

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-68807

(P2010-68807A)

(43) 公開日 平成22年4月2日 (2010. 4. 2)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 P	
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-271893 (P2009-271893)	(71) 出願人	000002185
(22) 出願日	平成21年11月30日 (2009. 11. 30)		ソニー株式会社
(62) 分割の表示	特願2003-387025 (P2003-387025) の分割		東京都港区港南1丁目7番1号
原出願日	平成15年11月17日 (2003. 11. 17)	(74) 代理人	100067736
			弁理士 小池 晃
		(74) 代理人	100096677
			弁理士 伊賀 誠司
		(74) 代理人	100106781
			弁理士 藤井 稔也
		(74) 代理人	100113424
			弁理士 野口 信博
		(74) 代理人	100150898
			弁理士 祐成 篤哉
		最終頁に続く	

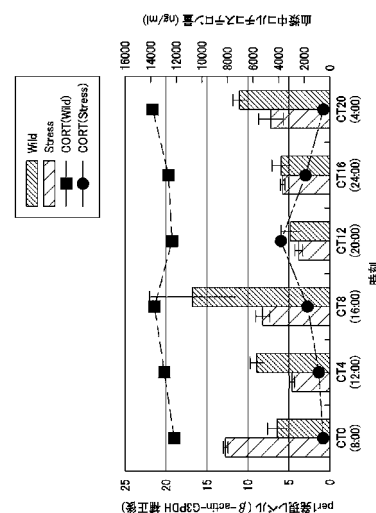
(54) 【発明の名称】 ストレス評価方法

(57) 【要約】

【課題】ストレスの程度を簡便に評価する新規なストレス評価方法を提供する。

【解決手段】生体から採取された細胞中における P e r 1 遺伝子の発現レベルを測定する測定工程と、上記細胞中における P e r 1 遺伝子の発現レベルの正常値と、上記測定工程で測定した発現レベルとを比較し、上記測定工程で測定した発現レベルが上記正常値より増加した場合に、上記生体にストレス負荷が与えられていると評価する評価工程とを有する。

【選択図】 図 1 0



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生体から採取された細胞中における P e r 1 遺伝子の発現レベルを測定する測定工程と、

上記細胞中における P e r 1 遺伝子の発現レベルの正常値と、上記測定工程で測定した発現レベルとを比較し、上記測定工程で測定した発現レベルが上記正常値より増加した場合に、上記生体にストレス負荷が与えられていると評価する評価工程とを有するストレス評価方法。

【請求項 2】

上記ストレスは、上記細胞内でのコルチコステロンの上昇を伴う請求項 1 のストレス評価方法。

【請求項 3】

上記正常値は、所定期間に亘って測定した上記 P e r 1 遺伝子の発現レベルの平均値である請求項 1 のストレス評価方法。

【請求項 4】

上記細胞は、上記生体の血液中に存在する細胞である請求項 1 のストレス評価方法。

【請求項 5】

上記細胞は、午後 0 時から午後 4 時の間に生体から採取される請求項 1 のストレス評価方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、生体のストレスの程度を簡便に評価するためのストレス評価方法に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

近年、ストレスが、生活習慣病やアレルギー疾患等の原因の 1 つとして注目を浴びている。ここで、ストレスとは、生体が外部からの様々な有害刺激（ストレッサー）に対して示す非特異的な状態を示すものである。

【0003】

生体にストレス負荷が与えられた場合、先ず最初に交感神経系の緊張が惹起され、さらに下垂体、副腎皮質系の活性化が生じる。この連続した反応は、ストレスに対する生体の適応現象であると考えられ、ストレスに対して生体は、その恒常性を維持するために、神経系・内分泌系を作動させる。しかしながら、その反応が過剰になった場合、生体は逆に生理的にアンバランスな状態となり、その結果、自律神経異常、内分泌異常、免疫異常、胃潰瘍・急性胃粘膜病変、精神疾患等の負の現象となる生理動態を示すようになる。

【0004】

ここで、生体のストレスの状態を捉え、その程度を評価することができれば、評価結果を日常生活にフィードバックできるため有益であると考えられる。このような観点から、最近では、ストレスの程度を簡便に評価できるオリゴヌクレオチドアレイ（DNA アレイともいう）が提案・開発されるに至っている（例えば特許文献 1 参照）。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0005】**

【特許文献 1】特開 2002 - 340917 号公報

【非特許文献】**【0006】**

【非特許文献 1】日本神経精神薬理学雑誌，20[3]（2000）p.107-111.

【非特許文献 2】老年精神医学雑誌，12[11]（2001）p.1344-1350.

【非特許文献 3】PNAS.，100[11]（2003 May）p.6795-6800.

