

目次

	頁
序論	1
第1章 葉酸欠乏マウスで出現する行動異常、および海馬歯状回での神経新生異常の解析	3
実験方法	4
実験結果	
1-1. 葉酸欠乏飼料の摂取が血清葉酸濃度および体重に及ぼす影響	9
1-2. 精神機能、空間記憶および運動機能に対する葉酸欠乏の影響	
1-2-1. 強制水泳試験に対する葉酸欠乏の影響	10
1-2-2. 高架式十字迷路試験、社会性相互作用試験、およびバーンズ迷路試験に対する葉酸欠乏の影響	11
1-2-3. 自発運動量測定およびロータロッド試験に対する葉酸欠乏の影響	12
1-3. 血液成分に対する葉酸欠乏の影響	13
1-4. 視床下部-下垂体-副腎系ストレス応答に対する葉酸欠乏の影響	14
1-5. 成体脳における神経新生に対する葉酸欠乏の影響	
1-5-1. 海馬歯状回における神経新生に対する葉酸欠乏の影響	15
1-5-2. 側脳室周囲-嗅球における神経新生に対する葉酸欠乏の影響	17
1-6. 海馬歯状回ニューロンの樹状突起およびスパインの形態に対する葉酸欠乏の影響	18
1-7. ストレス負荷時における海馬歯状回の神経活動に対する葉酸欠乏の影響	21
考察	22
第2章 葉酸欠乏下の培養神経幹細胞における遺伝子発現、およびエピゲノム修飾解析	24
実験方法	26
実験結果	
2-1. 培養神経幹細胞の分化・成熟に対する葉酸欠乏の影響	32
2-2. ニューロン分化・成熟関連遺伝子群の mRNA 発現量に対する葉酸欠乏の影響	34
2-3. 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	36
考察	39
第3章 葉酸欠乏マウスで観察される異常に対するメチル基供与体の作用	40
実験方法	41
実験結果	
3-1. 葉酸欠乏下の海馬歯状回における神経新生異常に対する S-アデノシルメチオニンの作用	43

	頁
3-2. 葉酸欠乏下の海馬歯状回ニューロンの樹状突起およびスパインの形態学的異常に対する S-アデノシルメチオニンの作用	45
3-3. 葉酸欠乏下の海馬歯状回における神経活動低下に対する S-アデノシルメチオニンの作用	47
3-4. 葉酸欠乏下の海馬歯状回におけるニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動に対する S-アデノシルメチオニンの作用	48
3-5. 葉酸欠乏性うつ様行動に対する S-アデノシルメチオニンの作用	50
考察	51
総括	52
謝辞	53
引用文献	54

序論

うつ病は気分障害に分類される精神疾患であり、精神機能の障害に伴う著しい精神的苦痛や社会的機能低下をもたらす慢性疾患である。厚生労働省が実施している「患者調査」によると、本邦におけるうつ病患者数は、1999年には44.1万人であったのに対して2017年には127.6万人にもものぼり、近年、うつ病患者数は急激に増加していることがうかがえる(1)。2013年から2015年にかけて行われた大規模疫学調査では、本邦におけるうつ病の生涯有病率は5.7%との報告がなされており(2)、現代社会においてうつ病は決して稀な病気とは言えない。また2018年における自殺者のうち、うつ病を動機としたものが約20%と最上位を占めており(3)、うつ病が患者本人に及ぼす苦痛は計り知れない。こうしたうつ病による本邦の経済損失額は、年間約2.7兆円にのぼるとの推計結果を厚生労働省が公表しており、うつ病は患者本人のみならず、社会にも大きな影響を与えているものと考えられる。また、世界保健機構の報告によると、世界におけるうつ病患者数が2015年時点で世界人口の約4.4%に相当する3.22億人にもものぼり(4)、近年のうつ病患者の急増は本邦に限らず、世界的にも重大な社会問題であることが指摘されている。

現代医療におけるうつ病治療の主軸の一つが、抗うつ薬を使用した薬物療法である。一般的に「うつ病は薬により治療可能」と認識されており、実際に薬物療法は一定の治療効果を示している。しかしながら、抗うつ薬のみでは改善作用が見られない患者や副作用が認められる患者が多数存在することから、既存の薬物療法だけでは十分でないことがうかがえる。このように十分なうつ病治療が実現しない要因の一つに、うつ病の詳細な発症機序は未だ不明であることが挙げられる。現状として、臨床現場で用いられる抗うつ薬がうつ病の分子基盤に則して治療効果を発揮しているかは不明である。すなわち、より良いうつ病治療の実現には、うつ病の発症や治療における詳細な分子機序を解明する必要がある。

これまでの家系研究や双生児研究などから、うつ病には遺伝性が認められてきた。特に2003年のヒトゲノム解読以降は、うつ病の原因遺伝子を同定することを目的に、うつ病のゲノムワイド関連解析が盛んに行われた。しかしながら、遺伝的要因のみでうつ病の発症を十分に説明できるには至っておらず、うつ病の発症には遺伝的要因以外の要因、すなわち環境要因の寄与が大きく、無視することはできないものと考えられる。

うつ病発症に関与する環境要因としては、外部環境に伴う精神的・身体的ストレスがよく知られているが、近年、メタボリック症候群がうつ病の発症リスクを約2倍に高めること(5)やうつ病患者では血中ビタミン量や不飽和脂肪酸量が低いことが報告されるなど(6)、環境要因の一つである食・栄養がうつ病の発症に関与することが示唆されている。なかでも葉酸は、体内量とうつ症状との間に高い相関性が認められる栄養素として知られている。ビタミンB群に分類される水溶性ビタミンの一つである葉酸は、生体内において種々の葉酸代謝産物へ変換されることでDNAのメチル化などの一炭素転移反応に関与する栄養素であ

る (7)。ヒトやげっ歯類を含む哺乳類は体内で葉酸を合成することができないため、食物などから葉酸を摂取することが必須とされている。本邦における葉酸の推奨摂取量は 240 μg /日に設定されており (8)、1人あたりの葉酸摂取量は 281 μg /日と多くの国民が推奨摂取量を満たしている (9)。しかしながら、アルコールの多量摂取による葉酸の吸収障害や、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の先天的変異による葉酸の利用障害などが原因となり、推奨摂取量以上の葉酸を摂取していても葉酸欠乏症が生じる場合がある。葉酸欠乏症は、成体において貧血症を引き起こすことや、がん疾患や心血管疾患などの発症に関与することが報告されている (10, 11)。また、妊娠期における母体の葉酸欠乏症が胎児の二分脊椎症を含む神経管閉鎖障害や先天性心疾患の発症リスクを高めることが報告されており、胎児期における葉酸欠乏は末梢組織のみならず中枢神経系にも影響を及ぼすことが知られている (12, 13)。一方で、うつ病患者の血中葉酸量が健常者と比べて減少していることも報告されており、葉酸欠乏がうつ病の危険因子となる可能性が示されている (14-20)。臨床研究においては、血清葉酸濃度が低いうつ病患者では抗うつ薬が改善作用を示し難いこと (21) や抗うつ薬と葉酸の併用がうつ病患者に対する治療効果を増強すること (22) が報告されている。以上の知見から、適切な体内葉酸量を保つことが、うつ病の予防や治療に有用となる可能性を示唆するものと考えられる。これまでに、葉酸欠乏によるうつ症状の発症機序として、体内ホモシステイン量の増加 (23) やセロトニン合成の低下 (24) などが関与する可能性が提唱されているものの、葉酸欠乏が出生後の脳・神経系に及ぼす影響の詳細は未だ明らかとなっていない。

以上の背景を踏まえて本研究では、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序の解明を目的に、葉酸欠乏性うつ症状を呈するマウスを作製し、海馬歯状回における神経新生の評価、ニューロンの形態学的解析および機能的解析を行った。また、マウス胎仔脳より調製した培養神経幹細胞を用いて、葉酸欠乏条件下での遺伝子発現解析およびエピゲノム解析を行った。さらに、葉酸欠乏マウスで観察される異常に対するメチル基供与体および抗うつ薬の作用について解析を行った。

第1章 葉酸欠乏マウスで出現する行動異常、および海馬歯状回での神経新生異常の解析

うつ病の発症には様々な脳領域の機能異常が関与するものとされており、その一つとして大脳辺縁系の一部である海馬歯状回が知られている。海馬歯状回は学習や記憶、ストレス応答に関与する脳領域である。これまでに死後脳研究から、うつ病患者では海馬歯状回の容積やニューロン数が減少していること (25-27)、抗うつ薬による治療を受けたうつ病患者では海馬歯状回の容積やニューロン数の減少が見られないこと報告されていることや (27-29)、臨床症状としてうつ病患者の一部では認知機能障害が認められることから、海馬歯状回の機能異常がうつ病態の形成に関与することが示唆されている。

一般的に成体脳では、新たにニューロンが産生されることはないと考えられてきた。しかしながら、成体においても海馬歯状回や側脳室周囲のような一部の脳領域では、神経幹細胞/神経前駆細胞のような自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞が存在しており、新たなニューロンが生み出される現象、いわゆる神経新生が観察されることが知られている。とりわけ海馬歯状回における新生ニューロンは、成熟した後に海馬神経回路網へ機能的に組み込まれることでストレスに対する正常な行動応答の一端を担うことが知られている (30, 31)。また、うつ病モデルとされる慢性ストレス負荷マウスにおいて海馬歯状回の神経新生が減少することや、抗うつ薬の投与によりストレス負荷による神経新生の減少が改善されることが報告されていることから (32, 33)、海馬歯状回の神経新生はうつ病の病態や抗うつ薬の薬効発現に重要な役割を果たすものと考えられる

そこで本章では、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序を解明することを目的として、体内葉酸量を減少させた「葉酸欠乏マウス」を作製し、生化学的解析により血清葉酸濃度および血液成分を、行動学的解析により精神機能、空間記憶、運動機能を評価した。また、本マウスを用いて、うつ症状との関連が指摘されている脳領域である海馬歯状回に着目し、免疫組織化学染色およびゴルジ染色により神経新生の評価、ニューロンの形態学的解析および機能的解析を行った。

実験方法

1-1. 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-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。動物実験は、「摂南大学動物実験に関する規定」に準拠して倫理的に行った。



図 1. 葉酸欠乏マウスの作製法および実験スケジュール

1-2. 血清葉酸濃度の測定

9 週齢のマウスを麻酔下で開腹し、心臓から血液を採取した。採取した血液サンプルは 4°C で一晩静置した後、4°C、2,000 ×g にて 10 分間遠心することで血清を分離した。血清葉酸濃度の測定は、日研ザイル株式会社 日本老化制御研究所 (Shizuoka, Japan) に委託した。

1-3. 血液成分の測定

9 週齢のマウスを麻酔下で開腹し、心臓から血液を採取した後、直ちにエチレンジアミン四酢酸 (10 mg/ml) を入れ、全血サンプルとした。白血球数、赤血球数、血色素量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC)、血小板数の測定は、Oriental Yeast に委託した。

1-4. 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 とするよう満たし、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。

1-5. 社会性相互作用試験

試験マウスおよび新奇マウス (別ケージで飼育した 9 週齢の ddY 系雄性マウス) を透明なケージ (24×17×12 cm) に入れ、20 分間ビデオ録画した。試験マウスが新奇マウスに対する嗅覚行動および毛繕い行動に費やした時間を社会性行動時間として測定した。

1-6. 高架式十字迷路試験

試験には、2 本のオープンアーム (26.5×6 cm)、および高さ 15 cm の板で囲われた 2 本のクローズドアーム (27.5×6 cm) からなる高架式十字迷路 (高さ 40 cm) を用いた。試験マウスを頭部がオープンアームに向くように迷路の中心に置き、5 分間迷路内を自由に探索させた。ANY-maze video tracking software (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) を用いて、オープンアーム滞在時間およびクローズドアーム滞在時間を測定した。

1-7. バーンズ迷路試験

試験には、外周に 20 個の穴 (直径 5 cm) がある円盤状のテーブル (直径 91 cm) を用いた。試験マウスに対して、1 日 3 回 5 日間のトレーニングと、トレーニング最終日の翌日に 3 分間のプローブテストを行った。トレーニングでは、テーブルの 20 個の穴のうちターゲットとして 1 つの穴に逃避箱を、テーブルの四方に視覚的情報を設置した状態で、試験マウスにテーブル上を探索させることでターゲットの位置を学習させた。プローブテストでは、ターゲットの穴を閉じた状態で、試験マウスに 3 分間テーブル上を探索させ、ターゲットおよびその他の穴の上に滞在した時間を測定した。

1-8. 自発運動量の測定

マウスを測定用ケージ (30×30×30 cm³) に入れ、30 分間の移動距離を ANY-maze video tracking software (Stoelting) を用いて測定した。

1-9. ロータロッド試験

試験には、ロータロッド装置 (Neuroscience, Tokyo, Japan) を用いた。試験マウスを 2 rpm で回転させたロッド (直径 3.2 cm) に置き、ロッドから落下するまでの時間 (最大 300 秒) を測定した。試験はマウス 1 匹あたり 30 分間隔で計 2 回行い、その平均値を各マウスの測定値とした。

1-10. 血清コルチコステロン濃度の測定

10:00 から 11:00 の間に試験マウスに対して 15 分間の強制水泳ストレス負荷またはデキサメタゾン (dexamethazone; DEX, 100 μg/kg) の腹腔内投与を行い、ストレス負荷の 30 分後、または DEX 投与の 6 時間後に頸椎脱臼を行うことでマウスを安楽死させ、直ちに心臓から

血液を採取した。採取した血液を室温で 30 分静置した後、4°C、2,000 ×g にて 10 分間遠心することで血清を分離した。その後、Corticosterone ELISA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を用いて、血清コルチコステロン濃度を測定した。

1-11. 副腎重量の測定

1-10. において、マウスから血液採取した後に副腎を摘出し、直ちに副腎重量を測定した。

1-12. 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 (表 1) 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 (表 1) 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。

表 1. 免疫組織化学染色で使用した抗体

一次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主		製造会社
BrdU	1:500	Rat		Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
NeuN	1:200	Mouse		Merck, Kenilworth, NJ, USA
DCX	1:200	Goat		Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Ki67	1:500	Rabbit		Abcam, Cambridge, MA, USA
c-Fos	1:10,000	Rabbit		Merck, Kenilworth, NJ, USA

二次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	標識	製造会社
Goat IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mouse IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rabbit IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rabbit IgG	1:200	Goat	Biotin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Rat IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rat IgG	1:200	Rabbit	Biotin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

1-13. 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 (ブレグマから後方 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 Stainig 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。

1-14. 統計学的解析

データは全て「平均値 \pm 標準誤差」として表し、統計学的処理には StatView 5.0 J (SAS Institute, Tokyo, Japan) を使用した。Student's *t* 検定、反復測定二元配置分散分析あるいは二元配置分散分析の後に多重比較検定として Tukey-Kramer 検定を行い、 $P < 0.05$ のものを有意差ありとした。

実験結果

1-1. 葉酸欠乏飼料の摂取が血清葉酸濃度および体重変化に及ぼす影響

葉酸欠乏がうつ症状を引き起こす機序を明らかにするにうえて、適切なモデル動物を用いた脳内分子基盤の解析が必要不可欠である。そこで、体内葉酸量を減少させた「葉酸欠乏マウス」の作製を試みた。図2に示すように、3週齢の ddY 系雄性マウスに葉酸欠乏飼料を与えて6週間飼育した。9週齢時に血清葉酸濃度を測定した結果、葉酸欠乏飼料を摂取したマウスは、対照飼料を摂取したマウスと比べて血清葉酸濃度が大きく減少していた (図3A)。一方、両群間で体重増加に有意な差は認められず、葉酸欠乏は身体的な成長に影響を与えなかった (図3B)。以上の結果から、葉酸欠乏飼料を摂取させることで葉酸欠乏状態のマウスを作製できたものと考えられる。



