

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670340

研究課題名(和文) 被虐待児の脳におけるDNAメチル化とその神経発達への影響に関する検討

研究課題名(英文) Investigation of DNA methylation in neural cells of the child after abuse

研究代表者

小湊 慶彦 (Kominato, Yosihiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30205512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、虐待というストレスが加わった子どもの脳で、脳神経細胞におけるDNAメチル化の検索を行うことである。海馬のパラフィン包埋切片からレーザーマイクロダイセクションシステムを利用して、神経細胞層を特異的に切り出し、そこからDNAを抽出し、バイサルファイト処理後に、NR3C1遺伝子プロモーター1Fを標的にPCRを行い、クローニング後に塩基配列調べメチル化の検索を行った。虐待例1例と内因性急死例2例の脳について調べた。虐待例ではメチル化部位の増加や転写因子NGFI-Aの認識配列のメチル化等が認められた。従って、虐待では海馬の神経細胞のメチル化が亢進することが示唆された。

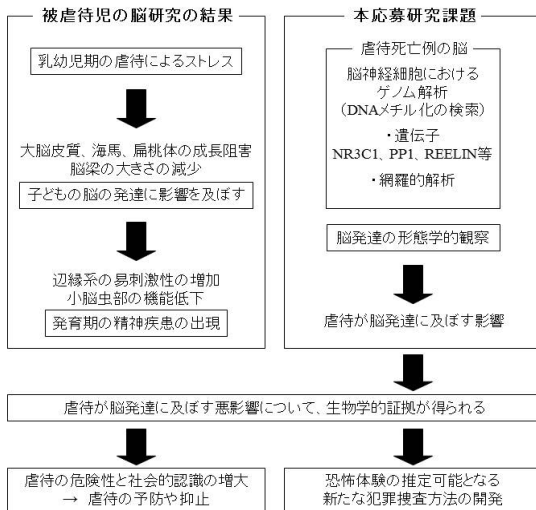
研究成果の概要(英文)：Child abuse is assumed to cause stress reaction resulting in secretion of corticotropin releasing hormone (CRH) from hypothalamus, adrenocorticotrophic hormone from pituitary and glucocorticoid from adrenal gland. The CRH elevation could be involved in psychological disturbance. DNA methylation was reported to be enhanced in the promoter of the gene encoding the glucocorticoid receptor (NR3C1) of the suicide cases who had experienced child abuse. DNA methylation of the promoter in NR3C1 was examined from neurons of the hippocampus of the child with abuse. Using DNA prepared from neurons in paraffin embodied tissues from hippocampus of the child with abuse and controls with endogenous diseases, bisulfite genomic sequencing was carried out, showing increased DNA methylation of the promoter in NR3C1 in the neurons of the hippocampus in the child with abuse. On the basis of the results, DNA methylation in the neurons of the hippocampus could be one of the candidates implying child abuse.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 虐待 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

子どもの虐待には、身体的な障害の他に、精神障害の発生や虐待の世代間連鎖等の問題がある。虐待によるストレスが子どもの脳発達に悪影響を及ぼし、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(下図)。また、動物実験では恐怖ストレスがどのような変化を脳にもたらすかについて、分子レベルでの解析が進んでいる(後述)。さらに、海外ではヒトにおける研究もある。



ストレス状況下において、視床下部 - 下垂体 - 副腎システムが恒常性維持のために重要である。この経路に関わるコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) の増加はこの経路に悪影響を及ぼし、精神的な問題を惹起する。その遺伝子発現はストレス下で一過性に増強され、その後に抑制を受けるが、その抑制に視床下部室傍核の神経細胞の Glucocorticoid receptor が関わっている。自殺者脳を用いた研究では、子供時代に虐待を受けたヒトではその Glucocorticoid receptor (NR3C1) 遺伝子プロモーターにメチル化の増加が観察されている (McGowan et al, Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with child abuse. *Nature Neuroscience* 12, 342-348, 2009)。以上より、虐待を受けたヒトでは Glucocorticoid による抑制が効かず、CRH が増加した状態が続

