

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06393・19K21472

研究課題名(和文) Chitinase様蛋白質類を活用した受傷時期診断法の確立

研究課題名(英文) Wound age estimation with Chitinase/Chitinase-like proteins

研究代表者

村瀬 壮彦 (MURASE, Takehiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：40823315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：科学的・客観的な受傷時期診断法の確立のために、ヒト損傷皮膚における Chitinase-like 1(CHIL1)蛋白質発現の検討を行った。CHIL1は主に炎症及び治癒反応のために浸潤したマクロファージに発現しており、受傷時期と全細胞あたりの CHIL1陽性率の関係として、受傷0-1日後ではほぼ発現を認めず(平均値:0.1%)、受傷2-3日後では陽性細胞が出現し(1.0%)、受傷4-6日後で陽性率は最大となり(5.6%)、受傷7日後以降で減少した(1.3%)。受傷4-6日後の群で他群と比較して有意に陽性率が増加しており、CHIL1発現の評価によって、受傷後4-6日の損傷が検出できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、乳幼児・小児のみならず成人や高齢者に対する虐待件数が増加しており、虐待死が疑われる法医剖検数も同様に増加している。このような事例では長期の暴力作用を証明し、かつ被疑者の供述の信憑性を判断するために、個々の損傷についてその受傷時期を明確に提示することが司法現場から求められる。しかし受傷後のある特定の期日を科学的に診断する方法は未だに確立されておらず、受傷後の特異的な期日に発現する診断マーカーを同定・確立することが法医学分野において希求されている。本研究によって受傷4-6日後の損傷を科学的に検出することが可能となり、虐待死事案等におけるより信頼性の高い法医学鑑定に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To establish a scientific and objective method for diagnosing the age of wound, we investigated the expression of Chitinase-like 1 (CHIL1) protein in human injured skin. We classified samples of injured skin into 4 groups; 0 to 1 day after injury (group A), 2 to 3 day after injury (B), 4 to 6 day after injury (C) and over 7 day after injury (D). CHIL1 was mainly expressed in macrophages infiltrated due to inflammation and healing reactions. As a relationship between wound age and CHIL1 positive rate per infiltrated inflammatory cells, we revealed that almost no CHIL1 expression was observed in the group A (mean value: 0.1%), positive cells appeared in the group B (1.0%), the positive rate became maximum in the group C (5.6%), and decreased in the group D (1.3%). Compared with other groups, the positive rate of CHIL1 was significantly increased in the group C. It was considered that the wound age of 4-6 days after injury could be detected by the evaluation of CHIL1 expression.

研究分野：法医学

キーワード：受傷時期推定 Chitinase-like 1 免疫組織化学 損傷皮膚 ヒト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、児童虐待や家庭内暴力、老人虐待の発生件数が増加し、これらが疑われる法医剖検数も増加している。このような事例においては肉眼的にも新旧混合する損傷が多数存在するため、長期間に亘る暴力作用を証明し、被疑者の供述の信憑性を科学的に判断するために、司法(裁判)の場からは個々の損傷について具体的かつ詳細に受傷時期を判断し、明解に法医病理学的診断を提示することが求められる。

(2) 現在汎用される受傷時期診断法は簡便な肉眼的観察のみに基づくものである。この方法は損傷部の皮下出血の色調から受傷時期を判断するが、色覚には個人差が存在し、明るさ等の環境によって色彩に変化が生じるため、著しく客観性に乏しい診断法と言わざるを得ない。また、組織学的な評価による受傷時期診断も行われており、汎用されている染色法はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、ベルリンブルー(BB)染色である。HE染色では炎症細胞等の浸潤の程度を評価し大雑把な受傷時期を推定する。しかし、判断には評価者の習熟が必須で、評価基準が曖昧なため同一標本でも評価者により判断が異なることがあり、普遍的な診断法となり得ていない。また、BB染色は受傷後約1週間程度より出現するヘモジデリンを利用し受傷時期推定を行うが、損傷が受傷から1週間程度経過しているか否かの判断にしか活用できず、より早期の受傷時期診断には全く活用できない。