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述したオリゴヌクレオチドアレイは、例えばストレス耐性や生存に關与する遺伝子やホルモン遺伝子、炎症・免疫応答・増殖に關与する遺伝子、細胞死を誘導する遺伝子、抗炎症・創傷治癒・増殖抑制に關与する遺伝子、免疫応答に關与する転写因子やシグナル分子、サイトカインの誘導に關与する転写因子やシグナル分子、或いはストレス耐性に關与する転写因子やシグナル分子などの遺伝子がチップ上に配置されたものであり、ストレスに關連する遺伝子についての網羅的な解析が可能とされる。

【0008】

しかしながら、ストレスは、種々の要因が關連する複雑系の反応であり、多角的な評価が不可欠である。したがって、従来知られていなかったストレスに關連する遺伝子についての新たな知見が得られれば、ストレス評価の信頼性をより向上させることが可能になると考えられる。

【0009】

本発明は、このような観点から提案されたものであり、生体のストレスの程度を簡便に評価する新規なストレス評価方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本件発明者等は、上述した目的を達成するために、様々な観点から鋭意研究を重ねてきた。その結果、日周期リズムの分子機構に關与する、いわゆる時計關連遺伝子の発現レベルを測定することで、ストレスの程度を簡便に評価できることを見出した。

【0011】

本発明は、このような知見に基づいて完成されたものである。すなわち、本発明に係るストレス評価方法は、生体から採取された細胞中における *Per 1* 遺伝子の発現レベルを測定する測定工程と、上記細胞中における *Per 1* 遺伝子の発現レベルの正常値と、上記測定工程で測定した発現レベルとを比較し、上記測定工程で測定した発現レベルが上記正常値より増加した場合に、上記生体にストレス負荷が与えられていると評価する評価工程とを有する。

【0012】

ここで、用いる時計關連遺伝子としては、*per 1* 遺伝子が挙げられ、用いる細胞としては、血液中の細胞が挙げられる。

【0013】

このように、*per 1* 遺伝子を用いてストレスの程度を評価できることについては、これまで全く報告されたことがなく、本件発明者等によって初めて見出されたものである。

【発明の効果】

【0014】

本発明に係るストレス評価方法によれば、生体の細胞中における時計關連遺伝子として、*per 2* 遺伝子の発現レベルを測定するという簡便な方法により、ストレスの程度を評価することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】マウスの同調方法とグループ毎の臓器採取時間を説明する図である。

【図2】マウス末梢臓器の細胞中における *per 1* 遺伝子の逆転写 P C R 結果を示す図である。

【図3】マウス末梢臓器の細胞中における *per 1* 遺伝子の逆転写 P C R 結果を示す図である。

【図4】マウス末梢臓器の細胞中における *per 2* 遺伝子の逆転写 P C R 結果を示す図である。

【図5】マウス末梢臓器の細胞中における *per 2* 遺伝子の逆転写 P C R 結果を示す図で

10

20

30

40

50

ある。

【図 6】ヒト白血球細胞中における p e r 2 遺伝子の逆転写 P C R 結果を示す図である。

【図 7】拘束ストレスの有無によるマウス血漿中コルチコステロン量の変化を示す図である。

【図 8】マウスの同調方法とグループ毎の採血時間を説明する図である。

【図 9】グループ毎に抽出した total RNA のアガロースゲル電気泳動写真を示す図である。

【図 10】拘束ストレスの有無によるマウス白血球細胞中の p e r 1 遺伝子の発現レベルの変化を示す図である。

【図 11】拘束ストレスの有無によるマウス白血球細胞中の p e r 2 遺伝子の発現レベルの変化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明を適用した実施の形態について、具体的な実験結果を参照しながら詳細に説明する。

【0017】

< マウス末梢臓器における時計関連遺伝子の発現解析 >

従来、脳以外の末梢臓器において、時計関連遺伝子の発現レベルが日周期リズムを示すことが報告されている (Cell, 109, p307-p320; Nature, 417, p78-p83; Nature, 418, p534-p539; Jpn.J.Pharmacol., 90, p263-p269; Neuroscience Letters, 256, p117-p119; American Journal of pathology, 158, p1793-1801)。そこで、先ず、肺 (lung)、心臓 (heart)、肝臓 (liver)、胃 (stomach)、脾臓 (spleen)、腎臓 (kidney)、精巣 (testis) の各末梢臓器について、p e r 1 遺伝子及び p e r 2 遺伝子の発現レベルを測定した。

