

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10129

研究課題名(和文) Transcriptomeを応用した法医病理学的損傷受傷時期推定法の開発

研究課題名(英文) Development of forensic wound estimation by transcriptome

研究代表者

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80332857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：法医学実務において、創傷の受傷時期推定は重要であり、受傷時期特異的な生体マーカー候補を探索する目的として、マウス損傷皮膚の経時的mRNA包括的発現解析を行った。受傷後0.5～9日の経過において、12887種のmRNAに有意な発現変動が認められた。主成分分析では第一、二主成分において、0.5、1日群で大きく変化し、その後経時的に0日群との差異が低減した。CD5Lに着目し、1日で発現量が多いことが認められた。今後、サンプル数の増加を検討し研究を進め、発現のピーク・発現が増加する期間を明確にできれば、CD5Lを受傷後1～5日の受傷時期マーカーとして十分に応用しうると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

損傷受傷後の特定の期日に発現する最適な診断マーカーが同定できれば、現在この受傷時期の判定に苦慮している法医病理学の分野で利用価値は著しく高い。本研究にて、皮膚損傷部の受傷後のTranscriptome解析にて詳細な遺伝子発現プロファイルが得られた。また、このデータを基盤として、Birc5、DRAXIN、SERPINB12及びCD5L/AIMの発現を検討し、CD5Lが受傷後1～5日の受傷時期マーカーであることを確認した。本研究の応用によって、より精度の高い法医解剖鑑定が可能となり、その社会的貢献は極めて多大になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In forensic practice, wound age estimation is essential, for the purpose of searching the injured stage-specific biological marker candidates. In this study, we carried out over time mRNA comprehensive expression analysis of mouse injured skin. Significant changes in the expression of 12887 mRNAs were observed 0.5 to 9 days after the injury. In the principal component analysis, the first and second principal components changed significantly in the 0.5 and 1-day groups, and then the difference from the 0-day group decreased over time. Focusing on CD5L, it was confirmed that the expression level was high in one day. In the future, if we can study the increase in the number of samples and proceed with the research to clarify the peak expression and the period during which the expression increases, we think that CD5L can be fully applied as a marker for the time of injury 1 to 5 days after injury.

研究分野：法医病理学、法医学

キーワード：損傷時期推定 マウス Transcriptome CD5L/AIM

1. 研究開始当初の背景

児童虐待、**Domestic Violence** や老人虐待の症例数が増加し、それとともにこれらが疑われる法医解剖検数も増加し、司法(裁判)の場からは詳細な暴行形態、特に損傷の受傷時期等について詳細な説明が求められている。つまり、法医解剖における外表検査、特に損傷の検査が死因究明と同等の重要な検査の一つで、損傷の受傷時期や生活反応の有無に関する法医病理学的判断が必要とされている。その一方で、現在の法医解剖では受傷時期の推定に関しては、受傷後約1週間程度より出現するとされるヘモジデリンの有無を確認できるベルリン・ブルー染色法が組織検査法として使用されているのみであり、実質的にこの検査法以外に汎用されている方法はない。分子生物学の進歩とともに損傷部位及び周囲の組織では受傷後直ちに生体防御や損傷修復に関連する遺伝子やその遺伝子産物である蛋白質の発現といった応答反応が起こっていることが明らかになりつつある。Cooperらは新生児マウスを使用したマイクロレイ解析にて損傷治癒及び炎症に関連する1,000以上の遺伝子を見出している。我々はCooperらが決定した遺伝子の中から、成熟マウスにおいても受傷後5日で最大発現量を示す遺伝子に着目しマウス皮膚損傷モデルにてCD14、PLGFやMCP-5の遺伝子発現量が2~4倍程度増加することを明らかにし(Kagawa *et al.* *Legal Medicine*, 2008)、この研究結果を基礎として、法医実務症例を用いてCD14蛋白質の発現を検討し、さらにこの時期にCD14を発現する好中球、マクロファージ特異的なマーカーの検討を追加し、複数マーカーを同時に検討することで受傷後2~5日間という時期を特定できることを報告した(Yagi *et al.* *Forensic Sci Int*, 2015)。さらに、プロテオーム解析法を用いて、マウス皮膚にて蛋白質発現動態を検索し、Chitinase 3-like 3(Chi 3l3)遺伝子並びに蛋白質が3~5日で特異的に発現が増加することを見出している(Murase *et al.* *Int Leg Med*, 2017)。しかし、受傷後の特定の時間を示唆するマーカーは未だに見出させておらず、受傷後特異的な期日に発現する最適な診断マーカーが同定できれば、現在この受傷時期の判定に苦慮している法医病理学の分野で利用価値は著しく高い。

2. 研究の目的

本研究ではTranscriptome解析を用いて、損傷時期における遺伝子発現プロファイリングを行い、損傷皮膚における時期特異的遺伝子発現を同定し、これら遺伝子の蛋白質発現状態を動物モデルで確認する。法医実務では解剖着手まである程度の死後経過時間を伴い、死後変化にてmRNAの変性が生じるため、剖検症例からのmRNA検出は困難であり、残念ながら実務上は応用困難である。従って、より死後変化(変性)に強い遺伝子産物(蛋白質)を検討対象とした方がより実務的であり、法医学分野では、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いてレトロスペクティブな症例の解析が行われることが一般的である。受傷時期の推定マーカーとして法医実務において汎用されているのは、損傷部のヘモジデリン発現を組織学的に検討する方法のみである。前述した如く、損傷受傷後の特定の期日に発現する最適な診断マーカーが同定できれば、現在この受傷時期の判定に苦慮している法医病理学の分野で利用価値は著しく高い。代表者らが本研究を応用して企図する新規マーカーを利用した受傷時期同定のための斬新な診断法は、法医実務に大きく貢献・寄与できるものと考えている。さらに、本研究にて、より精度の高い法医解剖鑑定が可能となり、その社会的貢献は極めて多大になるものと考えている。

3. 研究の方法

麻酔下の BALB/cCrS1c 系雄性マウス（8 週齢）の背部皮膚に 4 mm biopsy punch を用いて円形の打ち抜き創を作成し受傷皮膚とした。マウスを受傷直後の対照群 (Day0)、受傷後 1 日群 (Day1)、2 日群 (Day2)、3 日群 (Day3)、5 日群 (Day5) 7 日群 (Day7)、9 日群 (Day9) と振り分け、該当時期に頸椎脱臼による安楽死を施した後に受傷部周辺の皮膚を 6 mm biopsy punch で打ち抜き、サンプルとして採取した。サンプルは液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。

(1) Transcriptome 解析

皮膚サンプルより Total RNA を抽出後、Transcriptome 解析を用いて、損傷時期における遺伝子発現プロファイリングを作成する。

(2) Transcriptome 解析の結果を活用した受傷時期推定候補遺伝子の発現確認

Total RNA サンプルより cDNA を作成し、定量的 PCR にて遺伝子発現量を確認する。この段階で有意な結果が得られた遺伝子について蛋白質発現量の検討を行った。具体的には、サンプルより蛋白を抽出し、SDS-PAGE により分離、PVDF 膜に転写して、各蛋白質に対する抗原抗体反応を行った後、化学発光法によって検出を行った。その後、検出の結果が得られた画像データをもとにして統計学的解析を行った。

CD5L/AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) については、定量的 PCR を行わず、直接的に蛋白質の検討を行った。

4. 研究成果

(1) Transcriptome 解析

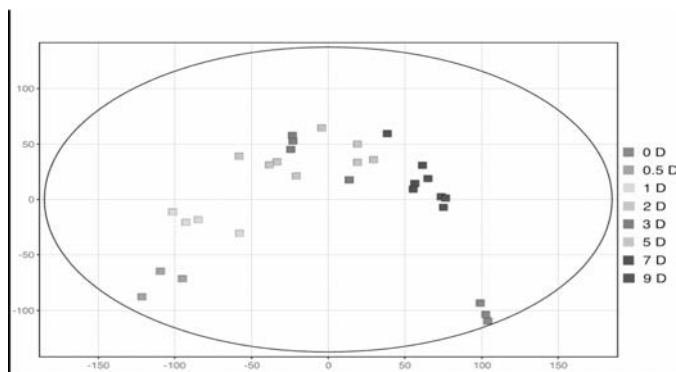


図1 主成分分析の結果

RNA-Seq 解析法を用いて、損傷時期における遺伝子発現プロファイリングを行ったところ、12,887 種の mRNA に有意な発現変動が認められた。はじめに、主成分分析を行った。その結果、主成分分析では第一、二主成分において、0.5、1 日群で大きく変化し、その後経時的に 0 日群との差異が低減した (図 1)。受傷から 2~5 日が経過した創傷の正確な時期推定

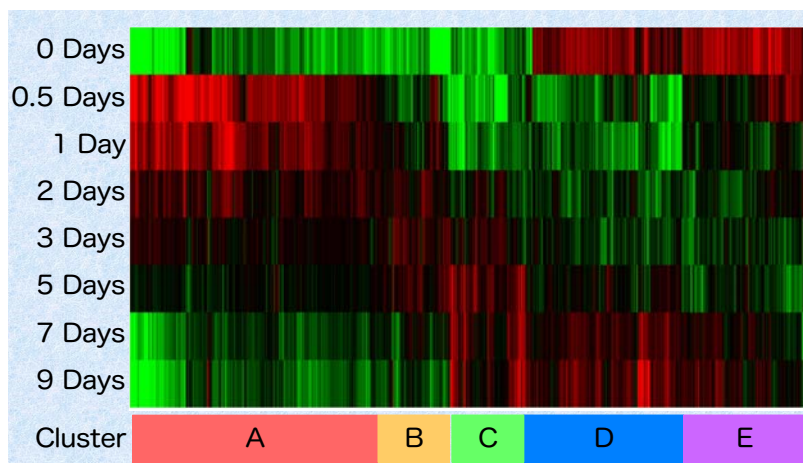


図2 Cluster 解析及び Gene Ontology 解析の結果

法がとくに求められているが、主成分分析の結果を鑑みると、当該時期の全体的な遺伝子発現の差異は比較的小さく、受傷時期推定は困難を伴うことが示唆される。Cluster 解析に加えて Gene Ontology 解析を行うことによって (図 2)、受傷後 0~9 日の経過中に 1,898

種類の遺伝子が有意かつ5倍以上の発現変動を示すこと、さらにこれらの遺伝子を群別化し、5群に大別することが可能となった。これらの5群はA: “increase in early” (0.5 days-1 day)、B: “increase in middle” (2-5 days)、C: “increase in late” (5-9 days)、D: “decrease in early” 及び E: “decrease in middle or late” がその意義として考えられ、受傷時期に応じて郡別されることが示唆される。

(2) 定量的PCR解析

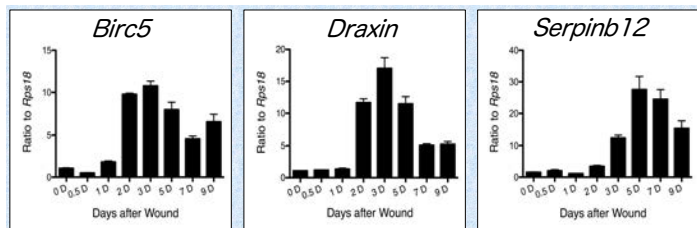


図3 定量的PCR解析の結果

12 (SERPINB12)の発現に経時的な変動が認められた。

(3) 蛋白質発現解析

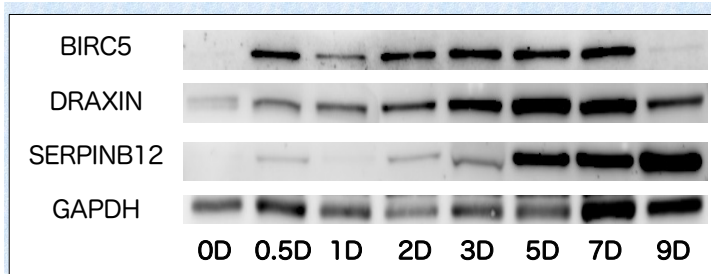


図4 代表的な Birc5, DRAXIN 及び SERPINB12 の Western Blot 像

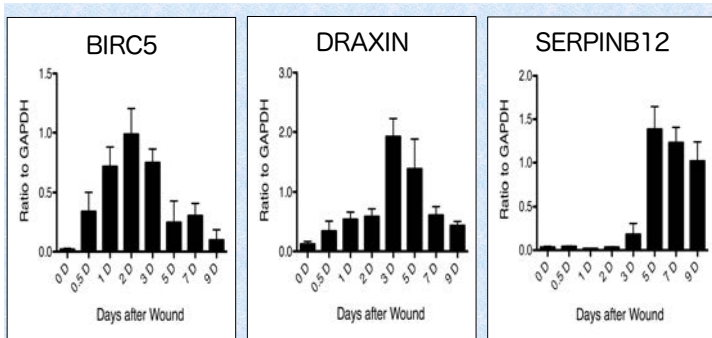


図5 Birc5, DRAXIN 及び SERPINB12 の経時的発現量

(4) CD5L/AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) の検討

バンドは2種類検出され、どちらも CD5L の分子量 36.9kDa から予想される範囲と異なる位置に認められた (図6)。CD5L の検出結果の画像データと検出された2つのバンドを統合し解析した結果を図7に示す。解析の結果 Day0-Day1、Day1-Day7、Day1-Day9 の間で有意差が認められた。この結果より CD5L の発現は受傷後に増加し特に Day1 で多いことが認められ、本研究では有意な差が認められなかったもの、Day3 あるいは Day5 までコントロール群よりは発現増加していることが示唆される。

上記の中で特に変動が認められた12遺伝子について、定量的PCRにてmRNAの発現を確認したところ (図3)、Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5 (BIRC5)、DRAXIN 及び Serine proteinase inhibitor clade B member

Birc5、DRAXIN 及び SERPINB12 遺伝子の蛋白質発現量について Western Blotting 法を用いて解析した。代表的な Western Blot 像を図4に示す。また、これら遺伝子の経時的蛋白質発現量を図5に示す。

Birc5 は Day2 にピークがあること、DRAXIN は Day3~5 にピークがあること、SERPINB12 は Day5~9 日にピークがあることが明らかになった。ただし、統計学的有意差は認められなかった。

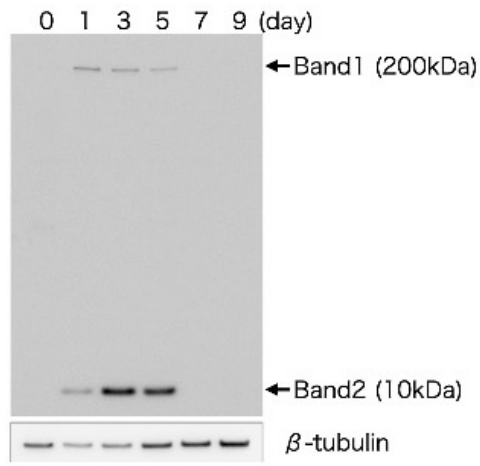


図6 代表的な CD5L の Western Blot 像

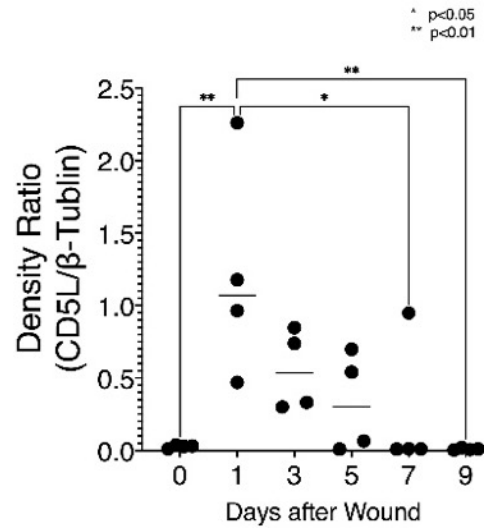


図7 CD5L の経時的発現量

(5) まとめ

本研究により、皮膚損傷部の受傷後の Transcriptome 解析にて詳細な遺伝子発現プロファイルが得られた。また、このデータを基盤として、Birc5、DRAXIN、SERPINB12 及び CD5L の発現を検討し、CD5L が受傷後 1~5 日の受傷時期マーカーとして十分に応用しうると考える。今後、法医剖検例を対象としてこの結果を確認して、法医実務に応用したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 | 梅原 敬弘 (UMEHARA Takahiro) (60617421) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301) | |
| 研究分担者 | 村瀬 壮彦 (MURASE Takehiko) (40823315) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |