

「第18回日本臨床環境医学会学術集会シンポジウム」 (臨床環境18: 91~97, 2009)

こころを映し出す DNA チップを用いたストレスゲノミクス研究

六 反 一 仁

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ストレス制御医学分野

Stress DNA chip in stress genomics research

Kazuhito Rokutan

Department of Stress Science, Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima Graduate School

要約

ストレスは、心の疾患のみならず身体疾患の発症に重要な役割を果たす。ライフイベントストレスに対する反応は、個人により様々である。ストレスに対する脆弱性は、人の疾患を理解する上で極めて重要であり、生まれ（遺伝的素因）と環境（育ち）の相互作用と相関関係のコンセプトをもとに研究が進んでいる。遺伝子と環境の相互作用は、環境に対する遺伝的な感受性を、また、遺伝子と環境の相互作用は、ある環境への曝露の機会を決める遺伝的な要因を指している。マイクロアレイ（DNA チップ）による網羅的な遺伝子発現解析は、複雑系のストレス応答の解析に威力を発揮する。我々は、末梢血に発現する1467のストレス関連遺伝子の cDNA プローブを搭載したストレス評価用 DNA チップを日立製作所と共同で開発した。この DNA チップを用いて、健常人の急性（70遺伝子）と慢性（24遺伝子）ストレスに応答する遺伝子を同定した。さらに、ストレス関連疾患の発症に関連する可能性のある病的ストレス応答の検出にも成功した。

《キーワード》 ストレス、環境と遺伝子の相互作用、ストレス関連疾患、ストレス評価

Abstract

Stress plays a central role in mental problems and possibly contributes to physical problems as well. Stressful life events trigger physiological, behavioral, and metabolic responses that are basically aimed at reinstating homeostasis. The response of individuals to stressful life events varies considerably and depends on a wide range of environmental experiences, together with cognitive and genetic factors. Nurture elements interacting with nature factors profoundly affect maturing one's mental health as epigenetic factors. Genotype-environment interaction refers to genetic sensitivity to environmental stressors and genotype-environment correlation refers to genetic influence on exposure to

別刷請求宛先：六反一仁

〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ストレス制御医学分野

Reprint Requests to Kazuhito Rokutan, Department of Stress Science, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

environments. At present there is no integrated technology that can objectively assess the complexity and diversity of stress response. Establishment of a new biometal tool for simply, objectively assessing stress response is an urgent need of society as a whole. High-throughput analysis of gene expression by microarray has a potential advantage to study the complex stress response. We developed an original cDNA microarray specifically designed to measure the 1467 mRNA levels of stress-related genes in peripheral blood leukocytes. Using the cDNA microarray and a whole blood RNA collection system, we identified 70 genes and 24 genes useful for objective assessment of acute and chronic psychological stress responses, respectively. In addition, we could detect abnormal gene expression profiles that may be associated with stress-related disorders.

《Key words》 stress, gene-environment interaction, stress-related disorders, stress assessment

I. はじめに

日本では、「ストレス研究」は必ずしも科学として正当な評価を受けていないが、欧米では重要視され、研究も驚くほどのスピードで進んでいる。ストレスとストレスに対する脆弱性は、人の疾患を理解する上で極めて重要であり、生まれ（遺伝的素因）と環境（育ち）の相互作用（interaction）と相関関係（correlation）のコンセプトをもとに研究が進んでいる。遺伝子と環境の相互作用は、環境に対する遺伝的な感受性を、また、遺伝子と環境の相互作用は、ある環境への曝露の機会を決める遺伝的な要因を指している。遺伝子と環境の相互作用を明らかにする研究は、双子研究や養子研究といった遺伝子の作用が鋭敏に検出できるモデルを用いて、ある環境計測を行う研究手法に依存してきた。これらの研究に特異的な遺伝子型を調べる研究を組み合わせると、より大きな可能性を引き出される。これからのストレス研究には遺伝子解析が必須になる。まず初めに、ストレス反応を概略し、ストレスの客観的な評価を目指した我々の取り組みを紹介する。

