

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00897

研究課題名(和文)脳・精神系調節因子としての食と栄養—葉酸とフェルラ酸の作用解析—

研究課題名(英文)Daily diets acts as a regulator of the brain and mental systems.

研究代表者

矢部 武士 (YABE, TAKESHI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：40239835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低葉酸食を与えたマウスでは、強制水泳試験においてうつ様行動を示した。海馬歯状回では、低葉酸食投与マウスで新生成熟ニューロンの減少と未成熟ニューロンの増加が観察された。Golgi-Cox染色の結果から、低葉酸食投与マウスの海馬では、樹状突起の複雑性、スパイン密度、及び成熟スパイン数が著しく減少していることが明らかになった。また、ストレス負荷後のc-Fos陽性ニューロン数が、低葉酸食投与マウスのDGでは減少していた。これらの結果から、海馬ニューロンの成熟度の低下が、葉酸欠乏による抑うつ症状に關与するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、葉酸欠乏性うつ病の発症機序として海馬歯状回における神経新生の異常が關与することを明らかとすることが出来た。本研究成果は、うつ病態における葉酸の重要性を示すものであり、適切な量を摂取することの重要性を啓蒙することにより、うつ病の予防や治療に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we assessed whether post-weaning folate deficiency affect neurological and psychological function. The low folate diet-fed mice showed depression-like behavior in the forced swim test. In the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, decreased number of newborn mature neurons and increased number of immature neurons were observed in low folate diet-fed mice. Staining with Golgi-Cox method revealed that dendritic complexity, spine density and the number of mature spines of neurons were markedly reduced in the DG of low folate diet-fed mice. Stress response of neurons indicated as c-Fos expression was also reduced in the DG of low folate diet-fed mice. These results suggest that reduction in the degree of maturation of newborn hippocampal neurons underlies folate deficiency-induced depressive symptoms.

研究分野：神経科学

キーワード：葉酸欠乏

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【うつ病と食品由来化合物】

うつ病や双極性障害に代表される気分障害は、本邦だけでも約 100 万人以上の患者が罹患しており、現代社会において決して稀な疾患ではない。厚生労働省による平成 22 年度の試算によると、うつ病や自殺による経済損失は約 2.7 兆円/年に上るとされており、医療経済学的視点からも、うつ病への対策強化は急務とされている。現在のうつ病への対策は薬物療法や行動認知療法といった治療的介入が主なものであるが、治療抵抗性患者が多数存在することや副作用などの問題点もあり、十分であるとは言い難い。

近年、うつ病に関連する因子について疫学調査が行われ、栄養素のひとつである葉酸の欠乏がうつ病の危険因子となる可能性が指摘されている (*J Altern Complement Med*, **14**, 277-285, 2008. 他)。また臨床研究においても、血清葉酸濃度が低いうつ病患者では抗うつ薬の効き方が悪いこと (*CNS Spectrums*, **14**, 2-7, 2009. 他) や、抗うつ薬と葉酸を併用することにより抗うつ効果が増強されること (*J Affect Disorders*, **60**, 121-130, 2000. 他) などが報告されている。これらの知見は、体内の葉酸量がうつ病の発症や治療効果に関与する可能性を示すものと考えられる。

またフェニルプロパノイドの 1 種であり米ぬかなどに多く含有されるフェルラ酸は、抗酸化作用や神経保護作用などが多く報告されており、アルツハイマー病の治療や予防への応用も検討されている。申請者らは慢性マイルドストレスの負荷によるうつ様モデルマウスを用いた解析を行い、フェルラ酸を経口摂取した動物で抗うつ様作用、神経新生促進作用、BDNF 産生促進作用などが観察されることを見だし報告している (*Neuroscience* **165**, 522-531, 2010)。

【幼少期における精神機能発達とエピジェネティクス】

幼少期のような精神機能の発達過程では、脳内で外部環境からの刺激に対応したダイナミックな変化が生じているものと考えられる。精神機能の正常な発達が何らかの理由により阻害されると、成人後の精神疾患発症リスクが高まることも指摘されている。精神機能の発達制御に関わる分子メカニズムは未だ不明な部分が多く残されているものの、脳内における DNA やヒストン蛋白のメチル化による遺伝子発現制御の変化、すなわちエピジェネティクス制御変化が関与する可能性が注目されている。これまでに申請者らを含めた多くの研究者により、後天的な環境要因による DNA メチル化の変動、すなわちエピジェネティクス制御の変動が脳・精神機能の異常に関与するとの報告がなされている (*Nat Neurosci.*, **7**, 847-854, 2004. 他)。

【葉酸とエピジェネティクス制御】

食事により摂取された葉酸は体内でテトラヒドロ葉酸に変換され、DNA の構成成分であるチミジル酸の合成基質として働く他、DNA やヒストンがメチル化される際のメチル基転移反応において補酵素として機能することが知られている。食事により摂取される葉酸が、精神機能の発達過程における脳内エピジェネティクス制御機構に影響をおよぼす可能性も十分に考えられる。

2. 研究の目的

前述の背景より我々は、「食事由来の栄養・化合物は、脳・神経系のエピジェネティクスを制御することにより正常な脳機能の発達に関与する。またこれらの摂取量の極端な増減は、エピジェネティクス制御に異常をもたらし、うつ様行動などの精神症状を誘発する」と

の仮説を立てて研究を行っている。本研究では、エピジェネティクス制御の中でも DNA メチル化の挙動に着目し、葉酸欠乏とうつ病を関連付ける分子基盤の解明を試みるとともに、フェルラ酸などの植物由来フェニルプロパノイド類の抗うつ作用について、その作用機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

【実験動物】

実験には、3 週齢の ddY 系雄性マウス (Shimizu Laboratory Supplies, Kyoto, Japan) を用いた。マウスは透明なケージ (24×17×12 cm) にて、1 ケージあたり 5 匹で食餌として対照飼料 (AIN-



図1. 葉酸欠乏マウスの作製法および実験スケジュール

93G, 葉酸含量 2 mg/kg; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) あるいは葉酸欠乏飼料 (葉酸含量 0.07 mg/kg; Oriental Yeast) を与えて 6 週間飼育し、9 週齢時に各種解析を行った (図 1)。飼育環境は、室温: 23±1°C、照明時間: 1 日 12 時間 (8:00~20:00) とし、水と飼料は自由に摂取させた。また、食糞を防止するために、飼育ケージにステンレス製の網を中敷として用いた。

【強制水泳試験】

円柱形の透明なビーカー (高さ 27 cm、直径 18 cm) に水温 25±1°C の水を深さ 13 cm となるように満たし、その中に試験マウスを入れて水泳させ、6 分間ビデオ録画した。6 分間の水泳のうち、後半 4 分間における無動時間を測定した。

【免疫組織化学染色】

海馬歯状回におけるニューロンの分化・成熟を評価する場合は、解析マウスが 3 週齢時に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 100 mg/kg) を 1 日 2 回 3 日間腹腔内投与した。また、海馬歯状回における細胞増殖を評価する場合は、灌流固定の 24 時間前および 12 時間前に BrdU (100 mg/kg) を腹腔内投与した。9 週齢時に麻酔下で、生理食塩水を心臓から灌流することで脱血した。その後、4%パラホルムアルデヒドを含む phosphate buffered saline (PBS) を灌流して組織を固定し、断頭して脳を採取した。採取した脳は、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS 中で 4°C にて 2 日間インキュベートした後、マイクロスライサー (DTK-1000, Dosaka EM, Kyoto, Japan) を使用して海馬 (ブレグマから後方 1.40 - 2.48 mm) または嗅球 (ブレグマから前方 5.05 - 3.85 mm) を含む厚さ 50 μm の冠状切片を作製した。抗体の非特異的結合を防ぐために、作製した切片を 1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS-T (0.3% Triton-X100 を含む PBS) または 10% donkey serum を含む PBS-T 中で室温にて 1 時間インキュベートした。その後、切片を一次抗体 と 4°C にて一晩反応させ、PBS で切片を洗浄した後、切片を 2 次抗体 と室温にて 2 時間反応させた。なお、一次抗体および二次抗体は、1% BSA を含む PBS-T、3% donkey serum を含む PBS-T または Can Get Signal immunostain Solution B (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて希釈した。核染色には、4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) を使用した。3,3'-diaminobenzidine (DAB) 染色法では、ブロッキング操作の前に切片を 0.3% H₂O₂ を含む PBS 中で室温にて 30 分間インキュベートすることで内因性ペルオキシダーゼを除去した。また、二次抗体反応後に Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) と DAB を用いて陽性細胞を標識した。海馬歯状回または嗅球における各陽性細胞は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) または正立顕微鏡 (BX53, Olympus) と顕微鏡用デジタルカメラ (DP73, Olympus) を用いて検出した。海馬では 4 切片おきに計 6 切片中の

陽性細胞数に 4 を乗じた数を、嗅球では 6 切片おきに計 6 切片中の陽性細胞数に 6 を乗じた数を各マウスの測定値とした。

【Golgi-Cox 染色】

Golgi-Cox 染色には、sliceGolgi Kit (Bioenno Tech, Santa Ana, CA, USA)を用いた。9 週齢時のマウスに麻酔下で、生理食塩水を心臓から灌流することで脱血した。その後、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS を灌流して組織を固定した後、断頭して脳を採取した。採取した脳は、キット付属の Fixative Solution 中で 4°C にて 24 時間インキュベートした後、マイクロスライサー (DTK-1000, Dosaka EM)を使用して海馬 (プレグマから後方 1.40 - 2.48 mm) を含む厚さ 100 μm の冠状切片を作製した。作製した切片をキット付属の Impregnation Solution 中で室温にて 3 日間遮光しながらインキュベートした。切片を PBS で洗浄した後、キット付属の Staining Solution および Post-staining Solution を用いて染色した。その後、正立顕微鏡 (BX53, Olympus) と顕微鏡用デジタルカメラ (DP73, Olympus)を用いて海馬の歯状回領域におけるニューロン、およびニューロンの樹状突起を撮影した。樹状突起の複雑性は、ショールアナリシス法を用い、細胞体を中心とした同心円 (20 μm 間隔) の各円と交わる樹状突起の交点数を計測した。スパインの形態解析では、海馬歯状回におけるニューロンの樹状突起の 10 μm 区間におけるスパイン密度および形態別のスパイン数を計測した。スパインの形態は階層分析法 (Risher *et al.* 2014) を参考に、以下に示す 5 つの形態に分類した; (1) Branchd = 同一のスパイン上に 2 本以上の頭部が存在する、(2) Mushroom = 横幅が 0.6 μm を超える、(3) Filopodia = 縦幅が 2 μm を超える、(4) Thin = 縦:横比率が 1 を超える、(5) Stubby = 縦:横比率が 1 未満。ショールアナリシスでは 3 切片から 10 個のニューロンを、スパイン数の解析では 3 切片から 9 本の樹状突起を無作為に選出して解析を行い、その平均値を各マウスの測定値として解析した。

4. 研究成果

(1) 強制水泳試験に対する葉酸欠乏の影響

葉酸欠乏マウスがうつ様症状を呈するか否かを確認するために、強制水泳試験における無動時間を指標としてうつ様行動を評価した。その結果、葉酸欠乏マウスでは対照マウスと比べて無動時間が有意に増加しており (図 2)、葉酸欠乏によりうつ様行動が誘発されることが明らかになった。本結果から、ヒトの疫学調査結果を実験動物で再現することができる「葉酸欠乏モデルマウス」の作製に成功したものと考え、本マウスを以降の実験に用いた。

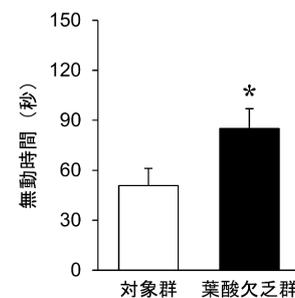


図 2 葉酸欠乏によるうつ様行動の出現
葉酸欠乏マウスでは、対照マウスと比較して強制水泳試験における無動時間の有意な増加が認められた。n=10。* $P < 0.05$ vs. 対照群。

(2) 海馬歯状回における神経新生に対する葉酸欠乏の影響

葉酸欠乏によるうつ様症状誘発メカニズムを解析するにあたり、うつ症状との関連が指摘されている海馬歯状回の神経新生に着目した。免疫組織化学染色により葉酸欠乏マウスの海馬歯状回における神経新生を評価したところ、対照群と比べて葉酸欠乏群では海馬歯

状回における 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 新生細胞マーカー) /NeuN (成熟ニューロンマーカー) 二重陽性細胞数、すなわち新生成熟ニューロンが有意に減少していた (図 3A, B)。また、対照群と比べて葉酸欠乏群では doublecortin (DCX, 未熟ニューロンマーカー) 陽性細胞数が有意に増加していた (図 4A, B)。すなわち、葉酸欠乏下の海馬歯状回では新生成熟ニューロン数は減少しているにもかかわらず、未熟ニューロン数が増加していることが明らかとなった。一方で、海馬歯状回における Ki67 (神経系前駆細胞マーカー) 陽性細胞数や BrdU 投与 24 時間後における BrdU 陽性細胞数に、両群間で有意な差は見られず、葉酸欠乏は海馬歯状回における神経系前駆細胞の増殖には影響を与えないものと考えられた。なお、TdT-mediated dUTP Nick End Labeling 法を用いて細胞死に及ぼす影響を確認したところ、両群間で海馬歯状回の細胞死に顕著な差は観察されなかった。本結果から、葉酸欠乏による新生成熟ニューロン数の減少は、新生未熟ニューロンから新生成熟ニューロンへの成熟過程が抑制されるために生じる可能性が推定された。

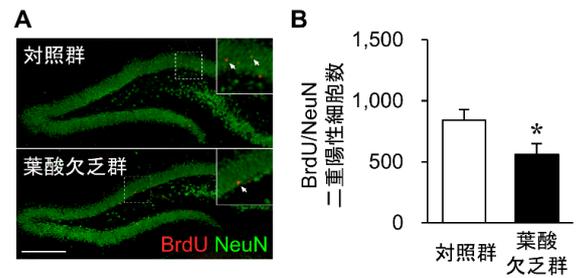


図 3. 葉酸欠乏が海馬歯状回における神経新生に及ぼす影響

葉酸欠乏マウスでは、対照マウスと比べて海馬歯状回における BrdU (3 週齢時に 200 mg/kg/day で 3 日間腹腔内投与)/NeuN 二重陽性細胞数 (新生成熟ニューロン) が有意に減少していた (A: 海馬歯状回における BrdU (赤) および NeuN (緑) の染色像、矢印は BrdU/NeuN 二重陽性細胞を示す。B: BrdU/NeuN 二重陽性細胞数の解析結果)。Scale bar = 200 μ m。n = 5。* P < 0.05 vs. 対照群。

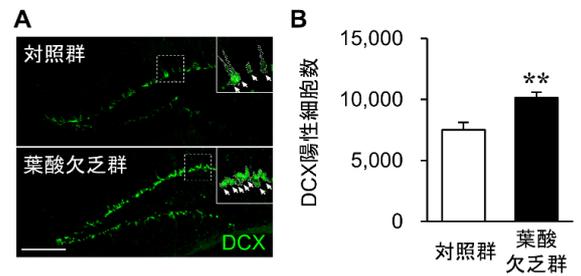


図 4. 葉酸欠乏が海馬歯状回における未熟ニューロン数に及ぼす影響

葉酸欠乏マウスでは、対照マウスと比べて海馬歯状回における DCX 陽性細胞数 (未熟ニューロン) が有意に増加していた (A: 海馬歯状回における DCX (緑) 陽性細胞の染色像、矢印および点線は DCX 陽性細胞を示す。B: DCX 陽性細胞数の解析結果)。Scale bar = 200 μ m。n = 5。** P < 0.01 vs. 対照群。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishida S, Araki R, Baba A, Asari S, Tachibana S, Nakajima Y, Iwakumo A, Yabe T.	4. 巻 143
2. 論文標題 Post-weaning folate deficiency induces a depression-like state via neuronal immaturity of the dentate gyrus in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 97-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田 将治、竹村 凌、橘 新、浅利 颯太、荒木 良太、矢部 武士
2. 発表標題 葉酸欠乏によるうつ症状メカニズムの解析 -神経成熟異常およびエピゲノム変動の関与
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林佑至、榎本太一、板原優、林尚迪、稲富由香、中谷尊史、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 グリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF の発現を誘導する生薬オンジ成分の探索
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橘 新、西田 将治、竹村 凌、浅利 颯太、荒木 良太、矢部 武士
2. 発表標題 葉酸欠乏性の神経成熟異常におけるエピゲノム変動の関与
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 7. 浅利 颯太、西田 将治、竹村 凌、橘 新、荒木 良太、矢部 武士
2. 発表標題 葉酸欠乏性の神経成熟異常における DNA/ヒストンメチル化の関与
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田 将治、竹村 凌、浅利 颯太、橘 新、壺井 美里、中村 吉孝、荒木 良太、矢部 武士
2. 発表標題 葉酸欠乏性の神経成熟異常におけるDNA/ヒストンメチル化の関与
3. 学会等名 第61回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中翔斗、和田梨沙、南園友紀、荒井雄樹、村瀬仁章、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 フェルラ酸のBPSD改善作用に関する基礎的研究
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板原倭、平城陽介、土屋友美、小林佑至、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 漢方薬・天然物由来化合物のセロトニン受容体に対する作用の評価系の構築
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹村凌、西田将治、浅利颯太、橘新、壺井美里、中村吉孝、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 葉酸欠乏により誘発される歯状回の神経成熟異常とうつ様行動におけるDNAメチル化の関連性
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田将治、竹中裕子、原田郁代、竹村凌、浅利颯太、橘新、壺井美里、中村吉孝、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 葉酸欠乏により誘発されるうつ様行動と歯状回における神経細胞の成熟異常
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田梨沙、小松原靖二郎、高橋実友、南園友紀、荒井雄樹、田中翔斗、村瀬仁章、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 精神疾患モデル動物の異常行動に対するフェルラ酸の作用
3. 学会等名 第67回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shoji Nishida, Yuko Takenaka, Ikuyo Harada, Ryo Takemura, Sota Asari, Shin Tachibana, Misato Tsuboi, Yoshitaka Nakamura, Ryota Araki, Takeshi Yabe
2. 発表標題 Folate deficiency-induced depression-like behavior, DNA hypomethylation and abnormal neuronal maturation in mice.
3. 学会等名 第60回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西田将治、竹中裕子、原田郁代、竹村凌、浅利颯太、橘新、壺井美里、中村吉孝、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 葉酸欠乏により誘発されるうつ様行動と海馬における神経細胞の成熟異常
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	荒木 良太 (Araki Ryota) (90710682)	摂南大学・薬学部・講師 (34428)	