

母子分離ストレスによるマウス脳由来ゲノム DNA のメチル化変化

岡野 雅 春 小方 彩 乃 網 干 博 文 近 藤 真 啓

日本大学歯学部法医学講座

要旨:

目的: ヒトの児童虐待被害によってゲノム DNA における CpG 配列のメチル化に変化が生ずることが報告され、虐待の存否を示すバイオマーカーとしての利用が期待されている。また、マウスの母子分離処置は、児童虐待ストレスとメチル化変化との関連を検証するために有用な実験モデルである。本研究では、マウスの母子分離処置が、ヒト精神神経疾患関連遺伝子のマウスホモログである *Myt1l*, *Grin1* および *Slc6a4* のメチル化率および転写産物量に与える影響を明らかにすることを目的とした。

方法: C57BL/6J 妊娠マウスの同腹仔の半数について、出生翌日から2週間、毎日2時間母子分離処置を行った。その後、マウスの扁桃体に由来する DNA および mRNA を用いて、メチル化感受性高解像度融解分析法および RT-qPCR 法により、メチル化率(Df 値)および転写産物量を測定した。

結果: 仔マウスの体重について、実験群と対照群との間で有意差は認められなかった。解析を行った3遺伝子のうち、*Myt1l* の Df 値は、対照群(-26.7 ± 0.1)と比較して実験群(-25.3 ± 0.4)で有意に高かった($p < 0.05$)。*Myt1l*, *Grin1* および *Slc6a4* の転写産物量は、両群間において有意差は認められなかった。

結論: *Myt1l* 遺伝子における CpG 配列のメチル化は、ヒトの虐待被害とマウスの母子分離ストレスとの間で共通して生じることが示唆された。

キーワード: マウス母子分離実験, DNA メチル化, MS-HRM 法, 児童虐待

Altered DNA methylation in mouse brain following maternal separation stress

Masaharu Okano, Ayano Ogata, Hirofumi Aboshi, Masahiro Kondo

Department of Legal Medicine, Nihon University School of Dentistry

Abstract: Purpose: The methylation of CpG dinucleotides is an epigenetic modification that plays essential roles in regulating gene expression. Recent studies have reported altered DNA methylation in several human genes in neuropsychiatric disorders associated with child abuse, suggesting that DNA methylation is a biomarker candidate to estimate child abuse. Maternal separation (MS) in mice is an excellent experimental model to elucidate the relationship between stress in child neglect and DNA methylation status. In this study, we analyzed methylation levels (Df values) of 3 genes, *Myt1l*, *Grin1*, and *Slc6a4*, associated with child abuse and neuropsychiatric disorders.

Methods: C57/BL6J litter mates were exposed to MS for 2 hours over 14 consecutive days (MS group), or left undisturbed (control group). Methylation status of genomic DNA and transcription levels of mRNA extracted from amygdala of mice in both groups were measured using the methylation-specific high-resolution melting (MS-HRM) method and RT-qPCR method, respectively.

Results: Df value of *Myt1l* gene in the MS group (-25.3 ± 0.4) was significantly higher than that in the control group (-26.7 ± 0.1 , $p < 0.05$). No significant difference in the transcription levels of 3 genes was observed between MS group and control group.

Conclusion: MS-dependent change of CpG methylation in *Myt1l* is useful as a biomarker for experienced child abuse.

Keywords: maternal separation, DNA methylation, MS-HRM, child abuse

(受付: 令和4年10月5日)

責任著者連絡先: 近藤真啓

日本大学歯学部法医学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8129

FAX: 03-3219-8343

E-mail: kondou.masahiro@nihon-u.ac.jp

緒 言

本邦における児童虐待の通告件数は年間 10 万件を超え、被虐待児が成人後に精神疾患を発症するまたは自殺する例も多数報告されている¹⁾。しかし、虐待被害の存否の証明は、被虐待者の訴えや身体所見が確認できない限り困難である²⁾。このため、自殺遺体や幼児を含めた被虐待者に対する客観的な評価法の開発が求められている。

エピジェネティクスは、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を調節する生体機構と定義され、ゲノム DNA における CpG 配列のメチル化などが含まれる。CpG 配列のメチル化の特徴として、生育環境³⁾および喫煙⁴⁾などの生活習慣が原因となって生じることが知られている。また、一度生じた CpG 配列のメチル化は、細胞分裂を経た娘細胞にも受け継がれるため長い期間維持され⁵⁾、表現型に様々な影響を与える。すなわち、遺伝子上流のプロモーター領域にて CpG 配列のメチル化が生じた場合は、遺伝子の転写を抑制する⁶⁾。一方、遺伝子内部で起こる CpG 配列のメチル化は、遺伝子の選択的スプライシングによるバリエーションの生成を変化させることが報告されている⁷⁾。このように CpG 配列のメチル化は、生活環境や表現型と関連し、かつ保存性が高い特徴を有しているため、虐待の存否を証明するためのバイオマーカーとしての特長を備えている。

近年、網羅的な CpG 配列のメチル化解析により、中枢神経系の主要なシナプス伝達に関わる遺伝子 glutamate receptor, ionotropic N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 1 (GRIN1) や神経分化に関わる転写因子 myelin transcription factor 1-like (MYT1L) 近傍の CpG 配列のメチル化率が虐待被害者において亢進していることが明らかにされた³⁾。また、セロトニントランスポーターをコードし、うつ病発症と関連する遺伝子 solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4)⁸⁾のメチル化についても、幼少期の生育環境の良不良との関連性が報告された⁹⁾。これらの報告は、CpG 配列のメチル化がバイオマーカーとして有力な候補であることを示唆しているが、ヒトの被虐待者の年齢および性別は多様であり、虐待の種類(ネグレクトと身体的虐待など)やその被害の程度は個々の事例によって異なる¹⁰⁾。バイオマーカーとして利用可能か、またその適応範囲について検討するには、一定数のサンプルを用いた基礎的な研究が必要である。

マウスを用いた母子分離は、児童虐待のうちネグレクトの実験モデルとされている¹¹⁾。現在までに、母子分離ストレス実験によって、ストレスへの曝露の指標として血中コルチゾール値の上昇¹²⁾、糖質コルチコイド受容体遺伝子 glucocorticoid receptor (GR) (Nr3c1)¹³⁾や抗利尿ホルモン遺伝子 arginine vasopressin (AVP)¹⁴⁾における

CpG 配列のメチル化率の変化が報告されている。しかし、ヒトの虐待被害にて報告された感受性領域について、マウスモデルでメチル化解析が実施されたことはない。これらのことから、本研究では、マウスの母子分離処置によって生じる幼少期のストレスが、ヒト虐待被害感受性遺伝子のマウスホモログである Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子のメチル化率および転写産物量に与える影響を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 実験動物の母子分離処置

C57BL/6J 妊娠マウス(日本エスエルシー, 静岡)3 匹 (dam A, B および C) が出産した仔マウス (4.6 g) を実験に用いた(表 1)。各母マウスの同腹仔をおよそ半数に群分けし、母子分離処置の実験群および対照群とした。実験群の仔マウスは、出生日の 1~14 日後までの 2 週間、毎日 11~13 時の 2 時間を母親とは別のケージに入れた(母子分離処置)。この際、仔マウスは、同腹仔ごとに同一のケージで飼育し、保温材によって体温の低下を防いだ。対照群の仔マウスは、常に母マウスと同じケージで飼育した。両群の一部の個体については、2 週間、隔日に体重を測定した。母子分離処置を終えた生後 15 日齢の仔マウス 19 匹は、インフルラン (Mylan, PA, USA) による吸入麻酔後に、心臓から全採血によって安楽死処置された。その後、脳を摘出し、扁桃体を採取した。なお、本研究に際して、所属施設の動物実験委員会の承認を得た(承認番号: 第 AP21DEN017-2 号, 承認年月日: 2022 年 2 月 25 日)。

2. プライマーの設計

Weder ら³⁾によって行われたヒトの虐待被害者を対象とした先行研究では、Infinium Human Methylation 450 BeadsChip (illumina, CA, USA) を用いて、MYT1L および GRIN1 遺伝子近傍の CpG 配列に生ずるメチル化率の変化が明らかにされた。これに基づいて、マウスにおいて、相同遺伝子近傍の CpG 配列を同定し、メチル化感受性高解像度融解分析 (Methylation-Specific High Resolution Melting, MS-HRM)¹⁵⁾の対象範囲とした。すなわち、我々はまず、先行研究においてメチル化変化が同定されたヒトの Infinium Human Methylation 450