II. ストレス反応のネットワーク

ヒトは様々なストレスに曝されると、心理・行動の変化にとどまらず、心血管、代謝、免疫、など多くの経路が様々な適応反応をおこす。これらのストレス応答の中心は、視床下部（Hypothalamus）－下垂体（Pituitary）－副腎（Adrenal）（HPA）軸であり、視床下部から corticotropin releasing hormone（CRH）、下垂体前葉から

adrenocorticotrophic hormone（ACTH）を分泌し、最終的に副腎皮質から全身の各器官へ glucocorticoid（GC）を分泌する（endocrine system）（図1）。視床下部を経由したストレス情報は、脳幹、延髄、脊髄に送られて自律神経系へと出力され、交感神経節後終末と副腎髄質でカテコールアミン（アドレナリン、ノルアドレナリン）が分泌される。カテコールアミンはサイトカイン産生と分泌を促進する（neuroimmune system）。逆に、GCは、炎症反応や免疫応答を抑制する。視床下部と下垂体に発現している gp130レセプターサイトカインファミリーに属する leukemia inhibitory factor（LIF）、interleukin-6（IL-6）、IL-11、ciliary neurotrophic factor（CNTF）、oncostatin M（OSM）、cardiotrophin-1（CT-1）は、ACTHの産生と神経内分泌の相互作用に重要な役割を果たしている。これらのサイトカイン受容体は gp130レセプターサブユニットを共有するクラス1型サイトカイン受容体である。下垂体前葉細胞の pro-opiomelanocortin（POMC）遺伝子の転写に関して、CRHと gp130レセプターサイトカインファミリーそれぞれ単独による転写活性化、相乗的な刺激作用、並びに細胞内抑制タンパク質 suppressor of cytokine signaling-3（SOCS-3）による POMC 遺伝子の転写の不活性化機構が明らかにされている¹⁾。

ストレスがどのようにして疾患を発症させるかについては、これらの神経・免疫・内分泌が複雑に相互作用するネットワークを調べる必要があり、容易な作業ではない。最近、特に注目されている

変化することが想定される。

IV. ストレス関連疾患の発症メカニズム

それでは、異常なストレス反応を引き起こす遺伝的素因は何なのか？ 環境に対する遺伝的な感受性については、量的特性遺伝子座 (QTL) の関連解析から、遺伝子と環境の相互作用を示すいくつかの証拠が見つかってきている。例えば、幼少時に虐待を受けると、大人になってから反社会的問題を引き起こす遺伝的素因について、MAOA (monoamine oxidase A) 遺伝子のプロモーター領域の機能性多型が関わるという報告がある⁴⁾。同じように、5-HTT (5-hydroxytryptophan [serotonin] transporter) 遺伝子のプロモーター領域の機能的多型は、ライフイベントストレスによるうつ病発症を左右する。これらの多型は、通常の状態ではそれぞれの遺伝子の機能には明らかな変化をきたさないが、ひとたびある環境下に置かれると機能不全を起こしてくる。これら二つの遺伝子多型は、遺伝子と環境の相互作用の例として脚光を浴びている。ストレス反応にかかわる遺伝子の数から考えると、さら

に多くの遺伝子型が見つかるだろう。

ストレス関連疾患の発症メカニズムを図2に示した。遺伝的素因 (例えば、セロトニントランスポーター遺伝子のプロモーターが短く機能的に活性が低い遺伝子型) があり、養育環境が疾患発症に大きく左右する。最近、母親のストレスにより胎児が高GCに曝されると、胎児のHPA軸のprogrammingと呼ばれる調節異常が生まれてから長期間残ることが報告されており、これらの影響は、遺伝的素因と区別がつきにくい要因になると考えられている⁶⁾。また、低出生体重 (未熟児) の影響も考えられている⁶⁾。いずれにしても、機能候補遺伝子のはっきりせず、解剖学的にも機能的にもはっきりとした異常が見つからない、例えば、過敏性大腸炎や喘息などのストレス関連疾患の要因として注目されている。なぜ、胎児期や幼児期の影響が10年以上も経ってから現れてくるのか、その原因として、ひとつはエピジェネティックによる遺伝子発現調節機構の存在が考えられている。

