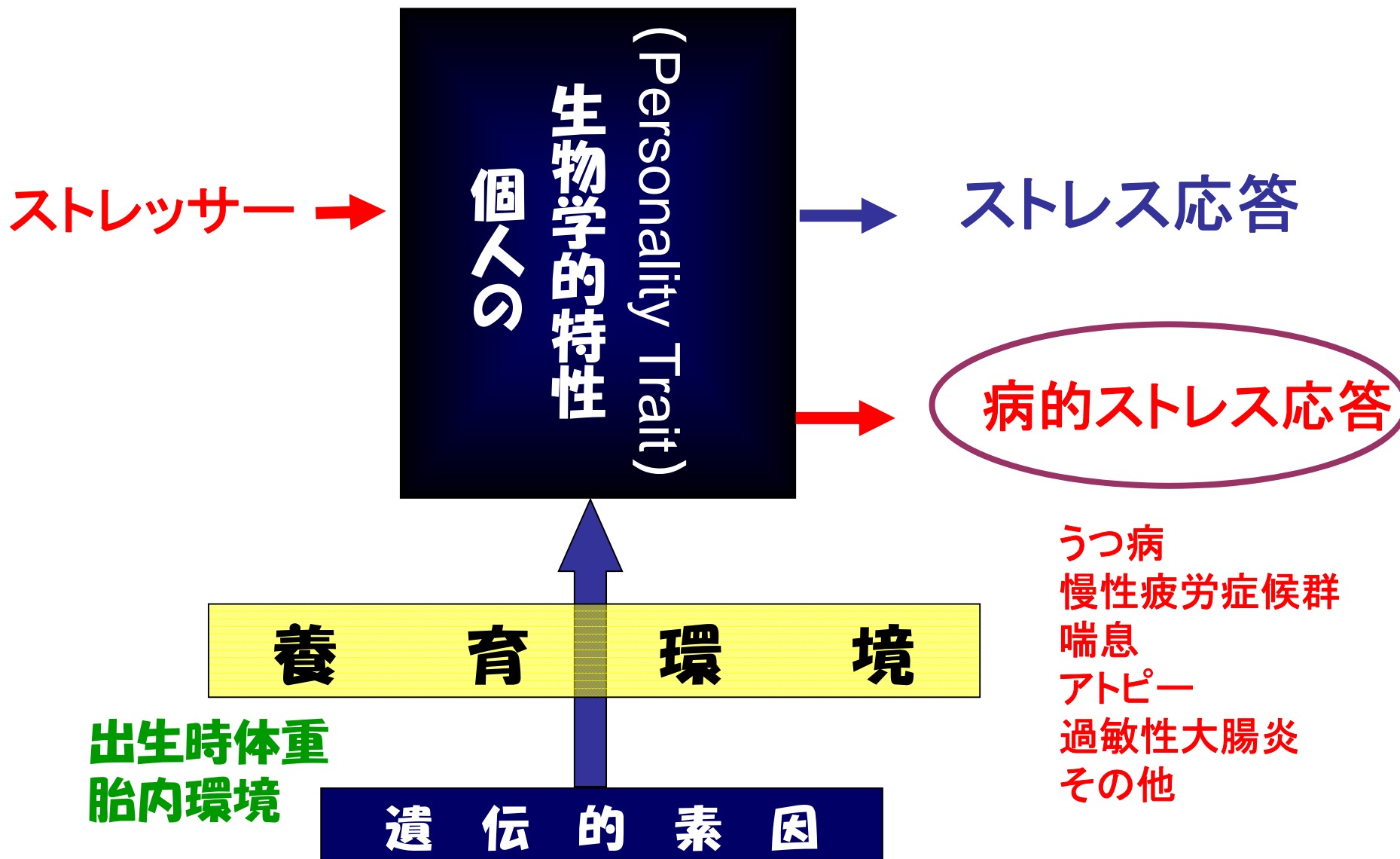


ストレスバイオマーカーの現状と可能性

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
六反一仁

ストレスに起因する疾患の発症



ストレスバイオマーカー

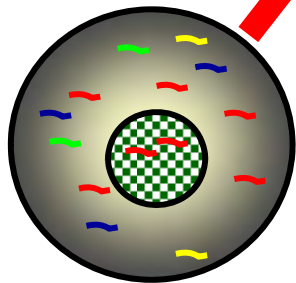
- **ストレスを客観的に評価できるマーカー**
 - ・ストレス反応の強さに加え質を判定する
- **ストレスに対する脆弱性(疾患リスク)を
予知できるマーカー**
 - ・ストレス関連疾患の予知
 - ・遺伝的素因と環境要因の同定

ストレスの評価技術

1. 質問紙: ライフイベント、心理・行動解析など
2. ストレスホルモンの測定(血液、唾液)
3. 自律神経機能
4. 脳機能: 脳イメージング
5. 発現プロファイル: 遺伝子発現解析、
プロテオーム解析、サイトカインプロファイル
パスウェイ解析
6. 脆弱性遺伝子: 遺伝子多型、コピーナンバー
9. 選択的スプライシングバリエント
10. 機能性RNA、エピゲノム

こころを映し出すDNAチップの開発

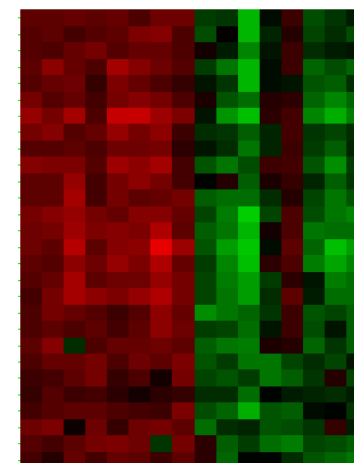
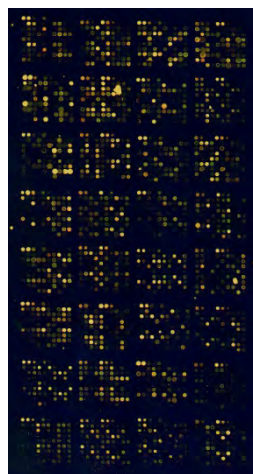
ストレス



(末梢白血球)