図2. 実験スケジュール

3週齢の ddY 系雄性マウスに対照飼料または葉酸欠乏飼料を与えて、6週間飼育した。9週齢時に各種解析を行った。

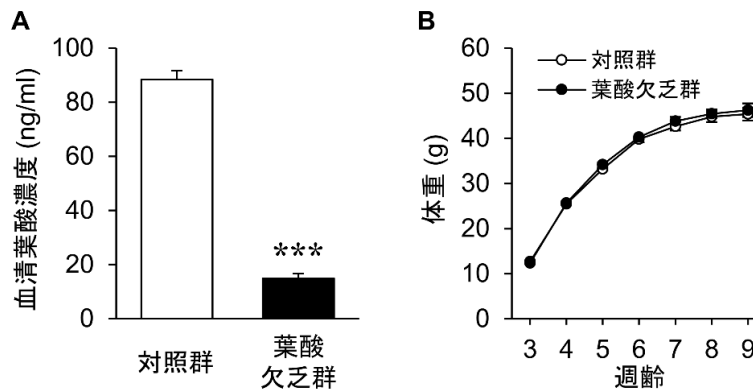


図3. 葉酸欠乏飼料摂取が血清葉酸濃度 (A) および体重変化 (B) に及ぼす影響

葉酸欠乏飼料を摂取したマウスでは、対照飼料を摂取したマウスと比べて血清葉酸濃度が顕著に減少していた (A)。一方で、両群間で体重増加に有意な差は認められなかった (B)。反復測定二元配置分散分析の結果、週齢 ($F_{6, 108} = 501.73, P < 0.001$) による主効果が認められたが、飼料 ($F_{1, 108} = 0.91, P = 0.35$) による主効果および交互作用 ($F_{6, 108} = 0.22, P = 0.97$) は認められなかった。n = 5 (A), 10 (B)。*** $P < 0.001$ vs. 対照群。

1-2. 精神機能、空間記憶および運動機能に対する葉酸欠乏の影響

1-2-1. 強制水泳試験に対する葉酸欠乏の影響

次に、作製した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 4)、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。

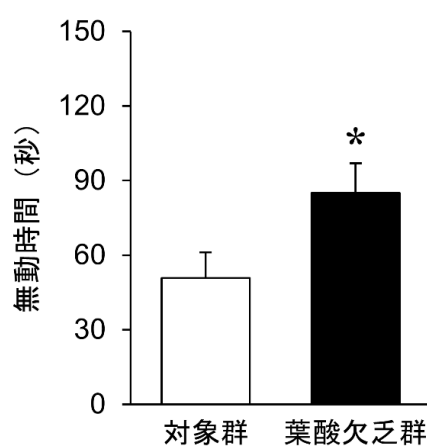


図 4. 葉酸欠乏によるうつ様行動の出現

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 = 20。* $P < 0.05$ vs. 対照群。

1-2-2. 高架式十字迷路試験、社会性相互作用試験、およびバーンズ迷路試験に対する葉酸欠乏の影響

葉酸は様々な生体機能調節に関与することから、体内葉酸量の減少はうつ様行動に限らず、広範な脳機能に影響を及ぼす可能性も十分に考えられる。そこで、葉酸欠乏が不安様行動に及ぼす影響を高架式十字迷路試験により、社会性行動に及ぼす影響を社会性相互作用試験により、空間記憶に及ぼす影響をバーンズ迷路試験により評価した。その結果、高架式十字試験におけるオープンアームおよびクローズドアームの滞在時間 (図 5A)、社会性相互作用試験における社会性行動時間 (図 5B)、バーンズ迷路試験におけるターゲット滞在時間 (図 5C) に両群間で有意な差は認められなかった。以上の結果から、葉酸欠乏による精神症状への影響は、うつ様行動に対して限定的に出現し、不安様行動、社会性行動、空間記憶に対して大きな影響は及ぼさないものと考えられた。

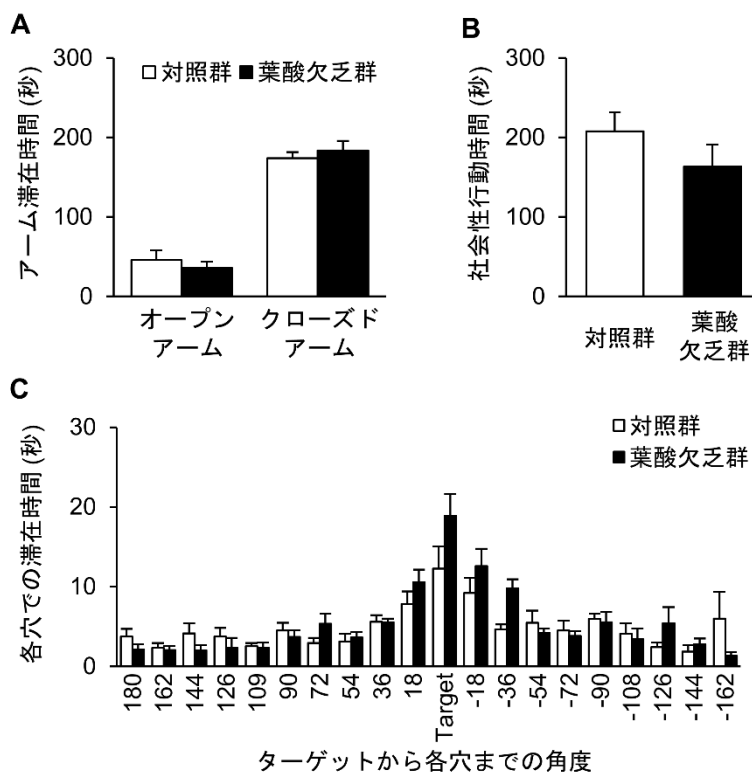


図 5. 葉酸欠乏が不安様行動 (A)、社会性行動 (B) および空間記憶 (C) に及ぼす影響

高架式十字迷路試験におけるオープンアームおよびクローズドアームの滞在時間 (A)、社会性相互作用試験における社会性行動時間 (B)、バーンズ試験におけるターゲット滞在時間 (C) に両群間で有意な差は認められなかった。n = 10。

1-2-3. 自発運動量測定およびロータロッド試験に対する葉酸欠乏の影響

強制水泳試験における無動時間は、自発運動量や協調運動機能に影響を及ぼす薬物により変動する。そこで、葉酸欠乏マウスの自発運動量を測定するとともに、ロータロッド試験による協調運動機能の評価を行った。その結果、自発運動量測定における総移動距離 (図 6A) およびロータロッド試験における落下潜時 (図 6B) に両群間で有意な差は認められず、葉酸欠乏によるうつ様行動は運動機能の低下によるものではないものと考えられた。

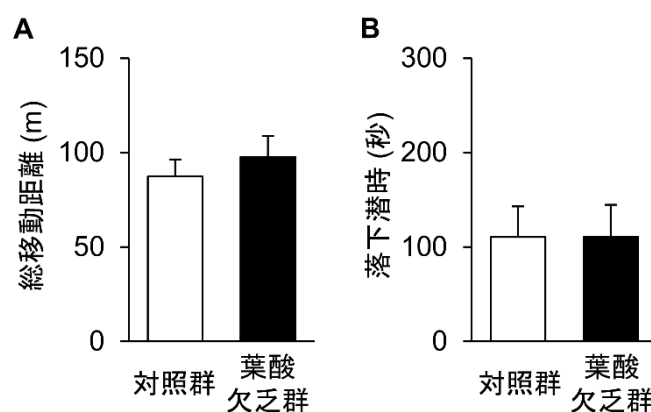


図 6. 葉酸欠乏が自発運動量 (A) および 協調運動機能 (B) に及ぼす影響

自発運動量測定における総移動距離 (A) およびロータロッド試験における落下潜時 (B) に両群間で有意な差は認められなかった。n = 10。

1-3. 血液成分に対する葉酸欠乏の影響

貧血は、葉酸欠乏により引き起こされる症状の一つとしてよく知られている。貧血は動悸や目眩、疲労感などを伴うことから、葉酸欠乏による貧血症状が強制水泳試験における無動時間に影響を及ぼしている可能性も否定できない。そこで、葉酸欠乏マウスの血液成分解析を行い、貧血症状の有無を評価した (表 2)。ヒトの葉酸欠乏性貧血では、赤血球の大きさを示す MCV や赤血球中の色素量を示す MCH の増加が観察されることが知られているが、葉酸欠乏マウスではそのような変化は観察されなかったことから、葉酸欠乏性貧血は生じていないものと判断した。また、赤血球数や白血球数など、今回測定したいずれの解析項目においても、対照群と葉酸欠乏群との間に有意な差は認められなかった。

解析項目	対照群	葉酸欠乏群
赤血球数 ($\times 10^2$ cells/ μ l)	42.4 \pm 4.7	50.8 \pm 6.3
白血球数 ($\times 10^5$ cells/ μ l)	84.2 \pm 2.7	85.4 \pm 1.4
Hb (g/dl)	14.0 \pm 0.3	14.4 \pm 0.2
Ht (%)	43.3 \pm 1.2	44.1 \pm 0.9
MCV (fl)	51.5 \pm 0.5	51.6 \pm 0.4
MCH (pg)	16.6 \pm 0.3	16.9 \pm 0.2
MCHC (%)	32.3 \pm 0.4	32.8 \pm 0.4
血小板数 ($\times 10^4$ cells/ μ l)	71.6 \pm 9.8	73.4 \pm 0.4

表 2. 葉酸欠乏飼の摂取が血液成分に及ぼす影響

葉酸欠乏マウスと対照マウス間において、いずれの解析項目にも有意な差は認められなかった。n = 4。

1-4. 視床下部-下垂体-副腎系のストレス応答機構に対する葉酸欠乏の影響

うつ病患者では、生体内のストレス応答機構である視床下部-下垂体-副腎 (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal; HPA) 系の機能異常や副腎の肥大がしばしば観察されることが知られており、HPA 系ストレス応答機構の機能異常や副腎の肥大がうつ病の発症や病態に関与する可能性が示唆されている (34-38)。そこで、葉酸欠乏が HPA 系ストレス応答機構に影響を及ぼすか否かを明らかにするために、ストレス負荷後のコルチコステロン (げっ歯類における主要なグルココルチコイド) の分泌量、および合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンの投与による HPA 系ネガティブフィードバック機構の評価を行った。その結果、15 分間の強制水泳ストレス負荷後 (図 7A)、およびデキサメタゾン投与後におけるコルチコステロン分泌量 (図 7B) に対照群と葉酸欠乏群との間で有意な差は見られなかった。また、副腎重量も両群間で有意な差は見られなかった (図 7C)。以上の結果から、葉酸欠乏は HPA 系ストレス応答機構や副腎重量に影響を及ぼさないものと考えられた。

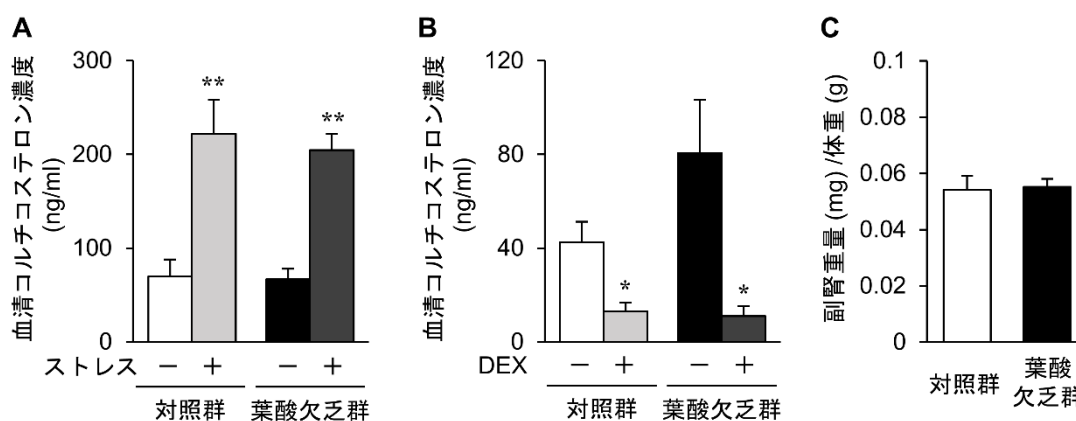


図 7. 葉酸欠乏が視床下部-下垂体-副腎系のストレス応答機構 (A, B) および副腎重量 (C) に及ぼす影響

15 分間の強制水泳ストレスを負荷した対照マウスおよび葉酸欠乏マウスでは、それぞれストレス未処置群と比較して、血清コルチコステロン量が有意に増加していた (A)。二元配置分散分析の結果、ストレス ($F_{1,16} = 40.60, P < 0.001$) による主効果が認められたが、飼料 ($F_{1,16} = 0.20, P = 0.66$) による主効果と交互作用 ($F_{1,16} = 0.10, P = 0.76$) は認められなかった。デキサメタゾン (dexamethazone; DEX, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与した対照マウスおよび葉酸欠乏マウスでは、それぞれ DEX 未処置群と比較して血清コルチコステロン量が有意に減少していた (B)。二元配置分散分析の結果、薬物 ($F_{1,16} = 15.88, P < 0.01$) による主効果が認められたが、飼料 ($F_{1,16} = 2.09, P = 0.17$) による主効果と交互作用 ($F_{1,16} = 2.59, P = 0.13$) は認められなかった。また、両群間で副腎重量に有意な差は認められなかった (C)。n=5。* $P < 0.05$ vs. DEX (-)、** $P < 0.01$ vs. ストレス (-)。

1-5. 成体脳における神経新生に対する葉酸欠乏の影響

1-5-1. 海馬歯状回における神経新生に対する葉酸欠乏の影響

葉酸欠乏性うつ症状の発症機序を追究するにあたり、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 8A, 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 9A, 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 (図 10A, B) や BrdU 投与 24 時間後における BrdU 陽性細胞数 (図 10C, D) 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 (Data not shown)。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。

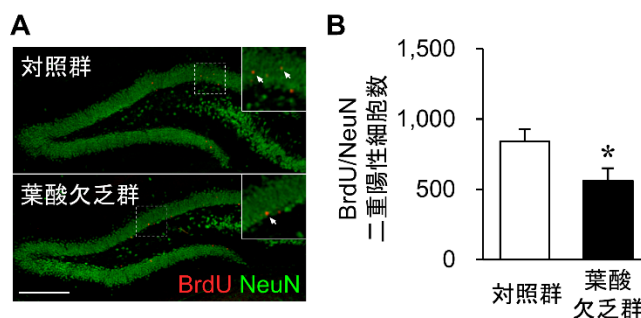


図 8. 葉酸欠乏が海馬歯状回における神経新生に及ぼす影響

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。

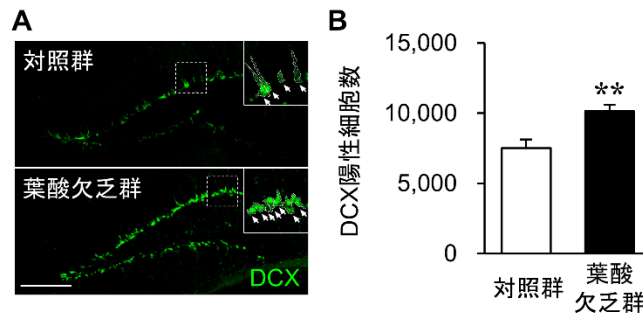


図 9. 葉酸欠乏が海馬歯状回における未熟ニューロン数に及ぼす影響

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 μm 。n = 5。 ** $P < 0.01$ vs. 対照群。

