

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15885

研究課題名(和文) microRNAを使用した拘束ストレスとカテコールアミンの心筋障害マーカーの確立

研究課題名(英文) cardiac damage from catecholamine and restraint stress affects microRNA expression in heart

研究代表者

細谷 直(Hosoya, Tadashi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・法医学・助教)

研究者番号：40782529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：拘束性ストレスを加えたラットの心臓ではmiR-128とmiR-338の低下をみとめた。また2刺激薬投与時にはmiR-27aとmiR-132の上昇、miR-144とmiR-451の低下をみとめた。2刺激薬と拘束性ストレスの相乗効果はなかった。組織学的変化はないが、トロポニンIの上昇をみとめていることから、これらのmiRが顕微鏡検査で特定できない心筋壊死の指標となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光学顕微鏡での心筋壊死所見はなかったがトロポニンIの上昇があるという、発症1時間程度の超早期心筋壊死を再現した状態で、心臓内miR-27・miR-132等の変動をみとめたことから、心筋壊死の客観的指標となる可能性がある。

また拘束性ストレス単独で変動のあるmiR-128とmiR-338が見つかったことから、拘束性ストレスを受けたかどうかの指標となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the hearts of restraint-stressed rats, miR-128 and miR-338 expression level was decreased. There was no synergistic effect to miR expression levels of 2 stimulation and restraint stress. Although there were no histological changes, blood troponin-I concentration was elevated. These miRs may be an indicator of myocardial necrosis that cannot be identified by microscopic examination.

研究分野：法医学

キーワード：microRNA 心筋障害 カテコールアミン 拘束性ストレス 動物実験

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

法医学領域では解剖でも形態的变化のない死因では死因特定が困難であり、発症後早期に死亡した虚血性心疾患等でも心筋壊死所見がないことが知られている。これに対して客観的指標となる物質の特定が数多く研究されている。

また microRNA(miR)は死後変化に対して比較的頑健であることが知られてきており、この指標となる可能性があった。

2. 研究の目的

法医学解剖でも死因判断が難しいカテコールアミン誘発性不整脈死や発症早期の虚血性心疾患に対して心筋内の microRNA 発現量を調査し、microRNA 変化の分子生物学的意義を検討するとともに、不整脈や心筋壊死マーカーとなりうるか検索した。

さらに拘束ストレスを条件に加えることで、カテコールアミンと拘束ストレスによる不整脈誘発に対する相互作用や microRNA 発現への影響を調べ、不整脈死での拘束ストレスの関与とそのマーカーを定量的に検討した。

3. 研究の方法

ラットに生理食塩水または 100 µg/kg の 2 刺激薬 (イソプロテレノール) を皮下注射したのち、1 時間経過観察する。この経過観察時間の間に粘着テープによる四肢の固定を行い、拘束性ストレスを負荷した。ラットは 2 刺激薬投与の有無、拘束性ストレスの有無で 4 群に分け、それぞれ検査した。

ラットから心臓を取り出し total RNA の抽出を行った後に miniSeq を使用して Deep Sequence を行った。これによって変動する microRNA 候補を特定し、real-time PCR で各 microRNA について発現量の変動を個別に確認した。このときに Deep Sequence ではラットを各群 4 匹としたが、real-time PCR においては各群 10 匹とした。

各群の発現量の差については二元配置分散分析を使用し、有意水準を 0.05 として統計学的検定を行った。

同時に採取した心臓の一部をホルマリン固定し、HE 染色およびリンタングステン酸染色 (PTAH 染色) を施し、光学顕微鏡での組織学的変化があるかを検討した。

また心臓採取時に下大静脈から血液を採取したのちに遠心分離した血漿を用いて、血中トロポニン I 濃度の測定を行った。

4. 研究成果

まず光学顕微鏡での組織学的検索では 4 群ともに心臓の異常所見はみとめなかったが、2 刺激薬投与群でトロポニン I 濃度の上昇をみとめた。拘束性ストレス群ではトロポニン I 濃度の変化はなかった。これらのことから 2 刺激薬投与により心筋障害が生じているが、光学顕微鏡でその変化が捉えることができないと考えられる。この状況は発症早期の虚血性心疾患の剖検例と類似している。

MiniSeq を使用した Deep Sequence によるラットの心臓での microRNA 変動については、2 刺激薬で上昇した miR を 3 種 (miR-27a, miR-132, miR-338)、低下した miR を 7 種 (miR-142, miR-144-3p, miR-144-5p, miR-388, miR-451, miR-499, miR-3585) 特定した。拘束性ストレスで上昇した miR は 1 種 (miR-455)、低下した miR は 4 種 (miR-128, miR-218a, miR-361, miR-388) 特定した。また 2 刺激薬投与と拘束性ストレスの相互作用による miR 発現量の変化は認めなかった。

これらのうち特に miR-27a と miR-132 はともに 2 刺激薬投与で発現量が上昇していたが、コントロール群と比較した発現量の変化が約 3 倍と特に大きかった。

また miR-338 は拘束性ストレスで発現量がコントロール群の約半分にまで低下していたことから、拘束性ストレスを受けたことの指標となる可能性がある。

これらのことから 2 刺激薬投与の状況が法医学領域の剖検例でよく見られる発症早期の虚血性心疾患に対して、本研究内容が適応可能であることが示唆される。本研究でみられたトロポニン I の上昇は実務では死後変化によるものと区別することが困難な場合が多く、光学顕微鏡で心筋壊死が捉えられていないことから実務上はこの心筋障害は捉えられない状態であるが、この状態でみとめられた miR の変動は客観的指標となる可能性がある。

また拘束性ストレスはこれまで他の薬剤との併用で致死性不整脈を惹起する可能性があることが知られており、興奮性譫妄などは拘束性ストレスが死因に関与しているものと考えられている。この場合にこれまで拘束性ストレスは発見状況のみから判断され、剖検で拘束性ストレスがあったことを示すことは困難であったが、本研究でみられた miR-338 や miR-361 などの発現

量の変化が拘束性ストレスを客観的に示す指標となる可能性がある。

ただし本研究で予定していた mRNA 変動を考慮した各 miR のターゲットについては、本研究中の機器故障等による進捗遅延により期間内に達成できなかった。これについては今後の研究が必要である。

本研究内容は第 103 次日本法医学会学術全国集会で報告した。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 細谷直、河野亜紀子、原田一樹、金武潤
2．発表標題 ラット心臓における 刺激薬投与時の急性期microRNA変動
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

〔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
---------	---------