

論文内容要旨

Application of RNA Sequencing Analysis to

Cause-of-Death Investigation

(RNA sequencing の死因究明への応用)

主指導教員：長尾 正崇教授

(医系科学研究科 法医学)

副指導教員：奈女良 昭教授

(医系科学研究科 法医学)

副指導教員：柿本 直也教授

(医系科学研究科 歯科放射線学)

中尾 直己

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

従来より、法医学領域における死因究明には解剖時に得られた試料からの病理組織学検査、分析機器を用いた化学検査等が行われてきたが、事例の生前の経過や臨書検査データなどの情報が皆無であることが多く、明らかに外因死が疑われる場合や肉眼所見や病理組織学検査において内因性疾患で死亡したことが明らかな場合を除き、死因を急性心不全とせざるを得ない場合が多い。本研究では、死亡までの生体の病態生理学的変化を確認するために、解剖時に採取した末梢血から RNA を抽出し、全血 RNA sequencing (RNAseq) を行い、死への経過の際の生体の病態生理学的変化の残渣である mRNA の挙動からの死因推測の可能性を検証した。先行研究では、PMI (死後経過時間) を推定するためのツールとしての RNAseq の利用が行われてきたが、死因究明の手段としての研究は行われていない。そこで、本研究では、新型コロナウイルスワクチン接種後に亡くなった 4 事例と過剰なインスリン持続点滴により死亡した事例、アナフィラキシーショックで死亡した事例を対象に、失血死・扼頸の 2 症例を対照群とした RNAseq を行い、死因究明における RNAseq の有用性の検討を行った。

【方法】

解剖時に採取した末梢血から ISOGEN-LS を用いて Total RNA を抽出し NEBNext rRNA depletion kit により rRNA 枯渇処理を行った。rRNA 枯渇法は RNA の分解が進んだサンプルに効果的な手法とされている。トランスクリプトームライブラリの調製は MGIEasy RNA directional library prep kit v2.0 を用いて行い、PCR で 12 サイクル増幅されたのちに DNBSEQ-G400 でシーケンシングを行った。クオリティコントロールは FASTQC v0.11.9 で行い、トリミングには Trimmomatic v0.39 を用いた。リファレンスゲノムは GENCODE Human Release 39 (GRCh38.p13) を利用し、カウントデータは Kallisto v0.46.0 で推定された。新型コロナウイルスワクチン接種後に死亡した 4 事例の発現変動遺伝子の探索は負の二項分布を使用したモデルに基づいて発現変動遺伝子の探索を行うプログラムである DESeq2 v1.30.1 を用いて行った。探索された発現変動遺伝子群に対して、Metascape 及び The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を用いてエンリッチメント解析を行った。インスリン死亡事例とアナフィラキシーショック死亡事例はそれぞれサンプル数が 1 例しかないため、統計学的有意に発現変動遺伝子を探索することが出来ななかった。従って、Relative Log Expression (RLE) 正規化を行いライブラリサイズに依存しない評価指標を作成したのち、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) に登録されている、Insulin signaling pathway、Fc epsilon RI signaling pathway、B cell receptor signaling pathway、T cell receptor signaling pathway の遺伝子リストに限局して、発現量の比較を行った。

【結果】

新型コロナウイルスワクチン接種後死亡群では発現変動を認めた遺伝子群を階層的クラスタリングヒートマップで視覚化すると、症例群と対照群で明確に区分された。症例群で発現が顕著に増加している遺伝子群に対しエンリッチメント解析を行うと、好中球の脱顆粒の促進が示唆され、全身の炎症反応が亢進していることが明らかになった。

インスリン死亡事例に対しても同様の対照群と比較することで、インスリン受容体基質 (IRS) をはじめとする、Insulin signaling pathway の活性化が確認された。アナフィラキシーショック死亡事例においては、肥満細胞に主として存在する、Fc epsilon RI signaling pathway において Fc epsilon 受容体と、pathway 終末の IL-4、IL-3、GM-CSF 等の発現亢進が認められた。また、T cell receptor signaling pathway では T 細胞表面の各種受容体の発現亢進と終末の IL-4 の亢進が認められたが、B cell receptor signaling pathway では顕著な発現変動が認められなかった。

【考察】

法医解剖は死後 24 時間以上経過してから行われることが多いため、サンプル中の mRNA が RNase により分解されている懸念があった。実際に分解の影響は随所に確認されたが、RNA 精製に rRNA 枯渇法を用いることで十分に情報を得ることが出来た。新型コロナウイルスワクチン接種後死亡した 4 症例は生物学的複製が存在したため統計学的有意に発現変動遺伝子を探索することが出来た。結果から、実際に診断基準をみたしていたのか知る方法はないが、死因は全身性炎症反応症候群 (SIRS) と推測された。

インスリン死亡事例では、Insulin signaling pathway の発現亢進を可視化したことにより、症例は対照群に比べ強くインスリンの影響を受けていたことが判明した。今回の症例では既に血液の生化学検査によりインスリンの過剰投与と致死域の低血糖を確認できていたが、本来インスリンは死後分解が顕著なため、他のインスリン中毒死例では血中インスリン濃度の計測が役に立たないことが多いとされている。当結果は、インスリン過剰投与が強く疑われるが血液検査で高濃度インスリンを検出できない場合に RNAseq が診断の傍証となる可能性を示した。

アナフィラキシーショック死亡事例の結果は、IgE を介したアレルギー反応が対照群に比べて強く発生していることを示しアナフィラキシーショック発症の傍証となった。しかし、この所見のみでアナフィラキシーショックと確定診断できるわけではなく、依然として臨床経過・解剖所見・化学検査等の情報が不可欠である。