【0018】

具体的には、図 1 に示すように、S L C 社から購入した 18 匹の I C R マウス (雄、5 週齢) を 3 匹ずつ 6 グループに分け、全てのグループを 2 週間の期間、6 時から 18 時まで明室、18 時から翌 6 時まで暗室に入れて同調させた。その後、全てのグループを 2 日間暗室に入れ、そのうちグループ C T 0 については 6 時に犠牲死させて、上述の各臓器を採取した。同様にグループ C T 4, C T 8, C T 12, C T 16, C T 20 については、それぞれ 10 時、14 時、18 時、22 時、翌 2 時に犠牲死させ、各臓器を採取した。そして、Promega total SV RNA Isolation kit (Promega 社) を用いて、各臓器の細胞から total RNA を抽出し、マウス p e r 1 遺伝子のプライマー (センスプライマー: 5'-CAGGCTAACCAGGAATATTACCAGC-3'、アンチセンスプライマー: 5'-CACAGCCACAGAGAAGGTGCTCTGG-3') とマウス p e r 2 遺伝子のプライマー (センスプライマー: 5'-GGCTTCACCATGCCTGTTGT-3'、アンチセンスプライマー: 5'-GGAGTTATTTTCGGAGGCAAGTGT-3') とを用いて逆転写 P C R を行った。ここで、逆転写は、SuperScriptII (Invitrogen 社) を用いて行い、P C R は、Prism 7000 (ABI 社) の機器により、SYBR Green PCR Master Mix (ABI 社) を用いて、50 / 2 分、95 / 10 分の後、95 / 15 秒、60 / 1 分を 40 サイクルのプロトコルで行った。

【0019】

p e r 1 遺伝子についての逆転写 P C R の結果を図 2, 図 3 に示し、p e r 2 遺伝子についての逆転写 P C R の結果をそれぞれ図 4, 図 5 に示す。ここで、図 2 及び図 4 において (a) ~ (d) は、それぞれ肺、心臓、肝臓、胃の結果を示したものであり、図 3 及び図 5 において (a) ~ (c) は、それぞれ脾臓、腎臓、精巣の結果を示したものである。また、縦軸は、G 3 P D H の発現レベルに対する p e r 1 遺伝子及び p e r 2 遺伝子の発現レベルの比を示したものである。これらの図から分かるように、測定した全ての末梢臓器において、p e r 1 遺伝子及び p e r 2 遺伝子の発現レベルの日周期リズムが確認された。

【0020】

10

20

30

40

50

< ヒト血液における時計関連遺伝子の発現解析 >

次に、ヒト血液を利用して p e r 2 遺伝子の発現レベルを測定した。具体的には、ZR W hole-Blood Total RNA Kit (Zymo Reserch 社) を用いて、ヒト白血球細胞から total RNA を抽出し、ヒト p e r 2 遺伝子のプライマー (センスプライマー : 5' -GGCTCTCCTAGTTTTAT TTCAAAACG-3'、アンチセンスプライマー : 5' -GTGTGCATTTCATCCGATGGA-3') を用いて上述と同様のプロトコルで逆転写 P C R を行った。なお、本実験では、同一血液サンプルについて異なる日に計 3 回、 p e r 2 遺伝子の発現レベルを測定した。

【 0 0 2 1 】

p e r 2 遺伝子についての逆転写 P C R の結果を図 6 に示す。ここで、図 6 における縦軸は、G 3 P D H の発現レベルに対する p e r 2 遺伝子の発現レベルの比を示したものである。図 6 から分かるように、ヒト血液においても時計関連遺伝子の発現解析が可能であることが確認された。

10

【 0 0 2 2 】

< ストレス付加によるストレスホルモンの発現確認 >

次に、本実施の形態の手法により十分なストレス負荷を与えることができるか否かを確認するために、ストレス負荷を与えたマウスと与えていないマウスとについて、ストレスホルモンの 1 つであるコルチコステロンの発現量を測定した。

【 0 0 2 3 】

具体的には、上述と同様に同調させた 3 匹の I C R マウス (グループ C T 2) を 1 0 時から 1 1 時までの 1 時間、尾静脈注射の際に用いるマウス固定アジャスター (SANPLATEC 社、商品コード 13302E) に入れて拘束ストレスを与え、採血した。また、コントロールの 3 匹の I C R マウスについては、1 0 時から 1 1 時までの 1 時間、ケージで待機させた後、同様に採血した。そして、採集した血液の血漿を分離し、Enzyme Immunoassay kit (Assay Designes, Inc、カタログ番号 900-097) を用いた E L I S A によりコルチコステロン量を測定した。なお、1 次抗体としてはロバ抗ヒツジ I g G 抗体を使用し、2 次抗体としてはヒツジポリクローナル抗体を使用した。コルチコステロンの測定結果を以下の表 1 及び図 7 に示す。

20

【 0 0 2 4 】

【表 1】

Wild type			Stress type		
Average	STDEV	誤差範囲	Average	STDEV	誤差範囲
43.01	63.07	36.41	695.07	29.82	17.22

30

【 0 0 2 5 】

この表 1 及び図 7 から分かるように、拘束ストレスを与えた場合には、血漿中のコルチコステロン量が平常時と比較して約 1 6 倍に上昇しており、この手法により十分なストレス負荷を与えることができることが確認された。

40

【 0 0 2 6 】

< ストレス負荷の有無によるマウス血液における時計関連遺伝子の発現変化 >

次に、拘束ストレスによって時計関連遺伝子の発現レベルに変化が生じるか否かを確認するために、マウス血液を利用して p e r 1 遺伝子及び p e r 2 遺伝子の発現レベルの日周期リズムを測定した。