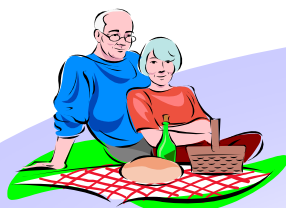
ストレス評価用
DNAチップ

末梢白血球のmRNA
の発現変化を網羅
的に解析しストレス
反応を評価

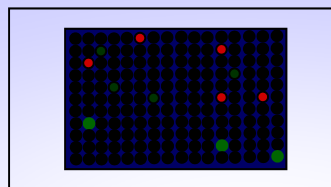


(クラスター解析)

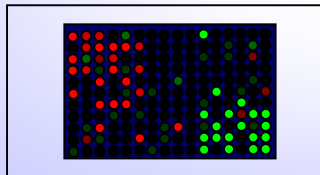
遺伝子発現データ
の医学的相関解析と
バイオインフォマティクス



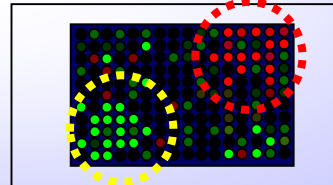
平安状態



正常ストレス応答



病的ストレス応答



安価で信頼性の高い実用化チップの開発

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？

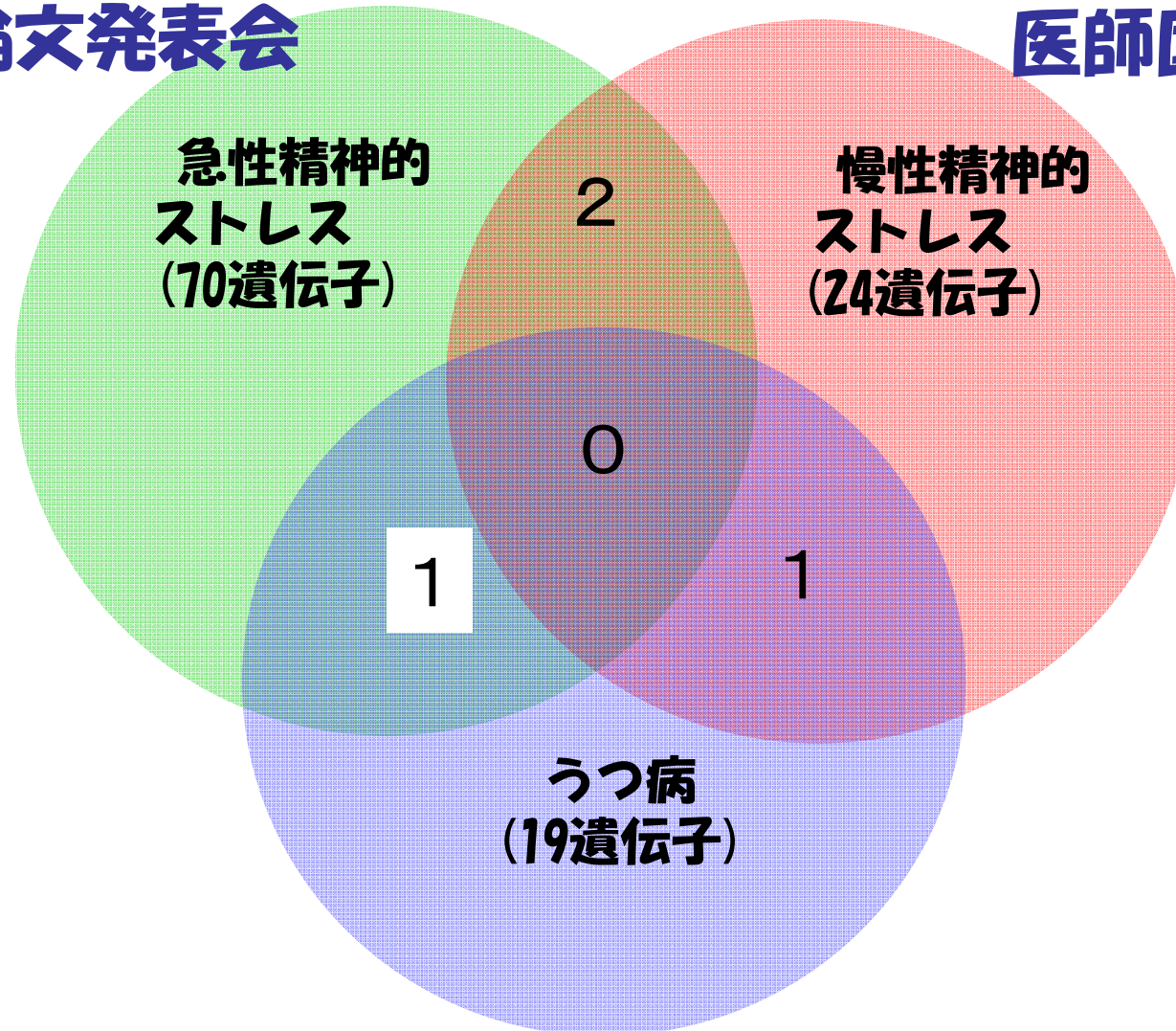
1. ストレス応答の質を解析できる
2. 末梢血白血球の遺伝子発現は極めて安定、しかし大きな個人差がある
3. 環境応答遺伝子がStaticな個人差の形成に関わる可能性がある
4. Staticな遺伝子発現と脳活動やストレス応答とリンクしている可能性がある
5. うつ病患者に特有のうつ病パターンがあり、健常人の約10%にも認められる（どこで形成されたのか？）
自閉症、病的疲労パターンも数%存在

“Nature or Nurture”から “Nature via Nurture”へ

うつ病患者で共通して発現が変化している遺伝子は
健常人の精神（心理）的ストレスに应答する遺伝子とは異なる

学位論文発表会

医師国家試験



ヒト全ゲノムアレイを用いた 末梢血の遺伝子発現解析

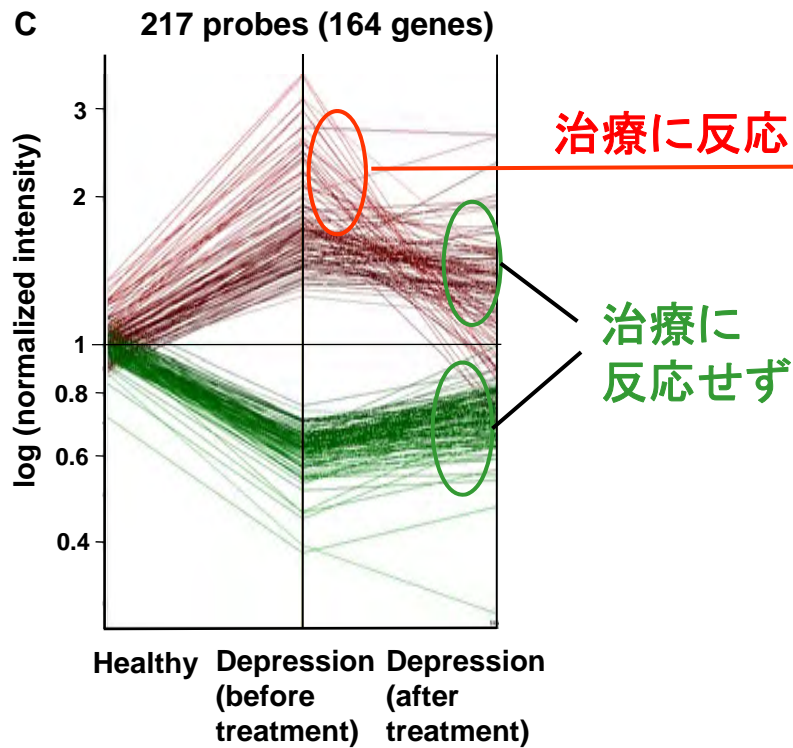
うつ病の診断

未治療のうつ病患者37名と健常者91名の間で 発現が変化している遺伝子

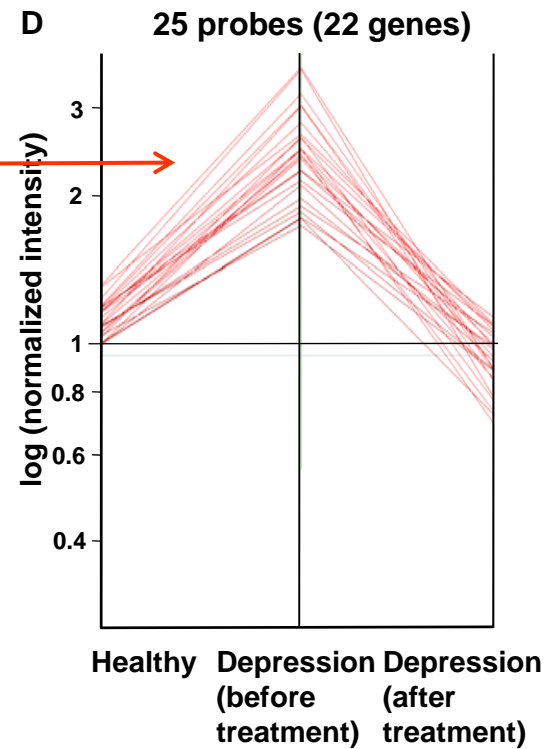
Group 1	Group 2	Differentially expressed genes Benjamini multiple correction ($p = 0.05$) + mean expression levels differed by > 1.5-fold
Drug-free major depression (37) (26 F & 11 M; aged 43.2 ± 16.3 y. o)	Healthy controls (91) (63 F & 28 M; aged 42.9 ± 17.0 y.o.)	164 genes (61 UP & 103 DOWN)
Drug-free major depression (26) (16F & 10 M) HAMD: $21. \pm 7.4$	Two-month treatment with anti-depressants (26) HAMD: 6.0 ± 6.4	200 genes (22 UP & 178 DOWN)

