

特集1：職場のメンタルヘルスの新しい視点 — ストレス社会を生き抜く —

メンタルヘルスを支える新たなストレスバイオマーカー

桑野由紀, 勝浦桜子, 増田清士, 棚橋俊仁, 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生体制御医学講座ストレス制御医学分野

(平成22年10月29日受付)

(平成22年11月4日受理)

はじめに

ストレスはうつ病などの心の疾患のみならず、生活習慣病などの多くの疾患のリスクファクターとなり得るとともに、その増悪にも密接に結びついている。また、自殺・うつ病による日本の経済的損失は2009年では年間約2.7兆円に上ると試算されている（厚生労働省）。このため、ストレスによる人的・経済的損失は経済発展を妨げる大きな要因となっており、これからの医療問題における重要な課題の一つといえる。われわれは、精神疾患の早期診断、治療評価を含めたメンタルヘルスに応用できる、新しいバイオメディカル技術の確立を目指した。

あった。1935年にカナダの生理学者 Selye, H. が医学の分野に導入し、「さまざまな外的刺激（ストレスラー）が加わった場合に生じる生体内の歪みと、それに対する生体の防衛（適応）反応」と定義し、ストレス学説を発表した<sup>1)</sup>。ストレス反応を起こすストレスラーは物理的因子（寒冷、高温、放射線、騒音など）、化学的因子（薬物、酸素など）、生物学的因子（感染、花粉など）、心理的因子（試験、仕事、病気、離別などのライフイベント）に大きく分類することができる<sup>2)</sup>。最近では、健康障害に結びつく有害なストレスラーやストレス反応を取り出し、“ストレス”として集約して用いられるようになっている（図1）。

ストレスとは

現代社会においては、ストレス社会と広く言われはじめてから久しい。日常的に使われる“ストレス”は多くの場合、心理社会的なストレスを指すが、もともとストレスという言葉は、物理学や機械工学の分野で「外部から力が加えられた時に物体に生じる歪み」という意味で

ストレスと体の反応

外部からのストレスラーは、視覚・聴覚・痛覚などを介し、大脳皮質で認知・評価される。これらの情報は大脳辺縁系に伝達され、不安や恐怖、怒り、悲しみなどの情動を引き起こす。次に視床下部に伝えられて自律神経系、内分泌系、免疫系の反応を起こす。ストレスによる

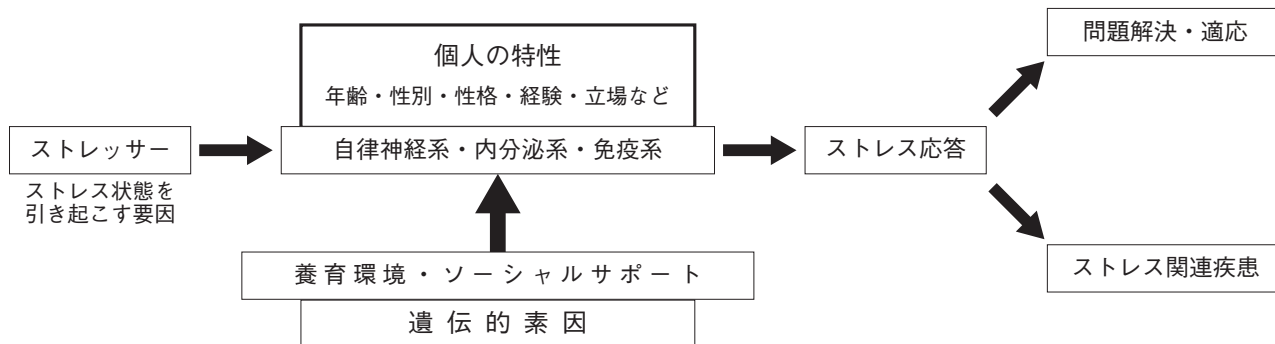


図1. ストレス反応

さまざまな情動興奮は、ノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンなどの神経伝達物質により引き起こされる。アドレナリン、ノルアドレナリンなどのカテコールアミンは交感神経系の興奮時に血液中に分泌され、血圧・心拍数の増加、中枢神経覚醒作用、胃粘膜血流の低下などを起こす。副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin releasing hormone : CRH) は視床下部で産生され、ストレスにตอบสนองし下垂体の門脈中に放出され、視床下部-下垂体-副腎 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis : HPA axis) 軸を活性化して、副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone : ACTH)、コルチゾールの分泌を促し、さらに交感神経系も亢進させる。コルチゾールには、糖新生の促進や免疫反応の抑制作用がある。また、ストレス応答にはフィードバック機能があり、ACTH は CRH 分泌を抑制する。コルチゾールは ACTH, CRH の分泌を抑制し、免疫反応やサイトカイン産生を減衰させる。ストレスの主要経路として、HPA 軸、自律神経系、免疫系、末梢器官における反応の経路およびフィードバック機構の概略を、図2に示す。このように、自律神経系、内分泌系、免疫系は互いに連携してストレスにตอบสนองして、生体の恒常性を保つ<sup>3,4)</sup>。

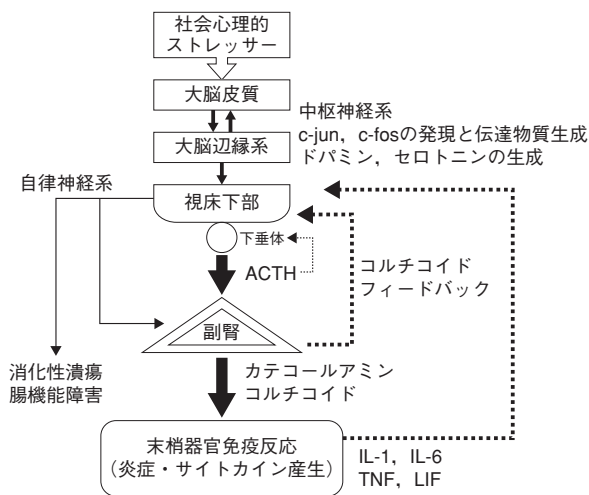


図2. ストレスの主要経路

ストレス関連疾患

社会生活をしていく上で、人は多少に関わらずストレスに直面し、生体内にストレス応答を生じさせる。しかしながら、ストレスの強度もしくは個人の特性によっては、体内の自律神経系・内分泌系・免疫系のホ

メオスターシス機構が破綻し、なんらかの失調や病気が引き起こされる場合がある。主として、ストレスにより精神面の失調が出現すれば、うつ状態や不安神経症を引き起こす可能性がある<sup>5)</sup>。不安や緊張が、胃腸や呼吸器などの自律神経系の支配を受けやすい臓器に影響を与え、機能的消化不良、過敏性腸疾患、胃・十二指腸潰瘍、過換気症候群、自律神経失調症などを起こす。また、ストレスによってカテコールアミン分泌が亢進した結果、高脂血症、動脈硬化、高血圧用の血管障害も促進される (ストレス関連疾患、表1)。

表1. ストレス関連疾患

●胃・十二指腸潰瘍	●慢性関節リュウマチ
●慢性膵炎	●動脈硬化
●潰瘍性大腸炎	●脳梗塞
●狭心症	●摂食障害
●心筋梗塞	●顎関節症
●気管支喘息	●適応障害
●過呼吸症候群	●パニック障害
●アトピー性皮膚炎	●うつ状態
●糖尿病	●社会不安障害
●甲状腺機能亢進症	など

ストレス反応と遺伝子発現

同じストレスに直面しても、個人によってストレスの受け止め方 (認知・評価) は異なっており、ストレス反応の程度に差がある。ストレス関連疾患の病因、ストレスを受け疾患を起こしやすいタイプ、感じているストレスの度合の予測は、非常に重要なテーマであるといえる。これまでに、ストレスと遺伝子発現の関係は強く示唆されており、例えば、拘束ストレス時のラット海馬及び視床下部において、グルココルチコイド受容体遺伝子の発現減少が報告されている<sup>6)</sup>。また、慢性ストレスを与えたマウスの脳において、シナプス塑性マーカーである VGLUT-1, synapsin 1, sinaptophysin, rab3A, 及び activity regulated cytoskeletal protein mRNA レベルの一過性の発現減少が認められた<sup>7)</sup>。そこで、われわれは、ヒトにおいて客観的にストレスを判定する新たなツールとして、個人の持つ末梢血の遺伝子発現に着目した。白血球の遺伝子発現は極めて安定で、かつ大きな個人差があり、環境応答遺伝子等の個人特性を反映している可能性がある<sup>8)</sup>。ヒト遺伝子 (~25,000) の90%以上は、選択的スプライシングによりイントロン・エクソンを選択され、複数の mRNA バリエントを産生

する。限られた遺伝子から生物の多様性を生み出すこの選択的スプライシング機構は、同時に、環境変化（ストレス）に対応して極めて広範囲に遺伝子発現プログラムを変化させることを可能にする。近年、遺伝子発現の網羅的解析技術の発展とともに、エクソン及びイントロンに内在されているスプライシング調節エレメントと、その調節因子の異常による疾患が注目されている。

### 心理的ストレスの指標としての選択的スプライシング

われわれは、医学科4年次CBT試験ストレスを慢性及び急性心理的ストレスとして、健常人の心理的ストレス時の選択的スプライシング反応の変化を、ヒト末梢血の遺伝子発現プロファイリング手法（human exon 1.0 ST array, Affimetrix社）を用い網羅的に解析した。受験者28名（19 males and 9 females, aged 22.7 ± 1.7 years）の協力を得、試験7週間前、1週間前、試験直後、及び試験1週間後での末梢血白血球遺伝子の発現情報、及び精神的・身体的ストレスによる唾液コルチゾル、STAIの不安度のデータ解析を行った。得られたデータはGene spring GX10 およびIngenuity Pathway Analysisを用い統計学的かつ生理的な分析を行った<sup>9)</sup>。試験1週間後を非ストレス時のコントロールとし、CBT試験ストレスによる選択的スプライシングパターンを検討したところ、

- 1) 27遺伝子が急性心理的ストレスに特異的に応答した
- 2) 27遺伝子のうち、21遺伝子においてエクソンスキッピングが認められた
- 3) 3' UTR領域のスキッピングが約半数の遺伝子に認められた

特に、網羅的解析によって、RNA分解経路とp53シグナルに必須のフォスファチジルイノシトール3リン酸関連酵素であるSMG-1遺伝子の3つのエクソン（エクソン33, 53, および63）が心理的ストレス直後でスキッ

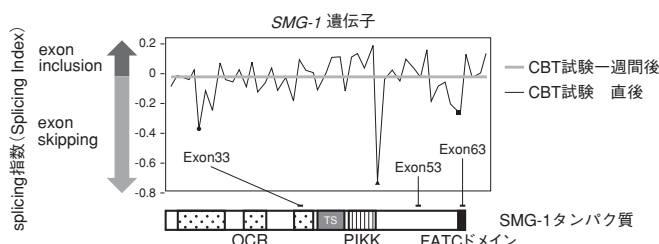


図3. 心理的ストレス（CBT試験）によるSMG-1遺伝子の選択的スプライシング反応（文献9）より改訂

ピングされた（図3）。さらに、リアルタイムRT-PCR法を用い、急性心理的ストレス時にはp53シグナルの活性化に必須な領域（FATCドメイン）を含むエクソン63が欠損したSMG-1 mRNAバリエントが特異的に発現し、ストレス時に細胞内でp53を介したDNA障害経路に変化が起こる可能性を見出した。この結果より、末梢血液中のSMG-1 mRNAバリエントが心理的ストレスのバイオマーカーの一つとなりうる可能性が示唆された。