【 0 0 2 7 】

具体的には、図 8 に示すように、S L C 社から購入した 7 2 匹の I C R マウス (雄、5 週齢) を 6 匹ずつ 1 2 グループに分け、そのうち 6 グループについてはストレス負荷を与えるグループ (以下、ストレスタイプという。) とし、残りの 6 グループについてはスト

50

レス負荷を与えないグループ（以下、ワイルドタイプという。）とした。全てのグループを2週間の期間、8時から20時まで明室、20時から翌8時まで暗室に入れて同調させた。その後、全てのグループを8時から翌20時までの36時間暗室に入れ、グループCT12については20時に、グループCT16, CT20, CT0, CT4, CT8については、それぞれ24時、翌4時、8時、12時、16時にそれぞれ採血した。なお、ストレスタイプについては、採血する1時間前から上述の保定器により拘束ストレスを与えた。

【0028】

そして、ストレスタイプとワイルドタイプとについて、6匹分の血液を混合し、Nycoprep 1.077 Animal (NYCOMED PHARMA 社)を用いて密度勾配法により白血球を分離し、Promega total SV RNA Isolation kit (Promega 社)を用いて、細胞からtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAを1.8%アガロースゲルを用いて電気泳動した結果を図9に示す。図9に示すように、問題なくtotal RNAが抽出できていることが確認された。なお、図9において、28S、18Sは、リボソームRNA由来のバンドを示すものである。

10

【0029】

続いて、抽出したtotal RNAを用いて、上述と同様のプロトコルで逆転写PCRを行った。per1遺伝子及びper2遺伝子についての逆転写PCRの結果をそれぞれ図10、図11に示す。ここで、図10、図11における縦軸は、 β -actin及びG3PDHの発現レベルに対するper1遺伝子及びper2遺伝子の発現レベルの比を示したものである。なお、図10、図11には、同じ血液サンプルを用いて測定した血漿中コルチコステロン量のデータについても併せて示している。図11から分かるように、per2遺伝子の発現レベルは、ストレス負荷により特にグループCT0において有意に低下しており、ストレス評価のマーカーとして使用可能であることが示された。また、図10から分かるように、per1遺伝子の発現レベルも、ストレス負荷により特にグループCT0、CT8で変化しており、ストレス評価のマーカーとして使用可能であることが示された。

20

【0030】

ここで、図10、図11から分かるように、時計関連遺伝子の発現レベルには有意な日内差があるため、1日を通して測定するか又は最もストレスの影響を受ける時間帯に測定することが好ましい。例えば、発現レベルを測定する遺伝子がper2遺伝子である場合には、8時から12時位に採血し、血液細胞中の時計関連遺伝子の発現レベルを測定することが好ましい。

30

【0031】

評価については、時計関連遺伝子の発現レベルが高い方が、ストレスの程度が高いと評価することができる。この際、時計関連遺伝子の発現レベル測定の測定値をそのままストレスの程度とすることもできるが、個体差等もあることから、各個体の通常時と比較することによって、より正確にストレスを評価することが可能である。例えば、所定期間に亘って時計関連遺伝子の発現レベルを測定してその平均値を正常値（通常の状態の発現レベル）とし、この正常値との比較によってストレスを評価するようにしてもよい。この場合、正常値との差や比等を算出し、算出値に基づいてストレスを評価することができる。また、所定の集団をサンプリングし、その時計関連遺伝子の発現レベルの平均値を正常値として、上記と同様に正常値との比較によってストレスを評価してもよい。

40

【0032】

ストレスの評価結果は、発現レベルを測定した測定値や正常値と比較し算出された算出値そのものとするとしてもできるが、例えばストレスレベル0～5等、測定値や算出値を2段階以上の複数段階に分けて表すようにしてもよい。

【0033】

なお、このようなストレスの程度は、ストレスが原因となり得る病気における病気の診断や原因の診断、未病状態の診断、学校や職場、家庭等の環境の診断、ペット等の動物の飼育環境の診断その他の指標として利用することが可能である。その他、余命占いやスト

50

レスチェック等の遊技機において利用することも可能である。

【 0 0 3 4 】

以上、具体的な実験結果を参照しながら本発明を実施するための最良の形態について説明したが、本発明は上述した実施の形態のみに限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能であることは勿論である。

【 0 0 3 5 】

例えば、上述の実施の形態では、時計関連遺伝子の一例として *per 1* 遺伝子及び *per 2* 遺伝子を用いたが、この例に限定されるものではなく、*per 3*、*Bmal1b*、*Npas2*、*Rev-erb-alpha*、*Rev-erb-beta*等の他の時計関連遺伝子を用いても構わない。

