

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593031

研究課題名(和文) 幼少期ストレスが発達期脳神経細胞の転写・翻訳制御に及ぼす影響 - 自閉症との関連 -

研究課題名(英文) Effects of early life stress on transcription or translation of developmental brain nerve cells

研究代表者

光畑 智恵子(Mitsuhashi, Chieko)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：10335664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症を含む発達障害の発症機序は多くの研究が進められているが、未だ明らかではない。本研究の目的は幼若期のストレスが出生後のepigeneticな遺伝子制御に影響し、発達障害の発症への関連の可能性を明らかにすることである。

幼若期ストレスとして出生早期の母子分離を2種類の分離期間により行い、ストレスの大きさと血中コルチコステロン値の関連を調べた。出生後6週間、3ヶ月後で両ストレス群間に明らかな差は認められなかった。ストレスにより起こる変化についてGR以外にもエピジェネティックな制御の可能性を探索するためにDNAメチル化解析並びにマイクロアレイを行ったが明らかなターゲット遺伝子の抽出はできなかった。

研究成果の概要(英文)：It is not clear about mechanism of pathogenic mechanism of mental disorder including autism. The purpose of this study is to elucidate the relation between early stress exposure and epigenetic gene regulations in the brain. It is also another purpose to explore the possibility that these epigenetic gene regulations exert influence to growth of brain development. There are some reports that early life events can induce long lasting changes in physiology and behavior. We chose Mother infant separation as early life stress. This separation starts from one day after birth for one week or two weeks. Corticosteron in the blood was measured. There was no significant difference between two groups. After this, we started another separation and total RNA samples of mesencephalon were prepared in seventh day after birth. New target genes were explored with DNA methylation and micro array. We did not get unique target genes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯科

キーワード：発達 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症の原因究明は進められているが未だ明らかではなく、遺伝的背景、ストレスなどの環境要因を含めた多因子の関わりが予想されている。自閉性を示す Rett 症候群において、methyl CpG-binding protein 2 (MeCP2) が責任遺伝子として同定された。MeCP2 はメチル化により制御されている遺伝子の表出をコントロールする複合タンパク質である。自閉症と MeCP2 変異との関連について調査され、MeCP2 の coding region の変異は自閉症の易罹患性に関係しないと結論づけられた (Beyer et al., Hum.Genet., 111:305-309, 2002)。思春期以降に高発する統合失調症や気分障害のような精神疾患に対して幼少期のストレスを成因とする神経発達障害説があるが、幼若期ストレス (early-life stress, ELS) 暴露マウスにおいてストレス応答としてバソプレッシン mRNA の発現が増加した。これは enhancer 領域の CpG アイランドで DNA メチル化の減少に伴う MeCP2 の transcriptional depression が起こらなかったことによる現象で、この DNA メチル化の減少状態は増齢しても続く (図 1)。ELS マウスの成長後の行動特性として記憶障害や抑うつ状態等が報告され (Murgatroyd, Nat. Neurosci., 12:1559-1566, 2009)、ストレスによる機能的な変化が長期に影響することが示されたが、DNA メチル化の減少機序ならびにその継続については明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

自閉症を含む発達障害の発症機序は未だ明らかではない。本研究では幼若期のストレスとして出生早期に母子分離を行うことにより、このストレスが MeCP2 や新規の遺伝子

の転写・翻訳制御機構に影響して脳の発生、発育過程で正常な神経細胞の分化や移動を妨害し、正常な脳内ネットワークの構築を阻害し、その結果、発達障害やストレス脆弱性をもたらす可能性についてマウスを使って検討する。

## 3. 研究の方法

### 実験 1 血中コルチコステロン測定

幼若期ストレス付加としての母子分離のストレス度を明らかにするために、分離時期を P1-7、P5-12 の 2 期間、1 日 3 時間の分離を行い、非分離群をコントロール群とし、3 群の作成を行なった。出生後 6 週間、3 ヶ月後、1 年後に血中コルチコステロン測定を行なった。3 か月後、1 年後には新規気ストレスとしてオープンフィールドでの 1 時間のストレス暴露時に活動量を測定し、また前後でコルチコステロン測定を行った。血液採取は尾静脈より行い、コルチコステロン値は ELISA を使用して得た。

