

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659919

研究課題名(和文)小児の精神的長期ストレスをモニターする唾液microRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of salivary microRNA which monitors pediatric prolonged mental stresses

研究代表者

前田 伸子 (Maeda, Nobuko)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：10148067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：小児の精神的ストレスを非侵襲的に診断する方法を確立することを目的とし、バイオマーカーとなる唾液microRNA検索を試みた。被験者として、小学校児童1-5年生の問題を抱えカウンセリングした児童30名をストレス群、安定している児童30名をコントロール群とした。う蝕経験歯数はストレス群がコントロール群の2倍高かったが、う蝕関連菌数と唾液分泌量・緩衝能には差がなかった。そこで唾液microRNA抽出・精製方法を確立し、アレイで発現プロファイルを比較したところ、10種のmicroRNAにおいて発現パターンが異なり、クラスターマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose to establish a diagnostic method for a child's psychological stress noninvasively, a survey of the salivary microRNA as a biomarker was carried out.

The subjects were the elementary school juvenile first-fifth graders. In the subjects, 30 children who had and counseled problem were classified into the stress group, and 30 stable children were into the control group.

Although the dental caries experience number of teeth was twice higher in the stress group than the control group, there was no difference in the number of cariogenic pathogens, the amount of salivary secretion and saliva buffer capacity. Then, the saliva microRNA extraction / purification methods were established and the expression profile was compared using an array. The expression patterns differed in ten sorts of microRNAs. The result suggested that microRNAs are useful as a cluster marker for diagnosis of children's psychological stress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：ストレス 小児 う蝕 唾液

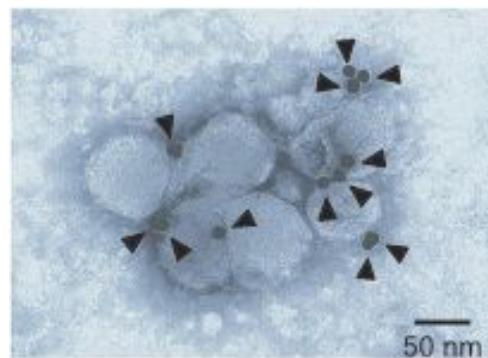
## 1. 研究開始当初の背景

(1) ストレス社会といわれる現代は小児・大人を問わず、精神的肉体的ストレスを感じて日々生活している。特に、虐待、いじめといった小児をとりまくストレスに満ちた境遇の報道が後をたたない。負担を感じるほどの精神的ストレスは免疫力の低下につながる事が示されており、さまざまな疾患の原因となって、心と体の健康状態に影響すると思われる。特に不安定な小児の心はさまざまなストレスを抱えていても、大人のように言葉で伝えることができないことが多いため、周囲の大人が見逃してしまった結果、不幸な事件につながっている。さらに2011.3.11に起こった東日本大震災の影響は、被災者にははかりしれない心の傷をもたらし、日本国民全体にも辛い記憶となった。

今、まさにその精神的ストレスを正しく評価し対応策を講じることは急務である。そのためには生体中のストレスマーカーを測ることで精神的長期ストレスを客観的に正しく評価することが必須であると考えられる。学校口腔検診でう蝕と診断され、治療勧告されても放置されている場合、ネグレクトなどの虐待を疑うべきと言われているが、検証は難しい。客観的なストレスマーカー物質による判断が望ましいが、現状ではその正確性や感度についての検討は十分ではなく、コンセンサスが得られていない。

(2) 近年、細胞内には non-coding RNA である microRNA の存在と重要な機能が発見され、細胞内だけでなく血清中に分泌されていることが明らかとなっている。さらに血清中のみならず、体液中にもこの分泌型 microRNA が存在することが報告されているが、機能については未だ不明である。分泌型 microRNA はエクソソームと呼ばれる細胞分泌顆粒に包埋されて体液中に放出されることが観察されている。そこで、小児の精神的ストレスに応じて分泌される microRNA をバイオマ

ーカーとし、国民の心と体の健康に寄与する方策を探ることが本研究の最終目的である。上図はエクソソームの電顕写真で、矢印はエクソソーム膜特異的タンパク質 CD63 の抗体染色である [Let-7 MicroRNA Family Is Selectively Secreted into the Extracellular Environment via Exosomes in a Metastatic Gastric Cancer Cell Line (Ohshima, K et al. *PLoS ONE*, 5(10): e13247,



2010)]. この報告では血清中エクソソームに含まれる microRNA が癌の新たなバイオマーカーと成り得ることが報告されている。また、正常な免疫機能、自然免疫反応に miRNA が関与すること ( Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. *Science* April 2007, NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS* August 2006 )、心臓のストレス応答に microRNA が関与すること ( Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science* August 2007 ) などの報告から、microRNA のストレスと免疫能に関与することが予想される。