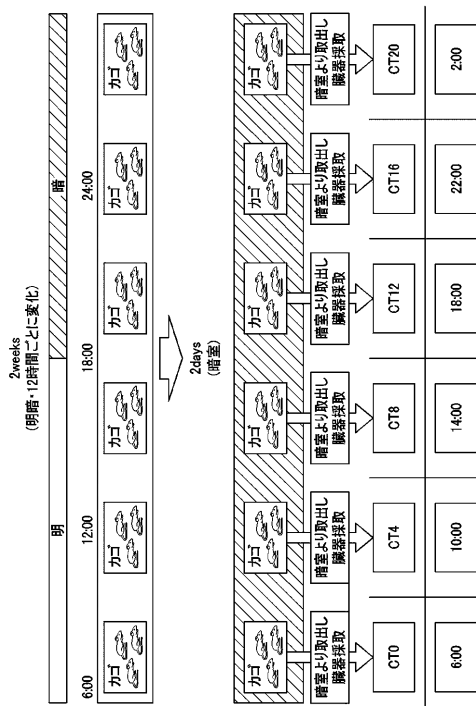
【産業上の利用可能性】

【 0 0 3 6 】

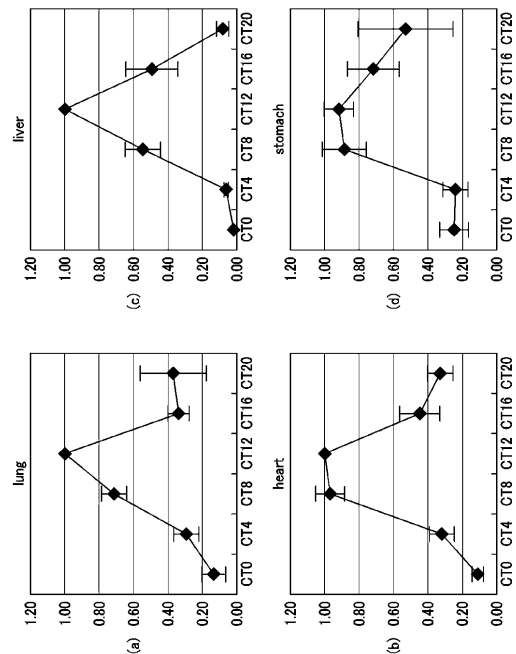
本発明は、生体の細胞中における時計関連遺伝子の発現レベルを測定するという簡便な方法によるストレスの程度の評価が望まれる用途に適用することができる。また、本発明を含めてストレスの程度を多角的に測定することにより、高い信頼性での評価が不可欠な用途に適用することができる。

10

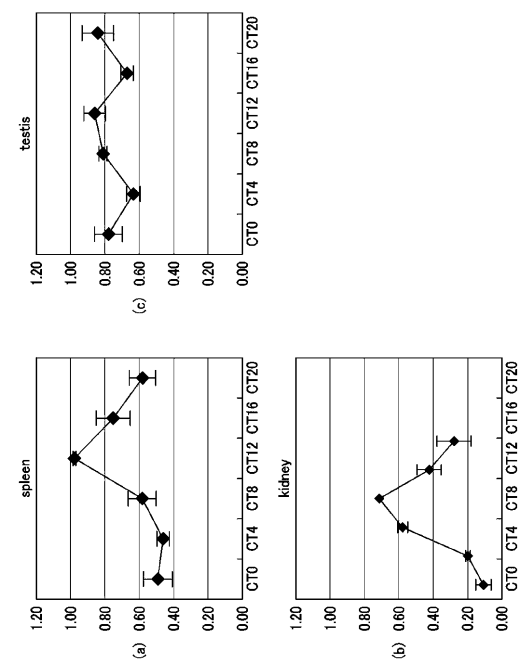
【 図 1 】



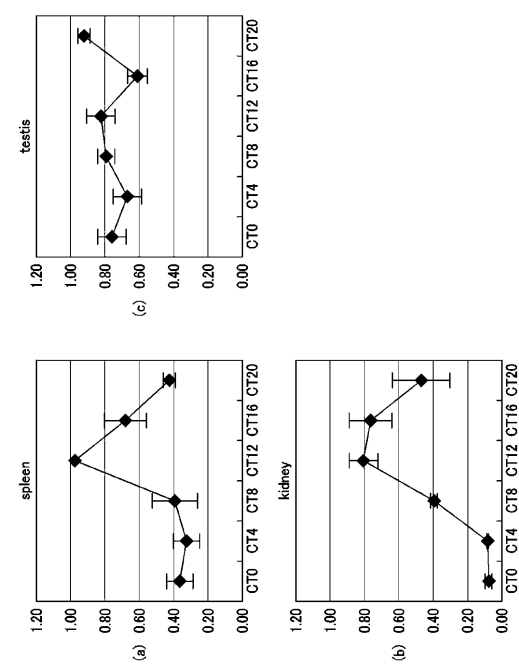
【 図 2 】



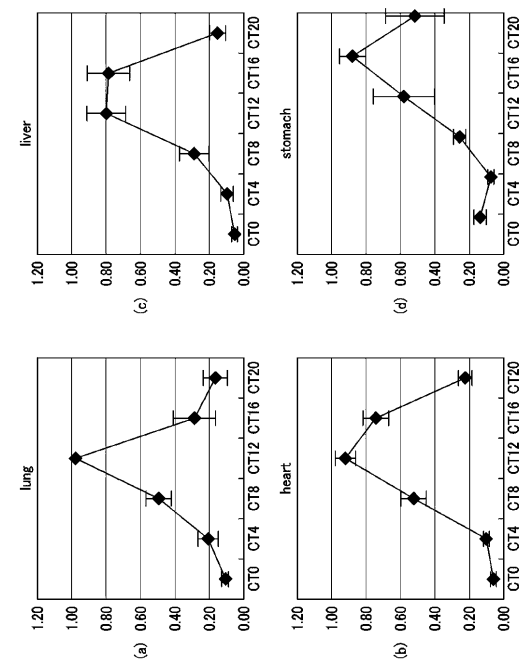
【 図 3 】



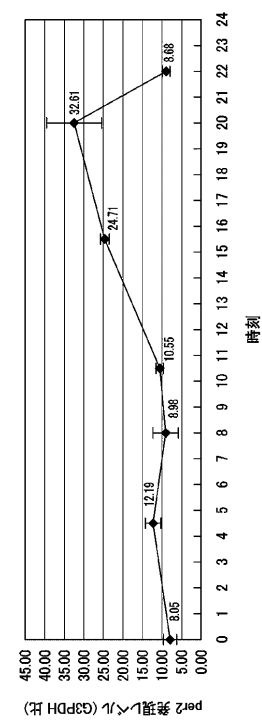
【 図 5 】



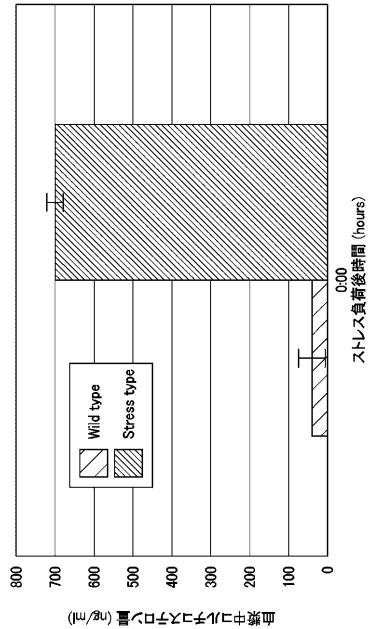
【 図 4 】



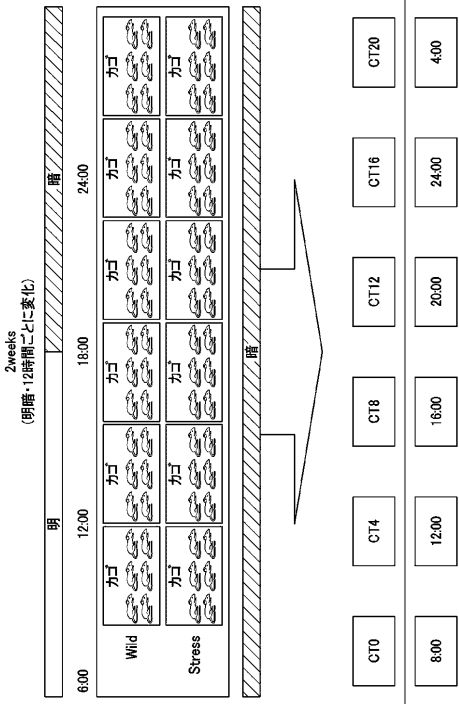
【 図 6 】



