

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21124

研究課題名（和文）児童虐待モデルマウスにおけるDNAメチル化状態の経時変化と組織特異性の解析

研究課題名（英文）DNA methylation analysis of tissue specificity and chronological changes in mouse model of human child abuse

研究代表者

岡野 雅春（OKANO, Masaharu）

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：70906544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：児童虐待被害を示すバイオマーカーとしてDNAメチル化率の応用が期待されている。本研究では、マウスの母子分離処置が、ヒト精神神経疾患関連遺伝子のマウスホモログのメチル化率に与える影響を明らかにした。子マウスを出生日翌日から2週間、毎日2時間母子分離処置を行い、扁桃体に由来するDNAを用いて、メチル化率を測定した。Myt11のDf値は、対照群（ -26.7 ± 0.1 ）と比較して実験群（ -25.3 ± 0.4 ）で有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。Myt11遺伝子におけるCpG配列のメチル化は、ヒトの虐待被害とマウスの母子分離ストレスとの間で共通して生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虐待被害の有無は、被虐待者の訴えや身体所見から判断されており、客観的な評価は難しいため、虐待被害の新たな指標が社会的に求められている。また、マウスの母子分離処置は、児童虐待ストレスとメチル化変化との関連を検証するために有用な実験モデルである。Myt11などの一部の遺伝子におけるCpG配列のメチル化は、ヒトの虐待被害とマウスの母子分離ストレスとの間で共通することが示唆された。DNAメチル化率の変化に基づいたヒトにおけるネグレクト被害の存否を示す分子生物学的な指標の開発のために、マウスを用いた母子分離実験によるストレスの曝露量とDNAメチル化の変化量との関連性解明へつながる研究成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have reported altered DNA methylation in several human genes in neuropsychiatric disorders associated with child abuse, suggesting that DNA methylation is a biomarker candidate to estimate child abuse. Maternal separation (MS) in mice is an excellent experimental model to elucidate the relationship between stress in child neglect and DNA methylation status. In this study, we analyzed methylation levels (Df values) of 3 genes associated with child abuse and neuropsychiatric disorders. Litter mates were exposed to MS for 2 hours over 14 consecutive days (MS group), or left undisturbed (control group). Methylation status of genomic DNA extracted from amygdala of mice in both groups were measured using MS-HRM method. Df value of Myt11 gene in the MS group (-25.3 ± 0.4) was significantly higher than that in the control group (-26.7 ± 0.1 , $p < 0.05$). MS-dependent change of CpG methylation in Myt11 is useful as a biomarker for experienced child abuse.

研究分野：法医学

キーワード：マウス母子分離実験 DNAメチル化 MS-HRM法 児童虐待

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における児童虐待は、通告件数が1年間に10万件を超えており、見逃すことのできない社会問題となっている。また、自殺で亡くなった人や被害を訴えられない幼児を含めると、膨大な数が潜在すると考えられている。さらに、虐待被害を受けた子供(被虐待児)のなかには、成人後も完治しない症例も存在し、社会への適応が難しく自殺する例も数多く報告されている。しかしながら、虐待被害の有無の評価は、被虐待者の訴えや身体所見が確認できない限り困難である。このため、自殺遺体や幼児をも含めた被虐待者に対する客観的な評価法の開発が求められている。

被虐待者は、その事例ごとに被害状況が異なるため、数多くのサンプルを集めた研究は困難である。このため、まずはモデル動物を使用した基礎研究が必要と考えた。申請者が着目した母子分離ストレスモデルは、児童虐待のうち養育義務の放任(ネグレクト)の実験モデルとされている¹⁾。このモデル動物は、糖質コルチコイドのシグナル伝達に関わる遺伝子において、DNAメチル化状態の変動が原因となり、PTSD やうつ病と類似した症状を示す。興味深いことに、このマウスは、ストレス刺激の終了後も活動性と社会性が乏しいことから、メチル化変動の長期維持が疑われている。ところが、このモデルのメチル化状態は、いまだに不明な点が多い。将来的に、メチル化状態を虐待被害の有無の指標とするためには、虐待とメチル化状態との相関性の解明が必須であった。

2. 研究の目的

現在までに、マウスの母子分離ストレス実験によって、ストレスへの曝露の指標として血中コルチゾール値の上昇²⁾、糖質コルチコイド受容体遺伝子 glucocorticoid receptor (GR) (Nr3c1)³⁾ や抗利尿ホルモン遺伝子 arginine vasopressin (AVP)⁴⁾ における CpG 配列のメチル化率の変化が報告されていた。しかし、ヒトの虐待被害にて報告された感受性領域について、マウスモデルでメチル化解析が実施されたことはなかった。これらのことから、本研究では、マウスの母子分離処置によって生じる幼少期のストレスが、ヒト虐待被害感受性遺伝子のマウスホモログである Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子のメチル化率および転写産物量に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1). 実験動物の母子分離処置

