

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791196

研究課題名(和文) 発達期脳内DNAメチル化再編成がもたらす成長後のストレス耐性への影響

研究課題名(英文) Effect of rearrangement in the DNA methylation in the developmental brain on the stress tolerance

研究代表者

松澤 大輔 (Matsuzawa, Daisuke)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10447302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、DNAメチル化をはじめとしたエピジェネティックな遺伝子制御が精神疾患発症の背景にあることが注目されている。脳内のDNAメチル化は、葉酸・コリン・メチオニンといったメチルドナーを食物から摂取することで維持されている。本研究ではマウス脳の発達期である生後3-6週にそのようなメチルドナーの欠乏食を与えた時に、それが精神疾患発症の脆弱性につながるかを検証した。結果として、メチルドナー欠乏は、恐怖記憶の獲得とその消去に影響を及ぼし、それは成長後の12週時にも認められた。その背景としては海馬におけるDNAメチルトランスフェラーゼやNMDA受容体、GABA受容体遺伝子の発現変化が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that epigenetic alteration such as DNA methylation could be a mechanistic background on the development of psychiatric diseases. DNA methylation in the brain is maintained by the intake of methyl donors such as folic acid, choline and methionine from food. In this study, we tried to demonstrate whether such methyl donors deficit during the developmental period in the mouse brain (postnatal 3-6wk) could lead to the vulnerability toward the psychiatric diseases. As a result, methyl donor deficit affected the fear memory consolidation and its extinction, and that effect was observed even in 12 weeks of age. Alterations of DNA expression in the DNA methyl-transferases, NMDA receptor, and GABA receptor could be associated with those behavioral changes.

研究分野：精神医学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 精神疾患発症脆弱性

1. 研究開始当初の背景

心的外傷後ストレス障害(PTSD)や社交不安障害のような不安障害やうつ病などの精神疾患は10代後半から20代前半の青年期に好発する。その発症、治療反応性、再発の有無には極めて個人差があり、例えば強烈なストレスに曝されたとしても誰も同じようにPTSDを発症するわけではなく、そのストレスの与える影響(ストレス耐性)には個人差が大きい(例:地下鉄サリン事件被害者のPTSD発症と脳形態の差, Yamasue et al., 2003)。発症脆弱性や治療反応性には個人因子として特に遺伝的因子が強く働いていることが予想されるが、現在までに確定したものはない。遺伝子は出生後もDNAメチル化やヒストンアセチル化に代表されるエピジェネティックな変化を受けて発現調節がなされており、従来、出生後は比較的安定していると考えられていたが、近年、様々な外部刺激によって一時的に解除されたり、逆に増加したりすることが判明してきた。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・学習における脳内DNAメチル化の変化が発症や病態に關与する報告が相次いでいる(Levenson and Sweatt, 2005)。DNAメチル化の変化は、ゲノムが同一である一卵性双生児で精神疾患を含む様々な疾患の発症が一致しないことを説明する要因の1つであり、また出生後の環境が発症や治療反応性に影響を与えることを強く示唆する。そのような遺伝子にエピジェネティックな影響をもたらす社会的要因としては例えば児童虐待がある。うつ病をはじめとする気分障害ではストレスに対する生体反応に強く関わる、海馬グルココルチコイド受容体の発現が自殺と関連していることが知られているが、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た(Macgowan et al. 2009)。さらに注目すべきは、そのような発現は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、その後の愛護的関わりによって回復可能である点である(Weaver et al. 2004)。従って、出生後発達期に遺伝子がある種の要因によってDNAメチル化を含めたエピジェネティックな再編成を受けることは、その後の精神疾患の発症脆弱性、もしくは発症に対する抵抗性をもたらす、効果的な治療は発症脆弱性につながった変化を回復させると考えた。

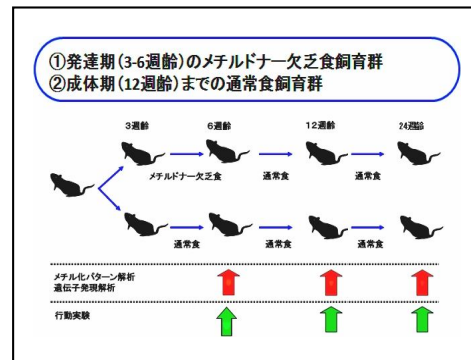
2. 研究の目的

青年期に好発する不安障害やうつ病などの精神疾患の発症脆弱性や治療反応性の有無には個人のストレス耐性の差が強く關与していると考えられる。それには出生後に発現調節を受ける、DNAメチル化に代表されるエピジェネティックな現象、特に小児(発達)期における脳内遺伝子のエピジェネティッ

クな再編成の關与が考えられる。本研究ではマウスにメチルドナー制限食を用いて促した小児期のDNAメチル化の再編成が、成長後のストレス耐性、刺激に対する生理的反応、不安・抑うつ・社会性等の行動面に影響を与えることを多角的に検証、発達期脳内遺伝子制御の与える精神疾患への影響を探り、再編成したDNAメチル化の回復が治療につながることを検討する。

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。その上で、ストレス耐性を中心とした行動解析、NMDA受容体を始めとした神経伝達物質受容体発現変化からDNAメチル化の成長後再編成の影響を検証し、食事を通常に戻した上での回復可能性を探る。下図は簡略化したスケジュールを示す。



(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餌させる期間は、生後3-6週である。これはマウスにおいては、離乳後通常食の摂餌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。また、6週までメチルドナー欠乏食(FMCD食)を食べさせたマウスを通常食飼育にした上で12週まで飼育し、その時点での行動/遺伝子解析も行う。

