

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460884

研究課題名(和文)多臓器DNAマイクロアレイデータの相関分析による低体温症における臓器間関連検索

研究課題名(英文)Correspondence analysis of gene expressions in hypothermic adrenal gland, heart, kidney, liver, and lung using DNA microarray

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：法医診断に有用な低体温症マーカーの検出を目的として、マウス低体温症モデルを導入し、肝臓、肺のトランスクリプトーム解析をDNAマイクロアレイを用いて行い、候補遺伝子を抽出するとともに、発現機序の考察を行った。さらに平成24、25年度に施行した副腎、心臓、腎臓のDNAマイクロアレイデータを加え、副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺の大容量遺伝子発現データを対応分析し、低体温症における臓器間の関連を考察した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the hepatic and pulmonary transcriptome of mice killed by hypothermia using DNA microarray technology. The present study demonstrated acute hepatic and pulmonary responses in hypothermia, and we suggest that understanding hepatic and pulmonary mRNA expression would be useful for hypothermia diagnosis. Furthermore, the present microarray data may facilitate development of immunohistochemical analyses that could be used for human autopsies. Corresponding analyses were also performed concerning to gene expressions in hypothermic adrenal gland, heart, kidney, liver, and lung. These analyses would reveal relationships among these organs in hypothermia.

研究分野：法医学

キーワード：低体温症 肝臓 肺 DNA microarray quantitative PCR 対応分析

## 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特異的所見とは言い難い。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。

近年、分子生物学の発展に伴い、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となりつつあり、代表的解析法に DNA マイクロアレイがある。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平成 24、25 年度、DNA マイクロアレイを用いて副腎、心臓、腎臓の低体温症におけるトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現の増減という観点から若干の低体温症マーカー候補の検出に至った。一方、単純な遺伝子発現の増減は、あくまでも表面的な観察であり、古典的な低体温症所見とは本質的には変わらない。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、また、これらデータを低体温症での死亡までのメカニズム解析に生かすためには、これらバイオマーカーの発現機序、すなわち低体温症がこれらバイオマーカーをいかに誘導するか、またこれらバイオマーカーの発現意義を明らかにすることも必要だと研究代表者は考えたが、平成 24、25 年度に、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、獲得した DNA マイクロアレイデータの検討が、個々の臓器での検討に留まり、各臓器の遺伝子発現情報を他臓器との

関連というさらに大きな枠組みの中で捉えられず、さらなる考察を展開できなかったことが挙げられる。すなわち低体温症における各臓器の相互関係は未だ不明のままである。一方、遺伝子発現レベルにおける臓器間の相互関係を明らかにする手技として、「多臓器 DNA マイクロアレイデータの対応分析」があり、低体温症研究においても有用である可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では低体温症における肝臓、肺を DNA マイクロアレイで解析し、低体温症マーカーを抽出し、低体温症マーカーの発現機序、発現意義を考察する。さらに平成 24、25 年度に施行した副腎、心臓、腎臓の DNA マイクロアレイデータを加え、副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺の多臓器 DNA マイクロアレイデータを「対応分析」で統合し、低体温症の遺伝子発現レベルにおける臓器間の相互関係を明らかにする。法医学では臓器個々の検討が主流で、これまで臓器間関連分析は充分に行われてこなかった。本研究は法医学関連病態における臓器間の相互関係分析の先駆けであり、本研究でその手法を確立することで、将来、様々な病態における臓器間関連分析が急速に進展するものと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 低体温症モデルの導入

ヒト剖検組織は死後経過時間、年齢、死亡時の状況が異なることから、ヒト剖検組織を DNA マイクロアレイでトランスクリプトーム解析し、包括的遺伝子発現情報を得ることは困難と考えられる。したがって遺伝子発現データの獲得には動物低体温症モデルを用いることとし、遺伝子データベースの充実しているマウスを検討対象とする。低体温症モデルは従来の低体温症研究において評価が定まっているものが望ましいので、water bath

modelを導入する。

## (2) マウスモデルを用いた肝臓における低体温症マーカー抽出

健常群および低体温症死群の肝臓における遺伝子発現動態を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、低体温症における肝臓の包括的遺伝子発現情報を獲得し、肝臓における低体温症マーカー候補を抽出する。なお、DNA マイクロアレイの施行により4万遺伝子の発現情報を得ることができる。さらに、これら低体温症マーカー候補の再現性を定量 PCR を用いて確認する。

## (3) マウスモデルを用いた肺における低体温症マーカー抽出

健常群および低体温症死群の肺における遺伝子発現動態を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、低体温症における肺の包括的遺伝子発現情報を獲得し、肺における低体温症マーカー候補を抽出する。これら低体温症マーカー候補の再現性を定量 PCR を用いて確認する。

## (4) マウスモデルを用いた副腎、心臓、腎臓における低体温症DNAマイクロアレイデータの再導入

研究代表者は平成 24、25 年度に低体温症の副腎、心臓、腎臓における遺伝子発現動態を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、低体温症における包括的遺伝子発現情報を獲得し、これら臓器の低体温症マーカー候補を抽出した。また、これら低体温症マーカー候補の再現性を定量 PCR で、すでに確認しており、副腎、心臓、腎臓の DNA マイクロアレイデータは、さらなる解析に導入可能な状態にある。

## (5) 副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺のDNAマイクロアレイデータを用いた対応分析による

## 臓器間相互関係分析

この段階で主要臓器、すなわち副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺の5臓器における計20万遺伝子の低体温症における発現情報を得ていることになる。これら低体温症における副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺のDNAマイクロアレイデータを対応分析で統合し、大容量遺伝子発現データに基づき、低体温症における臓器間の相互関係を明らかにする。さらに各臓器の低体温症マーカーの発現機序、発現意義の考察を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 肝臓のDNAマイクロアレイ解析

#### 変動遺伝子の抽出

有意に上昇していた遺伝子上位3個は insulin-like growth factor-binding protein 1、early growth response 1、z-DNA binding protein 1であり、有意に減少していた遺伝子上位3個はmajor facilitator superfamily domain-containing protein 2A、hemoglobin, beta adult major chain、desmoplakinであった。

#### 遺伝子セット解析

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)を用いた遺伝子セット解析では、有意に上昇している遺伝子セット上位3個は Herpes simplex infection、asthma、HTLV-1 infection、有意に減少している遺伝子セット上位3個はglycine, serine and threonine metabolism、metabolic pathways、African trypanosomiasisであった。

#### パスウェイ解析

KEGGを用いたパスウェイ解析では、発現上昇遺伝子で有意に変動しているパスウェイ上位3個はspliceosome、RNA transport、alcoholism、発現減少遺伝子で有意に変動しているパスウェイ上位3個はlysine

degradation、ribosome、mRNA surveillance pathwayであった。

#### Gene functional category analysis

Gene functional category analysisにおいては、発現上昇遺伝子で最も変動していたカテゴリーはbiological processにおいてcellular macromolecule metabolic process、molecular functionにおいてbinding、cellular componentにおいてintracellularであった。一方、発現減少遺伝子で最も変動していたカテゴリーはbiological processにおいてmetabolic process、molecular functionにおいてcatalytic activity、cellular componentにおいてintracellular organelleであった。

#### (2) 肺のDNAマイクロアレイ解析

##### 変動遺伝子の抽出

有意に上昇していた遺伝子上位3個はcathelicidin antimicrobial peptide、neutrophilic granule protein、myeloperoxidaseであり、有意に減少していた遺伝子上位3個はBAI1 associated protein 2 like 1、mucosal pentraxin 1、zinc finger protein 663であった。

##### 遺伝子セット解析

KEGGを用いた遺伝子セット解析では、有意に上昇している遺伝子セット上位3個はGraft-versus-host disease、allograft rejection、Type I diabetes mellitus、有意に減少している遺伝子セット上位3個はfocal adhesion、ECM-receptor interaction、long-term depressionであった。

##### パスウェイ解析

KEGGを用いたパスウェイ解析では、発現上昇遺伝子で有意に変動しているパスウェイ上位3個はribosome、transcriptional

misregulation in cancer、hematopoietic cell lineage、発現減少遺伝子で有意に変動しているパスウェイ上位3個はribosome、oocyte meiosis、spliceosomeであった。

#### Gene functional category analysis

Gene functional category analysisにおいては、発現上昇遺伝子で最も変動していたカテゴリーはbiological processにおいてcellular metabolic process、molecular functionにおいてstructural constituent of ribosome、cellular componentにおいてintracellular partであった。一方、発現減少遺伝子で最も変動していたカテゴリーはbiological processにおいてmetabolic process、molecular functionにおいてbinding、cellular componentにおいてintracellular organelleであった。

#### (3) 副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺のDNAマイクロアレイデータの対応分析

データ解析中である。

これら検討により低体温症における肝臓、肺の遺伝子変動が示され、肝臓、肺における遺伝子発現は低体温症診断に有用なマーカーとなりうると考えられた。特に肺において好中球に関連する遺伝子が増加することを示唆するデータを得た。実際の法医診断においてはタンパクが重要な役割を果たすと考えられるが、これらデータはヒト組織を用いた免疫組織学的検討への応用が可能である。また低体温症病態を明らかにするという観点からは臨床医学上も重要なデータと考えられる。

#### 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2件)

Masataka Takamiya, Kiyoshi Saigusa, Koji Dewa. DNA microarray analysis of

hypothermic murine myocardium to study pathophysiology and identify forensic biomarkers. Journal of forensic investigation. 2016; 4: 11. (査読有)

Masataka Takamiya, Hisae Niitsu, Kiyoshi Saigusa, Koji Dewa. Pediatric autopsy case of asphyxia due to salmon egg (ikura) aspiration. Pediatrics International 2016; 58: 899-901. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

Masataka Takamiya, Kiyoshi Saigusa, Hitoshi Biwasaka, Nori Nakayashiki, Koji Dewa. Pathophysiological and transcriptomic analysis of hypothermic mouse heart tissue using DNA microarray. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine. Fukuoka. 2014-06-16 – 2014-06-20

〔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〕

ホームページ等: 該当なし。

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

三枝 聖 (SAIGUSA, Kiyoshi)

岩手医科大学・教養教育センター・講師

研究者番号: 30398490

(3) 連携研究者: 該当なし。

(4) 研究協力者: 該当なし。