

令和元年6月10日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15399

研究課題名（和文）DNAメチル化を指標とした、被虐待児の脳神経細胞発達に関する検討

研究課題名（英文）Development of a biomarker for clarifying the antemortem experiences using DNA methylation of the NR3C1 promoter region in brains from pediatric victims of physical abuse

研究代表者

小湊 慶彦（Kominato, Yoshihiko）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30205512

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：子どもの虐待には、身体的な障害の他に、子どもの脳発達に悪影響を及ぼすことが明らかとなってきた。我々は虐待例と突然死例各4例における神経細胞の核受容体NR3C1遺伝子プロモーターのDNAメチル化を調べたところ、頭部外傷を伴う虐待例では海馬の神経細胞において、転写因子結合サイトのDNAメチル化増加があり、頭部外傷を伴わない虐待例ではDNAメチル化増加が観察されず、小脳の神経細胞においては虐待例と突然死例ともにDNAメチル化の増加は検出されなかった。以上から、生前の精神的ストレスが神経細胞のDNAメチル化という変化を惹起した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子どもの虐待には身体的な障害の他に子どもの脳発達に悪影響を及ぼすことが明らかとなってきた。また、動物実験やヒトにおける研究から、早期の有害なライフストレスが脳の神経細胞にDNAメチル化を引き起こすことが示されてきた。我々は法医解剖事例の脳を用いて虐待と神経細胞の核受容体遺伝子プロモーターのDNAメチル化の関係を調べ、頭部外傷を伴う虐待例ではDNAメチル化の増加を明らかにした。神経細胞のDNAメチル化という後天性変化が生前の精神的ストレスのバイオマーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Diagnostic confirmation of child abuse at autopsy is a critical task for forensic pathologists. In such cases, retrieval of information on the antemortem experiences of deceased infants is crucial. Early life stress (ELS) has been suggested to cause epigenetic changes to genes in the brain, such as the Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1 gene (NR3C1). Conversely, evaluation of the epigenetic status in the postmortem brain might provide clues to the antemortem ELS experience. We examined DNA methylation of the 1F promoter region of NR3C1 in the postmortem brains of eight children including four ELS cases. As a result, DNA methylation was evident in ELS cases due to severe physical abuse. Epigenetic status may have potential application as a biomarker for clarifying the antemortem experiences of deceased.

研究分野：法医学

キーワード：子どもの虐待 神経細胞 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

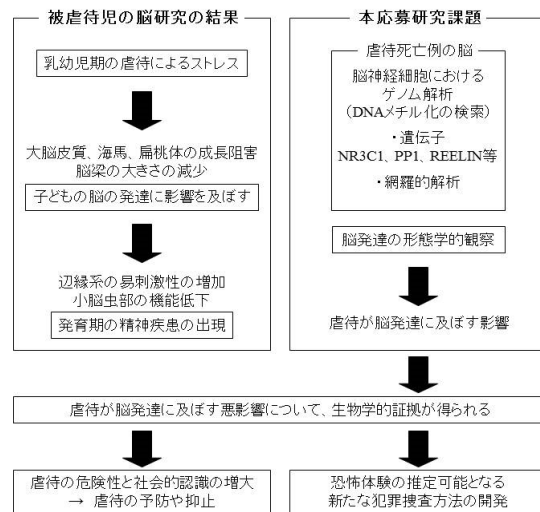
法医解剖において子どもが虐待により死亡事件死亡したことを確認することは重要である。虐待により DNA メチル化を受けやすい解剖学的な部位とゲノム領域が文献的に明らかにされている。例えば、DNA メチル化を受けやすい解剖学的な部位とゲノム領域として、海馬神経細胞における核受容体遺伝子プロモーターが知られている。そこで、法医解剖に供されたご遺体の脳を用いて、海馬神経細胞における核受容体遺伝子プロモーターの DNA メチル化を観察した。神経細胞の DNA メチル化という後天性変化が生前の精神的ストレスのバイオマーカーになる可能性が示唆された。

子どもの虐待には、身体的な障害の他に、精神障害の発生や虐待の世代間連鎖等の問題がある。早期の有害なライフストレス (ELSS) である虐待が子どもの脳発達に悪影響を及ぼし、精神障害の発生に関わることが脳の形態学的な検討から明らかとなってきた (下図)。

また、動物実験では ELSS がどのような変化を脳にもたらすかについて、分子レベルでの解析が進んでいる。さらに、海外ではヒトにおける研究もあり、末梢血、脳 (海馬) におけるグルココルチコイド受容体遺伝子 (NR3C1)、トロポミオシン受容体キナーゼ遺伝子 (TrkB) 等のメチル化解析や網羅的なメチル化解析も報告され、ELSS によ

って DNA メチル化が惹起されることが示されてきた。

それらの研究の一つを挙げると、ストレス状況下において、視床下部 - 下垂体 - 副腎システムが恒常性維持のために重要であり、コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) の発現はストレス下で一過性に増強され、その後に抑制を受けるが、その抑制に視床下部室傍核の神経細胞のグルココルチコイド受容体 (GR) が関わっており、メチル化 DNA の増加により GR 発現が抑制された場合には CRH が増加し精神的な問題を惹起することが提唱されている。自殺者脳を用いた研究では、子供



時代に虐待を受けたヒトではその GR 遺伝子 (正確には NR3C1 遺伝子) プロモーターにメチル化の増加が観察されている (McGowan et al, Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with child abuse. *Nature Neuroscience* 2009;12:342-348)。以上より、虐待を受けたヒトでは GR 発現が低下し、GR を介したネガティブフィードバックが働かず、CRH が増加した状態が続き、ストレスに対する抵抗性の低下や精神的な問題を生じやすくなるのではないかと推論されている。

動物実験では、恐怖体験により海馬で記憶抑制に関わる脱リン酸化酵素遺伝子 (PPI) のプロモーターがメチル化を受け、記憶形成に関わる遺伝子である REELIN のプロモーターが脱メチル化を受けること、等が報告されている (Miller CA, Sweatt JD, Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 2007;53, 857-869)。ヒトの研究もあるが、ヒトにおける研究では、研究材料が幼少期に虐待を受けた経験のある自殺者に由来する脳であったり、海馬に限定された研究であったり、DNA の由来が神経細胞に限定されていないなどの問題があり、更なる詳細な研究が必要である。

ところで、法医解剖に供されるご遺体では死亡と解剖の間に時間経過があるため、組

織の自己融解の問題がある。RNA は不安定で分解を受けるため、遺伝子の発現状況を RNA で調べることは困難である。一方、DNA やそのメチル化修飾体は比較的安定であるため、DNA メチル化というエピジェネティクスな生化学的指標は利用可能である。DNA メチル化は遺伝子発現の抑制につながるため、遺伝子の発現抑制状況をプロモーターのメチル化の程度から推測することが可能なため、虐待死亡事件例の解剖時に保存された脳から、海馬、小脳等についてパラフィン包埋切片を作製し、神経細胞から DNA を抽出し、DNA メチル化の検索を行うことは可能である。

2. 研究の目的

子どもの虐待死亡事例で法医解剖に供されたご遺体の脳を用いて、脳神経細胞を選択的に採取し、海馬や小脳歯状核の神経細胞におけるゲノム DNA のメチル化に関する検索を行い、虐待というストレスがゲノムの DNA メチル化に及ぼす影響について調べる。また、脳の DNA メチル化の検索に基づいて虐待の有無を判定する方法を開発する。

3. 研究の方法

子どもの虐待死亡例 4 例及び子どもの内因性急死例 4 例について、解剖時に保存された脳から海馬、小脳等についてパラフィン包埋標本を作製した。左右海馬、小脳歯状核からレーザーマイクロダイセクションシステム (ZEISS 社製 PALM) を利用して、神経細胞層を選択的に採取した。得られた細胞から QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出し、EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN 社)を用いてバイサルファイト処理を施した。*NR3C1* 遺伝子プロモーター 1F を標的に PCR を行った。用いたプライマーは 5'- TCTCTCTGGGGCGGCGTTAAGA-3', 5'-AAAGTACGTATGCGCCGACCC-3' であり、PCR 条件は、98 3分、59.8 30秒、68 1分の 35 サイクルであった。PCR 産物をクローニングベクター pUC118 に組み込み、大腸菌をトランスフォーメーション後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用いて各クローンの塩基配列を調べることでメチル化の検索を行った。

4. 研究成果

内因性急死例の海馬の神経細胞において核受容体遺伝子 *NR3C1* 遺伝子プロモーターにメチル化が認められるが、メチル化は転写因子 **NGFI-A** 結合サイトには観察されなかった。一方、頭部外傷を伴う虐待例 2 例では転写因子 **NGFI-A** 結合サイトにメチル化が観察された。しかし、頭部外傷を伴わない虐待例 2 例では転写因子 **NGFI-A** 結合サイトにメチル化が認められなかった。内因性急死例、虐待例の小脳歯状核の神経細胞においては転写因子 **NGFI-A** 結合サイトにメチル化が観察されなかった。以上から、非虐待例に比較して頭部外傷を伴う虐待例では海馬神経細胞において *NR3C1* 遺伝子プロモーターの転写因子 **NGFI-A** 結合サイトにおいて **DNA** メチル化増加が観察された。従って、神経細胞の **DNA** メチル化という後天性変化が生前の精神的ストレスのバイオマーカーになる可能性が示唆された。

しかし、本研究の症例数が限られていたことから、今後は症例数を増やす必要がある。また、頭部外傷に伴って **DNA** メチル化が惹起されるとの報告もあることから、上述の結果はその報告に矛盾しないものかもしれない。以上をまとめて論文として公表した (Takahashi Y, Kubo R, Sano R, Kuninaka H, Murayama M, Hayakawa A, Kominato Y. DNA methylation of the *NR3C1* promoter region in brains of pediatric victims of physical abuse. *Neurocase*. Published online: 27 Feb 2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

(研究代表者、研究分担者に下線)

