

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10688

研究課題名(和文) 寒冷応答組織の体系的遺伝子発現プロファイルによる革新的凍死診断法の確立

研究課題名(英文) Establish of innovative diagnostic of fatal hypothermia by systematic gene expression profile in hypothermia-related tissues

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、低体温ラットモデルを作製し、マイクロアレイ及び次世代シーケンシングを用いた褐色脂肪組織及び腸腰筋における体温依存的miRNA・mRNA発現解析を行った。その結果、腸腰筋においてmiR-374-5pは重度低体温群のみで有意な発現増加を示した。また、miR-374-5pはMex3Bの発現制御を行うことが示唆され、Mex3B発現は体温低下に伴い減少した。従って、miR-374-5pは体温低下に伴い活性化され、Mex3B発現を抑制することで、細胞生存に寄与することが示唆され、miR-374-5pは凍死の新規分子診断マーカーと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

凍死の診断は主観的に促えられる所見に頼らざるを得ず、状況証拠のみに頼った非科学的な剖検診断がなされているのが現状であり、科学的かつ客観的な確定診断法を確立することは法医学実務にとって急務である。本研究は、確定診断の障害であった他の死因との鑑別や死後変化の影響を考慮した全く新しい手段であり、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、その成果の実務応用への可能性が非常に高く、実務展開により、精度が高く、刑事裁判資料等の使用に耐える司法解剖鑑定書・行政解剖報告書を作成することで、研究成果を積極的に社会に還元することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Forensic diagnosis of fatal hypothermia is considered difficult because no specific findings have been identified. Therefore, identifying novel molecular markers to assist in diagnosing fatal hypothermia are important. We focused on microRNA expression in brown adipose tissue and iliopsoas muscle. We generated rat models of mild, moderate, and severe hypothermia, and performed body temperature-dependent microRNA and mRNA expression analysis using microarray and next-generation sequencing. The results show that miR-374-5p expression was significantly induced only by severe hypothermia in iliopsoas muscle. Luciferase reporter assay indicated that Mex3B expression was regulated by miR-374-5p and decreased with decreasing body temperature. Collectively, these results indicate that miR-374-5p was activated by a decrease in body temperature, whereby it contributed to cell survival by suppressing Mex3B. Thus, miR-374-5p is a potential supporting marker for the diagnosis of fatal hypothermia.

研究分野：法医学

キーワード：低体温 恒常性維持 分子診断マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学分野において「凍死」の診断は、死因究明が難しい病態の一つである。従来の診断は、寒冷暴露により生じる複数の所見を組み合わせることで行われてきた。しかし、これらの所見は、凍死以外の死因でも認められるため、他の死因との鑑別に苦慮している。これまで、凍死の動物モデルを作製し、生体の恒常性維持のための震え熱産生組織である腸腰筋 (IM) において、次世代シーケンシング (NGS) を用いて遺伝子の転写・発現状態を網羅的に解析した。その結果、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、恒常性維持システムの一部を解明した。しかし、法医実務への応用において、これらの mRNA は激しい運動や痙攣時にも発現変動する可能性があり、単一組織で同定された分子マーカーを凍死診断に応用することは困難である。また、法医学的検査のための検体は、外部環境変化に伴う死後変化の影響を受けている場合が多く、特に mRNA は分解されやすい。しかし、寒冷環境下で回収される検体は、死後経過 (死後 96 時間) をともなっても、検査検体内における mRNA の品質は、生存時と同程度、すなわち死亡時の状態を反映する品質が保たれていることが示唆された。近年、より死後変化に耐えうる分子として、microRNA (miRNA) の有用性が提唱されてきた。更に精度の高い凍死診断法を確立するためには、他臓器 (組織・細胞) において、寒冷暴露によってのみその発現が変化し、また死後変化に耐えうる miRNA を含めた新しい分子マーカーを同定することが必要不可欠であるが、未だ確立されていない。そこで、恒常性維持関連組織において、miRNA を含めた新しい分子診断マーカーを同定することを目指した。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子発現プロファイリングを用いて、miRNA を中心とした恒常性維持の階層的遺伝子発現制御機構の解明による褐色脂肪組織 (BAT) 及び腸腰筋 (IM) における寒冷暴露及び凍死特異的に発現する miRNA 及び mRNA を同定し、死後変化に耐えうる凍死の革新的な診断法を確立する。

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°C) あるいは室温暴露 (約 23°C) 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°C 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°C、12°C 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°C であった。安楽死後、直ちに組織を摘出し、Total RNA を抽出する。

(2) 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 によりシーケンシングを行う。得られたデータは、StrandNGS を用いて、Gene Ontology (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 (qRT-PCR) 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)、miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (EXICON)、TaqMan MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA 合成を行ったのち、SYBR Green I 法及び TaqMan Probe 法にて mRNA ・ miRNA の定量を行った。

4. 研究成果

(1) BAT における体温低下に伴い発現変動した miRNA

マイクロアレイ解析において、5 つの miRNA がコントロール群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した (表 1)。ここで、GeneSpring を用いて、これら miRNA が標的とする mRNA を予測したところ、200 以上の mRNA が標的遺伝子候補として抽出された。

qRT-PCRにおいて、体温低下に伴い *let-7b-5p* の発現は増加し、コントロール群と比較して中等度及び重度低体温群で有意な発現増加を示した。また、*let-7b-5p* の標的遺伝子と予測された *Casp3* が体温低下に伴い、有意な発現減少を示した (図 1)。従って、寒冷環境下の BAT において、*let-7b-5p* が活性化することで *Casp3* の発現抑制を介して、アポトーシスを抑制することにより細胞生存率を上昇させることが示唆された。

表1. 体温低下に伴い発現変動した5miRNA

Symbol	Fold change (Ctrl vs Severe)	Regulation	mirbase accession No
<i>rno-let-7b-5p</i>	1.6	up	MIMAT0000775
<i>rno-miR-30b-3p</i>	1.6	up	MIMAT0004721
<i>rno-miR-32-3p</i>	1.8	up	MIMAT0017103
<i>rno-miR-466b-5p</i>	1.8	up	MIMAT0005278
<i>rno-miR-672-5p</i>	1.9	up	MIMAT0005327

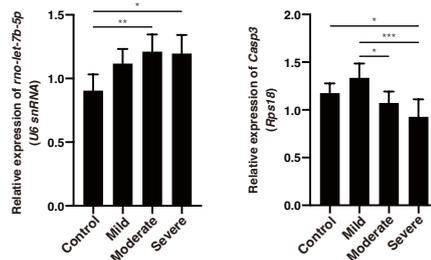


図 1

(2) BAT における凍死特異的に発現変動した mRNA

NGS 解析において、469 の mRNA がコントロール、軽度、中等度低体温群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した。これらの mRNA に対し、StrandNGS を用いて GO 解析を行ったところ、Response to hypoxia や Response to cold などのバイオリジカルプロセスに関与していることが示唆された (表 2)。

表2. GO解析

Symbol	Gene name
Response to hypoxia	
<i>Pmaip1</i>	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
<i>Rbm3</i>	RNA Binding Motif Protein 3
<i>Serpine1</i>	Serpin family E member 1
Response to cold	
<i>Pgclα</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- alpha
<i>Pnmt</i>	Phenylethanolamine N-methyltransferase

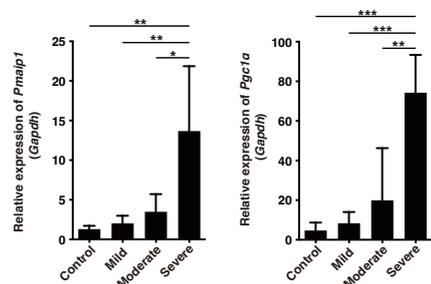


図 2

qRT-PCRにおいて、Response to hypoxia 及び Response to cold に関与することが示唆された *Pmaip1*、*Pgclα* 発現は、コントロール、軽度、中等度低体温群と比較し、重度低体温群のみで有意な発現増加を示した (図 2)。*Pmaip1* は、アポトーシスに関与し、*Pgclα* はミトコンドリアの生合成、エネルギー代謝、熱産生に関与していることが報告されている。従って、極度の低体温に対する細胞生存や、恒常性維持のための熱産生により両 mRNA が活性化されたことが示唆された。

(3) IM における体温低下に伴い発現変動した miRNA

マイクロアレイ解析において、コントロール、軽度及び中等度低体温群と比較して重度低体温群で 17 の miRNA が 2 倍以上の発現増加を示した (表 3)。ここで GeneSpring を用いて、17 miRNA が標的とする mRNA を予測したところ 100 以上の mRNA が標的遺伝子候補として抽出された。これらの遺伝子群は主に、*miR-126a-5p*、*miR-145-5p*、*miR-190a-5p*、*miR-374-5p* によって制御されていることが示された。

qRT-PCRにおいて、*miR-126a-5p* と *miR-145-5p* の発現は、体温低下に伴い増加したが、有意な変化を認めなかった。一方、*miR-190a-5p* と *miR-374-5p* は、体温の低下に伴いその発現を増加させ、コントロール、軽度、中等度低体温群と比較して重度低体温群のみで有意な変化を認めた (図 3)。*miR-374-5p* に制御されることが予測された *Mex3B* は、コントロール、軽度低体温群と比較して中等度、重度低体温群で有意な発現減少を認めた。またタンパク質レベルにおいても中等度、重度低体温群で有意な発現減少を認めた (図 4)。従って、*miR-374-5p* が *Mex3B* の発現を制御していることが疑われた。

表3. 体温低下に伴い発現変動した17miRNA

Symbol	Fold change (Ctrl vs Severe)	Regulation	mirbase accession No
<i>rno-miR-126a-5p</i>	2.8	up	MIMAT0000831
<i>rno-miR-139-5p</i>	2.1	up	MIMAT0000845
<i>rno-miR-145-5p</i>	2.3	up	MIMAT0000851
<i>rno-miR-15a-5p</i>	2.3	up	MIMAT00035728
<i>rno-miR-190a-3p</i>	2.7	up	MIMAT0017145
<i>rno-miR-190a-5p</i>	5.4	up	MIMAT0000865
<i>rno-miR-24-2-5p</i>	2.5	up	MIMAT0005441
<i>rno-miR-29a-5p</i>	2.5	up	MIMAT0004718
<i>rno-miR-3068-3p</i>	2.5	up	MIMAT0024846
<i>rno-miR-3084a-3p</i>	2.3	up	MIMAT0035740
<i>rno-miR-352</i>	2.4	up	MIMAT0000610
<i>rno-miR-374-5p</i>	2.3	up	MIMAT0003208
<i>rno-miR-376b-5p</i>	2.1	up	MIMAT0003195
<i>rno-miR-379-3p</i>	2.6	up	MIMAT0004791
<i>rno-miR-450b-5p</i>	4.4	up	MIMAT00035746
<i>rno-miR-494-3p</i>	2.4	up	MIMAT0003193
<i>rno-miR-6215</i>	3.1	up	MIMAT0024854