き、ストレスに対する抵抗性の低下や精神的な問題を生じやすくなるのではないかと推論されている。

ところで、法医解剖に供されるご遺体では死亡と解剖の間に時間経過があるため、組織の自己融解の問題がある。RNA は不安定で分解を受けるため、遺伝子の発現状況を RNA で調べることは困難である。一方、DNA やそのメチル化修飾体は比較的安定であるため、DNA メチル化というエピジェネティクスな生化学的指標は利用可能である。DNA メチル化は遺伝子発現の抑制につながるため、遺伝子の発現抑制状況をプロモーターのメチル化の程度から推測することが可能なため、虐待死亡事件例の解剖時に保存された脳から、大脳皮質、海馬、扁桃体、小脳等についてパラフィン包埋切片を作成し、そこから DNA を抽出し、DNA メチル化の検索を行うことは可能である。

動物実験では、恐怖体験により、海馬で記憶抑制に関わる脱リン酸化酵素遺伝子 (PPI) のプロモーターがメチル化を受け、記憶形成に関わる遺伝子である REELIN のプロモーターが脱メチル化を受けること、等が報告されている (Miller CA, Sweatt JD, Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53, 857-869, 2007)。

従って、虐待死亡例の脳について、Glucocorticoid receptor、PPI、REELIN、Estrogen receptor- α 等の遺伝子のプロモーターのメチル化の程度を調べることは有意義なことである。対照群は突然死した症例である。

2. 研究の目的

本課題研究の目的は、虐待というストレスが加わった子どもの脳で、脳神経細胞における DNA メチル化の検索を行うことである。加えて、脳の形態学的観察も行う。以上から、虐待がゲノム発現に及ぼす影響を推定し、虐待が脳発達に悪影響を及ぼすことを明らかし、虐待の社会的認識を深め、子どもの虐待防止について社会的な注意を喚起することを目的としている。

3 . 研究の方法

子どもの虐待死亡例 1 例及び子どもの内因性急死例 2 例について、解剖時に保存された脳から大脳皮質、海馬、扁桃体、小脳等についてパラフィン包埋標本を作製した。左右海馬からレーザーマイクロダイセクションシステム (ZEISS 社製 PALM) を利用して、神経細胞層を選択的に採取した。得られた細胞から QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。その DNA に EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN 社) を用いてパイサルファイト処理を施した。NR3C1 遺伝子プロモーター 1F を標的に PCR を行った。1 回目の PCR に用いたプライマーは 5'-GTGGTGGGGGATTTG-3', と 5'-ACCTAATCTCTCTAAAAC-3' であり、PCR 条件は、98 10 秒、53.8 30 秒、72 2 分の 40 サイクルであった。続いて、nested PCR を行ったが、用いたプライマーは 5'-TTTTTGAAGTTTTTTTAGAGGG-3', 5'-AATTTCTCCAATTTCTTTTCTC-3' であり、PCR 条件は、98 10 秒、56.1 30 秒、72 2 分の 40 サイクルであった。PCR 産物をクローニングベクター pUC118 に組み込み、大腸菌をトランスフォーメーション後、各クローンの塩基配列を BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用いて調べることでメチル化の検索を行った。

4 . 研究成果

結果は、虐待例 1 例の海馬の神経細胞において 24 アリルを調べたところ、左海馬では 12 アリル中の 5 アリル、右海馬では 12 アリル中の 7 アリルにメチル化が認められた。ほとんどのメチル化部位は転写因子 NGFI-A の認識配列に位置し、2 箇所以上のメチル化を有するアリルが 5 アリルあった。一方、内因性急死 2 例を調べた。一例では左海馬 8 アリル中の 2 アリル、右海馬 11 アリル中の 1 アリルにメチル化が認められた。調べた範囲では 2 箇所以上のメチル化を有するアリルは無かった。また、

メチル化部位は転写因子 NGFI-A の認識配列に位置していなかった。もう一例では、左海馬 16 アリル中全アリルにメチル化が認められたが、その全アリルで見つかったメチル化部位は一箇所であり、その他にメチル化をもつアリルは 3 アリルであった。調べた範囲で、全アリルで見つかったメチル化部位を除くと、2 箇所以上のメチル化を有するアリルは無かった。また、いずれのメチル化部位も転写因子 NGFI-A の認識配列に位置していなかった。以上から、非虐待例に比較して虐待例では海馬の DNA メチル化が増加しており、特に転写因子 NGFI-A の認識配列にメチル化が存在することが特異的であることが示唆されてきた。現在、内因性急死 7 例を同様な方法で調べている。以上のデータをまとめて論文を作成する予定である。

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 26 件)

1. Isa K, Yamamuro Y, Ogasawara K, Yabe R, Ogiyama Y, Ito S, Takahashi Y, Kominato Y, Sano R, Uchikawa M. Presence of nucleotide substitutions in the ABO promoter in individuals with phenotypes A₃ and B₃. *Vox Sanguinis*. 査読有 110.2016.285-287.

doi: 10.1111/vox.12363

2. Nakajima T, Sano R, Takahashi Y, Watanabe K, Kubo R, Kobayashi M, Takahashi K, Takeshita H, Kominato Y. ABO alleles are linked with haplotypes of an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 with a few exceptions attributable to genetic recombination. *Vox Sanguinis* 査読有 11. 2016. 90-92.

doi: 10.1111/vox.12312

3. Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Sano R, Kominato Y, Takeshita H.