表 1 使用したマウスの数

dam	Groups		Application
	Maternal separate	Control	
A	3	4	MS-HRM
B	2	2	
C	4	4	RT-qPCR

BeadsChipのプロープ配列を, HumanMethylation450 v1.2 Manifest File¹⁶⁾から取得した。また, National Center for Biotechnology Information (NCBI)¹⁷⁾のマウスゲノム配列 (Accession No. NC_000078) から, 第12番染色体上の *Myt1l* および第2番染色体上の *Grin1* 遺伝子の塩基配列を取得した。Clustal Omega (EMBL-EBI) を用いて, ヒトプロープ配列とマウスゲノム配列とのアライメントを作成した (図1)。また, Okada ら⁸⁾による

ヒトの *SLC6A4* 遺伝子とうつ病発症との関連性の報告を参照して, マウス第11番染色体上の *Slc6a4* 遺伝子の塩基配列を取得した。次に, SEQUENCHER Ver. 5.0.1 (Gene Codes, MI, USA) を用いて, これら3つの遺伝子の増幅領域内に複数の CpG 配列が含まれるように MS-HRM 解析用プライマーを設計した (図1および表2)。設計したプライマーの位置, 長さならびに含まれる CpG 部位の数は表2に示した。

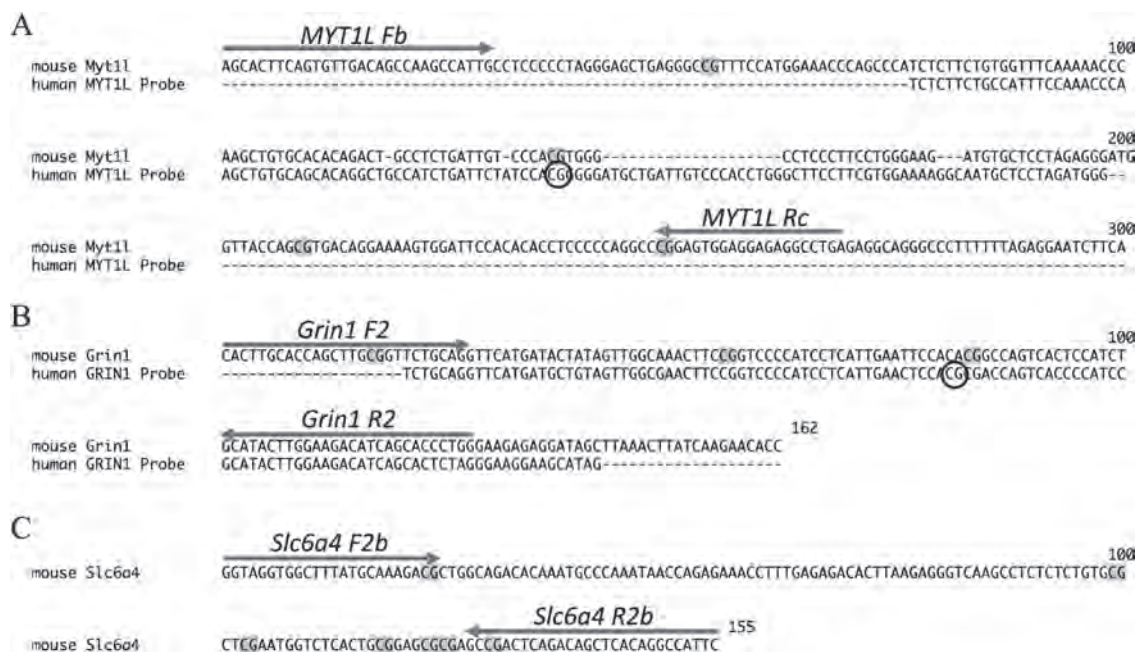


図1 MS-HRM 解析の対象とした CpG 配列

図中の矢印は設計したプライマーの位置を示した。マウス塩基配列内の CpG は灰色に描出した。Myt1l (A) および Grin1 (B) は, ヒトの Infinium HumanMethylation450 BeadChip のプロープ配列とのアライメントを示し, ヒトプロープ配列の解析対象 CpG に丸を付した。

表2 使用したプライマー

Primer name	Primer nucleotide sequence (5'-3')	Gene	Position	Length	Number of CpGs (Primer Site)	Application
MYT1L_Fb	AGTATTTTAGTGTGATAGTTAAGTTATTG	Myt1l	18th intron	244 bp	4 (1)	
MYT1L_Rc	CAAACCTCTCTCCACTCCG					
SLC6A4_F2b	GGTAGGTGGTTTTATGTAAAGACG	Slc6a4	1st intron	155 bp	5 (2)	MS-HRM
SLC6A4_R2b	AAATAACCTATAAACTATCTAAATCGAC					
GRIN1_F2	TATTTGTATTAGTTTGGGTTTTGTAG	Grin1	6th intron	128 bp	3 (1)	
GRIN1_R2	CCAAAATACTAATATCTTCCAAATATAC					
GAPDH_qPCR_F	GCTCACTGGCATGGCCCTCCGTG	Gapdh	5th exon	200 bp	-	
GAPDH_qPCR_R	TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA		6th exon			
MYT1L_qPCR_F	TGTCTGGATGCCCGCACAAAGA	Myt1l	10th exon	130 bp	-	RT-qPCR
MYT1L_qPCR_R	CTTCTGTGCGAGTTCCTGTGTGC		11th exon			
SLC6A4_qPCR_F	GTTGATGCTGCGGCTCAGATCT	Slc6a4	7th exon	141 bp	-	
SLC6A4_qPCR_R	GAAGCTCGTCATGCAGTTCACC		8th exon			
GRIN1_qPCR_F	CCTTTCAGAGCACACTGTGGCT	Grin1	12th exon	164 bp	-	
GRIN1_qPCR_R	CCAGGAAAACCATATGGCAGAG		13th exon			

3. 組織からの DNA 抽出およびバイサルファイト (BS) 処理

dam A および dam B の仔マウス計 11 匹の扁桃体から NucleoSpin DNA Forensic (タカラバイオ, 草津) を用いて, DNA を抽出した。これらの DNA 溶液を EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, CA, USA) により, プロトコールに従い BS 処理を行った。すべての DNA は, BS 処理後の最終濃度が $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ となるように M-Elution Buffer へ溶出した。

4. スタンダードメチル化 DNA の調製

スタンダードメチル化 DNA の調製には, 完全 (100%) メチル化 DNA である Universal Methylated Mouse DNA Standard (Zymo Research) に加えて, Mouse Genomic DNA (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) から REPLI-g Mini Kit (Qiagen, CA, USA) を用いて自ら作製した完全非 (0%) メチル化 DNA を用いた。すなわち, DNA テンプレートを $5 \mu\text{L}$, Buffer D1 を $5 \mu\text{L}$ 加え, 室温で 3 分間インキュベートし, これに REPLI-g Mini Reaction Buffer を $29 \mu\text{L}$ および REPLI-g Mini DNA Polymerase を $1 \mu\text{L}$ 加え, 30°C で 15 時間インキュベートした。 65°C で 3 分間の熱処理により DNA 合成酵素を失活させた溶液から, NucleoSpin DNA Forensic により DNA を抽出し, TE Buffer で溶出した。増幅後 DNA の濃度は, NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて定量した。増幅後 DNA をテンプレートとして, 上記の DNA 増幅工程をもう一度繰り返し, 2 回目に精製した DNA を 0% メチル化 DNA とした。次に, 100% メチル化および 0% メチル化 DNA を上述の手順によって BS 処理した。

5. ゲノム DNA の MS-HRM 反応

ゲノム DNA のメチル化状態を解析するために, 設計したプライマーと MeltDoctor HRM Master Mix (Applied Biosystems, MA, USA) による MS-HRM 反応を QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて実施した。まず, BS 処理した DNA テンプレート ($20 \text{ ng}/\mu\text{L}$) を $1 \mu\text{L}$, MS-HRM プライマー ($5 \mu\text{M}$) を各 $1.2 \mu\text{L}$, MeltDoctor HRM Master Mix を $10 \mu\text{L}$ および滅菌蒸留水を $6.6 \mu\text{L}$ 加え, 計 $20 \mu\text{L}$ とした。そして, 95°C で 10 分間のプレヒーティングの後, 95°C で 15 秒, 60°C で 1 分の PCR 反応を 40 サイクル行った。最後に, Melting 反応として 95°C で 10 秒, 60°C で 1 分保持した後, $0.025^\circ\text{C}/\text{秒}$ で 95°C まで上昇させている間に解離する DNA から放出された蛍光強度の推移を記録した。すべての MS-HRM 反応は, 2 回繰り返して行った。

6. MS-HRM データの解析

Melting 反応において得られた各サンプルにおける融解曲線をもとに, HRM Software Ver. 3.2 (Applied

Biosystems) を用いてサンプルのメチル化状態を同定した。具体的には, 各サンプルの融解曲線の推移から, 0% メチル化 DNA の蛍光強度を 0 とした際の各サンプルの差異 (Difference of Aligned Fluorescence (Df) 値) を算出した。

7. 組織からの RNA 抽出および RT-qPCR 解析

dam C の仔マウス計 8 匹の扁桃体から Trizol Reagent (Invitrogen, MA, USA) を用いて, total RNA を抽出した。その後, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡, 大阪) を用いて, DNase I によりゲノム DNA を除去した後に, total RNA $1 \mu\text{g}$ から逆転写酵素反応によって cDNA を合成した。Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子の転写産物量は, 各遺伝子に設計した RT-qPCR プライマーと, PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて QuantStudio 5 リアルタイム PCR システムにより実施した。すなわち, cDNA を 5 ng , フォワードおよびリバースプライマー ($5 \mu\text{M}$) を各 $2 \mu\text{L}$, $2 \times$ PowerUp SYBR Green Master Mix を $10 \mu\text{L}$, 滅菌蒸留水を加え, 計 $20 \mu\text{L}$ の反応液を準備した。そして, 95°C で 10 分間のプレヒーティングの後, 95°C で 15 秒, 60°C で 1 分間の反応を Grin1 および Myt1l 遺伝子では 40 サイクル, Slc6a4 遺伝子では 45 サイクル実施した。すべての qPCR 反応は 2 回繰り返して実施し, サイクリング反応の後に解離反応によって各サンプルの増幅産物が単一サイズであることを確認した。そして, QuantStudio Design and Analysis Software Ver. 1.5.1 (Applied Biosystems) を用いて, 内在性コントロールとした Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (Gapdh) に対する各サンプルの相対的遺伝子発現量を算出した。RT-qPCR に使用したプライマーは表 2 に示した。

結 果

1. マウスの母子分離処置

実験群のマウスに削瘦などの異常所見は認められなかった。また, 実験群と対照群の仔マウスの体重を 2 週間, 隔日に計測したところ, 両群での差は認められなかった (表 3)。

2. ヒト BeadsChip プローブ配列とマウスゲノム DNA 配列とのアライメント

ヒトの MYT1L および GRIN1 遺伝子の Infinium Human Methylation450 BeadsChip プローブ配列と, マウスゲノム DNA 配列とのアライメントを行った。この結果, マウス Myt1l 遺伝子の第 16 イントロンと Grin1 遺伝子の第 6 イントロンに, ヒト BeadsChip プローブ配列との類似性が高い (82.3 および 89.3%) 配列が認められた。また, これらの領域において, ヒト BeadsChip プローブ配列のメチル化検出対象の CpG 配列と近傍のマウス

の遺伝子領域に、CpG配列が位置していた(図1)。

3. マウスゲノム DNA におけるメチル化状態

母子分離処置による仔マウスの扁桃体における Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子のメチル化状態について MS-HRM 解析を行った(図2)。この結果、Myt1l 遺伝子の Df 値は、対照群(-26.7±0.1)と比較して実験群(-25.3±0.4)において有意に高かった(p<0.05)。また、Grin1 および Slc6a4 遺伝子の Df 値は両群間で有意な差は認められなかったが、どちらも実験群の平均 Df 値が対照群よりも高い傾向にあった。

4. Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子の転写産物量

母子分離処置による仔マウスの扁桃体における Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子の転写産物量を qPCR により解析した(図3)。この結果、すべての遺伝子の転写産物量は、実験群と対照群との間に差が認められなかった。

考 察

CpG配列のメチル化はゲノム DNA 上に付加された保存性の高い化学修飾であり、法医鑑定における年齢推定^{18,19}や体液の種類同定²⁰への利用が検討されている。このことから、児童虐待においても、被害の存否を CpG配列によって客観的に評価することが期待できる。本研究は、ヒトの児童虐待とマウスの母子分離ストレスにおいて、塩基配列の比較から相同な感受性領域を推定し、MS-HRM法によりメチル化率を測定した初めての試みである。そして、両者に共通してメチル化率に変化が生ずる CpG配列を1カ所見出した。

ヒトにおいて、幼少期に虐待被害を経験した自殺者での Infinium HumanMethylation450 BeadsChip を用いた網羅的なゲノム DNA メチル化プロファイリングが試みられた。この結果、MYT1L および GRIN1 遺伝子など数種類の遺伝子にメチル化率の変化が認められている³。本研究では、これら2種類の遺伝子について、マウスの

相同遺伝子内の CpG配列を含むようにプライマーを設計し、MS-HRM法による DNA メチル化解析を行った。その結果、マウスの Myt1l 遺伝子において、母子分離ストレスによって有意な DNA メチル化の亢進が認められた。実験群マウスは、分離時間中に母乳を摂取できておらず、低栄養状態であったことが DNA メチル化亢進に影響を与えたことが考えられたが、対照群との間に体重の差は認められなかった。これらのことから、ヒトとマウスにおいて、Myt1l 遺伝子領域の相同な CpG配列に、虐待ストレスによりメチル化変化が生ずることが示唆された。しかし、Myt1l 遺伝子のわずかに1カ所の CpG配列であるため、当遺伝子の他の領域の CpG配列や、頭数を増やすなどのさらなる解析が望まれる。今後は、本解析法を用いて、ヒトの情報をもとにした他の候補遺伝子での解析をマウスモデルにて実施し、複数遺伝子を利用した虐待バイオマーカーを確立することが期待される。

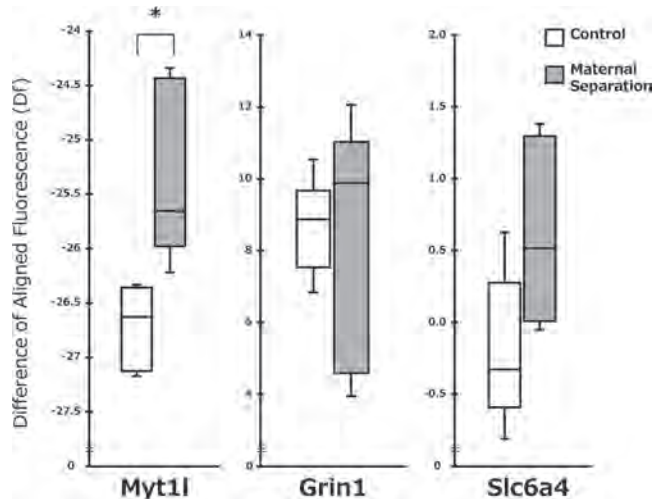


図2 3遺伝子における CpG配列のメチル化率(MS-HRM解析) welchのt検定にて値の差異の有意性を検定した。(*p<0.05)

表3 マウスの体重

Postnatal day	Maternal separate (g)	Control (g)
2	1.4	1.3
4	2.0	2.2
6	3.0	3.0
8	4.0	4.0
10	4.6	4.8
12	5.2	5.2
14	5.2	5.5

両群の体重に有意差は認められなかった。

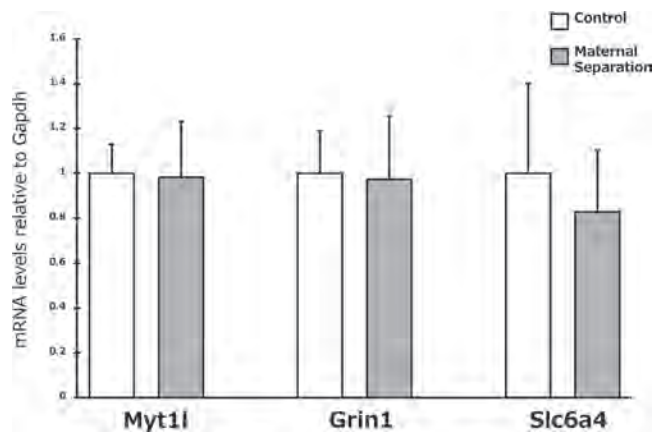


図3 3遺伝子における転写産物量(RT-qPCR解析)

