

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790641

研究課題名(和文) SuperSAGE法を用いた心臓、甲状腺、副腎における低体温症マーカー検索

研究課題名(英文) Forensic detection of hypothermic markers in heart, thyroid, adrenal gland using SuperSAGE

研究代表者

高宮 正隆 (Masataka, Takamiya)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：30364334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：法医診断に有用な低体温症マーカーの検出を目的として、マウス低体温症モデルを導入し、副腎、心臓のトランスクリプトーム解析を行った。副腎では遺伝子2015個が有意に発現が上昇しており、2036個は有意に発現が減少していた。また心臓では遺伝子1704個は有意に発現が上昇しており、1734個は有意に発現が減少していた。副腎、心臓における遺伝子発現は低体温症診断に有用なマーカーとなりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the adrenal and cardiac transcriptome of mice killed by hypothermia using DNA microarray technology. In adrenal gland, 2015 genes were upregulated and 2036 were downregulated. In heart, 1704 genes were upregulated and 1734 were downregulated. The present study demonstrated acute adrenal and cardiac responses in hypothermia, and we suggest that understanding adrenal and cardiac mRNA expression would be useful for hypothermia diagnosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：低体温症 副腎 心臓 分子生物学 トランスクリプトーム DNA microarray法 定量PCR法

1. 研究開始当初の背景

岩手県を含む寒冷地域では年の半分以上の期間が容易に低体温症を生じうる環境にある。低体温症の剖検所見として鮮紅色の死斑、左右心腔内液の色調差、鮮紅色の肺、血液の凝固能保持、胃粘膜の Wischniewski 斑、尿の充満、ケトン体検出、また状況所見として矛盾脱衣等が報告されているが、これら所見は低体温症に特異的所見とは言い難い。したがって低体温症の診断は発見状況を加味した上で除外診断的に行われるのが一般的である。しかし本来であれば生体の寒冷曝露に対する反応をも捕らえた上で診断すべきであり、剖検診断に適した新たな低体温症バイオマーカーの検索は急務と考えられる。一方、体温調節に関連する臓器として甲状腺、副腎が挙げられており、また低体温症時の心筋間質の狭小化、カテコールアミンの変動が報告されている。申請者はこれまでサイトカイン発現動態による皮膚損傷受傷後経過時間推定に関する検討を行ってきており、本推定へのサイトカイン多因子同時測定の有用性を報告してきた。さらに近年、分子生物学の発展に伴い個体という統合された構造と機能を理解するため、遺伝子発現解析は網羅的に解析し発現動態の全体像を捕らえるトランスクリプトーム解析が主流となりつつあり、低体温症バイオマーカーの検出にもこれらの手法が有用である可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では体温調節臓器を軸に、低体温症バイオマーカーの検索と同定、診断法の構築を目的とする。すなわち低体温症例について甲状腺、副腎、心臓の網羅的遺伝子発現解析を行う。一方、網羅的に解析したデータからデータマイニングにより各因子の相互作用を考察する。また低体温症病態、低体温症所見を考察するため、抽出された低体温症バイオマーカー発現動態と寒冷曝露時間との関

連を検討する。さらに実際の剖検例を用いてマーカー候補遺伝子の発現動態を検索する。

低体温症は寒冷地域を中心として社会医学上、重要な病態であるが、その診断は除外診断の性格が強く、低体温症特異的な指標の導入が求められている。甲状腺、副腎のトランスクリプトームデータを考察することにより、内分泌、特に体温調整機構から見た低体温症病態を明らかにすることが可能になると考えられる。さらに心臓のトランスクリプトームデータから心筋間質狭小化の形成機序を考察するが、これのみならず主要臓器を検索する本研究のデータから、これまで報告されてきた低体温症所見の機序を明らかにできる可能性がある。すなわち本研究は低体温症時の遺伝子発現動態を分子生物学的に明らかにし、診断への応用の可能性を探るものであり、異常環境死論の新たな展開、法医鑑定技術の向上に大きく貢献するものと考えられる。

ところで遺伝子発現の法医病理学的診断への応用が、これまでも試みられてきているが、法医学的試料に関しては、なお肉眼的、組織学的形態変化が重要視されており、低体温症等の機能変化が主たる病態である疾患に対する診断法は未構築の部分が多いと言わざるをえない。本研究で低体温症マーカーの提示に至れば、網羅的解析により遺伝子発現の全体像を捕らえるトランスクリプトーム解析が低体温症のみならず、これまで法医学的に診断困難だった病態への新たな解析方法となる可能性が出てくる。このような他の病態への応用、また遺伝子発現の法医病理学への応用という観点からも、本研究のデータは今後の法医病理学の発展に必須といえる。また低体温症は臨床上も観察される病態であるが、臨床的にはヒト組織の検討は十分には行われていない。すなわち臨床研究においては諸臓器の採取に困難が伴うと予測されるが、法医研究においては遂行することが

可能である。本研究は法医解剖への応用を目的とするが、マウスモデルで低体温症バイオマーカー発現動態と寒冷暴露時間との関連をも検討すること、さらにヒト由来の組織を用いて解析することにより、臨床医学的にも有用な低体温症病態を提示することが可能と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 低体温症モデルの導入

ヒト剖検組織は死後経過時間、年齢、死亡時の状況が異なることから、ヒト剖検組織をトランスクリプトーム解析しマーカーを抽出することは困難と考えられる。したがって低体温症マーカー候補の検出には動物低体温症モデルを用いることとし、遺伝子データベースの充実しているマウスを検討対象とした。低体温症モデルは従来の低体温症研究において評価が定まっているものが望ましいので、water bath model を導入した。

(2) マウスモデルを用いた心臓、副腎における低体温症マーカー候補の抽出を目的としたトランスクリプトーム解析

健常群および低体温症群の副腎、心臓における遺伝子発現動態をDNA microarray法を用いて網羅的に解析し、候補遺伝子を抽出し、また遺伝子セット解析、Gene function category analysisにより低体温症病態の考察を行った。

(3) マウスモデルを用いた低体温症マーカー候補の再現性の確認

DNA microarray法によるトランスクリプトーム解析で得られたマーカー候補の再現性を、健常群、低体温症群の副腎、心臓につき quantitative PCR法を用いて確認した。

4. 研究成果

(1) 副腎のトランスクリプトーム解析

有意差を持って発現変動していた遺伝子は4051個であり、2015個は有意に発現が上昇しており、2036個は有意に発現が減少していた。具体的には、最も発現が上昇していた遺伝子はFBJ osteosarcoma oncogeneで、最も発現が減少していた遺伝子はstearoyl coenzyme A desaturase 3であった。さらに遺伝子セット解析を行ったところ、有意に上昇している遺伝子セットが9個が確認され、また transforming growth factor、tumor necrosis factor が低体温症の発症に関与していることが示唆された。Gene functional category analysisにおいては、発現上昇遺伝子、発現減少遺伝子とも最も発現していたカテゴリーはbiological processにおいてはcellular process、molecular functionにおいてはbinding、cellular componentにおいてはcell、cell partであった。

(2) 心臓のトランスクリプトーム解析

有意差を持って発現変動していた遺伝子は3438個であり、1704個は有意に発現が上昇しており、1734個は有意に発現が減少していた。具体的には最も発現が上昇していた遺伝子はgranzyme Aで、最も発現が減少していた遺伝子はSolute carrier family 41, member 3であった。さらに遺伝子セット解析を行ったところ、有意に上昇している遺伝子セットが57個、有意に減少している遺伝子セットが22個確認された。Gene functional category analysisにおいては、発現上昇遺伝子、発現減少遺伝子とも最も発現していたカテゴリーはbiological processにおいてはcellular process、molecular functionにおいてはbinding、cellular componentにおいてはcell、cell partであった。granzyme Aはcell deathをもたらし遺伝子とされており、低体温症における心機能低下にgranzyme Aが関与している可能性が示唆された。

これら検討により低体温症における副腎、心臓の遺伝子変動が示され、副腎、心臓における遺伝子発現は低体温症診断に有用なマーカーとなりうると考えられた。実際の法医診断においてはタンパクが重要な役割を果たすと考えられるが、これらデータはヒト組織を用いた免疫組織学的検討への応用が可能である。また低体温症病態を明らかにするという観点からは臨床医学上も重要なデータと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Masataka Takamiya, Kiyoshi Saigusa, Koji Dewa. DNA Microarray Analysis of the Mouse Adrenal Gland for the Detection of Hypothermia Biomarkers: Potential Usefulness for Forensic Investigation. Therapeutic hypothermia and temperature management 2013; 3: 63-73. (査読有)

2. Masataka Takamiya, Nori Nakayashiki, Koji Dewa. Hypothalamic transcript profiling in hypothermia using SuperSAGE. Journal of Forensic & Legal Medicine 2012; 19: 396-401. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

1. 高宮正隆. 法医病理学におけるバイオマーカー検出を目的とした若干の試み. 第97次日本法医学会学術全国集会 2013年6月27日. 北海道札幌市.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: 該当なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高宮正隆 (TAKAMIYA, Masataka)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30364334

(2)研究分担者: 該当なし。

(3)連携研究者: 該当なし。