

令和元年5月20日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09210

研究課題名(和文) 死因究明に資する恒常性維持の分子メカニズム解明及び凍死診断への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of homeostasis for corpse examination and its application to the diagnosis of fatal hypothermia

研究代表者

賀川 慎一郎 (KAGAWA, Shinichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：70562213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：凍死の診断は特異的な所見がないため困難であることが知られている。そこで本研究では、凍死診断を補完する新規分子マーカーを同定するために、熱産生組織である腸腰筋に着目し、次世代シーケンシングを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、多数の遺伝子が凍死特異的な発現変動を示した。さらにこれらの遺伝子群は、極度の低体温に対する生体防御反応としての激しい震え熱産生による組織修復や筋再生に関与することが示唆された。従って、これらの遺伝子群は凍死の確定診断を補完する新規分子マーカーになりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、生体の恒常性維持の分子メカニズムの一端を解明できたことは、法医学領域にとどまらず、低代謝療法の治療戦略開発など他領域への波及効果を及ぼすことが期待される。

凍死の剖検診断において、恒常性維持の分子メカニズムを解明するための基礎的研究結果を応用し、同定された多臓器での複数の診断マーカーを、従来行われて来た外表所見・内景所見と組み合わせることで、凍死の確定診断の困難さは飛躍的に改善されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Fatal hypothermia is considered difficult to diagnose in forensic practice. In this study, to identify novel molecular markers that inform the diagnosis of fatal hypothermia, we focused on the iliopsoas muscle, which plays a role in cold-induced thermogenesis. We established rat models of mild, moderate, and severe hypothermia and performed body temperature-dependent gene expression analysis using next-generation sequencing. The expression of some genes was induced only by severe hypothermia. These genes were involved in muscle regeneration, tissue repair, and lipid metabolism. The results of this study indicate that heat production to maintain body temperature in a process leading to fatal hypothermia might be performed by the iliopsoas muscle and that these genes might serve as suggestive markers for diagnosing fatal hypothermia.

研究分野：法医学

キーワード：恒常性維持 震え熱産生 腸腰筋 分子マーカー 凍死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

凍死の診断は、寒冷暴露されたことで生じる左右心臓血の色調差や胃十二指腸粘膜下出血などの所見を組み合わせることで行われる。しかし、これらは主観的に捉えられる所見であることに加え、凍死以外の死因でも認められるため凍死特異的な所見とはいえ、その確定診断は難しい。

先行研究では、寒冷暴露されたことによる特徴的な骨格筋の形態変化に関する報告や凍死症例におけるカテコールアミン検査、海馬での細胞微小管結合蛋白の検討や血液中の糖質コルチコイドレベルの測定など生化学的検査による凍死マーカーの探索が行われてきた。しかし、これらは単純なストレス等の刺激においても同様の変化が認められるため、これらを用いた単一マーカーでの検討では、凍死を証明する事ができない。また、動物モデルを用いた検討では、寒冷暴露によるラットの脳組織における体温調節や熱産生能を有する遺伝子発現検討等の報告がなされているが、これらは寒冷暴露による検討であり、法医実務への応用に耐えうるものではない。従って、これらを指標として凍死の確定診断を行うことは非常に困難であり、新しい診断法の開発は急務である。

2. 研究の目的

本研究は、凍死経過中における生体の恒常性維持システムの分子メカニズムを解明するために、腸腰筋(IM)において凍死経過中の寒冷暴露特異的に発現する mRNA 及び miRNA を同定し、死因究明が最も困難な病態の一つである凍死(低体温症)の診断に応用可能な分子マーカーを同定することである。本研究成果により、それらを指標とした凍死の新しい法医分子病理学的診断法を確立することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 体温依存的寒冷動物モデルの作製

9週齢雄性 Wistar ラット 24 匹を、4 グループに分け各群 n=6 とした。腹腔内麻酔投与 30 分後、寒冷暴露(約 4℃)あるいは室温暴露(約 23℃)し、経時的に直腸温を測定する。軽度低体温群(Mild)は、直腸温が 30℃に到達した時点で安楽死させる。同様に、中等度(Moderate)・重度低体温群(Severe)も直腸温がそれぞれ 22℃、12℃になった時点で安楽死させる。コントロール群の直腸温は約 37℃であった。安楽死後、直ちに IM を摘出し、Total RNA を抽出する。

(2) 次世代シーケンズ(NGS)による網羅的遺伝子発現解析

Total RNA はバイオアナライザによる品質チェックを行ったのち、NGS のためのライブラリを作製、イルミナ Miseq によりシーケンズを行う。得られたデータは、StrandNGS を用いて、GO 解析によりその機能を、パスウェイ解析によりその発現変化が起きたパスウェイを推定する。

(3) マイクロアレイによる網羅的 miRNA 発現解析

マイクロアレイは、Rat miRNA マイクロアレイキット(Agilent Technologies)を用いて行った。解析には GeneSpring v13 (Agilent Technologies)を用いた。

