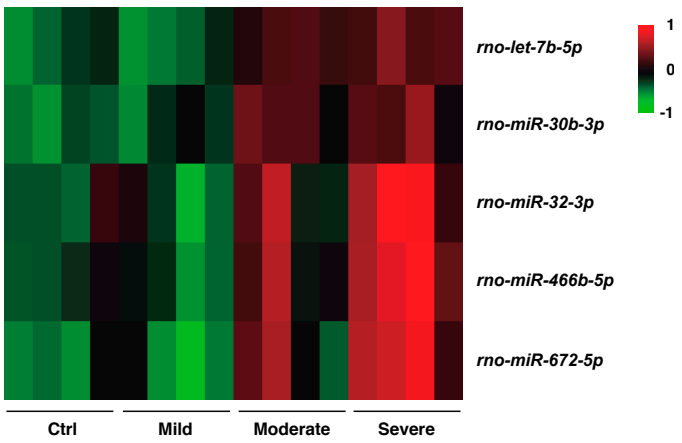
109　遺伝子発現プロファイルによる新規凍死診断法の開発	梅原　敬弘

【目的】凍死の診断は、寒冷暴露されたことで生じる左右心臓血の色調差や胃十二指腸粘膜下出血、紅色調死斑などの所見を組み合わせることで行われるが、他の死因においてもこれらの所見は認められることがあるため、凍死特異的な所見とはいえず、確定診断を行うことは難しい。ところで、法医学検査に用いられる検体は、死後経過時間を伴うため新鮮でないことが多く、そのような検体を用いた検査は、必ずしも死亡時の状態を反映しているとは限らない。従って、より死後変化に耐えうる分子診断マーカーの探索が必要となる。近年、死後変化に耐えうる分子として microRNA（miRNA）の存在が注目されてきた。そこで本研究は、寒冷環境下での恒常性維持に関与する褐色脂肪組織（BAT）における網羅的 miRNA・mRNA 発現検討を行い、死因究明が困難な病態の一つである凍死の診断に有用な分子診断マーカーを同定することで、死後変化に耐えうる新しい凍死の分子病理学的診断法を確立する。

【方法】コントロール群（Ctrl）、軽度低体温群（Mild）、中等度低体温群（Moderate）、重度低体温群（Severe）の動物モデルを作製した。軽度・中等度・重度低体温群は、直腸温がそれぞれ 30℃・22℃・12℃になった時点で安楽死させ、直ちに BAT を摘出し、Total RNA を抽出した。コントロール群の直腸温は約 37℃であった。マイクロアレイ及び次世代シークエンス（NGS）を用いて、網羅的 miRNA 及び mRNA 発現解析を行った。詳細な発現検討は、quantitative real-time PCR（qRT-PCR）を用いて行った。

【結果】マイクロアレイ解析において 5 つの miRNA が、コントロール群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した。qRT-PCR において、*rno-let-7b-5p* の発現が体温低下とともに増加し、コントロール群と比較して中等度及び重度低体温群で有意な増加を示した。NGS 解析において、469 の mRNA がコントロール、軽度、中等度低体温群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した。さらに、qRT-PCR において、*Pmaip1* 及び *Pgc1α* の発現が、重度低体温群のみで有意な増加を示した。本研究で同定された miRNA 及び mRNA は、凍死診断を補完する新規分子診断マーカーになりうる可能性が示唆された。

体温低下に伴い発現増加した 5 つの miRNA



109. 遺伝子発現プロファイルによる新規凍死診断法の開発

梅原　敬弘

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 社会医療科学講座 法医学分野

Key words：凍死，恒常性維持，死後変化，microRNA

緒　言

凍死の診断は、寒冷暴露されたことで生じる左右心臓血の色調差や胃十二指腸粘膜下出血、紅色調死斑などの所見を組み合わせることで行われる。しかし、これらの所見は主観的であることに加え、凍死以外の死因、例えば一酸化炭素中毒や青酸中毒においても認められるため、凍死特異的な所見とはいえず、確定診断を行うことは難しい。これまで、凍死診断を補完するマーカーを同定するために様々な研究が行われてきた。著者らは、mRNA を指標とした凍死特異的に発現する分子マーカーの探索を行い報告した［1，2］。ところで、法医学検査に用いられる検体は、死後経過時間を伴うため新鮮でないことが多く、そのような検体を用いた検査は、必ずしも死亡時の状態を反映しているとは限らない。物理的に脆弱である mRNA は、寒冷環境下においては比較的安定ではあるが、より死後変化に耐えうる分子診断マーカーの探索が必要となる。近年、死後変化に耐えうる分子として microRNA（miRNA）の存在が注目されている［3］。そこで、哺乳類において寒冷環境下での体温維持を行う褐色脂肪組織（BAT）における miRNA 及び mRNA 発現検討を行った。本研究は、凍死経過中の BAT における恒常性維持の分子メカニズムを解明し、死因究明が最も困難な病態の一つである凍死の診断に有用な分子診断マーカーを同定することで、死後変化に耐えうる新しい凍死の分子病理学的診断法を確立する。

本研究は、低体温動物モデルを作製し、マイクロアレイを用いて BAT における網羅的 miRNA 発現解析を行い、体温低下に伴い発現が増加する miRNA（*rno-let-7b-5p*）を同定した。さらに、次世代シークエンサーを用いて、BAT で凍死特異的に発現変動し、熱産生に関与する複数の mRNA を同定した。これら miRNA 及び mRNA は、凍死経過中の恒常性維持に関与する様々なバイオロジカルプロセスに関与しており、凍死の確定診断を補完する新規分子診断マーカーになりうる可能性が示唆された。

方　法

1. 低体温動物モデルの作製

9 週齢 Wistar 系雄性ラット 24 匹を、4 グループ（コントロール群（Ctrl）、軽度低体温群（Mild）、中等度低体温群（Moderate）、重度低体温群（Severe））に分けた（各群 n＝5～6）。三種混合麻酔薬の腹腔内投与 30 分後、寒冷暴露（4℃）あるいは室温暴露（約 23℃）し、経時的に直腸温を測定した。軽度・中等度・重度低体温群は、直腸温がそれぞれ 30℃・22℃・12℃になった時点で安楽死させた。コントロール群の直腸温は約 37℃であった。

2. マイクロアレイによる網羅的 miRNA 発現解析

安楽死後、直ちに褐色脂肪組織（BAT）を摘出し、miRNeasy mini kit（QIAGEN）を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA はバイオアナライザ（Agilent Technologies）による品質チェックを行った。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。解析は、GeneSpring v13（Agilent Technologies）を用いた。

3. 次世代シークエンス（NGS）による網羅的 mRNA 発現解析

安楽死後、直ちに BAT を摘出し、miRNeasy mini kit（QIAGEN）を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA はバイオアナライザによる品質チェックを行ったのち、NGS のためのライブラリを作製、イルミナ Miseq によりシークエンスを行った。解析は、StrandNGS（Strand Life Sciences）を用いた。

4. quantitative real-time PCR（qRT-PCR）による miRNA・mRNA 発現動態解析

miRNA は、TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific）を、Total RNA は、Prime-Script® RT Reagent Kit（Takara）を用いてそれぞれ cDNA 合成を行ったのち、TaqMan probe 及び SYBR Green I 法にて発現定量を行った。

結果および考察

1. 体温低下に伴い発現変動した miRNA

マイクロアレイ解析において、5 つの miRNA がコントロール群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した（表 1）。ここで、GeneSpring を用いて標的遺伝子を予測したところ、200 以上の mRNA が標的遺伝子候補として抽出された。

qRT-PCR において、体温低下に伴い *rno-let-7b-5p* の発現は増加し、コントロール群と比較して中等度及び重度低体温群で有意な発現増加を示した。また、*rno-let-7b-5p* の標的遺伝子と予測された *Casp3* が体温低下に伴い、有意な発現減少を示した（図 1）。

Casp3 は、アポトーシスの重要な因子である実行型カスパーゼの一つである［4, 5］。従って、寒冷環境下の BAT において、*let-7b-5p* が活性化することで *Casp3* の発現抑制を介して、アポトーシスを抑制することにより細胞生存率を上昇し、熱産生機能を亢進することが示唆された。

表 1. マイクロアレイ解析

Symbol	Fold change (Ctrl vs Severe)	Regulation	mirbase accession No
rno-let-7b-5p	**1.6**	**up**	**MIMAT0000775**
rno-miR-30b-3p	**1.6**	**up**	**MIMAT0004721**
rno-miR-32-3p	**1.8**	**up**	**MIMAT0017103**
rno-miR-466b-5p	**1.8**	**up**	**MIMAT0005278**
rno-miR-672-5p	**1.9**	**up**	**MIMAT0005327**

5 miRNAが、コントロール群と比較し、重度低体温群で1.5倍以上の発現増加を示した。Symbol欄は、miRNA名を示し、Fold change及びRegulation欄は、それぞれコントロール群と比較し重度低体温群で発現した倍数、発現増加を示す。

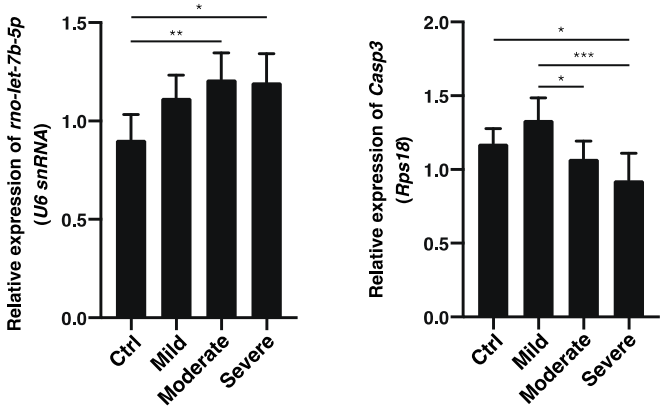


図 1. qRT-PCR による BAT の miRNA 及び mRNA 発現解析

左図）*rno-let-7b-5p* 発現。体温低下に伴い有意な発現増加を示した。

右図）*Casp3* 発現。体温低下に伴い有意な発現減少を示した。

内部標準遺伝子は、*U6 snRNA* 及び *Rps18* を使用した。統計処理は、GraphPad Software を用い、One-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test を行った。

P* <0.05、*P* <0.01、****P* <0.001。

2. 凍死特異的に発現変動した mRNA

NGS 解析において、469 の mRNA がコントロール、軽度、中等度低体温群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した。これらの mRNA に対し、StrandNGS を用いて GeneOntrogy（GO）解析を行ったところ、Response to hypoxia や Response to cold などのバイオロジカルプロセスに関与していることが示唆された（表 2）。

qRT-PCR において、Response to hypoxia 及び Response to cold に関与することが示唆された *Pmaip1*、*Pgc1α* 発現は、コントロール、軽度、中等度低体温群と比較し、重度低体温群のみで有意な発現増加を示した（図 2）。

Pmaip1 は、アポトーシスに関与し［6］、*Pgc1α* は、ミトコンドリアの生合成、エネルギー代謝、熱産生に関与していることが報告されている［7］。従って、極度の低体温に対する細胞生存や、恒常性維持のための熱産生により両 mRNA が活性化されたことが示唆された。

本研究で同定された miRNA 及び mRNA は、凍死経過中に生じる生体の恒常性維持に関与する様々なバイオロジカルプロセスに関与しており、凍死診断を補完する新規分子診断マーカーになりうる可能性が示唆された。凍死が疑われた症例における BAT で、これら miRNA 及び mRNA 発現を検討することで、より正確な凍死の死因究明が実現することが期待される。

表 2. GO 解析

Symbol	Gene name
Response to hypoxia	
Pmaip1	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
Rbm3	RNA Binding Motif Protein 3
Serpine1	Serpin family E member 1
Response to cold	
Pgc1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- alpha
Pnmt	Phenylethanoleamine N-methyltransferase

Response to hypoxia 及び Response to cold に関与する遺伝子を示す。

Symbol欄は、mRNA名を示し、Gene name欄は、遺伝子の正式名称を示す。

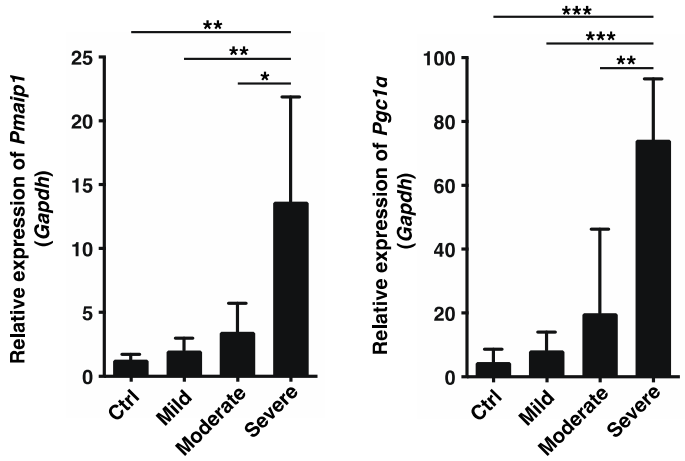


図 2. qRT-PCR による BAT の mRNA 発現解析

左図）*Pmaip1* 発現。重度低体温群のみで有意な発現増加を示した。

右図）*Pgc1α* 発現。重度低体温群のみで有意な発現増加を示した。

内部標準遺伝子は、*Gapdh* を使用した。統計処理は、GraphPad Software を用い、One-way ANOVA、Tukey's multiple comparison test を行った。

$*P < 0.05$、$**P < 0.01$、$***P < 0.001$。

文　献

1) Umehara T, Usumoto Y, Tsuji A, Kudo K, Ikeda N. Expression of material mRNA in the hypothalamus and frontal cortex in a rat model of fatal hypothermia. Leg Med (Tokyo). 2011 Jul;13(4):165-70. Epub 2011 Mar 5. PMID: 21377399 DOI: 10.1016/j.legalmed.2011.01.005

2) Umehara T, Murase T, Abe Y, Yamashita H, Shibaike Y, Kagawa S, Yamamoto T, Ikematsu K. Identification of potential markers of fatal hypothermia by a body temperature-dependent gene expression assay. Int J Legal Med. 2019 Mar;133(2):335-45. Epub 2018 Jun 29. PMID: 29959558 DOI: 10.1007/s00414-018-1888-3

3) Mayes C, Houston R, Seashols-Williams S, LaRue B, Hughes-Stamm S. The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. Leg Med (Tokyo). 2019 May;38:45-50. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30959396 DOI: 10.1016/j.legalmed.2019.03.007

4) Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. Cell. 2009 Sep 4. PMID: 19737514 DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.021.

5) Pradelli LA, Bénéteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. Cell Mol Life Sci. 2010 May. PMID: 20151314 DOI: 10.1007/s00018-010-0285-y.

6) Furukawa H, Makino T, Yamasaki M, Tanaka K, Miyazaki Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. PRIMA-1 induces p53-mediated apoptosis by upregulating Noxa in esophageal squamous cell carcinoma with TP53 missense mutation. Cancer Sci. 2018 Feb;109(2):412-21. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29168598 DOI: 10.1111/cas.13454

7) Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ. 2006 Dec;30(4):145-51. PMID: 17108241 DOI: 10.1152/advan.00052.2006