

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08875

研究課題名(和文) 免疫系臓器に特異的に発現するmiR-142ファミリーを用いた長期虐待診断法の開発

研究課題名(英文) Application of miR-142 family expressed only in immune system for chronic stress

研究代表者

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80332857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DVや高齢者虐待等の「成人虐待」が社会的にクローズアップされ、潜在的なケースは相当数と推定されている。ところで、法実務での成人虐待は、長期間持続された「身体的虐待」や「ネグレクト」と考えられる。研究者らは免疫臓器に発現が顕著なことを明らかにしているmiR-142 familyが種々の検討にて、長期ストレスのマーカーとなりうることを示唆された。miR-142-3pについてマウスストレスモデル胸腺を用いて検討を行い、長期ストレス群のみにて増加しており、miR-142-3pがマウスにおける慢性的なストレス暴露を証明する法医分子病理学的診断マーカーであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nowadays, adult abuse attract attentions and adult abuse cases is increasing in Japan. Similarly this problem is serious in whole world. Forensic pathologists did not have any useful tool or marker to demonstrate chronic stress in elderly people. We already showed that miR142 KO mice died by 24 hour starvation and it's thymus clearly became atrophic. Histologically, Hassall corpuscle were increasing in the thymus. Hassall corpuscle's increasing and thymus's atrophy are common among stressed mice for long time, therefore, we speculated that miR142 family have something to do with long-term stress. We investigated the expression of miR142-3p and miR142-5p in thymus after chronic stress. miR142-3p were significantly increasing in 1 week and 4 week stress mice and not significantly increasing in single stress mice. We considered that miR142-3p might increase expression by chronic stress in adult. We concluded that the evaluation of miR142-3p might be useful marker for chronic stress.

研究分野：法医病理学

キーワード：長期ストレス 過労死 高齢者虐待 長期ストレスマーカー マウス miR-142-3p

1. 研究開始当初の背景

近年、ドメスティックバイオレンスや高齢者虐待等の「成人虐待」と称される新たな虐待が社会的にクローズアップされている。成人虐待は、児童虐待に比しマスメディアでの報道ははるかに少ないものの、潜在的なケースはかなりの件数にのぼると推定されている。今後、急速な高齢化社会の到来や「高齢者虐待防止法」による社会的意識の高まりもあって、法医実務において取り扱われる「成人虐待」症例数は著明に増加することは確実である。

ところで、法医実務で遭遇する成人虐待はある一定の期間(長期間)持続された「身体的虐待」や「ネグレクト」と考えられる。長期間持続した児童虐待の剖検例においては、福永らが報告した「胸腺の萎縮」が診断基準として汎用されているが、成人虐待の症例では、そのような特異的な法医病理学的診断マーカーは特定されていない。従って、「成人虐待」においても「児童虐待における胸腺の萎縮」のような、長期に亘るストレス暴露に対する生体の反応を剖検後の検査にて捉えることが法医病理の分野では肝要と考える。

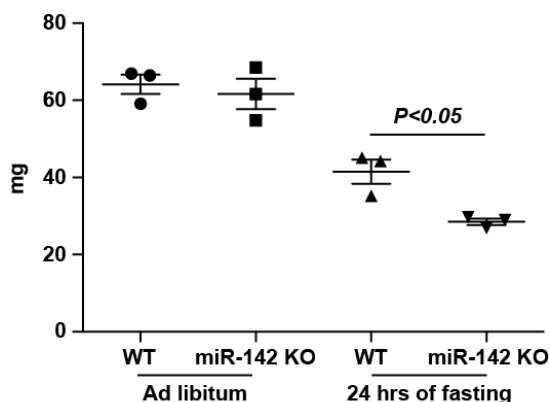


図1: 胸腺重量の比較

申請者が英国ブリストル大学神経内分泌研究所にて行ったラットストレスモデルの研究では、長期ストレスをシミュレートする Adjuvant-induced Arthritis (AA) モデルでは、ミネラルコルチコイドが、elder AA 群では young AA 群や control 群に比して有意に高値であること、さらに、長期ストレス中に更なる短期ストレス負荷をシミュレートする AA モデル + lipopolysaccharide (LPS) 負荷処理群では、その有意差が極めて大になること、雌雄別では雌においてその傾向が顕著であるという結果を得ている。つまり、長期ストレスでは血液中ミネラルコルチコイドが上昇することが判明している。しかし、Coe (J Forensic Sci, 1973) らの報告によると死体血液・尿ではミネラルコルチコイドの定量はできないとされている。従って、新しいストレス反応生体物質の検索は不可欠である。

