

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670352

研究課題名(和文)マイクロRNAを用いたストレスコーピング反応の評価・診断技術の開発

研究課題名(英文)Method for assessment of stress coping using microRNA

研究代表者

六反 一仁 (ROKUTAN, Kazuhito)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10230898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではストレスコーピング反応におけるマイクロRNAの役割を検討した。まず、慢性ストレス応答性マイクロRNA(miR-16, miR-20b, miR-26b, miR-29a, miR126, miR-144, miR-144*)を同定した。健常者の気分障害のリスクを評価できる末梢血マイクロRNAとしてmiR-144を見出した。さらに、慢性疲労症候群で特徴的な6種類の炎症関連マイクロRNAの発現変化を確認し、同時に、CSFではタンパク質合成・分解系の遺伝子発現が顕著に亢進することを確認した。マイクロRNAを用いた健常者の気分障害の評価及び病的疲労を診断するための技術基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that microRNA plays a crucial role in stress coping reactions. In this project, we succeeded to identify chronic psychological stress-responsive microRNAs (miR-16, miR-20b, miR-26b, miR-29a, miR126, miR-144, miR-144*) (PLoS One, 2013). We have also identify an anxiety and/or depression-associated miR-144 in healthy medical staffs of private hospitals. In addition, we examined differentially expressed microRNAs in peripheral blood from patients with chronic fatigue syndrome, and we revealed 6 microRNAs differentially expressed in those patients. Using the Target scan software, we found that the differentially expressed microRNAs significantly augmented inflammatory reaction and suppressed the protein synthesis pathway. Our results suggest that distinct microRNAs in peripheral blood may be useful for assessment of stress responses in healthy subjects and for diagnosis of pathological fatigue.

研究分野：ストレス科学

キーワード：ストレス ストレスコーピング マイクロRNA バイオマーカー 末梢血

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の非翻訳領域から転写される non-protein-coding RNA は、発達や生理機能の調節に重要な役割を果たすとともに、発がんとの関連性等が注目されている。small RNA に分類される 19-22 塩基のマイクロ RNA は、miRISC 複合体を形成し、mRNA の 3' UTR に結合して標的 mRNA を分解し、また、リボソームでの標的 mRNA の翻訳も阻害する。ヒトでは 1000 種類以上のマイクロ RNA が同定され、ヒトの全 mRNA の 70%以上がマイクロ RNA の標的配列をコードしており、一つのマイクロ RNA は数百のマイクロ RNA を標的にする。このため、マイクロ RNA は、遺伝子発現の重要な転写後調節機構の一つであり、広範囲の遺伝子発現の tuning や buffering を行っていると考えられている。個々のマイクロ RNA の遺伝子をノックアウトした実験動物では、通常の飼育環境では代償機構のため表現型の異常は現れないが、ストレスに曝された場合、様々な異常が現れることが報告され、特定のマイクロ RNA は、環境変化に適応するための遺伝子発現を調節するいわゆるストレスコーピング反応に重要な役割を果たすことが想定されていた。

2. 研究の目的

一般内科診療ではストレスに起因する精神・身体症状を訴える患者は少なくなく、気分障害やストレスによる身体症状を鑑別し、病状を理解することは極めて大切である。マイクロ RNA は、環境変化に対応して広範囲に遺伝子発現を調整し、ストレスコーピングに重要な役割を果たすことが示唆されている。申請者は、心理的ストレスに対するコーピング反応の時期に一致し、比較的長期間変動する血液中のマイクロ RNA を報告した。さらに、ストレス関連疾患においても、疾患特異的なマイクロ RNA-標的 mRNA が存在する事を明らかにした。マイクロ RNA は、従来のストレス評価とは異なり、ストレスに対する脆弱性を評価できるマーカーと考えている。本研究では、「環境と遺伝子」の観点から、マイクロ RNA を用いたストレス脆弱性の評価・診断法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 慢性ストレス応答性マイクロ RNA の解析：慢性ストレスモデルとして、医師国家試験受験者 25 名を対象とした慢性ストレス特異的マイクロ RNA の解析を計画した。また、民間病院の職員 95 名を対象に、質問紙 (GHQ-28、自己記入式抑うつ評価尺度 SDS、STAI、社会格差と健康、いじめ、対人応答性尺度) による調査を行い、8 種類の慢性ストレス応答性マイクロ RNA の有効性を検証するとともに、マイクロ RNA の発現異常と環境要因の関連解析を行った。さらに、Target Scan を用いた標的 mRNA の解析と遺伝子発現データから疾患特異的なマイクロ RNA - 標的 mRNA

の選定を計画した。

(2) 慢性疲労症候群患者の解析：名古屋大学総合診療部 (伴教授) の協力を得て解析を進めた。慢性疲労症候群患者で有意に発現が低下するマイクロ RNA と慢性疲労症候群患者で発現が変化している遺伝子の中から、Target Scan を用いて、慢性ストレスと各病態特異的なマイクロ RNA と標的 mRNA をリアルタイム RT-PCR で確認し、マイクロ RNA の発現異常による疾患特異的な標的 mRNA の発現変化を解析した。さらに、疾患特異的に発現低下する遺伝子のメチル化を解析した。

4. 研究成果

(1) 慢性ストレス応答性マイクロ RNA の同定 慢性ストレスモデルとして、医師国家試験受験者 25 名を対象とした解析も進め、miR-16, miR-144, 及び、miR-144* に加え、miR-20b, miR-26b, miR-29a, miR-126, miR-223 が国家試験前、2 か月以上にわたり末梢血で増加することを見だし、誌上発表した (図 1、PLoS One)。これらのマイクロ RNA は、炎症性サイトカインの mRNA や炎症関連遺伝子の mRNA を標的として、直接あるいは間接的に炎症性サイトカインの過剰な産生を抑制する重要な役割を果たしていることを明らかにでき、この分野の重要性を世界で初めて報告することができた。

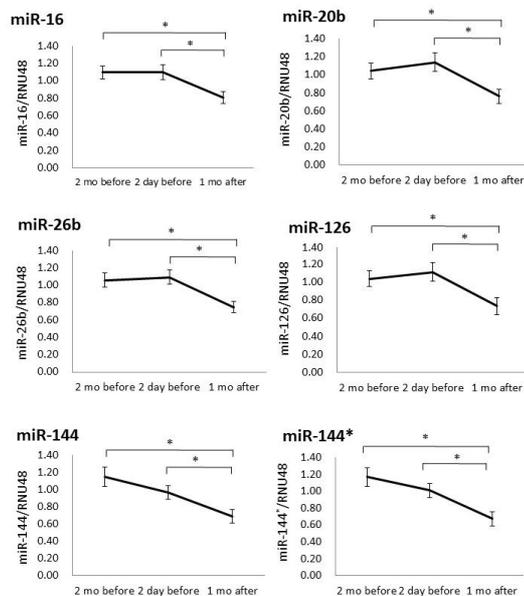


図 1. 医師国家試験受験者の慢性ストレスに応答する 6 種類のマイクロ RNA

(2) 健常者の気分障害のリスクを評価できるマイクロ RNA の同定

これまでの研究で明らかにした急性ストレス応答性マイクロ RNA (miR-16, miR-144, miR-144*) 及び慢性ストレス応答性マイクロ RNA (miR-16, miR-20b, miR-26b, miR-29a, miR-126, miR-144, miR-144*) をベースに、これらのマイクロ RNA の有用性について再検証した。民間病院職員 180 名を対象に、高不安と高度の抑うつを訴えるハイリスクグルー

プを対象に、気分障害と関連する末梢血マイクロ RNA として miR-144 を同定した。さらに、miR-144 の標的遺伝子のなかから不安・うつ状態と関連する遺伝子の同定に成功した（現在論文作成中）。

(3) 慢性疲労症候群については、名古屋大学との共同研究のなかで、CFS 群で特徴的な 6 種類の炎症関連マイクロ RNA の発現変化を確認し（表 1）CFS 群において、タンパク質合成・分解系の遺伝子が顕著に亢進することを確認した。現在、CFS 患者 28 名とコントロール 28 名を対象に、リアルタイム RT-PCR による確認作業を行っており、平成 27 年度に誌上発表する予定である。

miRNA	fold changes vs. control	p-value
hsa-miR-1207	2.197	0.002
hsa-miR-26b	2.144	0.047
hsa-miR-1225	2.136	0.044
Let-7a	1.656	0.036
hsa-miR-324	-1.411	0.019
hsa-miR-331	-3.083	0.037

表 1 . 慢性疲労症候群で有意に発現が変化する末梢血中のマイクロ RNA

さらに、CFS 群で発現が低下するマイクロ RNA については、プロモータ領域のメチル化の解析を継続して行っている。

健常者の気分障害のハイリスクグループの選定、及び、病的疲労を診断するための RNA バイオマーカーの同定はほぼ成功し、これらの病態を診断する技術基盤をある程度確立することが出来た。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Akaike Y, Kuwano Y, Nishida K, Kurokawa K, Kajita K, Kano S, Masuda K, Rokutan K. Homeodomain-interacting protein kinase 2 regulates DNA damage response through interacting with heterochromatin protein 1 . *Oncogene* (in press)
doi: 10.1038/onc.2014.278. [Epub ahead of print] (査読有)

Kuwano Y, Nishida K, Kajita K, Satake Y, Akaike Y, Fujita K, Kano S, Masuda K, Rokutan K. Transformer 2 and miR-204 regulate apoptosis through competitive binding to 3' UTR of BCL2 mRNA. *Cell Death Differ.* 2015;22(5):815-825. doi: 10.1038/cdd.2014.176. (査読有)

Akaike Y, Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Kajita K, Kurokawa K, Satake Y, Shoda K, Imoto I, Rokutan K. HuR regulates alternative splicing of the TRA2 gene in human colon cancer cells under oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2014;34(15):2857-2873.

doi: 10.1128/MCB.00333-14. (査読有)

Kano S, Nishida K, Kurebe H, Nishiyama C, Kita K, Akaike Y, Kajita K, Kurokawa K, Masuda K, Kuwano Y, Tanahashi T, Rokutan K. Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;306(3):C250-C262.

doi: 10.1152/ajpcell.00091.2013. (査読有)

Kurokawa K, Akaike Y, Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Yamagishi N, Kajita K, Tanahashi T, Rokutan K. Downregulation of serine/arginine-rich splicing factor 3 induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene.* 2014;33(11):1407-1417.

doi: 10.1038/onc.2013.86. (査読有)

Kano S, Nishida K, Nishiyama C, Akaike Y, Kajita K, Kurokawa K, Masuda K, Kuwano Y, Tanahashi T, Rokutan K. Truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 accelerates cell growth through up-regulating c-Jun expression. *J Med Invest.* 2013;60(3-4):228-235.

http://doi.org/10.2152/jmi.60.228 (査読有)

Honda M, Kuwano Y, Katsuura-Kamano S, Kamezaki Y, Fujita K, Akaike Y, Kano S, Nishida K, Masuda K, Rokutan K. Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood. *PLoS One.* 2013;8(10):e75960.

doi:10.1371/journal.pone.0075960. (査読有)

Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K., Imoto I. NF90 in posttranscriptional gene regulation and microRNA biogenesis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):17111-17121.

doi: 10.3390/ijms140817111. (査読有)

Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K. Application of DNA microarray technology to gerontological studies. *Methods Mol Biol.* 2013;1048:285-308.

doi:10.1007/978-1-62703-556-9_19. (査読有)

Yamagishi N, Teshima-Kondo S, Masuda K, Nishida K, Kuwano Y, Dang DT, Dang LH, Nikawa T, Rokutan K. Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *BMC Cancer.* 2013;13:229.

doi: 10.1186/1471-2407-13-229. (査読有)

Kajita K, Kuwano Y, Kitamura N, Satake Y, Nishida K, Kurokawa K, Akaike Y, Honda M, Masuda K, Rokutan K. Ets1 and heat shock factor 1 regulate transcription of the Transformer 2 gene in human colon cancer cells. *J Gastroenterol*. 2013; 48(11):1222-1233.

doi: 10.1007/s00535-012-0745-2. (査読有)

Komatsu M, Yoshimaru T, Matsuo T, Kiyotani K, Miyoshi Y, Tanahashi T, Rokutan K, Yamaguchi R, Saito A, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y, Sasa M, Shimada M, Katagiri T. Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis. *Int J Oncol*. 2013;42(2):478-506.

doi:10.3892/ijo.2012.1744. (査読有)

Toda M, Kawai T, Takeo K, Rokutan K, Morimoto K. Associations between chronotype and salivary endocrinological stress markers. *Endocr Res*. 2013;38(1):1-7.

doi: 10.3109/07435800.2012.683225. (査読有)

〔学会発表〕(計 8件)

六反一仁、ストレスバイオマーカーの探索と創薬への応用、第30回日本DDS学会学術集会、2014年7月31日、慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス(東京都・港区)

六反一仁、ストレス研究からみた病的疲労の評価、シンポジウム「ストレス・睡眠・疲労」第10回日本疲労学会総会・学術集会、2014年5月31日、大阪コングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

六反一仁、あらたなストレス研究をめざして、シンポジウム「ストレス、睡眠、疲労研究の統合的発展を目指して」第29回日本ストレス学会学術総会、2013年11月9日、徳島大学・大塚講堂(徳島県・徳島市)

藤田絹代、桑野由紀、西田憲生、赤池瑠子、狩野静香、六反一仁、医療従事者を対象とした社会格差による健康障害メカニズムの検討、第29回日本ストレス学会学術総会、2013年11月8日、徳島大学・大塚講堂(徳島県・徳島市)

Fujita K, Kuwano Y, Akaike Y, Kano S, Satake Y, Nishida K, Sakamaki S, Yasuhara Y, Tanioka T, Rokutan K. Socioeconomic status-related gene expression profiles in peripheral leukocytes from medical staffs. The international conference on social stratification and health 2013, 2013年9月1日, 東京大学・鉄門講堂(東京都・文京区)

Kuwano Y, Honda M, Fujita K, Akaike Y, Kano S, Satake Y, Nishida K, Rokutan K. Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood in

healthy Japanese students. The international conference on social stratification and health 2013, 2013年9月1日, 東京大学・鉄門講堂(東京都・文京区)

Kuwano Y, Katsuura S, Kawai T, Kamio Y, Rokutan K. Autism-associated gene expression was commonly observed in peripheral blood leukocytes from subjects with autism and healthy mothers having autistic children. 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013年6月24日, Kyoto International Conference Center(京都府・京都市)

桑野由紀、本田真奈美、梶田敬介、赤池瑠子、藤田絹代、佐竹謙、西田憲生、増田清士、六反一仁、ヒト末梢血における慢性心理的ストレス応答性マイクロRNAの同定、Neuro 2013, 2013年6月20日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六反 一仁 (ROKUTAN, Kazuhito)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10230898