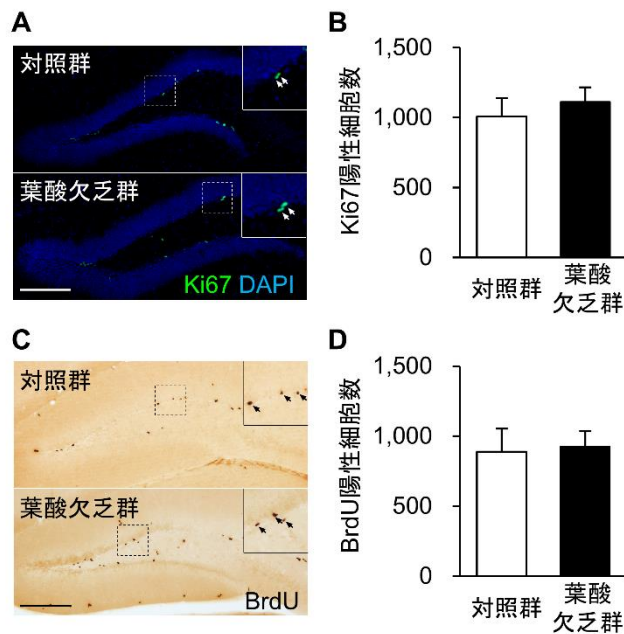


図 10. 葉酸欠乏が海馬歯状回における神経系前駆細胞数および細胞増殖に及ぼす影響

葉酸欠乏マウスおよび対照マウスの両群間で、海馬歯状回における Ki67 陽性細胞数 (神経系前駆細胞数) および BrdU (9 週齢時に 100 mg/kg で 12 時間毎に 2 回腹腔内投与) 陽性細胞数に有意な差は認められなかった (A: 海馬歯状回における Ki67 (緑) および DAPI (青) 陽性細胞の染色像、矢印は Ki67 陽性細胞を示す。B: Ki67 陽性細胞の計測結果。C: 海馬歯状回における BrdU 陽性細胞 (茶) の染色像、矢印は BrdU 陽性細胞を示す。D: BrdU 陽性細胞数の解析結果)。Scale bar = 200 μm 。n = 5。

1-5-2. 側脳室周囲-嗅球の神経新生に対する葉酸欠乏の影響

成体脳における神経新生は、海馬歯状回のみならず側脳室周囲-嗅球においても観察される。すなわち、葉酸欠乏下の側脳室周囲-嗅球においても神経新生異常が生じる可能性も十分に考えられる。そこで、葉酸欠乏が側脳室周囲-嗅球における神経新生に及ぼす影響についても解析を行った。側脳室周囲における新生ニューロンは、側脳室前方に位置する嗅球へと移動して成熟ニューロンに分化することが知られている。そこで、嗅球におけるBrdU/NeuN 二重陽性細胞数を指標に側脳室周囲-嗅球の神経新生について解析したが、両群間で有意な違いは認められなかった (図 11)。

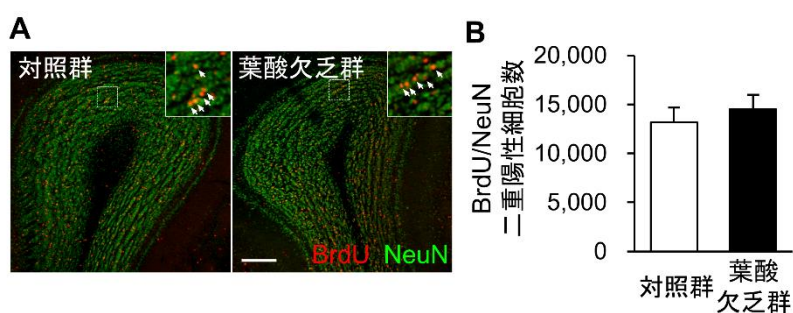


図 11. 葉酸欠乏が側脳室周囲-嗅球における神経新生に及ぼす影響

両群間において、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数) に有意な差は認められなかった (A: 嗅球における BrdU (赤) および NeuN (緑) 陽性細胞の染色像、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。

1-6. 海馬歯状回ニューロンの樹状突起およびスパインの形態に対する葉酸欠乏の影響

ニューロンは、核が存在する細胞体、他のニューロンに情報を伝える一本の軸索、他のニューロンから情報を受け取る複数の樹状突起を有しており、周囲のニューロンの軸索と樹状突起がシナプスを形成することで神経回路網を構築している。ストレス負荷により作成されるうつモデル動物では海馬歯状回ニューロンにおいて樹状突起の長さや分岐数が減少し、抗うつ薬によりストレス負荷による樹状突起の長さや分岐数の減少が改善することから (39,40)、樹状突起の形態異常とうつ様行動出現の関連性が指摘されている。そこで、樹状突起の長さや分岐数を定量的に解析する手法であるショールアナリシ法を用いて、ゴルジ染色法により可視化した海馬歯状回のニューロンの樹状突起形態を解析した。その結果、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ニューロンの樹状突起と各同心円との交点数が有意に減少しており、樹状突起の長さや分岐数が減少しているものと考えられた (図 12A, B)。

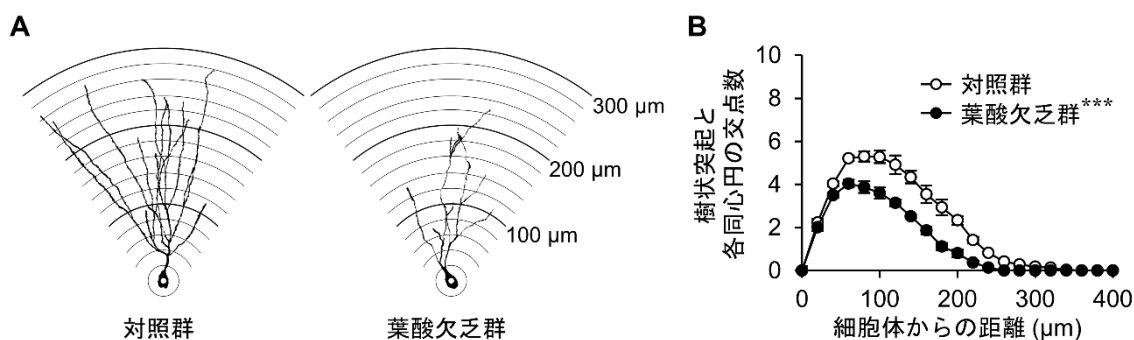


図 12. 葉酸欠乏が海馬歯状回におけるニューロンの樹状突起の複雑性に及ぼす影響

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ニューロンの樹状突起と各同心円との交点数が有意に減少していた (A: ゴルジ染色により可視化された歯状回ニューロンのトレース像。B: ショールアナリシスの解析結果)。反復測定二元配置分散分析の結果、飼料 ($F_{1, 152} = 54.10, P < 0.001$) および距離 ($F_{19, 152} = 252.43, P < 0.001$) による主効果と交互作用 ($F_{19, 152} = 10.06, P < 0.001$) が認められた。n = 5。*** $P < 0.001$ vs. 対照群。

樹状突起には「スパイン」と呼ばれる棘状の小さな突起が無数に存在しており、このスパインがシナプス入力を受け取ることでニューロン間の情報伝達を担っている。スパインは、スパイン前駆体である **filopodia** から未熟スパインである **thin**、中間型スパインである **stubby** を経て、成熟スパインである **mushroom** および **branched** へと成熟することで安定したシナプスを形成する (図 13)。慢性的ストレス負荷により作製したうつモデル動物では、海馬歯状回のニューロンにおけるスパイン密度や成熟スパイン数が減少することが報告されていることから (41)、スパイン形態異常がうつ様行動に関与することが示唆されている。そこで、海馬歯状回におけるニューロンのスパイン数およびスパイン形態について解析した結果、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ニューロンのスパイン密度の低下が観察された (図 14A, B)。さらに、形態別にスパイン数を解析した結果、葉酸欠乏マウスではスパイン前駆体である **filopodia** と未熟スパインである **thin** の増加、中間型スパインである **stubby** と成熟スパインである **mushroom** の減少が観察された (図 14A, C)。以上の結果から、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回ニューロンは形態的に未熟な状態となっていることが考えられた。

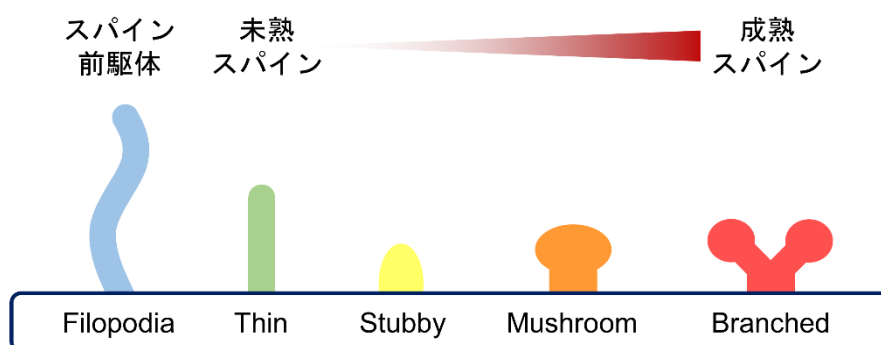


図 13. スパイン前駆体およびスパインの形態と成熟度

スパイン前駆体である **filopodia** は、未熟スパインである **thin**、中間型スパインである **stubby** を経て、成熟スパインである **mushroom** および **branched** へと成熟し、安定したシナプスを形成する。

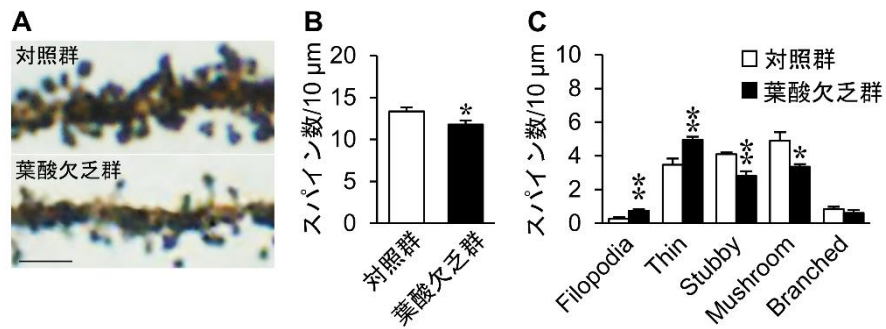


図 14. 葉酸欠乏が海馬歯状回のニューロンにおけるスパインの密度および形態に及ぼす影響

葉酸欠乏マウスでは对照マウスと比べて海馬歯状回のニューロンにおけるスパイン密度および成熟スパイン数が減少していた (A: 海馬歯状回における樹状突起スパインの染色像。B: スパイン密度の解析結果。C: 形態別スパイン数の解析結果)。Scale bar = 2 μm。n = 5。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 对照群。

1-7. ストレス負荷時における海馬歯状回の神経活動に対する葉酸欠乏の影響

前項の検討において、葉酸欠乏マウスでは海馬歯状回のニューロンにおける樹状突起の長さおよび枝分かれ数の低下、スパイン密度および成熟スパイン数の減少が観察された。樹状突起やスパインは周囲のニューロンからの情報伝達の役割を担うことから、葉酸欠乏は歯状回の神経活動にも影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、興奮後のニューロンで発現が増加することから神経活動マーカーとして利用される c-Fos タンパク質の発現を指標に、ストレス負荷後の海馬歯状回ニューロンの神経活動を評価した。図 15 に示すように、ストレス負荷 2 時間後の葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では、対照マウスと比べて c-Fos 陽性細胞数が有意に減少しており、ストレス負荷に応答するニューロン数が減少しているものと考えられた。

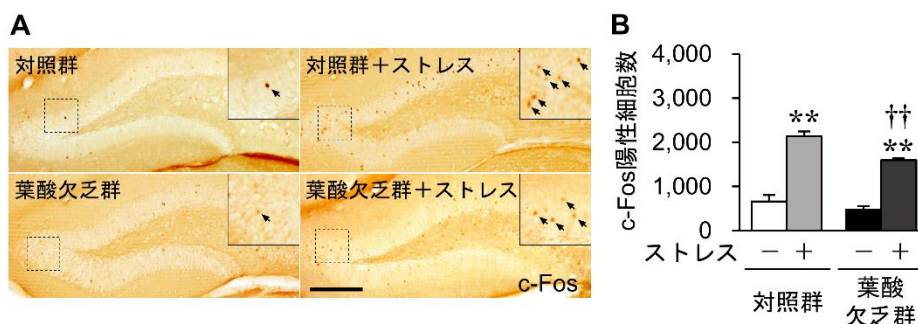


図 15. 葉酸欠乏がストレス負荷時における海馬歯状回の神経活動に及ぼす影響

15 分間の強制水泳ストレスを負荷した葉酸欠乏マウスおよび対照マウスでは、ストレス未処置群と比べて海馬歯状回における c-Fos 陽性細胞数が有意に増加していた。また、ストレス負荷した葉酸欠乏マウスでは、ストレス負荷した対照マウスと比べて c-Fos 陽性細胞数が有意に減少していた。(A: 海馬歯状回における c-Fos 陽性細胞 (茶) の染色像、矢印は c-Fos 陽性細胞を示す。B: c-Fos 陽性細胞数の解析結果)。二元配置分散分析の結果、飼料 ($F_{1,16} = 12.64, P < 0.01$) およびストレス ($F_{1,16} = 162.14, P < 0.001$) による主効果が認められたが、交互作用 ($F_{1,16} = 3.15, P = 0.094$) は認められなかった。Scale bar = 200 μm 。n = 5。** $P < 0.01$ vs. ストレス (-)、†† $P < 0.01$ vs. 対照群。

考察

本章では、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序を解明することを目的に、葉酸欠乏飼料の摂取により体内葉酸量を減少させた「葉酸欠乏マウス」を用いて検討を行った。葉酸欠乏マウスでは強制水泳試験における無動時間が増加していたことから、うつ様行動の出現を確認できた。本結果から、葉酸欠乏がうつ病発症リスクを高めるとの臨床報告を動物実験レベルで再現できたものと考えられる。また、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では、神経新生が低下していることを明らかにした。ストレス負荷動物でのうつ様行動の出現と海馬歯状回における神経新生の異常の関連性はよく知られており、同様の神経新生異常が葉酸欠乏性うつ症状の発症機序の一端であるものと考えられた。ストレス負荷動物の海馬歯状回では神経系前駆細胞が顕著に減少することが知られており、神経系前駆細胞の増殖抑制による未熟ニューロン数の減少がストレスによる神経新生低下の第一要因と考えられている。一方で、本研究において、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では、新生成熟ニューロンの減少、すなわち神経新生の低下が観察されるものの、神経系前駆細胞の増殖に変化は認められなかった。また、ストレス負荷動物とは異なり、未熟ニューロン数は増加していたことから、葉酸欠乏による海馬歯状回の神経新生異常は神経系前駆細胞の増殖抑制によるものではなく、新生ニューロンの成熟抑制に起因するものと推察される。葉酸欠乏下の海馬歯状回で観察されるニューロンの成熟抑制と類似した現象は、統合失調症様および双極性障害様のフェノタイプを示すカルシウムカルモジュリン依存性酵素 (CaMKII α) やシナプトソーム関連タンパク質 25 (SNAP-25) などの遺伝子欠損マウスにおいても観察されることが報告されている (42-44)。興味深いことに、海馬歯状回におけるニューロンの成熟抑制は、統合失調症患者や双極性障害患者の死後脳においても観察されることから (45)、海馬歯状回におけるニューロンの成熟抑制は、複数の精神疾患における中間表現型である可能性が考えられる。

HPA 系は、生体内における主要なストレス応答機構であり、ストレス刺激が入ると副腎から末梢血にグルココルチコイドが分泌され、気分や感情を含めた様々な生理機能を調節することが知られている。うつ病患者では、HPA 系のネガティブフィードバック機構の破綻や副腎の肥大がしばしば観察されることや (34-38)、うつ病モデル動物ではうつ病患者と同様の HPA 系機能異常が誘発されることが報告されており (46)、うつ病の発症や病態に HPA 系の機能異常に基づくストレス脆弱性が関与するものと考えられている。しかしながら、ストレス負荷やデキサメタゾン投与後の血中コルチコステロン量、および副腎重量は葉酸欠乏群と対照群で差異はなく、葉酸欠乏は HPA 系ストレス応答機構に影響を及ぼさないものと考えられた。すなわち、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序は、HPA 系ストレス応答機構の異常に基づくものとは異なる可能性が考えられる。

本検討では、離乳後 3 週齢の幼若マウスに葉酸欠乏飼料を 6 週間摂取させ、その影響を評価した。葉酸欠乏マウスで異常が見られた海馬歯状回における神経新生は、老齢動物においても観察される現象であることから (47)、今回の検討で用いたマウスより成熟した個体

においても葉酸欠乏による新生ニューロンの成熟抑制が生じる可能性は十分に考えられる。しかしながら、神経新生は胎児期、幼若期において盛んに行われているものの、加齢に伴って減少することから (47)、老齢動物での葉酸欠乏の影響は若齢動物に比べて軽度であるものと考えられる。成熟後の動物や老齢動物に対する葉酸欠乏の影響については、今後の検討課題としたい。

成体脳における神経新生は、海馬歯状回の他に側脳室周囲-嗅球においても観察される現象であるが、側脳室周囲-嗅球においては葉酸欠乏による異常を見出すことはできなかった。葉酸欠乏下の海馬歯状回の神経新生異常には新生ニューロンの成熟抑制が関与するものと推測している。しかしながら、ニューロンの成熟過程における分子基盤は脳領域やニューロンの種類により異なるものと考えられ、そのことが葉酸欠乏による応答性の違いに関与する可能性も考えられ、興味深く、葉酸欠乏が脳領域やニューロンの種類ごとに及ぼす影響についても今後検討する必要があるものと考えている。

ゴルジ染色法を用いたニューロンの形態学的解析から、葉酸欠乏マウスの歯状回ニューロンでは、樹状突起の長さや分岐数の減少といった複雑性の低下、スパイン密度および成熟スパイン数の減少などの形態学的異常が観察された。しかしながら、ゴルジ染色法は、ニューロンをランダムに染色する手法であるため、染色された細胞が新生ニューロンであるのか、既に存在していたニューロンであるのかを区別することはできない。したがって、葉酸欠乏下の海馬歯状回で観察されたニューロン形態異常は、新生ニューロン以外で生じていた可能性も十分に考えられる。今後は、免疫組織化学染色法による新生ニューロンの標識と、ゴルジ染色法を組み合わせることで既に存在していたニューロンと区別して解析することで、葉酸欠乏が新生ニューロンの樹状突起やスパインの形態に及ぼす影響を明らかにできるものと考えられる。

葉酸欠乏による病的症状としては貧血がよく知られている (10)。しかしながら、葉酸欠乏マウスでは葉酸欠乏性の貧血症状は観察されなかった。赤血球の寿命は、マウスにおいて約 40 日と比較的長く (48)、6 週間の葉酸欠乏飼料摂取では正常な赤血球が血液中に十分存在しているものと想定されるため、貧血症状が出現しなかった可能性も考えられる。一方で、貧血症状が出現しない 6 週間の葉酸欠乏飼料摂取によりうつ様行動や海馬歯状回の神経新生異常が誘発されたことから、中枢神経系は造血系と比べて葉酸欠乏に対してより脆弱な組織である可能性が考えられた。

第2章 葉酸欠乏下の培養神経幹細胞における遺伝子発現解析、およびエピゲノム修飾解析

第1章では、ヒトの疫学調査の結果と同様に葉酸欠乏によりうつ様行動を示す葉酸欠乏マウスを作製し、本マウスの海馬歯状回においてニューロンの成熟異常が生じていることを見出した。多くの細胞と同様にニューロンにおいても、分化・成熟過程は細胞種特異的な転写因子の発現変動により調節されており、この転写因子の発現変動はDNAやヒストンタンパク質のメチル化といったエピゲノム修飾によって厳密に制御されていることが知られている(49-56)。すなわち、ニューロンの分化・成熟過程では、分化や成熟に関わる遺伝子群のエピゲノム修飾がドラスティックに変動しており、DNAやヒストンタンパク質へのメチル基転移反応が活発に行われている。

食物などから摂取された葉酸は体内に吸収された後、代謝過程を経て活性型の葉酸であるテトラヒドロ葉酸へと変換される。体内で変換されたテトラヒドロ葉酸は一炭素単位の輸送担体としてデオキシウリジル酸にメチル基を供与することで、核酸塩基の構成成分であるチミジル酸が生合成される。また、テトラヒドロ葉酸はビタミンB₁₂やメチオニンと協調的に働くことで、多くのメチル基転移反応においてメチル基供与体として働くS-アデノシルメチオニン(S-adenosylmethionine; SAM)が生合成される(図16)。したがって、葉酸欠乏することで、核酸の合成やメチル基転移反応が抑制されるものと考えられる。しかしながら、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では細胞増殖に変化は見られないことから、DNAの複製といった核酸の合成には影響がないものと考えられる。つまり、ニューロンの分化・成熟に伴いメチル基転移反応が活発に行われている海馬歯状回では、葉酸欠乏によるエピゲノム修飾異常による影響を他の脳領域に比べて強く受ける可能性が推測される。

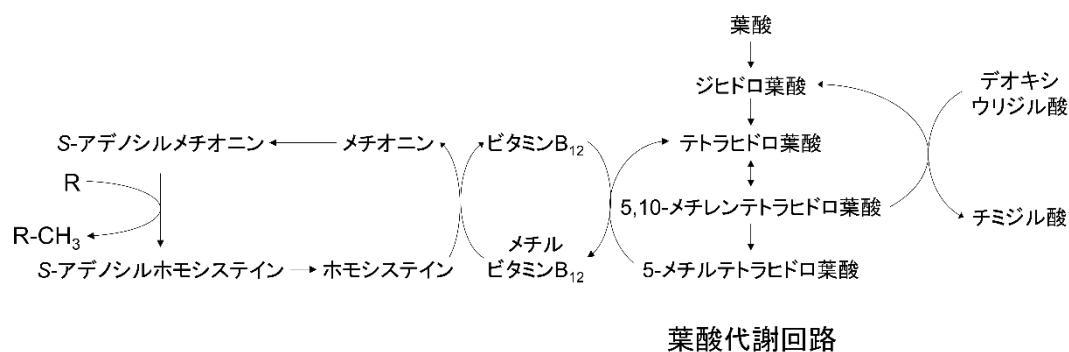


図16. 葉酸代謝回路の概略

体内に吸収された葉酸は葉酸代謝回路に入り、活性型のテトラヒドロ葉酸に変換されることで核酸合成に関与する。また、テトラヒドロ葉酸はビタミンB₁₂やメチオニンと協調的に働くことで、メチオニン代謝回路においてS-アデノシルメチオニンの生合成を介し、DNAおよびタンパク質などのメチル基転移反応に関与する。R = DNA、タンパク質など。

そこで本章では、葉酸欠乏による新生ニューロン成熟異常の詳細な分子基盤を明らかにするために、葉酸欠乏条件がニューロンの分化や成熟に関わる遺伝子群の発現量とエピゲノム修飾に及ぼす影響を解析することとした。本検討では神経系前駆細胞における分化・成熟異常を解明するために、マウス胎仔脳から単離した神経幹細胞を用いて解析を行った。

実験方法

2-1. 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。すなわち、妊娠 14.5 日目の ddY 系マウス (Shimizu Laboratory Supplies) を断頭した後、胎仔を取り出し、胎仔から脳を採取した。実体顕微鏡下で胎仔脳から終脳を分離した後、Papain dissociation system (Worthington, Lakewood, New Zealand) を用いて細胞を単一に分散させた。分散させた細胞は、1% (v/v) N-2 supplement (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 、20 ng/ml Epidermal growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) 、20 ng/ml Fibroblast growth factor 2 (PeproTech) および 2 µg/ml Heparin (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) /Ham's F-12 (Nacalai tesque) で再懸濁した後、 1×10^6 cells/dish となるように non-treated 100 mm dish に播種し、7 日間浮遊培養することで細胞塊 (ニューロスフェア) を形成させた。ニューロスフェアをチューブに回収し、ピペッティングにより分散させ後、Laminin/poly-L-ornithine コーティングした 24-well プレート、35 mm dish および 100 mmdish に播種し、2% (v/v) B-27 supplement (Invitrogen) を含む対照培地 (DMEM/Ham's F-12, 葉酸含量 2.44 mg/l)、あるいは葉酸欠乏培地 (DMEM without folic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA):Ham's F-12 (Nacalai tesque) 1:1, 葉酸含量 0.66 mg/l) 中で接着培養することで分化させた。分化 1 日目、3 日目、7 日目に各種解析を行った。

2-2. 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 (表 3) 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 (表 3) 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 (BX53, Olympus) および顕微鏡用デジタルカメラ (DP73, Olympus) を用いて撮影し、各陽性細胞数を計測した。

表 3. 免疫細胞化学染色で用いた抗体

一次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	製造会社	
Tuj1	1:1,000	Mouse	BioLegend, San Diego, CA, USA	
MAP2	1:1,000	Rabbit	Merck, Kenilworth, NJ, USA	
GFAP	1:200	Rabbit	Agilent, Santa Clara, CA, USA	

二次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	標識	製造会社
Mouse IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rabbit IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rabbit IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2-3. 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 (表 4) 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。

表 4. mRNA 発現量解析に使用したプライマー

標的遺伝子	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Pax6</i>	GAGACTGGCTCCATCAGACC	CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC
<i>Sox2</i>	ACCGTTTTCTGGTCTTGTT	CGATATCAACCTGCATGGAC
<i>Nrsf</i>	ACCTGCAGCAAGTGCAACTA	TTCACATTATAACGGGCGTTC
<i>Bmp4</i>	TGAGCCTTTCAGCAAGTTT	CTTCCCGGTCTCAGGTATCA
<i>Stat3</i>	TGAAGGTGGTGGAGAACCTC	TTCTGCACGTAATCCATTGC
<i>Hey1</i>	GGTACCCAGTGCCTTTGAGA	ATGCTCAGATAACGGGCAAC
<i>Ascl1</i>	AACAAACCAGACAGCCAACC	AGGAACCCATCTGTGATTTCG
<i>Neurog1</i>	AGGACGAAGAGCAGGAACG	CAGGGCCCAGATGTAGTTGT
<i>Eomes</i>	TGTGAGTGTAGGGGTCCTGA	CTCCTTCCTTCCTTCCTCC
<i>Mef2c</i>	GGGGACTATGGGGAGAAAAA	ACAGCTTGTTGGTGCTGTTG
<i>Prox1</i>	CTTGACTCGGGACACAACAA	TGATTGGGTGATAGCCCTTC
<i>Neurod1</i>	GAGGCTCCAGGTTATGAGA	GCTCTCGCTGTATGATTTGG
<i>Mib1</i>	CATTCGATGGAAATGTGCAG	ACTCTGGCACCAGCAAAGAT
<i>Creb1</i>	GGAGCTTGTACCACCGGTAA	GCAGATGATGTTGCATGAGC
<i>Gapdh</i>	ATGGTGAAGGTCGGTGTG	ACTCCACGACATACTCAG

2-4. ドットプロット法

分化させた培養神経幹細胞から lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1 % SDS, proteinase K)を用いてゲノム DNA を抽出し、TE 飽和フェノール (Nacalai tesque) 、 Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1) (Nacalai tesque) およびエタノールを用いて精製した。精製したゲノム DNA は 0.4 mM NaOH/10 mM EDTA を用いて 10 ng/100 μ l に希釈し、99°C で 10 分間インキュベートすることで変性させた後、直ちに氷上で冷却した。変性させた DNA に 2 M 酢酸アンモニウムを 100 μ l 加えた後、Dot-blotter (Sanplatec, Osaka, Japan)を用いてサンプル 200 μ l を Nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にアプライした。メンブレンを 2 \times SSC でリンスし、UV Transilluminator (UVP, Upland, CA, USA) を用いて UV (302 nm) を 5 分間照射することで DNA をメンブレンに定着させた。Blocking One (Nacalai Tesque) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体 (表 5) を 4°C にて一晩反応させ、TBS-T でメンブレンを洗浄した後、二次抗体 (表 5) を室温にて 2 時間反応させた。なお、一次抗体および二次抗体は 5% Blocking One を含む TBS-T で希釈した。5-メチルシトシン量の定量には、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) および ChemiDoc (Bio-Rad) を用いた。

表 5. ドットプロット法で用いた抗体

一次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	製造会社	
5-mehtylcytosine	1:2,000	Mouse	Active Motif, Carlsbad, CA, USA	

二次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	標識	製造会社
Mouse IgG	1:5,000	Horse	HRP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2-5. ヒストンタンパク質の単離およびウエスタンブロット法

分化させた培養神経幹細胞にヒストン抽出液 (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 25 mM KCl, 250 mM sucrose, 2 mM sodium butyrate, 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, protease inhibitor cocktail) を 1 ml 加え、セルリフターで細胞を回収した。氷冷した Dounce tissue grinder (Wheaton, Millville, NJ, USA) に細胞懸濁液を入れ、付属の Tight pestle で 12 回ストロークすることで細胞を破碎した。細胞破碎液を 4°C、7,700 \times g にて 1 分間遠心分離した後、上清 (細胞質画分) を除き、沈殿物 (核画分) に 0.4 M H₂SO₄ を 500 μ l 入れて再懸濁させた。再懸濁液を氷上で 30 分間静置した後、4°C、15,000 \times g にて 10 分間遠心分離し、上清に 10 mM デオキシコール酸を 250 μ l 入れ、4°C で 30 分静置した。4°C、15,000 \times g にて 10 分間遠心分離した後、沈殿物 (ヒストンタンパク質) に acidified acetone (0.1% HCl) を 1 ml 入れ、氷上で 5 分静置した。4°C、15,000 \times g にて 5 分間遠心分離して上清を除いた後、acetone を 1 ml 入れて氷上で 5 分静置し、ヒストンタンパク質を洗浄した。4°C、15,000 \times g にて 5 分間遠心分離して上清を除き、沈殿させたヒストンタンパク質を 30 μ l の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)

で溶解し、タンパク質濃度を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。タンパク質濃度が 50 ng/μl となるように sample buffer (0.1 M Tris-HCl; pH 6.8, 2% SDS, 4.2% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.005% bromophenol blue) で希釈した後、99°C で 5 分間加熱し、これをサンプルとした。15% SDS-ポリアクリルアミドゲルに 5 μl の ExcelBand All Blue Regular Range Protein Marker (SMOBIO, Tokyo, Japan) をおおよび 10 μl のサンプルを添加し、電気泳動した。その後、タンパク質を PVDF membrane (Merck, Burlington, MA, USA) に転写し、3%スキムミルクを含む 0.1% Tween20 Tris-buffered saline (TBS-T) 中で室温にて 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体 (表 6) を 4°C で一晩反応させ、二次抗体 (表 6) を室温で 1 時間反応させた。なお、一次抗体と二次抗体は、1%スキムミルクを含む TBS-T で希釈した。反応後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) および ChemiDoc (Bio-Rad) を用いてメチル化ヒストン量を定量した。定量後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl; pH 6.8, 10% SDS, 0.007% 2-mercaptoethanol) を加えて、50°C で 45 分インキュベートした。メンブレンを TBS-T で洗浄後、3%スキムミルクを含む TBS-T を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、一次抗体 (表 6) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (表 6) を用いて室温で 1 時間反応させた。一次抗体と二次抗体の希釈には、1%スキムミルクを含む TBS-T を使用した。メンブレンを TBS-T で洗浄した後、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) および ChemiDoc (Bio-Rad) を用いて総ヒストン H3 量を定量した。なお、メチル化ヒストン H3 量は、メチル化ヒストン H3 量/総ヒストン H3 量として算出した。

表 6. ウェスタンブロット法で使用した抗体

一次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主		製造会社
Histone H3	1:1,000	Rabbit		Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Tri-methyl-histone H3 Lys4	1:1,000	Rabbit		Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Tri-methyl-histone H3 Lys9	1:1,000	Rabbit		Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Tri-methyl-histone H3 Lys27	1:1,000	Rabbit		Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Tri-methyl-histone H3 Lys36	1:1,000	Rabbit		Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
二次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	標識	製造会社
Rabbit IgG	1:1,000	Goat	HRP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2-6. Methylated CpG Island Recovery Assay

