

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461711

研究課題名(和文) 脳DNAメチル化再編の次世代への継承と生化学的環境変化

研究課題名(英文) Change in metabolites and transgenerational effects after rearrangement of brain DNA methylation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化はゲノムに依らない遺伝子発現調整に関わる。本研究では、マウスの離乳後3-6週にDNAメチル化を維持するためのメチルドナーを欠乏した食事を用い、脳内DNA改変を促した。その後の行動変化と遺伝子および生化学的環境変化を調べた上で、その影響が次世代のマウスに生じるかをメチルドナー欠乏食を摂取した雄マウスの子ども世代で探索した。メチルドナー欠乏を持つ親の子マウスでは対照群と比して特に恐怖条件付けとその消去パラダイムにおいて違いがあり、海馬内遺伝子変化やモノアミン濃度の変化を伴った。親世代の脳DNAメチル化変化は次世代の行動や遺伝子発現、代謝物変化に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is a kind of gene expression control system with no change in the genome. In this study, methyl donor deficient diet was used to rearrangement of DNA methylation in the brain of mice during 3wk to 6wk of age after weaning. The author investigated the effect of the diet on the behavior and gene expression and change of metabolites in the hippocampus, and also those alterations into the next generation. As a result, F1 mice which has the father with methyl deficient diet history showed different behaviors especially in the fear conditioning and extinction paradigm and gene expressions and metabolites changes in the hippocampus compared to the control mice. The results suggest that the alteration in the brain DNA methylation affects behaviors, gene expressions, and metabolites in the next generation.

研究分野：精神医学

キーワード：DNAメチル化 エピジェネティクス 恐怖条件付け 次世代

1. 研究開始当初の背景

(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・学習における脳内 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)。

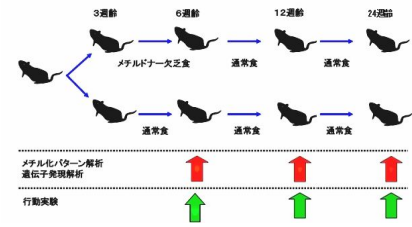
(2)親世代形質のエピジェネティックな変化を介した次世代への継承

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。

- ①発達期(3-6週齢)のメチルドナー欠乏食飼育群
- ②成体期(12週齢)までの通常食飼育群



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 メチル化再編の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と考える。海馬 DNA メチル化再編がもたらす海馬内 DNA 発現と代謝物への影響を検討する。

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らしするために、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。

(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。

(4)HPLCによるモノアミン代謝物解析

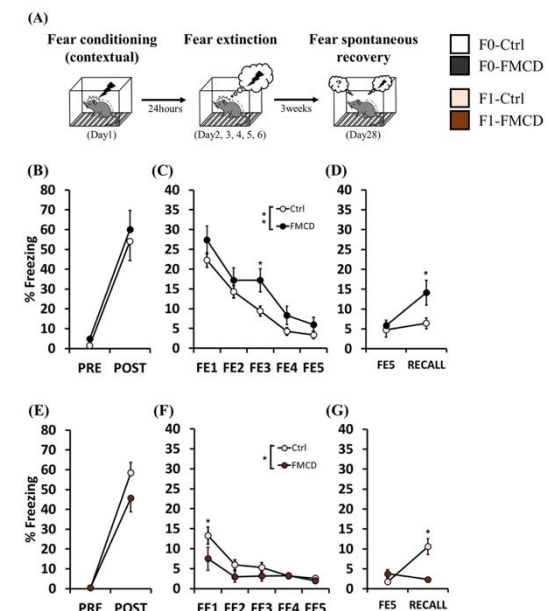
メチルドナー欠乏食の影響を包括的に探るためにHPLCを用い、海馬内モノアミン類(セロトニン、ノルアドレナリン、ドパミン及びそれらの代謝物)の濃度を測定した。

4. 研究成果

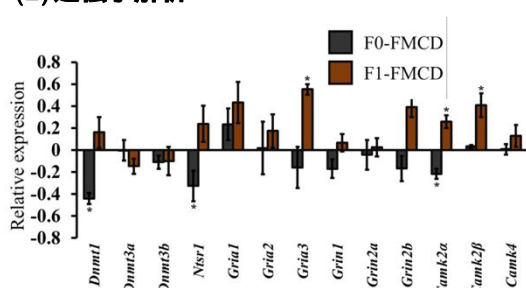
(1)メチルドナー欠乏食の行動への影響

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(下図中段)。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(下図下段)。



