

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590676

研究課題名（和文）損傷皮膚の治療過程で早期に発現する遺伝子及び蛋白質の発現動態と法医学実務への応用

研究課題名（英文）The time-course analysis early gene and protein expression during wound healing in skin and application to forensic pathological diagnosis

研究代表者

津田 亮一（TSUDA RYUICHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：20098875

研究成果の概要：損傷皮膚における c-fos、FosB、MKP-1、CD14、CCL9、MCP-5 及び PLGF の各遺伝子における発現ピークの時期は異なっていた。c-fos、fosB、MKP-1 の mRNA は受傷後極早期に、CD14、CCL9 の mRNA は受傷後 12～24 時間、MCP-5、PLGF の mRNA は、3 日から 5 日後に、それぞれ発現のピークが観察された。従って、c-fos、fosB、MKP-1、CD14、CCL9、MCP-5 及び PLGF の 7 遺伝子の発現量を比較することにより、受傷後初期に対する正確な時期推定が可能であることが示唆された。

他方、CD14 抗原（糖蛋白質）の発現した陽性細胞（単球あるいはマクロファージ）は、受傷後約 12 時間より観察され約 3～5 日目にピークとなり、その後減少した。CD14 陽性細胞の出現ピークと mRNA の発現ピークの時期（12～24 時間）との間に明らかな違いが認められたが、CD14 陽性細胞の観察も、法医学実務における受傷時期推定マーカーの 1 つとして有用ではないかと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：法医学病理学

## 1. 研究開始当初の背景

法医学解剖における外表検査、特に損傷の検査は死因の究明とともに重要な検査の 1 つであり、その結果をもとに成傷器や成傷方法の推定等が行われる。また、損傷の受傷時期や生活反応の有無に関して判断を求められ

ることがある。

受傷時期の推定に関しては、受傷後 4～5 日位より出現するとされる出血部のヘモジデリン発現の有無を確認できるベルリン・ブルー染色法のように繁用されている組織検査法がある。さらにこの検査法の他に、これ

までに種々の蛋白質をマーカーとした受傷時期の推定法が報告されている。我々も「細胞接着因子並びに成長因子を指標とした受傷時期の判定に関する法病理学的研究(課題番号 05670393)」にて平成 5・6 年度文部省科学研究費補助金の助成を受け、その研究成果を報告している。しかし、これまでの蛋白質マーカーを利用した検査法では、早期(1~3 日以内)の受傷時期を診断することは困難のまま今日に至っている。

## 2. 研究の目的

近年、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ア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。

そこで今回、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超早期(数時間以内)、早期(1~3 日以内)及び 5~7 日で最大発現量を示す数個の遺伝子(FosB、MKP-1、CD14、CCL9、MCP-5、Gas5、B2M、MUP-1)と損傷治癒過程時に発現が報告されている c-fos 及び PLGF に着目し、これら遺伝子及びその遺伝子産物である蛋白質が、法実務における受傷時期、特に超早期および早期の受傷時期診断マーカーとして応用可能かどうかを検討する目的で、本研究を企図した。

## 3. 研究の方法

1) 8 週齢 BALB/c マウスを使用して、麻酔下で背部に医療用パンチにより 4 mm の打ち抜き損傷を作製した。損傷後 0 分時に皮膚を採取した群をコントロールとして、受傷経過時間を 15 分から 21 日まで 20 群(n=5)に設定した。各時間経過後犠牲死、損傷周辺皮膚を採取した。本研究のプロトコルは、長崎大学動物実験ガイドラインに準拠した。

2) 採取した皮膚片から total RNA を抽出し、逆転写反応後、Real-Time PCR 法によって各遺伝子発現量の相対定量を行った。内因性リファレンス遺伝子については 18SrRNA を設定した。

3) CD14 抗原の経時的発現動態を損傷皮膚について、抗 CD14 抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

## 4. 研究成果

c-fos 及び fosB は、Immediately early genes (IEGs) であり、これらの mRNA は受傷後 1 時間以内に増加した(図 1、2)。この経時変化は、IEGs が刺激後即時に発現することと一致している。MKP-1 は、

mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路の抑制因子として機能し、この mRNA は fos 遺伝子群と同様に早期に発現が認められた(図 3)。この発現は損傷により活性化された MAP キナーゼ経路を制御しているものと考えられた。

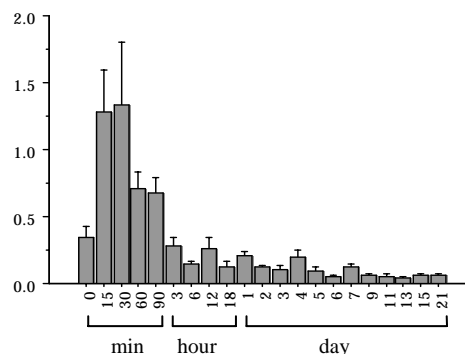


図 1 c-fos mRNA の経時的発現変化

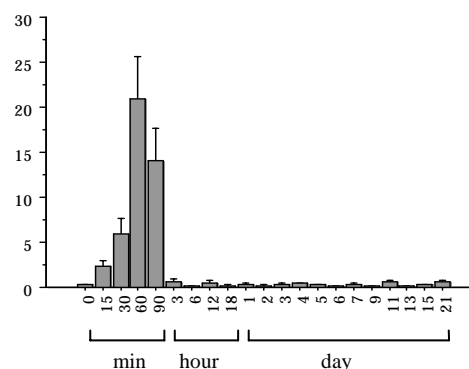


図 2 Fos-B mRNA の経時的発現変化

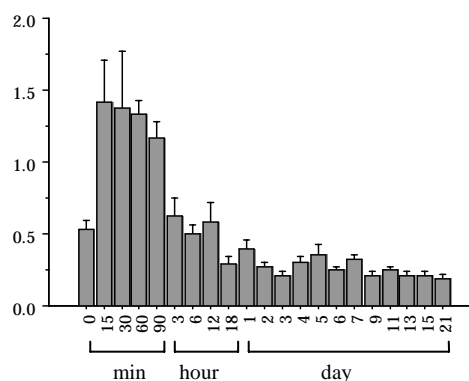


図 3 MKP-1 mRNA の経時的発現変化

CD14 は、単球やマクロファージなどの膜表面に発現する糖タンパク質であり、CD14mRNA は受傷後 12~24 時間に発現のピークが認められた(図 4)。CCL9 は、ケモカインの一種であり、その受容体は単球や T 細胞に存在している。CCL9mRNA の経時変化は CD14 に類似しており(図 5)、これらの発現は単球、マクロファージの炎症性遊走に関連していると考えられた。

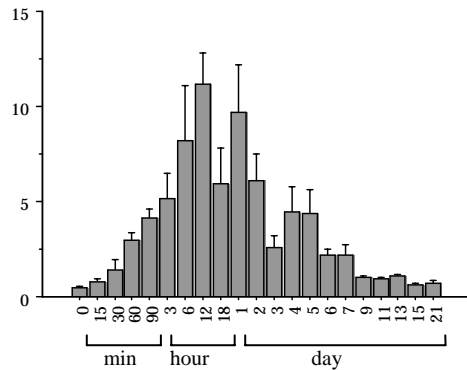


図4 CD14 mRNAの経時的発現変化

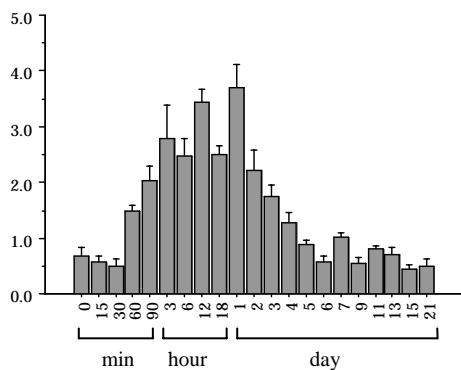


図5 CCL9 mRNAの経時的発現変化

MCP-5は、マスト細胞から分泌されるキマーゼであり、血管新生への関与を示唆されており、MCP-5 mRNAは受傷後5日後でピークが認められた(図6)。

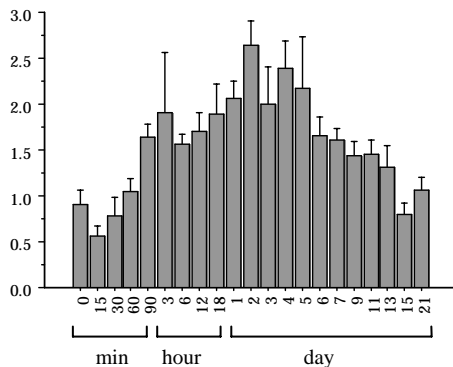


図6 MCP-5 mRNAの経時的発現変化

PLGFは、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)ファミリーに属し、損傷治癒過程での発現が報告され、本実験においても2日及び4日後に発現のピークが確認された(図7)。PLGF及びMCP-5の発現は、損傷治癒過程における血管新生の開始時期と相関していると考えられた。

Gas5、B2M、MUP-1のmRNAは、有意な変化は確認されず、受傷時期推定のためのマーカーとして利用できる可能性は低いと判断さ

れた。

以上の結果より、損傷皮膚の治癒過程における各遺伝子の発現ピークの時期は異なっていた。すなわち、c-fos、fosB、MKP-1のmRNAは受傷後極早期に、CD14、CCL9のmRNAは受傷後12~24時間、MCP-5、PLGFのmRNAは、3日から5日後に、それぞれ発現のピークが観察された。従って、c-fos、fosB、MKP-1、CD14、CCL9、MCP-5及びPLGFの7遺伝子の発現量を比較することにより、受傷後初期に対する正確な時期推定が可能であることが示唆された。

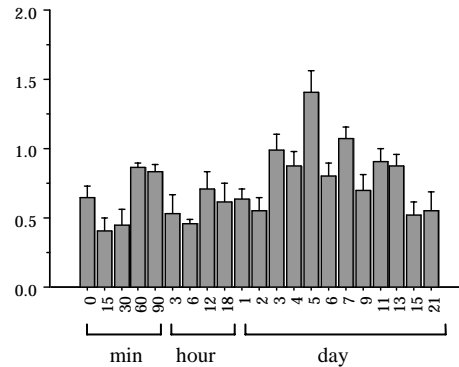


図7 PLGF mRNAの経時的発現変化

他方、CD14抗原(糖蛋白質)の発現した陽性細胞(単球あるいはマクロファージ)は、約12時間より観察され約3~5日目にピークとなり、その後減少した。CD14陽性細胞の出現ピークとmRNAの発現ピークの時期(12~24時間)との間に明らかな違いが認められたが、CD14陽性細胞の観察も、法医実務における受傷時期推定マーカーの1つとして有用ではないかと考えられる。

## 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1件)

Shinichiro Kagawa, Aya Matsuo, Yoichi Yagi, Kazuya Ikematsu, Ryouichi Tsuda, Ichiro Nakasono. The time-course analysis of gene expression during wound healing in mouse skin. Leg Med 2009; 11: 70-75. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

1. Shinichiro Kagawa, Kazuya Ikematsu, Ryouichi Tsuda, Yoichi Yagi, Ichiro Nakasono. The time-course analysis of gene expression during wound healing on mouse skin. 22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics(Copenhagen-Denmark) , 2007.

2. Shinichiro Kagawa, Yoichi Yagi, Kazuya Ikematsu, Ryouichi Tsuda, Ichiro Nakasono. The time-course analysis of CD14 protein expression during wound healing on mouse skin. 7th International Symposium Advances in Legal Medicine (Osaka) Jpn J Legal Med 2008; 62(Suppl): 126.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

津田 亮一(TSUDA RYOUICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号: 20098875

### (2)研究分担者

中園 一郎(NAKASONO ICHIROU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30108287

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

### (3)連携研究者