

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19487

研究課題名(和文) miRNA解析を中心とした新規溺死診断マーカーの検索と新たな診断法の開発

研究課題名(英文) A potential diagnostic marker for the drowning by investigating intrapulmonary mRNA and miRNA

研究代表者

前田 一輔 (MAEDA, Kazuho)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：40724761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：法医解剖における溺死診断に有用な分子生物学的マーカーについてmRNAおよびmiRNAを中心に探索した。溺死モデル動物の肺ではaqp5、trpv4が淡水溺死(FWD)群でのみ発現変動していた。さらにAQP5の発現制御を行っていると予測されたmiR-185-3pもFWD特異的に発現変動することが明らかとなった。実際の溺死剖検例でもaqp5、trpv4、miR-185-3p発現解析を行ったところ、同様の結果が得られた。miRNAは約20塩基前後の低分子RNAで、死後比較的安定しているとされているため、miR-185-3pはFWDと海水溺死の鑑別に有用である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学では様々な事案についてその死因を究明することが重要な責務とされている。近年では全国で年間1000例程度の水中死体の法医解剖がなされている。水中死体は解剖所見ならびに諸臓器のプランクトン検査によって溺死と診断される。しかし、死後変化の進行や溺水場所のプランクトンの存在状況によっては溺死の診断根拠となる所見が乏しくなり、診断が困難となる。本研究ではそれらの問題点を解消すべく溺死特異的に発現変動するmRNAとmiRNAを同定し、分子生物学的な指標を用いた新たな溺死診断法の開発を行うことでこれまで診断が困難であった高度腐敗死体やプランクトンの少ない入浴死における溺死診断の実現を目指す。

研究成果の概要(英文)：The diagnosis of drowning is one of the difficult problems in forensic science. In this study, we investigated a diagnostic marker for drowning, focused on intrapulmonary mRNA and miRNA. In the animal experiments, the expression of aqp5 was reduced and trpv4 was increased in freshwater drowning (FWD) significantly compared with that in saltwater drowning (SWD) and control mice. The miR-185-3p was predicted to bind to aqp5 and its expression was increased significantly in FWD. Consistent with the results in animals, a significant decrease of aqp5 and an increase of trpv4 and miR-185-3p expression was observed in FWD autopsy cases. Due to their small size, miRNAs are less susceptible to postmortem degradation than mRNA. Accordingly, the investigation of intrapulmonary miR-185-3p expression may differentiate between FWD and SWD.

研究分野：法医学

キーワード：溺死 死因診断マーカー micro RNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

法医解剖で溺死を診断する場合、鼻口部の細小泡沫や肺の膨隆、胸水の貯留など所見に加えて、プランクトン検査で肝臓や腎臓などの大循環系臓器から珪藻類を検出することで確定診断している。しかしながら、これらの所見は死後変化の影響によって観察されない場合もあり、さらに溺水場所や季節によっては水中の珪藻類が少なく、プランクトン検査による証明が困難となる。そのため、死後変化の影響やプランクトンの有無に左右されない新たな溺死診断法の開発は急務といえる。これまで様々な溺死診断に有用な分子マーカーについての研究が報告されているが、いまだ法医実務への応用には至っていない。

死後変化の影響を受けにくい分子として近年、マイクロ RNA (miRNA) が着目されている。miRNA は蛋白質をコードしない約 20 塩基程度の低分子 RNA で相補的な配列を有する mRNA に結合することで翻訳を抑制あるいは mRNA を分解する。法医学領域では、体液識別や心臓性突然死の診断のための指標として検討されている。本研究では、溺死で特異的に変動する肺の遺伝子を網羅的に解析し、溺死診断マーカーを探索する。さらに、その遺伝子の発現調節をしている miRNA を解析することで分子生物学的指標に基づいた新たな溺死の診断法の確立を目指す。

### 2. 研究の目的

これまで miRNA をターゲットとした溺死の研究報告はほとんどない。そこで本研究では、溺死モデル動物を用いて溺死診断に有用な遺伝子だけでなく、FWD 特異的または SWD 特異的に変動する遺伝子を同定し、さらに同定された遺伝子の発現を調節する miRNA を探索する。同定された溺死特異的変動分子について実際の剖検例から得られた試料でも検討し、法医実務に応用可能な溺死診断指標、FWD と SWD の鑑別診断のための指標としての有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 溺死モデルマウスの作製

深麻酔下で前頸部の皮膚を切開後、気管を露出させ、経気管的に 30 ml/kg の淡水 (純水) または海水 (3.5%塩化ナトリウム水溶液) を注入することで作製した。また、死後に水中に遺棄された事例を想定して、安楽死させた後、気管内に淡水または海水を注入した死後浸漬群も作製した。死亡 1 時間後に肺を採取し、各分析用途に合わせて保存した。

#### (2) 溺死特異的に発現遺伝子解析

モデルマウスから採取した肺から miRNA を含む total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにより網羅的解析を行った。網羅的解析によって発現変動が認められた遺伝子について TaqMan assay による Real time RT-qPCR にて遺伝子発現解析を行い、溺死特異的遺伝子を同定した。同定された遺伝子を標的とする miRNA について miRNA データベース (miRbase、miRanda、Targetscan) を用いた *in silico* スクリーニングによって候補 miRNA を探索した。候補 miRNA についても TaqMan assay による Real time RT-qPCR にて発現解析を行った。

#### (3) 溺死剖検例への応用

溺死モデルマウスで同定された新規マーカーを標的として実際の溺死剖検例の肺についても同様に遺伝子解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 溺死モデルマウスを用いた溺死特異的変動遺伝子の網羅的解析

溺死モデルマウスのうち FWD、SWD、対照群の肺を採取し、miRNA を含む total RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、FWD では 3400 遺伝子、SWD では 1050 遺伝子が対照群と比較して 1.5 倍以上または 0.66 倍以下の発現変動を認めた。GO 解析によれば、炎症反応、低酸素誘導、イオンチャネル関連遺伝子群が溺死特異的に変動しており、溺水吸引による肺障害や酸素欠乏が原因と考えられた。一方、FWD のみにはアポトーシス関連や浸透圧関連遺伝子群に発現変動が認められ、淡水流入による肺胞内の浸透圧変化が影響したものと考えられた。また、SWD のみには heat shock protein (HSP) など分子シャペロン関連遺伝子群に発現変動がみられ、海水流入により生じた変性蛋白質に対するストレス応答による可能性が考えられた。

##### (2) 淡水溺死特異的変動遺伝子の発現解析

上記網羅的遺伝子発現解析によって発現変動が確認された遺伝子のうち、淡水溺死特異的遺伝子として *aqp5*、*trpv4*、*trpm1*、海水溺死特異的遺伝子として *hspb1* について Real time RT-qPCR を行った。その結果、淡水溺死特異的に *aqp5* は有意に発現が減少し、*trpv4* は発現が増加した。さらに、FWD 群で *trpm1* の有意な発現上昇がみられたが、淡水死後浸漬（淡水）群でも同様に有意に発現が上昇していた。*aqp5* については肺胞内に低浸透圧な水である淡水が流入すると浸透圧変化によって型肺胞上皮細胞の細胞膜上に存在する AQP5 を通って水が血管内に入ることによる血液希釈を防ぐための生体反応として *aqp5* の発現が抑制されると考えられた。TRPV4 は型肺胞上皮細胞に発現し、浸透圧センサーとして働くことが知られている。先行研究でマウスの肺上皮細胞を低浸透圧環境下で培養すると TRPV4 の活性化による細胞内のライソソームの働きで AQP5 の発現が減少することを報告されている。したがって、低浸透圧刺激で *trpv4* 発現が誘導され、活性化されることで細胞外からカルシウムイオンを引き込み、細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇によりライソソームの働きが活発化し、AQP5 を分解している可能性が考えられた。*trpm1* については詳細な機能については明らかになっていないが、淡水流入による低浸透圧刺激により遺伝子発現が誘導されたものとする。しかしながら、死亡直後の淡水流入にも反応していることから FWD の診断には有用ではないことが明らかとなった。

*hspb1* 発現では、SWD 群において FWD 群を除いた群と比較して有意な発現上昇がみられた。*hspb1* は SWD 群で有意な発現上昇がみられたが、FWD 群との間に有意差を認めなかったことから溺水の種別は判定できないものの、SWD の診断には有用である可能性が示唆された。

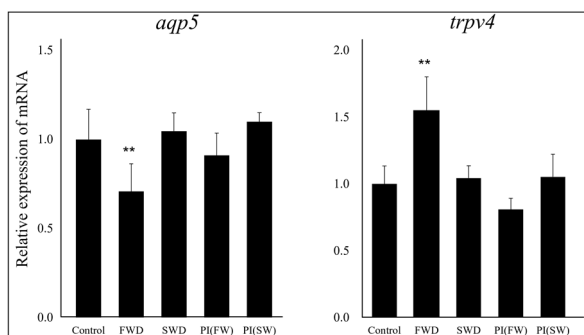


図 1 mRNA 発現解析 (マウス)

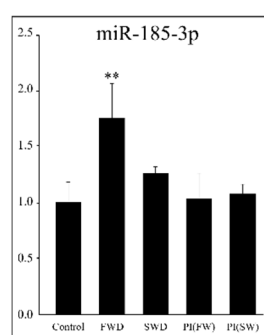


図 2 miRNA 発現解析 (マウス)

##### (3) 溺死特異的遺伝子に關与する miRNA 発現解析

同定された溺死特異的発現子のうち、*aqp5* について miRNA のデータベースを用いた *in silico* スクリーニングを行ったところ、miR-96-5p と miR-185-3p が候補 miRNA として検出された。各

miRNAについて発現解析を行ったところ、miR-96-5pは各群で発現に差は認められなかったが、miR-185-3pはFWD群で有意に発現が上昇していた。本結果からFWDにおけるAQP5発現抑制の過程の中にmiR-185-3pの結合による翻訳抑制が関与している可能性が考えられた。

#### (4) 溺死剖検例への応用

溺死モデルマウスを用いた実験で得られた結果をもとに、*aqp5*、*trpv4*、miR-185-3pについて実際の溺死剖検例の肺について遺伝子発現解析を行ったところ、動物実験と同様の結果を得ることができた。したがって、各遺伝子はFWDの診断マーカーになる可能性が示唆された。ただし、法医学では死後変化による遺伝子の分解も考慮する必要がある。*aqp5*は淡水溺死による発現変動だけでなく、死後変化の影響によって発現が低下している可能性がある。一方で*trpv4*やmiR-185-3pは、死後変化の影響により遺伝子が分解されると診断が困難になるものの発現が増加していればFWDと診断できる可能性が高い。さらに、miRNAは約20塩基前後の低分子RNAで、mRNAよりも死後安定しているとされている。よってmiR-185-3pはFWDとSWDの鑑別に有用である可能性が考えられた。

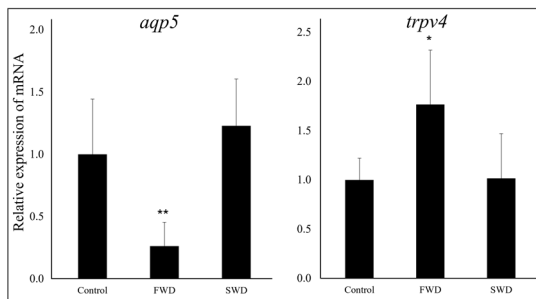


図3 mRNA発現解析（剖検例）

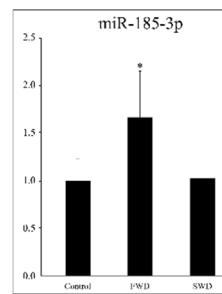


図4 miRNA発現解析（剖検例）

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 前田一輔, 林 敬人, 中前琢磨, 肥後恵理, 小片 守
2. 発表標題 淡水溺死と海水溺死の鑑別診断に有用な新規分子マーカーの検索
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

〔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
---------	---------