

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10128

研究課題名(和文) エタノール暴露により発現量が変化するマイクロRNAを指標とした飲酒時期推定の試み

研究課題名(英文) Attempt to estimate the time of alcohol consumption based on ethanol exposure-induced changes in microRNA expression

研究代表者

中西 祥徳 (Akinori, Nakanishi)

高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・助教

研究者番号：10217763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エタノール(EtOH)曝露に際して高い反応性を示すmicroRNA(miR-9、miR-15b、miR-21およびmiR-335)のEtOH投与マウス諸臓器中発現量をリアルタイムPCRにより観察し、体内EtOHを指標としない分子生物学的手法による飲酒証明の可能性を検討した。各microRNAは臓器ごとでそれぞれ異なる経時的変動を示し、またEtOH投与量により異なる反応性を示した。複数の臓器における複数のmicroRNA発現量の変動を解析することにより、EtOHを指標としない新たな飲酒証明の可能性が期待できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医実務では、解剖症例の飲酒の有無を明らかにすることは重要な検査項目であるが、飲酒してから検査試料を採取するまで相当の時間が経過した場合、既に体内エタノール(EtOH)濃度の低下又は消失により飲酒の証明が困難な事例も発生する。そのような事態に対処するため、体内EtOHを指標としない飲酒証明法の開発は法医学上非常に有用である。本研究の結果、EtOH曝露により発現量が顕著に増減する4種類のmicroRNAを指標とした全く新しい分子生物学的手法による飲酒証明の可能性が期待できると思われた。

研究成果の概要(英文)：In forensic practice, determining whether the autopsied person drank alcohol is an important test. However, depending on the time between the time when the alcohol was consumed and when the samples were collected, the ethanol (EtOH) concentration may have decreased markedly from the body. Therefore, there is a need for a method to establish whether someone has consumed alcohol that is not based on EtOH in the body. In this study we used multiple EtOH-responsive microRNA(E-miR) and investigated the extent to which they are expressed in individual organs of mice administered EtOH to determine their utility as indices of the proof of drinking. Because E-miRs (miR-9, miR-15b, miR-21 and miR-335) showed different responses to EtOH exposure in individual organs and it also revealed differences in depending on the amount of EtOH administered, by analyzing the multiple miRs in multiple organs, it may be possible to devise a novel method to prove alcohol consumption that does not rely on EtOH.

研究分野：法医学

キーワード：飲酒証明 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miR) は、メッセンジャー RNA の蛋白翻訳や発現を制御する 20 塩基程度の non-coding RNA (アミノ酸をコードしない RNA) である。現在、エタノール (EtOH) 投与により発現量が著しく増減する miR がいくつか知られている。miR-335 および miR-21 は、低濃度 (0.6 mg/g) の EtOH に慢性的に (5 日間) 投与されると発現量が増加 (1.5-4 倍) し、高濃度 (3.2 mg/dl) の EtOH に慢性的に投与されると逆に発現量が減少 (1/3-1/23) した (Sathyan ら 2007 年)。miR-9 は短時間 (15 分) の EtOH 投与で 2 倍に増加することが報告されている (Andrzej ら 2008 年)。miR-15b の発現量は EtOH 慢性投与で約 1/2 に減少するが、EtOH 投与を中止すると発現量が約 6 倍に増加した (Gretchen ら 2013 年)。このように EtOH 投与時間や投与後経過時間、または投与中止後に劇的に発現量が変化する複数の miR の定量解析により、飲酒証明、飲酒時期、飲酒量などを推定できる可能性があると考えられる。ただ、これらの報告は全て培養細胞を用いた *in vitro* の研究であり、生体内でどのような変化が起こるかは十分には解明されていないため、実験動物を用いた *in vivo* 実験が必要であると考えた。また、miR は組織により発現量や発現時期、発現動態に大きな違いがあることが知られており、各臓器を検査対象とする必要があると思われた。

2. 研究目的

飲酒ひき逃げ事件において、被疑者の身柄確保までにかかなりの時間を要した場合、被疑者の体内エタノール (以下、EtOH) 濃度が著明に低下ないし消失することにより、呼気中や血液中、尿中の EtOH を指標とした従来の飲酒運転立証手法では、事故発生時の飲酒の有無や酩酊度の判定が困難な事例も発生する。このような飲酒から検査試料採取まで時間が経過し、体内 EtOH 濃度を指標としたアルコール検査が有効でない事態に対処するため、体内 EtOH 濃度以外を指標とした飲酒証明法の開発が必要であると考えた。近年、数多くの生命機能に關与する機能性核酸として microRNA (以下、miR) が注目されており、EtOH 投与により発現量が顕著に増減する miR も多数報告されている¹⁻³⁾。そこで本研究では、miR を指標とした飲酒証明法開発のための基礎検討として、EtOH 投与とマウスを用いた動物実験により、EtOH 曝露に際して高い反応性を示すと報告されている miR-9、miR-15b、miR-21 および miR-335 が生体内の各臓器でどの程度発現し、時間経過と共にどのような挙動を示すかを観察した。

