

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390142

研究課題名(和文)オートファジーの法医診断学への応用—新規指標としての有用性の検証—

研究課題名(英文) Application of autophagy to forensic diagnosis -evaluation of autophagy as a novel marker

研究代表者

木村 章彦 (Kimura, Akihiko)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60136611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：種々の組織障害におけるautophagyの機能とその出現パターンをマウスモデルを用いて解析し、autophagyが組織障害診断の新しい指標となり得るか検討した。シスプラチンによる腎障害ではautophagyは障害発生の早期に出現して障害を軽減するように保護的に機能することを明らかにした。大動脈結紮心肥大モデルを用いた検討では、代償性心肥大の過程でautophagyが出現すること明らかにした。さらに、皮膚創傷治癒糧におけるautophagyを解析し、受傷後速やかに受傷部位でautophagyが抑制されることを見出した。これらのことからautophagyが新規の生活反応となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The function and pattern of appearance of autophagy in the various tissue injury were analyzed in the mouse models. We showed that autophagy was induced in early stage in the kidney of mice administrated with cisplatin, which was a protective response to cisplatin-induced renal injury. We also found that autophagy was induced in the compensatory stage of cardiac hypertrophy. In analysis of autophagy in the skin wound healing process, we found immediate reduction of autophagy in the wound sites, which might be very useful for forensic practice as a novel marker of vitality of skin wound.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：autophagy 薬物中毒 腎障害 心不全 皮膚創傷 法医診断

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内のタンパク分解システムである autophagy が生命科学の分野で大きな注目を集めている。autophagy は酵母で見出され詳しく解析されたシステムであり、酵母をアノ酸欠乏状態におくと細胞内の自らのタンパクを分解してアミノ酸を供給し細胞死から逃れるという防御機構である。このシステムは哺乳類を含めた高等動物にも広く存在し、酵母で見出された autophagy 関連分子はよく保存されており、ヒトにも一連の分子のホモログが見出されている。法医学以外の領域では、種々の疾患の病態に対する autophagy の関わりについて活発に研究が行われ、その重要性は増すばかりである。しかし、これまで法医学診断学の領域で autophagy を対象とする研究はほとんど見られない。本研究は autophagy が法医学診断の新しい指標となり得るかどうか種々のマウスモデルと剖検試料を用いて免疫組織化学的、生化学的および分子生物学的に検証を試みる初めての研究である。

2. 研究の目的

本研究は様々な内的外的侵襲に対する重要な生体防御システムとして注目を集める autophagy を臓器障害の新しい指標として法医学診断に応用することを目的とし、種々のマウスモデルと剖検試料を用いて各臓器障害に特異的な autophagy の出現パターンを解析する。法医学において死因の究明は最も重要かつ困難な課題であり、精度の高い診断を行うには出来るだけ多くの客観的指標を用いることが肝要である。既存の指標とは全く異なる autophagy に注目した新規指標の開発を行い、法医学診断学に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 飢餓マウスの臓器心臓における autophagy の検出と飢餓の指標としての有用性の評価

8週齢雄の Balb/c マウスを 1 - 3 日間絶食し、過麻酔により屠殺後、心臓を採取し、autophagy の進行に関与する分子、microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), beclin 1, p62/SQSTM1 (P62), cathepsin D 免疫組織染色および Western blotting により autophagy を検出した。

(2) cisplatin 腎障害における autophagy の役割解析

8週齢雄の Balb/c および IFN- γ -KO マウスの腹腔に cisplatin (15 mg/kg WT) を投与し、経時的に 3 日目までの血液および腎を採取した。各血液試料について血清尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン (CRE) を測定した。各腎試料については、病理組織化学的および免疫組織化学的解析、RT-PCR による遺伝子発現解析、Western blotting によるタンパクレベルの解析、電子顕微鏡による autophagosome の解析および Flow Cytometry による解析を行った。さらにマウス腎初代培養細胞を用いた解析も行った。

(3) 大動脈瘤解離の病態形成における autophagy の役割解析

8週齢雄の Balb/c および IFN- γ -KO マウスの背部皮下にマイクロ浸透圧ポンプを挿入し、angiotensin II (ANG) (1.4 mg/kg/day) を持続投与した。投与開始後 2 週までの生存率の解析および 2 日目、5 日目の

大動脈の採取を行い、病理組織化学的および免疫組織化学的解析、RT-PCR による遺伝子発現解析および Western blotting によるタンパクレベルの解析を行った。

(4) 皮膚損傷組織における autophagy の解析

0 時から 22 時まで 2 時間間隔で、8 週齢雄の Balb/c マウスの背部に麻酔下でパイオプシーパンチ (4 mm) を用いて打ち抜き損傷を作製した。打ち抜いた皮膚組織は正常皮膚組織試料とした。損傷作製後 0.5 から 24 時間後まで経時的に 8 mm のパイオプシーパンチで損傷組織の周囲を打ち抜き損傷組織試料とした。各皮膚試料について組織化学的および免疫組織化学的解析、Real-time RT-PCR による時計遺伝子の発現解析、Western blotting による autophagy の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 飢餓マウスの臓器心臓における autophagy の検出と飢餓の指標としての有用性の評価

3 日間絶食したマウスの心臓における autophagy の変化を LC3-II を指標として western blotting により解析すると、絶食 2 日目に最大となり、3 日目には非絶食マウスと同レベルとなった (図 1)。

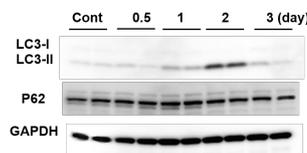


図1. 絶食により心臓に誘導される autophagy と p62.

したがって、心臓の LC3-II を指標として飢餓状態を診断することは困難と思われた。

(2) cisplatin 腎障害における autophagy の役割解析

野生型マウスの腹腔に cisplatin を投与すると、投与後 6 時間をピークとして腎に IFN- γ の遺伝子発現が誘導され、その発現細胞は CD3 陽性リンパ球および LY-6G 陽性好中球であった (図 2)。

cisplatin の腹腔内投与による腎障害は IFN- γ -KO マウスが野生型マウスに比較して、生化学検査 (BUN, CRE) および病理組織学的検査においても

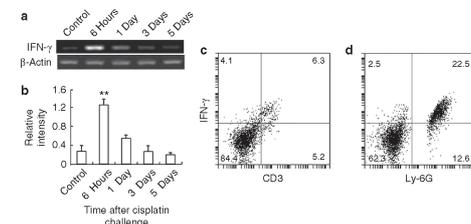


図2. 野生型マウスの腎における Cisplatin により誘導される *Ifng* の遺伝子発現。a, b) RT-PCR による *Ifng* の遺伝子発現解析。c, d) Flow cytometry による IFN- γ 発現細胞の解析。

有意に高度な腎障害を惹起した (図 3)。

骨髄キメラマウスを用いた解析から、この表現型を規定するのは骨髄由来の細胞 (リンパ球および好中球) が産生する IFN- γ であることが示された (図 3 f)。

マウス尿細管上皮細胞初代培養細胞に対する cisplatin、IFN- γ の作用および bafilomycin による

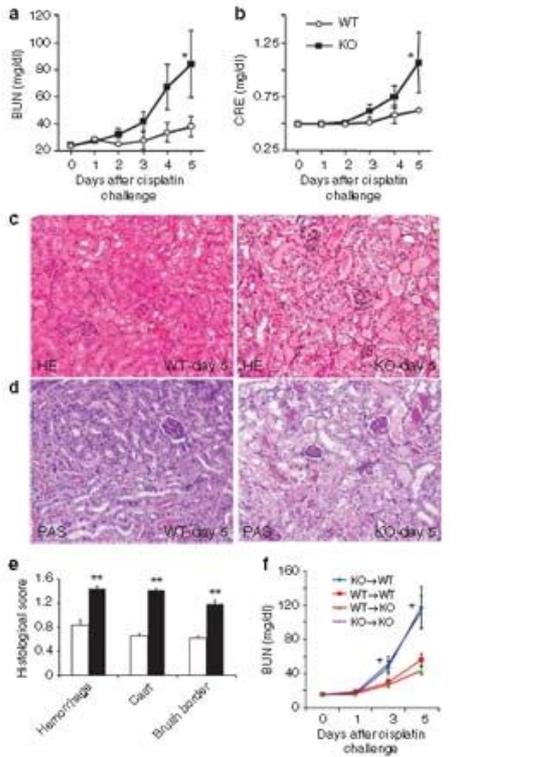


図3. Cisplatinによる腎障害。a, b)腎障害の指標BUNおよびCREの測定。c, d)腎組織障害の病理組織学的解析HE染色およびPAS染色。e)腎組織障害のscoring。f)骨髄キメラマウスにおけるcisplatin腎障害(BUN)。

autophagy抑制の影響をWestern blottingにより検討すると、IFN- γ はautophagosomeの酸性化を介してcathepsin Dの活性化を誘導し、結果的にautophagic fluxを亢進することを明らかにした。これによりIFN- γ はcisplatinによる尿細管上皮細胞のapoptosisを抑制して保護的に機能することが明らかとなった(図4)。

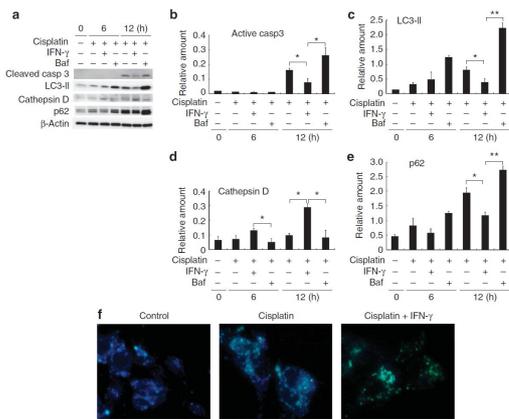


図4. 腎尿細管上皮細胞におけるcisplatin誘導autophagyとapoptosisに対するIFN- γ とbafilomycinの影響。a-e)活性化caspase 3、LC3-II、cathepsin Dおよびp62のWestern blottingによる解析。f)cisplatinで処理した腎尿細管上皮細胞lysosomeのpHに対するIFN- γ の影響。

実際、cisplatinによる腎組織におけるapoptosisをTUNEL法により解析すると、IFN- γ -KOマウスで有意にapoptosisが亢進していた(図5)。

さらに、cisplatinを投与したマウスの腎におけるcaspase3、LC-3II、ATG12-5 conjugate、cathepsin D、p62をWestern blottingにより解析すると、IFN- γ -KOマウスの腎では、野生型マウスに比較して活性

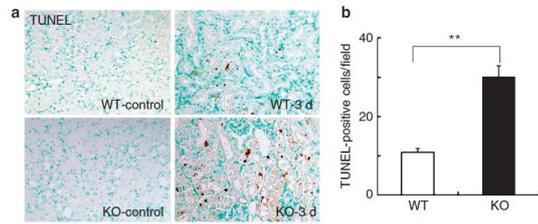


図5. cisplatinによる腎のapoptosisのTUNEL染色。

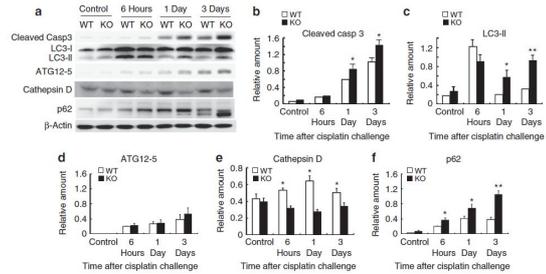


図6. cisplatin投与マウスの腎における活性型caspase 3、LC3-II、ATG12-5 conjugate、活性型cathepsin Dおよびp62のWestern blottingによる解析。

cathepsin Dが減少しており、有意にautophagic fluxが抑制され、結果としてapoptosisが亢進していた(図6)。

cisplatin投与3日後の腎尿細管を電子顕微鏡で観察すると、図7に示すようにIFN- γ -KOマウスでは野生型マウスに比較して著明なautophagosomeの蓄積を認め、IFN- γ -KOマウスではautophagic fluxが強く抑制されていることを示す結果を得た。

