

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670354

研究課題名(和文)興奮性譫妄による急死の解明に関する分子病態学的研究

研究課題名(英文)Study on molecular pathology in sudden death due to Excited Delirium

研究代表者

舟山 真人(FUNAYAMA, Masato)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40190128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は制圧後の突然死のメカニズム解明の一助としてmicroRNAを指標に、特定のストレスに対し客観的評価指標を探ることを試みた。ラットに対して3種類のストレス負荷処置を行い、加えてストレス負荷時間を変えることで、時間的要素を加味させた。microRNA測定の方法として、血清ではマイクロアレイを行った後でqRT-PCRを行い、心筋では次世代シーケンシングを使用した網羅的解析を行った。本研究結果から、運動後の拘束ストレスにより発現量が変化するmicroRNAがあることが示された。加えてストレス強度の違いによって発現するmicroRNAが異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRs) are increasingly associated with various diseases and biomechanisms, we studied serum miRs to find physical stress markers. To demonstrate changes in serum and cardiac miR levels when physical stress is applied, we constructed three stress modalities using rats: alcohol intake, treadmill running and restraint. As methods of miR measurement, qRT-PCR was performed after a microarray with serum. In addition, a comprehensive analysis using next-generation sequencing was performed in myocardium. This study showed that there are miRs whose expression level changes due to constraint stress after exercise. It was also suggested that different miRs were expressed depending on the different stress.

研究分野：法医学

キーワード：興奮性譫妄 microRNA 拘束 実験モデル マイクロアレイ 次世代シーケンシング

1. 研究開始当初の背景

1~2年に1度、暴れている人を警察官や医療関係者が押さえつけ暫く拘束しているうちに、急に意識を失い、そのまま死に至るといった事件が新聞報道される。また報道にならなくとも、これまでこういったケースを経験してきた法医学者も少なくないであろう。剖検上、致命的傷病変が確認されない場合、更に胸腹部への制圧者による強かつ長い圧迫がなければ、直接死因として急性循環不全と診断されるかもしれない。ただ法医学的に問題になるのは、死亡時に第三者による拘束ストレスが加えられている点である。特に警察官が関与した場合は、拘束ストレスと死との間の因果関係が刑事・民事いずれの法廷でも問われることになる。ところで、このような死亡を「興奮性譫妄」という概念でとらえる考えが法医学者の一部にある。これは死亡前に加えられた外的ストレスが交感神経系や視床下部-下垂体-副腎系といったストレス反応系を刺激し、血圧上昇や不整脈を介し、突然死に至るという考えである。しかしこの考えは臨床医学に基づく推測にすぎず、少なくとも剖検上はその根拠を示すことはできない。そこで、本研究はmicroRNA(miRNA)をメインとした、分子病態学的アプローチからの視点による実験系を構築した。ノンコーディングRNAであるmiRNAは、約20塩基長の非常に短い一本鎖RNAであり、それゆえに一部の種類においては死後も残存することが確認されている。死亡時の生体反応を反映し、死後もその情報をとどめる可能性を持つmiRNAは、法医学的に非常に有用なバイオマーカーとなる可能性を持つ。このマーカーを基に、運動後の拘束ストレスと交

感神経系との定量的関係を探り、興奮性譫妄によるであろう死の解明に迫ろうというものである。

2. 研究の目的

近年法医学関係者の間で知られるようになってきた興奮性譫妄(Excited Delirium)に対し、実験動物(ラット)に一定量の運動負荷後、更に身体拘束を行い、mRNAおよび、新しいバイオマーカーとして期待されるmicroRNA(miRNA)発現量を中心とした分子学的探索を行うことで、その病態解明を行う。なお、運動負荷時、薬物(エタノール)の影響の有無も考慮する。

具体的には

(1) 法医実務で希ならず経験する体動後の制圧・拘束中の急死例に対応するストレス負荷モデルを実験動物(ラット)を用いて構築する。

(2) 法医症例に利用可能なmicroRNAをストレス指標に選択し、運動後の拘束ストレスがmicroRNA発現に与える影響を網羅的解析により検討する。

(3) 運動ならびに拘束負荷時間を変化させることで、ストレス強度の違いによるmicroRNA発現の変化が生じ得るかを検索する。

3. 研究の方法

運動状態をトレッドミル負荷で、その後の拘束を水袋による圧迫でモデル化することで症例の再現を試みた。米国ではコカイン使用中が多いが、わが国では、このような死亡例において酩酊状態のことが少なくないため、ストレス負荷群ラットすべてに最初に21%エタノールを3.8g/kg相当経口投与した。負荷の種類は以下の4群にわけ、かつストレス

負荷をしないコントロール群(C)を加えて全5群とした。

- (1) 20分間の運動のみの群(R20)
- (2) 90分間の運動のみの群(R90)
- (3) 20分の運動ののち2kgの水袋で20分間圧迫群(P20)
- (4) 90分の運動ののち2kgの水袋で90分間圧迫群(P90)。

microRNA発現量の測定は血清と心筋で行った。血清ではマイクロアレイ後に、群間で発現量の差が多いmicroRNAに加え、心臓や筋組織に関連するmicroRNAを8種(miR-1, -24, 133a/b, -199a, -208a, -212, -296-5p)を選び、定量リアルタイムポリメラーゼチェーンリアクション法(quantitative real time polymerase chain reaction; qRT-PCR)を行った。また心筋に関してはC群・R90群・P90群について左室心筋のtotal RNAを使用し、microRNA発現について次世代シーケンシングを行った。

qRT-PCRではサンプルサイズが小さく正規分布が保障されないため、ノンパラメトリックな検定方法を採用した。運動・拘束ストレス処置群での比較はまずクラスカル・ワリス検定を行い、その後スティール・ドゥワス検定で2群間の比較を行った。エタノール摂取群と生理食塩水摂取群の比較はマン・ホイットニーU検定を使用した。次世代シーケンシングではサンプルサイズが各群間で異なることから、テューキー・クレーマー検定を使用した。

本研究は東北大学動物実験委員会の承認(承認番号:2013医動-140-1および2014-医動-142)を得たうえで、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に従って行った。

4. 研究成果

マイクロアレイとqRT-PCRによりR20群・

P20群にて血清miR-199aが上昇し、R90・P90群にて血清miR-1, -24, 133a/bがそれぞれ上昇した。ただし血清microRNAでは運動ストレスと運動後の拘束ストレス間の違いは明らかにならなかった。次世代シーケンシングを使用した心筋microRNAのRNA-seqでは、miR-16-5p, -22-3p, -26-5p, -29a-3p, -29b-3p, 126a-3p, -143-3pの7種のmicroRNAについて有意差を認めた。C群・R90群それぞれとP90群との比較でP90群ではmiR-126a-3pで有意な上昇、miR-29a-3pで有意な低下がみられた。

血清と心臓とのmicroRNA発現量の変化については、血清のqRT-PCRにおいて使用した8種のmicroRNA中5種は有意差があったが、心臓のmicroRNAでは有意な変化を認めなかった。一方で、心臓microRNAで有意差のあった7種では、マイクロアレイの結果で各群に発現量の差が認められるものもあった。

本研究結果から、運動後の拘束ストレスにより発現量が増えるmicroRNAがあることが示された。加えてストレス強度の違いによって発現するmicroRNAが異なることが示唆された。ただし、運動のみのストレスと運動後拘束ストレスとの差は出ていない。今回のストレスモデルは条件が複雑であり、拘束ストレスのみを負荷した群を作ることによって拘束ストレスがmicroRNAに与える影響を調べる必要があると思われた。また心筋をターゲットとした次世代シーケンシング解析では7種類のmicroRNAについて有意な変化が認められた。血清と心臓とのmicroRNA発現量の変化の相関についてはサンプルサイズが小さく、今後PCR等によって個別の確認が必要と思われた。

本研究結果は運動後の拘束ストレスとある種のmicroRNA発現変動の関連性を示唆する

ものである。しかし蓋然性を持ってそれが診断マーカーになると判断し、かつ実務応用に利用するには、ストレス負荷時間やストレス自体の負荷強度を細分化し、microRNA 発現への影響を更に詳しく検討していきたい。加えて死後も比較的安定と考えられている microRNA ではあるが、実務応用には microRNA ごとの死後経過に伴う変性について実験モデルを用いて確認する必要があると考えられる。

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)

[雑誌論文](計5件)

Hosoya T, Hashiyada M, Funayama M. Acute Physical Stress Increases Serum Levels of Specific microRNAs. *microna* 2016; 5: 50-56. 査読有り DOI: 10.2174/2211536605666160602104659

橋谷田真樹, 赤根敦, 松本智覧, 吉村澄学, 時安太久磨, 細谷 直, 舟山真人. ストレスモデルラットにおける microRNA の発現変化. *DNA 多型* 2016; 24 : 218-221. 査読無し. <http://dnapol.org/publication>

Hashiyada M, Hosoya T, Akane A, Matumoto T, Yoshimura S, Tokiyasu T, Funayama M. The comprehensive analysis of microRNA in hearts of stress model rat. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2015; 5: e557-558. 査読有り. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.220>

橋谷田真樹, 赤根敦, 吉田学, 吉村澄学, 時安太久磨, 細谷 直, 舟山真人. 死後経過時間に伴うラット血中 microRNA の挙動. *DNA 多型* 2015; 23 : 169-170. 査読無し. <http://dnapol.org/publication>

橋谷田真樹, 臼井聖尊, 大内 司, 林崎義映, 細谷 直, 池田知哉, 猪狩 由, 荒牧友美, 境 純, 舟山真人. 死後経過時間推定マーカーとしての microRNA の評価. *DNA 多型* 2014; 22 : 178-180. 査読無し. <http://dnapol.org/publication>

[学会発表](計3件)

Hosoya T, Aramaki T, Ikeda T, Igari U, Hayashizak Y, Ohuchi T, Sakai J, Usui K, Hashiyada M, Funayama M. Acute physical and restraint stress increases miR-16 expression in rat hearts. Student Poster Forum. The 98th Congress of the Japanese Society of Legal Medicine. 2014, June 16-20, Fukuoka, 福岡国際センター.

橋谷田真樹, 赤根敦, 松本智覧, 吉村澄学, 時安太久磨, 細谷 直, 舟山真人. ストレスモデルラットにおける microRNA の発現変化. 日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会 2015, 11.19-20, 岡山(岡山大創立 50 周年記念館).

橋谷田真樹, 赤根敦, 吉田学, 吉村澄学, 時安太久磨, 細谷 直, 舟山真人. 死後経過時間に伴うラット血中 microRNA の挙動. 日本 DNA 多型学会第 23 回学術集会 2014, 11.26-28, 名古屋(ウインク愛知).

[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]

特になし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

舟山 真人 (FUNAYAMA, Masato)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 40190128

(3)連携研究者

大内 司 (OUCHI, Tsukasa)
東北大学・医学系研究科・技術員
研究者番号: 90712266

橋谷田 真樹 (HASHIYADA, Masaki)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40374938

(4)研究協力者

細谷 直 (HOSOYA, Tadashi)