

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20K11637

研究課題名(和文)「食と栄養」が脳機能に及ぼす影響－神経新生とエピジェネティクスを指標とした解析－

研究課題名(英文) Effects of Food and Nutrition on Brain Function:

研究代表者

矢部 武士 (Takeshi, Yabe)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期より葉酸欠乏食を6週間摂取したマウスで、うつ様行動の出現、海馬歯状回で神経新生の異常や総メチル化DNA量の減少などが生じることを見出している。本研究では、葉酸欠乏が神経細胞の分化・成熟やDNAメチル化に与える影響をより詳細に検討するために葉酸欠乏条件下で培養した神経系前駆細胞を用いて検討をおこない、*in vitro*実験系においても葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察されたような新生ニューロン成熟異常を再現することができた。さらに葉酸欠乏による新生ニューロンの成熟異常にエピゲノム修飾の異常、特にDNAの低メチル化に起因する神経分化・成熟関連遺伝子群の発現変動が関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、葉酸欠乏による新生ニューロンの成熟異常にエピゲノム修飾の異常、特にDNAの低メチル化に起因する神経分化・成熟関連遺伝子群の発現変動が関与する可能性を見出した。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 examined the effects of low folate on expression and epigenetic modification of genes involved in neuronal differentiation and maturation in primary mouse neural stem/progenitor cells (NSPCs) *in vitro*. An increase in Nestin-positive cells was observed in cells differentiated in a low folate medium for 3 days. An increase in Tuj-1-positive cells and a decrease in MAP2-positive cells were observed in cells differentiated in a low folate medium for 7 days. In these cells, mRNA levels for genes involved in neuronal differentiation and maturation were altered. Hypomethylation of DNA, but not of histone proteins, was also observed at some promoters of these neuronal genes. The level of S-adenosylmethionine (SAM), a methyl donor, was decreased in these cells. The abnormalities in neural maturation and changes in gene expression in culture under low folate conditions were partially normalized by addition of SAM.

研究分野：神経科学

キーワード：葉酸

1. 研究開始当初の背景

【食と脳・精神疾患】

高度ストレス社会とも形容される現代社会では、うつ病や不安障害などの精神疾患が増加しており、医療経済学的視点からもこれらの疾患に対する対策強化は急務とされている。自閉症や ADHD などの発達障害の児童数に関しても、この 10 年で倍以上にも増加しており、大きな社会問題となっている。これらの疾患に対する治療は、抗うつ薬、抗不安薬、抗精神病薬などによる薬物療法が主たるものであるが、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もあり、十分であるとは言い難い。また発達障害の原因は不明な部分が多く残されているものの、家系研究や双生児研究などから、先天的要因だけでなく後天的な環境要因が少なからず関与するものとされている。脳・精神機能の正常な発達が環境的な要因により阻害されると、成人後にうつ病など精神疾患の発症リスクが高まることも指摘されている。一方で、食品に含まれる栄養素の欠乏が脳機能に影響を及ぼすことやある種の食品由来成分の摂取が精神疾患モデル動物の異常行動を改善することなどが報告されており、食事療法が上記の疾患に対する予防・治療の選択肢になりうるものと考えられる。

【うつ病と食品由来成分】

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 Complem 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)。

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ことを主目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔脳由来神経幹細胞の培養

マウス胎仔脳由来神経幹細胞はニューロスフェア法を用いて調製した。

(2) 免疫細胞化学染色

分化させた培養神経幹細胞を 4%パラホルムアルデヒドを含む PBS 中で室温にて 30 分間インキュベートした後、80%メタノールを含む PBS 中で -20°C にて 20 分間インキュベートすることで固定した。抗体の非特異的結合を防ぐために、固定した細胞を 1% BSA 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、細胞を一次抗体と 4°C にて一晩反応させ、PBS で細胞を洗浄した後、二次抗体と室温にて 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 を用いて希釈した。また、核染色には DAPI を使用した。染色した細胞を正立顕微鏡および顕微鏡用デジタルカメラを用いて撮影し、各陽性細胞数を計測した。

(3) 定量的リアルタイム PCR

分化させた培養神経幹細胞から Sepasol-RNA I Super G (Nacalai tesque) を用いて、total RNA を単離した。単離した total RNA (1 µg) を鋳型として ReverTra Ace (Toyobo) を用いて逆転写することで cDNA を合成した。定量的リアルタイム PCR は、THUNDERBIRD qPCR Mix (Toyobo) およびプライマーを用いて Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Takara Bio, Shiga, Japan) にて解析した。なお、各遺伝子の mRNA 発現量は *Gapdh* の mRNA 発現量で補正した。

