

平成22年 4月 20日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890033
 研究課題名（和文） 子どもの虐待が脳発達に及ぼす影響についての形態学的、エピジェネティックな検討

研究課題名（英文） morphologic and epigenetic study on the effects of child abuse on brain development

研究代表

佐野 利恵 (SANO RIE)
 群馬大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：70455955

研究成果の概要（和文）：虐待死亡例の DNA メチル化が異常な DNA メチル化の増加であるか否かを判断するために、発育や加齢に伴う DNA メチル化の程度を調べる必要性が生じ、Pyrosequencing 法により加齢に伴う DNA メチル化の程度を調査し、虐待死亡例における DNA メチル化のと比較することで正確な検討が可能となった。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the effect on the brain of child abuse, we studied whether childhood abuse alters pattern of DNA methylation of genes. We examined Age-dependent DNA methylation of genes by Pyrosequencing method and compared with child abuse victim.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,160,000	348,000	1,508,000
2009年度	120,000	36,000	156,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,280,000	384,000	1,664,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：子どもの虐待 DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

現在の日本は格差が広がりつつある社会

となり、より弱い者へと階層的に圧迫が加えられる時代になった。少子化時代であるにも関わらず、児童虐待検挙事件における被害児

童数は増える傾向にあり、今後の社会情勢の推移や家庭環境の変化などを考慮すると、さらにその数が増えることが懸念される。

最近の脳科学研究から、幼児期の虐待によるストレスが子どもの脳の発達に影響を及ぼし、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。また、動物実験では恐怖ストレスがどのような変化をもたらすかについて、分子レベルでの解析が進んでいる。

虐待の世代間連鎖を断ち切り、体罰・暴力に寛容な子育て観、あるいはネグレクトに対する許容的な風土を、その土台から変えていくためには、幼児期の虐待が如何に問題を有するものであるかについて社会的な理解を深める必要がある。そのためには、虐待というストレスが脳発達に及ぼす影響について、形態学的、および分子レベルでの調査研究が必要であり、子どもの虐待死亡事件で法医解剖に供されたご遺体からの脳を用いた研究は非常に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

子どもの虐待死亡事件で法医解剖に供されたご遺体の脳について、REELIN、PP1等の遺伝子のプロモーターのメチル化の程度を調べ、虐待による遺伝子発現への影響を調べる。対照群は突然死した事例の脳を用いる。なお、本研究は学内の倫理委員会にて承認済みである（受付番号78、DNAメチル化を利用した精神障害や生前の恐怖体験等の推定方法の開発）。

3. 研究の方法

- 1) 摘出した脳をホルマリン固定する。
- 2) 前頭葉（前頭回、中心溝回）などの脳皮質、海馬、小脳からパラフィン包埋切片を作製する。
- 3) 各切片からマイクロダイセクション法を用いて、大錐体細胞数百個程度を採取し、DNAを抽出する。

4) Bisulfite 処理を行い、塩基配列特異的なプライマーを用いて、PCRを行い、PP1 遺伝子や REELIN 遺伝子の上流域の増幅産物を得る。

5) PCR 増幅産物の塩基配列を決定し、メチル化されている塩基を決定する

(Bisulfite genomic sequencing 法)。

6) Bisulfite 処理によりシトシンはウラシルに変化するが、メチル化シトシンは変化しないことを利用し、それらを識別できる制限酵素で、

5) で得られた PCR 増幅産物を消化し、メチル化の程度を推定する (COBRA 法)。

7) 各組織切片から抽出された DNA を Bisulfite 処理し、メチル化特異的プライマーや脱メチル化特異的プライマーを用いて PCR を行い、メチル化の程度を推定する (メチル化特異的 PCR 法)。

8) 各組織切片から抽出された DNA をメチル化感受性酵素と非感受性酵素で切断し、塩基配列特異的なプライマーを用いて、PCR を行い、酵素間での PCR 増幅産物量を比較し、メチル化の程度を推定する (メチル化感受性 PCR 法)。

9) Bisulfite genomic sequencing 法はサブクローニングや塩基配列の決定等をする必要があり、メチル化検索の方法としては煩雑である。そこで、Bisulfite genomic sequencing 法により、PP1 遺伝子や REELIN 遺伝子の上流域のメチル化を評価するのに最も良い領域を選択し、COBRA 法、メチル化特異的 PCR 法、メチル化感受性 PCR 法を用いてメチル化の検討を行うのが簡便である。COBRA 法、メチル化特異的 PCR 法、メチル化感受性 PCR 法における PCR 増幅領域の選択、制限酵素の選択、メチル化特異的プライマーや脱メチル化特異的プライマーの作製を行い、各方法でプロトコルを作成し、PP1 遺伝子や REELIN 遺伝子の上流域のメチル化を評価するのに最も適した方法を確立する。

4. 研究成果

研究期間は子どもの虐待死亡事件解剖例はなかったため、症例数を増やすことはできなかった。ところで、遺伝子は加齢に伴いDNAメチル化を受けることが明らかとなってきた。そのため、虐待死亡例のDNAメチル化が異常なDNAメチル化の増加であるか否かを判断するために、発育や加齢に伴うDNAメチル化の程度を調べる必要性が生じてきた。収集された試料は0歳から100歳の脳組織であり、解剖時に摘出した脳をホルマリン固定後、前頭葉上前頭回、扁桃体、海馬、小脳からパラフィン包埋切片を作製した。本研究を実行するための準備として、各組織切片からDNAを抽出し、Bisulfite処理を行い、PP1遺伝子やREELIN遺伝子の上流域に対する塩基配列特異的なプライマーを用いてPCRを行い増幅産物を得た。PP1遺伝子やREELIN遺伝子の上流域のメチル化を評価するのに最も適した方法を確立するため、Bisulfite genomic sequencing法、COBRA法、メチル化特異的PCR法、メチル化感受性PCR法、Pyrosequencing法を行い、比較検討したところ、Pyrosequencing法が最も簡便であることが判った。その方法でプロトコールを作成し、対象とする遺伝子数を増やしてゆき、加齢に伴うDNAメチル化の程度を調査することが可能となった。

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5件)

- 1) Sano R, Hasuike T, Nakano M, Kominato Y, Itoh H. A fatal case of myocardial damage due to misuse of the “designer drug” MDMA. *Legal Med* 11(6): 294-297, 2009. S 査読有

- 2) Tajima Y, Takagi R, Kominato Y. A case of acute myocardial infarction after intracoronary stent implantation: demonstration of the stent location by postmortem X-ray examination. *Legal Med* 11: 226-228, 2009. 査読有
- 3) Nakajima T, Takagi R, Tajima Y, Makita C, Kominato Y, Kuribara J, Ohshima S, Tada H, Tsurugaya H, Kobayashi Y, Takeshita H, Kawai Y, Yasuda T. Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of DNase I in Human Serum. *Clinica Chimica Acta* 403: 219-222, 2009. 査読有
- 4) Tajima Y, Takagi R, Nakajima T, Yasuda T, Kominato Y. 11-Tungstophosphate with iron(II) and hydrogen peroxide efficiently detached bacterial biofilm. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32:1783-1789. 査読有
- 5) Tajima Y, Takagi R, Nakajima T, Kominato Y. An infant with asymptomatic hepatic granuloma probably caused by bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination found incidentally at autopsy: a case report. *Cases J.* 1:337(1-5), 2008. 査読有

[学会発表] (計8件)

- 1) 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦, 加藤恵理子, 高士祐一, 山根庸弘, 新田みなみ, 藤原純子, 竹下治男, 植木美鈴, 安田年博: 低酸素による核酸分解酵素 *DNASEI* 遺伝子の転写調節. 日本DNA多型学会第18回学術集会. 抄録集. 2009; p84, 2009. 5. 19-20, 久留米.
- 2) 田島 裕, 高木利恵, 小湊慶彦: 死後のCT撮影により過去の受傷痕を証明し得

た暴行死の一例. 第 93 次日本法医学会
総会, 2009. 5. 13-15, 大阪.

- 3) 小湊慶彦, 佐野利恵, 中島たみ子, 田島裕, 藤原純子, 竹下治男, 飯田礼子, 安田年博: 低酸素による核酸分解酵素 DNASE 1 遺伝子の発現増加と転写. 第 93 次日本法医学会総会, 2009. 5. 13-15, 大阪.
- 4) 佐野利恵, 栗田さちこ: 群馬大学における Ai の実際-死後画像と剖検情報の比較融合-. 平成 21 年度群馬県警察医会講演会, 2009. 10. 17, 群馬
- 5) 高木利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦, 加藤恵理子, 高士祐一, 山根庸弘, 新田みなみ, 藤原純子, 竹下治男, 植木美鈴, 安田年博: 核酸分解酵素 DNase I 遺伝子の転写調節機構の解明. 日本 DNA 多型学会第 17 回学術集会, 2008. 11. 20-21, 東京.
- 6) 田島裕, 高木利恵, 小湊慶彦: 死後の単純 X 線撮影によりステント留置部位を特定し得た急性心筋梗塞の一例. 第 77 回日本法医学会関東地方会, 2008. 11. 1, 東京.
- 7) 小湊慶彦, 中島たみ子, 田島裕, 高木利恵, 竹下治男, 藤原純子, 飯田礼子, 安田年博: 核酸分解酵素 DNASE 1 遺伝子の転写調節機構の解明. 第 92 次日本法医学会総会, 2008. 4. 23-25, 長崎
- 8) 田島裕, 高木利恵, 小湊慶彦: 急死した乳児の肝臓に類上皮結節が見られた一例. 第 92 次日本法医学会総会, 2008. 4. 23-25, 長崎.

〔図書〕(計 1 件)

中島たみ子, 佐野利恵, 小湊慶彦, 安田年博. DNA 分解酵素 I. 日本臨床. 2009;67(増刊): 546-549.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野利恵 (SANO RIE)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70455955

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: