

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790461
 研究課題名 (和文) 2次元電気泳動法を活用した窒息の法医病理診断法の開発
 研究課題名 (英文) Development of diagnosis for asphyxia using 2-dimensional electrophoresis

研究代表者
 池松 和哉 (IKEMATSU KAZUYA)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：80332857

研究成果の概要 (和文)：

窒息マウスモデルの前脳、小脳において2次元電気泳動法を活用して、窒息特異的な蛋白質の検索を行った。試料は、麻酔下マウスに30分のHanging処置を施した後に窒息死させ、死亡直後(H-0群)、死亡60分後(H-60群)の脳を採取した。また、Decapitation処置を行ったマウスの死亡直後(C-0群)、死亡60分後(C-60群)をControlとして用いた。

その結果、前脳にて約100個程度のスポットが認められた。C-0群のスポットをReferenceとした。Spot58と73はH-0、60群で増加していた。H-60群のSpot22、98は有意に増加していた。

さらに、小脳では、前脳と同様に、約100個程度のスポットが認められ、C-0群のスポットをReferenceとしたところ、Spot38と39の比、Spot52と53の比はH-0、60群で増加していた。H-60群のSpot96、99は有意に増加していた。

今後、これらSpotの蛋白質を同定し、法医剖検例に応用したい。

研究成果の概要 (英文)：

We explored a specific protein which responded to hypoxia on an animal model of asphyxia with 2-Dimensional electrophoresis. Mice were anaesthetized after which hypoxia was induced by neck ligation for 30 min, then were killed by decapitation, and the brains were dissected either immediately (H-0) or 60 min (H-60) after death. Control mice without ligation of the neck were killed by decapitation under anaesthesia immediately (C-0) or 60 min (C-60) after death.

In forebrain, about 100 spots were observed. 2 spots were increased in H-0 and H-60. In addition, other 2 spots were increased. In cerebellum, about 100 spots were observed. 2 spots were increased in H-0 and H-60. In addition, other 2 spots were increased.

These increased spots might be asphyxia response proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医病理学

1. 研究開始当初の背景

我々は、窒息（低酸素）、特に頸部圧迫における窒息時の生体反応に関して、かねてより、分子生物学的・生化学的手法を駆使して、非常に独創的な研究を行っている。

現在までに、遺伝子の転写・発現状態を多面的にかつ詳細に検討・解析できる Florescence Differential Display (FDD) 法や Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いて、マウスの頸部圧迫モデル脳において、低酸素（窒息）時に特異的に発現する遺伝子を数多く同定し、その結果の一部を既に報告した（2006, Forensic Sci. Int.）。しかし、FDD 法や SAGE 法により同定された多数の遺伝子では、窒息モデルにおける遺伝子の発現量（転写量）の変動が、極めて微量な mRNA 量を検出しようとする Real Time quantitative PCR (q-PCR) 法では認められるものの、In situ hybridisation (ISH) 法を用いた組織学的検討や Dot blot 法等を用いた蛋白質の量的検討では、窒息モデルとコントロール群において有意な差異を確認することはできず、C-fos gene product 等の数個の遺伝子（とその産物である蛋白質）が、その発現量に差異を認めるのみであった。従って、窒息時には、数多くの遺伝子発現量の増減が生じているものの、直接的に蛋白質発現量に反映されていない可能性があると考えられる。既に報告したように Excitatory Amino Acid Transporter (Forensic Sci. Int. 2000) や Oxygen Regulated Protein-150 (Legal Med. 2004) のように、窒息時における蛋白質の発現動態が変動することを実務レベルでは捉えているが、FDD 法や SAGE 法を利用した実験モデルではこれら遺伝子の増減を確認できていないことも、窒息時での遺伝子発現量と蛋白質発現量に乖離があることを示唆している。さらに、法医剖検例ではある程度の死後経過時間をどうしても伴うため、遺伝子 (mRNA) を検討対象にすることはその物理学的および生化学的脆弱性から実際的ではなく、検討対象を遺伝子産物 (蛋白質) とした方がより実務的である。つまり、法医実務的には、窒息（低酸素）時の生体における反応では遺伝子発現を検討するよりも、より直接的に「窒息特異的な蛋白質の発現」を捉えることが肝要であると考えられる。

現在、法医学分野における窒息の診断は主観的に促えられる所見（外表所見、内景所見）に頼らざるを得ず、同様の症例においても法医学者によって診断に差異が生じることで社会的混乱をまねていることは周知の事実である。殊に、乳幼児の突然死では、うつ伏せ寝による窒息死と SIDS の鑑別に苦慮することはしばしば経験することであり、同様の症例でも法医学者によってその診断に差異を生じており、「うつ伏せ寝＝窒息死」という状況証拠のみに頼った非科学的な剖検診断がまかり通っていることも事実である。このことから察せられるとおり、科学的かつ客観的な**窒息の診断法を確立**することは法医実務にとって急務である。本研究における窒息特異的蛋白質を見出し、このタンパク質に対する抗体を法医剖検例に応用することで**窒息の法医病理的診断法を確立**することは、法医実務において大きな問題となっている窒息死と SIDS の鑑別等にも大いに寄与することができ、社会的にも貢献できるものと確信している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物モデルを用いて窒息（低酸素）時の脳における蛋白質の発現動態を数千・数万の単位で検討し、窒息（低酸素）に特異的に応答する蛋白質を同定するとともに、これらの蛋白質を指標とした窒息の法医病理診断法を確立することである。本研究では極めて斬新な方法である定量的二次元電気泳動法を用いるが、この方法は、蛋白質の等電点と分子量の違いを利用し、未知、既知にかかわらず組織や細胞における蛋白質の質的・量的変化を何千という単位で包括的・大規模、かつ、鋭敏に検索でき、さらに、発現解析データを厳密に数値化できることから、蛋白質の発現動態解析に最適な方法である。本研究では、現在までに我々が明らかにしている種々の蛋白質の動態を指標として、（低酸素）時の脳における蛋白質の発現量を定量的二次元電気泳動法を活用したプロテオミクス的アプローチを行うことによって、より直接的に窒息（低酸素）に特異的に反応する蛋白質を新たに同定したい。

3. 研究の方法

○動物実験

頸部圧迫モデルは現在までに我々が行った方法に準じて行った (K. Ikematsu et. al. Leagl Med. 2006, Foresic Sci. Int. 2006)。具体的には、麻酔下マウスに 30 分の Hanging 処置を施した後に窒息死させ、死亡直後 (H-0 群)、死亡 60 分後 (H-60 群) の脳を採取した。また、Decapitation 処置を行ったマウスの死亡直後 (C-0 群)、死亡 60 分後 (C-60 群) を Control として用いた。

○試料調製

頸部圧迫によって死亡したマウスより脳を摘出し、 -80°C にて保存後、前脳および小脳について sample 処理 (albumin、IgG 除去等) を行った。

○2次元電気泳動

Sample、Control について、pH レンジ 4-7 にて等電点電気泳動後、12%ポリアクリルアミドゲルにて PAGE をおこなった。銀染色後、画像解析処理を行い、窒息群特異的なスポットを検索した。

4. 研究成果

2次元電気泳動・画像解析処理を行った代表的な画像を下記に供覧する。

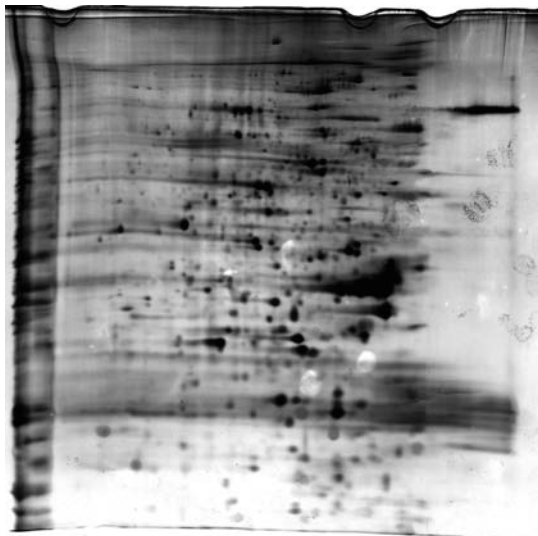


図 1
前脳 C-0 における 2次元電気泳動像

前脳にて約 100 個程度のスポットが認められた。C-0 群のスポットを Reference としたところ、Spot58 と 73 は H-0、60 群で増加していた。H-60 群の Spot22、98 は有意に増加していた。

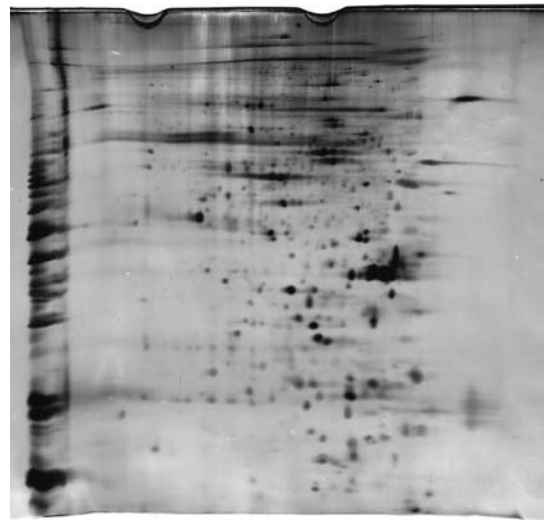


図 2
前脳 C-60 における 2次元電気泳動像

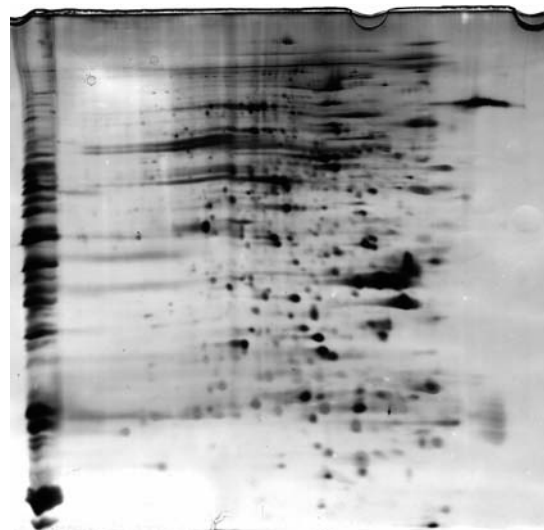


図 3
前脳 H-0 における 2次元電気泳動像

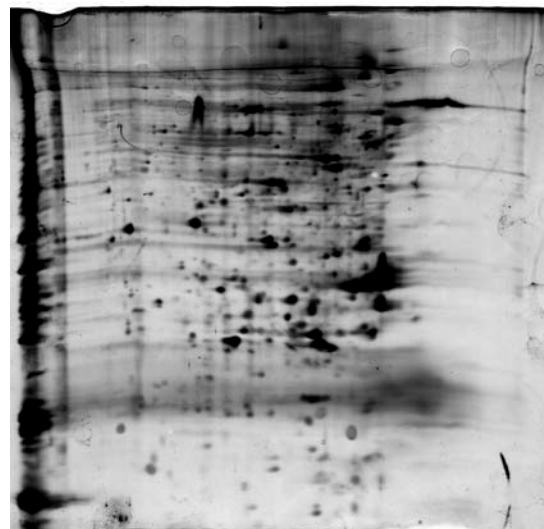


図 4

前脳 H-60 における 2 次元電気泳動像

その結果、それぞれ群にて、前脳と同様に約 100 個程度のスポットが認められた。C-0 群のスポットを Reference とした。Spot38 と 39 の比、Spot52 と 53 の比は H-0、60 群で増加していた。H-60 群の Spot96、99 は有意に増加していた。

今後、これら Spot の蛋白質をペプチドフィンガープリンティング法等を用いて、Spot 蛋白質を同定し、法医剖検例に応用したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池松 和哉 (IKEMATSU KAZUYA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

准教授

研究者番号：80332857