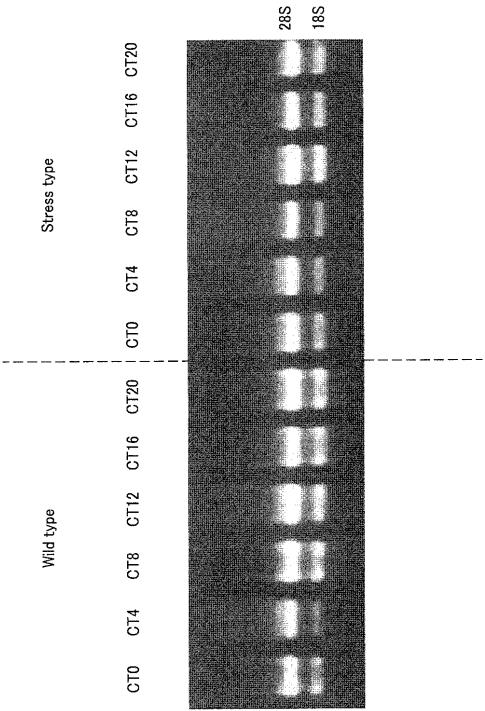
【 図 7 】



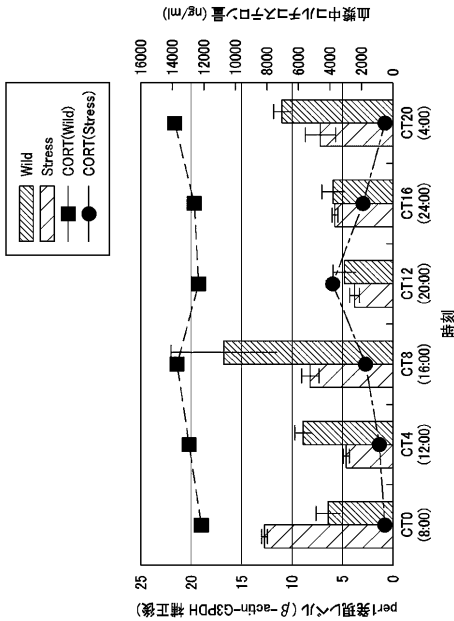
【 図 8 】



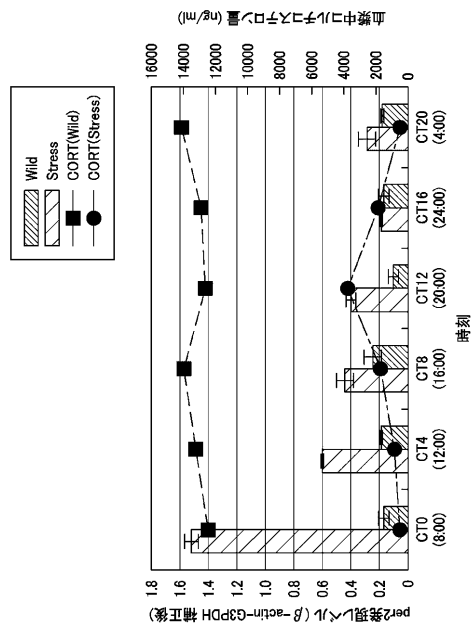
【 図 9 】



【 図 10 】



【図 1 1】



【手続補正書】

【提出日】平成21年12月15日(2009.12.15)

【手続補正 1】

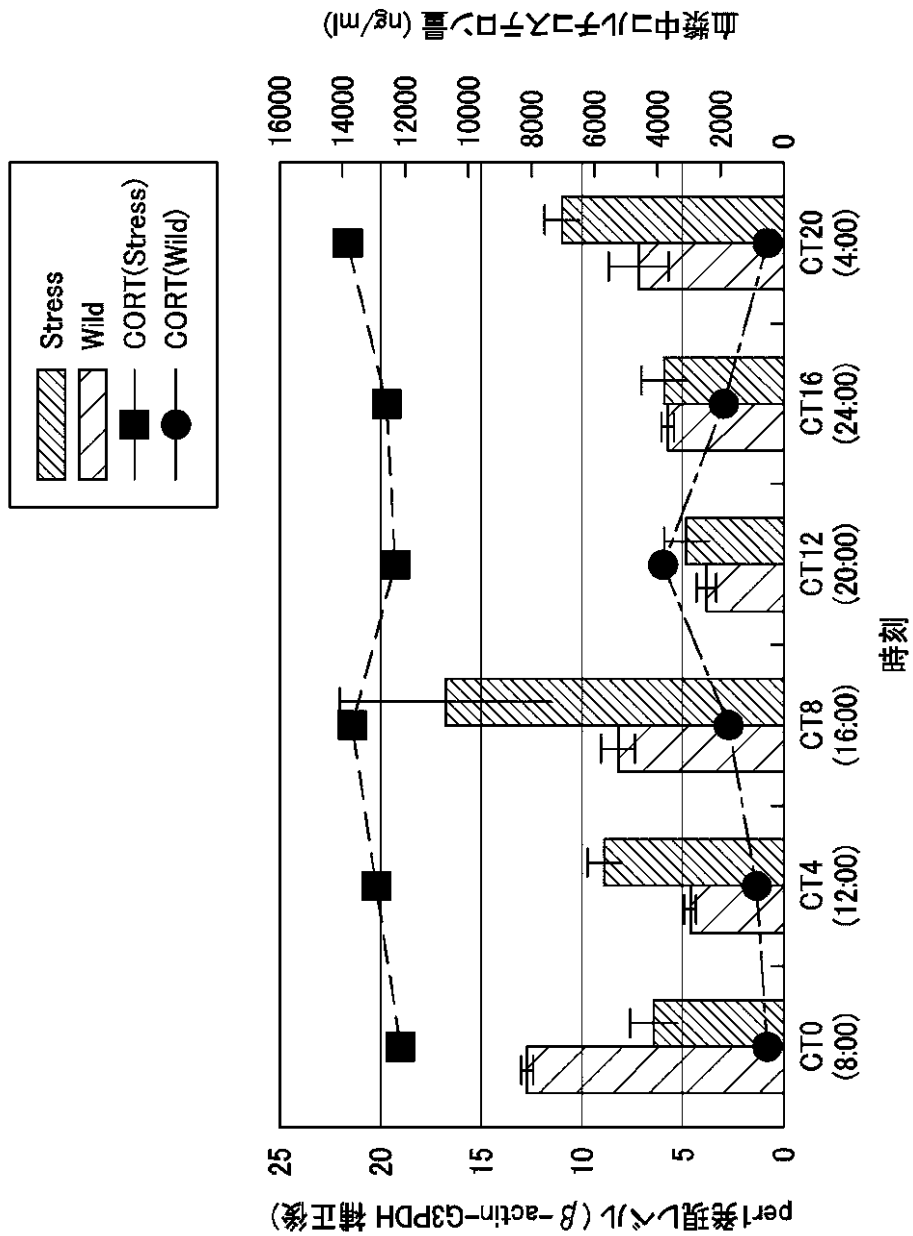
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 1 0 】