多くのうつ病関連遺伝子は治療に反応しないが、25遺伝子は反応する

Trait marker genes

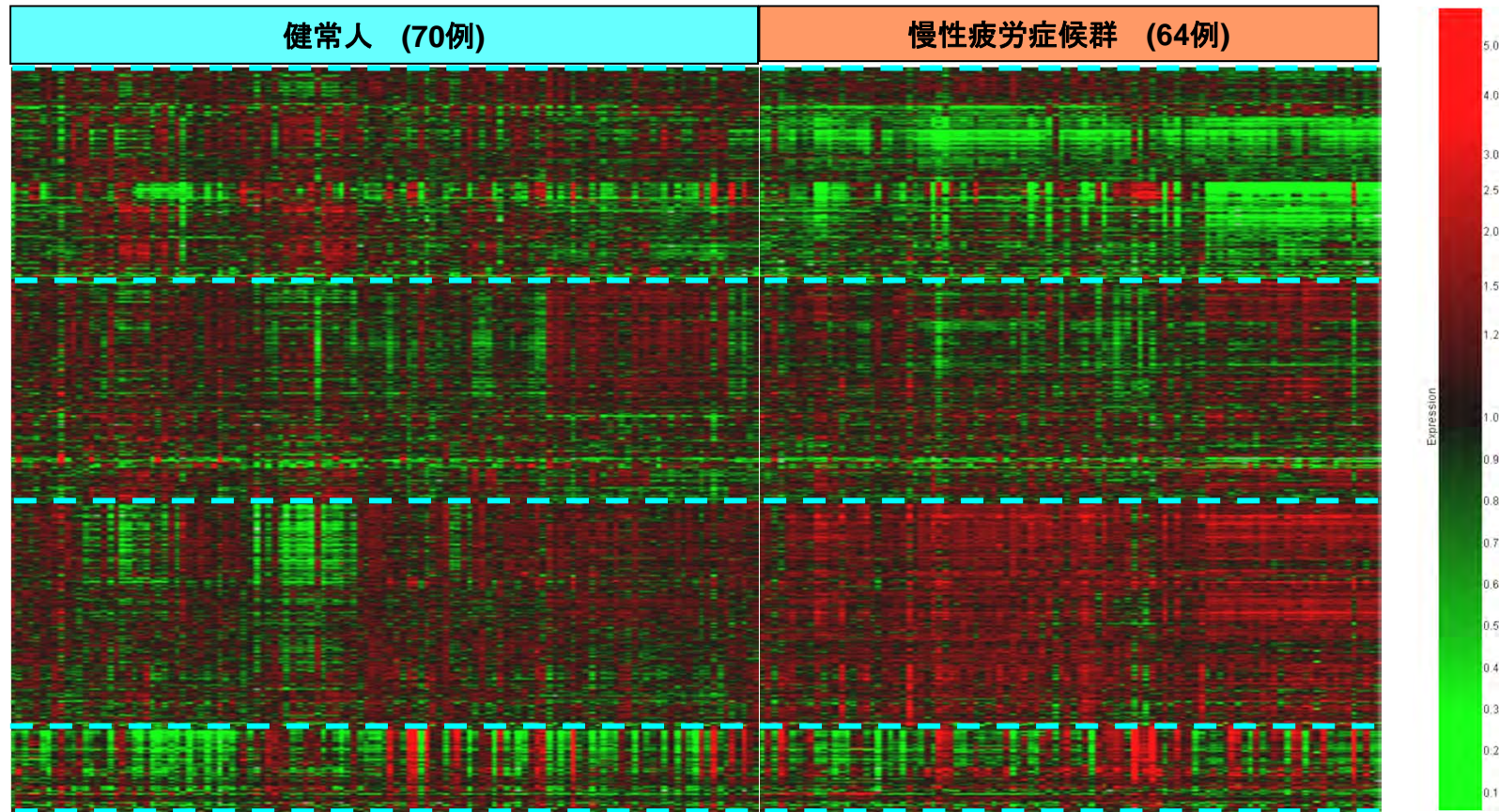


State marker genes



慢性疲労症候群の診断

健常人(70名) 慢性疲労症候群(64名) の21,895遺伝子発現

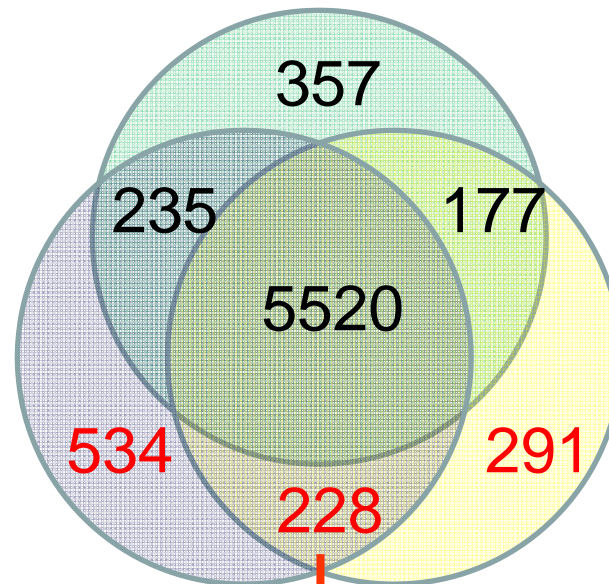


Benjamini-Hochberg multiple testing correction with cutoff p-value 0.05: 12,944 probes

Filtering by 2-fold change criteria: 74 up-regulated genes,
131 down-regulated genes
(90 genes encode ribosomal proteins)

慢性疲労症候群(CFS)は精神疾患の合併の有無で
三つのサブタイプの分類される

CFS I: CFS単独
(6,289)



CFS II: 精神疾患が併発
(6,517)

CFS III: 過去に精神疾患の既往
(6,216)



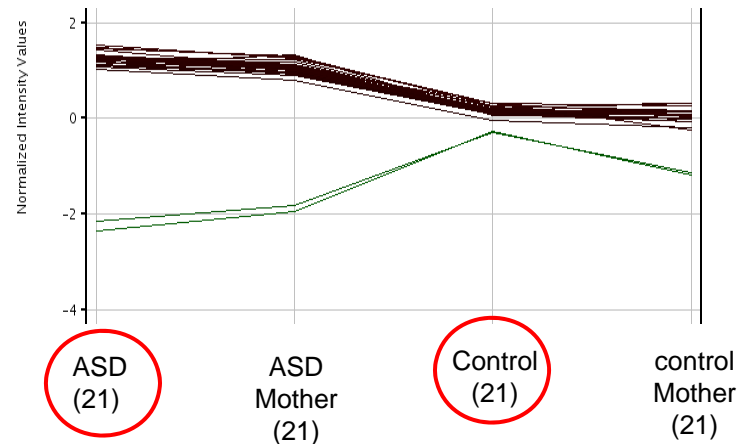
自然免疫応答関連遺伝子

自閉症と遺伝子発現

自閉症児、自閉症児を持つ母親の末梢血遺伝子発現

Differentially expressed genes (control vs ASD: averaged)

fold changes > 2.0, p -value < 0.05

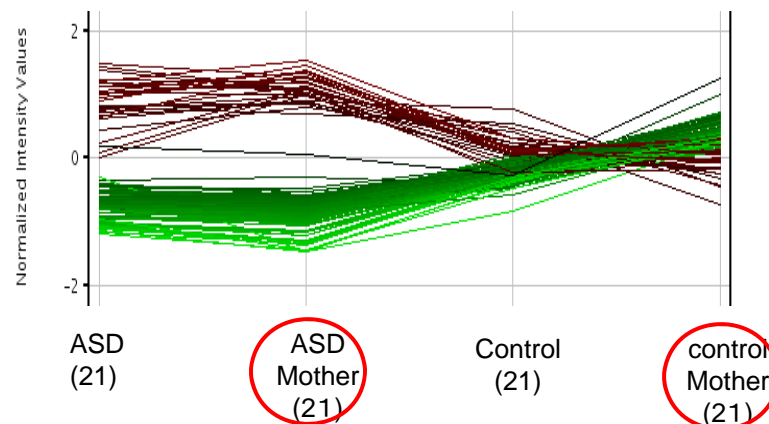


28 probes
(25 genes)

ASDで有意に2倍以上変化していた遺伝子はASD motherでもよく似たパターンで変化している

Differentially expressed genes (control mother vs ASD mother: averaged)

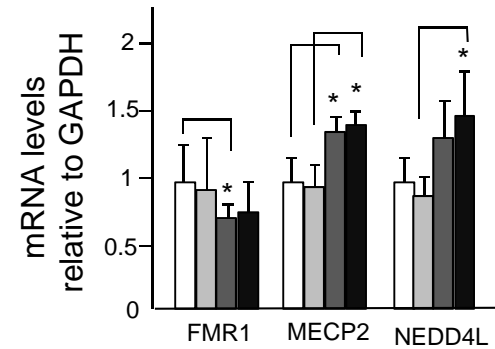
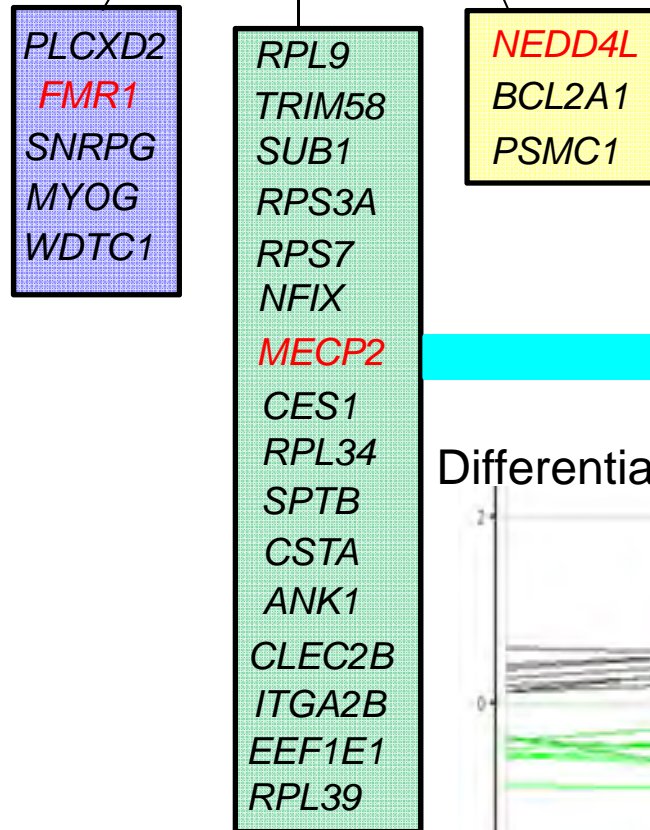
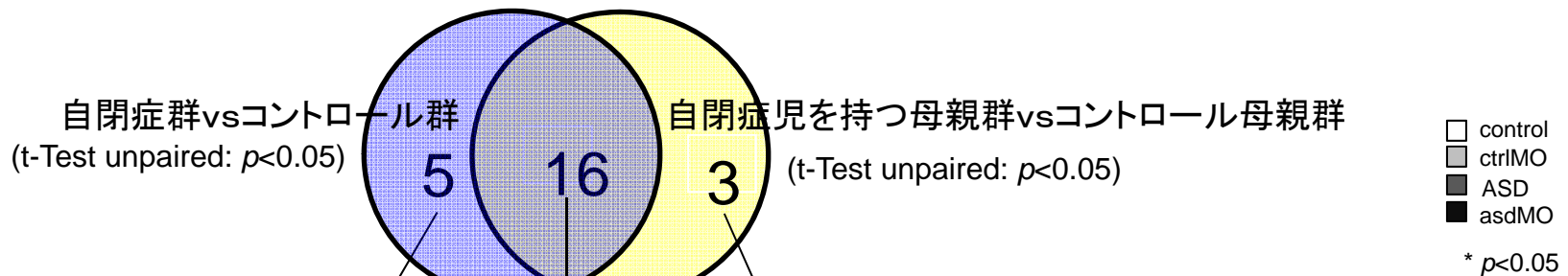
fold changes > 2.0, p -value < 0.05



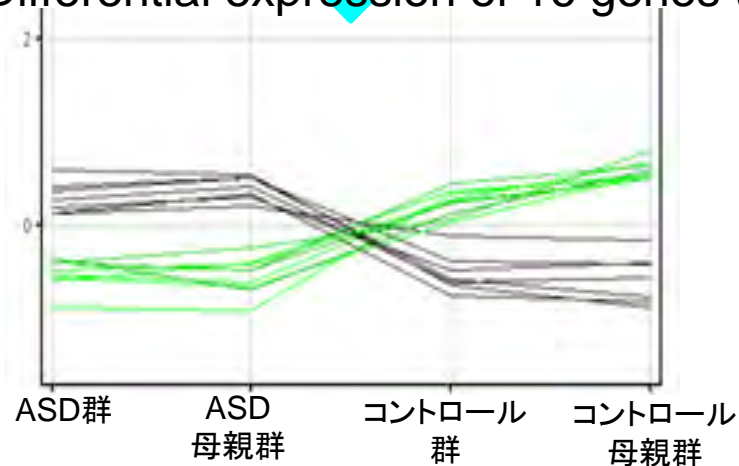
176 probes
(101 genes)

ASD motherで有意に2倍以上変化していた遺伝子はASDでもよく似たパターンで変化している

38遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCRで確認



Differential expression of 16 genes (averaged)

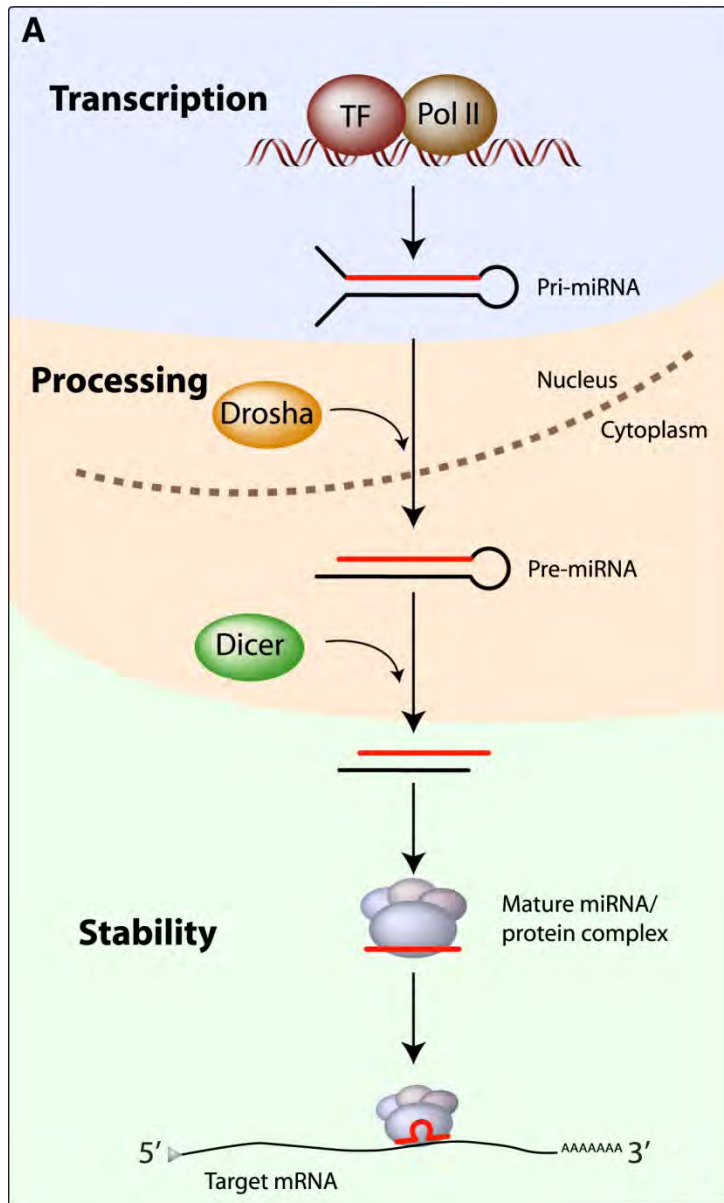


新たなストレスRNAマーカー

1. ストレス特異的スプライシングバリエーション

2. ストレス応答性マイクロRNA

Micro RNAsとストレスコーピング

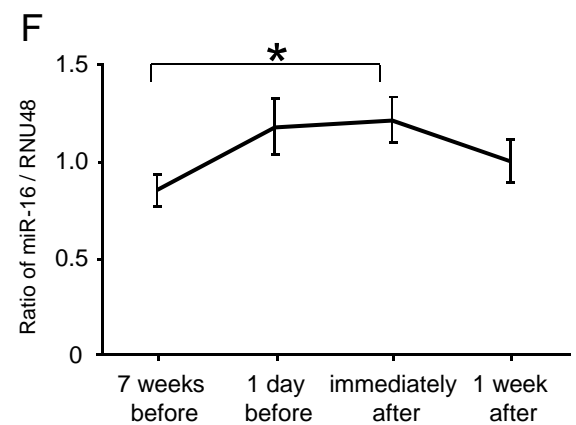
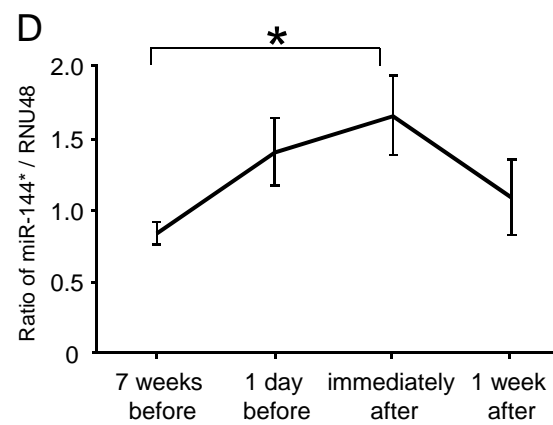
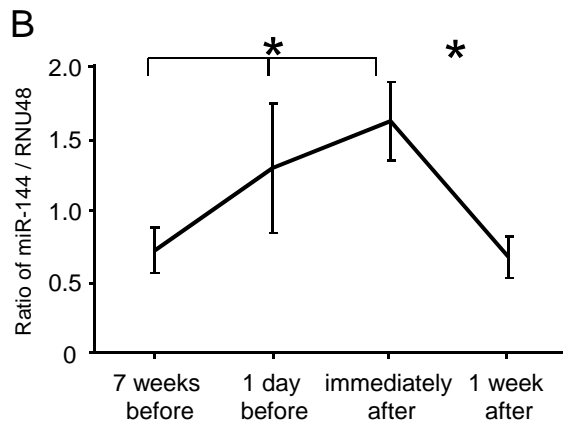
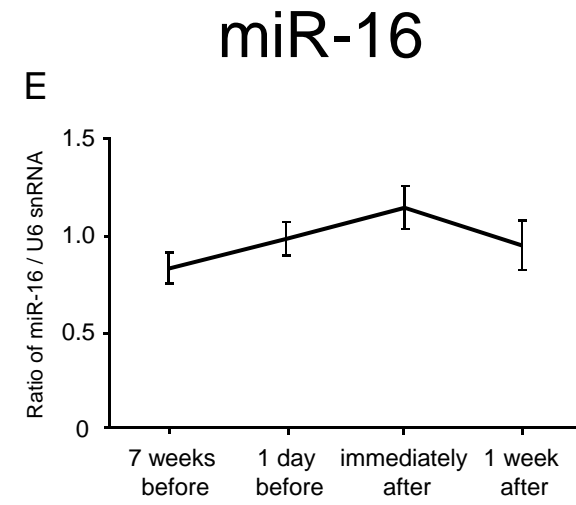
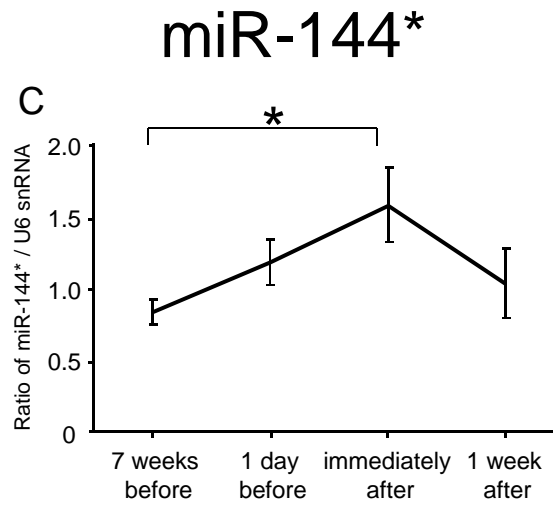
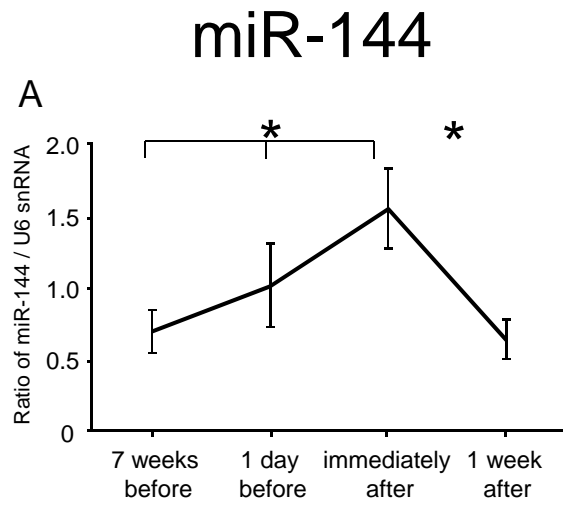