3. 研究の方法

5 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに 2% EtOH 含有生理食塩水 50 ml/kg (EtOH として 1 g/kg) を 1 回腹腔内投与し (E1 群) その 15 分後、1 時間後、2 時間後、5 時間後、12 時間後および 24 時間後 (各 n=3) に脳下垂体、顎下腺、肺、肝臓、腎臓、副腎および脾臓をそれぞれ採取した。また、EtOH 投与量により miR 発現量に相違があるか否かを観察するため、6% EtOH 含有生理食塩

水 50 ml / kg (EtOH として 3 g/kg) を 1 回腹腔内投与し (E3 群)、その 15 分後、1 時間後、2 時間後および 5 時間後 (各 n=3) に各試料を採取し、E1 群と比較した。対照群には、同量 (50 ml / kg) の生理食塩水を 1 回腹腔内投与したマウスを用い、同様の時間経過後にそれぞれの試料を採取した。各試料から miRNeasy Mini kit (QIAGEN) により total RNA を抽出し、TaqMan™ MicroRNA Assay (Thermo Fisher scientific) を用いて cDNA を作製した。StepOnePlus リアルタイム PCR システム (ライフテクノロジーズ・ジャパン) を使用して各臓器中の miR-9、miR-15b、miR-21 および miR-335 を解析 (内在性コントロール: U6 sn RNA) し、対照群に対する EtOH 投与群の miR 発現量を相対定量した。miR 発現量の経時的変動の有意性の有無は t-検定を用いて判定した (有意水準: $p < 0.05$)。なお、本研究は高知大学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号 M-00025-1)。

4. 研究成果

(1) 結果

E1 群 (EtOH 1 g/kg 投与) では (図 1)、脳下垂体の miR-9 発現量は、EtOH 投与の 15 分後に対照の約 1.7 (対照群における発現量を 1 とした時の EtOH 投与群における発現量の比率、以下同様) を示し、その後 5 時間後に約 0.2 まで著しく減少した後、12-24 時間後には再び約 2.4-1.8 まで増加した。顎下腺では、EtOH 投与の 24 時間後にはいずれの miR も対照群より低下傾向にあった。肺の miR-9 発現量は、EtOH 投与の 15 分後から 2 時間後にかけて増加し、5 時間後以降には著しく減少した。また miR-21 は 12 時間後まで対照と同程度であったが 24 時間後には約 2.5 程度まで急激に増加した。肝臓の miR-9 は、EtOH 投与の 2 時間後まで増加傾向を示した後、減少傾向を示した。また、miR-15b および 335 は EtOH 投与 5 時間後までは若干発現量増加傾向であったが 24 時間後には約 0.4-0.6 程度まで減少した。副腎の miR-9 では、EtOH 投与の 2-5 時間後に著しく減少した。腎臓および脾臓では統計学的に有意な経時的変動が若干認められたものの、他の臓器に比して miR の発現量変動は乏しかった。E3 群 (EtOH 3 g/kg 投与) では (図 2)、脳下垂体および副腎の miR-9 は、EtOH 投与 15 分後から経時的に増加傾向が見られた。肝臓の miR-9 および miR-21 並びに肺の miR-335 は、EtOH 投与 1 時間後には対照群より低値であったが、2 時間後には有意に増加する傾向が認められた。E1 群と E3 群を比較して EtOH 投与量による発現量の差が認められたのは、顎下腺、肺、肝臓、副腎および脾臓における miR-9 並びに肺における miR-335 であった。

(2) 考察

E1 群では、miR-9 発現量は特に脳下垂体、肺および副腎において、EtOH 投与後比較的早期に著しく増加し、その後著しく減少する変動パターンを示した。培養細胞を用いた Andrzej ら¹⁾の報

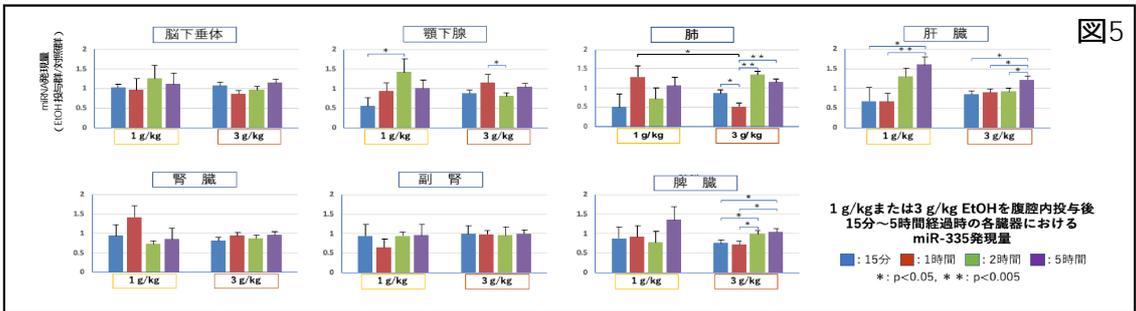
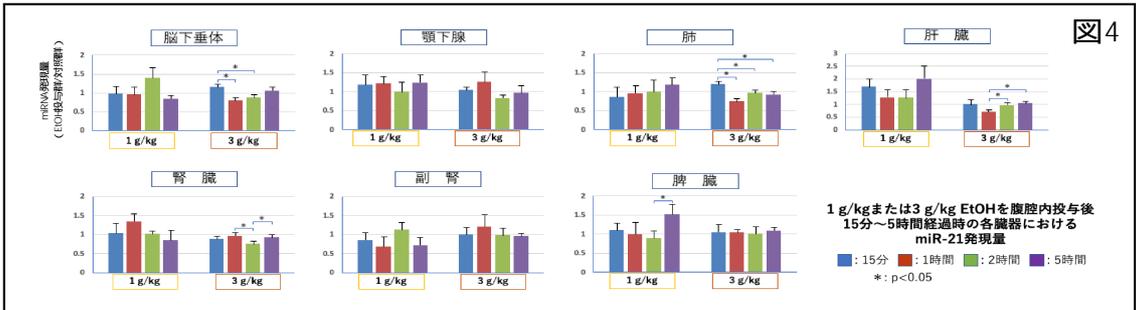
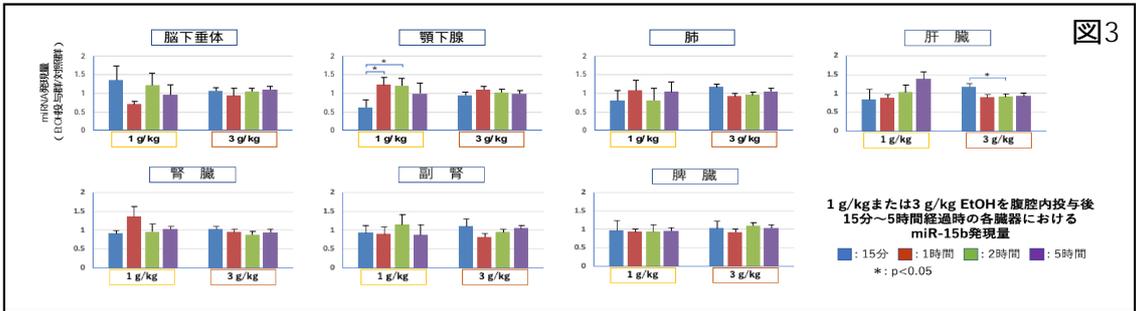
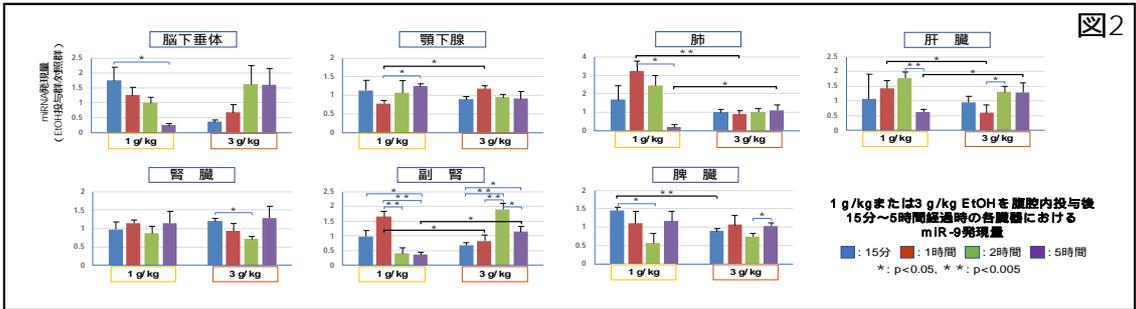
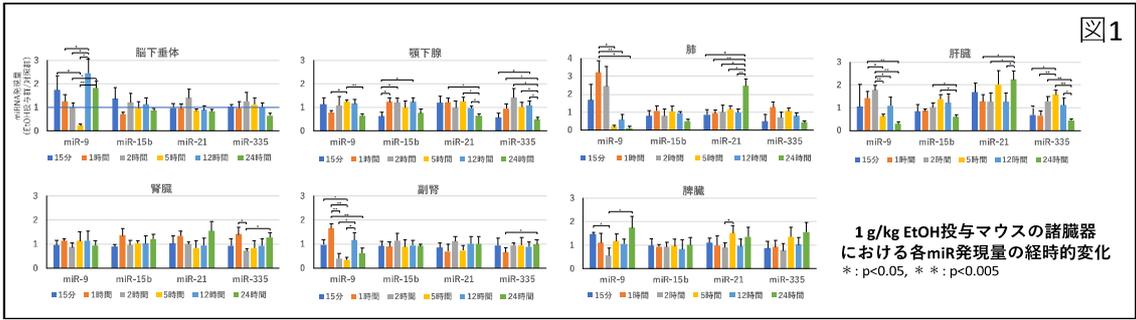
告では、EtOH 曝露の 15 分後に miR-9 の発現量が約 2 倍に増加したことを報告している。今回結果と合わせると、miR-9 は飲酒後早期（15 分-2 時間以内）であることを示唆するバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えた。Gretchen²⁾らは、培養細胞に 5 日間 EtOH を暴露させた（12 時間曝露後 12 時間非曝露のサイクルを 5 回実施）実験において、miR-15b 発現量が約 1/2 に減少し、EtOH 曝露を中止するとその 24 時間後には発現量が 6 倍に増加することを報告している。E1 群、E2 群共に今回の検討では miR-15b の変動はいずれの臓器においても顕著ではなかったが、miR-15b は EtOH 慢性投与の 1 日後以降に大きく増加する可能性があると考えられ、現在更に EtOH 慢性投与の影響を検討している。Sathyan³⁾らは、培養細胞に対する低濃度（0.6 mg/g）EtOH の慢性曝露（5 日間）により miR-21 および miR-335 の発現量はそれぞれ 1.5 倍および 4 倍に増加し、高濃度（3.2 mg/g）EtOH の慢性曝露ではそれぞれ 1/23 および 1/3 に著しく減少したと報告しており、miR-21 および miR-335 が飲酒量の多寡を知るマーカーとなることが期待されたが、本研究のような 1 回投与では、EtOH 投与量による明瞭な発現量の差は認められなかった。一方、肺、肝臓および副腎の miR-9 においては、EtOH 投与 1 時間後には E1 群に比して E3 群の発現量低下が見られ、5 時間後にはむしろ E3 群の発現量が E1 群より増加する傾向が観察された。従ってこれら臓器における miR-9 は飲酒量の多寡を示すマーカーとして利用できるかもしれない。

(3)まとめ

miR-9、miR-15b、miR-21 および miR-335 は、EtOH 曝露により各臓器ごとでそれぞれ異なる反応性を示した。複数の miR の発現パターンから、飲酒の有無や飲酒後の経過時間を推定できる可能性があると考えられる。

引用文献

- 1) Andrzej Z. Pietrzykowski, Ryan M. Friesen, Gilles E. Martin, et. al.: Posttranscriptional Regulation of BK Channel Splice Variant Stability by miR-9 Underlies Neuroadaptation to Alcohol. *Neuron*, 59, 2008, 274-287.
- 2) Gretchen van Steenwyk, Paulina Janeczek, Joanne M. Lewohl: Differential Effects of Chronic and Chronic-Intermittent Ethanol Treatment and Its Withdrawal on the Expression of miRNAs. *Brain Sciences*, 3, 2013, 744-756.
- 3) Pratheesh Sathyan, Honey B. Golden, Rajesh C. Miranda: Progenitor Survival and Proliferation after Ethanol Exposure: Evidence from an Ex Vivo Model of the Fetal Cerebral Cortical Neuroepithelium. *Journal of Neurosci*, 27(32), 2007, 8546-8557.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中西祥徳、道家章斗、西村拓起、古宮淳一	4. 巻 28
2. 論文標題 microRNAを指標としたエタノール摂取時期推定に向けた基礎的検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA多型 Vol.28 No.1	6. 最初と最後の頁 70-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西祥徳、道家章斗、西村拓起、古宮淳一
2. 発表標題 microRNAを指標としたエタノール摂取時期推定に向けた基礎的検討
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西祥徳、道家章斗、西村拓起、古宮淳一
2. 発表標題 エタノール投与によるマウス臓器中microRNA発現量の経時的変化
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西祥徳、道家章斗、西村拓起、古宮淳一
2. 発表標題 エタノール投与後24時間までのマウス諸臓器中マイクロRNAの変動
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西祥徳、道家章斗、西村拓起、古宮淳一
2. 発表標題 エタノール反応性microRNAのマウス臓器中発現量に及ぼすエタノール濃度の短時間影響
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------