

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10264

研究課題名（和文）発達期の脳DNAメチル化再編がもたらす精神疾患発症脆弱性と次世代への継承

研究課題名（英文）Vulnerability induced by rearrangement of DNA methylation in the brain during development and its inheritance

研究代表者

松澤 大輔（Matsuzawa, Daisuke）

千葉大学・子どものこころの発達教育研究センター・特任准教授

研究者番号：10447302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノムによらない遺伝子調節としてエピジェネティクスが注目されている。申請者はマウスを用いDNAメチル化が発達期に脳内で大きく変化した際の成長後の行動変化を探ってきた。本研究では、そのマウスをオス親としたときに子供に生じる行動変化や脳内での遺伝子発現及び代謝物変化の有無を検討した。その結果、親世代に生じた脳内DNAメチル化変化及び行動変化は、内容は変わっても子世代の行動や遺伝子発現に影響を与えていることがわかった。親世代へのストレスがエピジェネティックな変化を生じて子世代に影響することは精神疾患の発症を考えた時、重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティックな遺伝子修飾の精神疾患における役割が示唆されつつある。本研究は、発達期脳内でのエピジェネティックな遺伝子発現調節制御が成長後のストレス耐性や認知・社会的機能といった行動的側面、形態・生理的反応に影響を与えることを探り、DNAメチル化を介した不安や恐怖反応などの不安に関連した行動上の変化が次世代に継承しうることを検証したものである。生後の生活環境ストレスが、次世代にまで影響をもたらす可能性があることは学術上においては精神疾患の新しい脆弱性仮説に繋がり、社会的には子世代の結果が親世代にまで遡って影響がありうることで様々な環境ストレス対策への理論的寄与の一助となると考えている。

研究成果の概要（英文）：It has become increasingly evident that the methylation of DNA, known as an epigenetic marker, plays a significant role in the development of neurological, neurocognitive, and neurobehavioral disorders. I have made a mouse model which builds a hypothesis that the alteration of DNA methylation in the developmental brain would be vulnerability for later onset of mental diseases. In this study, I examined the change in the brain DNA alteration and resulting behavioral alteration could be transferred to the next generation. As a result, that effect was identified, but the behavioral alteration observed was not as the same as that in the parents. Our results are very important considering the vulnerability for mental diseases.

研究分野：神経科学、精神医学

キーワード：DNAメチル化 エピジェネティクス 恐怖条件づけ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノムによらない遺伝子調節としてエピジェネティクスが発達障害やうつ病をはじめとした精神疾患の発症に絡んで注目されている。申請者は、**発達期に脳内 DNA メチル化の変化に伴う脳内のエピジェネティックな環境再編が成長後の精神疾患発症脆弱性に繋がる**仮説を立て、マウスを用いた動物モデルを構築し、今回の研究につなげている。

(1)精神疾患とエピジェネティクス

一卵性双生児のゲノムは同一であり、外面および行動上の類似点が強調される反面、その両者にも相違が成長とともに顕在化する。要因の1つは染色体上 DNA メチル化が年齢と共に2人の間に乖離が強くなることであり、エピジェネティックな DNA 発現調節が関与している。一卵性双生児にさえ際立った差異を生じさせることは、他人ではさらにエピジェネティックな変化が大きいことも示し、それが発症や治療反応性に個人差の多い精神疾患の背景にあることが推察される。特に、うつ病、依存症や統合失調症をはじめとした精神疾患や記憶・学習においての脳内 DNA メチル化の変化が発症や病態に関与する報告が相次いでいる(Levenson and Sweatt, 2005)。具体的には、人の児童虐待を経験した自殺者の脳でエピジェネティックな修飾を受けた発現変化が報告されている(Macgowan et al.2009)。また、そのような発現が児童虐待の動物モデルにおいて同様に確認されているが、一旦受けたそのような DNA 上の「傷」が、ある種の薬剤により回復可能な点は臨床を考えたときに注目に値する(Weaver et al.2004)。

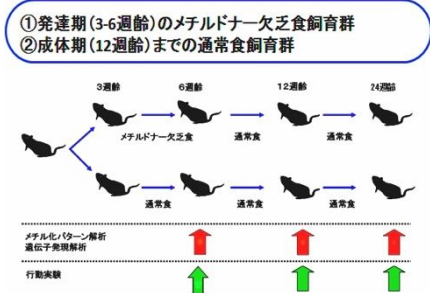
(2)親世代形質のエピジェネティックな変化を介した次世代への継承

また、ゲノムに依らない遺伝子調節が果たす役割が判明してきた中、エピジェネティックな変化が次世代に継承される可能性が浮上している。その端緒となったのは、マウスにおいて、桜の匂いに条件付けされた恐怖反応が孫世代にまで行動的に継承された2014年の報告である(Dias&Ressler,2014)。嗅覚受容体遺伝子のメチル化が精子 DNA において変化していることも確認され、成体がストレスを受けたときに、いわば「傷跡」を配偶子に残すことで次世代の行動を変化させる可能性を強く示唆したのである。