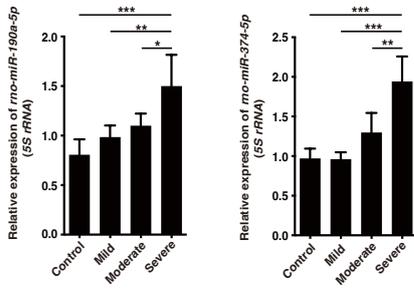


図 3

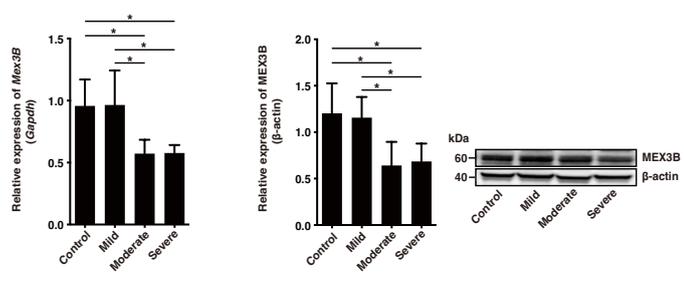


図 4

(4) *miR-374-5p*による*Mex3B*発現制御
 ルシフェラーゼレポーターアッセイによる *miR-374-5p* の *Mex3B* 発現制御を、3T3 細胞を用いて検討した。図 5-a は、*miR-374-5p* が *Mex3B* を認識する seed 配列である。本検討では、*miR-374-5p* mimic を作製した。Mutation は、*miR-374-5p* のシード配列に一塩基あるいは二塩基の変異を挿入したもので、mimic に対するコントロールとして用いた (図 5-a)。その結果、mimic によりルシフェラーゼ活性が有意に減少したため (図 5-b)、*miR-374-5p* mimic が効果的に *Mex3B* の発現を抑制したことが示唆された。

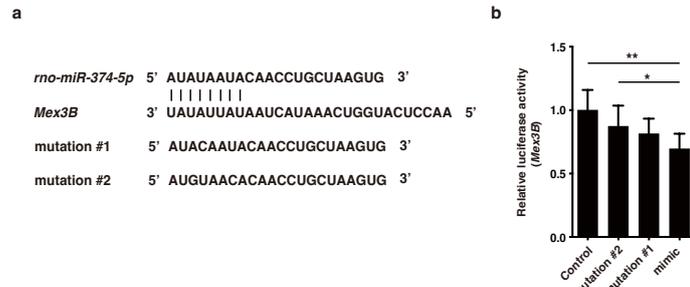


図 5

本研究により、体温低下に伴い恒常性維持関連組織で多数の miRNA の発現変動が認められ、それらが標的とする多数の遺伝子の発現変動が認められた。これらのことは、低体温における恒常性維持関連組織において細胞生存が増強された可能性が示唆され、低体温における生体防御の分子メカニズムの一端が解明された。また、多数の miRNA 及び mRNA が、寒冷暴露及び凍死の新規分子診断マーカーになりうる可能性が示唆された。これらの研究成果は、凍死の確定診断の一助になりうるものと考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Umehara Takahiro, Kagawa Shinichiro, Tomida Aiko, Murase Takehiko, Abe Yuki, Shingu Keita, Ikematsu Kazuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Body temperature-dependent microRNA expression analysis in rats: rno-miR-374-5p regulates apoptosis in skeletal muscle cells via Mex3B under hypothermia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71931-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 Body temperature-dependent microRNA and mRNA expression analysis in rats: rno-miR-203a-3p regulates apoptosis in iliopsoas muscle cells via Socs3 under hypothermia
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 凍死診断に有用な分子マーカーの同定及び機能解析
3. 学会等名 第4回日本法医病理学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 低体温における恒常性維持機構の分子動態解析
3. 学会等名 第71回日本法医学会学術九州地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 体温低下に伴う腸腰筋の分子動態解析及び凍死診断に有用な分子マーカーの同定
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 梅原敬弘
2. 発表標題 ラット腸腰筋における体温依存的microRNA発現動態：低体温下におけるmiR-374-5pの機能解析
3. 学会等名 第70回日本法医学会学術九州地方集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 体温依存的遺伝子発現プロファイルによる凍死の新規分子診断マーカー探索
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 梅原敬弘
2. 発表標題 凍死診断に有用な腸腰筋特異的microRNAの同定及び機能解析
3. 学会等名 第69回日本法医学会学術九州地方集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	村瀬 壮彦 (Murase Takehiko) (40823315)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	梅原 敬弘 (Umehara Takahiro) (60617421)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	池松 和哉 (Ikematsu Kazuya) (80332857)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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
---------	---------