

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02700

研究課題名(和文) マルトリートメント児の脳画像エピゲノムワイド解析によるバイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Imaging epigenome-wide association study to identify biomarkers for child maltreatment

研究代表者

西谷 正太(Nishitani, Shota)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・特命講師

研究者番号：50448495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：既存データに加え、追加試料・情報を集約し、データクリーニングした結果、マルトリートメント児61名、定型発達児62名のデータセット(脳MRI、唾液メチル化マイクロアレイ)を構築した。エピゲノムワイド解析から、16箇所のゲノムワイド有意なDMPを同定したが、有意なDMRは検出されなかった。これに加え、遺伝子単位毎のゲノムワイド比較を行うGAMuT解析も行ったところ、DMPの中の1箇所を含む遺伝子が有意に関連するという結果を得た。脳MRIとの関連では、このメチル化が後頭葉の紡錘状回と負に相関することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マルトリートメント児、及び同年代の定型発達児の脳MRI、唾液メチル化アレイデータの両者が揃った、世界有数かつ本邦一の規模となるデータセットが構築された。これは今後、多くの研究者らに活用される二次データとしての学術的な利用価値も高い。代表者の一次解析の結果では、マルトリートメントに関連した複数のメチル化部位が明らかにされた。それらメチル化部位や遺伝子と、幼少期のマルトリートメントとを、データ駆動型解析から結びつけた功績は、学術的に貢献度が高い。今後、マルトリートメントに曝された子どもの早期発見に資するバイオマーカーとなる視点についての検討も行うことで、社会的意義にも多大な貢献をする可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In addition to the existing data, additional samples and data were consolidated and cleaned, resulting in a data set (brain MRI and saliva methylation microarray) of 61 maltreatment children and 62 typically developed children. The epigenome-wide analysis identified 16 genome-wide significant DMPs, but no significant DMRs were detected. We also conducted a GAMuT analysis, a genome-wide comparison of each gene unit, and found that the gene containing one location in the DMP was significantly associated. In relation to brain MRI, this methylation was found to correlate negatively with the fusiform gyrus of the occipital lobe.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：虐待 マルトリートメント エピゲノム MRI 子ども DNAメチル化 脳 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

マルトリートメントは、子どもの心と脳に生涯消えない傷跡を刻み、成人後も多数の精神疾患やパーソナリティ障害の罹患率増・重篤化、これに伴う自殺率増が報告され (Angelakis I, Psychol Med, 2019) 虐待自体の予防に加え、被マルトリートメント児 (以下 Mal 児) の早期介入・治療が強く望まれている。しかし、介入を決定付ける客観的バイオマーカーはなく、現状は司法面接等を始め様々な対策が行われているが、それでも虐待死を見過ごすケースが少なくない。また、治療はトラウマ焦点型心理療法と薬物療法の組み合わせであるが、Mal 児脳の脆弱化機序解明の研究自体が極めて少なく、治療の根幹をなす標的分子機序も定まっていない為、对症療法に留まっている。一方、子どもの脳は、思春期にかけてメジャー・アップデートとも言える構造的・機能的再編が生じ、大脳皮質/皮質下の均衡の取れた成人型脳へと発達・成熟を遂げる (Giedd JN ら)。多くの精神疾患の好発時期は思春期～青年期以降にかけてであることを考え合わせると、Mal 児では、この脳再編のミスリードが成人後の脆弱性を残す原因である可能性が高い。このような時間的制限があるとすれば、成人後では根本的治療の有効時期を逃すとも考えられる。

一方、エピゲノム変化の内、DNA メチル化 (以下、メチル化) は、DNA の塩基配列を変えずに、養育環境を含む生後の環境要因によって変化を生じ、それが長期的に遺伝子機能を制御し得ることから、マルトリートメント研究において注目されている。McGowan PO ら (Nat Neurosci, 2009) は、幼少期の虐待経験を持つ成人の海馬死後脳組織を用い、Weaver IC ら (Nat Neurosci, 2004) がげっ歯類ネグレクトモデルで見つけた海馬 NR3C1 遺伝子メチル化増加を、ヒトで再現し、これを発端に他のストレス関連遺伝子メチル化との関連研究に火が着いた。しかし、McGowan PO らを含む多くの研究は、かつて虐待を受けた経験を持つ成人が対象で、実に数十年前のトラウマ体験が遺伝子上に刻まれていたという意味では学術的に興味深いが、成人が対象である以上、思春期前の Mal 児への介入・治療標的を決める為の研究にはならない。現在、成人でなく、施設保護中の Mal 児を対象に、そのエピゲノム解析を行った研究は僅かだがある。Non AL ら (Am J Phys Anthropol, 2016) は、長期施設保護児の 12 歳時点での類粘膜炎細胞 FKBP5 と SLC6A4 遺伝子メチル化が、入所総年数と共に低下することを報告している。しかし、定型発達 (TD) 児との比較はなく、Mal 児特異的变化かはわからない。Parade SH ら (Dev Psychopathol, 2017) は、Mal 児家庭介入による 3-5 歳 Mal 児の唾液 FKBP5 遺伝子メチル化の介入前後の比較を行った。この研究では、TD 児との比較も行われ、2 箇所のメチル化が異なることを報告しており、有力なバイオマーカー候補と考えられる。また、申請者らも本研究の着想で後述した研究 (Fujisawa TX, Nishitani S (equally contributed), Neuropsychopharmacol, 2019) から、Mal 児と TD 児を比較し、OXTR 遺伝子上のメチル化の違い、脳との相関を明らかにした。しかし、これら研究は、遺伝子を定めた標的解析であり、他の無数の遺伝子との関連性は何ら評価できていない。唯一、Kumusta R ら (Transl Psychiat, 2016) は、ルーマニアの劣悪施設入所児 (実親による虐待ではない) と通常の施設保護児のエピゲノムワイド解析による比較をしているが、限られたサンプルサイズ (各 16) から、ゲノムワイドレベルでの違いは見出せず、入所期間に従い CYP2E1 遺伝子領域メチル化が増加したことを報告している。

## 2. 研究の目的

本研究では施設保護中の Mal 児と一般家庭の TD 児を対象に、研究 1) 唾液メチル化のエピゲノムワイド解析を行い、Mal 児に関連する候補遺伝子メチル化を同定する。また、研究 2) 同一対象者の脳 MRI から、Mal 児に関連する脳脆弱性を明らかにする。メチル化には組織特異性があり、本来、精神疾患や心のエピゲノム研究には、その対象臓器である脳が必要だが、生きた人間の脳組織は採取できない。このジレンマには、唾液、血液を脳の代替組織として活用する為の対策や議論がなされてきた。申請者の留学先の上司・米国 Emory 大学医学部産婦人科・准教授の Alicia K. Smith は、唾液が血液よりも脳組織に近いことを示すエピゲノムワイドデータを報告した (Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2015)。申請者の共同研究者・米国 Iowa 大学 (現 Stanford 大学) 精神科・准教授の Gen Shinozaki は、難治性てんかん患者の切除脳組織と、同一患者から得た類粘膜炎・唾液・血液メチル化とのエピゲノムワイド相関データベース (IMAGE-CpG) を公開し、てんかん病巣という制限はあるものの、末梢組織メチル化と脳組織との相関性を確認するツールを提供した (Transl Psychiat, 2019)。このように、研究 1) の唾液メチル化の群間比較だけでは、それが本当に脳脆弱性に関連するののかという疑問が尽きない。そこで、本研究では、Pilot 研究後、症例数を追加し、研究 3) 脳画像エピゲノム解析を完遂 (96 名) し、唾液メチル化が実際に脳 (容積・接続・機能) と関連するかを調べることで、より質の高い成果を求めるものとする。

## 3. 研究の方法

<2020 年度の計画> 研究 1) 脳 MRI 実施済 Mal 児 32 名、TD 児 32 名の既存 DNA1 $\mu$ g (Qubit 測定) からマイクロアレイ (Illumina EPIC Array) を行う。TD 児に比べ Mal 児で増加 (減少) する

メチル化部位 (DMP: Differential Methylation Point)・領域 (DMR: Differential Methylation Region) を 85 万箇所から同定する (ゲノムワイドレベル FDR 補正 5%)。得られた結果より、エンリッチメント解析 (Gene Ontology, KEGG Pathway, oPOSSUM-3) を行い、如何なる機能、経路、転写調節因子結合部位が関与するかも調べ、関連候補遺伝子群の性質を明らかにする。

研究 2) 本学病院診療部にて、Mal 児 10 名、TD 児 10 名の新規脳 MRI・唾液採取を実施する。

研究 3) Pilot データセット (Mal 児 32 名、TD 児 32 名エピゲノム・脳 MRI) から脳画像エピゲノム解析 (A.研究 1 で同定済メチル化に絞り、関連脳部位の形態・接続・機能を探索) を行う。

<2021 年度の計画> 研究 1) 前年度より脳 MRI 実施・唾液採取済の追加試料を同様に委託分析し、全例 (Mal 児 48 名、TD 児 48 名) での DMP、DMR の群間比較、上述したエンリッチメント解析を行う。また、GEO (Gene Expression Omnibus) 等の公的データベースに同フォーマットのマイクロアレイデータが豊富に公開されている為、マルチリトメント、トラウマ研究のデータセットを用い、本研究で絞られたメチル化が本研究とは独立した別のデータセットでも再現されるかを調べ、人種・文化・国を越えた結果の頑健性についても検証する。

研究 2) 前年度より継続して Mal 児 6 名、TD 児 6 名の新規脳 MRI・唾液採取を実施する。TD 児に比べ Mal 児で増加 (減少) する脳容積・接続・機能部位を同定する。

研究 3) Pilot データセットから脳画像エピゲノム解析 (B.研究 2 で同定済脳部位に絞り、関連メチル化を探索) を行う。

<2022 年度の計画> 研究 3) 全例データセット (Mal 児 48 名、TD 児 48 名エピゲノム・脳 MRI) から、脳画像エピゲノム解析 (A 及び B) を行い、最終候補メチル化を同定する。また、得られた結果より、エンリッチメント解析を行い、如何なる機能、経路、転写調節因子結合部位が関与するかも調べ、関連候補遺伝子群の性質を明らかにする。最終候補メチル化は、MALDI-TOF 質量分析計による EpiTYPER 解析からもメチル化の測定を行い、結果の妥当性評価を行う。

#### 4. 研究成果

既存データに加え、追加試料・情報を集約し、データクリーニングした結果、Mal 児 61 名、TD 児 62 名のデータセット (脳 MRI、唾液メチル化マイクロアレイ) を構築した。エピゲノムワイド解析から、16 箇所のゲノムワイド有意な DMP を同定したが、有意な DMR は検出されなかった。これに加え、遺伝子単位毎のゲノムワイド比較を行う GAMuT 解析 (Hüls A, 2021) も行ったところ、DMP 中の 1 箇所を含む遺伝子が有意に関連するという結果を得た。脳 MRI との関連では、このメチル化が後頭葉の紡錘状回と負に相関することがわかった。現在、一連の結果を含む論文を発表するため、準備を行っている。

一方、DNA メチル化は組織特異性があり、唾液 DNA メチル化と脳構造との関連性が見出せたとしても、脳エピゲノムの機序解明に迫るのは難しい。そこで、当初の計画にはなかったが、脳外科手術を受けた患者の摘除脳組織、血液、唾液、頬粘膜を採取し、それらのメチル化アレイを行うことで、アジアでは初となる脳末梢組織間相関データベース (AMAZE-CpG) を作成・公開した。これにより唾液を使った本研究で得られた結果の、脳メチル化における解釈に用いると共に、公的データベースとして多くの研究者らに活用されることが期待される。また、本研究によって収集してきたデータをリソースとして活用し、TD 児の脳画像エピゲノムワイド解析を web 上で行うことができるデータベース (meVBM) の開発も行った。これは脳画像データと、メチル化のゲノムワイドデータの両者が揃わないと成立しないため、本研究によって得られたデータが有効に生かされるものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nishitani S, Isozaki M, Yao A, Higashino Y, Yamauchi T, Kidoguchi M, Kawajiri S, Tsunetoshi K, Neishi H, Imoto H, Arishima H, Kodera T, Fujisawa TX, Nomura S, Kikuta K, Shinozaki G, Tomoda A	4. 巻 13
2. 論文標題 Cross-tissue correlations of genome-wide DNA methylation in Japanese live human brain and their blood, saliva, and buccal epithelial tissues	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-023-02370-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takiguchi S, Makita K, Fujisawa TX, Nishitani S, Tomoda A	4. 巻 1
2. 論文標題 Effects of intranasal oxytocin on neural reward processing in children and adolescents with reactive attachment disorder: a randomized controlled trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Child and Adolescent Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1056115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/frcha.2022.1056115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishitani Shota, Fujisawa Takashi X., Hiraoka Daiki, Makita Kai, Takiguchi Shinichiro, Hamamura Shoko, Yao Akiko, Shimada Koji, Smith Alicia K., Tomoda Akemi	4. 巻 11
2. 論文標題 A multi-modal MRI analysis of brain structure and function in relation to OXT methylation in maltreated children and adolescents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-021-01714-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurata Sawa, Hiraoka Daiki, Ahmad Adlan Aida Syarinaz, Jayanath Subhashini, Hamzah Norhamizan, Ahmad-Fauzi Aishah, Fujisawa Takashi X., Nishitani Shota, Tomoda Akemi	4. 巻 12
2. 論文標題 Influence of the COVID-19 Pandemic on Parenting Stress Across Asian Countries: A Cross-National Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychology	6. 最初と最後の頁 782298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpsyg.2021.782298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujisawa Takashi X., Nishitani Shota, Makita Kai, Yao Akiko, Takiguchi Shinichiro, Hamamura Shoko, Shimada Koji, Okazawa Hidehiko, Matsuzaki Hideo, Tomoda Akemi	4. 巻 15
2. 論文標題 Association of Epigenetic Differences Screened in a Few Cases of Monozygotic Twins Discordant for Attention-Deficit Hyperactivity Disorder With Brain Structures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 799761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.799761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cheong Yongjeon, Nishitani Shota, Yu Jinyoung, Habata Kaie, Kamiya Taku, Shiotsu Daichi, Omori Ichiro M, Okazawa Hidehiko, Tomoda Akemi, Kosaka Hirota, Jung Minyoung	4. 巻 bhac043
2. 論文標題 The effects of epigenetic age and its acceleration on surface area, cortical thickness, and volume in young adults	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhac043	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 該当する