1. Takahashi Y, Kubo R, Sano R, Kuninaka H, Murayama M, Hayakawa A, Kominato Y. DNA methylation of the *NR3CI* promoter region in brains of pediatric victims of physical abuse. *Neurocase*. 査読有 Published online: 27 Feb 2019
<https://doi.org/10.1080/13554794.2019.1582678>
2. Takei H, Sano R, Takahashi Y, Takahashi K, Kominato Y, Tokue H, Shimada T, Awata S, Hirasawa S, Ohta N. Usefulness of coronary postmortem computed tomography angiography to detect lesions in the coronary artery and myocardium in cases of sudden death. *Legal Medicine*. 査読有 30. 2018. 46–51
<https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.11.005>
3. Sano R, Takahashi Y, Hayakawa A, Murayama M, Kubo R, Hirasawa S, Tokue H, Shimada T, Awata S, Takei H, Yuasa M, Uetake S, Akuzawa H, Kominato Y. Use of postmortem computed tomography to retrieve small metal fragments derived from a weapon in the bodies of victims in two homicide cases. *Legal Medicine*. 査読有 32. 2018. 87–89.
doi: 10.1016/j.legalmed.2018.03.006
4. Hayakawa A, Sano R, Takei H, Takahashi Y, Kubo R, Tokue H, Hirasawa S, Shimada T, Awata S, Yuasa M, Uetake S, Akuzawa H, Kominato Y, Tattoo image composed of radiopaque deposits demonstrated by postmortem computed tomography. *Legal Medicine*. 査読有 35. 2018. 9–11.
doi: 10.1016/j.legalmed.2018.09.002
5. Sano R, Fukuda H, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kobayashi M, Fujihara J, Takeshita H, Kominato Y. Sequence analysis of ABO and its homologues is valid for species identification. *Transfusion Medicine*. 査読有 27. 2017. 428–436.
doi: 10.1111/tme.12455
6. Takahashi Y, Sano R, Yasuda A, Kuboya E, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Takei H, Kobayashi S, Shimada T, Awata S, Tokue H, Hirasawa S. Postmortem computed tomography evaluation of fatal gas embolism due to connection of an intravenous cannula to an oxygen supply. *Legal Medicine*. 査読有 27. 2017. 1–4.
doi: 10.1016/j.legalmed.2017.05.004
7. Takahashi Y, Kubo R, Sano R, Nakajima T, Takahashi K, Kobayashi M, Handa H, Tsukada J, Kominato Y. Histone deacetylase inhibitors suppress ABO transcription in vitro, leading to reduced expression of the antigens. *Transfusion*. 査読有 57. 2017. 554–562.
doi.10.1111/trf.13958
8. Isa K, Yamamuro Y, Ogasawara K, Yabe R, Ogiyama Y, Ito S, Takahashi Y, Kominato Y, Sano R, Uchikawa M. Presence of nucleotide substitutions in the *ABO* promoter in individuals with phenotypes A₃ and B₃. *Vox Sanguinis*. 査読有 110. 2016. 285–287.
doi: 10.1111/vox.12363
9. Nakajima T, Sano R, Takahashi Y, Watanabe K, Kubo R, Kobayashi M, Takahashi K, Takeshita H, Kominato Y. ABO alleles are linked with haplotypes of an erythroid

cell-specific regulatory element in intron 1 with a few exceptions attributable to genetic recombination. *Vox Sanguinis*. 査読有 11. 2016. 90–92.

doi: 10.1111/vox.12312

10. Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Sano R, Kominato Y, Takeshita H. Association of a single nucleotide polymorphism (rs6180) in GHR gene with plural tissue weight. *Journal of Genetics*. 査読有 95. 2016. 189-192.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s12041-016-0615-4>

〔学会発表〕(計 24 件)

1. Kimura-Kataoka K, Ueki M, Yasuda T, Iida R, Fujihara J, Yamada K, Sano R, Kominato Y, Takeshita H. Interleukin 8-251 A>T polymorphism(rs4073) in Japanese subpopulations and its correlation with smoking rates. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM). 2018 ; p68 , 福岡.
2. Sano R, Kubo R, Takahashi Y, Takeshita H, Kominato Y. Reduction of CTCF binding to the ABO promoter by nucleotide substitutions found in individuals with phenotypes A3 and B3. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM). 2018 ; p106 ,福岡 .
3. Sano R, Takahashi Y, Kimura-Kataoka K, Takeshita H, Kominato Y. Usefulness of coronary postmortem computed tomography angiography to detect lesions in the coronary artery and myocardium in cases of sudden death. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine(IALM). 2018 ; p164 , 福岡
4. 高橋遥一郎. 法医分子病理学的解析の実際 - 脂肪酸代謝異常 2 症例の提示と, 被虐待児への応用可能性に」について - 第 101 次日本法医学会学術全国集会 . 日本法医学雑誌 . 2017 ; p50 , 岐阜.

他 20 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 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐野 利恵

ローマ字氏名：SANO RIE

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号 (ID 桁): 70455955

研究分担者氏名：高橋 遥一郎

ローマ字氏名：YOICHIRO TAKAHASHI

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号 (ID 桁): 50640538

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。