

別紙 1

## 博士論文要旨

論文題目 : 葉酸欠乏性うつ症状の発症機序に関する研究  
—海馬歯状回におけるニューロン成熟異常の関与—

申請者 西田 将治 印

専攻分野 医療薬学専攻

研究指導分野 臨床薬学分野

指導教員 矢部 武士

うつ病は、精神機能障害に伴う著しい精神的苦痛や社会機能低下をもたらす慢性疾患である。大規模疫学調査の結果から、本邦におけるうつ病の生涯有病率は5.7%とされており、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。また厚生労働省は、自殺動機の最上位がうつ病であることや、うつ病による本邦の経済損失額は年間約2.7兆円にのぼることを公表しており、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と考えられる。

現在のうつ病治療における主軸の一つが、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成果を挙げている。しかしながら、抗うつ薬抵抗性の患者や副作用を伴う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はないことがうかがえる。

近年、うつ病患者では血中のビタミン量や脂肪酸量が低いことが報告されるなど、うつ病の発症に食・栄養の関与が指摘されている。なかでもビタミンB群の一つである葉酸は、その体内量とうつ症状との間に高い相関性が見られることが疫学調査から明らかになっており、葉酸欠乏がうつ病のリスクファクターとなる可能性が示されている。しかしながら、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序の詳細は不明である。

本研究では、葉酸欠乏飼料を摂取したマウスでうつ様行動が出現するかを確認するとともに、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序解明を目的に、海馬歯状回での神経新生やエピゲノム修飾への影響を指標に検討を行った。

## 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

本章では、葉酸欠乏性うつ症状の発症機序を解明するにあたり、まず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。3週齢の ddY 系雄性マウスに葉酸欠乏飼料を与えて飼育し、9週齢時に血清葉酸濃度を測定したところ、対照飼料を与えたマウスと比べて血清葉酸濃度が大きく減少しており、葉酸欠乏状態であることを確認できた。こうして作製した葉酸欠乏マウスでは強制水泳試験において無動時間の増加といったうつ様行動が観察され、ヒトの疫学調査結果を実験動物で再現できるマウスの作製に成功したものと考えられた。そこで、本マウスを用いて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を免疫組織化学染色により評価した。その結果、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では新生成熟ニューロン数が減少しており、神経新生が抑制されていることが明らかになった。一方で、神経系前駆細胞の数や細胞増殖に変化がないことや未熟ニューロン数の増加が見られたことから、葉酸欠乏による神経新生の抑制は新生ニューロンの成熟過程の抑制によるものと推察された。また、ゴルジ染色法によるニューロンの形態学的解析から、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では樹状突起の長さや分岐数といった複雑性が低下することや、スパイン密度や成熟スパイン数が減少することを見出した。さらに葉酸欠乏マウスでは、ストレス負荷後における海馬歯状回の c-Fos (神経活動マーカー) 陽性細胞数が減少しており、ストレス応答性の神経活動が低下しているものと考えられた。

以上の結果から、葉酸欠乏下の海馬歯状回において新生ニューロン成熟異常が生じることや、樹状突起の複雑性の低下やスパイン形態の未熟化などのニューロン形態異常のみならず、ストレス応答性神経活動の低下といった機能的異常が引き起こされることが明らかとなり、これらの異常が葉酸欠乏によるうつ様行動に関与するものと推察された。

## 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

本章では、葉酸欠乏による新生ニューロン成熟異常の分子基盤を明らかとすることを目的に、マウス胎仔脳からニューロスフェア法により調製した培養神経幹細胞を用いて遺伝子発現解析、エピゲノム修飾解析を行った。培養神経幹細胞を葉酸欠乏培地で7日間分化させたところ、Tuj1 (ニューロンマーカー) 陽性細胞数の有意な増加、MAP2 (成熟ニューロンマーカー) 陽性細胞数の有意な減少が観察され、本培養系においても葉酸欠乏マウスと類似した新生ニューロン成熟異常が生じることを確認できた。そこで、ニューロン分化・成熟関連遺伝子群の発現変動に対する葉酸欠乏の影響を明らかにするために、本培養系において各遺伝子の mRNA 発現量を定量的 real-time PCR 法にて解析した。その

結果、葉酸欠乏条件下では神経幹細胞の増殖・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 発現量が減少していた。一方、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、葉酸欠乏により増加していた。葉酸は DNA やヒストンのメチル化のような遺伝子発現を制御するエピゲノム修飾に関与することから、葉酸欠乏によるエピゲノム修飾の異常がニューロン分化・成熟関連遺伝子の発現変動を引き起こしているものと考えられる。そこで、葉酸欠乏条件下における培養神経幹細胞のメチル化シトシン量とメチル化ヒストン H3 量を解析した結果、葉酸欠乏により全ゲノム中においてメチル化シトシン量およびヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) 量の減少が見られた。一方、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3) 量、4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) 量、36 番目のリジンのトリメチル化 (H3K36me3) 量に変動は見られなかった。次に、葉酸欠乏により発現変動が見られた遺伝子の転写開始点付近における DNA 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、*Neurog1* と *Eomes* では、メチル化シトシン量が有意に減少しており、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 *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が、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。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。

以上の結果から、葉酸欠乏による新生ニューロンの成熟異常に DNA の低メチル化に起因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が示唆された。

### 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

食物などから摂取された葉酸は体内に吸収された後、代謝過程を経てテトラヒドロ葉酸へと変換される。テトラヒドロ葉酸はビタミン B<sub>12</sub> 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 (SAM) が生合成される。したがって、葉酸欠乏による SAM 生合成の低下が DNA やヒストンのメチル化の減少を招き、新生ニューロンの成熟異常やうつ様行動が誘発されるものと推測される。

そこで本章では、葉酸欠乏により誘発される新生ニューロンの成熟異常やうつ様行動に対して SAM の投与が改善効果を示すか否かを検討した。葉酸欠乏下の海馬歯状回で観察される新生成熟ニューロン数の減少および未熟ニューロン数の増加は、SAM (50 mg/kg/day, i.p.) を 14 日間投与することで改善された。また、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形態的異常およびストレス負荷時の神経活動の低下についても SAM 投与により改善されたこ

とから、SAMの不足が葉酸欠乏によるニューロンの成熟異常に関与するものと考えられた。次に、第2章での検討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、それぞれの遺伝子の転写・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、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では *Tbr2* 陽性細胞数が増加することや *NeuroD1* 陽性細胞数が減少することが明らかとなり、葉酸欠乏条件下の培養神経幹細胞と同様の遺伝子発現変動を *in vivo* においても確認することができた。両因子の発現変動についても SAM 投与により対照群と同程度の発現レベルとなることが明らかとなった。さらに、SAM は葉酸欠乏マウスで見られた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改善した。

以上の結果から、葉酸欠乏により SAM の生合成が減少し、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抑制される可能性が示唆された。この海馬歯状回における新生ニューロンの成熟異常がうつ様行動につながるものと推測している。

以上、海馬歯状回における新生ニューロンの成熟異常が葉酸欠乏性うつ症状の発症機序の一端である可能性を見出した。本研究成果から、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。