

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：37116

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19653

研究課題名（和文）寒冷応答miRNA発現プロファイルによる凍死診断の革新的アプローチ

研究課題名（英文）Innovative approach to diagnosis of fatal hypothermia using cold-responsive miRNA expression profiles

研究代表者

梅原 敬弘（Umehara, Takahiro）

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60617421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、腸腰筋の初代培養細胞を用いて、miRNA mimic及びmRNA siRNAによるmiRNA-mRNAの分子間相互作用を検討した。極度の低体温において、miR-203aの標的遺伝子である低酸素関連遺伝子群は有意な発現増加を示した。miRNA mimicを用いた分子動体解析は、miR-203a過剰発現に伴う低酸素関連遺伝子群の有意な発現減少を示唆した。低酸素関連遺伝子群はアポトーシスや血管新生に関与しており、極度の低体温においてmiR-203a-低酸素関連遺伝子群軸の活性化により、低酸素により誘導される組織壊死を防ぐ生体防御機構が働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凍死の診断は、特異的な所見がなく主観的な所見に頼らざるを得ないため、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重要な課題である。本研究では、死後変化の影響を受けにくいmicroRNAを中心とした低体温の分子メカニズムの一端を解明できた。これらの成果は、法医学分野にとどまらない成果であり、それら遺伝子群を凍死特異的な新しい分子診断マーカーとして実務応用できる可能性が非常に高いものと考えられる。また、これらの成果の実務展開により、精度が高く、刑事裁判資料等の使用に耐えうる司法解剖鑑定書・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）：In this study, we investigated miRNA-mRNA molecular interactions using miRNA mimic or mRNA siRNA in primary cultured iliopsoas muscle cells. The expression of hypoxia-related genes, which are target genes of miR-203a showed a significant increase in extreme hypothermia. Molecular dynamic analysis using miRNA mimic revealed significantly decreasing expression of hypoxia-related genes with miR-203a overexpression. The hypoxia-related genes whose expression changes were observed are involved in apoptosis and angiogenesis. Accordingly, this study revealed that a biological defense mechanism via activation of the miR-203a-hypoxia-related genes axis works to prevent necrosis induced by extreme hypothermia. Furthermore, it was suggested that miR-203a and hypoxia-related genes may serve as novel molecular markers to complement the definitive diagnosis of fatal hypothermia.

研究分野：法医学

キーワード：低体温 低酸素 microRNA

## 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、特異的所見がないため死因究明が難しく、寒冷暴露により生じる複数の所見を組み合わせた除外診断で判断されてきた。しかし、寒冷暴露で認められる所見は凍死以外の死因でも生じるため、他の死因との鑑別に苦慮しているのが現状であり、凍死特異的所見の探索が必要である。近年、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。精度の高い凍死診断法を確立するためには、組織・細胞において、寒冷暴露により誘導された極度の低体温で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重要である。

先行研究において、凍死の動物モデルを作製し、寒冷暴露時に活性化する熱産生組織である腸腰筋において、マイクロアレイを用いて、体温依存的 miRNA の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、miR-203a-3p をはじめ複数の miRNA が極度の低体温において発現変化を示し、それら miRNA が標的とする複数の遺伝子群の発現変化を認めた。

## 2. 研究の目的

本研究は、腸腰筋の初代培養細胞を用いて、miRNA mimic あるいは siRNA による分子動態解析を行い、miRNA-mRNA の分子間相互作用を検討する。また、miRNA を中心とした極度の低体温における生体防御の階層的遺伝子発現制御機構を解明することで、腸腰筋における寒冷暴露及び凍死特異的に発現する miRNA 及び mRNA を同定する。さらに、寒冷応答 miRNA プロファイリングを用いて、死後変化に耐えうる凍死診断の革新的アプローチを確立する。

## 3. 研究の方法

### (1)低体温動物モデルの作製

9週齢雄性 Wistar ラット 24匹を、4グループに分け各群 n=3~6とした。腹腔内麻酔投与30分後、寒冷暴露(約4℃)あるいは室温暴露(約23℃)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℃に到達した時点で安楽死させる。同様に、中等度低体温群(Moderate)・重度低体温群(Severe)も直腸温がそれぞれ22℃、12℃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℃であった。安楽死後、直ちに腸腰筋を摘出し、Total RNAを抽出する。

### (2)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。

### (3)quantitative real-time PCR (qPCR)による mRNA・miRNA 発現動態解析

TotalRNA 及び miRNA は、miRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Prime-Script® RT Reagent Kit (Takara)及び 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)初代培養細胞を用いた miRNA mimic 及び mRNA siRNA による遺伝子動態解析

ラット腸腰筋より Skeletal Muscle Dissociation Kit を用いて腸腰筋細胞を分離し、Skeletal Muscle Cell Growth Medium (PromoCell) を用いて初代細胞培養を行った。miRNA mimic 及び mRNA siRNA を合成し、mimic 及び siRNA を初代培養細胞にトランスフェクションしたのち回収し、Total RNA を抽出する。その後、上記(3)の方法により、目的遺伝子 (miRNA 及び mRNA) の発現及び遺伝子間相互作用の検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1)腸腰筋において体温低下に伴い発現減少した miRNA

マイクロアレイ解析において、8つの miRNA がコントロール群と比較して重度低体温群で2倍以上の発現減少を示した (Table 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。そこで、以前 NGS を用いた網羅的遺伝子発現解析により、重度低体温群で発現が増加した mRNA 群と、miRNA が標的とする 200以上の遺伝子群を比較したところ、共通する遺伝子として Socs3 が抽出され、miR-203a-3p の標的遺伝子と予測された (Table 2)。

qRT-PCR において、miR-203a-3p は重度低体温群特異的な発現変化を認めなかったが、体温

低下に伴い発現は減少した (Fig. 1A)。一方、*Socs3* は、コントロール、軽度、中等度低体温群と比較し、重度低体温群で有意な発現増加を認めた (Fig. 1B)。体温低下に伴い *miR-203a-3p* 発現が減少し、*Socs3* 発現が増加したことは、*Socs3* の発現が *miR-203a-3p* によって制御されている可能性を支持するものであった。

Table 1. Microarray fold change analysis. Expression levels of eight miRNAs were decreased to less than half in severe hypothermia compare with ctrl.

Symbol	Fold change (Ctrl vs Severe)	Regulation	mirbase accession No
<i>rno-let-7c-1-3p</i>	3.3	down	MIMAT0017087
<i>rno-miR-203a-3p</i>	3.0	down	MIMAT0000876
<i>rno-miR-30c-1-3p</i>	2.9	down	MIMAT0004719
<i>rno-miR-3550</i>	3.1	down	MIMAT0017808
<i>rno-miR-3552</i>	4.0	down	MIMAT0017813
<i>rno-miR-3588</i>	5.0	down	MIMAT0017887
<i>rno-miR-433-5p</i>	2.7	down	MIMAT0017192
<i>rno-miR-671</i>	10.2	down	MIMAT0005326

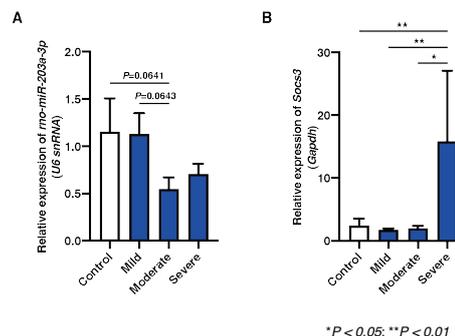
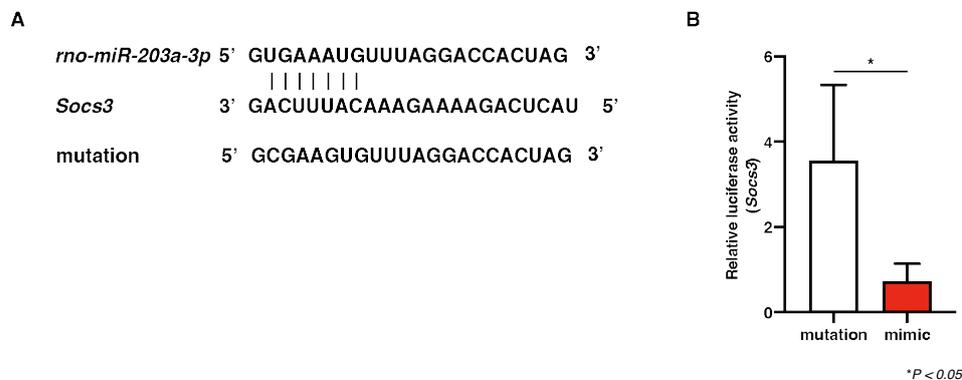


Table 2 Result of GO analysis

GeneID	mirbase accession No	p-value	Symbol	Synonyms	GO_ID	description
89829	MIMAT0000876 ( <i>rno-miR-203a-3p</i> )	0.046511628	<i>Socs3</i>	Cish3 Socs-3 Ssi-3	GO:1990830;GO:0060708;GO:0060707;GO:0060674;GO:0060670;GO:0051384;GO:0050728;GO:0046627;GO:0046426;GO:0045597;GO:0045595;GO:0043434;GO:0043066;GO:0042532;GO:0042493;GO:0035556;GO:0034097;GO:0032868;GO:0032570;GO:0032496;GO:0032355;GO:0032094;GO:0031100;GO:0019221;GO:0016567;GO:0014070;GO:0010332;GO:0009968;GO:0009725;GO:0009617;GO:0009408;GO:0007568;GO:0007259;GO:0007165;GO:0006469;GO:0005737;GO:0005622;GO:0004860;GO:0001932;GO:0001784;GO:0001666;GO:0001558	suppressor of cytokine signaling 3

### (2) *miR-203a-3p* による *Socs3* 発現制御

ルシフェラーゼレポーターアッセイによる *miR-203a-3p* の *Socs3* 発現制御を、3T3 細胞を用いて検討した。Fig. 2A は、*miR-203a-3p* が *Socs3* を認識する seed 配列である。本検討では、*miR-203a-3p* mimic を作製した。Mutation は、*miR-203a-3p* のシード配列に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。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、*miR-203a-3p* mimic が効果的に *Socs3* の発現を抑制したことが示唆された (Fig. 2B)。

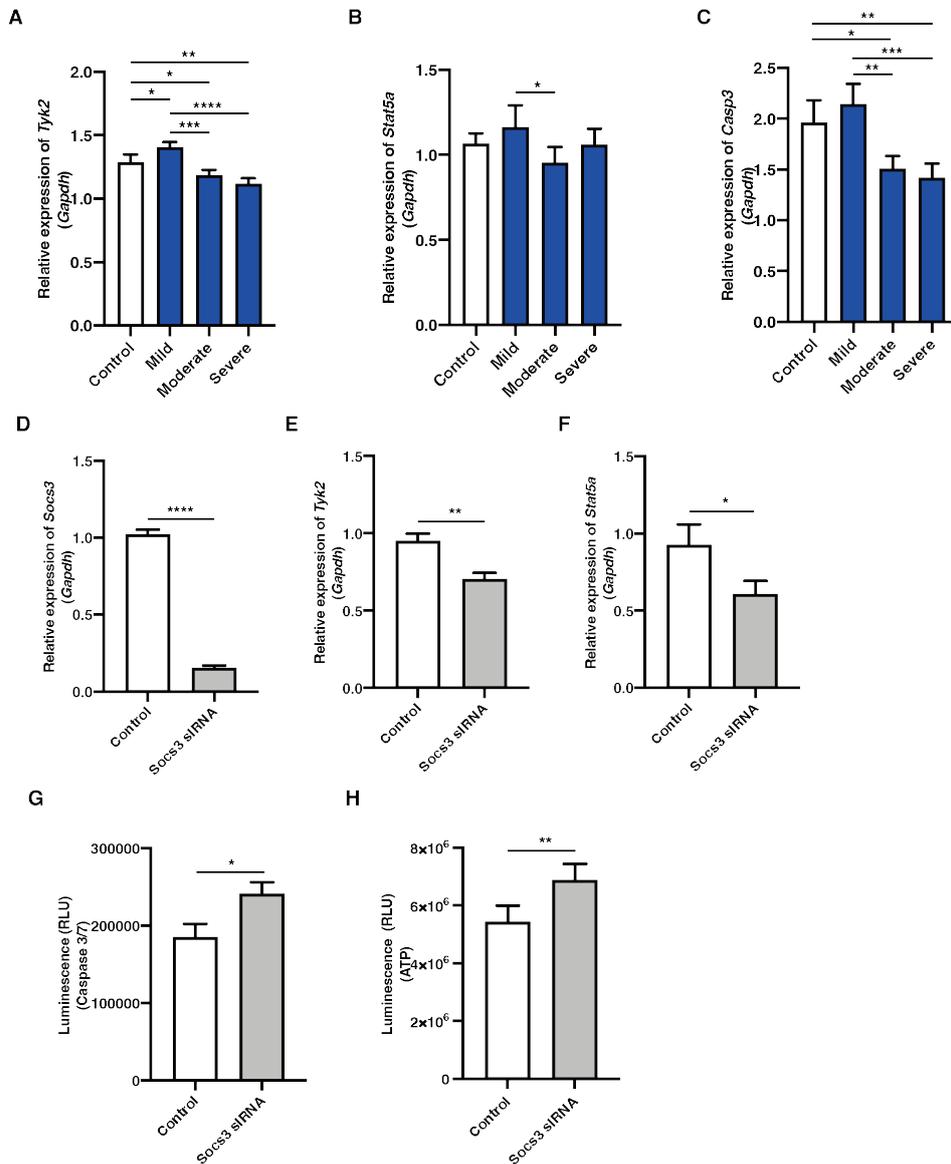


### (3) *miRNA* 標的遺伝子の不活性化により誘導されたアポトーシス

KEGG にて *Socs3* が関与する Pathway を検討したところ、*JAK-stat* シグナリングパスウェイに關与することが示唆されたため、*Tyk2* と *Stat5a* の発現を検討したところ、両遺伝子は有意な発現変化を示した (Fig. 3A-B)。また、*JAK-stat* シグナリングパスウェイは抗アポトーシスに關与するため、*Casp3* 発現を検討したところ、コントロール、軽度低体温と比較し、中等度、重度低体温群で有意な発現減少を認めた (Fig. 3C)。これらの結果は、体温低下に伴いアポトーシスが抑制されたことを示唆する。

*Socs3* が *JAK-STAT* シグナリングパスウェイの活性に關与するかを検討するために、*Socs3* の発現を抑制する siRNA を作製し、腸腰筋細胞へのトランスフェクションを行い、*Tyk2* 及び *Stat5a* の発現を検討した。その結果、*Socs3* 発現抑制に伴い、両遺伝子とも有意な発現減少を認めた (Fig. 3D-F)。

最後に、*Caspase-Glo3/7* assay によりカスパーゼが有するプロテアーゼ活性及び ATP を測定した。その結果、*Socs3* 発現抑制に伴い、*Caspase3/7* 活性及び ATP は有意に増加した (Fig. 3G-H)。これらの結果は、*Socs3* の不活性化がカスパーゼ活性を増加させ、アポトーシスを促進したことを示唆する。



\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$

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增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、凍死診断の一助になりうるものとする。

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, Mori Ryoichi, Murase Takehiko, Tanaka Toshiko, Kasai Kentaro, Ikematsu Kazuya, Sato Hiroaki	4. 巻 59
2. 論文標題 rno-miR-203a-3p and Mex3B contribute to cell survival of iliopsoas muscle via the Socs3-Casp3 axis under severe hypothermia in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102150 ~ 102150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102150	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅原 敬弘
2. 発表標題 miR-203a-3p contributes to cell survival of iliopsoas muscle cells via the Socs3-Casp3 axis under severe hypothermia in rats
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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 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（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 miR-203a-3p may be contributed to angiogenesis of iliopsoas muscle via the Hif1a-Maff axis and Vegfa under severe hypothermia in rats
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 凍死診断に資する体温依存的遺伝子発現解析による新規分子マーカーの同定
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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)	
研究分担者	佐藤 寛晃  (Sato Hiroaki)  (50441845)	産業医科大学・医学部・教授    (37116)	

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