(2)遺伝子解析

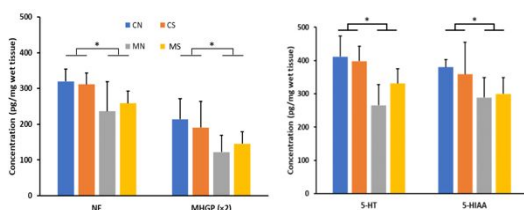


F0及びF1世代の海馬における遺伝子発現変化を探った。上図はメチルドナー欠乏食後のF0雄とそれを親としたF1世代のもので、DNAメチル化の維持に関わるDnmt1がF0世代では低下しているのはメチルドナー欠乏による影響と考えられる。一方、海馬において含有量が高く記憶メカニズムに強く関わるカルモジュリンキナーゼ2の遺伝子発現がF0世代で低く、F1世代で高いことが行動上の変化と関わっていることが示唆された。

(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。



(4)研究成果の発表

以上の成果は、下記学会の他、'Intergenerational impacts of methyl donors deficient diets: Paternal methyl donors deficient diets during development can affect behaviors in male mice of the next generation.'のタイトルで、現在 Gene, Brain and Behavior 誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

松澤大輔 不安とエピジェネティクス
心身医学 56(4)333-336,2016 査読無

Tomizawa H, Matsuzawa D, Ishii D, Matsuda S, Kawai K, Mashimo Y, Sutoh C, Shimizu E. (2015) Methyl-donor deficiency in adolescence affects memory and epigenetic status in the mouse hippocampus Genes Brain Behav. 14(3):301-9. doi: 10.1111/gbb.12207 査読有

Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Sutoh C, Shimizu E. (2015) Sex differences in fear extinction and involvements of extracellular signal-regulated kinase (ERK). Neurobiol Learn Mem. 12:123:117-124. doi: 10.1016/j.nlm.2015.05.009 査読有

Ishii D, Matsuzawa D, Matsuda S, Tomizawa H, Sutoh C, Shimizu E. An isolated retrieval trial before extinction session does not prevent the return of fear. Behav Brain Res. 2015 Mar 28;287:139-145. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.052. 査読有

Ishii D, Matsuzawa D, Matsuda S, Tomizawa H, Sutoh C, Shimizu E. Methyl Donor-Deficient Diet during Development Can Affect Fear and Anxiety in Adulthood in C57BL/6J Mice. PLoS One. 2014 Aug 21;9(8):e105750. doi: 10.1371/journal.pone.0105750.eCollection 2014 査読有

Ishii D, Matsuzawa D, Matsuda S, Tomizawa H, Sutoh C, Shimizu E.

Methyl Donor-Deficient Diet during Development Can Affect Fear and Anxiety in Adulthood in C57BL/6J Mice. PLoS One. 2014 Aug 21;9(8):e105750. doi: 10.1371/journal.pone.0105750.eCollection 2014 査読有

Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Shimizu E. Effects of memory age and interval of fear extinction sessions on contextual fear extinction. Neurosci Lett. 2014 Aug 22;578:139-42. doi: 10.1016/j.neulet.2014.06.054 査読有

Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Shimizu E. Effects of memory age and interval of fear extinction sessions on contextual fear extinction. Neurosci Lett. 2014 Aug 22;578:139-42. doi: 10.1016/j.neulet.2014.06.054 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Sahara Y, Matsuzawa D, Fuchida T, Goto T, Sutoh C, Shimizu E. Transgenerational effects of methyl donors deficient diets in mice during juvenile period, The 40th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Makuhari Messe, Chiba 2017/7/20

松澤大輔 Anxiety related mental illness and epigenetics シンポジウム 3「精神疾患の病態研究〜リズムと睡眠」第 23 回日本時間生物学会 名古屋大学豊田講堂 名古屋 2016/11/13

松澤大輔. 不安とエピジェネティクス シンポジウム 3「ストレス調節のメカニズムとエピジェネティクス」第 56 回日本心身医学会 東京 2015/6/26

松澤大輔. 不安症とエピジェネティクス 第 7 回日本不安症学会 広島 2015/2/15

富澤 はるな, 松澤 大輔, 石井 大典, 松田 真悟, 河合 琴美, 須藤 千尋, 清水 栄司. 発達期のメチルドナー欠乏は記憶と AMPA 受容体遺伝子の発現に影響する 第 37 回日本神経科学大会 横浜 2014/9/11-13

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学医学部認知行動生理学

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/phys1/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松澤 大輔 (Daisuke, Matsuzawa)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 10447302