内分泌も免疫も脳の支配下にある。脳が健全に発達し、性格と社会脳がある範囲内で形成される

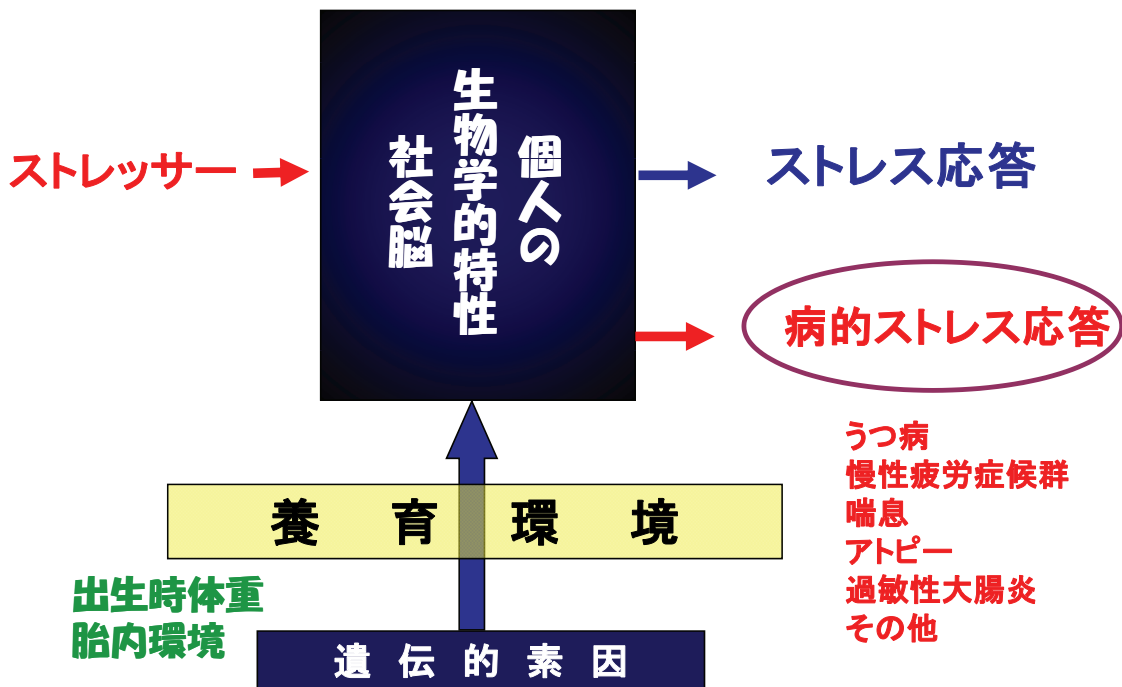


図2 ストレスに起因する疾患の発症

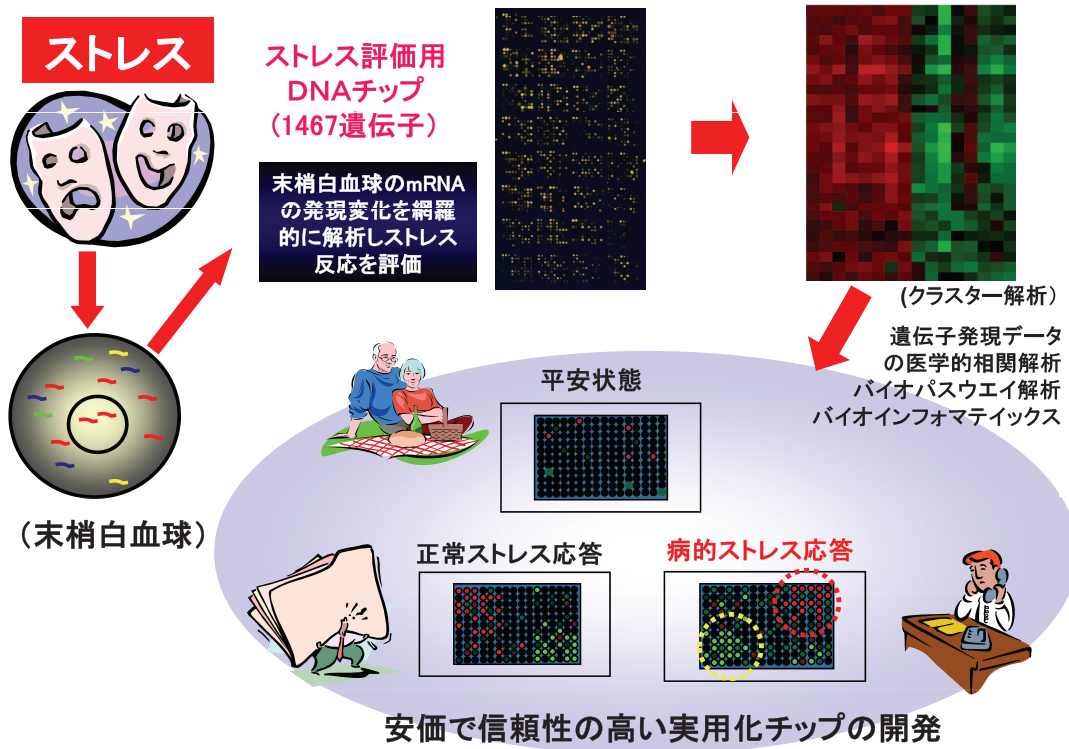


図3 こころを映し出す DNA チップの開発

と、ライフイベントに対しても正常なストレス応答を示すだろう。遺伝子と環境の相互作用により発達障害が起きると、同じライフイベントに対しても、疾患発症に結びつく病的なストレス応答がおこり、個人の遺伝的表現系の違いにより、ある人はうつ病に、ある人はアトピー性疾患を発症するのではないかと考えられる。この病的な反応を何とか捉えたいと考えた。