miRNAsとは

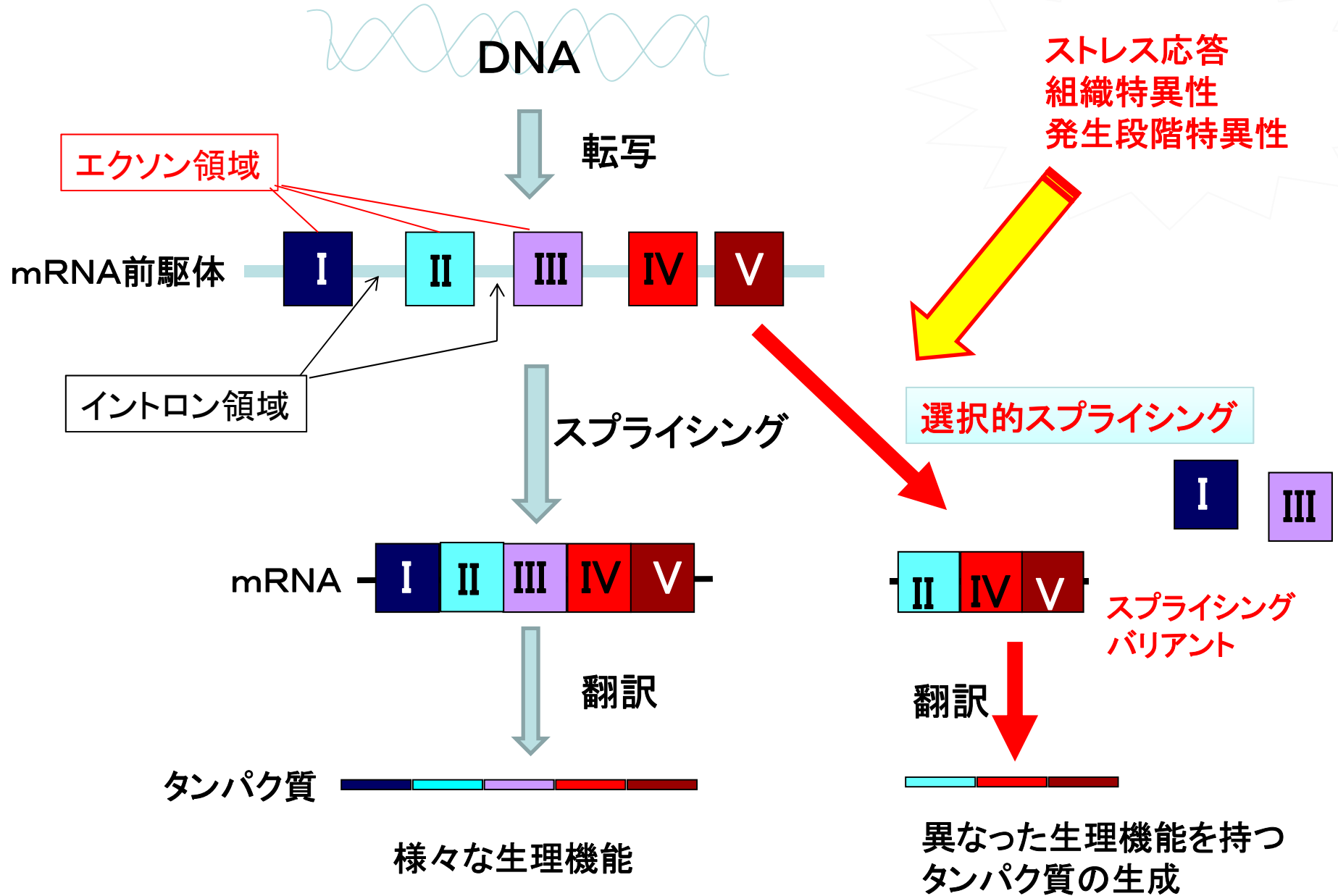
1. ~22塩基のsmall, non-coding RNAs
2. 950種類以上のmiRNAがある
3. mRNAの3'UTRに結合
4. 一つのmiRNAは数百のmiRNAを標的にする
5. 70%以上のmRNAsはmiRNAの標的

miRNAの機能

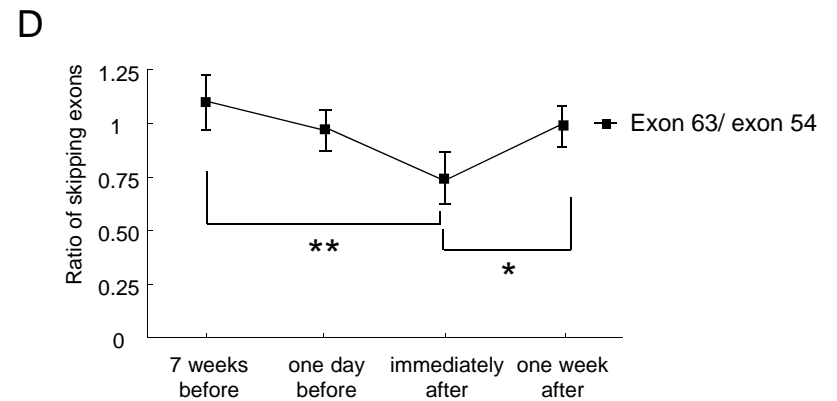
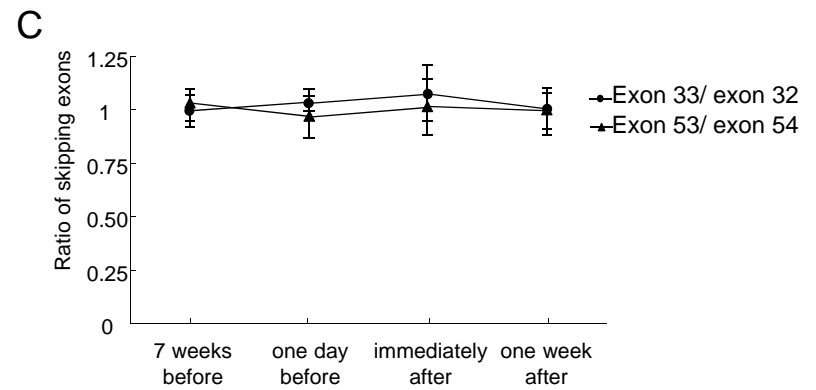
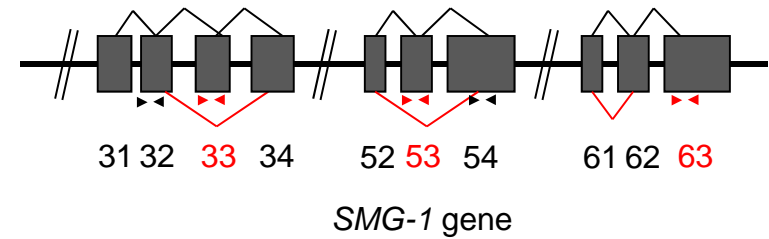
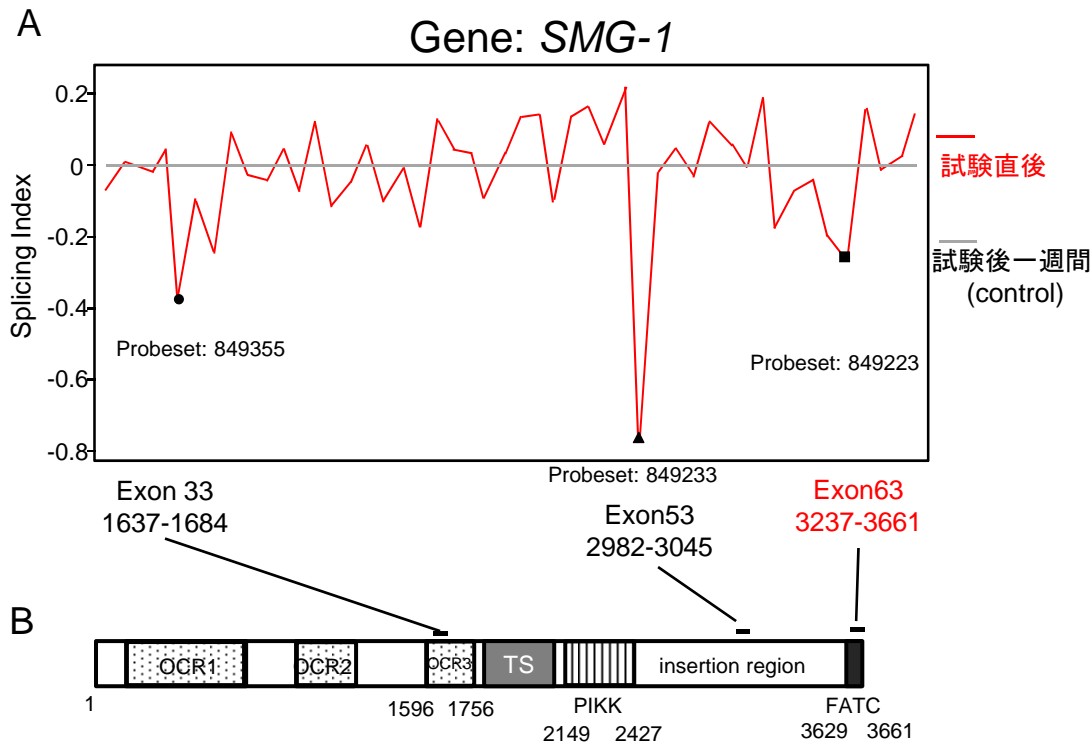
1. 基本的な細胞機能に加え、細胞のストレス応答を調節する
2. miRNAの遺伝子を破壊した動物は通常の状態では正常に発育するが、ストレスに曝すと異常が生じる
 - ・miR-14 mutant flies
 - ・miR-7 knockout flies
 - ・miR-208-inactivated zebra fishes,
 - ・mice deficient in miR-208



選択的スプライシング: mRNA前駆体からエクソンを選別して
遺伝子を再構成する反応



SMG-1遺伝子の53番目と64番目のエクソンのスキッピングをリアルタイムPCR法にて確認



** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

(Kurokawa et al. Neurosci Lett 2010)

CBT試験ストレスは、SMG-1のエキソン63のスキッピングを促進した

SMG-1: p53シグナルの活性化
mRNA分解(NMD)に必須

精神的ストレス指標蛋白質—血清での評価—(2)

慢性ストレス状態の客観的評価(ラーニング試験)

ストレス負荷	総検体数	正答数	誤答数	判定不能	正答率(%)	誤答率(%)
8種類の血清中蛋白質で評価						
慢性ストレス	76	74	0	2	(感度) 97.4	0.0
非ストレス	169	152	9	8	(特異性) 89.9	5.3
3種類の血清中蛋白質で評価						
慢性ストレス	76	74	0	2	(感度) 97.4	0.0
非ストレス	169	152	9	3	(特異性) 92.9	5.3

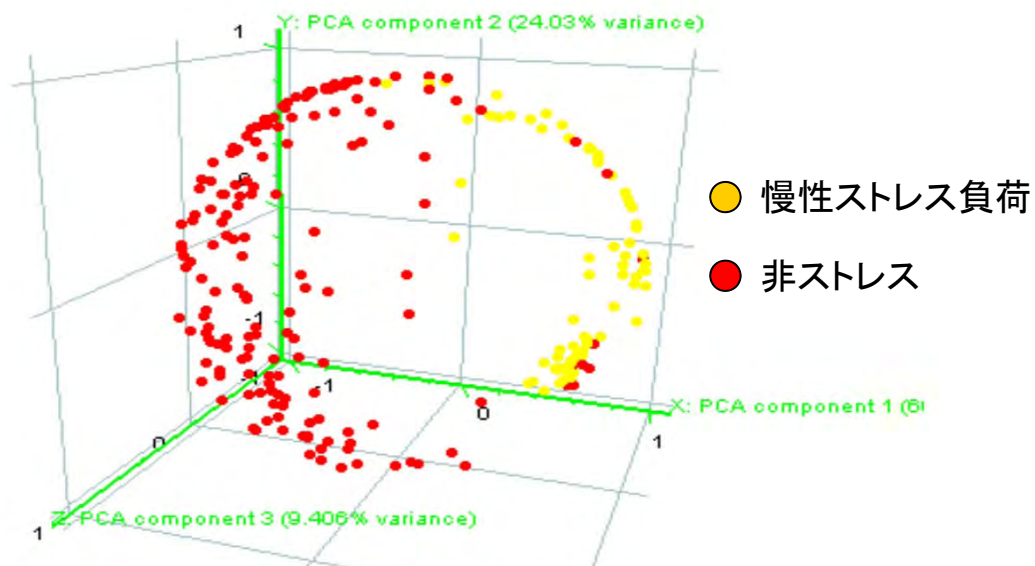
慢性ストレス状態の客観的評価(バリデーション試験)

ストレス負荷	総検体数	正答数	誤答数	判定不能	正答率(%)	誤答率(%)
8種類の血清中蛋白質で評価						
慢性ストレス	54	51	0	3	(感度) 94.4	0.0
3種類の血清中蛋白質で評価						
慢性ストレス	54	41	8	5	(感度) 75.9	14.8

精神的ストレス指標蛋白質—血清での評価—

ラーニング試験

【主成分分析(3種類で評価)】



バリデーション試験

【主成分分析(3種類で評価)】

