

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24年 5月21日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659142

研究課題名（和文） ストレス特異的スプライシングバリエントを指標とした新たな
ストレス評価技術研究課題名（英文） A new method for stress assessment using stress-specific
alternative splice variants

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

研究成果の概要（和文）：

医学科4年次の全国共通進級試験受験を急性ストレスモデルとして、エクソンアレイとリアルタイムRT-PCRを用いて、27遺伝子のストレス特異的選択的スプライシング反応の中からp53を介するストレス反応に重要なSMG-1遺伝子のエクソン63をスキップしたバリエントを同定した (Neurosci Lett, 2010)。医師国家試験受験者の慢性心理的ストレスモデルとして、グルココルチコイド受容体の選択的スプライシング反応の解析を行い、受容体機能のないGR-betaの発現が特異的に低下する事を誌上発表した (Stress, 2011)。

研究成果の概要（英文）：

Alternative splicing events in healthy medical students challenging an examination for promotion were analyzed using exon array and real-time RT-PCR. We identified the stress-initiated skipping of exon 63 of *SMG-1* that encodes a phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase crucial for activations of p53-dependent pathways (Neurosci Lett 2010). Using National Medical License Examination as a chronic psychological stress model, we also examined alternative splicing of the glucocorticoid receptor (GR) gene in medical students, and found that the persistent stressful situations specifically decreased a non-functional isoform (GR-beta) in medical students (Stress 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：ストレス、ストレス関連疾患、バイオマーカー、選択的スプライシング、スプライシングバリエント

1. 研究開始当初の背景

ヒト遺伝子（～25,000）の70%以上は、選択的スプライシングにより複数の mRNA バリア

ントを産生する。選択的スプライシング機構は、限られた数の遺伝子から生物の多様性を生み出すと同時に、環境変化に対応して極め

て広範囲に遺伝子発現プログラムを変化させる。

選択的スプライシングは、exon の認識の有無、つまり、当該 exon を含む(inclusion)か、あるいはスキップする(skipping)かによって決定される。exon 及び intron にコードされているエンハンサー/サイレンサーエレメントのシス領域、並びに、その領域に結合するトランス因子である SR (serine/arginine) タンパク質 (SFRS) ファミリーや hnRNP などのスプライシングエンハンサー/サイレンサーにより調節される。SFRS 遺伝子の一つをノックダウンすると、数千の遺伝子発現が変化することからも認識される。

申請者は、医学科学生 of CBT 試験時の心理的ストレスによる選択的スプライシング反応について、エクソンチップを用いて網羅的に解析し、急性心理的ストレス特異的な 27 遺伝子のスプライシングバリエントを見いだした。培養細胞を用いた *in vitro* の実験で、酸化ストレス下では SFRS 自身の premature termination codon (PTC) をコードする PTC バリエントが特異的に産生されることも報告した (Am J Physiol Cell Physiol 2009)。

これらの研究成果をもとに、本研究では、末梢血で検出できる心理的ストレス特異的な選択的スプライシング反応の同定とそれを用いたストレス評価技術の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、心理的ストレス、うつ病、及び慢性疲労症候群に焦点を当て、血液細胞（白血球）における選択的スプライシング反応を介したストレス応答を捉えるとともに、ストレス関連疾患特異的なスプライシングバリエントとその機能を明らかにする。具体的には、1) ストレスによる SR タンパク質遺伝子の選択的スプライシングとその標的遺伝子の同定、2) 選択的スプライシング異常による病的ストレス応答と精神疾患との関連を明らかにする。“ストレス反応の質”を評価できる新たなストレス RNA マーカーを確立し、それを指標としたうつ病及び慢性疲労症候群の簡便かつ革新的な診断技術の確立をめざした。