## (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。NMDA 受容体はグルタミン酸受容体の 1 つで、記憶や学習メカニズムに深く関わる長期増強(LTP)のような可塑的变化をもたらす。獲得した恐怖の消去学習においてそのアゴニストが治療的効果を促進する。ここでは受容体を構成する NR1、NR2A/B サブユニットの遺伝子解析を行う。また不安や恐怖の軽減に薬理的に大きな役割を担うベンゾジアゼピン系化合物の受容体である、GABA 受容体サブユニット Gabra1-3 遺伝子の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1)メチルドナー欠乏食(FMCD)マウスは体重が減少してしまうため、食事制限コントロール(Food restriction: FR)が通常食マウスに加えて必要になった。

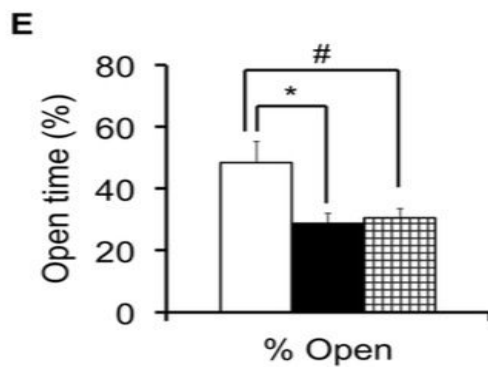
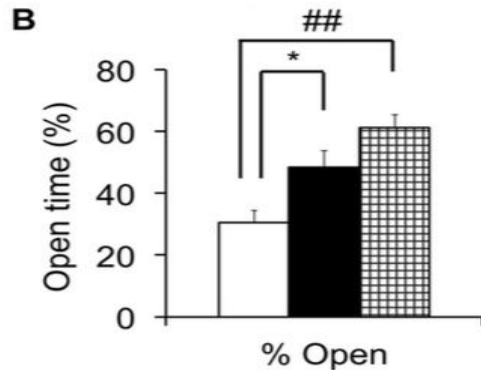
(2)FMCD を終えた6週齢と、その後通常食に切り替えて飼育した12週齢で、Dnmt、行動、NMDA 受容体、GABA 受容体遺伝子発現を測定した。

(3)Dnmt 発現は、6週齢で、Dnmt3a/b 両遺伝子発現が FMCD 群でのみ低下しており、DNA メチル化の再編成が FMCD 群で生じていることが示唆された。一方で12週齢時には通常食群、FR 群で発現しており、FMCD 食から通常食に変えることは DNA メチル化を回復しうる方法であることが推測される。

(4)一方、行動においては、6週齢 FMCD 群で恐怖記憶の獲得が低下(下図 A)、翌日の今日雨記憶の定着に支障を来した(下図 B)。12週齢では、記憶の獲得は3群が同レベル(下図 C)であったが、記憶の定着に関して、FMCD 群が低いレベル(下図 D)にあることを示し、恐怖記憶の固定に関しては食事を戻しても回復

しないことが示唆された。

FMCD 群は高架式十字迷路でも、6週齢で不安が弱く(下図 B)、一方12週齢では不安が強い(下図 E)結果となり、それは FR 群でも同じ傾向があった。オープンフィールドは移動距離



におい差がなかった。このことから不安の発生に関して FMCD 群では影響が12週齢になっても持続していることがわかるが、単に食事制限しても認められるため、メチルドナー不足よりも体重減少の影響が考えられた。

(5)神経伝達物質受容遺伝子発現は、NR2B 遺伝子発現が FMCD・FR 群で6週齢時に認められたが12週齢時には回復。GABA 受容体遺伝子は Gabra2 遺伝子が6週齢で FMCD・FR 両群で発現低下、Gabra3 遺伝子が12週齢時に FMCD 群のみで低下していた。

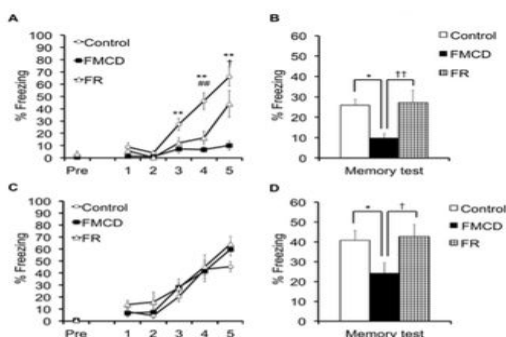
(6)以上の結果から、脳発達期におけるメチルドナー欠乏は、恐怖や不安の発現を後年にわたるまで残す影響を残し、精神疾患発症の脆弱性に関わることが示唆された。その背景には、神経伝達物質受容体である NMDA や GABA 受容体の発現に関わり、DNA メチル化の再編成が遺伝子発現に関与していることも示唆された。

## 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 1 件)

D.Ishii, D.Matsuzawa, S.Matsuda, H.Tomizawa, C.Sutoh, E.Shimizu. Methyl donor-deficient diet during development



can affect fear and anxiety in adulthood in C57BL/6J mice. PlosOne, 2014, 9:e105750. DOI: 10.1371/journal.pone.0105750. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

松澤大輔 不安症とエピジェネティクス  
日本不安症学会 2015年2月15日。広島国際会議場(広島県広島市)。

松澤大輔 不安とエピジェネティクス  
日本心身医学会 2015年6月26日(発表確定)。タワーホール船堀(東京都江戸川区)。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松澤 大輔 (Matsuzawa, Daisuke)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10447302