

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19663

研究課題名（和文）虐待の早期発見を目指した血中マーカー分子の確立-萎縮胸腺の新機能-

研究課題名（英文）Establishment of blood marker molecules for early detection of abuse

研究代表者

小森 忠祐（Komori, Tadasuke）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90433359

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：児童虐待は深刻な社会問題となっており、その早期発見方法の開発が切望されている。我々は、被虐待者では胸腺が萎縮することに着目し、萎縮胸腺における虐待特異的なストレス応答分子の発見を目指した。本研究の結果より、線維芽細胞増殖因子の一種であるFGF23が虐待など重度のストレス時にのみ増加する分子であること、及びストレスが過去にかかっていたことを長時間追跡できる分子であることが明らかとなった。このことは、FGF23が虐待に特異的、及び隠蔽防止に役立つマーカーとなる可能性を示唆している。また、萎縮胸腺からは、血中に分泌される分子として線維芽細胞増殖因子ファミリーや、アディポカインを候補分子として得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

厚生労働省では児童虐待に対して、発生予防、発生時の迅速・的確な対応、被虐待者の自立支援の三点を軸に対策を進めているが、重篤な虐待が後を絶たないのが現状であり、その早期発見へと繋がる特異的なマーカー分子の発見は社会的に喫緊の課題である。また、胸腺は、T細胞の分化・成熟の場として知られているが、それ以外の機能は不明である。小児期における生体の危機的状況を知らせるアラートシグナルを発する新規の内分泌臓器という、胸腺の新たな役割の発見にも繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Child abuse has become a serious social problem, and the development of methods for its early detection is much needed. We focused on the fact that the thymus gland atrophies in abused children and aimed to discover abuse-specific stress response molecules in the atrophied thymus gland. The results of this study revealed that FGF23, a type of fibroblast growth factor, is a molecule that does not increase with minor stress but only increases during more severe stress, such as abuse, and that it is a molecule that can track past stress for a long time. This suggested that FGF23 may be a specific marker for abuse and a marker that may help prevent concealment of abuse. The atrophic thymus also yielded the fibroblast growth factor family and adipokines as candidate molecules that are secreted into the blood.

研究分野：代謝学

キーワード：虐待 胸腺 ストレス FGF23

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の調査では、全国の児童相談所における児童虐待対応相談件数は2003年では約2万5千件であったのに対し、2017年には約13万件にまで増加しており、深刻な社会問題となっている。厚生労働省では児童虐待に対して、発生予防、発生時の迅速・的確な対応、被虐待者の自立支援の三点を軸に対策を進めているが、重篤な虐待が後を絶たないのが現状であり、虐待を受けているかを早期に発見するための確実・簡便・安価な方法の開発が切望されている。

2. 研究の目的

我々は、以前より、摂食中枢である視床下部の絶食に対する応答に着目し、研究を進めてきた(Komori et al., J Biol Chem, 2010; J Biol Chem, 2012)。その研究において、当該教室では、2013年度挑戦的研究(萌芽)を獲得し、絶食により視床下部において誘導される遺伝子をcDNAマイクロアレイにより網羅的に検討したところ、抗老化遺伝子である α Klothoを見出した。我々は、この研究テーマに関して、研究代表者として、2017年度挑戦的研究(萌芽)、2019年度基盤研究(B)を獲得し、視床下部における α Klothoの機能解析を行ってきた。その結果、 α Klothoは絶食時の視床下部において摂食や体温の調節を行うという知見を得ている。また、 α Klothoのリガンドである線維芽細胞増殖因子(FGF)23の血中濃度が絶食時に増加していたこと、及び末梢臓器の中でも胸腺におけるFGF23の発現が著明に増加していたことより、FGF23は絶食時に胸腺より分泌される新規分子であることを明らかにした。絶食時には、様々な臓器の重量が少なからず減少するが、重量の減少程度が最も大きい臓器が胸腺であり(Yamamoto et al., FEBS Open Bio, 2015)、胸腺は絶食ストレスに対して反応性の高い臓器であると考えられる。そこで、絶食時の萎縮胸腺を組織学的に解析したところ、胸腺細胞の著明な減少が認められたが、皮質・髄質の胸腺上皮細胞は保存されており、それらの細胞においてFGF23の発現が認められた。

虐待を受けている被虐待者において、胸腺の萎縮がおこる事はよく知られており(Fukunaga et al., Forensic Sci Int, 1992)、法医学の分野において虐待を受けているかの指標の一つとなっている。虐待は、ネグレクト(育児放棄)・身体的虐待・性的虐待・心理的虐待に分離される。我々は、マウスの絶食モデルを、ネグレクトにおける“食事を与えない行為”のモデルとして捉え、上述の実験結果と合わせ、「被虐待者の萎縮胸腺からは、FGF23を含む様々な虐待特異的なストレス応答分子が産生される」という仮説を立てた。本研究は、FGF23が新たな虐待の血中マーカーとなりうるのかを検討するとともに、虐待時の胸腺において産生される分子を明らかにし、虐待に特異的な新規マーカーの探索へと繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物、絶食負荷

本研究で用いた8週齢の雄性C57BL/6Jマウスは、日本SLCより購入した。全てのマウスは、明暗周期が12時間(明期：午前8時から午後8時まで)、温度 $23.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度50~60%の室内で飼育した。食餌(CE-2;日本クレア)と水は自由に摂取させた。絶食負荷実験の3日前より、フロアメッシュを敷いたケージにてマウスを個別飼育した。その後、自由飲水下にて絶食し、24時間、及び48時間後に組織採取を行った。また、48時間絶食後に再摂食を行った。

(2) 組織採取、RNA抽出

RNAの抽出は、以前の方法に従って行った(Komori et al., J Biol Chem, 2012)。マウスにイソフルラン麻酔をかけ、胸腺を採取した。TRI reagent (モレキュラーリサーチセンター)を用いてRNAを抽出し、リアルタイムPCR、及びRNAシーケンス解析を行った。

(3) 灌流固定、組織切片の作成

マウスにイソフルラン麻酔をかけ、経心的に生理食塩水を注入した。その後、ザンボン固定液(2%パラホルムアルデヒドと0.2%ピクリン酸)を経心的に注入し、灌流固定を行った。固定した胸腺を採取し、同固定液で 4°C 3時間浸漬固定した。浸漬固定後、30%スクロース溶液にて脱水した。その後、組織をO.C.T.コンパウンド(サクラファインテックジャパン)で包埋し、ドライアイスで冷却したn-ヘキサンに沈め、 -80°C で保存した。クライオスタットを用いて $6\mu\text{m}$ の薄さのマウスの胸腺切片を作成した。

(4) 蛍光免疫染色

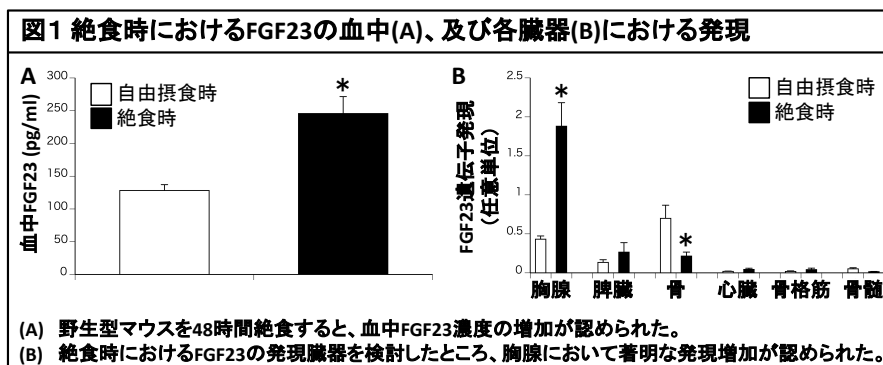
本研究で行った蛍光免疫染色法は、以前の方法に従って行った(Komori et al., J Biol Chem, 2012)。5%の正常ロバ血清にて切片を室温で1時間インキュベートした後、抗FGF23抗体(R&D Systems)、抗サイトケラチン5抗体(アブカム)、及び抗サイトケラチン8抗体(アブカム)で一晩インキュベートした。翌日、二次抗体(Cy2でラベルされた抗ヤギIgG抗体、Jackson ImmunoResearch)を用いて室温で1時間インキュベートした。すべての切片は、4',6-diamidimo-

2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)で対比染色を行った。蛍光画像は、デジタル CCD カメラ (DP71;オリンパス)が取り付けられた落射蛍光顕微鏡(BX50)を用いて撮影した。

4. 研究成果

(1) FGF23 の新規虐待マーカーとしての可能性の検討

FGF23 が虐待のマーカーとなりうるのかを明らかにするために、絶食モデルマウスの血中 FGF23 濃度を測定したところ、自由摂食群と比較して増加が認められた (図 1)。次に、絶食時に FGF23 を

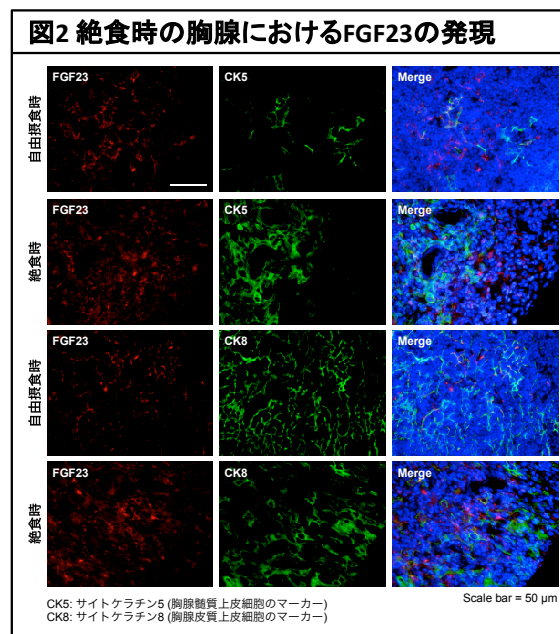


産生している臓器を検討したところ、胸腺において FGF23 の著明な増加が認められた (図 1)。また、絶食 48 時間後に再摂食を行い、血中 FGF23 の増加持続時間を経時的に検討したところ、再摂食後 6 時間目においても増加の持続が認められた。以上の結果より、FGF23 は、虐待 (特に、ネグレクトにおける“食事を与えない行為”) の血中マーカーとなりうる可能性が示唆された。

FGF23 タンパクの胸腺内における局在を検討した。胸腺皮質上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン 8、及び胸腺髄質上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン 5 に対する抗体を用いて免疫染色法にて検討したところ、FGF23 はいずれのマーカー分子とも共存が少なく、胸腺上皮細胞には発現していない可能性が示唆された (図 2)。

虐待における胸腺萎縮のメカニズムの一つとして、ストレスに暴露されることによる視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA axis) の活性化が考えられ、副腎皮質からグルココルチコイドが分泌される。しかし、グルココルチコイドは一般的なストレスマーカーであり、あらゆるストレス負荷において分泌される。また、グルココルチコイドは、絶食後 24 時間という絶食の早期より血中濃度が上昇し、再摂食後 1 時間という短時間で正常値に戻ることが知られている (Ueyama et al., Neurosci Lett, 2004)。

我々の結果は、FGF23 が、軽微なストレスでは増加せず、虐待などのより重度のストレス時のみ増加する分子であること、及びストレスが過去にかかっていたことを長時間追跡できる分子であることを示唆しており、虐待の発見や隠蔽防止に役立つ可能性が考えられる。

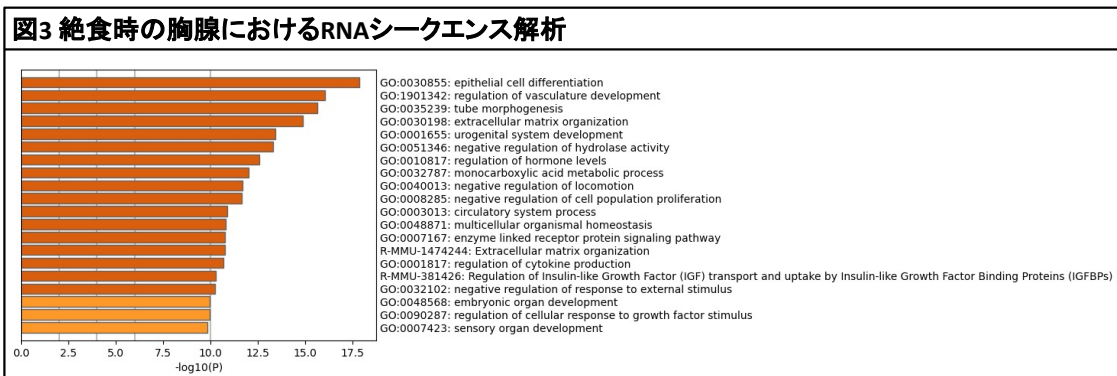


(2) 虐待時の胸腺より産生される新規分子の探索

絶食モデルの胸腺と正常胸腺の胸腺組織全体を用いて RNA シークエンス解析を行い、両組織における遺伝子発現を比較し、虐待のマーカーとなりうる新規分子を解析した。遺伝子オントロジーのエンリッチメント解析により、上皮細胞の分化に関与する遺伝子群の挙動が大きく変動していることが明らかとなった (図 3)。

また、絶食時の胸腺より産生される新規分子の探索を行った。コントロール群、24 時間絶食群、及び 48 時間の長期絶食群の 3 群の胸腺を用いて RNA シークエンス解析を行い、遺伝子発現量を比較した。虐待を早期に発見するための候補分子として、1) コントロール群と 24 時間絶食群の間で 10 倍以上増加している、2) 48 時間絶食後もその分子の増加が持続している、の 2 点を満たす分子を同定した。極度のストレス下においてのみ発現する候補分子として、1) コントロール群と 24 時間絶食群の間では差が認められない、2) 24 時間絶食群と比較して 48 時間絶食群で増加している、3) 血中に分泌されるサイトカインや増殖因子、の 3 点を満たす分子を同定した。いずれの条件においても、将来的にはヒトにおける虐待発見のマーカー分子として用いることを想定し、血中に分泌される分子を同定したところ、線維芽細胞増殖因子ファミリーや、

アディポカインを候補分子として得た。



<引用文献>

Fukunaga T, Mizoi Y, Yamashita A, Yamada M, Yamamoto Y, Tatsuno Y, Nishi K. Thymus of abused/neglected children. *Forensic Sci Int* 53: 69-79, 1992.

Komori T, Doi A, Furuta H, Wakao H, Nakao N, Nakazato M, Nanjo K, Senba E, Morikawa Y. Regulation of ghrelin signaling by a leptin-induced gene, negative regulatory element-binding protein, in the hypothalamic neurons. *J Biol Chem* 285: 37884-37894, 2010.

Komori T, Doi A, Nosaka T, Furuta H, Akamizu T, Kitamura T, Senba E, Morikawa Y. Regulation of AMP-activated protein kinase signaling by AFF4 protein, member of AF4 (ALL1-fused gene from chromosome 4) family of transcription factors, in hypothalamic neurons. *J Biol Chem* 287: 19985-19996, 2012.

Ueyama E, Morikawa Y, Yasuda T, Senba E. Attenuation of fasting-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus in response to refeeding. *Neurosci Lett* 371: 40-44, 2004.

Yamamoto J, Kamata S, Miura A, Nagata T, Kainuma R, Ishii I. Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis. *FEBS Open Bio* 5: 357-368, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	森川 吉博 (Morikawa Yoshihiro)	和歌山県立医科大学・解剖学第二講座・教授 (24701)	
研究協力者	久岡 朋子 (Hisaoka Tomoko)	和歌山県立医科大学・解剖学第二講座・助教 (24701)	
研究協力者	岩淵 禎弘 (Iwabuchi Sadahiro)	和歌山県立医科大学・分子病態解析研究部・講師 (24701)	

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