

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590857

研究課題名(和文)自殺鑑別の分子生物学的指標へのストレスマーカークロモグラニンAの応用

研究課題名(英文) Application of messenger RNA expression of Chromogranin A to a biological marker for the suicide/non-suicide discrimination

## 研究代表者

中西 祥徳 (NAKANISHI, Akinori)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：10217763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：精神ストレスの高感度マーカーであるクロモグラニンA(CgA)蛋白のメッセンジャーRNA(mRNA)を指標として、自殺鑑別の精度向上を試みた。諸種拘束水浸ストレスを負荷したWistar系ラット(12-38週齢)の脳下垂体、副腎、顎下腺におけるCgA mRNA発現量は、ストレス負荷時間や回数により顕著な変化を示さなかった。法医剖検例(62例)に対する検討では、脳下垂体および副腎において、自殺症例のCgA mRNA発現量が非自殺症例に比して増加する傾向が認められた。脳下垂体および副腎におけるCgA mRNA発現量の増加は、生前の精神的ストレスの定量的指標となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the expression of messenger RNA (mRNA) of the chromogranin A (CgA) protein, which is a high sensitive marker of the psychological stress, improve precision of the suicide/non-suicide discrimination. No significant expression of CgA mRNA in pituitary gland, adrenal gland and submandibular gland of rats (12-38 weeks) after water-immersion restraint were observed. In the autopsy cases (62 cases), expression of CgA mRNA in pituitary gland ( $p<0.01$ ) and adrenal gland ( $p<0.05$ ) in suicide victims was significantly higher than in non-suicide victims. Higher expression of CgA mRNA in pituitary gland or adrenal gland in suicide victims may suggest the psychological stress with intentions to commit suicide.

研究分野：法医学

キーワード：クロモグラニンA 精神ストレス RT-PCR

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の自殺者数は14年連続(1998年~2011年)で年間3万人を超え、深刻な社会問題となっている。法医剖検例において、変死者が自殺か否かの鑑別は重要であり、解剖所見、死体の状況、捜査情報などから自殺か否かを鑑別(自殺鑑別)する。しかし、身元不明者や自殺を推測させる情報が得られない事例では、事件、事故、過失の多方面からの広範な捜査が必要となる。自殺の大きな原因のひとつに長期間の高度な精神的ストレスの蓄積がある。高感度な精神的ストレス亢進の指標として、近年、唾液中のクロモグラニンA(CgA)<sup>(1)</sup>が注目されている。CgAは副腎髄質クロム親和性細胞において見出された可溶性タンパクである<sup>(2)</sup>が、その後、諸種内分泌器官や交感神経ニューロンにも存在することが分かった<sup>(3)</sup>。唾液中に分泌される精神的ストレス応答蛋白にはコルチゾールやアミラーゼが知られている<sup>(4)</sup>が、CgAはこれらの蛋白よりも応答が速く、肉体的ストレスには反応せず、精神的ストレスに対してのみ反応するという特徴<sup>(5)</sup>がある。生体では、唾液中のCgA蛋白を測定する方法が確立されているが、死者では唾液を採取できない。我々はこれまでに、剖検例の唾液腺のCgA蛋白を免疫組織学的に検査したが、染色程度と死因との相関は明瞭でなかった<sup>(6,7)</sup>。本研究では、CgA蛋白の発現に先行して唾液腺中に発現するCgAメッセンジャーRNA(mRNA)の定量的評価を行い、死者の死亡前の精神的ストレスの大きさを評価する分子生物学的指標となり得るか否かを検討し、自殺鑑別の精度向上への応用を試みる。

## 2. 研究の目的

法医剖検例において変死者が自殺か否かを鑑別すること(自殺鑑別)は、事件性の有無を判断する際に必要な情報であり、また、遺族の社会的、経済的利害に関係することから、非常に重要な鑑定項目である。一般に、解剖所見、死体の状況、捜査情報などから自殺鑑別を行うが、自殺を推測させる情報が得られず自殺鑑別が困難な事例も少なくない。自殺の大きな原因のひとつに長期間の高度な精神的ストレスの蓄積がある。近年、高感度な精神的ストレス亢進の指標となる蛋白質として唾液中のクロモグラニンA(CgA)が注目されている。本研究では、CgAが死者の死亡前の精神的ストレスの大きさを客観的に評価する分子生物学的指標となり得るか否かを検討する。法医鑑定では対象が死者であるため唾液を採取できない。そこで本研究では、唾液腺におけるCgAメッセンジャーRNA(mRNA)発現量を検査対象とする。また、CgAは諸種内分泌器官や交感神経ニューロンにも存在することから、脳下垂体、副腎におけるCgA mRNA発現量についても検討する。死因と諸種組織におけるCgA蛋白発現の免疫組織学的検討は散見される<sup>(8)</sup>ものの、死者の生

