

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10560

研究課題名(和文) 樹状細胞サブセットを指標とする皮膚損傷受傷後経過時間判定法の確立

研究課題名(英文) Forensic pathological study on temporal appearance of dendritic cells in skin wounds

研究代表者

國中 由美(Kuninaka, Yumi)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：60843282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：53個の皮膚創傷中の樹状細胞(DC)を検出した。CD11c+HLA-DR⁺DCは、受傷後3日の皮膚創傷で初めて観察され、その後、受傷後経過時間が長くなるにつれて、DC数が増加することが判明した。DC数は受傷後経過時間が12日の創傷で最も多くなっていた。皮膚創傷におけるDCの存在は、受傷後経過時間が3日以上であることを判定できる可能性がある。さらに、皮膚創傷に1視野あたり50個以上のDCが存在する場合、その受傷後経過時間は4-14日と判断される。ヒトの皮膚創傷におけるDCの出現は、受傷後経過時間を判定する上で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

樹状細胞(DC)については、その提唱者であるDr.Steinmanが2011年ノーベル医学生理学賞を受賞し、その後、自然免疫、アレルギー、腫瘍免疫等の様々な医科学分野への応用が試みられてきた。しかしながら、法医学領域においてDCに着目した研究はほぼ皆無に等しい状態と言える。また、皮膚損傷治癒は、法医学領域のみならず、病理学や皮膚科学、外科学、形成外科学といった他分野との関連性が深い学際的なテーマである。したがってこのように基礎的研究と実務的研究を融合させて得られた成果は法医学領域のみならず、他分野における研究の発展にも寄与する可能性が高く、この点も本研究の創造性に富む点である。

研究成果の概要(英文)：A double-color immunofluorescence analysis was carried out with anti-CD11c and -HLA-DR⁺ antibodies to detect DCs in 53 skin wounds (their postinflation intervals: group I, 0-3 days; group II, 4-7 days; group III, 9-14 days; and group IV, 17-21 days). CD11c+HLA-DR⁺ DCs were first observed in skin wounds with postinflation intervals of 3 days, and the DC numbers were found to be elevated in skin wounds with the subsequent increase in postinflation intervals. Semi-quantitative morphometric analyses showed that the DC number was the highest in the 12-day-old wound. Thus, the presence of DCs in a skin wound was possibly estimated as postinflation intervals of at least 3 days. Furthermore, when a skin wound contained > 50 DCs, its age would be judged as 4-14 days. Collectively, the appearance of DCs in human skin wounds may provide useful information in determining the age of a wound.

研究分野：実験病理学

キーワード：樹状細胞 受傷後経過時間

1. 研究開始当初の背景

皮膚損傷部局所における樹状細胞(dendritic cell, DC)の時間的・空間的出現様態を検討し、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可能か否かを検証する研究である。本研究は、基礎的研究と実務的研究の2つに大別され、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DC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ヒト剖検試料を用いてDC出現を免疫組織科学的に検討する。最終的には、DCの皮膚損傷受傷後経過時間判定の指標としての法医実務の有用性を検証する。

2. 研究の目的

法医学は臨床医学と同様に実務的な応用医学であり、常に最先端の基礎研究の知見が応用されなければならない。法医実務において、皮膚損傷が認められた場合、その損傷がどれくらい前に受傷した損傷なのかの判断、すなわち皮膚損傷の受傷後経過時間判定は最重要な診断事項の一つである。したがって、皮膚損傷の受傷後経過時間判定に関する研究は、古典的ではあるが、現在も尚重要な研究テーマの一つである。皮膚損傷の受傷後経過時間判定に関する研究では、皮膚損傷治癒に関与する細胞、生理活性物質または細胞外マトリックスがその指標として検討されてきた。申請者の教室では、これまでサイトカインやケモカイン等の生理活性物質に着目し、皮膚損傷の受傷後経過時間に関する研究を包括的に実施してきた (Forensic Sci Int. 2010;203:93, Leg Med. 2007;9:109)。

樹状細胞(dendritic cell, DC)は、白血球の一種で、生体内に広く分布し、侵入した異物由来の抗原に対するT細胞を活性化するための抗原提示機能を有することで、免疫監視細胞としての役割を果たしている。DCは一系統の細胞ではなく、共通の細胞表面マーカー以外に、各群特異的表面抗原を発現することで複数のサブセットを構成している (アレルギー. 2016;65:11)。各DCサブセットで、細菌感染、ウイルス感染およびアレルギー反応等において特有の機能がある (アレルギー. 2016;65:11)。皮膚は生体と外界を隔て、感染性微生物、有害化学物質等から生体を防御する重要な器官である。その皮膚組織中にも、DCが存在するという事は皮膚組織が免疫担当器官として極めて重要であり、種々の皮膚疾患におけるDCの役割が注目されている (J Invest Dermatol. 2009;129:302)。

精度の高い受傷後経過時間判定を行うには複数の客観的指標を用いることが重要で、且つ各指標の独立性が高いほどそれらの実務的価値は高まる。法医学領域でこれまでDCに着目した研究は国内外を通じて、今日までわずかに1編にとどまっている (Forensic Sci Int. 2014;244:179)。申請者は、いくつかのサブセットを構成するようなHeterogenousなDCの、損傷治癒における動態を明らかにすることによって、それらが皮膚損傷受傷後経過時間判定のために有益な情報を与える可能性があると考えた。そこで、本研究では、皮膚損傷治癒過程における損傷部局所での総DCおよび各DCサブセットの検出にチャレンジして、それらの時間的・空間的出現様態を明らかにし、法医学的観点からそれが受傷後経過時間判定のための有用な指標となり得るか否かについて検証する。

3. 研究の方法

本研究は、実験動物であるマウスモデルによる基礎的研究と法医解剖事例で得た受傷後経過時間が判明しているヒトの皮膚損傷試料による実務的研究を組み合わせた包括的研究である。基礎的研究ではマウス皮膚損傷モデルを用いて経時的に損傷部を採取し、治癒過程で出現する全DCとその各DCサブセット (形質細胞様DCや抑制性DC等) について、複数の抗体を組み合わせ免疫組織化学的および分子生物学的に検出して、その時間的・空間的出現様態を明らかにする。これらの基礎的研究結果に基づいて、実務的研究では法医剖検例から採取した受傷後経過時間の判明している皮膚損傷試料について、蛍光多重免疫染色によりDCの検出を行う。基礎的研究と実務的研究の結果を総合し、DCの出現様態を受傷後経過時間との関連性を統計的に解析して既存の指標を用いた診断法と比較検討することにより、法医実務に応用可能な総DCおよびそのDCサブセットを指標とする新しい受傷後経過時間判定法を確立する。

(1) マウス皮膚損傷モデルは、申請者の所属する研究室ですでに確立している (図1)。具体的には、マウスをイソフルランにより麻酔し、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製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、DEC205 に対する抗体を用いて総 DC を検出する (DEC205 ならびに CD11c をタンパク質レベルで検出する実験手技を習得している：図 2)。さらに、抗 CD11c 抗体と HLA-DR α 、CD4、CD8 および XCR1 に対する各抗体を組み合わせたで蛍光二重免疫染色を行う。染色された切片の観察は、組織切片定量解析イメージングシステム (Mantra, Perkin-Elmer 社) を用いて、同一組織切片で各 DC サブセットの発現動態を解析する。

(3) 経時的に採取した皮膚損傷部試料の一部を用いて細胞分離を施し、上記 (2) で免疫組織化学的に検出した総 DC および各 DC サブセットを flow cytometry により検出し、損傷治癒過程における総 DC および各 DC サブセットの時間的出現様態を明らかにする。

(4) 基礎的研究結果に基づいて皮膚損傷治癒過程における DC 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、法医剖検例 (ヒト皮膚損傷部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。さらに、応募者はこれまでに予備実験において、受傷後 12 日のヒト皮膚損傷部における HLA-DR ならびに CD11c をそれぞれタンパク質レベルで検出することに成功しており、さらにデータを蓄積する。

(5) 上記の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部試料について、基礎的研究で得られた DC 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 DC 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、DC 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、DC 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

ヒト皮膚損傷サンプルは、Table 1 に示すような wound type で、合計 53 サンプルを使用した。また、受傷後経過時間によって I~IV の 4 つにグループ分けして解析した (Table 2)。

Table 1. Wound types

Type	Number
Stab wounds	15
Incised wounds	8
Surgical wounds	23
Lacerations	7

Ages: 8 to 75 years (mean age, 40.6 years)

Table 2 Wound group

Group	Wound age	Number
I	0-3 days (inflammatory phase)	15
II	4-7 days (early proliferative phase)	10
III	9-14 days (late proliferative phase)	16
IV	17-21 days (maturation phase)	12

(1) 正常皮膚および受傷後経過時間が 2 日以内の損傷部においては、CD11c+HLA-DR α +樹状細胞は検出されず、受傷後経過時間が 3 日以降の損傷部において CD11c+HLA-DR α +樹状細胞が観察された。受傷後経過時間に伴って CD11c+HLA-DR α +樹状細胞数は増加した (図 3)。

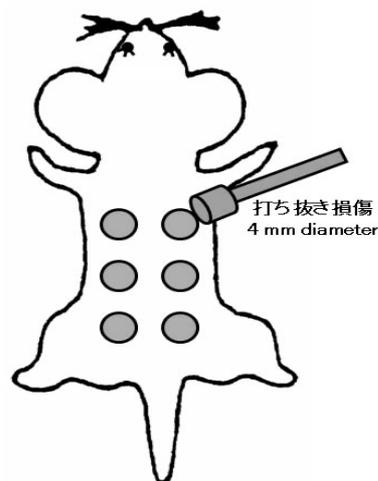


図 1. マウス皮膚損傷モデル

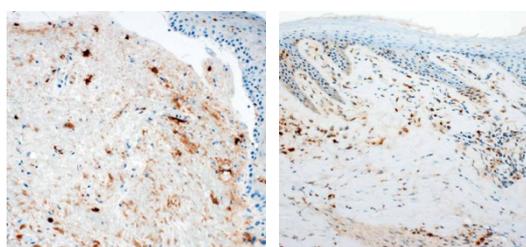


図 2. 受傷後 6 日のマウス皮膚損傷部 (左, DEC205; 右, CD11c)

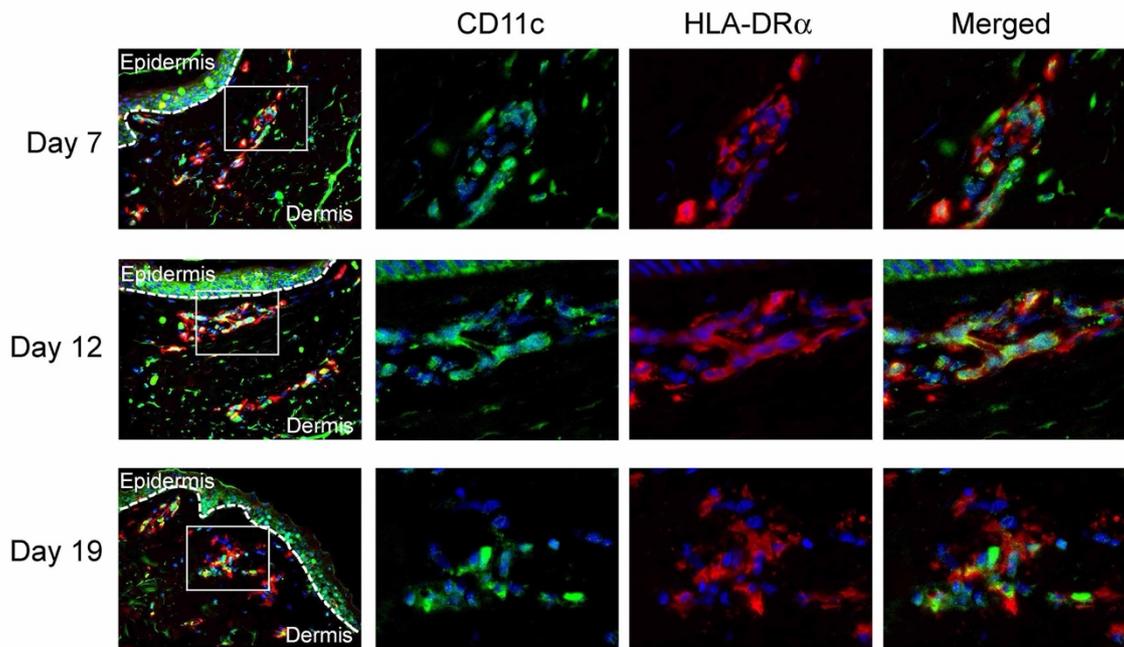


図3. ヒト皮膚損傷部における CD11c+HLA-DR α +樹状細胞の検出

(2) 形態計測学的に、受傷後経過時間と CD11c+HLA-DR α +樹状細胞数に相関が認められた (図4A). グループ II と III の間では有意な差を認めなかったが、グループ I と II, および III と IV の間で有意な差を認めた (図4B).

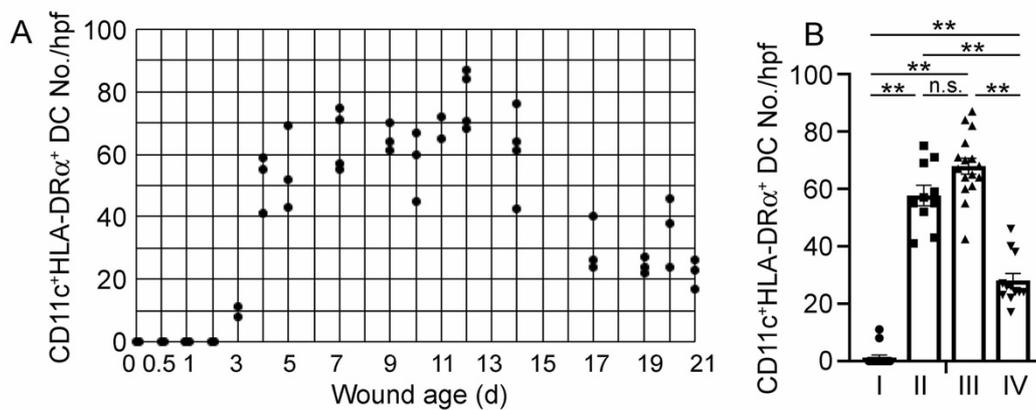


図4. CD11c+HLA-DR α +樹状細胞の形態計測学的解析

(3) さらに、CD11c+HLA-DR α +樹状細胞数と年齢、性別、wound typeの間にはそれぞれ相関は認められなかった (図5).

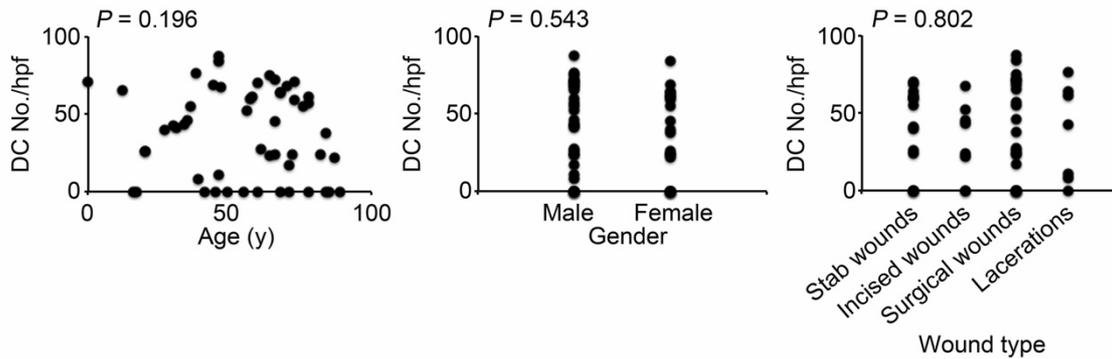


図5. CD11c+HLA-DR α +樹状細胞数と年齢、性別、および wound type 間における相関の解析

(4) 受傷後経過時間が1日以内の損傷ではCD11c+HLA-DR α +樹状細胞はほとんど検出されなかったが、3~14日の損傷ではCD11c+HLA-DR α +樹状細胞の集積が時間依存的に増加していた。これらのことから、樹状細胞は受傷後経過時間の判定に有用な細胞マーカーである可能性が示唆された。樹状細胞を検出するための単一のマーカーは存在しないため、我々はヒト皮膚損傷試料中の樹状細胞を検出するために2つの異なるマーカーを利用した。CD11cとHLA-DR α は、ヒトの炎症性樹状細胞の検出に広く用いられている。その結果、II群およびIII群(創傷日数:4~14日)のすべての創傷標本から1視野あたり40個以上のDCが検出された。IV群(創傷年齢:17~21日)では、II群およびIII群に比べ、樹状細胞の数が明らかに減少した。IV群では、樹状細胞数が1視野あたり40個以上である損傷が2つあった。特に、受傷後経過時間が4~14日の26サンプルのうち22サンプルで、1視野あたり50個以上の樹状細胞が検出された。このように、今回の結果は、ヒト皮膚損傷サンプルのCD11c+HLA-DR α +樹状細胞数が1視野あたり50個以上であれば、受傷後経過時間が4~14日であることを示唆するものであった。しかし、単一のマーカーを用いるだけでは、創傷年齢の判定に高い信頼性と客観性を与えることはできない。CD11c+HLA-DR α +樹状細胞の数だけでは、受傷後経過時間が4~7日の損傷(II群)と9~14日の損傷(III群)を区別することは非常に難しいため、他のマーカーと組み合わせて評価することがヒト皮膚損傷の受傷後経過時間判定に有用であると考えられた。

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 Yumi Kuninaka	4. 巻 134
2. 論文標題 Forensic pathological study on temporal appearance of dendritic cells in skin wounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Legal Med	6. 最初と最後の頁 597-601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00414-019-02185-z	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yumi Kuninaka
2. 発表標題 Forensic pathological study on temporal appearance of dendritic cells in skin wounds
3. 学会等名 IALM（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Kuninaka
2. 発表標題 Forensic pathological study on temporal appearance of dendritic cells in skin wounds
3. 学会等名 DGRM（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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