

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	中尾 直己
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Application of RNA Sequencing Analysis to Cause-of-Death Investigation (RNA sequencing の死因究明への応用)			
論文審査担当者			
主 査	教授	坂口 剛正	印
審査委員	教授	志馬 伸朗	
審査委員	講師	味八木 茂	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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床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になった場合を除き、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、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。対象事例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とし、対照群として失血死・扼頸の 2 事例を用いた。</p> <p>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。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 サイクル増幅したのちに 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 で推定した。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。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、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</p>			

pathway、 B cell receptor signaling pathway、 T cell receptor signaling pathway の遺伝子リストに局限して、発現量の比較を行った。

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。

本研究で、死後 24 時間以上経過している遺体から採取された血液でも、RNase による分解の影響が随所に確認されたが、RNA 精製法に rRNA 枯渇法を用いることで十分に情報を得ることが可能であることが示された。またいずれの事例においても、RNA sequencing (RNAseq) の結果のみで死因を確定診断できるわけではないが、RNAseq が診断の傍証となる可能性を示した。よって審査委員会委員全員は、本論文が中尾直己に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。