

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号： 14301

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2010 ~ 2011

課題番号： 22790596

研究課題名（和文） 死亡時刻推定におけるリアルタイムPCRの応用

研究課題名（英文） Estimation of the time of death by clock gene mRNA expression

研究代表者

尾関 宗孝 (Ozeki Munetaka)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号： 80549618

研究成果の概要（和文）：

法医学実務への応用を目的として、日内変動することが知られている生体時計遺伝子の発現量を測定することにより、死亡時刻が推定できるかどうか検討した。対象遺伝子として Arntl、Clock、Cry、Per2 を選択し、6 時間ごとに安楽死させたマウス諸臓器より得た mRNA について、リアルタイム PCR を用いた定量を行った。いくつかの遺伝子は脳や腎臓において死亡時間に依存した異なる変動が認められ、本研究をヒトへ応用することにより有効な方法となりうるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that circadian rhythm-related gene mRNA expression level correlates to the time of death in order to establish the new estimation method using molecular biological techniques in forensic field. Arntl, Clock, Cry, and Per2 were chosen as target genes for realtime-PCR analysis in mice sacrificed every 6 hrs interval. Some genes showing dynamic expression change in Brain or Kidney seemed to be useful to estimate the time of death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

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：法医鑑定学

1. 研究開始当初の背景

正確な死亡時刻の推定は、現代法医学における重要課題のひとつである[1]。現在おこ

なわれている法医解剖においては、死後硬直、角膜の混濁、直腸内温度といった死後に生じる死体現象や、胃内容物の消化の程度や膀胱内尿容量など死亡により停止した生理現象

から得られる情報をもとに検案者の経験に基づいて総合的に判断されている。しかしながら、これらの指標は気温や湿度といった外的要因の影響を受けやすく個体差も大きいため、多くの場合死亡推定時刻にはおおきな幅を持たせて決定されるのが通例であり、その精度は実務上不十分と言わざるを得ない。特に死後数日ともなると、死亡時刻の昼夜さえも推定不能となり、死体のおかれた状況などが唯一の材料となってしまうことも少なくない。また、上記の判断は検案者の経験に基づくものであることから、判断する個人による違いも考慮する必要がある。

一方、法医学は社会安全上重要な学問分野でありながら、あまり先駆的な技術を応用した実務分析はなされていない。DNA 鑑定は日常的に行われるようになったものの、そのほかに実用されている生体分子を利用した法医実務は皆無であるといつてよい。日々新たな犯罪手法が現れるような刻々と変化する社会の中で、精度の高い死亡時刻や死体年齢の推定をはじめとして、すぐにでも解決されるべき課題は多くありながら、これらは長い間手付かずのまま残されている。今後は大きく発展を遂げている分子生物学を法医実務に応用し、これらの課題の解決が期待されている。

2. 研究の目的

より正確かつ簡便な死亡時刻推定法を確立するために、(i)外的要因に作用されにくい、(ii)個体差が少ない、(iii)客観的に判断できる死亡時刻推定のための新たな指標が必要であると考えた。まず、(i)、(ii)の条件を満たすものとして生体分子が適していると考えた。なかでも生体時計と呼ばれている概日リズムに反応する遺伝子群が適していると判断した。これらは、その発現量が一日の中で周期的に制御されていることが知られている。たとえば、あるものは昼に最大発現を示し夜には発現が見られず、またあるものは夜に最大発現を示し昼には認められない[2]。さらに、(iii)の条件を満たすために、これら生体時計遺伝子群の発現量をリアルタイム PCR により定量・数値化することにより、日内死亡時刻がより正確かつ客観的に判別できると考えた。

従来、死亡時刻の推定とは死後の経過時間を意味している。しかしながら、多くの場合死亡時刻推定の際には大きな幅を持たされており、昼夜の区別もつかないことも多々ある。本研究では、トータルの経過時間ではなく昼夜の区別に焦点を当てることで、従来法では不明であった情報を得ることができ、このことは特に犯罪捜査において重要であり、事件の早期解決にも繋がるものと期待でき

る。

元来、RNA はその不安定性から法医サンプルとして不向きであると考えられてきたが、近年では分子生物学の発展により、RNA を対象とした法医鑑定の研究が試みられ、体液の由来の判定、RNA 分解度からの死後経過時間の特定、急死における原因の同定等新たな法医サンプルとしての利用の可能性が模索されている[3]。RNA を逆転写することにより cDNA へと変換すれば、貴重なサンプルを安定に保存できるのみならず、PCR による増幅が可能となり微量なサンプル量から高感度な検出が可能である。また、これまで用いられてこなかった生体分子が実務において利用可能となれば、あらたな法医鑑定の発展へとつながることが期待され、より安全な社会の構築に貢献することは想像に難くない。このようなことから、本研究で新たな死亡時刻推定指標として RNA の利用に挑戦することには大きな意義があるものと考えた。

3. 研究の方法

頸椎脱臼により安楽死させたマウス (Balb/c、8~12 週齢、雌雄の区別なし)より臓器を採取し、液体窒素を用いて冷凍後、 -80°C にて使用するまで保存した。冷凍保存した臓器約 0.5 mg から,TRIzol (Invitrogen)を用いて RNA を抽出し、Promega RQ1 RNase-Free DNase 処理を施した。得られた RNA 溶液について、Nanodrop-1000 により濃度を測定し、0.1 μg の RNA を SuperScript III cDNA synthesis Kit (Invitrogen)に供し、反応容量 10 μl にて cDNA 合成を行った。得られた溶液に 90 μl の TE 溶液を加え全量を 100 μl として、以下の実験に鋳型 DNA 溶液として用いた。RT-PCR もしくはリアルタイム PCR を行い、諸臓器における時間ごとの Arntl、Clock、Cry、Per2 の 4 つの生体時計遺伝子の mRNA 発現量を調べた。各遺伝子に対する PCR プライマーは GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (<http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>)を用いてデザインした。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

本研究で用いた PCR プライマー

Arntl

Forward 5' -tattggccagagcttgtttg-3'

Reverse 5' -gaagtccagctcttggcatca-3'

Clock

Forward 5' -gcctcctctagaagctcacg-3'

Reverse 5' -aaatgctgtctgggaggagt-3'

Cry

Forward 5' -ggtaggagacagatcccaa-3'

Reverse 5' -tgcatccaaggatcgtaga-3'

Per2

Forward 5' -ggaagcatctgttgagaaa-3'

Reverse 5' -agcaaggagctggttctta-3'

ACTB

Forward 5' -ccaactgccgcatcctcttcc-3'

Reverse 5' -ctcgttgccaatagtgatgacctg-3'

10 μ l の Promega GoTaq Master Mix に 5 μ M の フォワードおよびリバースプライマー溶液 各 1 μ l と cDNA 溶液 1 μ l を加え、水で全量を 20 μ l として PCR を行った。PCR 条件は次のとおりである。

1 サイクル
95°C 5 min

30 サイクル
95°C 45 sec
59°C 45 sec
72°C 30 sec

1 サイクル
72°C 10 min
4°C ∞

得られた PCR フラグメントはポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離・解析した。

リアルタイム PCR の際には、Promega GoTaq Master Mix のかわりに Roche FastStart SYBR Green Master 溶液を同量加え、添付のプロトコールに従い、QIAGEN Roter Gene-Q を用いて反応および解析を行った。PCR 条件は先の条件と同様である。各遺伝子の発現量は内部標準として用いた ACTB の発現量に対する相対値として表し、比較検討した。

なお、本研究において実験動物としてマウスを使用するに際し、京都大学大学院医学研究科動物実験倫理委員会の承認を得た。

4. 研究成果

試料採取に適する臓器を特定するために、RT-PCR により昼 12 時に安楽死させたマウスの各臓器における生体時計遺伝子の mRNA 発現量を調べた結果を図 1 に示す。

脳、食道、心臓、腎臓、肝臓においては今回対象とした 4 つの生体時計遺伝子全ての発現を見ることができたが、大腸、肺、脾臓といった臓器においては全てもしくはいずれかの遺伝子の発現が確認できなかった。法医実務において日常的に採取され、RNA を抽出操作においても諸臓器に比べ容易なことから最も適すると考えられた血液では、いずれの遺伝子の発現も検出できなかった。本方法

を実務応用した場合、検出されなかった遺伝子について、それが実際の発現量を示しているのか、あるいは試料や検査法に問題があるのか判断が困難になると考え、状況として全ての対象遺伝子が多少なりとも発現している状況が好ましいと判断した。そこで、本研究においては高い発現を示した脳および腎臓を以下の研究対象にすることとした。

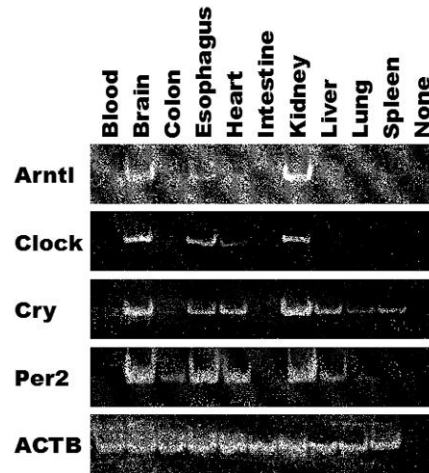


図 1 昼 12 時における諸臓器での生体時計遺伝子 mRNA 発現量の比較

次に、マウスを 0/24 時、6 時、12 時、18 時の 6 時間ごとに 1 群を 3 匹として安楽死させ、RT-PCR により各死亡時間での脳および腎臓における生体時計遺伝子 mRNA 発現量を調べた。(図 2、および 3 を参照)

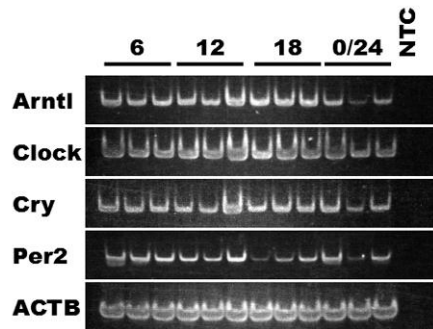


図 2 脳における死亡時間ごとの生体時計遺伝子 mRNA 発現量の変化(1 群 3 匹)

脳において Arntl の発現は 0/24 時に若干低い傾向を示した。また、Per2 についても、午前に比して午後において発現量が低下するように思われた。しかしながら脳においては全体に一日を通して 4 つの対象遺伝子全てが比較的一定量が常時発現している様子が観察された。それに対し、腎臓においては時間ごとにダイナミックに変化している様子

が観察された。中でも Arntl は午後から深夜にかけてほぼ発現が認められなくなった。Cry についても午後において発現量が低下する傾向が見られたものの、18 時において最小発現となった。これに対し Per2 は日中においては発現が低下し、夜間に発現が認められることから、腎臓における Per2 mRNA 発現量は光の明暗と相関があることも考えられた。また、Clock は脳、腎臓のいずれにおいても恒常的に発現している様子が観察された。本研究では内部標準として ACTB を用いたが、生体時計遺伝子群のひとつである Clock を内部標準とするほうが、これら遺伝子の発現量を比較検討するのに望ましいのではないかと考えられ、今後の検討課題のひとつとなった。

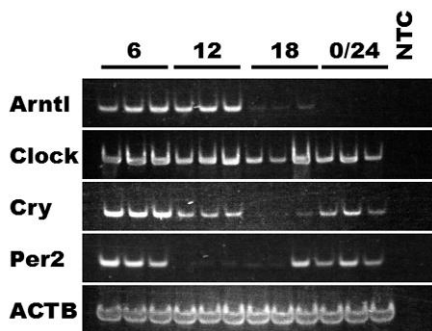


図 3 腎臓における時間ごとの生体時計遺伝子発現

以上の結果を元に、同サンプルをリアルタイム PCR に供し定量した。予想されたように、Clock は比較的一定量が恒常的に発現していた。また、Cry については今回対象とした他の遺伝子と比較して低発現量であったことから、比較検討に適さないと判断した。Arntl と Per2 は半定量 PCR において観察されたように日内で大きく変化し、その変動パターンは脳と腎臓では異なっていることがわかった。しかしながらマウス個体間でのデータのばらつきが大きく、本結果を持ってこれら生体時計の発現量から死亡時刻が推定できるとはいない難いものの、今後データを積み重ねることによって、あらたな推定法の確立につながるものと期待される。

本研究では動物モデルとしてマウスを用いたが、マウスは夜行性でありまた食餌も自由摂取であったことから、ヒトの通常の生活で刻まれている生体時計のリズムとは異なる点も多いであろうことは容易に想像される。24 時間様々な様式で生活を営むヒトへの応用には、生体時計の基礎的な知見を含めまだまだ解決されなければならない課題が多いものの、法実務への RNA の応用の第一歩として、本研究で得られた成果が実際に実務の中で役に立つ日が来ることを望む。

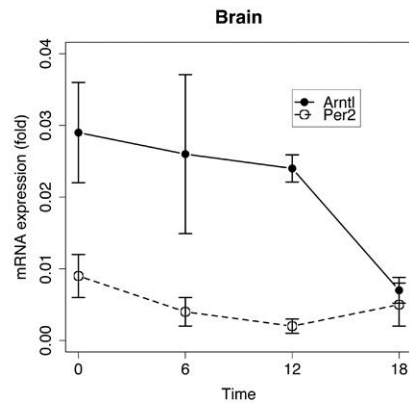


図 4 脳における時間ごとの生体時計遺伝子 mRNA 発現量の変化(リアルタイム PCR)

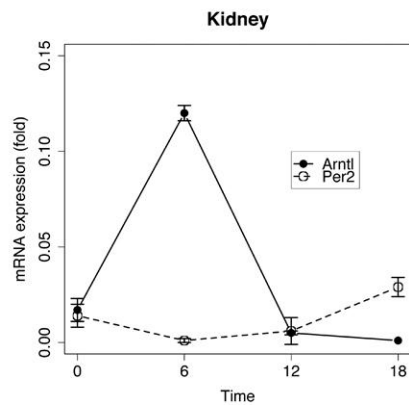


図 5 腎臓における時間ごとの生体時計遺伝子 mRNA 発現量発現(リアルタイム PCR)

参考文献

- [1]Madea et al, Forensic Sci Int, 151, 139-149 (2005)
- [2]Reppert et al, Annu Rev Physiol, 63 647-76 (2001)
- [3]Bauer, Forensic Sci Int Genet, 1 69-74 (2007)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾関 宗孝 (Ozeki Munetaka)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：80549618