1. 著者名 Nishitani Shota, Kasaba Ryoko, Hiraoka Daiki, Shimada Koji, Fujisawa Takashi X., Okazawa Hidehiko, Tomoda Akemi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epigenetic Clock Deceleration and Maternal Reproductive Efforts: Associations With Increasing Gray Matter Volume of the Precuneus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 803584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.803584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Andari E, Nishitani S, Kaundinya G, Caceres GA, Morrier MJ, Ousley O, Smith AK, Cubells JF, Young LJ	4. 巻 45(7)
2. 論文標題 Epigenetic modification of the oxytocin receptor gene: implications for autism symptom severity and brain functional connectivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 1150-1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-020-0610-6	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 該当する

1. 著者名 Kogan SM, Bae D, Cho J, Smith AK, Nishitani S	4. 巻 なし
2. 論文標題 Pathways linking adverse environments to emerging adults' substance abuse and depressive symptoms: A prospective analysis of rural African American men	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Psychopathology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0954579420000632	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 該当する

1. 著者名 De Leon D, Nishitani S, Walum H, McCormack KM, Wilson ME, Smith AK, Young LJ, Sanchez MM	4. 巻 126
2. 論文標題 Methylation of OXT and OXTR genes, central oxytocin, and social behavior in female macaques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hormones and Behavior	6. 最初と最後の頁 104856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yhbeh.2020.104856	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 該当する

1. 著者名 Nishitani S, Suzuki S, Ochiai K, Yao A, Fujioka T, Fujisawa TX, Tomoda A	4. 巻 75(3)
2. 論文標題 Altered epigenetic clock in children exposed to maltreatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 110-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.13183	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 Hack LM, Nishitani S, Knight AK, Kilaru V, Maddox SA, Seligowski AV, Jovanovic T, Ressler KJ, Smith AK, Michopoulos V	4. 巻 6
2. 論文標題 Epigenetic prediction of 17 $\beta$ -estradiol and relationship to trauma-related outcomes in women	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comprehensive Psychoneuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 100045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cpneec.2021.100045	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 該当する

1. 著者名 Aoi T, Fujisawa TX, Nishitani S, Tomoda A	4. 巻 0
2. 論文標題 Mismatch negativity of preschool children at risk of developing mental health problems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西谷正太、磯崎誠、矢尾明子、東野芳史、山内貴寛、木戸口正宗、川尻智士、常俊顕三、根石紘行、井本浩哉、有島英孝、小寺俊昭、藤澤隆史、野村貞宏、菊田健一郎、篠崎元、友田明美
2. 発表標題 脳、血液、唾液、頬粘膜上皮のゲノムワイドDNAメチル化の組織横断的なDNAメチル化の相関性
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西谷正太、友田明美
2. 発表標題 被虐待児のエピゲノム
3. 学会等名 第65回小児神経学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西谷正太
2. 発表標題 社会性とエピジェネティクス
3. 学会等名 日本社会心理学会第63回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Nishitani
2. 発表標題 Oxytocin and oxytocin receptor DNA methylation modulates social behaviors in humans
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西谷正太, 友田明美
2. 発表標題 被虐待児のOXTR遺伝子DNAメチル化の脳画像エピゲノム解析
3. 学会等名 第116回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西谷正太
2. 発表標題 社会環境による ヒトの社会性への影響
3. 学会等名 日本社会心理学会第61回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shota Nishitani
2. 発表標題 A cross-national study of the influences of COVID-19 pandemic on parenting stress across Asian countries
3. 学会等名 The 2nd International Symposium for CRNACDD (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shota Nishitani
2. 発表標題 Epigenetic modulation of OXT and OXTR genes in humans
3. 学会等名 The 33rd Meeting of the Japanese Society for Behavioral Neuroendocrinology (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nishitani Shota	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier (Academic Press)	5. 総ページ数 420
3. 書名 Chapter 16 - Capturing the epigenome: Differences among blood, saliva, and brain samples, Epigenetics of Stress and Stress Disorders	

〔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			
韓国	Korea Brain Research Institute			
マレーシア	University of Malaya			
米国	Emory University	University of Georgia	Stanford University	他1機関