

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15425

研究課題名(和文)精子エピジェネティックマークを介した子孫への行動異常の伝承

研究課題名(英文) Transgenerational of behavioral abnormalities associated with DNA methylation signatures in sperm

研究代表者

松崎 秀夫 (MATSUZAKI, Hideo)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号：00334970

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)：本研究では、まず、母体ストレスが仔マウスおよび孫マウスの行動異常を引き起こすことを明らかにした。さらにこれら行動異常に関わる各因子の仔マウスおよび孫マウスの脳内発現を解析し、数種類の因子の発現の変化を認めた。続いて、仔マウスの精子のメチル化解析を行い、これら因子のうち、数種類の遺伝子のメチル化が減少および増加傾向を示すことを明らかにした。これらの事象は、仔の精子のエピジェネティクス変化(エピジェネティックマーク)を介して孫に異常が受け継がれる可能性を示唆している。今後、詳細なメチル化解析および精子メチル化異常と脳内遺伝子変化の関連性を検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we find that maternal stress influences behavior in subsequent generations. In addition, some gene expressions involved in the abnormal behaviors are changed in brains of subsequent generations. We also find that methylation status of these gene in sperm DNA is changed in subsequent generations. From these results, transgenerational of behavioral abnormalities associated with DNA methylation in sperm is suggested. In the future, detailed experiments of DNA methylation in sperm is needed.

研究分野：分子精神医学

キーワード：母体ストレス マウス 行動異常 遺伝子発現 精子 エピジェネティックマーク

## 1. 研究開始当初の背景

多くの先行研究から、ヒトの妊娠期における母体ストレスが、生まれてきた子どもの自閉症、感情障害、ADHDなどの発達障害のリスクファクターであることが示唆されている (Glover, 2015)。また古くからマウスやラットのような実験動物においても同様の結果が多く報告されている (Weller et al., 1988; Patin et al., 2005; Son et al., 2006)。さらに興味深いことに、近年の研究によって、孫の世代にまでその負の影響が受け継がれる事象が報告され注目を集めている (Bohacek et al., 2014)。そのメカニズムについては不明な点が多いが、エピジェネティクス変化 (エピジェネティックマーク (特に DNA メチル化)) を介している可能性が示唆されている。

我々は、マウスを用い、母体ストレスが仔 (F1) および孫 (F2) に与える影響の解明を生化学的、行動学的およびエピゲノムの解析から試みている。これまでの行動学的解析から、母体ストレスによる行動異常は F2 に受け継がれること、さらに、この異常はオスを介してのみ世代を超えて受け継がれるという非常に興味深い結果を得ている (未発表データ)。この結果から、母体ストレスが F1 の精子のエピジェネティックマークを介して F2 に異常が受け継がれる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

先行研究から、母体ストレスが発達障害発症のリスクファクターであることが示唆されており、さらに近年、孫の世代にまでその負の影響が受け継がれる事象が報告されている。しかしそのメカニズムは不明である。そこで我々は、マウスを用い、母体ストレスが仔および孫に与える影響の解明を、生化学的、行動学的およびエピゲノムの解析から試みる。現在、母体ストレスによる仔の行動異常がオスを介してのみ孫に受け継がれるという非常に興味深い結果を得ている。本研究では、仔の精子のエピジェネティクス変化 (エピジェネティックマーク) を介して孫に異常が受け継がれる可能性を検証し、精子エピジェネティックマークと行動異常という表現型の関連を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

我々は、マウスを用い、母体ストレスが仔 (F1) および孫 (F2) に与える影響の解明を生化学的、行動学的およびエピゲノムの解析から試みた。

まず、これまでに得られている行動異常に対してより詳細な行動解析を行った。

続いて、これら行動異常に関わるそれぞれ

の脳領域での各種因子の発現を定量的リアルタイム PCR 法にて測定・解析した。

最後に、F1 のオスマウスから精子を採取し、ゲノム DNA を抽出した。これらゲノム DNA を用い、上記脳内において発現変化の認められた遺伝子をターゲットとし、パイサルファイトシーケンス法にてメチル化状態を解析した。

## 4. 研究成果

まず、母体ストレスによる F1 の行動異常が F2 に受け継がれること、さらに、この異常はオスを介してのみ世代を超えて受け継がれることを確認した。続いて、これら行動異常に関与するいくつかの因子の、F1 マウスおよび F2 マウスの脳内発現の変化を認めた。さらにこれら因子のうち、数種類の遺伝子の DNA メチル化が、F1 精子において、減少および増加傾向を示すことを明らかにした。これらの事象は、仔の精子のエピジェネティクス変化 (エピジェネティックマーク) を介して孫に異常が受け継がれる可能性を示唆している。今後、詳細なメチル化解析および精子メチル化異常と脳内遺伝子変化の関連性を検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Ikawa D, Makinodan M, Iwata K, Ohgidani M, Kato T, Yamashita Y, Yamamuro K, Kimoto S, Toritsuka M, Yamauchi T, Fukami S, Yoshino H, Okumura K, Tanaka T, Wanaka A, Owada Y, Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya KJ, Mori N, Hashimoto R, Matsuzaki H, Kanba S, Kishimoto T. Microglia-derived neuregulin expression in psychiatric disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*. 61:375-385, 査読有, 2017. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.003.

Makinodan M<sup>#</sup>, Iwata K<sup>#</sup>, Ikawa D, Yamashita Y, Yamamuro K, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Yoshino H, Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya KJ, Mori N, Matsuzaki H, Kishimoto T. Tumor necrosis factor-alpha expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with early childhood social interaction in autism spectrum disorder. *Neurochem. Int.* 104:1-5, 査読有, 2017. (<sup>#</sup>The first three authors contributed equally to this work.) doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.005.

Andrade E, Musante V, Horiuchi A, Matsuzaki H, Brady A, Wu T, Greengard P, Taylor J, Nairn A. ARPP-16 is a striatal-enriched inhibitor of protein phosphatase 2A regulated by

microtubule-associated serine/threonine kinase 3(Mast 3 Kinase). *J Neurosci*. 8;37(10):2709-2722, 査読有, 2017. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4559-15.2017.

Kameno Y, Suzuki K, Takagai S, Iwata K, Matsuzaki H, Takahashi K, Wakuda T, Iwata Y, Magata Y, Mori N. Mismatch in cerebral blood flow and glucose metabolism after the forced swim stress in rats. *Acta Neuropsychiatr*. 28(6):352-356, 査読有, 2016. doi: 10.1017/neu.2016.24

Mundalil Vasu M, Anitha A, Takahashi T, Thanseem I, Iwata K, Asakawa T, Suzuki K. Fluoxetine Increases the Expression of miR-572 and miR-663a in Human Neuroblastoma Cell Lines. *PLoS ONE* 11(10):e0164425, 査読有, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0164425.

Sato R, Tsuchiya KJ, Matsuzaki H, Takei N, Itoh H, Kanayama N, Suda T, Watanabe H, Ohashi T, Tanaka M, Nishimura S, Maekawa M; HBC study group. Fetal Environment and Glycosylation Status in Neonatal Cord Blood: A Comprehensive Mass Spectrometry-based Glycosylation Analysis. *Medicine* (Baltimore). 95(14):e3219, 査読有, 2016. doi: 10.1097/MD.00000000000003219.

〔学会発表〕(計 18 件)

松崎秀夫:生活習慣の重要性.招待講演、福井県放課後子どもクラブ従事者研修会、2017年3月3日、福井県立大学(福井県吉田郡永平寺町)

松崎秀夫:気がかりな子どもへの理解と対応.招待講演、福井県放課後子どもクラブ従事者研修会、2017年3月3日、福井県立大学(福井県吉田郡永平寺町)

松崎秀夫:気がかりな子どもへの理解と対応.招待講演、福井県放課後子どもクラブ従事者研修会、2017年3月1日、パレア若狭(福井県三方上中郡若狭町)

松崎秀夫:生活習慣の重要性.招待講演、福井県放課後子どもクラブ従事者研修会、2017年3月1日、パレア若狭(福井県三方上中郡若狭町)

松崎秀夫:子どものこころを診る.招待講演、福井県大野市青少年問題協議会、2017年2月22日、学びの里めいりん(福井県大野市)

Iwata K and Scorrano L. Exploring the role of mitochondrial dynamics in developmental and psychiatric disorders. ポスター、15th VIMM Annual Retreat (2月17日~18日)、2017年2月17日、Padova, Italy.

Hirayama A and Matsuzaki H. Measurement of Multiple Radical Scavenging Activity as a diagnostic method for autism spectrum disorder in children. ポスター、The

Society for Redox Biology and Medicine's 23rd Annual Meeting(11月16日~19日)、2016年11月19日、San Francisco, USA.

Matsuzaki H, Iwata K, Nakamura K, Tsujii M and Mori N. Specific Hypolipidemia caused by VLDL degradation in Children with ASD. ポスター、The Society for Neuroscience 46th annual meeting (11月12日~16日)、2016年11月13日、San Diego, USA.

Iwata K, Nakabayashi K, Hata K, Nakamura K, N Shintani, Matsuzaki H, Mori N. Genome-wide DNA methylation profiles in postmortem brains from subjects with autism. ポスター、The Society for Neuroscience 46th annual meeting (11月12日~16日)、2016年11月13日、San Diego, USA.

松崎秀夫:自閉症の科学.招待講演、名古屋市立大学医学部「医療・保健学びなおし講座」、2016年11月2日、名古屋市立大学医学部(愛知県名古屋市)

松崎秀夫:自閉症の科学.招待講演、新潟精神医学会、2016年10月22日、新潟グランドホテル(新潟県新潟市)

原田陽子、渡邊賢、松崎秀夫:自閉症者血清中の糖脂質: MALDI-TOF-MSによる網羅的糖鎖分析.ポスター、第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会合同年会(9月8日~10日)、2016年9月10日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

松崎秀夫, 岩田圭子, 中林一彦、中村和彦、秦健一郎、森則夫:自閉症死後脳縫線核メチル化状態の網羅的解析.口頭発表.第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会合同年会(9月8日~10日)、2016年9月8日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Matsuzaki H: Clinical research for Child Mental Development in Japan. 招待講演、VIMM seminar, 2016年8月30日、Padova, Italy.

松崎秀夫:脳の発達と問題行動.招待講演、福井県藤島中学校区夏季合同研修会、2016年8月3日、福井県立武道館(福井県福井市)

松崎秀夫: NSF interacts with SERT and modulates its trafficking: implications for pathophysiology in autism. ポスター(International Session (P-5))、第5回日本DOHaD研究会学術集会(7月23日~24日)、2016年7月24日、国立成育医療研究センター(東京都世田谷区)

松崎秀夫:子どもの生活習慣と脳の発達.招待講演、福井県PTA連合会地区別研修会、2016年6月26日、小浜市文化会館(福井県小浜市)

松崎秀夫:自閉症スペクトラムの生物学的研究.特別講演、アスペ・エルデの会

総会、2016年5月22日、アイプラザ半田（愛知県半田市）

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：自閉症スペクトラム障害の判定方法と判定用キット  
発明者：平山暁、松崎秀夫  
権利者：国立大学法人筑波技術大学、国立大学法人福井大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-170479  
出願年月日：2016年9月1日  
国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松崎 秀夫 (MATSUZAKI, Hideo)  
福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授  
研究者番号：00334970

##### (2) 研究分担者

岩田 圭子 (IWATA, Keiko)  
福井大学・子どものこころの発達研究センター・助教  
研究者番号：30415088

小西 慶幸 (KONISHI, Yoshiyuki)  
福井大学・学術研究院工学系部門・准教授  
研究者番号：00382838