ヒトにおいて、MYT1L 遺伝子は Zinc Finger domain を複数有した転写調節因子のひとつであり、脳の発達、特に神経分化を促進する²¹⁾。これまでに、MYT1L 遺伝子の重複が知的障害および自閉スペクトラム症の、欠失が統合失調症の発症とそれぞれ関連することが報告されている^{22,23)}。本研究において、Myt1l 遺伝子の第 16 イントロンに存在する CpG 配列のメチル化率が母子分離ストレスにより上昇していた。この部位は転写産物量の調節に関わる遺伝子上流のプロモーター領域ではなく、RT-qPCR による解析において遺伝子の転写産物量に有意差は認められなかった。一方で、Myt1l 遺伝子は、選択的スプライシングを受けて、複数のバリエーション (Accession No. NM_001093775) を形成することが推定されている興味深い分子である。今後は、Myt1l 遺伝子の機能的な観点から、DNA のメチル化率に変化が生ずることの生物学的な意義を検討する必要がある。また、その他の 2 種類の遺伝子はどちらも CpG 配列のメチル化率に変化は認められず、各々の転写産物量にも有意な差は認められなかった。母子分離処置の様々な条件を検討し、仔マウスが曝露されるストレス量を増やした場合には、これらの遺伝子の DNA メチル化率および転写産物量がどのように変化するかのかの解明が期待される。

母子分離実験は、1 日当たりの母子分離時間の長さや処置を行う発育段階など様々な実施方法が報告されている²⁴⁾。1 日当たりの分離時間は、10 分～1 時間の短期間母子分離 (Brief maternal separation) や 1～8 時間の長期間母子分離 (Prolonged maternal separation) および哺乳時以外を常時分離する母子剥奪 (Maternal Deprivation) の 3 種類に分けられる。また、処置を行う発育段階は、P0～P12-14 を低反応性期間 (Hypo-responsive period) および P12-14～P21-28 (離乳期) を高反応性期間 (Hyper-responsive period) と定義されることがある。これらの条件の違いによって、仔マウスが曝露されるストレス量も変化すると考えられるが、母子分離ストレスの程度と DNA メチル化量との関連についての情報はいまだ報告されていない。ヒトにおいて、DNA メチル化の変化量から被虐待児におけるネグレクト被害の重症度も評価できれば、極めて有用な分子生物学的指標となる。本研究では、1 日当たり 2 時間の長期間母子分離、なおかつ、P0～P14 の低反応性期間に実施した。この結果、有意差が認められた Myt1l 遺伝子において、母子分離処置によって生じた Df 値の差は 1.4 であった。この Myt1l 遺伝子の Df 値の差は、他の母子分離条件下にて曝露されるストレス量で異なる可能性がある。今後は、1 日当たりの母子分離時間の長さや処置を行う発育段階を検討し、ストレスの曝露量と DNA メチル化の変化量との相関の有無を明らかにすることで、DNA メチル化率の変化に基づいたヒトにおけるネグレクト被害の

存否を示す分子生物学的な指標の開発へつなげたい。

結 論

本研究でのマウスの母子分離実験から、以下の結論が得られた。

1. 塩基配列のアライメント解析により、ヒトの虐待被害に感受性を示した MYT1L および GRIN1 遺伝子内の CpG 配列に相当する部位を、マウスの相同遺伝子内に同定した。
2. 母子分離処置によって、Myt1l 遺伝子の第 16 イントロンに存在する CpG 配列のメチル化率が有意に上昇した。
3. 母子分離処置によって、Myt1l, Grin1 および Slc6a4 遺伝子の転写産物量に変化は認められなかった。

Myt1l などの一部の遺伝子における CpG 配列のメチル化は、ヒトの虐待被害とマウスの母子分離ストレスとの間で共通することが示唆された。

なお、本研究は、JSPS 科研費 JP21K21124、令和 3 年度日本大学歯学部佐藤研究費および令和 4 年度日本大学歯学部総合歯学研究費 (B) の助成を受けた。

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 警察庁. 令和 3 年における少年非行、児童虐待及び子供の性被害の状況 (警察庁生活安全局少年課) (令和 4 年 3 月). <https://www.npa.go.jp/publications/statistics/safetylife/syonen.html> (2022 年 12 月 20 日アクセス)
- 2) 佐藤喜宣 (2008) 臨床法医学からみた子ども虐待. 日本新生児看会誌 14, 2-5.
- 3) Weder N, Zhang H, Jensen K, Yang BZ, Simen A, Jackowski A, Lipschitz D, Douglas-Palumberi H, Ge M, Perepletchikova F, O'Loughlin K, Hudziak JJ, Gelernter J, Kaufman J (2014) Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 53, 417-424.e5.
- 4) Tsai PC, Glastonbury CA, Eliot MN, Bollepalli S, Yet I, Castillo-Fernandez JE, Carnero-Montoro E, Hardiman T, Martin TC, Vickers A, Mangino M, Ward K, Pietilainen KH, Deloukas P, Spector TD, Vinuela A, Loucks EB, Ollikainen M, Kelsey KT, Small KS, Bell JT (2018) Smoking induces coordinated DNA methylation and gene expression changes in adipose tissue with consequences for metabolic health. *Clin Epigenetics* 10, 126.
- 5) Kass SU, Pruss D, Wolffe AP (1997) How does DNA methylation repress transcription?. *Trends Genet* 13, 444-449.
- 6) Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635-638.
- 7) Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer

- S (2011) CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479, 74-79.
- 8) Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Kataoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Kokubo Y, Mimura M (2014) The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J Psychiatr Res* 53, 47-53.
- 9) Beach SRH, Brody GH, Todorov AA, Gunter TD, Philibert RA (2010) Methylation at SLC6A4 is linked to family history of child abuse: an examination of the Iowa Adoptee sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B, 710-713.
- 10) 厚生労働省. 子ども虐待による死亡事例等の検証結果等について(第16次報告)(社会保障審議会児童部会児童虐待等要保護事例の検証に関する専門委員会)(令和2年9月). https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000190801_00001.html(2022年9月15日アクセス)
- 11) George ED, Bordner KA, Elwafi HM, Simen AA (2010) Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neurosci* 11, 123.
- 12) Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T (2014) Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci* 8, 166.
- 13) Turecki G, Meaney MJ (2016) Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: A systematic review. *Biol Psychiatry* 79, 87-96.
- 14) Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmuhl Y, Fischer D, Holsboer F, Wotjak CT, Almeida OF, Spengler D (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 12, 1559-1566.
- 15) Wojdacz TK, Dobrovic A (2007) Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 35, e41.
- 16) Illumina. Infinium HumanMethylation450K v1.2 Product Files. https://jp.support.illumina.com/downloads/infinium_humanmethylation450_product_files.html. (2022年9月15日アクセス)
- 17) NIH. The National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (2022年9月15日アクセス)
- 18) Kondo M, Aboshi H, Yoshikawa M, Ogata A, Murayama R, Takei M, Aizawa S (2020) A newly developed age estimation method based on CpG methylation of teeth-derived DNA using real-time methylation-specific PCR. *J Oral Sci* 63, 54-58.
- 19) Ogata A, Kondo M, Yoshikawa M, Okano M, Tsutsumi T, Aboshi H (2022) Dental age estimation based on DNA methylation using real-time methylation-specific PCR. *Forensic Sci Int* 340, 111445.
- 20) Fujimoto S, Hamano Y, Ichioka K, Manabe S, Hirai E, Ogawa O, Tamaki K (2021) Rapid semen identification from mixed body fluids using methylation-sensitive high-resolution melting analysis of the DACT1 gene. *Leg Med (Tokyo)* 48, 101806.
- 21) Matsushita F, Kameyama T, Kadokawa Y, Marunouchi T (2014) Spatiotemporal expression pattern of Myt/NZF family zinc finger transcription factors during mouse nervous system development. *Dev Dyn* 243, 588-600.
- 22) Mansfield P, Constantino JN, Baldrige D (2020) MYT1L: A systematic review of genetic variation encompassing schizophrenia and autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 183, 227-233.
- 23) Chen J, Yen A, Florian CP, Dougherty JD (2022) MYT1L in the making: emerging insights on functions of a neurodevelopmental disorder gene. *Transl Psychiatry* 12, 292.
- 24) Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, Brenhouse H, Grassi-Oliveira R (2016) An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 68, 489-503.