(3)本研究に関連したこれまでの研究成果

申請者は、脳内 DNA メチル化の変化が与える可能性を、マウスを用いて検証してきた。

図のように、出生後のメチル化変化を制限するために、メチル化反応に使われるメチルドナーを欠乏させた食事をマウス生後3-6週に与えて(メチルドナー欠乏群)、発達期=小児期にDNAメチル化が制限されるモデルとした。このメチルドナー欠乏群はメチルドナー制限後(6週齢)でも、発達後の12週齢期においても、海馬におけるメチル化や記憶に関連した遺伝子群(Dnmt3やAMPA受容体遺伝子)のメチル化を変化させ、恐怖や不安反応に違いをもたらした。



2. 研究の目的

(1)次世代への影響

DNAのメチル化は、ゲノムインプリンティングという形で次世代に受け継がれることが知られている。DNAメチル化は、配偶子生成の段階で一旦全て解除されるが、受精を経て発生が進む過程で、染色体上のDNAメチル化は父母由来に応じてDNAメチル化が再構成される。

申請者も、本研究で行うような発達期に起きた脳内 DNA メチル化再編成が、次世代に受け継がれるかを予備実験で確認した所、DNA メチル化再編成マウスを父親とする次世代マウスは、恐怖消去の過程が、対照群と明らかに異なっていた。本研究では、親マウスの脳内 DNA メチル化再編成もたらす次世代への影響に関して詳細に検討する。

(2)海馬 DNA メチル化再編成がもたらす遺伝子発現と代謝物質変化

これまでの申請者の研究含め、先行研究からは、海馬 DNA のメチル化が精神疾患の病態に、少なくとも一部の患者には影響を与えていることは確実に考える。海馬 DNA メチル化再編成もたらす海馬内 DNA 発現と代謝物への影響を検討する。

(3)親世代のメチルドナー欠乏が次世代の行動や遺伝子発現に影響を与えるか

申請者のこれまでの予備実験において、メチルドナーを発達期に欠乏して育ったオス親からの次世代では、恐怖条件づけ応答が異なっていることがわかった。

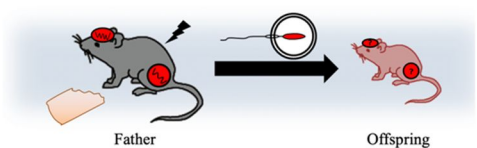
これまでの、親世代のストレスがエピジェネティックな影響を通じて次世代にもたらす行動変容があるとの研究報告を鑑み、精神科疾患の脆弱性をもたらす新たな機序として考えるべき問題と考えた。本研究ではオス親から次世代のマウスに行動変化のみならず、遺伝子発現変化が伴うか、また継承においてのプロセスと考えられる精子 DNA メチル化状態も探る。

仮説

父親の発達期のメチルドナー欠乏は生殖細胞のメチル化を変え、次世代に同様の形質をもたらす。

検証

次世代の不安様行動・恐怖応答や遺伝子の発現量およびメチル化率に親と同様の変化が見られるかどうかを調査する。



3. 研究の方法

DNA メチル化を中心としたエピジェネティックな遺伝子制御の変化を発達期にもたらすために、C57BL/J 系統マウスに、メチルドナー欠乏食を生後 3-6 週に課す。対照群は通常食飼育群である。

(1)メチルドナー欠乏食マウス

研究期間内を通じ、メチルドナー欠乏食群と通常食を用いたマウス群の作成、維持を続ける。使用マウスは C57BL/J 系統、雄マウスとする。DNA メチル化は、DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)を介した反応で生ずるが、その基質となる S-アデノシルメチオニンが生成されるには、葉酸、コリン、メチオニンがメチル基の供給源(=メチルドナー)となる。そこで、その 3 種類のメチルドナーを食事から欠乏させ、DNA メチル化の変化をもたらすことができる。本研究でメチルドナー欠乏食を摂取させる期間は、生後 3-6 週である。これはマウスにおいては、離乳後通常食の摂取が可能になった時期から、生殖可能になるまでの期間である。この期間を選択した理由は、脳の発達と成熟期間であること、ヒトにおいて児童虐待の犠牲になりやすい発達期に相当するからである。

次世代マウスは、このようなメチルドナー欠乏食を経験した雄マウス(F0)を通常飼育の雌マウスと交配させて得た(F1)。F1 の雄世代のマウスに対して F0 と同様の行動実験と遺伝子及び代謝物解析を行い、F0 の F1 世代に対する種々の影響を探索した。