前の精神的ストレスの大きさとCgA発現量の相関は分かっていない。CgA mRNA発現量の定量的評価により、死者の生前の精神的ストレスの大きさを客観的に評価することができれば自殺鑑別の精度向上のために非常に有用である。マウスやラットでもストレスにตอบสนองして血中にCgA蛋白が分泌されることから<sup>(10,11)</sup>、ストレスとCgAの相関を見るモデル実験として、拘束水浸ストレス負荷ラットを用いた動物実験も行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

#### ストレス負荷

Wistar系ラット(12-13週齢:260-320g、雄)に以下の種々の拘束水浸ストレス(水温21±1度)を負荷した。

拘束水浸ストレス負荷5分間 1回のみ、  
拘束水浸ストレス負荷30分間 1回のみ、  
拘束水浸ストレス負荷60分間 1回のみ、  
拘束水浸ストレス1時間毎30分間 5回/日 1日のみ、  
拘束水浸ストレス24時間毎30分間 3日間(ストレス負荷合計3回)、  
拘束水浸ストレス24時間毎30分間 9日間(ストレス負荷合計9回)

各最終ストレス負荷の直後(0分)、30分後、1時間後、2時間後および4時間後に過剰のウレタン(1.6g/kg腹腔投与)で安楽死させ、脳下垂体、副腎および顎下腺を摘出した(各群n=20-22)。単回ストレス条件1)~3)では36-38週齢(360-460g、雄)ラットについても検討した(各群n=20-21)。なお、陰性対照としてストレスを負荷していないラット(n=20-25)を用いた。

#### RT-PCRの検討

EMBL-EBIで検索したラットのCgA mRNA配列から、プライマー解析ソフトOLIGO 6.8(MBI社)を用いて特異性と検出感度の高いプライマーセットを4種類作製したが、最も検出感度が高く、再現性の高かったR-CgA250(nt1066-1301、forward 5'-TGG GAG GAC AAG CGA TGG-3'、reverse 5'-CTG CTC TGC GGT TGG-3'、250bps)を用いて以下の検討を行った。RT-PCR産物はダイレクトシークエンスにより塩基配列を確認した。ハウスキーピングジーンには18SリボソームRNA(18S rRNA)を用いた。各試料からはGene Elute RNA extraction kit(Sigma社)を用いてtotalRNAを抽出し、ランダムプライマー(9mer)(TaKaRa社)によりcDNAを作製した。

### (2) 法医剖検例

死後48時間以内の剖検例62例(自殺症例:外傷死7、焼死3、窒息死3、溺死2;非自殺症例:外傷死20、焼死11、病死9、溺死6、窒息死1)の脳下垂体、副腎および顎下腺を試料とした。

#### RT-PCRの検討

DNA Data Bank of Japan(DDBJ)で検索したヒトのCgA mRNA配列から、プライマー解

析ソフト OLIGO 6.8 (MBI 社) を用いて特異性と検出感度の高いプライマーセット (H-CgA130 : nt1243-1372、forward 5' -AGG AGG AGC GGC TCT-3'、reverse 5' -GGA ACT GTC CCG GTT GTC-3') を作製し検討を行った。また、既報(Sarutaら)<sup>(9)</sup>のプライマーセット (H-CgA584 : nt494-1077、forward 5' -GCT CCA AGA CCT CGC TC-3'、reverse 5' -GAC CGA CTC TCG CCT TTC CG-3') を用いた検討も行った。RT-PCR 産物はダイレクトシークエンスにより塩基配列を確認した。ハウスキーピング遺伝子には Glyceraldehyde 3phosphate-dehydro genase (GAPDH) mRNA を用いた。Gene Elute RNA extraction kit (Sigma 社) を用いて total RNA を抽出し、ランダムプライマー (9 mer) (TaKaRa 社) により cDNA を作製した。

なお、剖検例に対する本研究は、高知大学医学部倫理委員会の承認を得ている (承認番号 : 2014-005)。

### (3) CgA mRNA 発現量の評価

CgA mRNA およびハウスキーピング遺伝子の RT-PCR 産物 3  $\mu$ l を 1%アガロースゲル電気泳動後、EDAS 290 (Kodak 社) でゲルを撮影し、各増幅産物のバンド強度を電気泳動ゲル撮影解析システム (ライフテックオリエンタル社) で解析した。ラット試料は 18S rRNA、ヒト試料は GAPDH のバンド強度に対する CgA mRNA 産物のバンド強度の比 (R-CgA/18s または H-CgA/GAPDH) を指標として、CgA mRNA 発現量を評価した。各群の比較は t-検定を用いて行い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 4. 研究成果

### (1) 動物実験

単回拘束水浸ストレス (5 または 60 分間 1 回のみ) 負荷直後のラット (12-13 週齢) のほとんどで胃粘膜に潰瘍が認められた。複数回拘束水浸ストレス (24 時間毎 30 分間 1 回を 3 日間および 24 時間毎 30 分間 1 回 9 日間) 負荷後のラット (12-13 週齢) の胃粘膜には潰瘍が治癒した形跡が認められた。