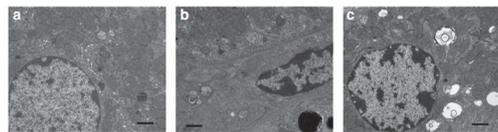


図7. cisplatin投与マウス腎尿細管上皮細胞のautophagosomeの電子顕微鏡像。a)未処理野生型マウス、b)cisplatin投与野生型マウス、c)cisplatin投与IFN- γ -KOマウス。(bars = 10 μ m)。

さらに、ユビキチン化タンパクの腎尿細管への蓄積をWestern blottingおよび免疫組織染色で解析すると、IFN- γ がユビキチン化タンパクの蓄積を抑制することおよびlysosome酵素の阻害剤はユビキチン化タンパクの蓄積を増強し、IFN- γ の効果を打ち消すことが示された(図8)。

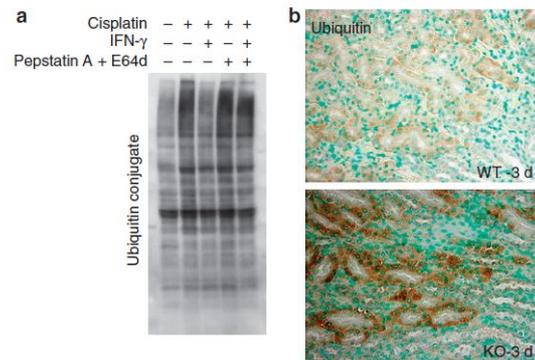


図8. Cisplatinにより誘導される腎尿細管上皮細胞へのユビキチン化タンパクの蓄積に対するIFN- γ およびlysosome protease阻害剤の影響。a)培養尿細管上皮細胞への影響。b)cisplatin投与3日後のマウス腎組織の免疫染色。

以上のことから、cisplatinによる腎障害において

autophagy は早期に亢進し、保護的に機能することが明らかとなった。さらに、障害組織に浸潤したリンパ球や好中球が産生する IFN- γ は autophagy の円滑な進行に必須であり、重要な保護因子として機能することが判明した。

(3) 大動脈瘤解離の病態形成における autophagy の役割

ANGII の持続投与により野生型マウスでは IFN- γ の弱い発現上昇を認めた。ANGII による収縮期血圧の上昇は野生型および IFN- γ -KO マウスに差を認めなかったにも拘らず(図9)、大動脈瘤解離は IFN- γ -KO マウスで著しく、解離腔破裂による死亡率も高度であった(図10)。

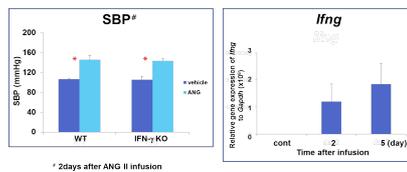


図9. ANG IIによる血圧の変化と野生型マウスの大動脈における IFN- γ 遺伝子の発現

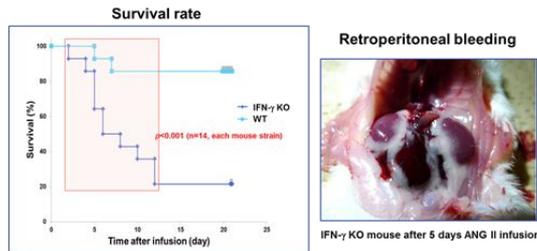


図10. ANG II持続投与による死亡率と解離腔破裂による後腹膜下出血

IFN- γ -KO マウスが野生型マウスに比較してより高度な ANGII による大動脈解離を呈する直接的原因は、IFN- γ -KO マウスにおける MMP9 および MMP12 の発現が野生型マウスに比べて有意に高いことと思われるが(図11)、この MMP9 および MMP12 の発現の差の根本の原因は IFN- γ -KO マウスにおける autophagy が野生型マウスに比べて

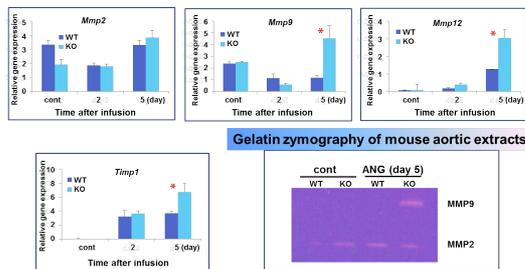


図11. ANG IIによりマウス大動脈に誘起されるMMPの遺伝子発現のreal-time RT-PCRによる解析とMMP2および9のzymography.

有意に抑制されていることによると思われる(図12)。

野生型マウスに autophagy の阻害剤である 3-methyladenine (3MA) の投与下に ANG II を持続投与すると、ANG II のみの場合と比較して大動脈解離は著明に増悪した(図13)。

以上のことから、autophagy は ANG II により誘起される大動脈解離において autophagy は保護的に機能することが示された。

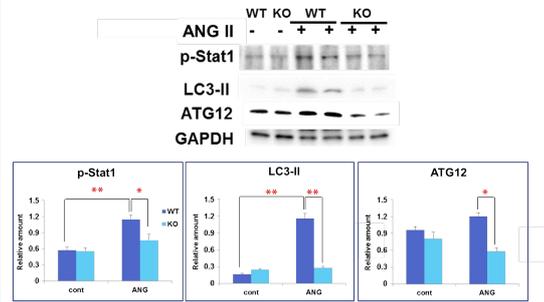


図4. ANG IIによりマウス大動脈に誘起されるautophagyのWestern blottingによる解析.

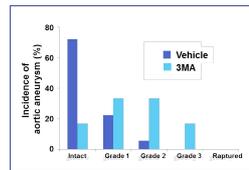


図5. ANG IIにより誘起される大動脈解離に及ぼす3MAの影響.

(4) 皮膚損傷組織における autophagy の解析
マウス皮膚に作製した打ち抜き損傷の治癒過程における autophagy を LC3-II と p62 を指標として Western blotting で解析すると、受傷後少なくとも LC3-II は 0.5 時間で有意に減少し、受傷後速やかに autophagy が抑制されることが明らかとなった

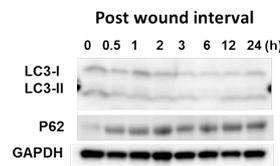


図14. 皮膚損傷組織における LC3-II の減少と p-62 の増加.

(図14)、また、autophagy の過程で autolysosome により分解される p62 も autophagy の減少に伴い受傷後早期に増加した(図15)。

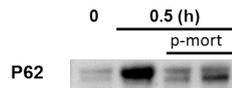


図15. 生前および死後(p-mort)皮膚損傷組織における受傷後0.5時間におけるp62の増加.

この現象は死後の受傷では認められないことから、新規の生活反応として法医実務に有用な指標となるものと思われる。

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5件)

1. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic macrophage-derived cytokines and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. *Int J Legal Med*, 127(5):937-42. 2013 (査読有)
2. Kimura A, Ishida Y, Inagaki M, Nakamura Y, Sanke T, Mukaida N, Kondo T. Interferon- γ is protective in cisplatin-induced renal injury by

enhancing autophagic flux. *Kidney Int*, 82(10):1093-104. 2012 (査読有)

3. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest*, 122(2):711-21. 2012 (査読有)
4. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest*, 121(7):2911-20. 2011 (査読有)
5. Kimura A, Ishida Y, Hayashi T, Nosaka M, Kondo T. Estimating time of death based on the biological clock. *Int J Legal Med*, 125(3):385-91. 2011 (査読有)

(学会発表)(計 23 件)

1. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 向田直史, 近藤稔和. マウス急性砒素腎障害モデルにおける IL-6 およびエストロゲンの役割解析. 第 13 回分子予防環境医学研究会, 和歌山, 2014.1.31-2.1 (2.1)
2. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Lack of IFN-gamma exacerbates ANG II-induced aortic aneurysm through reduction of autophagy. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013.12.11-13 (12.11)
3. 近藤稔和, 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 川口真理子. 皮膚組織における autophagy の circadian rhythm と創傷治癒. 第 43 回日本創傷治癒学会, 大分, 2013.11.14-15 (11.15)
4. Kimura A, Ishida Y, Furuta M, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. Pivotal involvement of IFN-gamma/Stat5 axis in compensatory cardiac hypertrophy induced by pressure overload. ESC Congress 2013, Amsterdam (The Netherlands), 2013.8.31-9.4 (9.3)
5. 木村章彦, 野坂みずほ, 向田直史, 近藤稔和. 圧負荷による代償性心肥大の分子メカニズム - IFN- γ の役割について. 第 34 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2013.7.2-3 (7.2)
6. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 川口真理子, 近藤稔和. 損傷が体内時計に及ぼす影響 - 皮膚損傷について -. 第 97 次日本法医学会学術全国集会, 札幌, 2013.6.26-28 (6.27)
7. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. IFN- γ /Stat5 axis is essential in compensatory cardiac hypertrophy induced by pressure overload. JSICR-MMCB2013, Tokyo, 2013.5.20-21 (5.20)
8. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Mukaida N, Kondo T. IFN-gamma plays a protective role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy through PI3K/Akt signaling activation. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012.12.5-7, (12.5)
9. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. A role of IFN-gamma in pressure overload-induced compensatory cardiac hypertrophy. 10th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, Geneva, 2012.9.11-15, (9.14)
10. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 向田直史, 近藤稔和. 圧負荷による代償性心肥大における IFN- γ の役割. 第 33 回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.7.5-6, (7.6)
11. Kimura A, Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kondo T. Effects of wound on circadian rhythm of skin tissue. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM2012), Istanbul, 2012.7.5-8, (7.5-7)
12. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 川口真理子, 國中由美, 近藤稔和. A role of IFN- γ in the pathogenesis of pressure overload-induced heart failure. 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 静岡, 2012.6.7-9, (6.9)
13. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Mukaida N, Kondo T. IFN-gamma plays a protective role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy through immunoproteasome activation. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011.11
14. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Kondo T. Application of the biological clock-based method for estimating the time of death to forensic practices. 8th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM), Frankfurt, 2011.9
15. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kawaguchi M, Wagatsuma S, Ohata S, Kondo T. Pressure overload-induced cardiac hypertrophy affects oscillation amplitude of clock genes expression but not their circadian rhythm. 19th IAFS world meeting, Portugal, 2011.9
16. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Mukaida N, Kondo T. IFN- γ plays a protective role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. The 10th World Congress on Inflammation, Paris, 2011.6
17. Kondo T, Ishida Y, Inui M, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Mukaida N. Essential roles of CCL3-CCR1 axis in the pathogenesis of antigen-induced arthritis. 第 32 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011.6

18. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Essential role of chemokine receptor CX3CR1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of bone marrow-derived fibrocyte infiltration. JSICR-MMCB2011, Osaka, 2011.5
19. Kondo T, Ishida Y, Kimura A, Kawaguchi M, Murata S, Takatsu A, Eisenmenger W. Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination. 20th Spring meeting of German Society of Legal Medicine in South, Munich, 2011.5
20. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Essential role of chemokine receptor CX3CR1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of bone marrow-derived fibrocyte infiltration. Experimental Biology2011, Washington D.C., 2011.4
21. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. Experimental Biology 2011, Washington D.C., 2011.4
22. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Mukaida N, Kondo T. Crosstalk between estrogen/estrogen receptor and IL-6/Jak/Stat3 signal in pathogenesis of sodium arsenite -induced renal injury. 2010 Joint meeting between the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society, Vancouver, 2010.10
23. 木村章彦, 石田裕子, 向田直史, 近藤稔和. Estrogen は IL-6/Jak/Stat3 signal を抑制してヒ素による腎障害を増悪する. 第 31 回日本炎症・再生医学会. 東京, 2010.8

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 章彦 (KIMURA AKIHIKO)
 和歌山県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：60136611

(2) 研究分担者

近藤 稔和 (KONO TOSHIKAZU)
 和歌山県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：70251923
 石田 裕子 (ISHIDA YUKO)
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：10364077
 野坂 みずほ (NOSAKA MIZUHO)
 和歌山県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00244731

(3) 連携研究者

向田 直史 (MUKAIDA NAOFUMI)
 金沢大学・がん研究所・教授
 研究者番号：30182067