### 実験 2 脳内バソプレッシン濃度測定

脳内バソプレッシン濃度測定のため、各測定時にマウスを左心室生理食塩水還流により脱血し、脳を摘出後、Trizol を用いて total RNA の抽出を行った。Housekeeping gene として Gapdh を用い、アルギニンバソプレッシンの RT-PCR、qPCR を行った。

### 実験 3 脳内コルチコステロン並びにセロトニン濃度測定

脳内コルチコステロンは上記の ELISA を用い、脳内セロトニンは EIAs serotonin kit を用いて濃度の測定を行なった。分離後 3 か月後及び 1 年度のコントロール群ならびに分離群 (P1-7) のマウスを左心室生理食塩水

還流により脱血し、脳を摘出後ホモジネートし、さらに超音波破碎し、その後ろ過フィルターでろ過し、遠心分離した。得られた上清を用いてコルチコステロン、セロトニン濃度を測定した。

#### 実験4 新規関連遺伝子の探索

早期母子分離後、コントロール群並びに P1-7 分離群を用いて、脳を摘出(小脳領域を除く)し、Trizol を用いて total RNA の抽出を行った。分離群-コントロール群で DNA メチル化ならびにマイクロアレイを用いてストレス応答に関連する遺伝子の探索を行った。

#### 4. 研究成果

幼若期ストレスが epigenetic な遺伝子制御へ及ぼす影響に関して、幼若期ストレスとして出生早期の母子分離を 2 種類の分離期間により行うことにより、ストレスの大きさと血中コルチコステロン値の関連を調べた(図 1)。

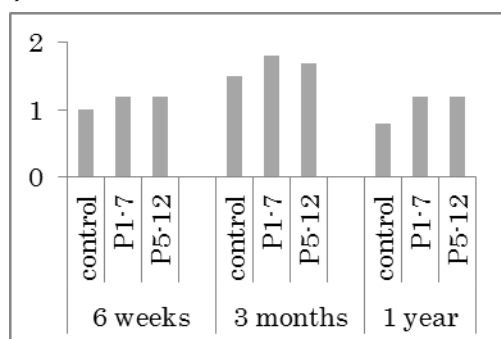


図1 血中コルチコステロン濃度

出生後6週間、3ヶ月後、1年後で両ストレス群間に明らかな差は認められなかった。また、同時に脳内コルチコイド、脳内バソプレッシンに関する測定を行ったが、両群間に明らかな差は認められなかった。

P1-7、P5-12 群間に差がなかったことからコントロール群と P1-7 群を用いて新規ストレスとしてオープンフィールドでの活動量並びにその前後で血中コルチコステロンを調べたところストレス群により活動性が上がっており、ストレス群ではコルチコステロ

ンもストレス付加でより増加していた。

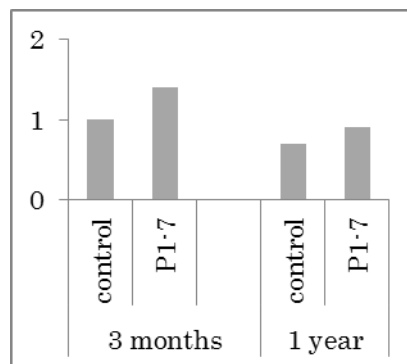


図2 活動量

そこで両群間の違いにストレス・不安が関係している可能性を明らかにするために脳内のセロトニン濃度の測定を行ったが、両群間に明らかな差は認められなかった。

ストレスにより起こる変化について GR 以外にもエピジェネティックな制御の可能性を探索するために早期母子分離直後のマウスから抽出した total RNA を用いて DNA メチル化解析並びにマイクロアレイを行ったが、明らかなターゲット遺伝子の抽出はできなかった。しかし、表現形として3か月齢マウスの行動において、ストレス群により行動 activity が上昇している傾向が認められたため、今後中脳領域を中心にさらに探索を続けていきたいと考えている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

光畑智恵子 (Mitsuhata Chieko)  
広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：10178212

##### (2) 研究分担者

香西克之 (Kozai Katsuyuki)  
広島大学大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：10178212

森田克也 (Morita Katsuya)  
広島文化学園大学看護学部・教授  
研究者番号：10116684

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：