有用性の高いストレスマーカーを測定することで、客観的数値によるストレス評価ができれば、いじめや不登校、自殺など防ぐ対策を学校医、学校歯科医師、教職員、保護者などが協力してとることができる。さらに、小児だけではなく、大人のストレス把握への応

用ができる可能性が考えられる。

ストレスマーカー測定にあたっては、被験サンプル採取時に採血は痛みを伴い、その結果精神的ストレスを加えることになり正確な評価が困難である。したがって採取時に侵襲性の極めて少ない唾液を検体として利用することが良いと考えられるが、その唾液を使った検討は報告が少ない。

(3) ストレス応答タンパク質とされている CgA (クロモグラニン A) は、副腎髄質クロム親和性細胞および交感神経ニューロンから分泌されるタンパク質である。顎下腺導管部に存在し自律神経刺激により唾液中に放出されるので精神的ストレスマーカーとして使用できると言われているが、短期ストレスの検出に適しているものの、長期ストレスとの整合性はまだ不明である。他にもアミラーゼ、コルチゾールなどが同様である。

(4) 前述したように、現在ストレスマーカーとして用いられている物質は適応に限られるために広く普及していないものと思われる。したがって、新たなストレスマーカーとしてストレスに特異的に唾液中に発現する RNA およびタンパク質を探る研究が有用と予測される。しかし、タンパク質に関しては網羅的プロテオミクス解析が行われているにも関わらず、未だ有用なものが明らかにされていない。

一方、近年体液中にはエキソソーム内に封入された microRNA が発見され、その存在理由を探る研究が始められている。従来 mRNA とは存在様式も機能も異なることから、これから解析すべき要素が多いが、本研究はその存在意義を示す可能性を含んでおり、ストレスマーカーとして有用である可能性が十分考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 不安定な小児の心はさまざまなストレスを抱えていても、大人のように言葉で伝えることができないことが多いため、対応が遅

れることが指摘されている。おりしも、東日本大震災の影響は被災者にははかりしれない心の傷をもたらしたままであり、癒すための対策を講じることは急務である。

本研究では小児の精神的ストレスを短時間で正確かつ非侵襲的に把握する方策を見出すことを目的とする。すでにストレス応答タンパク質候補とされているものがいくつか報告されてはいるものの、精神的長期ストレスへの対応は見られていない。そこでストレスに応じて唾液中に分泌される microRNA をバイオマーカーとし口腔検診レベルでの評価を実現し、国民の心と体の健康に寄与する方策を探ることが最終目標である。

(2) 今回立案した研究は臨床観察研究である。小児の日常生活におけるストレスレベルを心理的ストレス反応測定尺度および第三者評価で測り、口腔診査による健康状態との相関を見出す。また、ストレスにより変動する唾液成分(タンパク質および microRNA) を分析し、量的分析によりストレスレベルの、より正確な把握方法を確立する。

(3) 本研究から予測される効果および意義は、唾液中の口腔疾患罹患リスク診断に役立つ新たなストレスマーカーを見出し、予防措置や積極的な継続的経過観察の必要性を判断する基準となる可能性が考えられる。また、唾液は採取にあたって被験者に対する侵襲性が少ないので、検体採取でのストレスが少なく抑えられ、最も適切な生体サンプルであると期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 被験者：研究代表者が学校医と長年連携している小学校の全校児童を対象とした。この小学校には全校児童 200 名前後のうち両親から離れて保護施設から通う児童が 12%、母子寮から通う児童が 6%、不登校の児童や家庭的に問題のある児童が 7%以上存在した。なお、本研究は鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認のもと(承認番号 947)、プライバシー

に十分配慮し臨床観察研究として行った。

(2)口腔疾患および口腔環境調査：全児童の口腔診査により口腔疾患の実態調査を行い、う蝕経験歯数（DFT）を算出した。唾液中の口腔微生物でう蝕原性菌（ミュータンス菌、カンジダ真菌、ラクトバチルス菌）の培養試験、唾液分泌量の測定、唾液緩衝能の試験を行った。

(3) ストレス評価：児童にも理解しやすい設問からなるとされる DSS-K 健康調査票を使って主観評価を行った。

(4)唾液ストレスタンパク質の検出：唾液 CgA を市販 EIA キットで測定した。

(5)唾液 microRNA 抽出・精製方法の確立：被験者の唾液からエキソソーム分画を分離し、microRNA を抽出・精製し、totalRNA および mRNA に対する比率を測定した。比較のため血清 microRNA との相関性を検討した。realtime-PCR により、内部コントロール microRNA および添加外部コントロール（線虫由来配列）との比率から発現レベルを換算した。

(6) 発現プロファイルの比較：ストレス群、対照群の microRNA の発現プロファイルをマイクロアレイにより、網羅的に検出した。発現レベルが2倍以上の差が見られる microRNA は、定量 realtime-PCR により検証を行った。

#### 4. 研究成果

(1)口腔疾患および口腔環境調査：う蝕経験歯数（DFT）と唾液中のう蝕関連微生物（ミュータンスレンサ球菌、ラクトバチラス菌、カンジダ真菌）の培養検査、唾液分泌量および緩衝能測定し、それぞれ2群間で比較した。DFT はストレス群がコントロール群の2倍程度高かったが、微生物検査結果と唾液分泌量および緩衝能の測定結果には差がなく、相関が見られなかった。

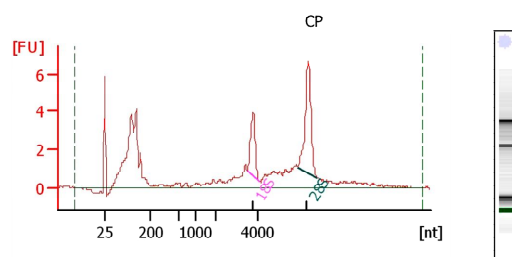
(2)ストレス評価：DSS-K 健康調査票を用い、2群間の比較を行ったところ、ストレスサー、ストレス反応、自己効力感にはともにわずか

に差が見られた。

(3)唾液ストレスタンパク質として報告されているクロモグラニンA(CgA)をELISA法で測定し、2群間で比較した。平均値ではストレス群が約2倍の高値を示した。

(4)唾液 microRNA 抽出・精製方法の確立：被験者の唾液から microRNA を抽出・精製方法を検討した。初期変性条件を改良することで、エキソソーム分画ステップを経由せずに精製できる条件を確立した。

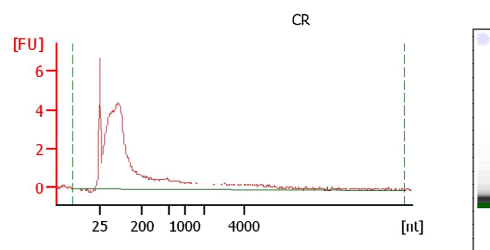
下図は、同一被験者の血漿サンプル(CP)と唾液サンプル(CR)の低分子量 RNA の全自動キャピラリー電気泳動パターンを示す。CP には 18S, 28S rRNA が混入しているが、CR には混入がなく microRNA が抽出された。



**Overall Results for sample 7 :** CP  
RNA Area: 74.6  
RNA Concentration: 415 pg/ $\mu$ l  
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8  
RNA Integrity Number (RIN): 7.1 (B.02.07)  
Result Flagging Color:    
Result Flagging Label: RIN: 7.10

**Fragment table for sample 7 :** CP

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	3,506	4,069	5.8	7.7
28S	5,980	6,918	10.6	14.2



**Overall Results for sample 9 :** CR  
RNA Area: 77.6  
RNA Concentration: 432 pg/ $\mu$ l  
rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.0  
RNA Integrity Number (RIN): 2.5 (B.02.07)  
Result Flagging Color:    
Result Flagging Label: RIN: 2.50

また、精製後のサンプルで安定的に存在する

microRNA を見だし、リアルタイム PCR によって定量を行うことで、抽出精度の検証を行った。

(5)発現プロファイルの比較：ストレス群と対照群の唾液から microRNA を抽出・精製した。精製後の microRNA は蛍光標識し、キャピラリー電気泳動により純度を確認後、蛍光 peak から AUC(Area Under Curve)が一定になるような 8 例ずつを各群から選出した。マイクロアレイにより、microRNA 発現プロファイルを網羅的に解析し、結果を統計学的に分析したところ、10 種の microRNA において発現パターンが異なる可能性が示された。

(6)バイオマーカー候補の検討：絞り込まれた 10 種について、異なる被験者で構成されたストレス群 24 名、コントロール群 19 名における発現比較をリアルタイム PCR によって行った。その結果、平均値では 2 群間での明らかな有意差は示されなかったものの、各個人のマーカー候補すべてにおける 2 つずつの組合せでは、発現レベルが有意に関連していた。

したがって、これらは単独ではなく、組合せによるクラスターマーカーとして、非侵襲的に採取した唾液からの判定に有用となる可能性が示唆された。

## 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)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

前田 伸子 (MAEDA, Nobuko)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：10148067

### (2)研究分担者

大島 朋子 (OHSHIMA, Tomoko)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50233101