【 手続補正 2 】

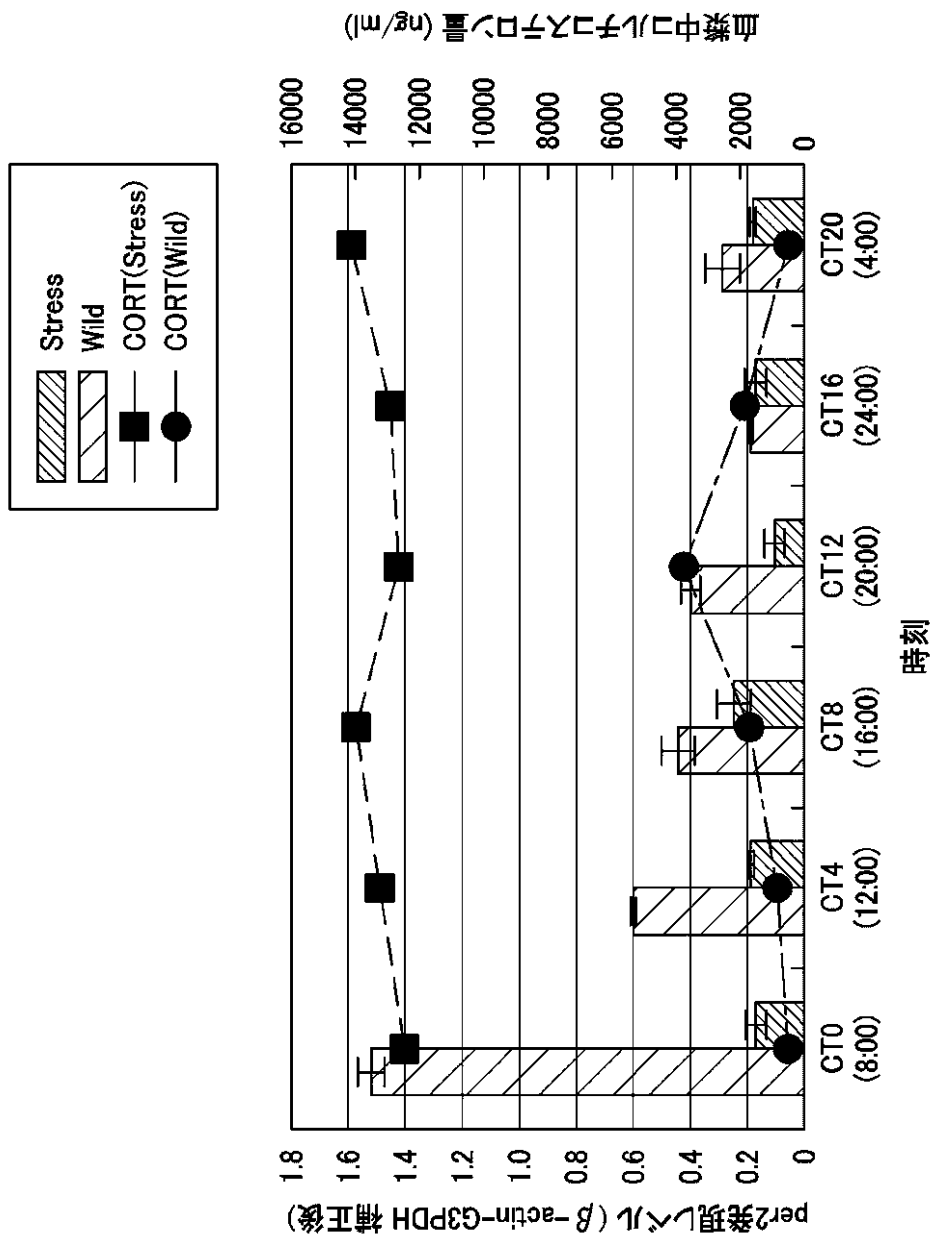
【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 1 1

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【図 11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 B

(72)発明者 山本 拓郎
東京都港区港南 1 丁目 7 番 1 号 ソニー株式会社内

(72)発明者 内匠 透
大阪府吹田市古江台 6 丁目 2 番 4 号 財団法人大阪バイオサイエンス研究所内

F ターム(参考) 2G045 AA40 CA25 DA14
4B024 AA11 CA02 CA11 HA14
4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ43 QQ52 QQ75 QR08 QR32 QR56
QR62 QS25 QS34 QX02