(3) これまでに損傷治癒に関連する種々の遺伝子や蛋白質をマーカーとした受傷時期の推定・診断法について多数の様々な報告が為されてきた。しかし、法医実務レベルでの応用が可能なマーカーは未だ確立できていない。受傷後のある特定の期日を診断することが可能な、正確で信頼性のある検査法は現在皆無であり、その確立が求められてきた。

2. 研究の目的

(1) 受傷後の特異的な期日に発現する最適な診断マーカーを同定・確立することは法医病理学分野における急務であり、我々は受傷時期診断マーカーの探索を行ってきた。マウス損傷皮膚を用いたプロテオーム解析等分子生物学的研究によって、Chitinase-like 3(Chil3)という蛋白質の発現が受傷時期診断に有用である可能性を明らかにした(Murase et al. Int J Legal Med. 2017.)。さらに、Chil3がChitinase/Chitinase-like proteinsという蛋白質ファミリーに属することに着目し、同ファミリー蛋白質についても検討を行ったところ、Chitinase-like 1(Chil1)の発現に時期特異性があることを明らかにした。

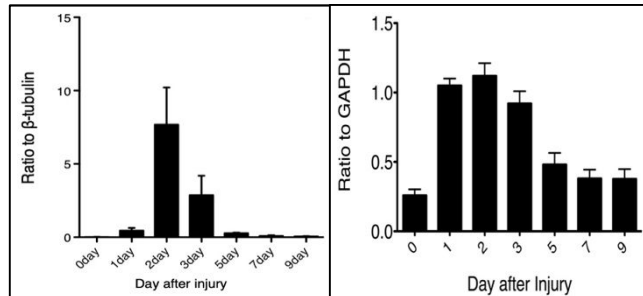


図1: マウス損傷皮膚における CHIL3 及び CHIL1 発現量の変化

(2) これらの結果を踏まえ、ヒトの損傷皮膚においても両タンパク質の発現が時間的特異性をもって発現する可能性が考えられた。本研究ではヒト損傷皮膚における両蛋白質の発現動態を明らかにしたうえで、これを指標とした法医病理学的受傷時期診断法を確立し、法医解剖鑑定への還元を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 当分野に保存されている、2015～2018年における非腐敗(組織採取まで死亡後3日以内)の法医剖検例から採取した受傷時期の様々なパラフィン包埋ヒト皮膚損傷検体を無作為に選出した(症例数:51、サンプル数:122)。各検体の受傷時期を捜査情報に基づいて判断し、更に4群に分類を行った(A群:受傷から0-1日後、B群:受傷から2-3日後、C群:受傷から4-6日後、D群:受傷から7日以降)。本研究に使用したヒト皮膚

性別	男性	女性
年齢(平均)	0-90(55.18)	0-95(71.19)
N	23	28
サンプル数	62	60

表1

受傷からの経過(日)	0-1	2-3	4-6	7-
サンプル数	33	26	23	40

表2

損傷組織検体及びその受傷時期分類について表1及び表2に示す。各検体について抗CHIL1抗体、抗CHIL3抗体を用いた免疫組織化学法による検出を行った。得られた組織像はバーチャルスライドにてデジタルデータとして保存し、倍率200倍での全細胞数あたりの陽性細胞数を陽性率として求めた。1スライドあたりランダムに選択した10視野での平均陽性率をそれぞれ算出した。受傷時期分類に対する平均陽性率についてTukey法による多群間比較を行った。

4. 研究成果

(1) Chitinase はその名が示す通り、キチンを加水分解する酵素として働く。脊椎動物は生体物質としてキチンを保有しないが、キチンを有する生物(節足動物や真菌)に対する防衛機能の一つとして Chitinase を用いている。一方 Chitinase-like proteins はキチン分解能を有さないが、Chitinase と共通するドメインを持ち、マクロファージや軟骨細胞など様々な細胞に発現している。組織修復、免疫反応や細胞増殖に働くとされ、自己免疫疾患や悪性腫瘍との関連が示唆されているが、現在でもその詳細な機能は明らかになっていない。

(2) ヒト損傷皮膚組織における CHIL1 発現を免疫組織化学法にて検討したところ、損傷皮膚では主にマクロファージに発現していることが明らかとなり(図2) 損傷部での炎症やその後の組織修復に働いていることが示唆された。なお、CHIL3 については染色を試行したが、抗原賦活化法など検討を重ねたものの、ヒト組織での発現を確認することは出来なかったため、以降は CHIL1 についての検討のみとした。

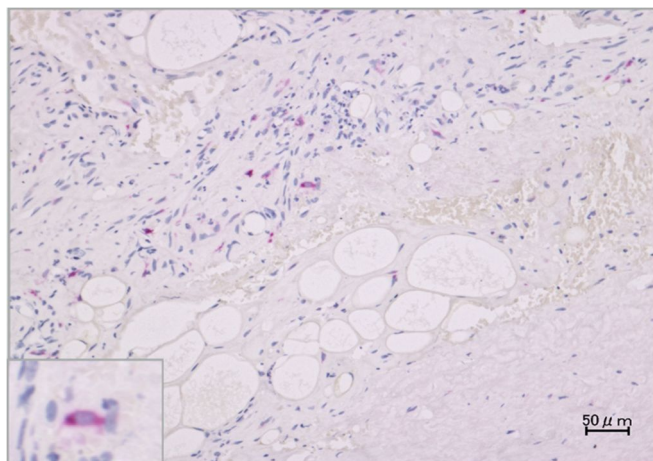


図2: 受傷6日後のヒト損傷皮膚での CHIL1 発現

(3) 受傷時期と CHIL1 発現率の関係を図3に示す。A群ではほぼ発現が認められず(平均陽性率:0.1%) B群では陽性細胞が出現し(1.0%) C群では陽性のピークとなり(5.6%) D群では発現の減少が認められた(1.3%)。C群は他群に比較して、有意に陽性率が増加していた。ヒト損傷皮膚組織において CHIL1 の発現を評価することで、受傷から4-6日経過している損傷を検出できる可能性が示され、受傷時期診断マーカーとして法医学鑑定での活用が期待される結果となった。

(4) 皮膚損傷の修復過程は 炎症期、増殖期、成熟期の3段階に分類でき、C群は増殖期に相当すると考えられる。増殖期では線維芽細胞や細胞外マトリックスが増加し、損傷部の補填が行われるが、CHIL1 がこれらの機能に何らかの作用を与えている可能性が示唆される。また、マウス損傷皮膚組織を用いた同様の検討では、受傷後1-3日で CHIL1 陽性細胞が増加していたのに対し、ヒト損傷皮膚組織では受傷から4-6日後において増加が認められた。非常に興味深い結果と考えられるが、現時点ではこの乖離を説明できる知見を持っておらず、今後さらなる研究を行う予定である。

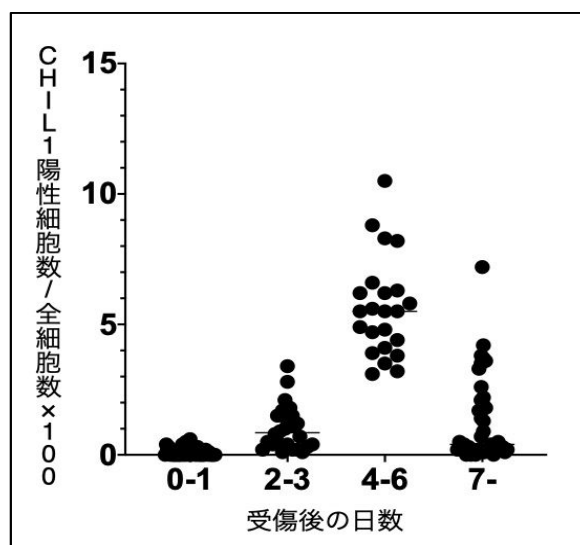


図3: ヒト損傷皮膚における CHIL1 陽性率

(参考文献)

Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications, G. S. Gupta, Springer-Verlag Wien, 2012

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
--	---------------------------	-----------------------	----