

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591491

研究課題名(和文) 精神ストレスに起因するゲノム可変性からみた発達障害の基盤メカニズムの解明

研究課題名(英文) The epigenetic regulation of brain development by maternal stress

研究代表者

平澤 孝枝 (HIRASAWA, Takae)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：10402083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスホルモンのコルチゾールは脳の標的器官である海馬と視床下部に発現しているGR受容体を介して脳機能のシグナル伝達に影響を及ぼす。本研究ではマウス海馬神経細胞を用いてGR受容体を介し神経細胞の活性化を促進し、NMDA受容体の一つのNR2Aの翻訳を促進していることが分かった。またマウス母子分離ストレスによる海馬組織のGRの発現量はmRNAで変化はなかったがタンパク質の著しい低下がみられた。このことからストレスによる急性の神経細胞の活性化と慢性的な神経活動の低下は前者がGRを介した神経活動、及び活性化タンパクの発現促進であるのに対して後者はGRそのものの発現低下に起因することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cortisol as a stress hormone affects brain function through the GR receptor in hippocampus and hypothalamus. In this study, we evaluated the activation mechanism through GR receptor in mouse hippocampal neurons using Ca<sup>2+</sup> imaging method. The results suggested that corticosterone effect to the up-regulation of translation of NR2A, one of the NMDA receptor subunit. And this phenomenon could reappear by D-serine, a NR2A specific agonist. Moreover, in mouse maternal separation stress experiment, although the mRNA expression of GR was changeless in hippocampus, protein expression of GR was remarkable decreased. these results suggested that corticosterone have regulate the synaptic transmission and GR expression in immature stage.

研究分野：医学薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：脳 ストレス 母子分離

1. 研究開始当初の背景

幼児期のストレスがその後の脳機能形成に影響を与える事が示唆されているがそのメカニズムについては未だ不明な点が多い。生体では環境や栄養等の微妙な変化をストレスと感じるが恒常性を維持するためのストレス対応機構は HPA 経路(視床下部 下垂体 副腎経路)が重要な役割を担っておりストレスに対応する受容体である GR 遺伝子の発現量がその後のストレス耐性を決定している。2004 年に母親マウスの子育て具合の差によって子マウスの GR 受容体の遺伝子がメチル化を受け発現が調節されている報告が報告されてから環境 遺伝子の応答制御機構が科学的に証明されつつある。一方で、脳機能発達も生まれ持っているものではなく、生後の発達の中で神経回路形成が行われており、記憶や学習に必要なグルタミン酸受容体の発現変化や活性化シナプス形成は環境刺激やストレスによって変化することが報告されている。このストレス耐性機能の獲得と脳の機能獲得が行われる時期は同じ成長の中の時間軸で構築されている。したがって HPA 経路の未発達な時期、すなわち乳幼児期のストレスはその後の脳機能形成に影響を与えると考えられる。また、その調節にはストレスという環境因子と遺伝子の後天的な制御機構の相互作用が関係していることが推察されるが不明である。研究代表者はストレス耐性機能獲得と脳発達形成は密接に関与しており幼児期のストレスによる脳機能形成異常が DNA のメチル化やクロマチン修飾等の遺伝子発現制御を介するものであるという考えに至り、エピジェネティックな調節と脳のストレス制御機構の解明研究の施行という着想に至った。

2. 研究の目的

ストレスに反応し副腎より放出されるストレスホルモンであるコルチゾールは脳においては標的器官である海馬と視床下部に発現している GR 受容体を介して脳機能のシグナル伝達に影響を及ぼす。ストレスホルモンが GR 受容体を介し神経細胞の活性化を促進し、またストレスが GR 遺伝子のメチル化を促進することが分かっているがその遺伝子制御と反応との関連性が分かっていない。平成 23 年度は「ストレスホルモンの神経細胞におけるシグナル伝達調節作用」、平成 24 年度は「ストレス誘導性神経機能調節分子の発現変動と DNA 修飾作用の解析」、平成 25 年度は「ストレス負荷マウスにおける海馬神経機能の変化とストレス耐性機能の獲得の関連性」を到達目標として研究遂行を行う。幼児期のストレスがその後の成熟した脳機能に与える影響を、ストレスホルモンに反応するグルココルチコイド受容体遺伝子(以下 GR 遺伝子)のメチル化やヒストン蛋白の修飾という遺伝子の可塑性から検討し、脳機能形成がストレスという環境因子に

よって変化しうる事を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)「ストレスホルモンの神経細胞におけるシグナル伝達調節作用」: ストレスホルモンの標的組織である海馬組織のストレスホルモンに対する作用と活性化メカニズムの詳細を明らかにする。具体的にはストレスホルモンは神経細胞において興奮性の活性化を促進すると予想されるがその活性化経路とどの受容体を介しているのかということ明らかにする。

(2) ストレス負荷マウスにおける海馬神経機能の変化とストレス耐性機能の獲得の関連性: 新生児ストレス負荷マウスの脳スライスを作製し関連する分子の発現や神経機能の変化を解析、測定する。