Association of a single nucleotide polymorphism (rs6180) in GHR gene with plural tissue weight. *Journal of Genetics*. 査読有 95.2016.189-192.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s12041-016-0615-4>

4. Tokue H, Takahashi Y, Hirasawa S, Awata S, Kobayashi S, Shimada T, Tokue A, Sano R, Kominato Y, Tsushima Y. Intestinal obstruction in a mentally retarded patient due to pica. *Ann Gen Psychiatry*. 査読有 14.2015.22.
doi: 10.1186/s12991-015-0060-4
5. Murayama M, Takahashi Y, Sano R, Watanabe K, Takahashi K, Kubo R, Kuninaka H, Kominato Y. Characterization of five cases of suspected bathtub suicide. *Legal Medicine*. 査読有 13. 2015. 576-578.
doi:10.1016/j.legalmed.2015.07.005
6. Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Ueki M, Sano R, Kominato Y, Inoue K, Kimura-Kataoka K, Takeshita H. Global analysis of genetic variations in a 56-bp variable number of tandem repeat polymorphisms within the human deoxyribonuclease I gene. *Legal Medicine*. 査読有 17. 2015. 283–286.
doi:10.1016/j.legalmed.2015.01.005
7. Watanabe K, Takahashi Y, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Kobayashi S, Shimada T, Takei H, Awata S, Hirasawa S. Brain fragility can be estimated by its putative signs on postmortem computed tomography. *Legal Medicine*. 査読有 17.2015.98–101.
doi:10.1016/j.legalmed.2014.10.008
8. Sano R, Kuboya E, Nakajima T, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Takeshita H, Yamao H, Kishida T, Isa K, Ogasawara K, Uchikawa M. A 3.0-kb deletion including an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 of the ABO blood group gene in an individual with the B_m phenotype. *Vox Sanguinis*. 査読有 108. 2015.310–313.
doi: 10.1111/vox.12216
9. Sano R, Nogawa M, Nakajima T, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Yokohama A, Tsukada J, Yamao H, Kishida T, Ogasawara K, Uchikawa M. Blood group B gene is barely expressed in in vitro erythroid culture of B_m-derived CD34⁺ cells without an erythroid cell-specific regulatory element. *Vox Sanguinis*. 査読有 108.2015. 302–309.
doi: 10.1111/vox.12220
10. Sano R, Takahashi Y, Nakajima T, Yoshii M, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Takeshita H, Yasuda T, Tsuneyama H, Uchikawa M, Isa K, Ogasawara K: ABO chimerism with a minor allele detected by the PNA-mediated PCR clamping method. *Blood Transfusion*. 査読有 12. 2014. 431–434.
doi: 10.2450/2014.0162-13
11. Takahashi Y, Isa K, Sano R, Nakajima T, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Michino J, Masuno A, Tsuneyama H, Ito S, Ogasawara K, Uchikawa M: Presence of nucleotide substitutions in transcriptional regulatory elements such as the erythroid cell-specific enhancer-like element and the ABO promoter in individuals with phenotypes A₃ and B₃, respectively. *Vox Sanguinis*.

査読有 107.2014.171–180.