4. 研究成果

(1) 培養神経幹細胞の分化・成熟に対する葉酸欠乏の影響

in vitro 実験系において、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回におけるニューロンの成熟異常を再現できるかどうかを確認するために、葉酸欠乏培地中で1、3、7日間分化させた培養神経幹細胞における、 β III tubulin (Tuj1, ニューロンマーカー) 陽性細胞数および microtubule-associated protein 2 (MAP2, 成熟ニューロンマーカー) 陽性細胞数を評価した。その結果、分化1日目、3日目では Tuj1 陽性細胞数および MAP2 陽性細胞数に変化は見られなかったが、分化7日間では葉酸欠乏条件下で分化させた細胞において Tuj1 陽性細胞数の有意な増加と MAP2 陽性細胞数の有意な減少が観察された。また、分化1日目、3日目、7日目のいずれにおいても、葉酸欠乏条件は glial fibrillary acidic protein (GFAP, アストロサイトマーカー) 陽性細胞数に影響を及ぼさなかった。なお、DAPIにより染色された核の形態を指標として細胞の生存率を評価したところ、対照条件と葉酸欠乏条件で細胞の生存率に違いはみられなかった。本結果は、葉酸欠乏によりニューロンへの分化が促進される一方で、ニューロンの成熟が抑制されることを示唆しており、*in vitro* 実験系においても、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察されたような新生ニューロン成熟異常を再現することができたものと考えられる。

(2) ニューロン分化・成熟関連遺伝子群の mRNA 発現に対する葉酸欠乏の影響. 神経幹細胞は中枢神経系を構成する主要な細胞種であるニューロンやアストロサイトなどに分化する多分化能を有した細胞である。神経幹細胞は直接成熟したニューロンへと分化するのではなく、神経前駆細胞などの未熟な神経系細胞への分化を経て、段階的に成熟したニューロンへと分化することが知られている。それぞれの分化段階において特異的に発現する遺伝子がいくつか同定されており、これらの遺伝子発現の変動によりニューロンへの分化や成熟が規定されている。そこで、葉酸欠乏がニューロンの分化や成熟に関連する遺伝子の発現変動に及ぼす影響を明らかにするために、本培養系においての各遺伝子の mRNA 発現量を定量的 real-time PCR 法により解析した。その結果、分化1日目では各遺伝子の有意な発現変化は見られなかったものの、分化3日目と分化7日目においては、葉酸欠乏条件により *Pax6*, *Nrsf*, *Bmp4*, *Stat3*, *Hey1* などの神経幹細胞の増殖・維持に関与する遺伝子および *Neurod1*, *Mib1*, *Creb1* などのニューロンの成熟に関与する遺伝子の mRNA 発現量が有意に減少していた。一方で、*Neurog1*, *Eomes* などの神経前駆細胞からニューロンへの分化に関与する遺伝子の mRNA 発現量は、葉酸欠乏条件により有意に増加していた (図 1A-C)。

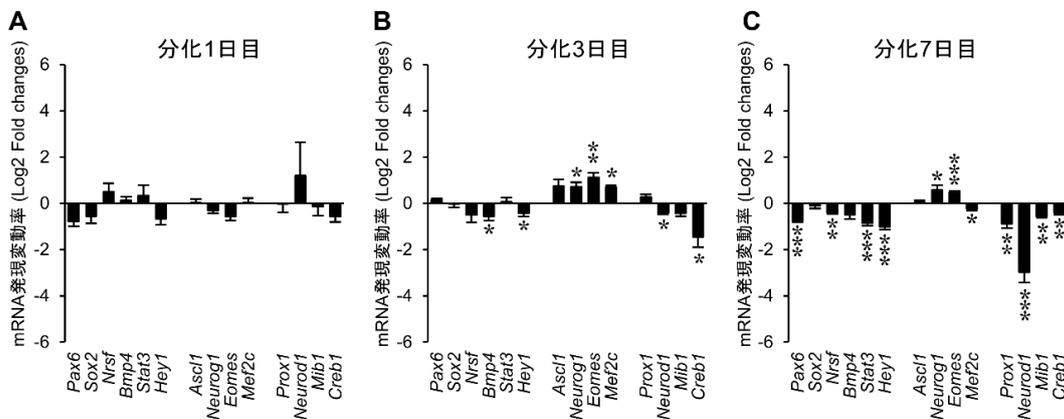


図 1. 葉酸欠乏がニューロン分化・成熟関連遺伝子群の mRNA 発現パターンに及ぼす影響

葉酸欠乏条件下で7日間分化させた細胞では、対照条件下で分化させた細胞と比べて、神経幹細胞の増殖・維持に関与する遺伝子である *Pax6*, *Nrsf*, *Stat3*, *Hey1* およびニューロンの成熟に関与する遺伝子である *Mib1*, *Creb1*, *Neurod1* の mRNA 発現量が有意に減少しており、神経系前駆細胞からニューロンへの分化に関与する遺伝子である *Neurog1*, *Eomes* の mRNA 発現量は有意に増加していた (C)。分化7日目と同様の遺伝子発現パターンの変動は、分化3日目においても認められた (B)。一方で、分化1日目においては葉酸欠乏による有意な遺伝子発現変動は認められなかった (A)。n = 3 (A), 6 (B, C)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 対照群。

(3)ニューロン分化・成熟関連遺伝子群の DNA メチル化およびヒストンメチル化に対する葉酸欠乏の影響

葉酸欠乏によるニューロン分化・成熟関連遺伝子群のエピゲノム修飾について解析を行った。哺乳類における DNA メチル化は、主にシトシン残基の 3' 末端にグアニン残基が隣接する「CpG 部位」と呼ばれる配列のシトシンにおいて観察される。ヒストンのメチル化は、8 量体のコアヒストンを形成するサブユニットである H2A、H2B、H3、H4 の N 末端側であるヒストンテールのリジン残基やアルギニン残基において観察される。この 4 つのヒストンサブユニットのうち、H3 は 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3)、9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3)、27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3)、36 番目のリジンのトリメチル化 (H3K36me3) のように最も多くのメチル化修飾を受けることが知られている。

そこで、葉酸欠乏が全ゲノム中におけるメチル化シトシン量とメチル化 H3 量に及ぼす影響をドットプロット法およびウエスタンブロット法により解析した。その結果、葉酸欠乏条件下で 7 日間分化させた細胞では、全ゲノム中のメチル化シトシン量 (図 2A) および H3K27me3 量 (図 2B) が有意に減少していた。一方で、H3K4me3 量、H3K9me3 量および H3K36me3 量に有意な変動は見られなかった (図 2B)。

DNA のメチル化が生じる CpG 部位はゲノム全体に分布しているものの、その多くが遺伝子の転写開始点付近に集中しており、この CpG 部位が集中する領域を「CpG アイランド」という。一般的に、転写開始点付近の CpG アイランドにおける DNA メチル化は遺伝子の転写を抑制することが知られている。一方で H3 のメチル化は、修飾部位によって遺伝子の転写活性に及ぼす影響が異なる。一般的に、H3K4me3 および H3K36me3 は転写を促進する修飾であり、H3K9me3 および H3K27me3 は転写を抑制する修飾であることが知られている。

そこで、葉酸欠乏によるニューロン分化・成熟関連遺伝子群の発現変動とエピゲノム修飾変動との関連性を評価するために、葉酸欠乏により発現変動が見られた遺伝子において転写開始点付近のメチル化状態およびヒストンメチル化状態を解析した。その結果、神経系前駆細胞からニューロンへの分化に関与する遺伝子である *Neurog1* と *Eomes* では、葉酸欠乏によりメチル化シトシン量が有意に減少しており (図 3)、mRNA 発現変動と DNA メチル化との間に相関性が見られた。また、ニューロンの成熟に関与する遺伝子である *Neurod1* では、葉酸欠乏によりメチル化シトシン量が減少していたものの、mRNA 発現変動と DNA メチル化との間に相関性は見られなかった (図 3)。一方で、葉酸欠乏による H3K4me3 量および H3K27me3 量の変動は、*Neurod1* 以外の遺伝子では認められなかった (図 4)。