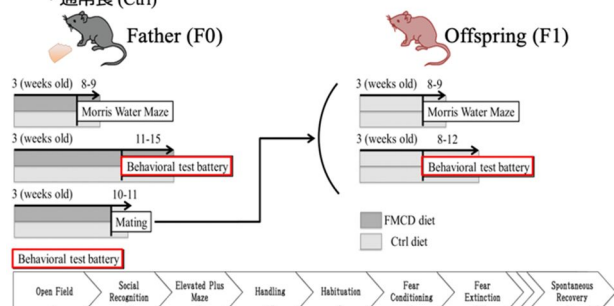
Methods

動物

C57BL/6J マウス ♂ 3週齢~

飼料

- メチルドナー欠乏食 (folate-, methionine- and choline-deficient: FMCD)
- 通常食 (Ctrl)



(2)行動解析

行動解析は、青年期に生ずる不安や抑うつに対してそのモデルとなるマウスの行動を、恐怖条件付けと消去(恐怖や不安を主症状とする不安障害疾患のモデル)、オープンフィールド(不安障害モデル)、高架式十字迷路(恐怖症モデル)、を用いて評価することでストレス耐性への DNA メチル化再編成の影響を見る。

(3)遺伝子解析

恐怖や不安の記憶の定着に関して強い影響を持つ海馬における DNA メチルトランスフェラーゼ(Dnmt)遺伝子、NMDA 受容体、GABA 受容体遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法(RT-PCR)にて解析する。Dnmt は DNA メチル化を維持、もしくは新生するためのタンパク質であり、Dnmt1、3a/3b があるためそれらの遺伝子解析を行うことにより海馬内における DNA メチル化の再編成の可能性を探る。また海馬内にて記憶形成に深く関わるグルタミン酸受容体遺伝子や、カルモジュリンキナーゼ 2 遺伝子などについてもその発現を調べる。また、父親精子 DNA における DNA メチル化率を計り、オス親の次世代へのエピジェネティックな調節を介した遺伝に対するエビデンスの 1 つとする。

(4)HPLC によるモノアミン代謝物解析

メチルドナー欠乏食の影響を包括的に探るために HPLC を用い、海馬内モノアミン類(セロトニン、ノルアドレナリン、ドパミン及びそれらの代謝物)の濃度を測定する。

4. 研究成果

(1)メチルドナー欠乏食の行動への影響

F0 世代雄には離乳後 3-6 週にメチルドナー欠乏食を与えた後に、オープンフィールド、効

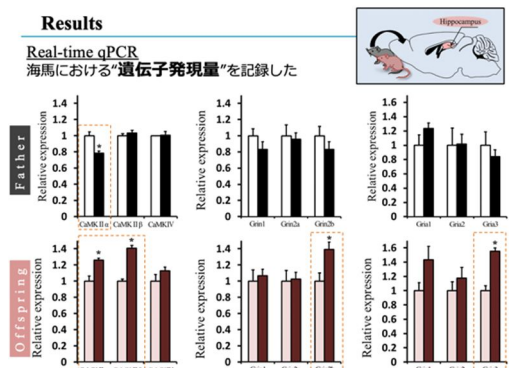
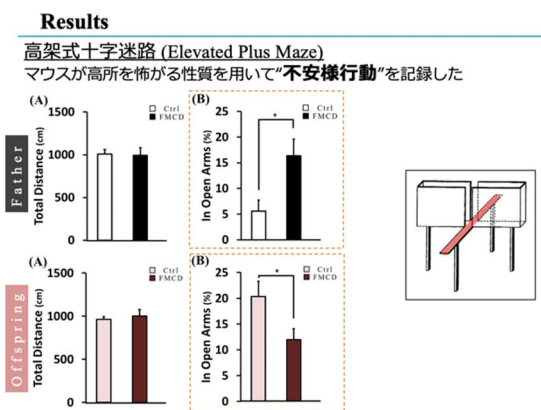
果式十字迷路、恐怖条件付けとその消去、社会的行動などの一連の行動実験を行った。

さらに、そのマウスにはメスとの交配により F1 世代を作成し、F1 世代にも同様の行動実験を課した。その中で F0 世代は筆者らの先行研究の通り、メチルドナー欠乏食群(FMCD 食群)で対照群に比して高架式十字迷路のオープンアーム滞在時間が長く、恐怖消去が遅くその固定が不十分であった。興味深いことに F1 世代はその 2 つの行動実験ともに F0 と

は逆の傾向を見せた。すなわち高架式十字迷路で、対照群を親に持つ F1 世代と比してオープンアーム滞在時間が短く、恐怖消去が早かった。

(2)遺伝子解析

F0 及び F1 世代の海馬における遺伝子発現変化を探った。左図はメチルドナー欠乏食後の F0 雄とそれを親とした F1 世代のもので、DNA メチル化の維持に関わる Dnmt1 が F0 世代では低下



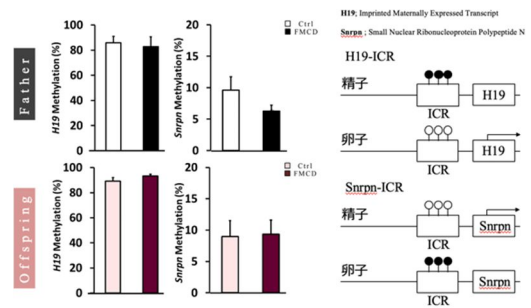
しているのはメチルドナー欠乏による影響と考えられる。一方、海馬において含有量が高く記憶メカニズムに強く関わるカルモジュリンキナーゼ2の遺伝子発現がF0世代で低く、F1世代で高いことが行動上の変化と関わっていることが示唆された。

精子DNAメチル化率に関しては、次世代マウスへの行動への影響を考え、親世代精子において大きな変化があることを期待していたが、今回解析した領域に関しては通常餌群と、メチルドナー欠乏群で大きな差を認めず、精子DNAメチル化の変化が次世代への影響の鍵を握っているかの検証は不十分な成果となった。

Results

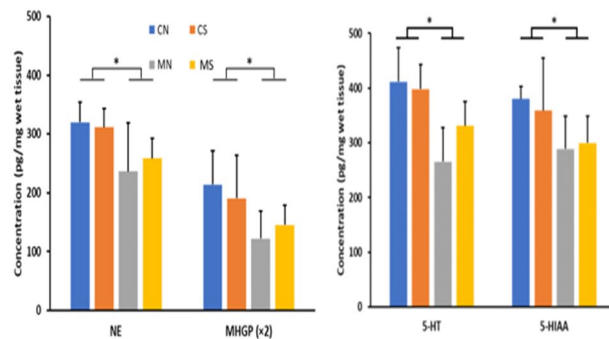
Methylation Specific PCR

父親の精子における特定遺伝子の“メチル化率”を記録した



(3)HPLCによるモノアミン代謝物解析

F0世代における海馬のモノアミン及びその代謝物の変化を測定した。ストレスの有無に依らず、メチルドナー欠乏による影響が強く見られ、特にノルアドレナリン系とセロトニン系の代謝物に、対照群との差が大きく、海馬におけるDNAメチル化再編がもたらす行動変化への寄与が示唆された。



以上の研究成果のうち、親世代(F0)から次世代(F1)への行動変化に対するF0オス親発達のメチルドナー欠乏がどのように影響を与えたかを考察し、行動変化と脳内海馬遺伝子の遺伝子発現に対する結果をまとめた部分は、下記論文として公表した。

Sahara Y, Matsuzawa D, Ishii D, Fuchida T, Goto T, Sutoh C, Shimizu E. Paternal methyl donor deficient diets during development affect male offspring behavior and memory-related gene expression in mice. *Developmental Psychobiology* 2019 volume61, Issue 1, p17-28.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ishii D, Matsuzawa D, Matsuda S, Tomizawa-Shinohara H, Sutoh C, Shimizu E.	4. 巻 129
2. 論文標題 Spontaneous recovery of fear differs among early - late adolescent and adult male mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00207454.2018.1501049	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 Sahara Y, Matsuzawa D, Ishii D, Fuchida T, Goto T, Sutoh C, Shimizu E.	4. 巻 61
2. 論文標題 Paternal methyl donor deficient diets during development affect male offspring behavior and memory-related gene expression in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Psychobiology	6. 最初と最後の頁 17-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dev.21801	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 Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Shimizu E.	4. 巻 150
2. 論文標題 Development of the fear regulation system from early adolescence to young adulthood in female mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurobiology of Learning and Memory	6. 最初と最後の頁 93-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nlm.2018.03.007	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sahara Y, Matsuzawa D, Fuchida T, Goto T, Sutoh C, Shimizu E.
2. 発表標題 Positive effect of environmental enrichment on fear extinction is affected by presence or absence of methyl donor in mice.
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Goto T, Matsuzawa D, Sahara Y, Fuchida T, Sutoh C, Shimizu E.
2. 発表標題 The effect of methyl donor deficient diet combined with stress exposure in juvenile period on behaviors and monoamine levels in C57BL/6J
3. 学会等名 The 90th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

認知行動生理学 業績・学会活動 http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/phys1/result/index.html

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