

授与番号	乙第 123 号
------	----------

論文内容の要旨

Enhancement of miRNA-223-5p and miRNA-30b-5p expression in the saliva of abused children

被虐待児の唾液中における miRNA-223-5p および miRNA-30b-5p の発現亢進

(尾崎 貴子、大島 朋子、三浦 廣行、佐藤 健一)

((岩手医科大学歯学雑誌 第 47 巻、第 1 号、令和 4 年 5 月)

I. 研究目的

児童虐待は世界的に深刻な問題であり、子どもを虐待から守ることは重要である。そのため、客観的に把握するためのバイオマーカーの実用化が求められているものの、客観的な指標や定量的な方法は確立されていない。本研究では虐待の有無による子どもの唾液由来のマイクロ RNA (miRNA) の発現量を比較検討し、虐待の判別につながるバイオマーカーを探索・評価することを目的とした。

II. 研究方法

1. 臨床検体

親からの虐待を受け保護施設に入所している 6-15 歳の児童 (SG) 52 名および非虐待児 (CG) 52 名、を本研究の対象とした。

2. 唾液からの miRNA の抽出と精製

miRNeasy Mini Kit を用いて、唾液より miRNA を精製した。精製した miRNA サンプルに外部コントロールとして miRNA (cel-39-3p) 100 pmol をそれぞれ添加した。

3. MiRNA マイクロアレイ解析

一次スクリーニングとして、7-10 歳の SG 8 名と CG 8 名の miRNA 解析を行った。

4. 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)解析

miRNA の定量解析では、6-15 歳の SG 44 名 (男児 29 名、女児 15 名)、CG 44 名 (男児 21 名、女児 23 名) のサンプルを用いた。miRNA を cDNA に逆転写したのち、qRT-PCR により比較検討した。また、miRNA 発現レベルが虐待の判別につながるバイオマーカーとなるか A receiver operating characteristic (ROC)解析から評価した。

5. 統計解析

SG と CG の有意差はフィッシャーの正確確率検定、一元配置分散分析、テューキー検定ならびに t 検定を用いた。

III. 研究成績

1. プライマリースクリーニングのための miRNA マイクロアレイ解析

miRNA マイクロアレイ解析の結果、6種類の miRNA の発現量は SG で有意に増加した。

2. 6 種類の miRNA の発現量

マイクロアレイ解析で有意な発現を認めた 6 種類の miRNA の発現量を qRT-PCR で比較したところ、hsa-miR-181a-5p、223-5p、30b-5p の発現が SG では有意に高く、性別間で比較した場合においても同様の結果を示した。

3. 被虐待児における 3 つの miRNA の診断精度

3 種の miRNA が虐待の判別につながるバイオマーカーとなる可能性について ROC 解析から検討した。hsa-miR-223-5p は虐待の有無において最も高い診断精度を示したが、感度・特異度は中程度であった。

4. hsa-miR-223-5p と他の 2 種類の miRNA との相関性

診断精度を高めるため、hsa-miR-223-5p と hsa-miR-30b-5p または hsa-miR-181a-5p の相関関係から、これらが補助的なバイオマーカーとなるか検討した。両群共に hsa-miR-223-5p と hsa-miR-181a-5p の発現量の間には正の相関が見られたが、hsa-miR-223-5p と hsa-miR-30b-5p の発現量は SG のみにおいて正の相関があった。

IV. 考察及び結論

我々は児童虐待を客観的に評価するためのツールとして miRNA に着目し、その探索と評価を行った。miRNA アレイおよび qRT-PCR から 3 つの miRNA (hsa-miR-181a-5p、223-5p、30b-5p) が虐待により発現量が上昇することを見出した。これらの miRNA の発現増強は人格障害などの精神疾患につながるという明確な根拠は示されていないものの、アルツハイマー病や神経変性疾患などでの発現増強が認められていることから、虐待により神経変性が誘発される可能性は否定できないと考える。

次に虐待のバイオマーカーとしての診断精度を検討したところ、miRNA hsa-miR-223-5p は最も高い AUC スコアを有したが、その感度および特異性は中程度であった。より高い虐待の診断精度を得るためには、hsa-miR-223-5p と hsa-miR-30b-5p をバイオマーカーとして併用することが虐待の発見につながると推測された。本研究の成果は、児童虐待の早期発見につながり、予防措置の根拠となることが期待されるが、今後、地域や受傷期間などは精査される必要があるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査	黒瀬 雅之	教授	(生理学講座 病態生理学分野)
副査	佐藤 健一	教授	(口腔顎顔面再建学講座 歯科麻酔学分野)
副査	石河 太知	教授	(微生物学講座 分子微生物学分野)

主論文要約

急増する虐待から子供の命を守る社会作りが加速しているが、育児に虐待が埋もれ表在化しにくい現状が子供の出すシグナルをかき消し発見を困難としている。その背景には、虐待相談件数の急激な増加に対する十分ではない人材確保に伴う拡大する需給ギャップがある。さらに、この10年間で物理的痕跡を伴わない心理的虐待の割合が急増しており、核家族化に伴うシグナルを感知する地域コミュニティの“目”が失われる中で、虐待の第1発見者となりやすい医療者は、明確な証拠が見いだせず虐待を見逃してしまい、自責の念に駆られている現状がある。

ネグレクト・身体的・性的・心理的虐待などが児童虐待に含まれ、あらゆるライフステージに渡って様々な機能に影響を及ぼす事実が後ろ向き調査によって明確に示されてきた。虐待を受ける幼児期・学童期のステージに幼児童が出す生体機能変調のシグナルは、前向きの臨床研究の構築の困難さから明確ではない。そこで虐待ストレス由来の機能変調の検出を目的として唾液内 miRNA を対象にバイオマーカーの候補の探索を行うことを目的とした。

児童相談所入所者群（ストレス群）と、非虐待群（コントロール群）の唾液を使用し、miRNeasy Mini Kit を用いて miRNA を抽出・精製した。1次スクリーニングでは、有意な発現増加が6種見られ、2次スクリーニングでは、3種類の miRNA (miR-181a-5p、miR-223-5p、miR-30b-5p) が有意な増強を示した。ROC 解析から、両群共に hsa-miR-223-5p と hsa-miR-181a-5p の発現量の間には正の相関が見られたが、hsa-miR-223-5p と hsa-miR-30b-5p の発現量はストレス群のみにおいて正の相関があった。

本研究では、血液を用いた miRNA 抽出ではなく、非侵襲的手法である唾液採取から、虐待由来の生体機能変調のシグナルである miRNA の増強の検出に成功している。これらの miRNA を対象としたバイオマーカーの実用化には、今後コホートでのさらなる試料収集・解析が必要であるが、社会的な課題として顕在化している児童虐待の早期発

見・予防に繋がることが期待される。

上記より、

虐待ストレスにより miRNA-223-5p、miRNA-30b-5p などの miRNA の有意な増加が明らかとなり、虐待の早期発見に繋がるバイオマーカーとなり得ることが期待される。本研究の成果は、児童虐待の早期発見・予防に繋げるが期待され、本論文は社会的意義が非常に高いものであり、学位論文に値すると評価した。

試験・試問結果の要旨

最初に本論文の目的・概要について説明がなされた。次いで、研究方法・結果並びにその考察と今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問：miRNA-223-5p、miRNA-30b-5p などの miRNA は疾患のバイオマーカー候補となっているのか？

答：文献的には miRNA-223-5p は敗血症などの炎症時に分泌されるとの報告があり、同様に miRNA-30b-5p は、炎症や乳がん検出されるとの報告がある。しかしながら、バイオマーカーとしては確立されていない。

問：本研究では、虐待を受けた児童を対象としている。虐待の有無や程度など、どのようにグループ分けをしたのか？ストレスは一概には一定ではなく、特に急性期と慢性期で異なるのでは？

答：ストレスが急性か慢性かについては、本研究で被験者と対象とした児童では明確に区分することができなかった。理由として、最後の虐待事象からサンプル採取までの期間についての情報が開示されなかったためである。一般的に、急性ストレスによる障害は受傷後3日から一月で発症するとされているので、児童福祉法の原則から考えるとサンプルには急性ストレスをうけている児童が含まれていることが考えられる。今後は、受傷からサンプル採取までの期間についての情報や、急性期ストレスマーカーを用いて、被験者の群分けを行っていきたいと考える。

問：6 - 15 歳の個体での検討だが、成長期の子供なのでもっと年齢を絞った方がいいのではないか。

答：年齢を詳細に区分する必要性はあると考える。しかしながら、対象となる虐待を受けた児童では、年齢を揃えてサンプル数を確保・比較することが困難であり、本研究では児童のサンプルに限定し、年齢的な有意差がないようにして対応している。性別や年齢などは影響を与える因子である可能性がありますので、今後の課題とさせていただきます。

問： 相関解析をすることによる理由は何があるのか。

答： miRNA-223-5p は ROC 曲線 で高い AUC 値を示したが、Akobeng の論文では診断に用いられるバイオマーカーとして AUC が 90%以上で高い、80~90%で中等度、80%以下では低いと報告されている。本研究の結果では AUC が 90%に達している miRNA もあるが、感度と特異度がともに 0.8 を上回っていなかったことから、診断精度を向上させるために他の miRNA を併用することを想定した。感度と特異度のカットオフ値の設定は独自に行うことも可能であるが、虐待に関する社会的な要望から考えると、診断精度を向上させ、偽陽性の割合を減らすために他の miRNA を併用し、感度と特異度の不足を補う必要があるものとする。相関解析は miRNA223-5p の発現増強と異なるメカニズムで発現している miRNA を選択するために行った。両者が同様のメカニズムで発現している場合、異なるバイオマーカーとしての役割が弱いものとする。このため、無刺激では相関がなく、ストレス受傷時に発現が相関するものを第二のバイオマーカーとして選択した。

問： cel-39-3p でノーマライゼーションしているが、他の miRNA ではだめなのか。

答： 内部標準を用いた解析もあるが、2002 年の Vandesompele ら、2008 年の Bustin らの報告において内部標準を用いる際は複数設定することが推奨されている。このため、本研究では内部標準は用いずに外部標準として線虫の cel-39-3p を用いた。

問： AUC 曲線の数値は 0.79 で区切ってはだめなのか。

答： 2007 年の Akobeng の論文では診断に用いられるバイオマーカーとして AUC が 0.9 以上で高い、0.7~0.9 で中等度、0.7 以下では低いと報告されている。この報告に準じると、0.79 で区切ることはできないと考える。

問： 本研究の今後の展望は？

答： 今回の結果を踏まえて、miRNA が新しいストレスバイオマーカーとして有用であるか、どのようなメカニズムでこれら miRNA が発現するのか明らかにするにはさらなる検討が必要であるとする。また、特に小児に用いるバイオマーカーは、採取が簡単で信頼性が高くある必要がある。我々がサンプルを収集していた時期より、現在は日本でも海外のように小児や家庭内での問題を解消すべく、少しずつカウンセリング文化が発展してきているので、小児・保護者の協力を根気よく促し、今後はサンプル数を増やして虐待の種類別や年齢別の比較や、同個体の唾液サンプルと血液サンプルを用いて miRNA 量の発現量を調べ、実用化にむけて検証していくことが理想である。