V. こころを映し出す DNA チップ

我々は、末梢血の遺伝子発現解析により、この病的な反応を捉えるための診断技術の開発を行ってきた。ストレスにより発現が変動する遺伝子を数千選出、実際にヒトの血液で検出される1467遺伝子の mRNA を特異的に認識する cDNA プロブを搭載したストレス評価用 DNA チップ(図3)を日立製作所と共同で開発した。「こころを映し出す DNA チップの開発」と命名したこの DNA チップを用いて、健常人の心理的・身体的ストレス^{7~9)}、うつ病及び慢性疲労症候群¹⁰⁾の解

析を行ってきた。

我々の研究戦略は、1) 健常人でみられるストレス反応の評価、2) ストレス関連疾患における病的ストレス反応の検出、3) 疾患発症を予知できる個人の遺伝子発現の特性の同定、及び、4) 環境応答性遺伝子の特定と遺伝子発現の個人差(パーソナリティ)の形成を明らかにすることを目指した。

うつ病はストレスが起因となって発症するが、未治療患者32名で共通して発現変化する19遺伝子を、大学院生の学位発表会と医師国家試験受験者でそれぞれ見いだした急性(70遺伝子)⁷⁾及び慢性心理的ストレスマーカー遺伝子(24遺伝子)⁸⁾と比較すると、うつ病患者は健常人のストレス反応では見られない特徴的な遺伝子発現変化を示すことを見いだした(図4)。その後、大学生の心の疾患の発症を調べるため、コホート研究を開始し、「末梢血の遺伝子発現は、環境と遺伝子の相互作用の研究、脳科学研究の有効なツールとなるか？」をテーマに、環境と遺伝子並びにパーソナ

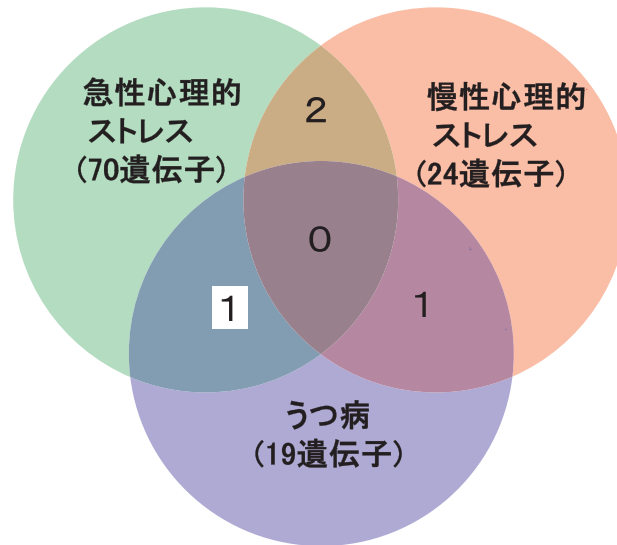


図4 うつ病患者で共通して発現が変化している遺伝子と健常人の心理的ストレス応答遺伝子

未治療のうつ病患者32名に共通して発現変化している19遺伝子と健常人の急性⁷⁾及び慢性心理的ストレス⁸⁾応答遺伝子のオーバーラップをベン図に示した。慢性心理的ストレスとうつ病には共通して1つの遺伝子が含まれるが、急性心理的ストレスとうつ病の双方のマーカー遺伝子に含まれる1つの遺伝子は、急性心理的ストレスでは発現が亢進し、うつ病では低下していた。

リテイー研究へと展開している。

これまでの研究成果をまとめると、末梢血遺伝子発現プロファイリングは、

1. ストレス応答の質を解析できる。
2. 白血球細胞の遺伝子発現は極めて安定、しかし大きな個人差がある。
3. 環境応答遺伝子が Static な個人差（パーソナリティ）の形成に関わる可能性がある。
4. Static な遺伝子発現と脳活動やストレス応答とリンクしている可能性がある。
5. うつ病患者に特有のうつ病パターンがあり、健常人の約10%にも認められる。などを明らかにしている。

VI. 遺伝子発現の個人差と環境応答遺伝子

遺伝子発現の個人差に注目し、97名の健常大学生の遺伝子発現解析から、個人間で発現に差が大きい396遺伝子を抽出した。この396遺伝子を用いると健常人を5つの発現パターンに分けることが出来る。それぞれのグループのシグナルパスウェイ解析を行うと、不安とうつ状態を訴えるグルー

プは、細胞死のパスウェイネットワーク遺伝子の発現亢進、NF- κ B ネットワーク遺伝子の発現低下、細胞増殖ネットワーク遺伝子の発現低下の特徴を備えている。これらの個人差を誘導する遺伝子は、質問紙により調べた睡眠習慣、睡眠状態、生活習慣、食行動、養育環境のスコアと相関する遺伝子が含まれており、環境応答遺伝子群と考えられる。なかでも、養育環境は興味深い。医学科学生は、社会経済学的には恵まれた比較的均一な集団である。しかし、医学科学生232名の心理・行動・生活習慣・養育環境を PBI 調べた結果、両親の養育態度に関する認識には大きな違いが認められた。232名の医学科新入生が15才までの両親の養育態度をどのように評価しているかを Parental Bonding Instrument (PBI) で調査した。父親の愛情と干渉及び母親の愛情と干渉の4つの成分について、主成分分析を行い、両親の愛情が不足しており過度の干渉を受けたと答えた群22名 low care (LOW) と両親からの豊かな愛情と自由を与えられたと感じている33名 optimal (OPT) を抽出した。LOW グループは、OPT グ

ループに比べて、cortisol awaking response が有意に低下し、末梢血のグルココルチコイド受容体 β mRNA の発現上昇と β 2アドレナリン受容体の mRNA 発現低下を認めた。これらの結果より、健常人においても養育環境が若い成人のコルチゾル反応を修飾する可能性が示唆された。本研究手法は、遺伝子と環境の相互作用、疾患の予知医学、あるいはパーソナリティー研究への応用が期待できる。

VII. おわりに

末梢血の遺伝子発現を調べて行くと、個人差の大きさには驚かされる。遺伝的な素因に加えて、養育環境などの環境要因が個人差を生み出しているのであろうか？ 我々の研究手法は、環境因子のモニターにも使用できる。本手法を用いて、低濃度の環境カドニウム曝露のモニターに有用なマーカー遺伝子も同定した¹¹⁾。紙面の関係から省略したが、環境医学への応用が期待できる。これからのストレス研究では、non-coding functional RNA に加えて、選択的スプライシングなどの post-transcriptional regulation が環境変化に対応する重要な調節機構として重要視されるだろう。遺伝子と環境の研究は今後益々重要なテーマとなると思う。本来、ヒトの遺伝子は行動を制約するものでなくその可能性を開くべきものである。そうだとすると、遺伝子と環境の命題を解き明かす事は可能なのであろうか？

謝辞

本項で紹介した我々の研究成果は、当教室の森田恭子先生、河合智子先生が中心となり行ったものである。また、本研究は、科学技術振興調整費「こころを映し出す DNA チップの開発」事業、日本科学技術振興機構「脳科学と教育」事業、及び、日本科学技術振興機構育成研究事業の研究助成で行った。この場を借りて深謝致します。

文献

- 1) Auernhammer CJ, Melmed S: The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* 108: 1735-1740, 2001
- 2) Selye H: A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138:32, 1936
- 3) McEwen BS: Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338: 171-179, 1998
- 4) Caspi A, McClay J, et al: Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science* 297: 851-854, 2002
- 5) Caspi A, Sugden K, et al: Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301: 386-389, 2003
- 6) Lupien SL, McEwen BS: Effect of stress throughout the lifespan on the brain, behavior and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10: 434-445, 2009
- 7) Morita K, Saito T, et al: Expression analysis of psychological stress-associated genes in peripheral blood leukocytes. *Neurosci Lett* 381: 57-62, 2005
- 8) Kawai T, Morita K, et al: Gene expression signature in peripheral blood cells from medical students exposed to chronic psychological stress. *Biol Psychol* 76: 147-155, 2007.
- 9) Kawai T, Morita K: Physical exercise-associated gene expression signatures in peripheral blood. *Clin J Sport Med.* 17: 375-383, 2007
- 10) Saiki T, Kawai T, et al: Identification of marker genes for differential diagnosis of chronic fatigue syndrome. *Mol Med* 14: 599-607, 2008
- 11) Dakeshita S, Kawai T, et al: Gene expression signatures in peripheral blood from Japanese women exposed to chronic low level of cadmium. *Toxicology* 2009; 257: 25-32.