

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590637

研究課題名（和文）長期ストレス暴露を証明する法医分子病理学的診断法の開発  
—下垂体を標的として—研究課題名（英文）The development of the forensic pathological method for  
diagnosis about chronic stress

研究代表者

鶴屋 伸一郎（TSURUYA SHINITIROU）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90562108

研究成果の概要（和文）：

現在、日本では過労死は大きな社会問題となっている。過労死においては過労死の労災認定請求件数に比して過労死と認められた件数(支給決定件数)は非常に少ない。これは過労死における科学的な診断基準が確立されていないためである。過労死では生体に長期ストレス負荷がかかっていると考えられるが、長期ストレスの法医学的証明法は確立されていない。また、法医実務で経験する成人の虐待例において、剖検所見から決定的な「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。ラット下垂体線種細胞 MtT/S 細胞にコルチコステロンを添加し MtT/S 細胞の経時的な遺伝子発現状態を MicroArray 法にて検討したところ、培養後 24 時間以降に Syntaxin 11 (Stx11)、Somatostatin receptor 4 (SStr4)、Cystic fibrosis transmembrane conducting regular homolog (Cftr)、Ras oncogene family 3a (Rab3a)、activating transcription factor 2 (Atf2)、cAMP responsive element binding protein 3-like 1 (Creb3l1)、cAMP responsive element binding protein 3-like-2 (Creb3l2) に有意な増減が認められた。特に、Stx11、SStr4 では 200 倍以上 mRNA が増加していた。さらに、我々が開発したマウス長期ストレスモデルにおいて、下垂体の Stx11、SStr4 mRNA は長期ストレスにて有意に増加していた。

研究成果の概要（英文）：

Recently, death from overwork has been paid a great deal of attention as one of the serious society problems in Japan. The people who died from overwork must suffer from chronic stress. It is important to diagnose chronic stress to demonstrate the death from overwork in forensic practice. Unfortunately, forensic pathologists did not have any useful tool or maker to do it. Although stress induces glucocorticoid (Gc) secretion from adrenal glands, there is huge variance in blood of dead body due to the stress of agonal stage, and the hormone could not be available for forensic practice. We already reported that the Somatostatin receptor 4 (Sstr4) and Syntaxin 11 (Stx11) increased after high-dose Gc treatment in pituitary adenoma cell. We assumed that these mRNA might increase after long-term stress, as chronic stress must be high Gc state. So, we investigated (that) the both mRNA expression after chronic stress in mouse pituitary. The restraint to mice was utilized as stress model. The mice were treated only once as single, or once a day for one week as chronic. No restrict(restraint) were employed as control. They were euthanized at 60 min after the final treatment and pituitary was collected. The level of Sstr4 and Stx11 mRNA from the gland were measured with q-PCR method. There was no significant difference of Stx11 with single and chronic treatment between the stress treatment and control. On the other hand, Sstr4 showed the significantly increase after the chronic treatment but not with the single. We considered that Sstr4 might increase expression by chronic stress. So, we concluded that the evaluation of Sstr4 mRNA might be useful to diagnose the chronic stress for forensic practice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医病理学

1. 研究開始当初の背景

法医実務で経験する成人の虐待例において、剖検所見から決定的な「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、申請者らが既に同定した長期ストレス反応遺伝子産物である Somatostatin receptor 4 (SSTR4) 等の抗体を作製し、動物モデルにて遺伝子産物である蛋白質の量を確認し、その結果を法医実務へ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したい。

2. 研究の目的

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、2006年4月より施行された「高齢者虐待防止法」による社会的な意識の高まりをうけて、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していくことが予想される。

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」がその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。

分担研究者である池松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での研究では、長期ストレスをシミュレートする Adjuvant-induced Arthritis (AA) モデルでは、コルチコステロンが、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コルチコステロンが上昇することが判明している (Fig. 1)。

しかし、Coe (J Forensic Sci, 1973) らの報告によると死体血液・尿ではコルチコステロン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。

ところで、埼玉大学の川島らと分担研究者である坪井らは、ラット下垂体線種細胞 MtT/S 細胞にコルチコステロンを加え 48 時間培養し、成長ホルモン (GH) の免疫組織化学的検討を行って、Fig.2 のような現象を見出している。

そこで申請者らは、コルチコステロンを添加した MtT/S 細胞の経時的な遺伝子発現状態を MicroArray 法にて検討したところ、培養後 24 時間以降に Syntaxin 11 (Stx11)、Somatostatin receptor 4 (SSTR4)、Cystic fibrosis transmembrane conducting regular homolog (Cftr)、Ras oncogene family 3a (Rab3a) に有意な増減が認められ

た。特に、Stx11、Sstr4 では 200 倍以上 mRNA が増加していた。

これらの遺伝子は、生体に於いても下垂体でこれらの遺伝子発現量の変動すると考えられる。そこで、長期ストレス動物モデルにおける Sstr4、Stx11 発現量を測定し、長期ストレスマーカーとしての法医病理学的意義を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 《1. 試料作製》

長期ストレスの影響を検討するため、単回ストレスモデルと長期ストレスモデルを作製した。単回ストレスモデルでは、拘束処置を1回施したマウスを Stress 群、一方で無処置のマウスを Control 群とした。長期ストレスモデルでは、拘束処置を1日1回1,2週間施したマウスを Stress 群、無処置のマウスを Control 群とした。単回・長期ストレスモデルともに最終拘束処置の1時間後に安楽死させ、下垂体を採取、また Control 群も Stress 群と同じ時間に安楽死させ、下垂体を採取した。

#### ▪《2. コルチコステロンの解析》

採取した体幹血液を遠心分離し、得られた血清を用いて ELISA 法により血清中コルチコステロン値を測定した。統計的検討は Mann-whitney 検定にて行った

#### ▪《3. mRNA の発現動態解析》

下垂体より total RNA を精製後、cDNA に逆転写し、Real Time Quantitative PCR 法にて Sstr4、Stx11 の発現量を測定した。内部標準として 18 ribosomal protein (18Rps) を用いた。統計的検討は Mann-whitney 検定にて行った。

### 4. 研究成果

血中コルチコステロン量は単回ストレスモデルではコントロール群と比べストレス群で有意に上昇していたが、長期ストレスモデルでは1週間・2週間共に有意な差は認められなかった(Fig.2)。また、Stx11 の発現量は単回ストレスモデル・長期ストレスモデル共に有意な発現量の変化は認められなかった(Fig.3)。Sstr4 のストレス負荷1週間のストレス群のみコントロール群に比べ Sstr4 の発現量の有意な増加が認められたが、単回及び2週間のストレス群において有意差は認められなかった(Fig.4)。また、Sstr4 はある一定期間においてコルチコステロン量が減少した状態でも発現量が増加することが明らかになった。しかし、この後ある一定期間が過

ぎた後では Sstr4 発現量の増加は認められなくなった。

ストレス負荷によるコルチコステロン量増加が認められなくなった時に Sstr4 発現量は増加し、その後減少する。つまり、Sstr4 は過労死のような長期ストレス負荷状態で負荷が始まった後一定期間内後に発現が増加することが推定される。従って、剖検症例において Sstr4 の増加を証明することは、過労死、つまり長期ストレスの診断が容易になるものとする。

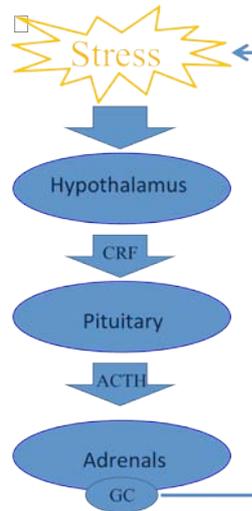


Fig.1 HPA axis.

▪ Stress induces glucocorticoid (Gc) secretion from adrenal glands

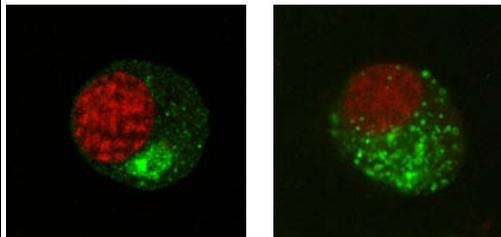


図 1

GH に対する蛍光免疫染色像 (緑; Alexa488; GH 赤; PI; 核)

共焦点レーザー顕微鏡による観察像である。対照群 (左) では細胞質内にゴルジ装置様の強い GH 陽性反応 (緑) が確認でき、分泌顆粒様の染色が少数見られたのに対し、コルチコステロン刺激群 (右) ではゴルジ装置は観察されず、多数の分泌顆粒の染色が確認された。

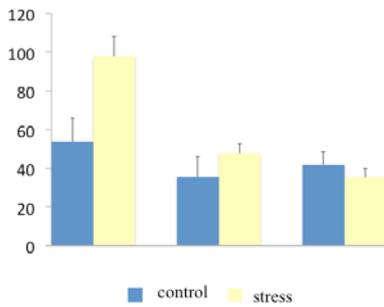


Fig.2  
Concentration of corticosterone in serum at 60min after treatment. Indicates significant difference compared to control in single treatment ( $p \leq 0.05$ )

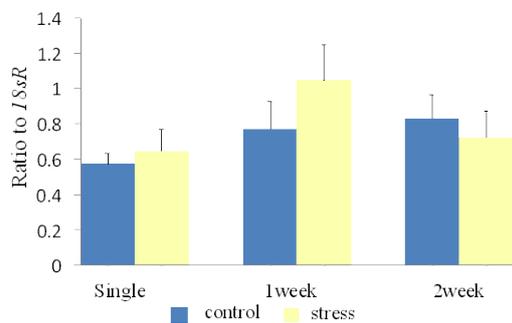


Fig.3 Stx11 mRNAs expression in pituitary

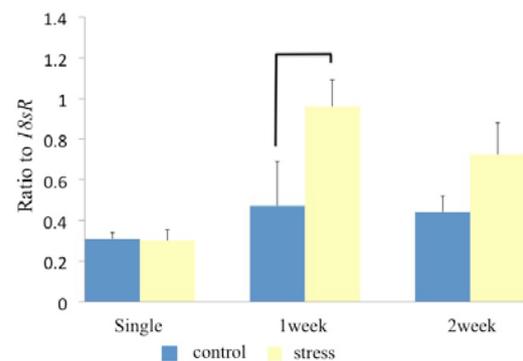


Fig.4 Sstr4 mRNAs expression in pituitary at 60 min later after treatment.

## 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)

① 安倍優樹、池松和哉、鶴屋伸一郎、新宮啓太、梅原敬弘、中園一郎、長期ストレス負荷モデルマウスにおける Sstr4, Stx11 の発現動態. 第 96 次日本法医学会学術全国集会. 浜松.

② Expression of Sstr4 and Stx11 in mouse pituitary after chronic stress treatment. Abe Y, Ikematsu K, Shingu K, Tsuruya S, Umehara T. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine. Istanbul, Turkey.

[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]

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴屋 伸一郎 (TSURUYA SHINITIROU)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号: 90562108

(2) 研究分担者

中園 一郎 (NAKASONO ICHIROU)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30108287

池松 和哉 (IKEMATSU KAZUYA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 80332857

坪井 貴司 (TUBOI TAKASHI)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号: 8041532