培養神経幹細胞に DNA 抽出バッファー (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1 % SDS and 100 µg/ml proteinase K) を 100 µl 加え転倒混和し、55°C で 1 時間インキュベートした後、37°C で一晩インキュベートした。その後、TE 飽和フェノール (Nacalai tesque) を 100 µl 加え、室温で 20 分間穏やかに混和した。混和したサンプルを室温、11,000 ×g で 10 分間遠心し、上層に Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1) (Nacalai tesque) を 100 µl 加え、室温で 20 分間穏やかに混和した。混和したサンプルを室温、11,000×g で 10 分間遠心し上層に 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 20 µl、100 %エタノールを 500 µl 加え、穏やかに混和した後、-80°C で 1 時間静置し、4°C、16,000×g で 30 分間遠心した。遠心後、上清を取り除き 70 %エタノールを 500 µl 加え、穏やかに混和した後、4°C、16,000 ×g で 30 分間遠心した。遠心後、上清を取り除き、10 分間自然乾燥させた後、20 µl の注射用水を加えて溶解した。抽出した DNA サンプル (1 µg) に注射用水を加えて全量 75 µl とし、超音波発生機 Handy Sonic (UR21-P; TOMY, Tokyo, Japan) を用いて 5 秒間超音波処理することで DNA をせん断した。せん断した DNA は EpiXplore Methylated DNA Enrichment Kit (Takara bio) を用いてメチル化 DNA の濃縮を行い、メチル化 DNA と非メチル化 DNA に分別した。その後、KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo) およびプライマー (表 7) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Takara Bio) にて各遺伝子の転写開始点付近における CpG アイランドを含む領域を増幅した。DNA メチル化割合は、メチル化 DNA 量/メチル化 DNA 量+非メチル化 DNA 量として算出した。

表 7. Methylated CpG Island Recovery Assay で使用したプライマー

標的遺伝子	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Pax6</i>	AGCACAGGACGAAAGAATGC	CGAAGGAAGCTCAAATCACACG
<i>Nrsf</i>	ACCGCGGTCCTGAAACTTC	TTCCGGCCCTGCTACGAC
<i>Stat3</i>	CTAACCGGATCGCTGAGGTAC	CCGCCTGGCCTCTCCTAG
<i>Hey1</i>	CAACCTCTCCGCCTTCCC	CCGGTTAAAACCTCAACCATCCC
<i>Neurog1</i>	ACAGTAAGTGCGCTTCGAAG	TCAGAGATGCAGGTCTCCAAAG
<i>Eomes</i>	TTTCCCGTGTGATCGCATTG	ATTACGGACGCCTGCAGTAG
<i>Mef2c</i>	AGCAAGGATGAAGTGGCTACTG	AGTCGAGATCTTCTTCTGACC
<i>Prox1</i>	CTCTCCCCAGCCCCCTCAC	GGTCCCAGCACCCAATCG
<i>Neurod1</i>	GAAGACCATATGGCGCATGC	CATTACCCCCTCCCCAGAAC
<i>Mib1</i>	CGAAAGGCTGCTCGTGGAC	CGGCGGGGAATCGTGAG
<i>Creb1</i>	AGTTTGACGCGGTGTGTTAC	TCTTACCGGTGGTACAAGCTC

2-7. クロマチン免疫沈降法

培養神経幹細胞に 1% formaldehyde を含む DMEM/Ham's F-12 medium (Nacalai tesque) を 10 ml 加え、室温で 10 分間インキュベートすることでヒストンタンパク質と DNA を架橋した。ChIP-IT Express Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) 付属の Glycine stop-Fix Solution を 5 ml 加え、室温で 5 分間インキュベートすることで架橋反応を停止させた。固定した細胞

に ChIP-IT Express Kit 付属の 0.5 mM PMSF を含む Cell scraping solution を 1 ml 添加し、4°C で 800 ×g にて 10 分間遠心分離した。沈殿物をキット付属の Lysis buffer (1×protease inhibitor cocktail , 0.5 mM PMSF) で懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。氷冷した Dounce tissue grinder (Wheaton) および付属の Tight pestle を用いて 12 回ストロークすることで細胞を破碎して核を放出させた。細胞破碎液を 4°C で 2,400×g にて 10 分間遠心分離し、上清を除いた後、沈殿物をキット付属の Shearing buffer 150 μl に再懸濁した。超音波発生機 Handy Sonic (UR21-P; TOMY)を用いて 1 回あたり 30 秒間の超音波処理を 10 回繰り返すことでクロマチンを断片化した。その後、4°C で 18,000 ×g にて 10 分間遠心分離し、上清をサンプルとした。クロマチン免疫沈降は、ChIP-IT Express Kit のマニュアルに従った。免疫沈降には、抗メチル化ヒストン H3 抗体 (表 8) を使用し、ローテーターを用いて 4°C で一晩反応させた。得られた ChIP DNA および Input DNA を Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (Nacalai tesque) およびエタノールを用いて精製した。定量的リアルタイム PCR は、プライマー (表 9) および KOD qPCR SYBR Mix (Toyobo)を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Takara Bio) にて解析した。メチル化ヒストン割合は、ChIP/Input で算出した。

表 8. クロマチン免疫沈降法で使用した抗体

抗原	希釈倍率	宿主	製造会社
Tri-methyl-histone H3 Lys9	1:50	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Tri-methyl-histone H3 Lys27	1:50	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

表 9. クロマチン免疫沈降法で使用したプライマー

標的遺伝子	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Pax6</i>	TTGCTGGCGTGGATATTAAGG	ATCTGACAACCGGGTTCTACG
<i>Nrsf</i>	GGGAAGGGGGCGTGTCGG	CGCACATTCCAGCACAGGA
<i>Stat3</i>	CGGGGCTTAGGAAGTACAGC	TACAGCCCCTCCAGCCAATC
<i>Hey1</i>	CAACCTCTCCGCCCTCCC	CCGGTTAAACTCAACCATCCC
<i>Neurog1</i>	GCCGTAATAAGGGGTCCTG	GGCTGGTCTCCTGAGTGATG
<i>Eomes</i>	ATAGCAAAGTCCCCTAGCCATG	TCTAGGCATACTTGACCGCTTG
<i>Mef2c</i>	ACTAACAGTGTAGAGGCTTG	AACCAGACCTTTGTCAGTGC
<i>Prox1</i>	ACGTGCAGTCTTCCTGTTTC	GCTTTCCAGCGCTCTCTC
<i>Neurod1</i>	CGCTCAGCATCAGCAACTC	TGACGATCTCATAACCCTGGAG
<i>Mib1</i>	TTAGCGATCCGTTTCCTTCCC	TCAGCGACAACGGGATGG
<i>Creb1</i>	GGTCGAGCTCGGCTGTTTC	CCGACTGAGGAGCCGCAG

2-8. 統計学的解析

データは全て「平均値±標準誤差」として表した。統計学的処理として、Student's *t* 検定を行い、 $P < 0.05$ のものを有意差ありとした。

実験結果

2-1. 培養神経幹細胞の分化・成熟に対する葉酸欠乏の影響

まず *in vitro* 実験系において、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察された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 (図 17)。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 (図 18A-F)。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 (Data not shown)。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。

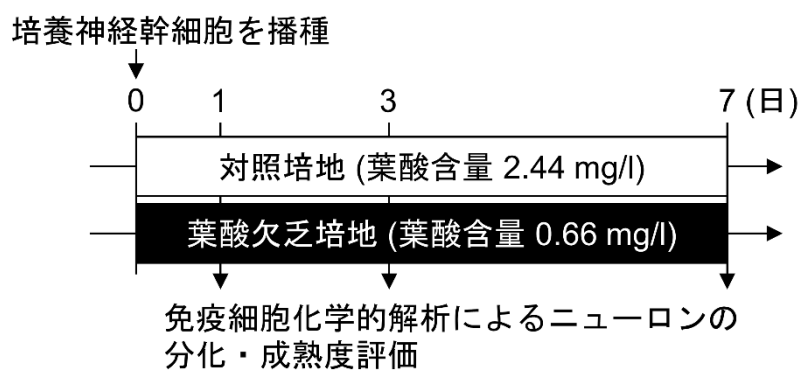


図 17. 実験スケジュール

ニューロスフェア法により調製した培養神経幹細胞を 24-well プレートに播種し、対照培地または葉酸欠乏培地中にて接着培養することで分化させた。分化1日目、3日目、7日目に免疫化学染色により、ニューロンの分化・成熟を評価した。

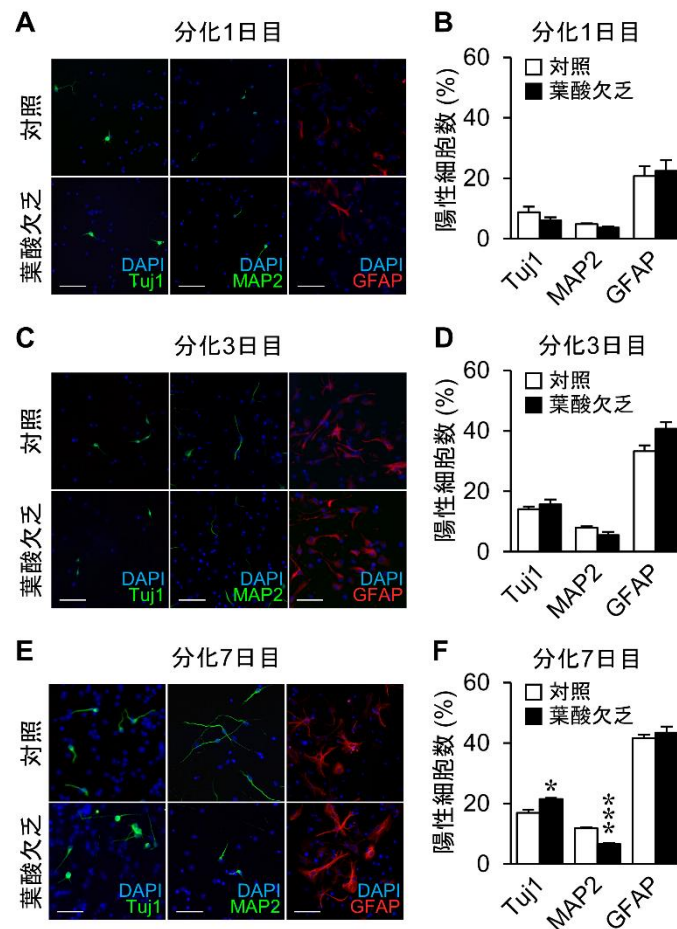


図 18. 葉酸欠乏が培養神経幹細胞の分化・成熟に及ぼす影響

葉酸欠乏条件下では、対照条件下と比べて分化 7 日目において TuJ1 陽性細胞数 (ニューロン数) の有意な増加、および MAP2 陽性細胞数 (成熟ニューロン数) の有意な減少が認められたが、GFAP 陽性細胞数 (アストロサイト数) に両条件間で有意な差は認められなかった (E: TuJ1 (緑) 陽性細胞、MAP2 (緑) 陽性細胞、GFAP (赤) 陽性細胞および DAPI (青) の染色像。F: 分化 7 日目における TuJ1 陽性細胞数、MAP2 陽性細胞数および GFAP 陽性細胞数の解析結果)。一方で、分化 1 日目および分化 3 日目においては、両条件間で TuJ1 陽性細胞数、MAP2 陽性細胞数および GFAP 陽性細胞数に有意な差は認められなかった (A, C: 分化 1 日目 (A) および分化 3 日目 (C) における TuJ1 (緑) 陽性細胞、MAP2 (緑) 陽性細胞、GFAP (赤) 陽性細胞および DAPI (青) の染色像。B, D: 分化 1 日目 (B) および分化 3 日目 (D) における TuJ1 陽性細胞数、MAP2 陽性細胞数、および GFAP 陽性細胞数の解析結果)。n = 3。Scale bar = 30 μ m。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. 対照群。

2-2. 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 (図 19)。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、これら遺伝子の発現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、本培養系における各遺伝子の 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 20A-C)。

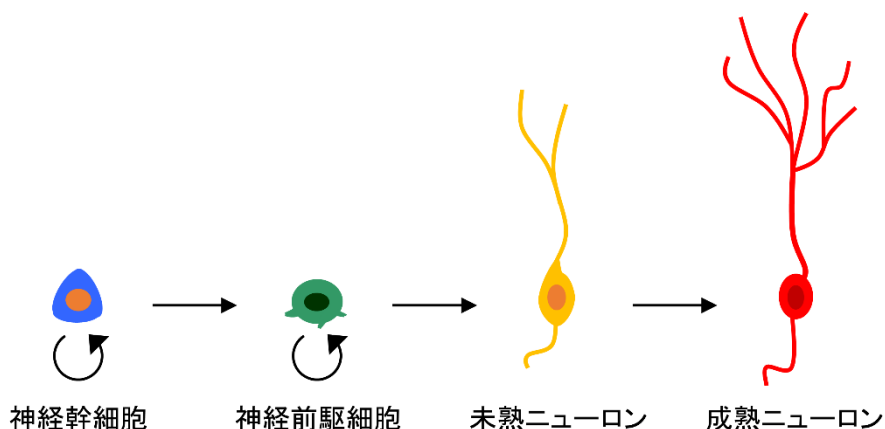


図 19. 神経幹細胞からニューロンへの分化・成熟過程の概略

神経幹細胞は増殖・分化することで神経前駆細胞となり、未熟ニューロンへの分化を経て成熟ニューロンへと分化する。

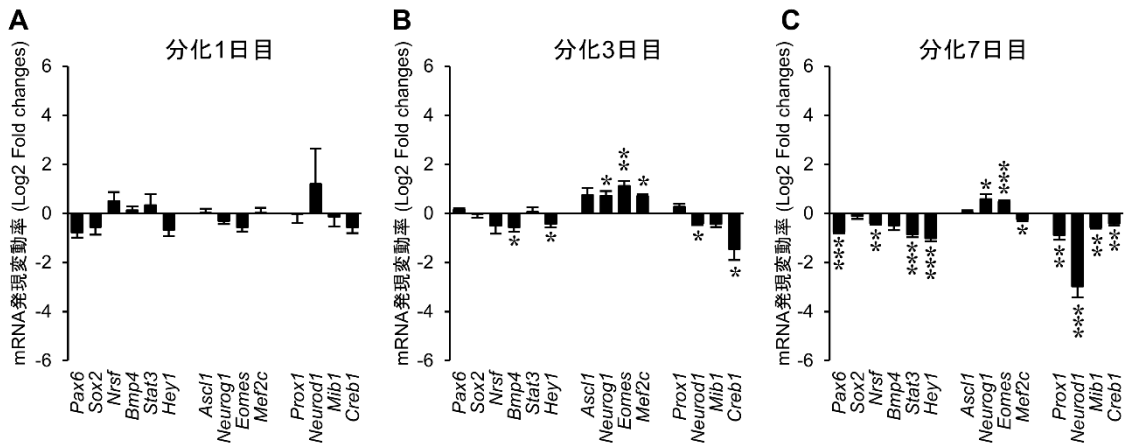


図 20. 葉酸欠乏がニューロン分化・成熟関連遺伝子群の mRNA 発現パターンに及ぼす影響

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。

2-3. 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

次に、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 21A) および H3K27me3 量 (図 21B) 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 21B)。