C57BL/6J 妊娠マウス(日本エスエルシー、静岡)が出産した仔マウス(4-6 g)を実験に用いた。各母マウスの同腹仔をおよそ半数に群分けし、母子分離処置の実験群および対照群とした。実験群の仔マウスは、出生日の1~14日後までの2週間、毎日11~13時の2時間を母親とは別のケージに入れた(母子分離処置)。この際、仔マウスは、同腹仔ごとに同一のケージで飼育し、保温材によって体温の低下を防いだ。対照群の仔マウスは、常に母マウスと同じケージで飼育した。両群の一部の個体については、2週間、隔日に体重を測定した。母子分離処置を終えた生後15日齢の仔マウスは、イソフルラン(Mylan, PA, USA)による吸入麻酔後に、心臓から全採血によって安楽死処置された。その後、脳を摘出し、扁桃体を採取した。

(2). プライマーの設計

Weder ら⁵⁾によって行われたヒトの虐待被害者を対象とした先行研究では、Infinium HumanMethylation450 BeadsChip (illumina, CA, USA)を用いて、MYT1L および GRIN1 遺伝子近傍の CpG 配列に生ずるメチル化率の変化が明らかにされた。これに基づいて、マウスにおいて、相同遺伝子近傍の CpG 配列を同定し、メチル化感受性高解像度融解分析(Methylation-Specific High Resolution Melting, MS-HRM)の対象範囲とした。すなわち、我々はまず、先行研究においてメチル化変化が同定されたヒトの Infinium HumanMethylation450 BeadsChip のプローブ配列を、HumanMethylation450 v1.2 Manifest File から取得した。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のマウスゲノム配列(Accession No. NC_000078)から、第12番染色体上の Myt1l および第2番染色体上の Grin1 遺伝子の塩基配列を取得した。Clustal Omega (EMBL-EBI)を用いて、ヒトプローブ配列とマウスゲノム配列とのアライメントを作成した。また、Okada ら⁶⁾によるヒトの SL06A4 遺伝子とうつ病発症との関連性の報告を参照して、マウス第11番染色体上の Slc6a4 遺伝子の塩基配列を取得した。次に、SEQUENCHER Ver. 5.0.1 (Gene Codes, MI, USA)を用いて、これら3つの遺伝子の増幅領域内に複数の CpG 配列が含まれるように MS-HRM 解析用プライマーを設計した。

(3). ゲノム DNA の MS-HRM 反応

ゲノム DNA のメチル化状態を解析するために、設計したプライマーと MelTDoctor HRM Master Mix (Applied Biosystems, MA, USA)による MS-HRM 反応を QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems)を用いて実施した。まず、BS 処理した DNA テンプレート (20 ng/

μL) を 1 μL, MS-HRM プライマー (5 μM) を各 1.2 μL, MeltDoctor HRM Master Mix を 10 μL および滅菌蒸留水を 6.6 μL 加え, 計 20 μL とした。そして, 95 °C で 10 分間のプレヒーティングの後, 95 °C で 15 秒, 60 °C で 1 分の PCR 反応を 40 サイクル行った。最後に, Melting 反応として 95 °C で 10 秒, 60 °C で 1 分保持した後, 0.025 °C/秒で 95 °C まで上昇させている間に解離する DNA から放出された蛍光強度の推移を記録した。すべての MS-HRM 反応は, 2 回繰り返して行った。

(4) . MS-HRM データの解析

Melting 反応において得られた各サンプルにおける融解曲線をもとに, HRM Software Ver. 3.2 (Applied Biosystems) を用いてサンプルのメチル化状態を同定した。具体的には, 各サンプルの融解曲線の推移から, 0%メチル化 DNA の蛍光強度を 0 とした際の各サンプルの差異 (Difference of Aligned Fluorescence (Df) 値) を算出した。

4 . 研究成果

神経関連遺伝子のメチル化量に対する母子分離処置による影響について, 新たな知見を得た。

(1) . マウスの母子分離処置

実験群のマウスに削瘦などの異常所見は認められなかった。また, 仔マウスの体重を 2 週間, 隔日に計測したところ, 実験群 (5.5 g ± 0.84) と対照群 (5.33 g ± 0.82) との差は認められなかった。

(2) . ヒト BeadsChip プローブ配列とマウスゲノム DNA 配列とのアライメント

ヒトの MYT1L および GRIN1 遺伝子の Infinium HumanMethylation450 BeadsChip プローブ配列と, マウスゲノム DNA 配列とのアライメントを行った。この結果, マウス Myt1l 遺伝子の第 16 イントロンと Grin1 遺伝子の第 6 イントロンに, ヒト BeadsChip プローブ配列との類似性が高い (82.3 および 89.3%) 配列が認められた。また, これらの領域において, ヒト BeadsChip プローブ配列のメチル化検出対象の CpG 配列と近傍のマウスの遺伝子領域に, CpG 配列が位置していた。

(3) . マウスゲノム DNA におけるメチル化状態

母子分離処置による仔マウスの扁桃体における Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子のメチル化状態について MS-HRM 解析を行った。この結果, Myt1l 遺伝子の Df 値は, 対照群 (-26.7 ± 0.1) と比較して実験群 (-25.3 ± 0.4) において有意に高かった (P < 0.05)。また, Grin1 および Slc6a4 遺伝子の Df 値は両群間で有意な差は認められなかったが, どちらも実験群の平均 Df 値が対照群よりも高い傾向にあった。

本研究は, ヒトの児童虐待とマウスの母子分離ストレスにおいて, 塩基配列の比較から相同な感受性領域を推定し, MS-HRM 法によりメチル化率を測定した初めての試みである。そして, 両者に共通してメチル化率に変化が生ずる CpG 配列を 1 カ所見出した。本研究に用いた母子分離実験は, 1 日当たりの母子分離時間の長さや処置を行う発育段階など様々な実施方法が報告されている⁷⁾。1 日当たりの分離時間は, 10 分~1 時間の短期間母子分離 (Brief Maternal Separation) や 1~8 時間の長期間母子分離 (Prolonged Maternal Separation) および哺乳時以外を常時分離する母子剥奪 (Maternal Deprivation) の 3 種類に分けられる。また, 処置を行う発育段階は, P0~P12-14 を低反応性期間 (Hypo-responsive period) および P12-14~P21-28 (離乳期) を高反応性期間 (Hyper-responsive period) の 2 種類に定義されることがある。これらの条件の違いによって, 仔マウスが曝露されるストレス量も変化すると考えられるが, 母子分離ストレスの程度と DNA メチル化量との関連についての情報はまだ報告されていない。ヒトにおいて, DNA メチル化の変化量から被虐待児におけるネグレクト被害の重症度も評価できれば, 極めて有用な分子生物学的指標となる。本研究では, 1 日当たり 2 時間の長期間母子分離, なおかつ, P0~P14 の低反応性期間に実施した。この結果, 有意差が認められた Myt1l 遺伝子において, 母子分離処置によって生じた Df 値の差は 1.4 であった。この Myt1l 遺伝子の Df 値の差は, 他の母子分離条件下にて曝露されるストレス量で異なる可能性がある。今後は, 1 日当たりの母子分離時間の長さや処置を行う発育段階を検討し, ストレスの曝露量と DNA メチル化の変化量との相関の有無を明らかにすることで, DNA メチル化率の変化に基づいたヒトにおけるネグレクト被害の存否を示す分子生物学的な指標の開発へつなげたい。

< 引用文献 >

- 1) George ED, Bordner KA, Elwafi HM, Simen AA (2010) Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. BMC Neurosci 11, 123.
- 2) Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T (2014) Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. Front Neurosci

8, 166.

3) Turecki G, Meaney MJ (2016) Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: A systematic review. *Biol Psychiatry* 79, 87-96.

4) Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmuhl Y, Fischer D, Holsboer F, Wotjak CT, Almeida OF, Spengler D (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 12, 1559-1566.

5) Weder N, Zhang H, Jensen K, Yang BZ, Simen A, Jackowski A, Lipschitz D, Douglas-Palumberi H, Ge M, Perepletchikova F, O'Loughlin K, Hudziak JJ, Gelernter J, Kaufman J (2014) Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 53, 417-424.e5.

6) Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Kataoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Kokubo Y, Mimura M (2014) The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J Psychiatr Res* 53, 47-53.

7) Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, Brenhouse H, Grassi-Oliveira R (2016) An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 68, 489-503.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogata Ayano, Kondo Masahiro, Yoshikawa Masaaki, Okano Masaharu, Tsutsumi Takamichi, Aboshi Hirofumi	4. 巻 340
2. 論文標題 Dental age estimation based on DNA methylation using real-time methylation-specific PCR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 111445 ~ 111445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2022.111445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡野雅春、小方彩乃、網干博文、近藤真啓	4. 巻 96
2. 論文標題 母子分離ストレスによるマウス脳由来ゲノム DNA のメチル化変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日大歯学	6. 最初と最後の頁 107-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 真啓、小方 彩乃、吉川 雅朗、岡野 雅春、堤 貴通、網干 博文
2. 発表標題 歯由来 2 遺伝子のメチル化率を指標とした年齢推定
3. 学会等名 日本DNA多型学会第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野 雅春、小方 彩乃、網干 博文、近藤 真啓
2. 発表標題 高解像度融解分析によるネグレクトのモデルマウスにおけるDNAメチル化量の測定
3. 学会等名 第91回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野 雅春、小方 彩乃、網干 博文、近藤 真啓
2. 発表標題 子マウスの腹間に認められたゲノムDNAのLINE-1メチル化量の相違
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------