3. 研究の方法

1) 健常ボランティアにおける心理的ストレス評価と選択的スプライシング反応

書面により同意を得た医学科学生 100 名を対象に医学科学生ボランティア全員に対して、質問紙（親の養育態度調査 PBI、摂食態度調査 EAT-26、抑うつ尺度 HADS、性格判定テスト NEO FFI、GHQ-28、自己記入式抑うつ評価尺度 SDS、STAI、生活習慣調査、生活リ

ズム調査、睡眠習慣調査）による 10 種類 23 項目の調査を行う。

各環境リスク要因の主成分分析を行い、ハイリスクグループと正常グループを分別して、有意に選択的スプライシングを受ける遺伝子を選び出し、別途、バリエントの過剰発現細胞とノックダウン細胞を作成して機能解析を行う。環境要因による選択的スプライシングを介した生体応答の変化を調べ、疾患発症との関連性を検討する。これらの情報は、環境生物学と医学を結びつけるインパクトの高い研究成果となると確信している。

2) エクソンアレイを用いた末梢血の遺伝子発現と選択的スプライシング解析

医学科 4 年生の CBT 試験時の急性心理的ストレス特異的な 27 種類の選択的スプライシングバリエントの検出は終了した。平成 22 年度は、6 年生の国家試験受験者に見られる慢性ストレス (Mol Psychol 2008) のモデルを用いて、慢性心理的ストレス特異的な SFRS 遺伝子と選択的スプライシングバリエントを検出する。

選択的スプライシング反応のパスウェイ解析は Ingenuity Pathway Analysis Application (IPA) を用いて、選択的スプライシングは GeneSpring ver. 10.0 のソフトウェアでそれぞれ解析する。費用の関係から、全ての被験者の解析は困難なため、質問紙と唾液マーカーを参考に、過度のストレス反応を示す被験者を 10 名選び、exon array 解析を行う。残りの被験者については、選別した遺伝子についてリアルタイム RT-PCT での解析を行う。質問票による心理・行動データのデータ、唾液マーカー値、遺伝子発現と選択的スプライシングデータのデータベースを構築し、それぞれの項目間での関連解析は SSPI を用いて行う。

3) リアルタイム RT-PCR による標的遺伝子の選択的スプライシングの確認

SFRS の PTC バリエントに加え、選択的スプライシングデータと発現データをもとに、あらたにストレスのマーカーとなるスプライシングバリエント遺伝子を選別する。すべての被験者についてリアルタイム RT-PCT を行い。最終的には、カード式の PCR アレイをデザインする。

4. 研究成果

1) 医学科 4 年次の全国共通進級試験 (CBT 試験) 受験者を対象に、試験 7 週間前、試験前日、1 日の試験終了直後、及び、試験終了 1 週間後のタイムポイントで採血し、質問紙 (STAI, SDS) による不安とうつ状態の評価、唾液のコルチゾルの測定、サイトカインの測定、及び、エクソンアレイを用いたスプライ

シング反応の網羅的解析を行い、27 遺伝子のストレス特異的選択的スプライシング反応を検出した結果、スプライシングの多くは inclusion ではなく skipping であり (27 遺伝子中 21)、3' UTR の skipping が特徴的であった (8 遺伝子)。さらに、急性心理的ストレスにより p53 の活性化に重要な役割をはたす *SMG1* のスプライスバリエントが生成されることを明らかにした。

2) 同じ CBT 試験モデルを用いて、急性心理的ストレス特異的な血液中のマイクロ RNA として mir144* mir144, mir16 を初めて同定した (Neurosci Lett 2012)。急性心理的ストレス特異的な血液中のマイクロ RNA の増加と 3' UTR の skipping 反応の相反する mRNA の代謝調節機構が心理的ストレス応答を調節している可能性を示すことが出来た。

3) 慢性心理的ストレスモデルである医師国家試験受験者を対象に、グルココルチコイド受容体 (GR) 遺伝子のスプライシング反応を解析し、慢性ストレス時にはデコイ受容体とされている *GR-beta* アイソフォームが低下することを報告した (Stress 2011)