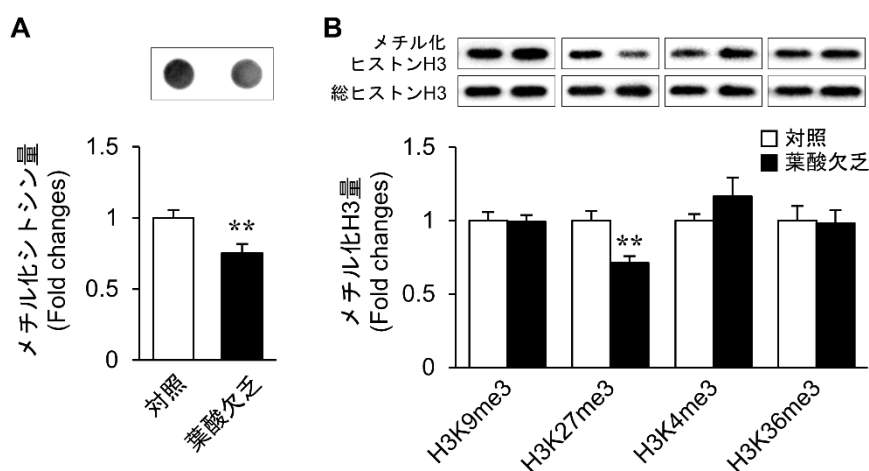


図 21. 葉酸欠乏が DNA メチル化およびヒストンメチル化に及ぼす影響

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。

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 22)、mRNA 発現変動と DNA メチル化変動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 メチル化変動との間に相関性は見られなかった(図 22)。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 23)。

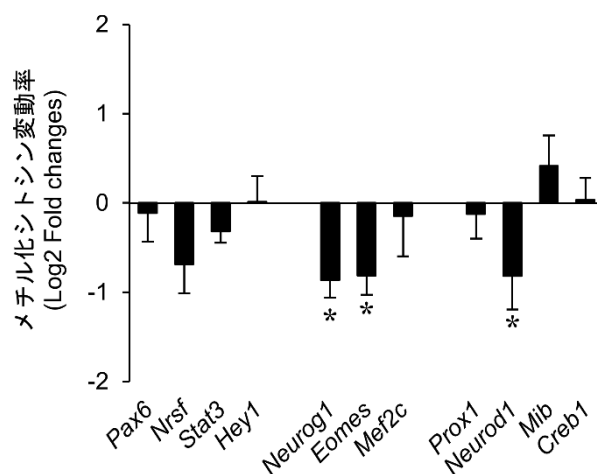


図 22. 葉酸欠乏がニューロン分化・成熟関連遺伝子群の転写開始点付近における CpG アイランドの DNA メチル化に及ぼす影響

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。

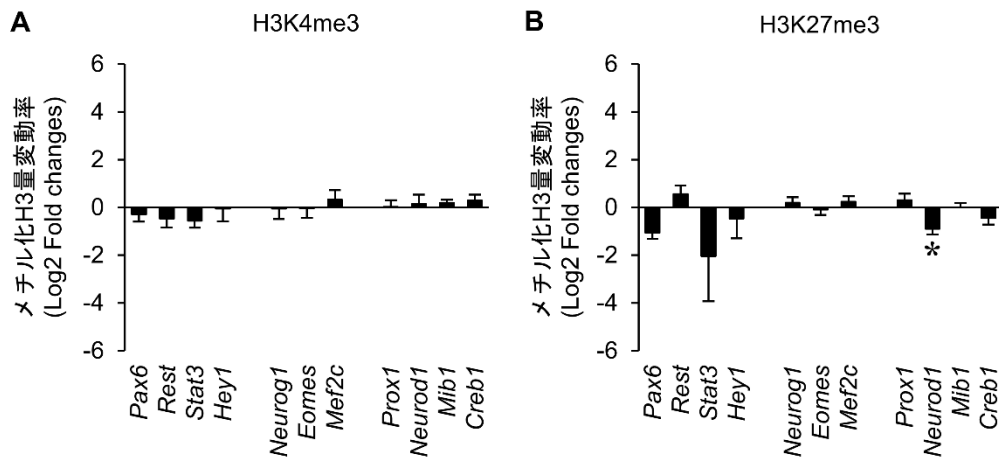


図 23. 葉酸欠乏がニューロン分化・成熟関連遺伝子群の転写開始点付近におけるヒストンメチル化に及ぼす影響

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細胞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。* $P < 0.05$ vs. 対照群。

考察

本章では、葉酸欠乏がニューロンの成熟異常を引き起こす分子機序を明らかとすることを目的に、ニューロンの分化・成熟を詳細に評価可能な *in vitro* 実験系を構築し、葉酸欠乏の影響を解析した。その結果、葉酸欠乏条件下では、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回と類似した新生ニューロン成熟異常が観察されることを確認するとともに、ニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動および DNA やヒストンの低メチル化が観察された。本結果は、葉酸欠乏によるニューロンの成熟異常が遺伝子レベルの変化に基づくことを示唆するものと考えられる。

今回変動が見られた遺伝子のうち、*Neurogl* と *Eomes* においては DNA メチル化の変動と mRNA 発現量の変動に相関性が見られた。これら 2 つの遺伝子は、海馬歯状回において神経前駆細胞からニューロンへ分化する過程において特異的に発現することが知られている (57-59)。また、*Eomes* 遺伝子欠損マウスでは、胎仔期や成体期において神経新生に異が見られることから、*Eomes* は神経前駆細胞からニューロンへの分化制御の役割を担うものと考えられている (60-62)。これらの知見を考慮すると、葉酸欠乏によるニューロン成熟異常に DNA 低メチル化を起因とする *Neurogl* や *Eomes* の発現増加が関与するとの仮説が考えられる。また、葉酸欠乏条件下では *Neurod1* の mRNA 発現量の減少も観察された。*Neurod1* にコードされているタンパク質の NeuroD1 は塩基性ヘリックスループヘリックス転写因子の一つであり、成体新生ニューロンや胎仔脳における神経前駆細胞の生存および成熟において重要な役割を担っていることが知られている (63-65)。したがって、葉酸欠乏による *Neurod1* の発現減少はニューロンへの成熟が抑制されている原因の一つである可能性が考えられる。しかしながら、今回の検討では葉酸欠乏条件下において *Neurod1* のエピゲノム修飾の変動と mRNA 発現量の変動との間に相関性は見られなかった。*Neurod1* を含むニューロンの分化・成熟に関与するいくつかの遺伝子は、*Eomes* にコードされている転写因子の *Tbr2* により発現が調節されていることが知られている (62)。*Neurod1* は *Tbr2* が結合することで転写が抑制されることが報告されていることから (62)、*Neurod1* の mRNA 発現量の減少は、葉酸欠乏によるエピゲノム修飾の変動により直接引き起こされたものではなく、*Tbr2* の発現増加により *Neurod1* への *Tbr2* の結合が増加することで、*Neurod1* の転写が強く抑制された結果かもしれない。また、葉酸欠乏条件下では、*Mib1* や *Creb1* などのニューロンの樹状突起伸長やスパインの形成および成熟に関与する遺伝子 (66, 67) の発現減少も観察された。これら遺伝子の発現減少が葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で見られた樹状突起およびスパインの成熟異常に関与している可能性が考えられる。

本章では、ニューロンの分化や成熟に関わる遺伝子の発現変動やエピゲノム修飾変動を見出した。今回変動が見られた遺伝子のみで葉酸欠乏による異常のすべてを十分に説明できるわけではないが、DNA 低メチル化によるニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動が葉酸欠乏による新生ニューロン成熟異常の分子基盤の一端に関わるものと考えられる。

第 3 章 葉酸欠乏マウスで観察される異常に対するメチル基供与体、および抗うつ薬の作用

第 2 章では、葉酸欠乏条件下における培養神経幹細胞を用いて、葉酸欠乏性のニューロン成熟異常に DNA の低メチル化を起因とするニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動が関与する可能性を見出した。

前述のように DNA のメチル化反応では、DNA メチル基転移酵素の触媒によりメチル基供与体である SAM から CpG 部位のシトシンにメチル基が付加されることが知られている。これまでに、葉酸欠乏状態を伴ったうつ病患者において脳脊髄液中の SAM 濃度が減少していることや (68)、ラットにおいて葉酸欠乏飼料の摂取により肝臓や脳内の SAM 量が減少することが報告されており (69, 70)、葉酸欠乏により体内 SAM 量が減少するものと考えられる。一方で、臨床試験において、うつ病患者に対する SAM の単独投与はイミプラミンなどの三環系抗うつ薬と同程度の抗うつ作用を示すことや (71-75)、選択的セロトニン再取り込み阻害薬に反応しないうつ病患者に対して、葉酸を併用して投与することで抗うつ効果が見られることが報告されており (22)、生体内の SAM 量がうつ病の病態や治療において重要であることが示唆されている。

そこで本章では、葉酸欠乏性うつ症状に対する SAM の影響を評価するために、SAM の投与が葉酸欠乏性のニューロン成熟異常、ニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動およびうつ様行動が改善するか否かを検討した。

実験方法

3-1. 実験動物

1-1. に準ずる。

3-2. S-アデノシルメチオニンの投与

7 週齢時の対照マウスおよび葉酸欠乏マウスに saline、または saline に溶解した S-アデノシルメチオニン (*S*-adenosylmethionine; SAM, 50 mg/kg/day) を 1 日 1 回 14 日間、腹腔内投与し、9 週齢時に各種解析を行った (図 21)。

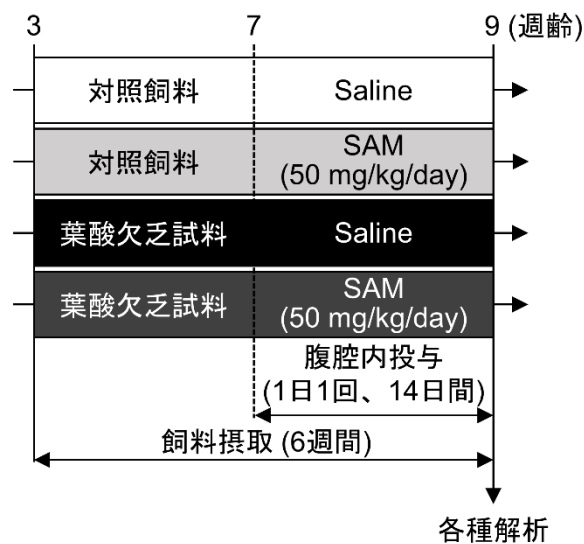


図 24. S-アデノシルメチオニンの投与スケジュール

3 週齢の ddY 系雄性マウスに対照飼料または葉酸欠乏飼料を 6 週間摂取させた。7 週齢時から SAM (50 mg/kg/day) を 14 日間腹腔内投与し、9 週齢時に各種解析を行った。

3-3. 免疫組織化学染色

1-10. に準ずる。ただし、使用した一次抗体および二次抗体は表 10 に示す通りである。

表 10. 免疫組織化学染色に使用した抗体

一次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	製造会社	
BrdU	1:500	Rat	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA	
NeuN	1:200	Mouse	Merck, Kenilworth, NJ, USA	
DCX	1:200	Goat	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	
c-Fos	1:10,000	Rabbit	Merck, Kenilworth, NJ, USA	
NeuroD1	1:1,000	Rabbit	Merck, Kenilworth, NJ, USA	
Tbr2	1:200	Rabbit	Abcam, Cambridge, MA, USA	

二次抗体				
抗原	希釈倍率	宿主	標識	製造会社
Goat IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mouse IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rabbit IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rabbit IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rabbit IgG	1:200	Goat	Biotin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Rat IgG	1:1,000	Donkey	Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3-4. Golgi-Cox 染色

1-11. に準ずる。

3-5. 強制水泳試験

1-4. に準ずる。

3-6. 統計学的解析

データは全て「平均値±標準誤差」として表し、統計学的処理には StatView 5.0 J (SAS Institute) を使用した。反復測定三元配置分散分析、あるいは二元配置分散分析の後に多重比較検定として Tukey-Kramer 検定を行い、 $P < 0.05$ のものを有意差ありとした。

実験結果

3-1. 葉酸欠乏下の海馬歯状回における神経新生異常に対する S-アデノシルメチオニンの作用

まず、葉酸欠乏による海馬歯状回の神経新生異常に対する SAM の作用を解析したところ、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察される BrdU/NeuN 二重陽性細胞数の減少 (図 25) および DCX 陽性細胞数の増加 (図 26) は、SAM (50 mg/kg/day) を 14 日間腹腔内投与することで対照群と同程度にまで改善することが明らかとなった。

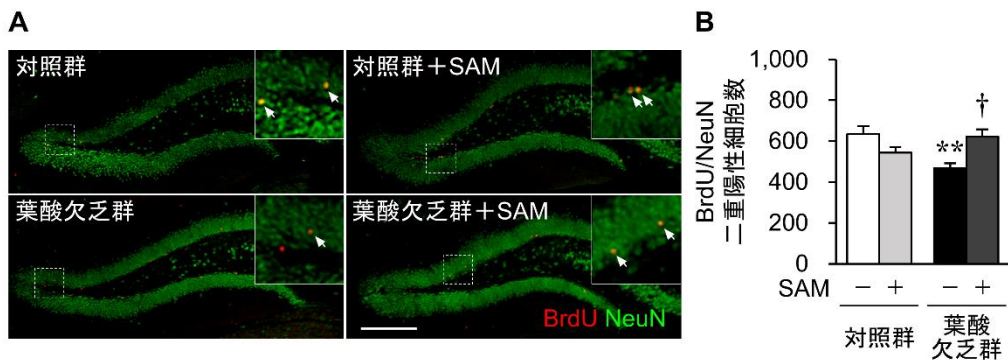


図 25. 葉酸欠乏による海馬歯状回における新生成熟ニューロン数の減少に対する SAM の作用

葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察された 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) の減少は、SAM (50 mg/kg/day) を 2 週間腹腔内投与することで改善した (A: 海馬歯状回における BrdU (赤) 陽性細胞および NeuN (緑) 陽性細胞の染色像、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)。二元配置分散分析の結果、交互作用 ($F_{1,39} = 14.19, P < 0.01$) が認められたが、飼料 ($F_{1,39} = 1.86, P = 0.18$) および薬物 ($F_{1,39} = 0.94, P = 0.34$) による主効果は認められなかった。n = 9-12。Scale bar = 200 μm 。 ** $P < 0.01$ vs. 対照群 SAM (-)、 † $P < 0.05$ vs. 葉酸欠乏群 SAM (-)。

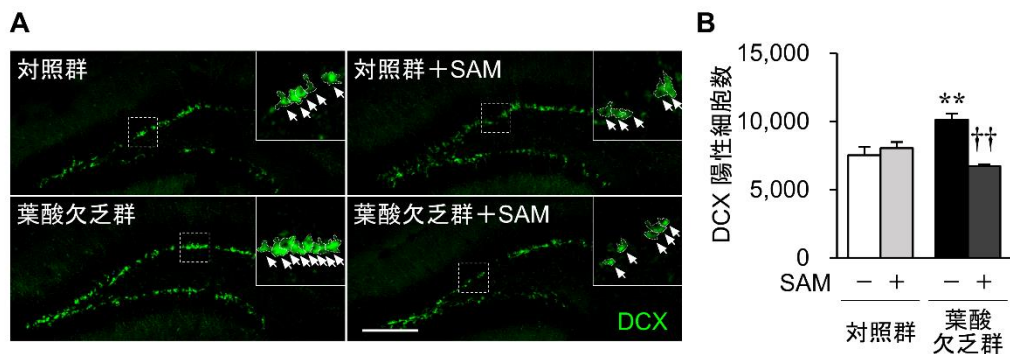


図 26. 葉酸欠乏による海馬歯状回における未熟ニューロン数の増加に対する SAM の作用

葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察された DCX 陽性細胞数 (未熟ニューロン数) の増加は、SAM (50 mg/kg/day) を 14 日間腹腔内投与することで改善した (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)。二元配置分散分析の結果、薬物による主効果 ($F_{1,15} = 9.28, P < 0.01$) と交互作用 ($F_{1,15} = 17.06, P < 0.01$) が認められたが、飼料による主効果 ($F_{1,15} = 1.83, P = 0.20$) は認められなかった。n = 5。Scale bar = 200 μm 。** $P < 0.01$ vs. 対照群 SAM (-), †† $P < 0.01$ vs. 葉酸欠乏群 SAM (-)。

3-2. 葉酸欠乏下の海馬歯状回ニューロンの樹状突起およびスパインの形態学的異常に対する S-アデノシルメチオニンの作用

次に、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察される樹状突起およびスパインの形態学的異常に対する SAM の作用について検討した。ゴルジ染色法による形態学的解析の結果、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察された樹状突起の複雑性の減少は SAM を 14 日間投与することで対照群と同程度にまで改善することが明らかとなった (図 27)。さらに、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察されたスパイン密度の減少 (図 28A, B)、および成熟スパイン数の減少 (図 28A, C) も、SAM を投与することで対照群と同程度まで改善した。

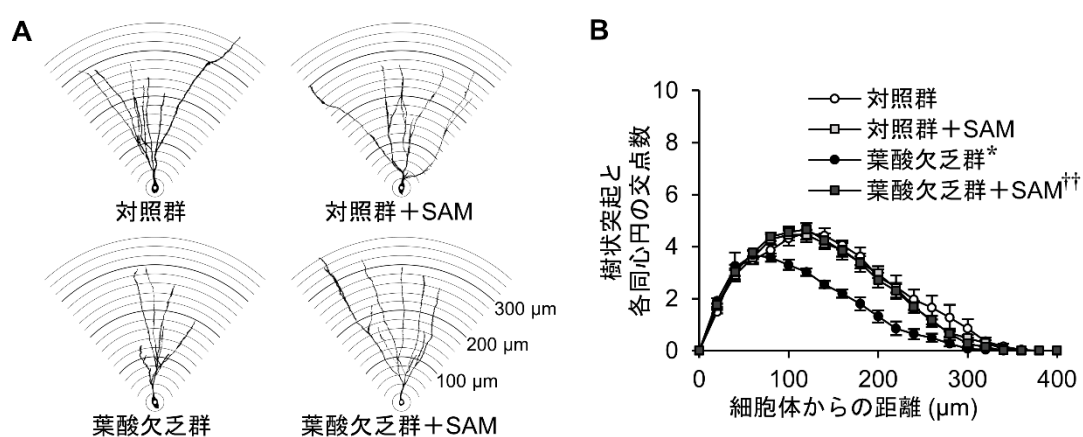


図 27. 葉酸欠乏による海馬歯状回における樹状突起の複雑性の低下に対する SAM の作用

ショールアナリシス法の結果、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回におけるニューロンで観察された各同心円と樹状突起の交点数の減少は、SAM (50 mg/kg/day) を 7 週齢時から 14 日間腹腔内投与することで対照群と同程度にまで改善した (A: ゴルジ染色により可視化された歯状回ニューロンのトレース像。B: 樹状突起の複雑性の解析結果)。反復測定三元配置分散分析の結果、飼料 ($F_{1, 304} = 10.31, P < 0.01$)、薬物 ($F_{1, 304} = 5.49, P < 0.05$)、および距離による主効果 ($F_{19, 304} = 311.35, P < 0.001$) とすべての要因間における交互作用 (飼料×薬物: $F_{1, 304} = 10.36, P < 0.01$ 、薬物×距離: $F_{19, 304} = 4.24, P < 0.001$ 、距離×飼料: $F_{19, 304} = 4.86, P < 0.001$ 、飼料×薬物×距離: $F_{19, 304} = 4.45, P < 0.001$) が認められた。n = 5。* $P < 0.05$ vs. 対照群 SAM (-), †† $P < 0.01$ vs. 葉酸欠乏群 SAM (-)。

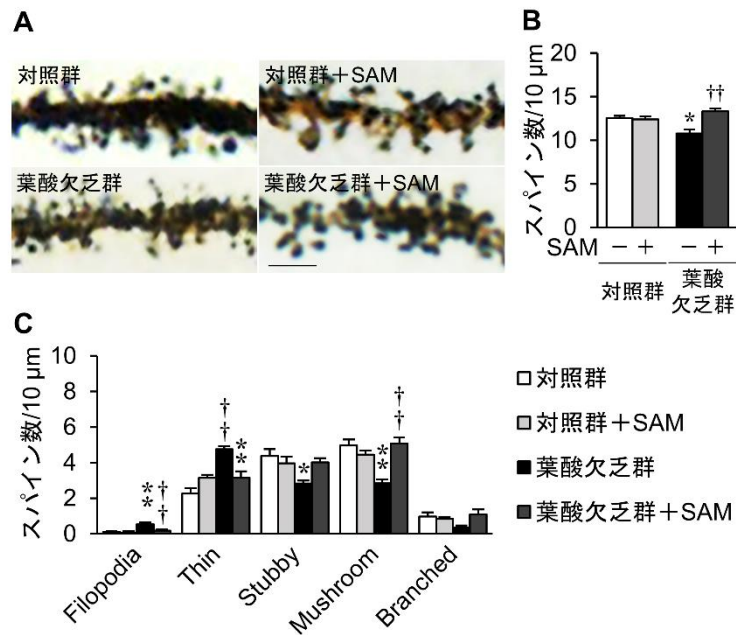


図 28. 葉酸欠乏による海馬歯状回におけるスパインの形態学的異常に対する SAM の作用

葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察されたスパイン密度の減少および成熟スパイン数の減少は、SAM (50 mg/kg/day) を 7 週齢時から 14 日間腹腔内投与することで改善した (A: ゴルジ染色により標識された樹状突起スパイン。B: スパイン密度の解析結果。C: 形態別スパイン数の解析結果)。二元配置分散分析の結果、スパイン密度の解析 (B) において飼料による主効果 ($F_{1,20} = 11.71, P < 0.01$) および交互作用 ($F_{1,20} = 15.23, P < 0.001$) が認められたが、薬物による主効果 ($F_{1,20} = 1.38, P = 0.25$) は認められなかった。また、形態別のスパイン数の解析 (C) において、Filopodia: 飼料 ($F_{1,20} = 9.68, P < 0.01$) および薬物による主効果 ($F_{1,20} = 15.68, P < 0.001$) と交互作用 ($F_{1,20} = 6.48, P < 0.05$)、Thin: 薬物による主効果 ($F_{1,20} = 23.34, P < 0.001$) と交互作用 ($F_{1,20} = 23.34, P < 0.001$)、Stubby: 飼料による主効果 ($F_{1,20} = 5.99, P < 0.05$) と交互作用 ($F_{1,20} = 6.92, P < 0.05$)、Mushroom: 飼料 ($F_{1,20} = 8.91, P < 0.01$) および薬物による主効果 ($F_{1,20} = 6.73, P < 0.05$) と交互作用 ($F_{1,20} = 23.04, P < 0.001$)、Branched: 交互作用 ($F_{1,20} = 4.92, P < 0.05$) が認められたが、Thin: 飼料による主効果 ($F_{1,20} = 1.95, P = 0.18$)、Stubby: 薬物による主効果 ($F_{1,20} = 1.65, P = 0.21$)、Branched: 飼料 ($F_{1,20} = 0.80, P = 0.38$) および薬物による主効果 ($F_{1,20} = 2.42, P = 0.14$) は認められなかった。n = 6。Scale bar = 2 μm。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 对照群 SAM (-)、†† $P < 0.01$ vs. 葉酸欠乏群 SAM (-)。

3-3. 葉酸欠乏下の海馬歯状回における神経活動低下に対する S-アデノシルメチオニンの作用

前項において、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回における樹状突起およびスパインの形態異常は SAM により改善することが明らかとなった。そこで、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察されるストレス負荷時の神経活動低下に対しても SAM が改善作用を示すか否かを c-Fos 陽性細胞数を指標に解析した。その結果、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回において減少していた c-Fos 陽性細胞数は、SAM の投与により対照マウスと同程度にまで回復することが明らかとなった (図 29)。

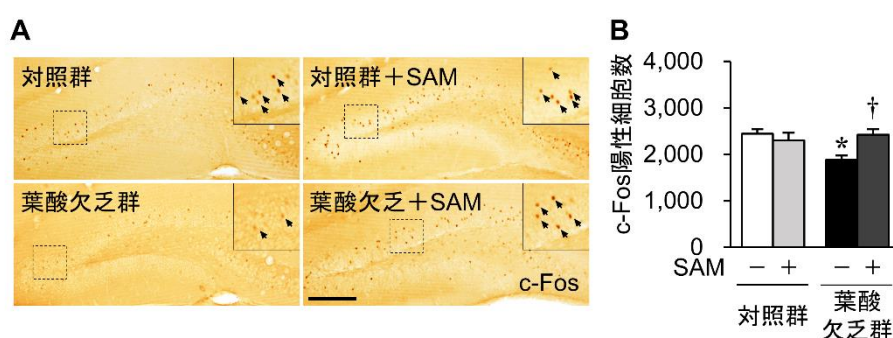


図 29. 葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察されるニューロンのストレス応答異常に対する SAM の作用

葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察された c-Fos 陽性細胞数の減少は、SAM (50 mg/kg/day) を 7 週齢時から 14 日間腹腔内投与することで改善した (A: 海馬歯状回における c-Fos 陽性細胞 (茶) の染色像、矢印は c-Fos 陽性細胞を示す。B: c-Fos 陽性細胞数の解析結果)。二元配置分散分析の結果、飼料 ($F_{1,16} = 12.14, P < 0.05$) および薬物による主効果 ($F_{1,16} = 6.83, P < 0.05$) が認められたが、交互作用 ($F_{1,16} = 1.27, P = 0.28$) は認められなかった。n = 5。Scale bar = 200 μm 。* $P < 0.05$ vs. 対照群, † $P < 0.05$ vs. SAM (-)。

3-4. 葉酸欠乏下の海馬歯状回におけるニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動に対する S-アデノシルメチオニンの作用

葉酸欠乏によるニューロン成熟異常が SAM の投与により改善したことから、次にニューロン成熟異常の原因と考えられるニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動に対する SAM の作用について解析した。第 2 章において葉酸欠乏により顕著な発現変動が見られた *Eomes* と *Neurod1* について、それぞれの遺伝子転写・翻訳産物であり転写因子として機能する Tbr2 および NeuroD1 の陽性細胞数を免疫組織化学染色により解析した。その結果、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 Tbr2 陽性細胞数が有意に増加すること (図 30)、NeuroD1 陽性細胞数が有意に減少すること (図 31) が明らかとなり、葉酸欠乏条件下の培養神経幹細胞と類似した結果が観察された。葉酸欠乏マウスで観察される海馬歯状回の Tbr2 陽性細胞数の増加と NeuroD1 陽性細胞数の減少は、SAM を 14 日間投与した葉酸欠乏マウスでは観察されなかった (図 30、図 31)。

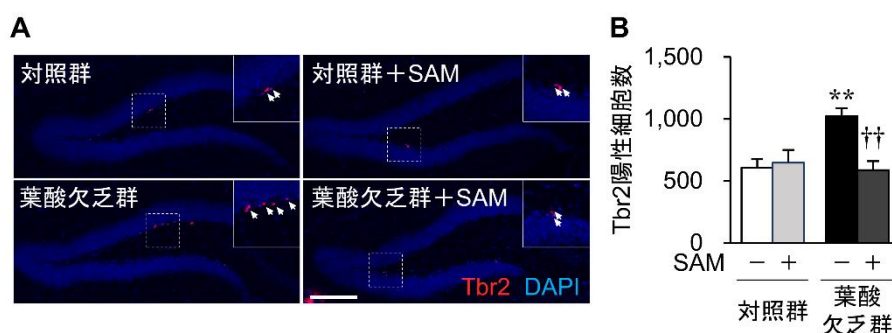


図 30. 葉酸欠乏および SAM が海馬歯状回における Tbr2 陽性細胞数に及ぼす影響

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 Tbr2 陽性細胞数が有意に増加していた。また、葉酸欠乏マウスに SAM (50 mg/kg/day) を 14 日間腹腔内投与することで海馬歯状回における Tbr2 陽性細胞数の有意な減少が認められた (A: 海馬歯状回における Tbr2 (赤) 陽性細胞の染色像、矢印は Tbr2 陽性細胞を示す。B: Tbr2 陽性細胞数の解析結果)。二元配置分散分析の結果、飼料 ($F_{1,16}=5.23, P<0.05$) および薬物による主効果 ($F_{1,16}=6.52, P<0.05$) と交互作用 ($F_{1,16}=9.28, P<0.01$) が認められた。n=5。Scale bar=200 μm 。
** $P<0.01$ vs. 対照群 SAM (-), †† $P<0.01$ vs. 葉酸欠乏群 SAM (-)。

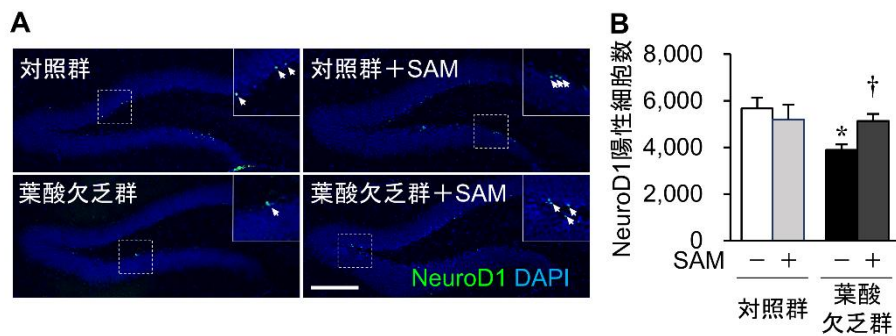


図 31. 葉酸欠乏および SAM が海馬歯状回における NeuroD1 陽性細胞数に及ぼす影響

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 NeuroD1 陽性細胞数が有意に減少していた。また、葉酸欠乏マウスに SAM (50 mg/kg/day) を 14 日間腹腔内投与することで海馬歯状回における NeuroD1 陽性細胞数の有意な増加が認められた (A: 海馬歯状回における NeuroD1 (緑) 陽性細胞の染色像、矢印は NeuroD1 陽性細胞を示す。B: NeuroD1 陽性細胞数の解析結果)。二元配置分散分析の結果、交互作用 ($F_{1,24} = 12.64, P = 0.094$) が認められたが、飼料 ($F_{1,24} = 0.12, P = 0.73$) および薬物による主効果 ($F_{1,24} = 3.09, P = 0.092$) は認められなかった。n = 7。Scale bar = 200 μm 。* $P < 0.05$ vs. 対照群 SAM (-), † $P < 0.05$ vs. 葉酸欠乏群 SAM (-)。

3-5. 葉酸欠乏性うつ様行動に対する S-アデノシルメチオニンの作用

これまでの検討から、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察されるニューロンの成熟異常が SAM により改善することが明らかになったことから、次に葉酸欠乏マウスのうつ様行動に対する SAM の作用について解析した。その結果、葉酸欠乏マウスで観察される強制水泳試験における無動時間の増加は、SAM の投与により対照群と同程度にまで減少し (図 32)、葉酸欠乏性のうつ様行動も SAM 投与により改善されることが明らかになった。

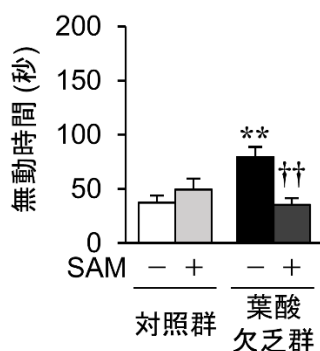


図 32. 葉酸欠乏により引き起こされるうつ様行動に対する SAM の作用

葉酸欠乏マウスで観察される強制水泳試験における無動時間の有意な増加といったうつ様行動は、SAM (50 mg/kg/day) を 7 週齢時から 14 日間腹腔内投与することで改善した。二元配置分散分析の結果、交互作用 ($F_{1,71}=11.12, P<0.05$) が認められたが、薬物 ($F_{1,71}=3.53, P=0.065$) および飼料による主効果 ($F_{1,71}=2.77, P=0.10$) は認められなかった。n = 18-21。
** $P < 0.01$ vs. 対照群 SAM (-), †† $P < 0.01$ vs. 葉酸欠乏群 SAM (-)。

考察

本章では、第 1 章と第 2 章で見出した葉酸欠乏によるうつ様行動、ニューロンの成熟異常、ニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動に対する SAM 投与の影響について検討を行った。その結果、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回で観察される神経新生の低下や未熟ニューロン数の増加、樹状突起の長さ・分岐数の減少、成熟スパイン数の減少、ストレス負荷に対する神経活動の低下などの異常は、SAM の投与により改善されることが明らかとなった。また、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では、Tbr2 陽性細胞数の増加や NeuroD1 陽性細胞数の減少といった培養神経幹細胞と同様の遺伝子発現変動が観察され、これら両因子の発現変動は SAM 投与により対照群と同程度の発現レベルとなることを見出した。さらに、葉酸欠乏マウスで見られる強制水泳試験における無動時間の増加といったうつ様行動も、SAM により改善することを明らかにした。以上の結果より、葉酸欠乏性の種々の異常は SAM 生合成の低下により体内 SAM 量が減少することで生じる可能性が示された。

本研究成果から、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序として、図 36 に示すようなメカニズムを推測している。すなわち、葉酸欠乏によりメチル基供与体である SAM の生合成が減少することで体内 SAM 量が不足し、ニューロンの成熟に必要な DNA のメチル化が十分に生じないことで、ニューロン分化・成熟関連遺伝子の正常な遺伝子発現変動が起こらず、海馬歯状回の新生ニューロンの成熟が形態的・機能的にも抑制されるものと考えられる。

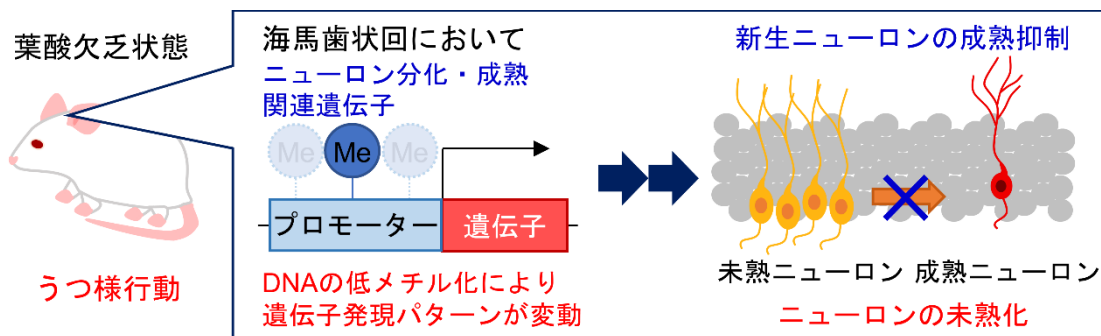


図 36. 葉酸欠乏性うつ症状の発症機序仮説

葉酸欠乏は海馬歯状回において DNA 低メチル化を引き起こすことでニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現パターンを変動させる。この遺伝子発現パターンの変動により、海馬歯状回における新生ニューロンの成熟が抑制され、ニューロンの成熟が形態的・機能的に抑制されることでうつ様行動の誘発につながるものと考えられる。

総括

本研究では、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序を解明することを目的として、葉酸欠乏マウス、および葉酸欠乏条件下で培養した神経幹細胞を用いて種々の検討を行った。

第1章では、葉酸欠乏によりうつ様行動と海馬歯状回におけるニューロンの成熟異常が生じることを見出した。第2章では、葉酸欠乏によるニューロンの成熟異常の分子基盤として、ニューロン分化・成熟関連遺伝子におけるエピゲノム修飾の異常とそれに伴う遺伝子発現の変動を見出した。第3章では、葉酸欠乏により生じる異常に対してメチル基供与体であるSAMが改善作用を示すことを見出した。

本結果は、疫学調査で示唆された葉酸欠乏性うつ症状の発症機序として、エピゲノム修飾異常に起因する海馬歯状回のニューロンの成熟異常という新たなメカニズムを提唱するものである。また、統合失調症や双極性障害といった幅広い精神疾患においても同様のニューロンの成熟異常が報告されていることから、葉酸欠乏はうつ病のみならず、様々な精神疾患のリスクとなる可能性も無視できない。加えて本研究では、血中葉酸濃度が低いうつ病患者は、海馬歯状回においてニューロンの成熟異常が生じているため、抗うつ薬に対して治療抵抗性と示す可能性も見出した。本研究で明らかにした葉酸欠乏性うつ症状の発症機序は、ストレス負荷動物での解析から提唱されてきたうつ症状の発症機序とは異なるものであり、既存の抗うつ薬で有効性が認められない患者に対する新たな治療法の開発などへの応用が期待される。

身近な栄養素である葉酸が成体においてもエピゲノム修飾に影響を及ぼし、疾患の発症につながることは、疾患の予防や治療を考えるうえで非常に重要な知見である。現在、本邦における葉酸の推奨摂取量は240 µg/日（妊婦を除く）と定められており、ほとんどの国民がこれを満たしているとされる。しかしながら、世界保健機関の附属機関が策定した摂取基準量やアメリカをはじめとする諸外国の推奨摂取量は、本邦の推奨摂取量よりも多い400 µg/日とされている。人種の違いなどを考慮する必要はあるものの、本邦の多くの国民は400 µg/日の摂取を満たしていないことから、葉酸欠乏状態に陥っている可能性も考えられる。葉酸欠乏症として広く認知されている症状は巨赤芽球性貧血であるが、本研究結果から、貧血症状よりもうつ症状の方が起こりやすい可能性が示されており、本邦では潜在的に多くの国民が葉酸欠乏によるうつ病のリスクを抱えている可能性も否定できない。一部の国では小麦粉に葉酸を添加することなどが義務付けられるなど葉酸摂取への意識の高さが窺える。一方で、本邦の葉酸の推奨摂取量の低さは葉酸摂取の意識の低さを表すものかもしれない。本研究結果から、うつ病態における葉酸の重要性を提示できたことで、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。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室教授、矢部 武士先生に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数多くの御指導、御助言を頂きました、摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室講師、荒木 良太先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、実験に御協力いただきました太田 圭祐学士、竹中 裕子学士、原田 郁代学士、浅利 颯太氏、橘 新氏、中島 裕紀氏、岩雲 有海氏をはじめ、摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室の卒業生ならびに在校生の皆様に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、援助していただきました、日本学術振興会（本研究は、日本学術振興会特別研究員奨励費 17J03416 の助成による）に厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで長きに渡る学生生活を陰ながらいつも応援してくれた両親、家族ならびに親族一同に深く感謝いたします。

引用文献

1. 厚生労働省 平成 29 年患者調査.
2. 川上 憲人 精神疾患の有病率等に関する大規模疫学調査研究：世界精神保健日本調査セカンド (2016).
3. 厚生労働省 平成 30 年中における自殺の状況.
4. World Health Organization, Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates (2017).
5. Debra, L.F. *et al.* Major depression and the metabolic syndrome. *Twin Res Hum Genet* **13** (4), 347–358 (2010).
6. Kaner G.*et al.* Evaluation of Nutritional Status of Patients with Depression. *Biomed Res Int.*, 521481, 9 pages (2015).
7. Anderson, O. S., Sant, K. E., Dolinoy, D. C. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *The Journal of nutritional*
8. 厚生労働省 日本人の食事摂取基準 (2015 年版).
9. 厚生労働省 平成 29 年 国民健康・栄養調査.
10. Huether, S. E., McCance, K. L. *Understanding pathophysiology*. Sixth edition. edn, (2016).
11. Bailey, L. B. *et al.* Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. *The Journal of nutrition* **145**, 1636S-1680S (2015).
12. Desai, A., Sequeira, J. M., Quadros, E. V. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie* **126**, 31-42 (2016).
13. Czeizel, A. E. *et al.* Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients* **5**, 4760-4775 (2013).
14. Carney, M. W. *et al.* Red cell folate concentrations in psychiatric patients. *Journal of affective disorders* **19**, 207-213 (1990).
15. Carney, M. W., Sheffield, B. F. Serum folic acid and B12 in 272 psychiatric in-patients. *Psychological medicine* **8**, 139-144 (1978).
16. Ghadirian, A. M., Ananth, J., Engelsmann, F. Folic acid deficiency and depression. *Psychosomatics* **21**, 926-929 (1980).
17. Reynolds, E. *et al.* Folate deficiency in depressive illness. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* **117**, 287-292 (1970).
18. Morris, D. W., Trivedi, M. H., Rush, A. J. Folate and unipolar depression. *Journal of alternative and complementary medicine* **14**, 277-285 (2008).
19. Gilbody, S., Lightfoot, T., Sheldon, T. Is low folate a risk factor for depression? A meta-analysis and exploration of heterogeneity. *J Epidemiol Community Health* **61**, 631-637 (2007).

20. Bender, A., Hagan, K. E., Kingston, N. The association of folate and depression: A meta-analysis. *J Psychiatr Res* **95**, 9-18 (2017).
21. Farah, A. The role of L-methylfolate in depressive disorders. *The Journal of CNS Spectrums*, **14**, 2-7 (2009).
22. Coppen A, Bailey J. Enhancement of the antidepressant action of fluoxetine by folic acid: a randomised, placebo controlled trial. *The Journal of Affective Disorders*, **60**, 121-130 (2000).
23. Folstein, M. *et al.* The homocysteine hypothesis of depression. *The American journal of psychiatry* **164**, 861-867 (2007).
24. Young, S. N. Folate and depression a neglected problem. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* **32**, 80-82 (2007).
25. Boldrini, M. *et al.* Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology* **38**, 1068–1077 (2013).
26. Eisch, A. J., Petrik, D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* **338**, 72–75 (2012).
27. Santarelli, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805–809 (2003).
28. Malberg, J. E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J. Psychiatry Neurosci.* **29**, 196–205 (2004).
29. Yun, S. *et al.* Re-evaluating the link between neuropsychiatric disorders and dysregulated adult neurogenesis. *Nat. Med.* **22**, 1239–1247 (2016).
30. Levone, B. R., Cryan, J. F., O'Leary, O. F. Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiol Stress* **1**, 147-155 (2015).
31. Mirescu, C., Gould, E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* **16**, 233-238 (2006).
32. Jessica, E. *et al.* Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience* **20** (24), 9104-9110 (2000).
33. Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438 (2000).
34. Naughton, M., Dinan, T. G., Scott, L. V. Corticotropin-releasing hormone and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in psychiatric disease. *Handb Clin Neurol* **124**, 69-91 (2014).
35. Murphy, B. E. Steroids and depression. *J Steroid Biochem Mol Biol* **38**, 537-559 (1991).
36. Vreeburg, S. A. *et al.* Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Arch Gen Psychiatry* **66**, 617-626 (2009).
37. Arana, G. W., Baldessarini, R. J., Ornstein, M. The dexamethasone suppression test for diagnosis and prognosis in psychiatry. Commentary and review. *Arch Gen Psychiatry* **42**, 1193-1204 (1985).

38. Rubin, R. T., Phillips, J. J., McCracken, J. T. & Sadow, T. F. Adrenal gland volume in major depression: relationship to basal and stimulated pituitary-adrenal cortical axis function. *Biol Psychiatry* **40**, 89-97 (1996).
39. Morais, M. *et al.*, The effects of chronic stress on hippocampal adult neurogenesis and dendritic plasticity are reversed by selective MAO-A inhibition. *J Psychopharmacol* **28**, 1178-1183 (2014).
40. Qu, Y. *et al.* Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. *Acta Neuropsychiatr* **30**, 117-122 (2018).
41. Higuchi, F. *et al.* Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *The Journal of Neuroscience* **36**, 7253–7267 (2016).
42. Yamasaki, N. *et al.* Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Mol Brain* **1**, 6 (2008).
43. Takao, K. *et al.* Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **38**, 1409-1425 (2013).
44. Ohira, K. *et al.* Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol Brain* **6**, 12 (2013).
45. Hagihara, H., Takao, K., Walton, N. M., Matsumoto, M. & Miyakawa, T. Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plast* 318596 (2013).
46. Chen, J. *et al.* Effects of chronic mild stress on behavioral and neurobiological parameters - Role of glucocorticoid. *Horm Behav* **78**, 150-159 (2016).
47. Apple, D. M., Solano-Fonseca, R. & Kokovay, E. Neurogenesis in the aging brain. *Biochem Pharmacol* **141**, 77-85 (2017).
48. Van Putten, L. M. The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 *in vivo*. *Blood* **13**, 789-794 (1958).
49. Rhee, K. D., Yu, J., Zhao, C. Y., Fan, G. & Yang, X. J. Dnmt1-dependent DNA methylation is essential for photoreceptor terminal differentiation and retinal neuron survival. *Cell death & disease* **3**, e427 (2012).
50. Wu, H. *et al.* Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* **329**, 444-448 (2010).
51. Noguchi, H. *et al.* Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neuroscience research* **95**, 1-11 (2015).
52. Feng, J. *et al.* Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature neuroscience* **13**, 423-430 (2010).
53. Nguyen, S., Meletis, K., Fu, D., Jhaveri, S., Jaenisch, R. Ablation of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in the nervous system leads to neuromuscular defects and shortened lifespan. *Dev Dyn* **236**, 1663-1676 (2007).

54. Fan, G. *et al.* DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* **132**, 3345-3356 (2005)
55. Pereira, J. D. *et al.* Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15957-15962 (2010).
56. Lim, D. A. *et al.* Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature* **458**, 529-533 (2009).
57. Hodge, R. D. *et al.* Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 3707-3717 (2008).
58. Schuurmans, C. *et al.* Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J* **23**, 2892-2902 (2004).
59. Kim, E. J. *et al.* Spatiotemporal fate map of neurogenin1 (Neurog1) lineages in the mouse central nervous system. *J Comp Neurol* **519**, 1355-1370 (2011).
60. Hodge, R. D. *et al.* Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 6275-628 (2012).
61. Mihalas, A. B. *et al.* Intermediate Progenitor Cohorts Differentially Generate Cortical Layers and Require Tbr2 for Timely Acquisition of Neuronal Subtype Identity. *Cell Rep* **16**, 92-105 (2016).
62. Sessa, A. *et al.* The Tbr2 Molecular Network Controls Cortical Neuronal Differentiation Through Complementary Genetic and Epigenetic Pathways. *Cereb Cortex* **27**, 5715 (2017).
63. Gao, Z. *et al.* Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nature neuroscience* **12**, 1090-1092 (2009).
64. Pataskar, A. *et al.* NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. *EMBO J* **35**, 24-45 (2016).
65. Boutin, C. *et al.* NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (2010).
66. Smrt, R. D. *et al.* MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1. *Stem Cells* **28**, 1060-1070 (2010).
67. Sargin, D. *et al.* CREB regulates spine density of lateral amygdala neurons: implications for memory allocation. *Front Behav Neurosci* **7**, 209 (2013).
68. Bottiglieri, T. *et al.* Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**, 228-232 (2000).

69. Miller, J. W. *et al.* Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J* **298**, 415-419 (1994).
70. Ordonez, L. A., Wurtman, R. J. Folic acid deficiency and methyl group metabolism in rat brain: effects of L-dopa. *Arch Biochem Biophys* **160**, 372-376 (1974)
71. Miccoli, L., Porro, V., Bertolino, A. Comparison between the antidepressant activity of S-adenosylmethionine (SAME) and that of some tricyclic drugs. *Acta Neurol (Napoli)* **33**, 243-255 (1978).
72. Scarzella, R., Appiotta, A. Confronto clinico in doppio cieco della SAME versus clorimipramina nelle sindromi depressive. *Riv Sper Freniatr Med Leg Alien Ment* **102**, 359-365 (1978).
73. Monaco, P., Quattrocchi, F. Study of the antidepressive effects of a biological transmethylation agent (S-adenosyl-methionine or SAM) . *Riv Neurol* **49**, 417-439 (1979).
74. Küfferle, B., Grünberger, J. Early clinical double-blind study with S-adenosyl-L-methionine: a new potential antidepressant. *Adv Biochem Psychopharmacol* **32**, 175-180 (1982).
75. Janicak, P. G. *et al.* S-adenosylmethionine in depression. A literature review and preliminary report. *Ala J Med Sci* **25**, 306-313 (1988).