申請者らは Ets Family 転写因子の一員である PU.1 の Knock Out (KO) マウスを用いた皮膚創傷モデルでの創傷部位における microRNA (miRNA) の網羅的発現解析を行ったところ、損傷反応 miRNA として miR-142 family (miR-142-3p 並びに-5p) を含む複数の miRNA を同定した。

miR-142 family の機能は全く未知であったため、機能解析を目的に miR-142 KO マウスを作成した。驚いたことに、別研究の過程で、24 hours の絶食にて miR-142 KO マウスはほとんどが死亡すること、また、胸腺重量は、自由摂食では Wild Type (WT)、KO は同程度であるが、絶食後の胸腺重量は有意に Wild Type に比して miR-142 KO マウスは減少し、胸腺が萎縮することを見出した(図1)。

組織学的には、KO マウスにて胸腺においてハッサル小体の著明な増加が認められた。これらは、飢餓ストレスにて生じたものと考えられる。ついで、miR-142 family の Wild Type での臓器内発現を検討したところ、胸腺・脾臓に発現が顕著なことが判明した(図2)。

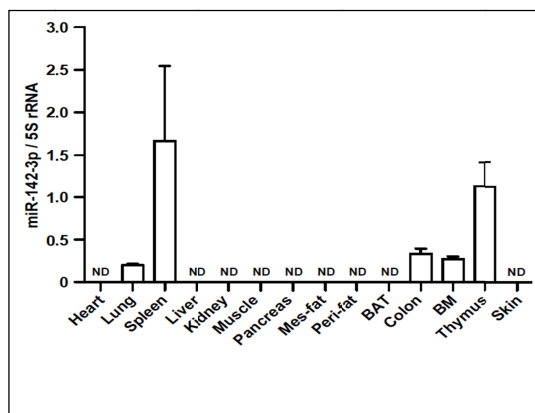


図2: miR-142-3p の諸臓器での発現量

これらのことから、miR-142 family がストレスに反応する生体物質の候補であることが推察される。

ストレスは、神経・内分泌・免疫系に大きな影響を与えることは広く知られており、繰り返しになるが、「胸腺の萎縮」は長期ストレスの法医学的マーカーである。さらに、長期ストレス負荷時に胸腺ではハッサル小体が増加するが、申請者らの先行研究にて組織学的に KO にてハッサル小体の著明な増加が認められたことから、この現象に miR-142 family が関与していることも疑わせる。つまり、miR-142 family は単なるストレス反応物質ではなく、長期ストレスのマーカーとなることが示唆される。

このために、申請者らは、miR-142-3p につ

いてマウスストレスモデル胸腺を用いて予備的検討を行ったところ、長期ストレス群のみに増加していた (n=2 のため統計学的解析は行っていない)。

さらに、細胞内で働くと考えられてきた miRNA が細胞外、つまり、血液にも分泌されることが明らかになっている。miRNA は血液中では Ago 蛋白質と複合体を形成していることやエクソソームとして膜中に存在することから、極めて安定であることが判明している。つまり、miRNA は血液中に多量に含まれており、死後ある程度時間が経過しても比較的安定と予想される。これら miRNA の特性を考慮すると、miR-142 family の血液中の増減を検討することにより、生体のみならず死体においても長期虐待を血液生化学的手法にて診断可能になるものと考えられる。

2. 研究の目的

法医実務で経験する成人の虐待例において、剖検所見において決定的な「長期間のストレス持続」を証明する特異的な診断マーカーは全く知られていない。従って、長期に亘るストレス暴露に対する生体の反応を捉える新しい診断マーカーの同定が重要である。本研究では、申請者が既に同定した免疫系臓器にのみ発現する miR-142 family (miR-142-3p 並びに-5p) について、ストレス反応性を動物モデルで確認後、法医剖検例に応用して慢性的なストレス暴露を証明する法医分子病理学的診断法を確立する。

本研究では、はじめに miR-142 family について拘束ストレスモデルマウスを作成した上で胸腺を採取し、胸腺における長期ストレス時の発現動態を確認した。

ついで、この結果を基に miR-142 family が制御していると予測される mRNA、*roundabout guidance receptor 1 (Robo1)*、*centrosomal protein 170 (Cep170)*、*zing finger and BTB domain containing 37 (Zbtb37)*、*basic transcription factor 3-like 4 (Btf3l4)*、*LIM homeobox transcription factor 1 alpha (Lmx1a)* 及び他 15 種類について同モデルを用いて胸腺、脾臓における発現動態を検討した。

3. 研究の方法

(1) 試料作成

ストレス負荷は雄性マウスを 50ml チューブの中に入れ 1 日 1 回 1 時間拘束を行う拘束ストレスを用いた。

4 週齢/8 週齢のマウスを用いて単回/1 週間の拘束ストレスモデルマウスを作成した。また、無処置のマウスをコントロール群とした。

各群は全て最終拘束処置の 1 時間後にコントロール群と共に安楽死させ、胸腺を採取した。

(2) miRNA の発現解析

胸腺より total RNA を精製、cDNA に逆転写し、Real Time Quantitative PCR 法にて miR142-3p、miR142-5p の発現量を検討した。内部標準として snoRNA202 を用いた。Steel 法を用いて統計学的検討を行った。

(3) mRNA の発現解析

Lmx1a、*Zbtb37*、*Robo1*、*Btf314*、*Cep170* について実験 2. と同様の方法を用いて行った。内部標準は *18 ribosomal protein (18Rps)* を用いた。

4. 研究成果

(1) miRNA の発現解析

miR142-3p は 4 週齢/8 週齢ともに 1 週間の拘束ストレスモデルでのみ発現量の有意な増加が認められた (表 1)。

表 1 miR142-3p の発現量

		Average	S.D.	
4 week	1 week	Control	1.03	0.15
		Stress	1.71	0.43
	Single	Control	0.96	0.06
		Stress	0.85	0.09
8 week	1 week	Control	0.71	0.12
		Stress	1.07	0.27
	Single	Control	0.81	0.18
		Stress	0.86	0.12

その一方で miR142-5p は 8 週齢の 1 週間の拘束ストレスモデルでのみ発現量の有意な増加が認められ、4 週齢マウスでは明らかな変動はみとめられなかった (表 2)。

表 2 miR142-5p の発現量

		Average	S.D.	
4 week	1 week	Control	1.65	0.48
		Stress	2.37	0.94
	Single	Control	0.94	0.06
		Stress	0.72	0.12
8 week	1 week	Control	0.64	0.19
		Stress	1.01	0.21
	Single	Control	0.79	0.32
		Stress	0.95	0.17

以上より、miR142-3p, 5p の発現動態を解析することが長期ストレスの診断につながる可能性があることが示唆された。

miR-142 の発現量増加について次の二つの可能性を考えている。1 つ目は miR-142 はアクチンの制御に関わるという報告がされていることから、miR-142 の発現量の増加はア

クチンの mRNA を減少させ、細胞骨格が障害されることによる胸腺の萎縮を表すということ、二つ目は miR-142 は CD4 陽性の樹状細胞のホメオスタシスに関わるという報告から、miR-142 の発現量増加により CD4 陽性の樹状細胞を増加させることでストレスによるリンパ球の減少を補おうとしていると推定する。

(2) mRNA の発現解析

表3 *Robo1* の胸腺における発現量

		Average	S.D.
4 week	1 week	Control	0.95 0.16
		Stress	0.53 0.25
	Single	Control	1.18 0.24
		Stress	0.76 0.36
8 week	1 week	Control	0.84 0.14
		Stress	0.38 0.08
	Single	Control	0.81 0.15
		Stress	0.59 0.16

表4 *Robo1* の脾臓における発現量

		Average	S.D.
4 week	1 week	Control	2.13 0.52
		Stress	1.90 0.28
	Single	Control	2.03 0.33
		Stress	2.23 0.14
8 week	1 week	Control	2.43 0.14
		Stress	2.55 0.30
	Single	Control	2.98 0.21
		Stress	2.63 0.14

胸腺における *Robo1* 発現量のみが長期ストレス負荷時に有意な発現量の減少が認められ、その他の遺伝子に明らかな変動は認められなかった。

(3) まとめ

今回の検討では miR142-3p、5p とともに 1 週間の拘束ストレス群のみに発現量の有意な上昇が認められた。このことから、miR142 family は長期ストレス反応物質と推定する。

また、miR-142 family が制御すると予想される遺伝子 *Lxm1a*、*Zbtb37*、*Robo1*、*Btf314*、*Cep170* の検討では、miR142-5p に制御される *Robo1* の発現量が同時期に有意に減少していた。

現在、*Robo1* とストレスに関する報告は我々の調べた限り全く成されておらず、*Robo1* は miR142 family と同様に新規の長期ストレスマーカーになりうるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Abe K, Abe Y, Umehara T, Yamamoto T, Murase T, Ikematsu K. Expression kinetics of miR142-3p and miR142-5p in thymus of stressed mice. International academy of legal medicine intersocietal symposium P5 Medicine & Justice, Venice, June, 2016

Abe Y, Abe K, Murase T, Umehara T, Yamamoto T, Ikematsu K. Expression of *Sstr4* in mouse thymus and spleen after chronic stress treatment. 95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Heidelberg, September, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号: 80332857

(2) 研究分担者

山本 琢磨 (YAMAMOTO, Takuma)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号: 50634458

梅原 敬弘 (UMEHARA, Takahiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号: 60617421

坪井 貴司 (TSUBOI, Takashi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号: 80415231

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし