

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09274

研究課題名(和文) アクアポリンを新規指標とする皮膚損傷受傷後経過時間判定法の樹立

研究課題名(英文) Immunohistochemical analysis on aquaporin-1 and -3 in skin wounds from the aspects of wound age determination

研究代表者

古川 福実 (Furukawa, Fukumi)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40156964

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)：剖検例から得られたヒト皮膚創傷(55例)において、アクアポリン1およびアクアポリン3に対する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行ったところ、アクアポリン1陽性血管占有面積が5%以上の創傷は受傷後経過時間が4-12日を示すことが明らかとなった。また、アクアポリン3陽性細胞数が300を超える創傷は、受傷後経過時間が5-10日を示す。これらの結果から、ヒト皮膚創傷におけるアクアポリン1およびアクアポリン3の免疫組織化学的検討は、受傷後経過時間検索の有用な指標となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学で取り扱う事例では受傷に至る以前の身体的情報や受傷の過程、さらに受傷後の状況など全ての情報が乏しい、あるいは完全に欠如している場合も少なくない。そのような状況下でも精度の高い診断を行うためには、基本的な診断学の知識に加えて、広く医科学全般の最新の知見を取り入れて常に診断法を進歩させなければならない。これまで受傷後経過時間判定のために、皮膚損傷治癒に関与する様々な細胞や分子(サイトカインや細胞増殖因子)の検索が行われてきた。本研究ではこれらの指標に加えて、近年注目を集めているアクアポリンが、受傷後経過時間判定の新規指標となることを示した。

研究成果の概要(英文)：A total of 55 human skin wounds of different postinfliction intervals were collected as follows: group I, 0-3 days (n=16); II, 4-7 days (n=11); III, 9-14 days (n=16); and IV, 17-21 days (n=12). The percentage of AQP1+ vessels and the number of AQP3+ keratinocytes were apparently elevated in accordance with wound ages. The number of AQP3+ keratinocytes was distinctly evident in groups II and III. Morphometrically, both AQP1+ vessel area and AQP3+ cell number were markedly increased in group II, compared with other three groups. With regard to forensic safety, AQP1+ vessel area of over 5% would imply wound ages of 4-12 days. Moreover, the positive area of >15% would suggest wound age of 7-10 days. Especially, most samples of skin wounds aged 5-10 days except for only one sample (a 10-day-old wound) showed AQP3+ cell number of >300, and the remaining other samples had that of <300. Thus, the AQP3+ cell number of >300 would indicate wound ages of 5-10 days.

研究分野：実験病理学

キーワード：受傷後経過時間

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生体のホメオスタシスを保つために水だけを選択的に通過させる膜タンパクとして 1992 年に最初の AQP がクローニングされて以来、現在では 13 種類の AQP が発見されている (Verkmann, *J Cell Sci*, 118:3225-32, 2005)。AQP はそれぞれが臓器特異的な発現パターンを持っており、AQP ファミリーの中で AQP4 は中枢神経系に特異的に発現し、脳浮腫の病態形成に重要な役割を担っていることが明らかにされている (Manley, et al., *Mat Med*, 6:159-63, 2000)。また、肺においては AQP1 および AQP5 が特異的に発現していることが知られており、肺水腫などの病態においてこれらの AQP が関与していることが明らかにされている (Ma, et al., *J Clin Invest*, 105:93-10, 2000; Song, et al., *J Physiol*, 525:771-779, 2000)。さらに、皮膚においては損傷治癒過程で AQP3 が特異的に発現亢進することが知られており、その過程において AQP3 が重要な役割を担っていることが示唆されているが、その詳細は明らかにされていない (Sebastian, et al., *Burns*. 2015 Jun;41(4):843-7.; Sugimoto, et al., *Biol Res Nurs*. 2013 Jul;15(3):347-55.)。

法医学において正確な死因の判定は最重要課題である。特に多数の損傷が存在した場合、いずれの損傷が死因と密接に関与しているのか、また虐待事例においてはいつ頃から虐待が継続しているのかを判定することが求められ、損傷の受傷後経過時間の判定が必須となる。受傷後経過時間判定は、損傷治癒に関与する種々の細胞やそれらから産生される分子を指標として行われてきた。応募者らはこれまで、サイトカインが受傷後経過時間判定のための有用な指標となることを明らかにしてきた (Ishida, et al., *Int J Legal Med*. 2012 May;126(3):435-40.; Ishida, et al., *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):711-21.; Ishida, et al., *Int J Legal Med*. 2009 Jul;123(4):299-304.; etc.)。しかしながら法医学鑑定においては、単一の指標よりも複数の指標を用いることで、より客観性の高い鑑定結果が得られると考えられる。AQP は種々の病態における微小環境に応じて精密に制御される必要があることから、炎症反応や免疫応答において重要な役割を果たすことが明らかになってきており、損傷治癒にも密接に関係していることが予想される。しかしながら、皮膚損傷治癒過程における AQP 出現様態の詳細は明らかにされておらず、また、法医学診断学の領域で AQP を対象とした研究は国内国外を通じてほとんど行われていない。本研究は、既存の指標に基づく皮膚損傷の受傷後経過時間判定法をより客観性に富んだものとするため、AQP が新しい指標となり得るかを検証する初めての研究である。

## 2. 研究の目的

本研究は、基礎的研究と実務的研究の二つに大別される。基礎的研究ではマウスを用いて皮膚損傷モデルを作製し、その治癒過程における AQP の出現様態を経時的に明らかにする。実務的研究では基礎的研究の成果に基づき、受傷後経過時間の判明している剖検試料を用いて AQP 出現を免疫組織化学的に検討する。最終的には、AQP の皮膚損傷受傷後経過時間判定の指標としての有用性を検証する。このように、皮膚損傷部局所における AQP の時間的・空間的出現様態を検討する点、さらにそれらの結果を皮膚損傷の受傷後経過時間判定に応用しようとする点が本研究の最も重要な点である。

法医学で取り扱う事例では受傷に至る以前の身体的情報や受傷の過程、さらに受傷後の状況など全ての情報が乏しい、あるいは完全に欠如している場合も少なくない。そのような状況下でも

精度の高い診断を行うためには、基本的な診断学の知識に加えて、広く医科学全般の最新の知見を取り入れて常に診断法を進歩させなければならない。これまで受傷後経過時間判定のために、皮膚損傷治癒に關与する様々な細胞や分子(サイトカインや細胞増殖因子)の検索が行われてきた。本研究ではこれらの指標に加えて、近年注目を集めている AQP に着目し、受傷後経過時間判定の新規指標の開発を試みる。

AQP の機能に関しては細胞生物学や免疫学などの領域で研究され、内的外的侵襲に対する重要な生体防御システムとしての姿が構築されつつあり、また臨床医学の領域では新たな治療戦略の一手段としても注目を集めている。しかしながら、法医学の領域において AQP を対象とする研究は全くみられない。本研究は受傷後経過時間判定の指標としての AQP の有用性を検討する独創的な試みであり、これまでの法医診断の指標とは異なる視点による新規指標の導入は判定の客観性を高め、鑑定精度向上に大きく寄与するものである。また、基礎的研究と実務的研究を組み合わせた包括的研究であることや、これまでの受傷後経過時間判定に関する研究で着目されていなかった AQP に焦点を当てた点が本研究の特色かつ独創的な点である。本研究により皮膚損傷組織において AQP の検出が可能であることが明らかとなれば、AQP は受傷後経過時間判定の新規指標となり、実際の法医実務において応用可能となる。さらには、これまで応募者らが受傷後経過時間判定の指標として実証してきたサイトカインやケモカインと組み合わせることにより、より客観性および正確性の高い受傷後経過時間判定システムが確立され、法医鑑定精度の向上につながる。

### 3. 研究の方法

- 1) マウス皮膚損傷モデルは、応募者らの研究室ですでに確立しており、直ちに効率的に研究を進めることができる。具体的には、マウスをペントバルビタール(50 mg/kg、腹腔内投与)により麻酔し、剃毛した背部皮膚に直径4 mmの打ち抜き損傷を作製する。損傷作製後経時的にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、損傷部組織を採取する。対照試料は損傷を作成していないマウスの正常皮膚より採取する。
- 2) 経時的に採取した皮膚損傷部試料の一部を用いて、パラフィン包埋切片を作製する。各切片について、AQP1 および AQP3 に対する抗体を用いて、それぞれを組織レベルで検出する。応募者らはこれまでに、皮膚組織における AQP1 および AQP3 をタンパク質レベルで検出する実験手技を修得しており直ちに目的とする研究を行うことが可能である。
- 3) 経時的に採取した皮膚損傷部試料の一部を用いて総タンパクを抽出し、western blotting 法および ELISA 法により AQP1 および AQP3 を検出し、損傷治癒過程における AQP の時間的出現様態を明らかにする。応募者らはこれまでに、予備的実験において、受傷後7日の皮膚損傷部における AQP1 および AQP3 をタンパク質レベルで検出することに成功しており、今後さらにデータを蓄積する。
- 4) 経時的に採取した皮膚損傷部試料の一部を用いて RNA を抽出する。real time RT-PCR 法により AQP1 および AQP3 の遺伝子発現を定量解析し、損傷治癒過程と AQP 出現の関係を検討する。遺伝子発現解析に用いる real time PCR 用プライマーセットおよび PCR の条件設定はすでに終了しており、本研究を支障なく遂行できる。
- 5) 基礎的研究結果に基づいて皮膚損傷治癒過程における AQP の時間的・空間的出現様態を解明することにより、法医実務的研究へと発展させるため、法医剖検試料(ヒト皮膚損傷

試料および対照試料)の収集に努める。応募者らは剖検試料収集についてはすでに開始しており、効率的に研究を進めることができる。

上記研究計画を鋭意継続しながら法医実務への応用研究として、法医剖検例において受傷後経過時間が判明している皮膚損傷試料について、基礎的研究で得られた AQP1 および AQP3 検出に適した抗体を用いて免疫組織化学的検討を行う。さらに、適切な抗体の組み合わせによる蛍光二重免疫染色法を用いて、より特異的な AQP の検出を試みる。動物実験の結果と実務的研究の結果を総合的に考察し、AQP の出現様態と受傷後経過時間の関連性について統計的解析を行い、AQP を指標とする受傷後経過時間判定法を確立する。

#### 4. 研究成果

本研究は、近年クローニングされ生命科学の分野で注目を集めている「アクアポリン(AQP)」が、皮膚損傷の受傷後経過時間判定のための指標となり得るかについて検討するものである。剖検例から得られたヒト皮膚創傷(55例)において、アクアポリン1およびアクアポリン3に対する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。受傷後経過時間ごとに以下のように分類した：I群、0-3日(n=16)；II群、4-7日(n=11)；III群、9-14日(n=16)；およびIV群、17-21日(n=12)。受傷していないコントロールサンプルにおいては、アクアポリン1およびアクアポリン3は真皮の血管およびケラチノサイトにわずかに検出された。

アクアポリン1陽性の血管の占有面積の割合およびアクアポリン3陽性のケラチノサイトの数は、受傷後経過時間に伴って増強した。アクアポリン3陽性のケラチノサイト数は、II群およびIII群において著明に増加していた。アクアポリン1陽性の血管の占有面積およびアクアポリン3陽性細胞数は、II群で他の群と比べて有意に増加していた。アクアポリン1陽性血管占有面積が5%以上の創傷は受傷後経過時間が4-12日を示すことが明らかとなった。また、アクアポリン3陽性細胞数が300を超える創傷は、受傷後経過時間が5-10日を示す。これらの結果から、ヒト皮膚創傷におけるアクアポリン1およびアクアポリン3の免疫組織化学的検討は、受傷後経過時間検索の有用な指標となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishida Yuko, Kuninaka Yumi, Furukawa Fukumi, Kimura Akihiko, Nosaka Mizuho, Fukami Mie, Yamamoto Hiroki, Kato Takashi, Shimada Emi, Hata Satoshi, Takayasu Tatsunori, Eisenmenger Wolfgang, Kondo Toshikazu	4. 巻 132
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis on aquaporin-1 and aquaporin-3 in skin wounds from the aspects of wound age determination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Legal Med	6. 最初と最後の頁 237 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00414-017-1725-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	石田 裕子  (Ishida Yuko)  (10364077)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授    (24701)	