課題番号	23 若 12

若手研究者助成金　実績報告書

令和　6 年　4 月　3 日

氏　　名：　岡野　雅春
所属・資格：　歯学部・助教
実施研究所：　歯学部・総合歯学研究所

1　研究課題

和文表記（40 字以内）
新たな指標の開発に向けた児童虐待ストレスと LINE-1 との相関解析と後遺症への応用

英文表記
Correlation analysis of maternal separation and genomic LINE-1

2　研究期間

令和 5 年度

※令和　年度　～　令和　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究目的

解決すべき社会問題のひとつに児童虐待が挙げられる。しかし，現在の虐待被害の評価には，陳旧性の傷痕や被虐待者等からの申告など客観性に欠ける要素が多い。被虐待児の見逃しを減少させ，潜在する虐待被害を把握するためにも客観的な指標が必要である。

我々は，ゲノム DNA の約 20%もの極めて大きな領域を占めるレトロトランスポゾンの LINE-1 に着目した。LINE-1 は，恒常状態において mRNA への転写と，それに引き続くゲノム内への新規挿入が抑制されている。しかし，何らかの要因によって LINE-1 が転写およびゲノム内への新規挿入する機会が増加した結果として，他の遺伝子の失活につながるようなゲノムの構造変化を引き起こす可能性が示唆されている。近年では，母マウスが仔マウスに施す世話時間が短い場合に，仔マウスの海馬由来ゲノム DNA において，LINE-1 のコピー数が増幅するとの報告がなされた。マウスにおける LINE-1 のコピー数増幅は，母マウスが仔マウスに与える環境がその要因となる可能性が考えられるが，関連性は不明である。本申請研究では，ネグレクトのモデルであるマウスを用いた母子分離実験において，LINE-1 のゲノム DNA 内のコピー数および DNA メチル化状態を解析する。母子分離の条件によりストレスに強弱をつけたマウスを比較することで，LINE-1 の変化との関連性を見出し，虐待被害の分子生物学的な指標への応用を検討する。

課題番号	23 若 12

4　研究概要

ネグレクトの実験モデルである母子分離マウスにおいて，脳神経機能に関連する複数の遺伝子のメチル化率が変化することが報告されている。しかし，依然として，ストレスの負荷量と相関関係にあるゲノム DNA に生ずる変化は不明である。その一方で，マウスは生理的に個体ごとに，仔マウスに対して世話を行う時間が異なることが知られている。そして近年，母マウスから享受した世話時間が短い仔マウスは，海馬由来ゲノム DNA にて，LINE-1 のコピー数が増幅するという関連性が示された。

本研究の目的は，マウスの母子分離によるストレス曝露によって LINE-1 のコピー数が増幅するかを明らかにし，ストレス負荷量と LINE-1 コピー数との関連性を検討することである。そのために，2 種類の異なる条件によって母子分離処置を行い，ストレス負荷の強弱を勾配させた母子分離マウスを作製する。この際，新生仔マウスを実験で取り扱うことにより，母マウスがストレスを感じた場合に，飼育放棄や仔マウスの食殺に繋がることが知られているため，まずは母子分離処置の条件検討を以下のように厳密に行った。

実験モデルの確立（マウスの母子分離方法）

本研究では，C57BL/6JJcl の妊娠マウス（日本クレア）を導入し，出産まで 1 週間，ハウスに順化させた。仔マウスに処置する母子分離の条件に従って，腹ごとに 2 グループに群分けを行った。すなわち，毎日 3 時間を母子分離した 3h グループおよび毎日合計 6 時間（3 時間× 2 回／毎日）を母子分離した 6h グループを作製した。なお，6h グループの仔マウスを，1 日に実施される 2 回の母子分離処置の間に，母マウスが飼育されているハウスへ戻した（休息）。両グループの母子分離処置期間は，生後翌日から 14 日目までとし，生後 15 日目でサンプリングした。同腹子の出生数によって，仔マウスの発育状態がばらつくことを防ぐために，母マウスから出産された仔マウスを 6 または 8 頭に統一し，これらのうち 3 または 4 頭を母子分離処置群（Maternal separation, MS）とした。残る同腹子は，実験期間中を常に母マウスとともにハウスで飼育した無処置群（Control, CT）とした。マウスの母子分離処置の概要を**図 1** に示した。上記の条件によって，母子分離処置の仔マウスが安定して作製されており，これまでに合計 10 腹を実施したが，飼育放棄や食殺は生じなかった。

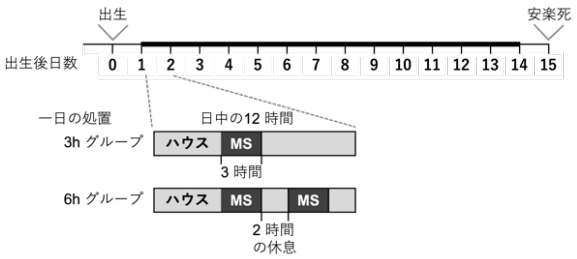


図 1　マウスの母子分離期間の概要

これら母子分離マウスを用いて，以下の実験を行った。なお，LINE-1 のコピー数及び DNA メチル化解析は，ゲノム DNA をテンプレートとしたリアルタイム PCR にて実施した。

(1) 中枢神経の海馬および扁桃体に加えて，心臓，脾臓，肝臓および末梢血の恒常状態における LINE-1 コピー数の組織間の違いを明らかにした。生後 15 日目においても，中枢神経は他の組織と比較して LINE-1 コピー数が増幅しているかを明らかにした。

(2) (1)のゲノム DNA を採取し，LINE-1 のゲノム内コピー数および DNA メチル化状態を解析し，その変化の雌雄差も比較した。これにより，LINE-1 の変化と母子分離によるストレスの強弱との関連性を検討した。

課題番号	23 若 12

5　研究結果

(1)　恒常状態における LINE-1 コピー数の組織間の違い

LINE-1 は，ゲノム内への新規挿入によって，機能遺伝子が不活化する場合が報告されている。このため恒常状態では，LINE-1 の転写が基本的に抑制されているが，脳の発生が著しい胎生期の一時期に，中枢神経の LINE-1 コピー数が増幅し，成熟後の個体でも維持されることが知られている。すなわち，マウスにおける LINE-1 のコピー数は，組織ごとに異なり，特に海馬などの中枢神経が高い値を示す特徴を有する。しかし，これらの報告は，胎生期または成熟後の個体にて実施されたものであり，生後 15 日目のような幼少期マウスにおいて，LINE-1 の組織間の違いは不明であった。

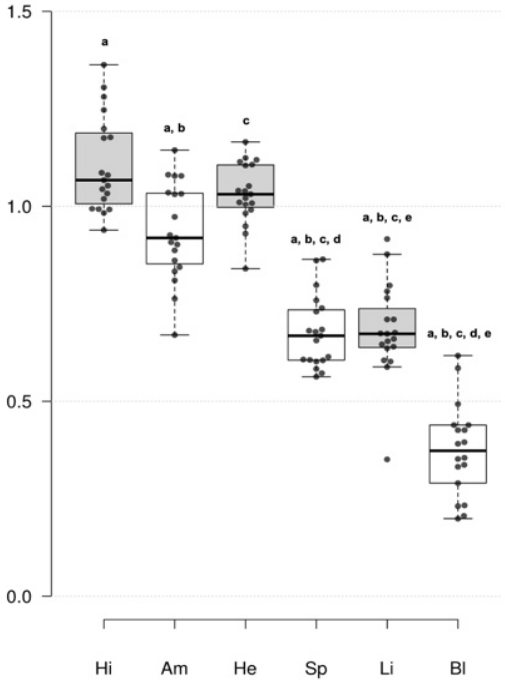


図 2 各組織における LINE-1 コピー数

表中の略語はそれぞれ Hi; 海馬, Am; 扁桃体, He; 心臓, Sp; 脾臓, Li; 肝臓及び Bl; 末梢血を示す。有意差を示すペアは，a から e で記した。

本研究では，無処置群の生後 15 日目のマウスから海馬，扁桃体，心臓，脾臓，肝臓および末梢血に由来するゲノム DNA を抽出した。生後 15 日目においても，成熟個体と同様に各組織におけるゲノム DNA 内の LINE-1 コピー数に多様性が認められた（**図 2**）。すなわち，海馬（19 頭，平均 1.107），扁桃体（19，0.936）および心臓（19，1.033）の LINE-1 コピー数は，そのほかの 3 種類の組織（脾臓，肝臓および末梢血）よりも増幅していた。また，脾臓（19，0.677）および肝臓（19，0.682）の LINE-1 コピー数は，末梢血（18，0.375）よりも増幅していた。特に，中枢神経において，海馬は，扁桃体よりも LINE-1 コピー数が多く，6 種類の組織の中で最も LINE-1 コピー数が増幅した組織のひとつであった。上記の実験結果から，幼少期マウスの海馬および扁桃体は，他の組織よりも LINE-1 コピー数が増幅しており，これまでの胎生期および成熟後の個体での知見と矛盾しなかった。

(2)　母子分離条件による LINE-1 コピー数および DNA メチル化状態の違い

本研究では，生後 14 日間の母子分離実験において，1 日あたり 3 または 6 時間の母子分離を実施した 2 つのグループにおいて，LINE-1 コピー数を解析した。まず，1 日あたり 3 時間の母子分離実験では，5 腹の同腹子合計 35 頭を用い，うち 19 頭を実験群（3h MS 群）および 16 頭を無処置群（3h CT 群）とした（**図 3A**）。これらの個体の海馬由来ゲノム DNA において，3 h MS 群のオス（8 頭，平均 1.115）およびメス（11，1.126）と，3h CT 群のオス（9，1.041）およびメス（7，1.089)との間に，それぞれ有意な差は認められなかった。同様に，1 日あたり 6 時間の母子分離実験では，5 腹の同腹子合計 38 頭を用い，うち 19 頭を実験群（6h MS 群）および 19 頭を無処置群（6h CT 群）とした（**図 3B**）。まず，海馬由来ゲノム DNA に関して，6h MS 群のオス（10，1.176）と，6h CT 群のオス（9，1.116）との間に有意な差は

〔5　研究結果（つづき）〕

認められなかった。その一方で，6h MS 群のメス（9，1.288）は，6h CT 群のメス（10，1.099）よりも LINE-1 コピー数が有意に増幅していた。次に，扁桃体は，6h MS 群の雌雄において，LINE-1 コピー数に有意な差は認められなかった（**図 3C**）。最後に，LINE-1 コピー数に有意な差が認められた 6h MS のメスの海馬において，LINE-1 の DNA メチル化状態を解析した。しかしながら，MS 群と CT 群との間に有意な差は認められなかった（**図 4**）。

以上の結果から，母子分離処置による何らかのストレスが原因となり，メスの海馬由来ゲノム DNA における LINE-1 のコピー数の増幅が認められた。特に，このコピー数増幅が，母子分離処置が 1 日あたり 3 時間ではなく，6 時間のみで認められた。このため，より強いストレスを受容した場合に，LINE-1 のコピー数増幅が生ずることが明らかとなった。また，LINE-1 のコピー数は，海馬では増幅していた一方で，海馬と隣接する脳領域である扁桃体では変化しなかったが，海馬以外にも変化が生ずる領域があるかもしれない。さらに，メスのみでコピー数増幅が認められたことから，ストレスの感受性またはその影響に雌雄差があることが示唆された。今後は，脳の個々の領域での LINE-1 コピー数の解析によって，母子分離ストレスにより影響が生ずる脳領域を明らかにし，母子分離マウスの行動異常，虐待のトラウマ症状および雌雄差との関連性を検討したい。また，LINE-1 の DNA メチル化状態に関しては，本研究では差が認められなかったが，今後はより精度の高い実験手法を用いて，再度解析を実施することを検討している。

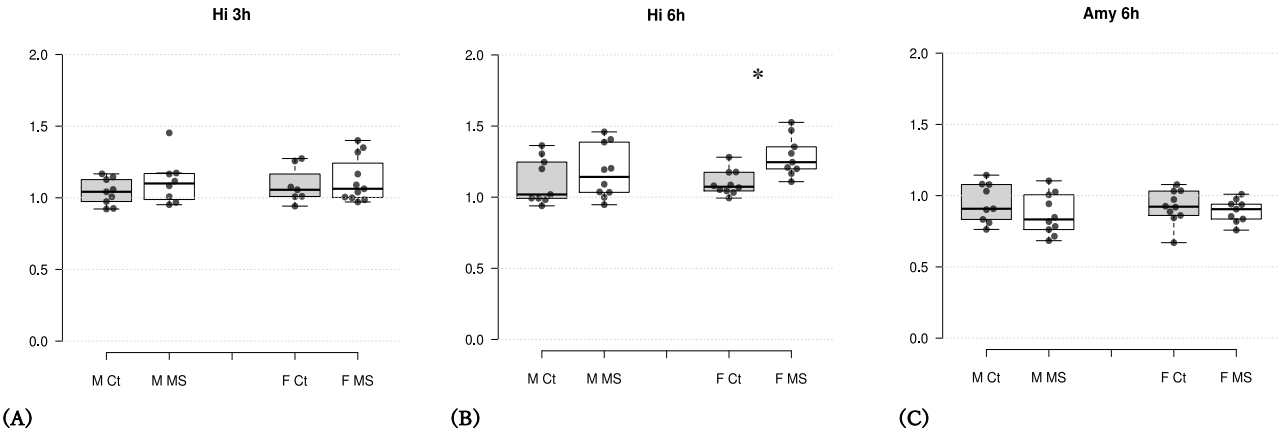


図 3 母子分離実験後の仔マウスにおける LINE-1 コピー数

表中の略語は Hi; 海馬および Amy; 扁桃体を表した。また，M Ct; オスの CT 群, M MS; オスの MS 群, F Ct; メスの CT 群および F MS; メスの CT 群を示した。黒い丸は，個々のマウスの値を示した。

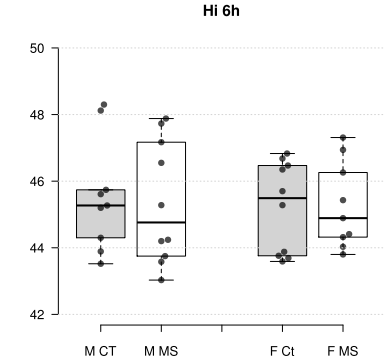


図 4 母子分離実験後の仔マウスにおける LINE-1 の DNA メチル化（Df 値）

0%DNA メチル化スタンダードを 0 とした場合の値（Df 値）を示した。

課題番号	23 若 12

6　将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類　（※研究計画書に記載したものを記入すること）
科研費:海外特別研究員，基盤研究(B)，挑戦的研究(開拓または萌芽)，国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED):成育疾患克服等総合研究事業，学内:歯学部総合歯学研究所研究費(A)，理事長・学長特別研究

7　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否
なし				

8　学会発表等
要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
岡野　雅春	2023 年度「先進ゲノム支援」拡大班会議	母子分離ストレス負荷が原因となるゲノム DNA の LINE-1 に生じた変化	2023 年 12 月
Masaharu Okano, Ayano Ogata, Masahiro Kondo	北米神経科学学会 (Neuroscience 2023)	Increasing of copy number of LINE-1 in genomic DNA by maternal separation stress in mice	2023 年 11 月
小方　彩乃 堤　　貴通 岡野　雅春 近藤　真啓	第 92 回日本法医学会学術関東地方集会	頬粘膜および唾液由来 DNA のメチル化率を用いた年齢推定法	2023 年 10 月

9　著書・雑誌論文
著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
なし				

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）
なし

課題番号	23 若 12

１１　他の研究への発展

本研究では，海馬においてLINE-1が増幅したことが明らかとなったが，実際にゲノム内のどの領域に新規挿入されたかは未だに不明である。今後，増幅したLINE-1が新規挿入したゲノム領域を同定することにより，機能遺伝子の破壊の有無が検討でき，精神疾患やトラウマなどの後遺症の発症および重症化との関連性が明らかにされるかもしれない。

短鎖散在型反復配列の1種であるSINE B1は，LINE-1がコードする逆転写酵素を利用するため，LINE-1の活性化に伴ってコピー数が増幅することが期待される。本申請研究で作製した母子分離マウスにおいても，ストレスの強弱とSINE B1のゲノムDNA内コピー数との関連性を明らかにしたい。

１２　その他の成果

なし

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
なし						

※ホームページ等での公開（☑可・□否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。