doi: 10.1111/vox.12136

12. [Takahashi Y](#), Isa K, [Sano R](#), Nakajima T, Kubo R, Takahashi K, [Kominato Y](#), Tsuneyama H, Ogasawara K, Uchikawa M: Deletion of the RUNX1 binding site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in two individuals with the A_m phenotype. *Vox Sanguinis*. 査読有 106.2014.167–175.
doi: 10.1111/vox.12077
13. [Takahashi Y](#), [Sano R](#), Nakajima T, [Kominato Y](#), Kubo R, Takahashi K, Ohshima N, Hirano T, Kobayashi S, Shimada T, Tokue H, Awata S, Hirasawa S, Ishige T: Combination of postmortem mass spectrometry imaging and genetic analysis reveals very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a case of infant death with liver steatosis. *Forensic Science International*. 査読有 244. 2014. e34–e37.
doi:10.1016/j.forsciint.2014.08.031
14. Yazawa S, Yokobori T, Ueta G, Ide M, Altan B, Thongprachum A, Nishimura T, Nakajima T, [Kominato Y](#), Asao T, Saniabadi AR, Furukawa K, Kuwano H, Le Pendu J, Ushijima H: Blood group substances as potential therapeutic agents for the prevention and treatment of infection with noroviruses proving novel binding patterns in human tissues. *PLoS ONE*. 査読有 9.2014.e89071.
doi: 10.1371/journal.pone.0089071
15. Ueki M, Kimura-Kataoka K, Takeshita H, Fujihara J, Iida R, [Sano R](#), Nakajima T, [Kominato Y](#), Kawai Y, Yasuda T. Evaluation of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding human deoxyribonuclease I and I-like 3 as a functional SNP potentially implicated in autoimmunity. *FEBS Journal*. 査読有 281.2014.376–390.
doi: 10.1111/febs.12608
16. Hata Y, Mori H, Tanaka A, Fujita Y, Shimomura T, Tabata T, Kinoshita K, Yamaguchi Y, Ichida F, [Kominato Y](#), Ikeda N, Nishida N. Identification and characterization of a novel genetic mutation with prolonged QT syndrome in an unexplained postoperative death. *International Journal of Legal Medicine*. 査読有 128.2014.105–115.
doi: 10.1007/s00414-013-0853-4
17. Murakami T, Tajika Y, Ueno H, Awata S, Hirasawa S, Sugimoto M, [Kominato Y](#), Tsushima Y, Endo K, Yorifuji H: Integrated education of gross anatomy and CT radiology for current advances in medicine. *Anatomical Science and Education*. 査読有 7.2014.438–449.
18. Nakajima T, [Sano R](#), [Takahashi Y](#), Kubo R, Takahashi K, [Kominato Y](#), Tsukada J, Takeshita H, Yasuda T, Uchikawa M, Isa K, Ogasawara K. Mutation of the GATA site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in a B_m subgroup individual. *Transfusion*. 査読有 53. 2013. 2917–2927.
doi: 10.1111/trf.12181
19. [Sano R](#), Hirasawa S, Awata S, Kobayashi S, Shimada T, Takei H, [Takahashi Y](#), [Kominato Y](#). Use of postmortem computed tomography to reveal acute subdural hematoma in a severely decomposed body with advanced skeletonization. *Legal Medicine*. 査読有 15. 2013. 32-34.
doi:10.1016/j.legalmed.2012.05.005

20. Takahashi Y, Sano R, Kominato Y, Takei H, Kobayashi S, Shimada T, Awata S, Hirasawa S. Usefulness of postmortem computed tomography for demonstrating cerebral hemorrhage in a brain too fragile for macroscopic examination. *Journal of Forensic Radiology and Imaging*. 査読有 1. 2013. 212-214.

doi:10.1016/j.jofri.2013.06.003

21. Ogasawara K, ISA K, Tsuneyama H, Saito M, Okazaki H, Satake M, Tadokoro K, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Maruhashi T, Yokohama A, Uchikawa M. MOLECULAR BASIS FOR JAPANESE INDIVIDUALS WITH Bm AND Am. *Vox Sanguinis*. 査読有 105(s1). 2013. 44.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.2013.105.issue-s1/issuetoc>

他 5 件

[学会発表](計 34 件)

1. Takahashi Y, Sano R, Nakajima T, Takeshita H, Yasuda T, Kominato Y. Mutations were found in the transcription-regulatory elements such as the promoter and the erythroid cell-specific enhancer of ABO in individuals with phenotypes A_m, A₃ and B₃. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 2014.6.17 Fukuoka.
2. Sano R, Takahashi Y, Nakajima T, Yoshii M, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Takeshita H, Yasuda T. ABO chimerism with a minor allele detected by the PNA - mediated PCR clamping method. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 2014.6.17

Fukuoka.

他 32 件

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小湊 慶彦 (KOMINATO YOSHIHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30205512

(2) 研究分担者

佐野 利恵 (SANO RIE)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 70455955
高橋 遥一郎 (YOICHIRO TAKAHASHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50640538

(3) 連携研究者

無

研究者番号: