

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09275

研究課題名(和文) DNAマイクロアレイで得た低体温症マーカー候補の免疫組織化学的な法医実務応用

研究課題名(英文) Immunohistochemical analyses of candidate hypothermic markers in human forensic samples

研究代表者

高宮 正隆 (Takamiya, Masataka)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：30364334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス低体温症モデルのDNAマイクロアレイ解析で抽出された低体温症マーカー候補について、ヒト剖検例組織での発現動態を免疫組織化学的に検索し、実務応用の可能性を検討する。またマウス低体温症モデルのDNAマイクロアレイデータを対応分析し各臓器と各遺伝子の相関関係を考察する。マウスデータを用いた対応分析では「上昇遺伝子・減少遺伝子とも心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の病態に関与していること」などが示唆された。ヒト組織の免疫組織化学的検討では肺、副腎においてマウス実験で得られた低体温症マーカー候補が有用であることを示唆する所見を得ており、作業を継続中である。また随時、症例の追加を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの低体温症指標は非特異的なものが多い。分子生物学的が急速に進展している今日、新規手技の導入を積極的に進め、新規マーカーの検出を試みる事が求められる。本研究は低体温症診断の進展に大きく貢献するものと考えられる。なお本研究は低体温症DNAマイクロアレイデータの実務応用への展開であるが、大規模遺伝子検索の適用は低体温症には限らない。DNAマイクロアレイを用い、低体温症以外の様々な病態における大容量遺伝子データを得ることは可能である。本研究により大規模遺伝子解析からの法医実務への応用の道が切り開かれれば、将来、他の病態における法医学的なバイオマーカー検索が急速に進展するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We have analyzed the murine transcriptome of heart, lung, liver, adrenal gland, kidney killed by hypothermia using DNA microarray technology. These analyses indicated several candidate genes as forensic biomarkers of hypothermia. Expressions of these factors were investigated in human samples, with immunohistochemical methods. In addition, correspondence analysis was applied to murine DNA microarray datum of approximately 200000 genes.

Correspondence analysis demonstrated that both the increased and decreased genes affect the pathophysiology of the 5 organs. And, immunohistochemical expressions of lungs and adrenal glands would be useful in human forensic practices.

研究分野：法医学

キーワード：低体温症 DNA microarray法 免疫組織化学 対応分析 法医解剖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

岩手県を含む寒冷地域では年の半分以上の期間で容易に低体温症を生じうる環境にある。低体温症の剖検所見として鮮紅色の死斑、左右心腔内液の色調差、鮮紅色の肺、血液の凝固能保持、胃粘膜の Wischnewski 斑、尿の充満、ケトン体検出、また状況所見として矛盾脱衣等が報告されているが、これら所見は低体温症に非特異的である。したがって低体温症の診断は発見状況を加味した上で除外診断的に行われるのが一般的である。一方、近年では分子生物学の発展に伴い個体という統合された構造と機能を理解するため、遺伝子発現解析は網羅的に解析し、大容量の遺伝子発現情報を獲得するトランスクリプトーム解析が主流であり、代表的解析法に DNA マイクロアレイがある。これら状況を念頭に法医学的新規バイオマーカーの導入に向けた現実的な検討方法として研究代表者は、

- 1) マーカー候補の抽出に向け、マウスを用いた DNA マイクロアレイによる大規模遺伝子検索
- 2) 法医実務応用に向け、ヒト剖検例組織を用いたマーカー候補の免疫組織化学的検討