4) 選択的スプライシング調節因子である SR タンパク質のうち、SRSF3 と Tra2beta に焦点を絞り、in vitro でのストレス反応の研究をすすめた。その結果、SRSF3 を介した G1/S チェックポイントとアポトーシス調節機能を明らかにした (論文投稿中)。また、SRSF3 自身の選択的スプライシングバリエントによるストレス応答を発見し (J Med Invest 2012)、さらに、ストレスにより特異的に誘導される Tra2beta のスプライシングバリエントの新たな機能も発見した (論文作成中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Kamezaki Y, Katsuura S, Kuwano Y, Tanahashi T, Rokutan K. Circulating cytokine signatures in healthy medical students exposed to academic examination stress. *Psychophysiology* 2012 (in press), DOI:10.1111/j.1469-8986.2012.01371.x, 査読有
- 2) Katsuura S, Kuwano Y, Yamagishi N, Kurokawa K, Kajita K, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Rokutan K. MicroRNAs miR-144/144* and miR-16 in peripheral blood are potential biomarkers for naturalistic stress in healthy Japanese medical students. *Neurosci Lett*. 516(1): 79-84, 2012, DOI: 10.1016/j.neulet.2012.03.062, 査読有
- 3) Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T,

Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Murakami Y, Fukushima M, Rokutan K. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol*. 2012 (in press), DOI: 10.1007/s00535-012-0547-6, 査読有

4) Kuwano Y, Kamio Y, Kawai T, Katsuura S, Inada N, Takaki A, Rokutan K. Autism-associated gene expression in peripheral leucocytes commonly observed between subjects with autism and healthy women having autistic children. *PLoS One*. 6(9):e24723. 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0024723.t001, 査読有

5) Akaike Y, Kurokawa K, Kajita K, Kuwano Y, Masuda K, Nishida K, Kang SW, Tanahashi T, Rokutan K. Skipping of an alternative intron in the *srsf1* 3' untranslated region increases transcript stability. *J. Med. Invest*. 58(3-4):, 180-187, 2011, DOI: 10.2152/jmi.58.180, 査読有

6) Kurokawa K, Tanahashi T, Murata A, Akaike Y, Katsuura S, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Kawai T, Rokutan K. Effects of chronic academic stress on mental state and expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in healthy Japanese medical students. *Stress*, 14(4):431-438, 2011, DOI: 10.3109/10253890.2011.555930, 査読有

7) Katsuura S, Kamezaki Y, Yamagishi N, Kuwano Y, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Kawai T, Arisawa K, Rokutan K. Circulating vascular endothelial growth factor is independently and negatively associated with trait anxiety and depressive mood in healthy Japanese university students. *Int J Psychophysiol*. 81(1):38-43, 2011, DOI: 10.1016/j.ijpsycho.2011.04.004, 査読有

8) Yamamoto Y, Tanahashi T, Katsuura S, Kurokawa K, Nishida K, Kuwano Y, Kawai T, Teshima-Kondo S, Chikahisa S, Tsuruo Y, Sei H, Rokutan K. Interleukin-18 deficiency reduces neuropeptide gene expressions in the mouse amygdala related with behavioral change. *J Neuroimmunol*. 15:229(1-2):129-39. 2010, DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.07.024, 査読有

9) Kurokawa K, Kuwano Y, Tominaga K, Kawai T, Katsuura S, Yamagishi N, Satake Y, Kajita K, Tanahashi T, Rokutan K. Brief naturalistic stress induces an alternative splice variant of SMG-1 lacking exon 63 in peripheral leukocytes. *Neurosci Lett*. :484(2):128-32. 2010, DOI: 10.1016/j.neulet.2010.08.031, 査読有

10) Katsuura S, Kamezaki Y, Tominaga K, Masuda K, Nishida K, Yamamoto Y, Takeo K, Yamagishi N, Tanahashi T, Kawai T, Rokutan K. High-throughput screening of brief naturalistic stress-responsive cytokines in university students taking examinations. *Int J Psychophysiol.* 77(2):135-40, 2010, DOI: 10.1016/j.ijpsycho.2010.05.004, 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 桑野由紀、神尾陽子、河合智子、勝浦桜子、稲田尚子、高木晶子、六反一仁
Autism-associated gene expression signatures in peripheral blood leukocytes, Joint Academic Conference on ASD 2011, 2011年12月2日、日本財団ビル(東京都)
- 2) 本田真奈美、桑野由紀、山岸直子、黒川憲、佐竹譲、梶田敬介、赤池瑠子、西田憲生、増田清士、棚橋俊仁、六反一仁. 精神的ストレスに反応するヒト末梢血マイクロRNAの発現, 第27回日本ストレス学会学術総会, 東京国際交流館(東京都), 2011年11月20日
- 3) 赤池瑠子、増田清士、山岸直子、黒川憲、佐竹譲、梶田敬介、本田真奈美、西田憲生、桑野由紀、六反一仁. 酸化ストレス下での、HuRによるtransformer 2-beta (Tra2-beta)の選択的スプライシング制御機構, 第6回臨床ストレス応答学会大会、名古屋大学(名古屋市)、2011年11月4-5日
- 4) 六反一仁、桑野由紀、神尾陽子. 自閉症スペクトラム成人と自閉症児の母親に共通する末梢白血球の遺伝子発現の特徴、第107回日本精神神経学会学術総会シンポジウム: 精神医学における発達障害再考: 自動機から成人期へのさまざまな発達軌跡、ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都)、2011年10月27日
- 5) Honda M, Katsuura S, Kuwano Y, Yamagishi N, Kurokawa K, Satake Y, Kajita K, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Rokutan K. High-throughput screening of immunomodulators identifies VEGF as a potential biomarker for trait anxiety and depressive mood in healthy Japanese university students. The International Conference on Social Stratification and Health 2011, 東京大学(東京都), 2011年8月6日
- 6) 六反一仁, 遺伝子発現解析からみた慢性疲労症候群の病態 第7回日本疲労学会総会・学術集会 特別講演、2011年5月21日、名古屋大学(名古屋市)
- 7) 六反一仁. ストレスマーカーの現状、第26回日本ストレス学会学術総会 教育講演、2010年11月6日、九州大学(福岡市)
- 8) 六反一仁. 心と遺伝子を探るストレスゲ

ノミクス研究 2010 日本歯周病学会秋期学術大会(第53回)特別講演、2010年9月19日、かがわ国際会議場(高松市)

- 9) Yuki Kuwano, Ken Kurokawa, Sakurako Katsuura, Naoko Yamagishi, Yuzuru Satake, Keisuke Kajita, Toshihito Tanahashi, Kazuhito Rokutan. Alternative splice variants of SMG-1 as a potential marker for brief naturalistic stressors in peripheral leukocytes. The 7th World Congress on Stress, 2010年8月25-27日、Leiden University (Leiden), Netherlands
- 10) Sakurako Katsuura, Yoshiko Kamezaki, Yuki Kuwano, Naoko Yamagishi, Ken Kurokawa, Yuzuru Satake, Toshihito Tanahashi, Kazuhito Rokutan. High-throughput screening of brief naturalistic stress-responsive cytokines in Japanese university students taking examinations. The 7th World Congress on Stress, 2010年8月25-27日、Leiden University (Leiden), Netherlands
- 11) Sakurako Katsuura, Yoshiko Kamezaki, Yuki Kuwano, Naoko Yamagishi, Ken Kurokawa, Keisuke Kajita, Toshihito Tanahashi, Kazuhito Rokutan. High-throughput screening of immunomodulators identifies VEGF as a potential biomarker for trait anxiety and depressive mood in healthy Japanese university students. The 7th World Congress on Stress, 2010年8月25-27日、Leiden University (Leiden), Netherlands

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