 の発現解析

脂肪酸輸送における母体血から胎児の脳までの血液関門は、少なくとも胎盤における微絨毛膜、胎盤における胎児側の毛細血管内皮、胎児脳における毛細血管内皮、胎児脳の神経細胞膜、がある。で発現されている脂肪酸トランスポーター (FATP: Fatty Acid Transport Protein) には、FATP1, 2, 3, 4, 6 があり、では FATP1, 3, 4, 5 があり、では FATP3, 4 があり、では、FATP3, 4 があることを文献調査から確かめた(図3)。

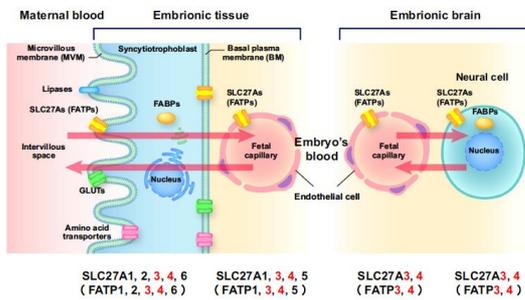


図 3 : 各組織で発現している FATP 分子

①～④で共通する分子は FATP3, 4 であるので、この2つの分子に焦点を当てて研究を進めることにした。胎児の神経細胞を模倣すべく、ヒト iPS 細胞を樹立し、それを分化して神経幹細胞塊 (NS: neurosphere)、神経細胞へと分化したものを用意した。FATP3, 4 の両遺伝子とも NS および分化させた神経細胞で発現していた (図 4)。

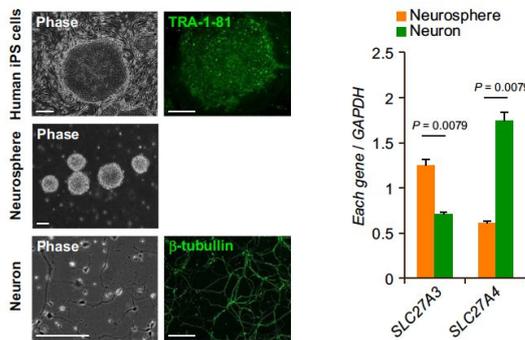


図 4 : iPS 細胞系譜での FATP3 (SLC27A3)、および FATP4 (SLC27A4) の発現

また、胎児脳における毛細血管内皮のモデルとして、マウス胎生期 E18.5 脳を用い血管内皮細胞マーカーとして CD31 を選択した。免疫組織化学的解析により、Fatp3 (図 5), 4 (図 6) とともに CD31 と共同在していた。

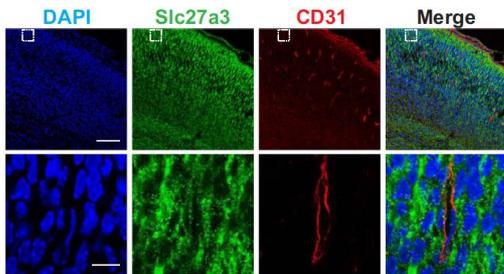


図 5 : 血管内皮細胞における Fatp3 (Slc27a3) の発現

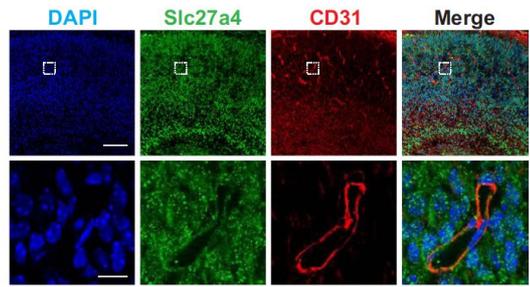


図 6 : 血管内皮細胞における Fatp4 (Slc27a4) の発現

(2) FATP3, FATP4 の遺伝学的解析  
FATP3 遺伝子のリシーケンス解析では、47 個の変異 (これらのうち 44 個が新規でアミノ酸置換を伴うものは 29 個あった) を検出し (図 7)、FATP4 遺伝子においては 30 個の変異 (これらのうち 17 個が新規でアミノ酸置換を伴うものは 14 個あった) を検出した (図 8)。これらの結果は、両遺伝子は稀な変異を多種類持つことを示す。上記の変異のうち、p.Gly209Ser (c.625G>A) は、マイナーアレルの頻度が 21.9% と最も高く、遺伝解析においても自閉症と関連が見られた (男性 :  $p = 0.0054$  ; 女性 :  $p = 0.0030$ ) (表 1)。

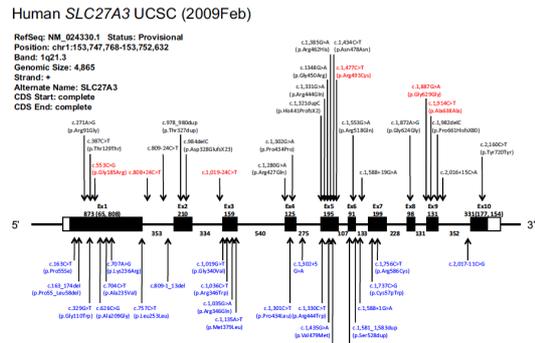


図 7 : FATP3 遺伝子で見つかった変異

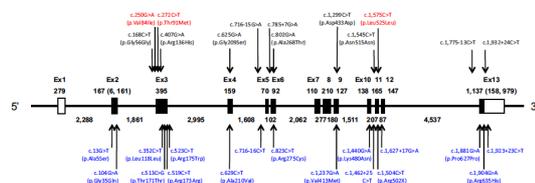


図 8 : FATP4 遺伝子で見つかった変異

Gene	Nucleotide change	Amino acid change	*dbSNP ID	Minor allele homo/hetero/major allele homo	**MAF	***HWE	****De novo
SLC27A4	c.271 A>G	p.Arg91Gly	New (rs13822588)	0/1/261	0.2%	0.98	No
	c.387 C>T	Synonymous	rs36064263	0/2/265	0.4%	0.95	No
	c.553 G>C	p.Gly185Arg	New (rs147251588)	0/1/260	0.2%	0.98	No
	c.808+24 C>T	—	New (rs1399952409)	0/1/265	0.2%	0.98	No
	c.809-24 C>T	—	New (rs1399952410)	0/1/266	0.2%	0.98	No
	c.980_981 dup	p.Thr227dup	New (rs149047357)	0/2/260	0.4%	0.95	No
	c.984 delC	p.Asp328GluX23	New (rs143079887)	0/4/258	0.8%	0.90	No
	c.1.019-24 C>T	—	New (rs1399952411)	0/1/266	0.2%	0.98	No
	c.1.280 G>A	p.Arg427Gln	rs77673307	0/13/249	2.7%	0.05	No
	c.1.302 G>A	Synonymous	New (rs139037399)	0/1/266	0.2%	0.98	No
	c.1.321 dupC	p.His441ProfsX2, p.Lys442Stop	New (rs144727289)	0/1/261	0.2%	0.98	No
	c.1.331 G>A	p.Arg444Gln	New (rs141932545)	0/1/261	0.2%	0.98	No
	c.1.348 G>A	p.Gly450Arg	New (rs146128753)	0/1/251	2.1%	0.73	No
	c.1.385 G>A	p.Arg623His	New (rs143908472)	0/5/257	1.0%	0.88	No
	c.1.434 C>T	Synonymous	New (rs146407808)	0/2/265	0.4%	0.95	No
	c.1.477 C>T	p.Arg493Cys	New (rs140637267)	0/1/261	0.2%	0.98	No
	c.1.553 G>A	p.Arg518Gln	New (rs142414300)	0/3/259	0.6%	0.93	No
	c.1.588+19 G>A	—	New (rs1399952412)	1/0/265	0.4%	0.00	No
	c.1.872 A>G	Synonymous	rs80014940	0/1/264	0.2%	0.98	No
	c.1.887 G>A	Synonymous	New (rs138193292)	0/1/264	0.2%	0.98	No
	c.1.914 C>T	Synonymous	New (rs146109147)	0/1/264	0.2%	0.98	No
	c.1.982 delC	p.Pro661HisX30	New (rs142189417)	0/4/256	0.8%	0.90	No
	c.2.016+15 C>A	—	New (rs1399952413)	0/2/263	0.4%	0.95	No
	c.2.160 C>T	Synonymous	New (rs147511607)	0/4/261	0.8%	0.90	No
c.168 C>T	Synonymous	rs181020996	0/3/264	0.6%	0.93	—	
c.250 G>A	p.Val84Ile	New (rs1399952594)	0/1/266	0.2%	0.98	No	
c.272 C>T	p.Thr91Met	rs138443340	0/1/266	0.2%	0.98	No	
c.407 G>A	p.Arg136His	rs148684713	0/3/264	0.6%	0.93	No	
c.625 G>A	p.Gly209Ser	rs2240953	15/87/165	21.9%	0.43	No	
c.716-15 G>A	—	rs17848327	2368/197	13.5%	0.13	—	
c.785+7 G>A	—	rs17848328	0/13/254	2.4%	0.68	—	
c.802 G>A	p.Ala268Thr	rs17848330	0/2/265	0.4%	0.95	No	
c.1.289 C>T	Synonymous	rs78415617	0/2/265	0.4%	0.95	—	
c.1.545 C>T	Synonymous	rs2240952	0/8/259	1.5%	0.80	—	
c.1.575 C>T	Synonymous	New (rs1399952595)	0/1/266	0.2%	0.98	—	
c.1.775-13 C>T	—	New (rs1399952596)	0/4/263	0.7%	0.90	—	
c.1.932+24 G>A	—	rs138008274	0/2/265	0.4%	0.95	—	

表 1 : 自閉症・対照群における変異の頻度

(3) FATP4 p.Gly209Ser の in vitro 機能解析  
 FATP3, 4 遺伝子のリシークエンス解析により、両遺伝子は稀な変異を多種類持つことが判明したが、自閉症 (ASD) サンプルを用いた遺伝解析から、FATP4 の p.Gly209Ser はマイナーアレル頻度が 21.9%と最も高く、自閉症と関連がみられた (男性 ASD は Gly209 を多く持つ傾向、女性 ASD では Ser209 を有意に多く持っていた)。そこで FATP4 の p.Gly209Ser につき、in vitro 機能解析を行うことにした。

FATP4 c.625G (Gly209), c.625G>A (Ser209), および control 発現ベクターを用意した。それらを bEnd3 細胞にトランスフェクションした。bEnd3 細胞は、マウス脳内毛細血管内皮細胞由来であり、脂肪酸の取り込みに内在性の Fatp4 を使っている。脂肪酸の取り込みは、蛍光長鎖脂肪酸アナログである C1-BODIPY-C12 を用いた。Control ベクターに比較して、FATP4 Gly209 コンストラクトは 15 倍、Ser209 コンストラクトは 20 倍、それぞれ BODIPY の取り込みが増加した (図 9)。このことから、FATP4 の p.Gly209Ser 多型は機能変化を伴うものであることが判明した。

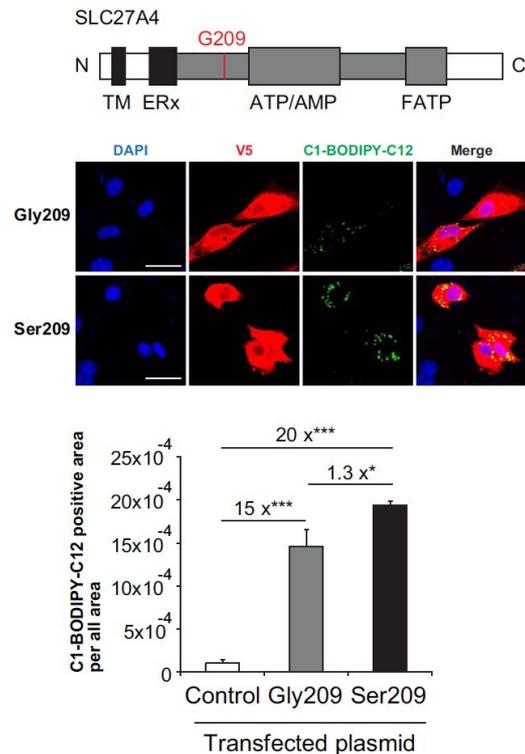


図 9 : FATP4 p.Gly209Ser の脂肪酸取り込みアッセイ

(4) FATP4 p.Gly209Ser の in silico 解析  
 FATP4 の p.Gly209Ser 多型はタンパク表面に位置することが判明し、多型は他のタンパクとの相互作用に影響を与えている可能性が示唆された (図 10)。

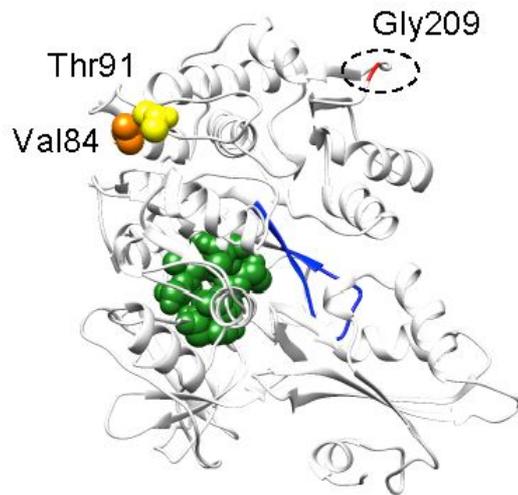


図 10 : FATP4 p.Gly209Ser の立体配座

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Maekawa M, Iwayama Y, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Hisano Y, Toyota T, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Takagai S, Yamada K, Ota M, Fukuchi S, Okada Y, Akamatsu W, Tsujii M, Kojima, Owada Y, Okano H, Mori N, Yoshikawa T: Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes *SLC27A3* and *SLC27A4* in autism. *Scientific Reports* 5:16239, 2015. doi: 10.1038/srep16239. 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉川 武男(YOSHIKAWA,Takeo)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合  
研究センター・チームリーダー  
研究者番号:30249958