という2段階での検討を模索している。

低体温症特異的マーカーがない状況を踏まえ、剖検診断に適した新たな低体温症バイオマーカーの検索は急務と考えた研究代表者は基礎的検討として平成 24、25 年度[科学研究費 若手研究 B]、平成 26～28 年度[科学研究費 基盤研究 C]にマウス低体温症モデルを導入し、心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の DNA マイクロアレイ解析を行い、各臓器 4 万遺伝子、計 20 万遺伝子の遺伝子発現情報を得て、増減という観点から若干の低体温症マーカー候補の抽出に至った。さらに踏み込んで、これらが低体温症バイオマーカーとして妥当であることを示すため、実務応用を念頭にヒト剖検例組織での発現動態を免疫組織学的に検索することも必要だと研究代表者は考えたが、これらの解析は全く行えなかった。解析に至らなかった大きな要因として DNA マイクロアレイが高価な実験であることが影響し、平成 28 年度段階で免疫組織化学の試薬、特に抗体費用が捻出できなかったことが挙げられる。すなわちマウス大規模遺伝子解析で抽出された低体温症マーカー候補のヒト剖検例組織での実際の有用性は未だ不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、平成 24～28 年度にマウス低体温症モデルを用い心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の DNA マイクロアレイ解析で抽出した低体温症マーカー候補を、ヒト剖検例組織で免疫組織学的に検索し、実務応用の可能性を検討し、具体的な鑑定法を構築することを目標とする。

また研究代表者は法医学的新規バイオマーカーの選定に向けた戦略として「マーカー候補の抽出に向け、マウスを用いた DNA マイクロアレイによる大規模遺伝子検索」と「法医実務応用に向け、ヒト剖検例組織を用いたマーカー候補の免疫組織化学的検討」の組み合わせを模索しており、これら戦略の有用性、特に大規模遺伝子検索の法医実務への応用の可能性を、低体温症での検討を通し総括的に考察する。本研究は低体温症の新規診断法の構築を目指すものであり、異常環境死論の新たな展開、法医鑑定技術の向上に大きく貢献するものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) マウス低体温症モデルで得た低体温症マーカー候補

マウス低体温症モデルを導入し DNA マイクロアレイ解析で抽出された低体温症マーカー候補のうち、発現上位のものを示した。なお遺伝子名は symbol で記載している。

1. 心臓 上昇上位3個: Gzma, Cyp26b1, Atf3 減少上位3個: Slc41a3, Slc46a2, Nr1d1
2. 肺 上昇上位3個: Camp, Ngp, Mpo 減少上位3個: Baiap2l1, Mptx1, Zfp663

3. 肝臓 上昇上位3個: Igfbp1, Egr1, Zbp1 減少上位3個: Mfsd2a, Hbb-b1, Dsp
4. 副腎 上昇上位3個: Fos, C2cd4b, Rgs1 減少上位3個: Scd3, Nr4a2, Dbp
5. 腎臓 上昇上位3個: PLCL2, Fbxw10, Elavl4 減少上位3個: Snora47, Malat1, Cxcr6

(2) マウス低体温症モデルのデータを用いた対応分析

マウス低体温症モデルを用いた DNA microarray データは心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓それぞれに 40000 遺伝子を解析したものである。これら 5 臓器の DNA microarray データを統合し、200000 遺伝子での解析を行う。解析手法は対応分析 (correspondence analysis) である。対応分析では分割表における要素と要素の関係が散布図における距離で示される。すなわち散布図における点と点の関係は距離が近いほど強いということになる。これらデータは低体温症マーカーの発現機序、発現意義の考察をする上で有用である。

(3) ヒト剖検例組織を用いた低体温症マーカー候補の免疫組織学的検討

岩手医科大学法医学分野で低体温症と診断された剖検例、73 例 (男性 42 例、女性 31 例) を検討に用い具体的な鑑定法の構築を試みる。また当分野は寒冷地にあり今後の症例の積み重ねは可能である。対照群には窒息を充てる。これらヒト剖検例組織に関して、対照群および低体温症死群における心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓でのマーカー候補の発現動態を免疫組織化学的に検討する。マーカー候補は各臓器とも DNA マイクロアレイ解析における上昇因子上位 3 個、減少因子上位 3 個の計 6 個を原則とする。抗体は実務応用を念頭に市販のものを導入する。またマーカー発現量は発現細胞数を測定するなど定量的に解析し、発現部位の変化を考察する。

(4) 低体温症マーカー候補の発現動態のマウス・ヒトでの比較、具体的な鑑定法の構築

マウスデータを基礎に、ヒト剖検例組織の性別、年齢、基礎疾患、死亡直前の全身状態と発現動態との関連を考察し、具体的な鑑定法を構築する。また死後経過時間、外部環境などを比較することで各因子の死後の分解について検討し、本法が利用可能な死後経過時間を提示する。

(5) 低体温症マーカーの発現機序、発現意義の考察

低体温症マーカーの発現機序、発現意義の考察を行い低体温症病態の解明を進める。

(6) 新規低体温症マーカーの検出戦略の総括的考察

「マーカー候補の抽出に向け、マウスを用いた DNA マイクロアレイ解析」、「法医実務応用に向け、ヒト剖検例組織を用いたマーカー候補の免疫組織化学的検討」という検出戦略を総括的に考察し、将来的に他の法医学的病態のマーカー検索に応用可能か明らかにする。

4. 研究成果

(1) マウス低体温症モデルのデータを用いた対応分析

マウス低体温症モデルにおける心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の DNA microarray データを統合し、200000 遺伝子に関して対応分析 (correspondence analysis) を行った。「全遺伝子と心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓」を散布図に載せると、全遺伝子が心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の周囲に集中しており、極端に外れる遺伝子は確認できなかった。したがって心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓において遺伝子発現動態は大きく変わらない可能性が考えられた。次に「上昇遺伝子と心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓」、「減少遺伝子と心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓」を散布図に

載せると上昇遺伝子・減少遺伝子とも心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の周囲に集中しており、上昇遺伝子・減少遺伝子とも心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の病態に関与していると考えられた。さらに「心臓、肺、副腎と各臓器それぞれの上昇因子上位3遺伝子」を散布図に載せると、副腎で上昇を認めた Fos と心臓で上昇を認めた Atf3 が心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓に近かった。したがって Fos および Atf3 は低体温症における心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓の共通制御因子であると考えられた。

(2) ヒト剖検例組織を用いた低体温症マーカー候補の免疫組織学的検討

組織の薄切を作成し HE 染色、免疫染色を施行しており、この作業を継続中である。ヒト心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓のうち、肺、副腎においてマウス実験で得られた低体温症マーカー候補が有用であることを示唆する所見を得ており、肺、副腎を集中的に検討している。また随時、症例の追加を行っている。

(3) 今後の展望

法医学においても DNA マイクロアレイの導入が散見されるが、低体温症における DNA マイクロアレイデータを、法医実務を念頭にヒト剖検例組織にまで踏み込んで応用する検討は研究代表者が調べる範囲において行われていない。したがって本検討は法医実務における低体温症診断を飛躍的に向上させる可能性がある。また低体温症は臨床上も観察される病態であり、本研究は臨床医学に有用な低体温症病態を提示することが可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masataka Takamiya	4. 巻 24
2. 論文標題 Molecular biological and statistical background of transcriptomic analyses for forensic pathophysiologic studies and biomarker detections	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forensic Pathology	6. 最初と最後の頁 33-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Takamiya, Hisae Niitsu, Kiyoshi Saigusa	4. 巻 39
2. 論文標題 An Autopsy Case of Sudden Death in Neurofibromatosis Type 1 With Pheochromocytoma and Myocarditis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Forensic Medicine and Pathology	6. 最初と最後の頁 78-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masataka Takamiya, Kiyoshi Saigusa, Koji Dewa
2. 発表標題 Pathophysiological and transcriptomic analysis of hypothermic mouse pulmonary tissue using DNA microarray
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masataka Takamiya, Kiyoshi Saigusa, Koji Dewa
2. 発表標題 Incorporation of the gene expression omnibus into forensic pathology: reanalysis and recycling of large-scale gene expression data
3. 学会等名 The 2nd Wakayama Medical University International Symposium of Forensic Molecular Pathology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Takamiya
2. 発表標題 Large-scale gene expression analysis in hypothermia to study pathophysiology and identify forensic biomarkers: Incorporating correspondence analysis into forensic pathology
3. 学会等名 The 1st Wakayama Medical University International Symposium of Forensic Molecular Pathology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高宮正隆, 三枝 聖, 出羽厚二
2. 発表標題 マウス低体温症における肝臓のトランスクリプトーム解析
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
研究 分担者	三枝 聖 (Saigusa Kiyoshi) (30398490)	岩手医科大学・教養教育センター・講師 (31201)	