単回拘束水浸ストレス (単回ストレス : 5、30 または 60 分間 1 回のみ) 負荷直後のラット (12-13 週齢) では、脳下垂体、副腎および顎下腺における CgA mRNA 発現量にほとんど差は認められなかった。また、30 分間ストレス負荷後の種々時間経過 (負荷直後、30 分後、1 時間後、2 時間後および 4 時間後) 後の CgA mRNA 発現量にほとんど差は認められなかった。5 分間拘束水浸ストレス直後の 36-38 週齢ラットでは、脳下垂体、副腎および顎下腺における CgA mRNA 発現量が若干増加する傾向が認められた (統計学的有意差なし)。

複数回拘束水浸ストレス (複数回ストレス : 1 時間毎 30 分間 1 回を 5 回、24 時間毎 30 分間 1 回を 3 日間、24 時間毎 30 分間 1 回 9 日間) を負荷後 0 分、30 分、1 時間、2 時間および 4 時間経過したラット (12-13 週齢)

では、いずれの条件においても、ストレス負荷によると思われる脳下垂体、顎下腺および副腎の CgA mRNA 発現量の増加は認められなかった。複数回拘束水浸ストレス直後の顎下腺の CgA mRNA 発現量は若干減少する傾向が認められた (統計学的有意差なし)。

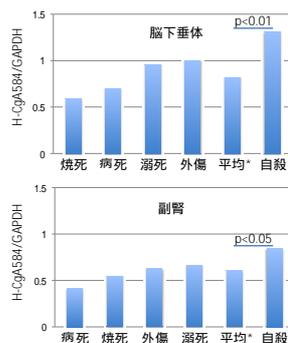
### 考察

12-13 週齢ラットでは、ストレス負荷程度やストレス負荷後の経過時間に関係なく、CgA mRNA 発現量の明瞭な増加は認められなかったが、36-38 週齢ラットでは、5 分間の単回ストレスにおいて若干 CgA mRNA 発現量の増加が認められた。若い個体よりも成熟した個体の方がストレスに対する CgA mRNA 発現応答が敏感なのかもしれない。12-13 週齢ラットでは、複数回ストレス負荷後の顎下腺において CgA mRNA 発現量が減少する傾向があった。これはストレスの繰り返しにより、ストレスに対する CgA mRNA 発現の馴化を示唆しているのかもしれない。

### (2) 法医剖検例

脳下垂体の H-CgA130 による検討において、自殺者群は非自殺者群に比して若干高値を示したが、その他では、死因や死亡状況 (自殺か否か) による CgA mRNA 発現量に特徴的な相違は認められなかった。

既報のプライマーセット (H-CgA584) を用いて検討した結果、顎下腺では全く RT-PCR 産物が検出されなかったが、脳下垂体および副腎において、自殺症例の CgA mRNA 発現量は非自殺症例の平均 (病死を除く) に比して増加傾向が認められた。



剖検例における既報(Sarutaら2005年)プライマーセット(H-CgA584)を用いた検討  
平均\* : 病死を除く(非自殺例の平均)

### 考察

H-CgA130 および 210 は H-CgA584 よりも PCR 産物の分子量が小さいため増幅効率が良く、そのため CgA mRNA 発現量の微妙な差が出にくかったのかもしれない。H-CgA584 による検討では、脳下垂体や副腎の CgA mRNA 発現量増加傾向は自殺前の精神的ストレスの増加を示唆する可能性があり、自殺鑑別の精度向上に有効かもしれない。なお、H-CgA584 で顎下腺から PCR 産物が得られなかった理由は現在不明である。

### < 引用文献 >

(1) Int J Psychophysiol 2002; 46: p85-89

- (2) Mol Pharmacol 1966; 2: p298-310.
- (3) Neurosci 1992; 49: p487-528.
- (4) Archives of Oral Biology 2004; 49: p963-968.
- (5) 豊田中央研究所 R&D レビュー 1999; 34: p17-22.
- (6) 第 93 次日本法医学会学術全国集会. 特別講演 I. 2009.
- (7) 高知大学医学部 第 8 回 KMS Research Meeting. 学部長裁量経費採択演題 17. 2009.
- (8) Cells Tissues Organs 2005; 180: p237-244.
- (9) Legal Medicine 2009; 11: p231-S233.
- (10) J Neurocytol. 1996; 25: p405-16
- (11) J Neurosci. 2005; 25: p7324-7332

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

中西祥徳, 古宮 淳一, 西村 拓起, 橋本 良明. 顎下腺組織からのクロモグラニン A mRNA の検出, 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 2012 年, 6 月 7 日-9 日. アクトシティ浜松 (静岡県)

中西祥徳, 古宮 淳一, 西村 拓起, 橋本 良明. クロモグラニン A mRNA の脳下垂体と副腎における発現に及ぼす影響因子, 第 93 次日本法医学会学術全国集会, 2009 年, 5 月 13 日-15 日. 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 祥徳 (NAKANISHI, Akinori)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号: 10217763