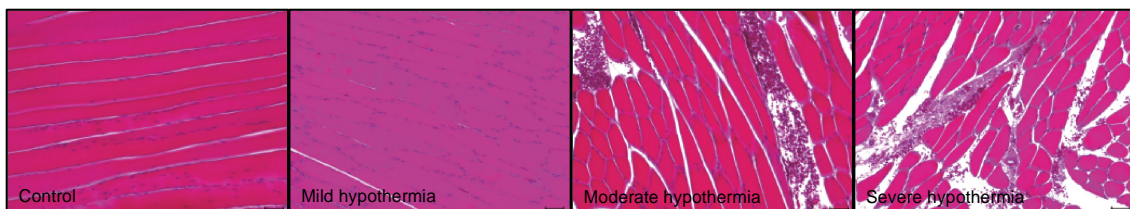
(4) quantitative real-time PCR (qPCR)による mRNA・miRNA 発現動態解析

Total RNA 及び miRNA は、miRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Prime-Script® RT Reagent Kit (Takara)及び miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (EXICON) を用いて cDNA 合成を行ったのち、SYBR Green I 法にて mRNA・miRNA の定量を行った。

4. 研究成果

(1) 震え熱産生による IM の出血

凍死症例の所見として、熱産生のための激しい震えによる IM での出血の存在が報告されている。作製した体温依存的寒冷動物モデルにおいても中等度及び重度低体温群において震えが確認された。そこで、出血を確認するために HE 染色を行ったところ、コントロール及び軽度低体温群では出血が認められなかったが、中等度及び重度低体温群では顕著な出血が認められた。従って、これらの出血は熱産生のための激しい震えによって惹起されたことが示唆された。



(2) 重度低体温特異的に発現変動する遺伝子の同定

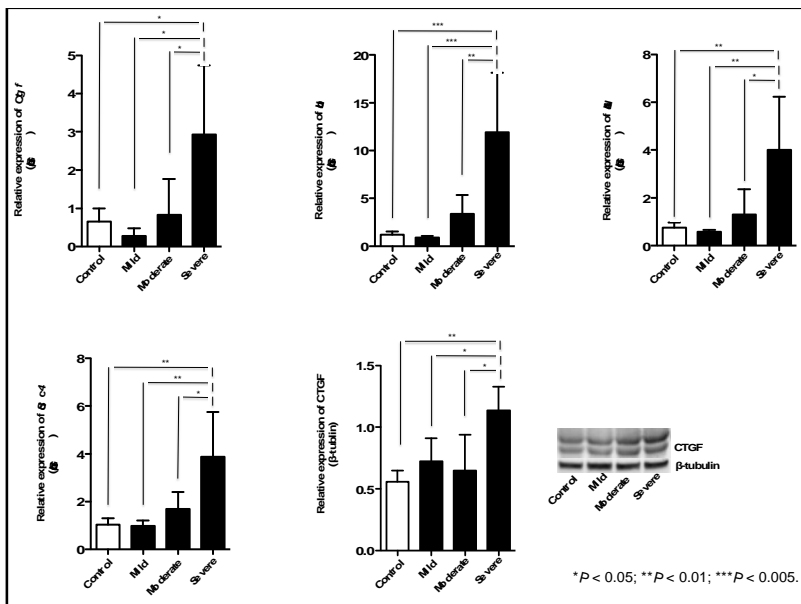
NGS の結果、重度低体温群で 91 mRNA がコントロール・軽度・中等度低体温群と比較して 2 倍以上の発現増加を示した。これらの遺伝子群に対し GO 解析を行ったところ、ストレスに対す

る反応や低酸素への反応などの生物学的プロセスに関与することが示唆された。
NGS で得られた RPKM 値より分子マーカー候補となりうる 4 遺伝子を抽出した。

Gene Symbol	Mean expression (RPKM, n=2-3)			
	Control	Mild	Moderate	Severe
<i>Ctgf</i>	29.8	11.9	4.8	91.5
<i>Junb</i>	12.1	8.6	21.7	118.7
<i>Nr4a1</i>	115.1	93.7	79.3	486.0
<i>Sdc4</i>	20.7	12.6	17.7	87.6

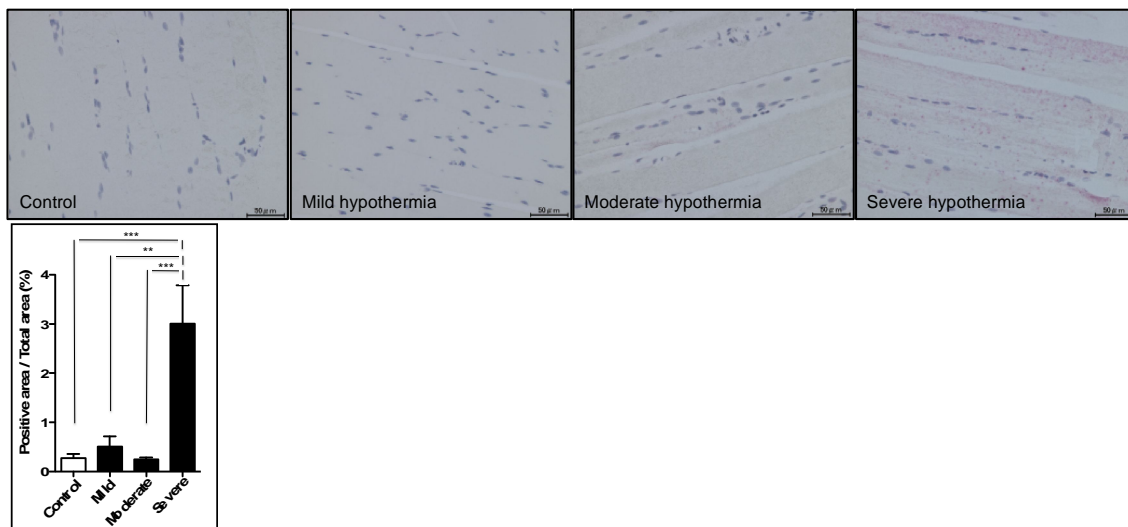
(3) 遺伝子及び蛋白質発現検討

分子マーカー候補となりうる 4 遺伝子は、いずれも重度低体温群のみで有意な発現増加を認めた。また、Western blotting による CTGF の蛋白質発現検討においても、重度低体温群のみで有意な発現増加を認めた。*Ctgf* 及び *Sdc4* においては、激しい震えによって引き起こされた腸腰筋のダメージによる炎症や組織修復反応として発現が増加したことが示唆された。一方、*Junb* 及び *NR4a1* においては、極度の低体温による熱産生や筋再生によってその発現が誘導されたことが示唆された。



(4) 免疫組織化学検討

免疫組織化学検討は、CTGF が他群と比較して重度低体温のみで強いシグナルを検出したことを示した。また、CTGF のポジティブエリアを計測したところ他群と比較して有意なポジティブシグナルが観察された。



(5) 重度低体温特異的に発現変動する miRNA の同定

マイクロアレイの結果、重度低体温群で 17 miRNA がコントロール・軽度・中等度低体温群と比較して 2 倍以上の発現増加を示した。GeneSpring を用いて、これらの miRNA が制御する標的 mRNA を推測したところ、100 以上の遺伝子群が抽出され、これらの遺伝子群は脂質代謝などに関与することが示唆された。

本研究により、凍死過程への生体の反応として、震え熱産生や脂質代謝などに関与する様々な遺伝子 (mRNA) 発現が変動することを見出した。これらの研究成果は、凍死診断の一助になりうるものと考えられる。miRNA に関する研究は現在進行中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Umehara T, Murase T, Abe Y, Yamashita H, Shibaike Y, Kagawa S, Yamamoto T, Ikematsu K. Identification of potential markers of fatal hypothermia by a body temperature-dependent gene expression assay. Int J Legal Med. 査読有. 133(2), 2019, 335-345

DOI: 10.1007/s00414-018-1888-3

〔学会発表〕(計 4 件)

梅原 敬弘、村瀬 壮彦、安倍 優樹、芝池 由規、新宮 啓太、山下 裕美、山本 琢磨、池松 和哉、視床下部・褐色脂肪組織の体温依存的遺伝子発現解析による凍死診断に有用な新規分子マーカーの探索、第 68 回日本法医学会学術九州地方集会、2018

Umehara T, Murase T, Abe Y, Yamashita H, Shibaike Y, Yamamoto T, Ikematsu K, Identification of novel molecular markers for fatal hypothermia by body temperature-dependent gene expression analysis in rats, 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018

梅原 敬弘、山本 琢磨、村瀬 壮彦、安倍 優樹、山下 裕美、梅野 哲也、芝池 由規、池松 和哉、凍死の確定診断に資する体温依存的遺伝子発現解析による新規分子マーカーの同定、第 67 回日本法医学会学術九州地方集会、2017

Umehara T, Yamamoto T, Murase T, Abe Y, Yamashita H, Umeno T, Shibaike Y, Ikematsu K, Identification of novel diagnostic markers for fatal hypothermia by body temperature-dependent gene expression analysis in animal model, 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/legal-m/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：梅原 敬弘

ローマ字氏名：(UMEHARA, Takahiro)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：60617421

(2)研究分担者

研究分担者氏名：山本 琢磨

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Takuma)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：講師

研究者番号（8桁）：50634458

(3)研究分担者

研究分担者氏名：池松 和哉

ローマ字氏名：(IKEMATSU, Kazuya)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：教授

研究者番号（8桁）：80332857

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。