4. 研究成果

(1) 機能的メカニズムの解明・・・これまでにマウス海馬培養神経細胞にストレスホルモンであるコルチコステロンを投与すると神経細胞の自発的細胞内カルシウムスパイク、同期現象の増加が見られ神経活動の興奮性が活性化する事が分かった。細胞内カルシウムイメージング法を用いてこのメカニズムを検証した結果、以下の事が本研究で示された。コルチコステロン刺激による同期現象の活性化は NMDA 受容体、AMPA 受容体を介した細胞外カルシウムイオンの流入によるものである。細胞内のストアからの流出作用はなかった。膜非透過性のコルチコステロン (cor-BSA) で同様の現象が確認され、またグルココルチコイドの賦活剤であるデキサメタゾンによって同様の活性化が認められた。したがって、この作用は膜型のグルココルチコイド受容体を介した作用である。

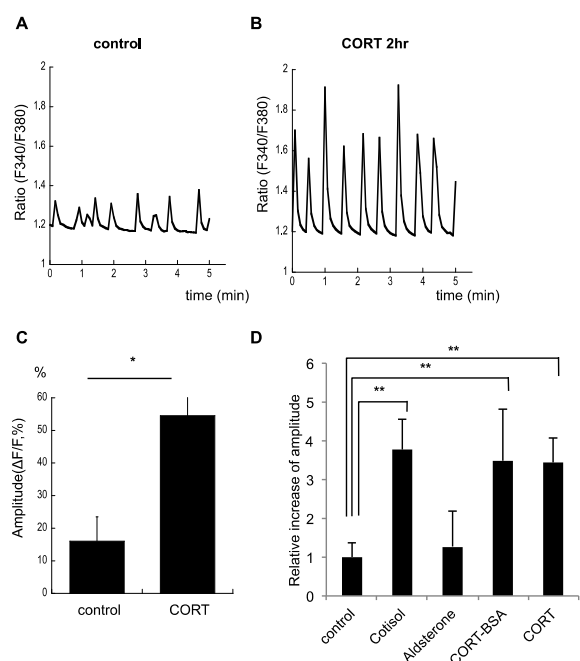


図1 マウス海馬神経細胞のコルチコステロン刺激による神経活動の変化

(2) 遺伝学的調節機構の解明・・・発火現象が増幅したメカニズムを本年度は mRNA と蛋白レベルを real time-PCR 法とウェスタンブロッティング法で確認した。その結果 NMDA 受容体の NR2A サブユニットの蛋白レベルがコルチコステロン刺激によって増加した。一方で mRNA は刺激によって変化はみられなかった。翻訳阻害剤であるシクロヘキサミド処理によってこの反応は抑制された。従って、NMDA 受容体の翻訳亢進が示唆された。一方で AMPA 受容体や NR1 など他のサブユニットの変化は見られなかった。一方で抑制性の GABA 受容体の一つである GABA<sub>A</sub> 受容体についてはコルチコステロン刺激で増加が見られた。このように興奮性と抑制性で転写や翻訳のスピードや制御機構を使い分ける事が示唆された。さらに NR2A の翻訳促進がコルチコステロン刺激によるカルシウムオシレーションの同期性の増加に特異的に関与しているのかを調べるために NR2A の特異的アゴニストである D-serine を処理しオシレーションを調べたところコルチコステロン刺激によるオシレーションと同等の増幅率と周期性をもった。このことからコルチコステロン刺激による細胞外カルシウム流入による同期性の増加は膜型 GR を介した NR2A の翻訳促進によるものであることが結論づけられた。

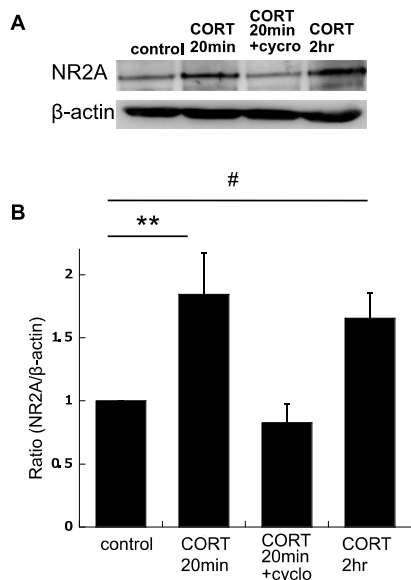


図2 コルチコステロンによる NR2A の翻訳促進

(3) 「ストレス誘導性神経機能調節分子の発現変動と DNA 修飾作用の解析」を目的に幼若期ストレスによって変動する様々な遺伝子の把握とエピジェネティクス修飾作用について検討した。実験方法として幼若期ストレスを負荷したマウスの脳の GR の発現変化や DNA のメチル化状態、および網羅的に発現

変動する遺伝子の特定を行った。生後 1 日より母子分離ストレスを 14 日間負荷されたマウスは生後の GR の発現量が著しく低下する事が分かった。しかしながら、バイサルファイトシークエンスによるメチル化状態を確認した所、大きな変動は見られなかった。一方で DNA メチル化アレイ解析により網羅的に解析した所、生後 30 日齢において母子分離群で高メチルであったもの 76 遺伝子、低メチルであったもの 46 遺伝子が見つかった。またこれまでに発達の過程で重要な遺伝子やグルココルチコイドによって誘導される炎症反応に関連する遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で mRNA 量を調べた所これらの遺伝子の発現量が低下していた。今後これらの遺伝子の調節機構を解明することで環境要因、特にストレスに対する遺伝子のエピジェネティック調節メカニズムについて解明する。

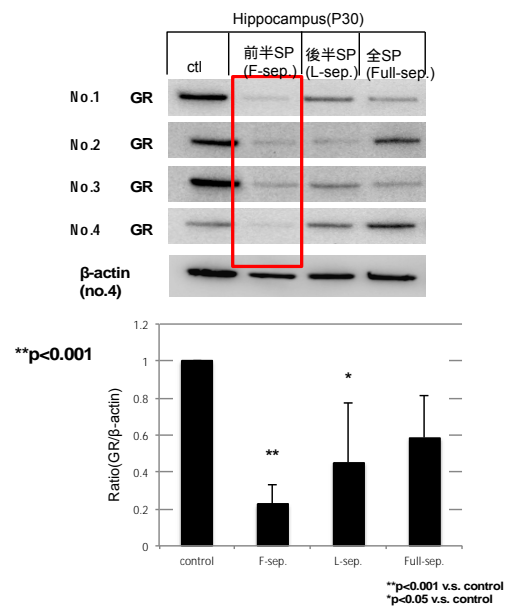


図3 幼若期ストレスによる GR の発現変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto YI, Andoh T, Kurosawa H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of Genomic and Epigenomic Expression in Monozygotic Twins Discordant for Rett Syndrome. PLoS One. 8(6):e66729, doi:10.1371/journal.pone.0066729, 2013

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. The role of epigenetics in Rett syndrome.

Epigenomics 5(5), 1-10, 2013

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetics in Neurodevelopmental and Mental Disorders. Med Epigenet. 1: 52-59, DOI: 10.1159/000354718, 2013

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. Clin Epigenetics. 4(1):1, DOI: 10.1186/1868-7083-4-1, 2012

Miyake K, Hirasawa T, Koide T, Kubota T. Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. Adv Exp Med Biol. 724, 91-98, 2012

Miyake K#, Hirasawa T#, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakawaga T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. (# Equal contribution) The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. BMC Neurosci 12(81), doi: 10.1186/1471-2202-12-81, 2011

自閉症とエピジェネティクス 平澤孝枝 久保田健夫 分子精神医学 11(10), 27-32, 2011

〔学会発表〕(計8件)

久保田健夫 平澤孝枝 妊婦の低栄養と胎児のエピジェネティクス変化 第35回日本臨床栄養学会 京都(2013. 10.5)

Nguyen An Nghia, Takae Hirasawa, Schuichi Koizumi, Takeo Kubota. A new evidence of the effect of imipramine for NMDA receptors; there are two opposite effects of imipramine for neurotransmitters. Neuro2013 (第36回日本神経科学学会)神戸 7.22, 2013

前山弘樹・田原佑里子・小幡千枝・望月和樹・平澤孝枝・久保田健夫 妊娠期母体精神ストレスに起因する11β-HSD1発現上昇と肝脂質代謝異常 第2回日本DOHaD研究会 東京 6.9, 2013

平澤孝枝・田原佑里子・石田哲史・小幡千枝・久保田健夫 幼若期、胎生期の環境変化によって惹起される生活習慣病に関わる遺伝子発現調節機構の解明 第35回日本分子生物学会 福岡 12.11, 2012

平澤孝枝 動物モデルからみた発達障害の発症病態 環境ストレスと脳機能 第54回日本小児神経学会総会 北海道 5.19, 2012 (招待講演)

平澤孝枝・石田哲史・田原佑里子・三宅邦夫・久保田健夫 母子分離ストレスによるマウス脳海馬領域グルココルチコイド受容体の発現変化 第6回日本エピジェネティクス研究会 東京 5.14, 2012

T. Hirasawa, K. Miyake, T. Kubota. The role of MeCP2 in neurodevelopmental

disorder. Neuro2011, Yokohama, 9. 15. 2011

T. Hirasawa, A Endo, K. Miyake, S. Koizumi, T. Kubota. Corticosterone facilitates the synchronized calcium oscillation in hippocampal neurons. 23th Biennial Meeting, International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry. Athens, Greece, 8. 28. 2011.

〔図書〕(計1件)

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Chapter: Epigenetic modifications: genetic basis of environmental stress response. In "DNA Replication /Book 1. Intech (Open Access Publisher), 2011 (ISBN 978-953-307-259-3).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.epigenetmed.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平澤 孝枝 (HIRASAWA Takae)

山梨大学大学院医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：10402083

### (2) 研究分担者

久保田 健夫 (KUBOTA Takeo)

山梨大学大学院医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：70293511