### おわりに

医学科4年次CBT試験ストレスにより健常人において、特定の遺伝子が共通した選択的スプライシングパターンを示すことを見出し、新たなストレス評価指標として有効である可能性が示唆された。これらの結果より、末梢血を用いた遺伝子プロファイリングがストレス応答の客観的な診断法・評価法のひとつと成り得る可能性や、病気のかかりやすさや薬の効き方等の個人の特性として表れるストレス反応のフェノタイプの特定に利用できる可能性が示唆された。しかしながら、ストレス・精神疾患の分野において、環境適応反応の一つである選択的スプライシングに着目した研究は未だ少ない。今後は、1) 選択的スプライシングを介した心理的ストレス反応の分子基盤の確立、2) 新たな定性的RNAストレスマーカーを用いたストレス・精神疾患の評価診断技術の開発、が期待される。

### 文献

- 1) Selye, H.: A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138 : 32, 1936
- 2) 河野友信 編：ストレス診療ハンドブック. メディカルサイエンスインターナショナル, 東京, 2003
- 3) 上野川修一：からだと免疫のしくみ（入門ビジュアルサイエンス）, 日本実業出版社, 東京, 1996
- 4) 森田恭子, 関山敦生, 六反一仁：ストレスと神経・内分泌ネットワーク. *脳神経*, 57(5) : 397-406, 2005
- 5) Bao, A. M., Meynen, G., Swaab, D. F.: The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res. Rev.*, 57(2) : 531-53, 2008
- 6) Nishimura, K., Makino, S., Tanaka, Y., Kaneda, T., *et al.*: Altered expression of p53 mRNA in the brain

- and pituitary during repeated immobilization stress : negative correlation with glucocorticoid receptor mRNA levels. *J. Neuroendocrinol.*, **16** : 84-91, 2004
- 7) Elizalde, N., Pastor, P. M., Garcia-García, A. L., Serres, F., *et al.* : Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression : chronic mild stress and decreased expression of VGLUT 1. *J. Neurochem.*, **114**(5) : 1302-14, 2010
- 8) 六反一仁, 森田恭子, 増田清士, 河合智子 他 : DNAチップを用いた診断法. *総合臨牀*, **55**(1) : 65-69, 2006
- 9) Kurokawa, K., Kuwano, Y., Tominaga, K., Kawai, T., *et al.* : Brief naturalistic stress induces an alternative splice variant of *SMG-1* lacking exon 63 in peripheral leukocytes. *Neurosci. Lett.*, **484**(2) : 128-32, 2010

## *A novel biomenal tool for assessing psychological stress response*

*Yuki Kuwano, Sakurako Katsuura, Kiyoshi Masuda, Toshihiko Tanahashi, and Kazuhito Rokutan*

*Departments of Stress Science, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

Stress plays an important role in both mental and physical problems. Stressful life events initiate a coordinated physiological process that is produced by interactions between the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, sympathetic nervous system, and immune system. The response to psychological stress varies considerably and depends on a wide range of environmental and genetic factors. Establishment of a new biomenal tool for objectively assessing stress response is required. We focus on high-throughput analysis of gene expression using microarray system to study the complex stress responses.

Alternative splicing (AS) regulates the gene expression program in response to surrounding environment. However, acute psychological stress-initiated AS events have not been documented yet. Academic examinations are one of the brief naturalistic stressors and have been shown to change gene expression in peripheral leukocytes, which is postulated to be involved in the psychological response. Using the GeneChip human exon 1.0 ST array, AS events of 27 genes with splicing indices >1.0 could be detected immediately after the examination among healthy university students. Real-time reverse transcription PCR validated the stress-initiated skipping of exon 63 of *SMG-1* that encodes a phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase crucial for activations of p53-dependent pathways and mRNA decay system. These results indicate that AS mediated regulation of gene expression in response to brief naturalistic stressors in peripheral leukocytes, and suggest the *SMG-1* splice variant as a potential biomarker for acute psychological stress.

Key words : microarray, gene expression, psychological stress, alternative splicing