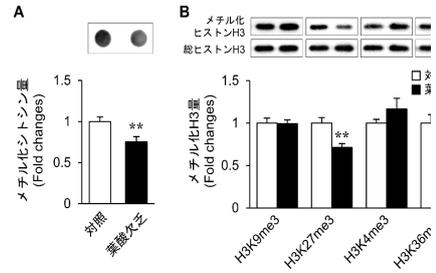


図 2. 葉酸欠乏が DNA メチル化およびヒストンメチル化に及ぼす影響

葉酸欠乏条件下で 7 日間分化させた細胞では、対照条件下で分化させた細胞と比べて全ゲノムにおけるメチル化シトシン量 (A) およびヒストン H3 リジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) 量 (B) が減少していた。一方、ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3) 量、ヒストン H3 リジン 9 トリメチル化 (H3K9me3) 量およびヒストン H3 リジン 36 トリメチル化 (H3K36me3) 量に有意な変動は認められなかった (B)。n = 3 (A), 5-6 (B)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 対照群。

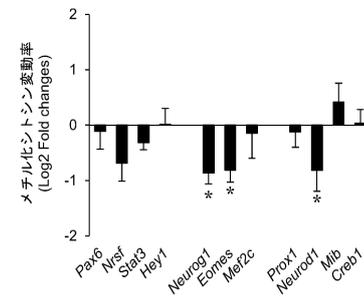


図 3. 葉酸欠乏がニューロン分化・成熟関連遺伝子群の転写開始点付近における CpG アイランドの DNA メチル化に及ぼす影響

葉酸欠乏条件下で 7 日間分化させた細胞では、対照条件下で分化させた細胞と比べて神経系前駆細胞からニューロンへの分化に関与する遺伝子である *Neurog1* と *Eomes*、およびニューロンの成熟に関与する遺伝子である *Neurod1* の転写開始点付近における CpG アイランドのメチル化シトシン量が有意に減少していた。その他のいずれの遺伝子においても、転写開始点付近における CpG アイランドのメチル化シトシン量に有意な変動は認められなかった。n = 9。* $P < 0.05$ vs. 対照群。

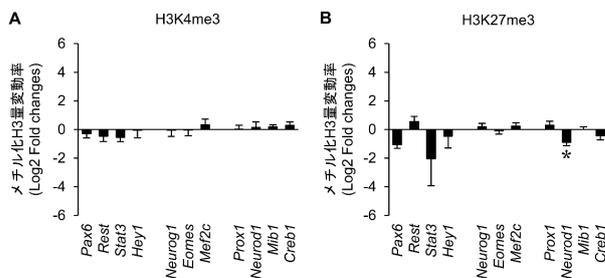


図 4. 葉酸欠乏がニューロン分化・成熟関連遺伝子群の転写開始点付近におけるヒストンメチル化に及ぼす影響

葉酸欠乏条件下で 7 日間分化させた細胞では、対照条件下で分化させた細胞と比べて神経系の成熟に関与する遺伝子である *Neurod1* の転写開始点付近における H3K27me3 量の有意な減少が認められた (B)。その他のいずれの遺伝子においても、転写開始点付近における H3K4me3 量および H3K27me3 量に有意な変動は認められなかった (A, B)。n = 9。* $P < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishida Shoji, Araki Ryota, Baba Akihiro, Asari Sota, Tachibana Shin, Nakajima Yuki, Iwakumo Arimi, Yabe Takeshi	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 Journal of Pharmacological Sciences	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) 10.1016/j.jphs.2020.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Araki Ryota, Yasubuchi Akira, Ikegaya Marina, Hojo Chihiro, Tachioka Hayato, Kawai Kentaro, Omote Masaaki, Kita Ayami, Yabe Takeshi	4. 巻 238
2. 論文標題 Ferulic acid alleviates abnormal behaviors in isolation-reared mice via 5-HT1A receptor partial agonist activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 2147 ~ 2154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00213-021-05839-2	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 該当する
1. 著者名 Araki Ryota, Nishida Shoji, Nakajima Yuki, Iwakumo Arimi, Tachioka Hayato, Kita Ayami, Yabe Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Low folate induces abnormal neuronal maturation and DNA hypomethylation of neuronal differentiation-related genes in cultured mouse neural stem and progenitor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08071 ~ e08071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e08071	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 該当する
1. 著者名 Araki Ryota, Nishida Shoji, Oishi Yui, Tachioka Hayato, Kita Ayami, Yabe Takeshi	4. 巻 485
2. 論文標題 Methyl Donor Supplementation Prevents a Folate Deficiency-induced Depression-like State and Neuronal Immaturity of the Dentate Gyrus in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 12 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2022.01.007	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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・准教授 (34428)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------