

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07133

研究課題名(和文) ケモカインを指標とする胸腺萎縮の分子メカニズムの解析とその法医学的応用

研究課題名(英文) The involvement of chemokines in thymic atrophy and its application to forensic practices

研究代表者

川口 敬士 (Kawaguchi, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・準客員研究員

研究者番号：60781284

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)：実験動物として8から10週齢の雄C57BL/6野生型(WT)及びCCR5遺伝子欠損(KO)マウスを用いて、拘束ストレスモデル(1時間拘束する処置を3日間)による胸腺萎縮の分子メカニズムを検討した。T細胞に発現していることが知られているケモカインレセプターであるCCR5の遺伝子欠損マウスを用いて拘束ストレスによる胸腺萎縮における病態生理学的役割を検討したところ、CCR5遺伝子欠損マウスでは拘束ストレスによる胸腺萎縮が野生型マウスと比較して有意に抑制されていた。そのメカニズムの1つとして胸腺細胞のアポトーシスの減少の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the pathophysiological roles of CCR5 in stress-induced thymic atrophy. C57BL/6 (WT) and Ccr5 KO mice were immobilized individually in well-ventilated restrainers for 1 hour daily, and this procedure were repeated the following 2 days. When WT mice were restrained, the thymuses significantly involuted and their weight decreased to 25% of unrestrained thymus weight. However, in Ccr5 KO mice treated with the same manner, the decrease of thymus weight was significantly suppressed. In the next series, restrain stress significantly induced the apoptosis in the thymic cells of WT mice. On the contrary, the absence of CCR5 significantly suppressed apoptosis of thymic cells. These observations implied that the absence of CCR5 resisted stress-induced thymic atrophy. Thus, CCR5-mediated signals would promote thymic involution induced by restrain stress. From the forensic aspects, CCR5 would be a key molecule for diagnosing abuse in infants and children.

研究分野：法医病理学

キーワード：胸腺萎縮 児童虐待 ストレス サイトカイン ケモカイン

### 1. 研究開始当初の背景

児童に対する虐待は、近年になって新たに始まったものではなく、児童が実父母や継父母から暴行を受けたり、重労働を強いられることは世界中で古くから知られており、現代においても医学的・社会的にも重要な問題の一つである。世界的にみると被虐待児が医学的な領域から研究が開始されたのは、歴史的には比較的新しく、1860年のフランスの法医学者 Tardieu の小児虐待の研究であり、1888年の West による乳児の急性骨膜腫脹の起載と言われている。臨床的には、1946年にアメリカの小児レントゲン学者の Caffey が長管骨の多発骨折と頭蓋内出血を併発する乳幼児の 6 例を報告したものが研究の始まりとされている。我が国においても、明治末期にはすでに児童虐待防止に関する運動への取り組みが始まっていたものの医学的かつ社会的問題としての認識は薄かった。1962年に Kempe らによって、被虐待児症候群・殴打症候群 (Battered Child Syndrome) の名称のもとに虐待症例が報告されてから、より広く認識されるようになった。

現在児童虐待は、①身体的虐待、②心理的虐待、③性的虐待、④ネグレクト (養育放棄) に分類定義されている。実際、我が国における児童相談所への相談件数は 6 万件を超えている。臨床医学および法医学の実務の場において、児童が虐待を受けているのかという判断は極めて重要となる。時にその判断が誤っていたり、不十分であったがために、その後の虐待により児童が死亡するという最も悲劇的な結末を迎えたり、虐待による死亡を見逃したりすることも少なくはない。すなわち、現在臨床医学の現場においては、新旧多発する外傷、異常な不潔、他に原因のない栄養不良が主たる虐待を疑う所見とされ、法医解剖においても前記所見が得られた場合、虐待による死亡を疑うことが一般的である。一方で外傷が認められるだけでは、不慮の事故によって生じたものである可能性は完全には否定できず、更なる鑑別が必要となる。したがって、生死を問わず被虐待児であると判断するための客観的かつ正確な方法の確立が望まれる。

### 2. 研究の目的

長期間に亘って身体的・精神的虐待を受けたことにより死亡した小児の剖検例では、胸腺が著明に萎縮することが知られ [Forensic Sci Int 1992;53:69-79]、虐待の補助的診断のために胸腺重量が指標として用いられている。被虐待児は、長期的な身体的・精神的ストレスに暴露されているため、主として視床下部—下垂体—副腎皮質系 (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA axis) による神経・内分泌系を介したストレスに対する生体反応の動態に変化が起こっている。また、神経系・内分泌系・免疫系の間には複雑なクロストークが存在することが知られている。胸腺の萎縮は、ストレスに

反応して副腎皮質から分泌される glucocorticoid (GC) が、胸腺のリンパ球をアポトーシスに導くため起こると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは解明されていない。近年、白血球遊走作用を有するケモカインが種々の疾患の病態生理に関与していることが明らかにされつつある。申請者の所属する研究室においてもケモカインを指標とする皮膚損傷の受傷後経過時間判定や敗血症の診断についての研究を行ってきた。そこで、胸腺萎縮の機序におけるケモカインの役割を解明することによって、虐待されていたことを診断するための新たな分子指標を見つけ出す可能性があると考え、本研究課題を提案した。

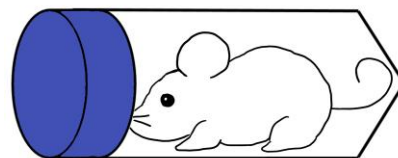
### 3. 研究の方法

#### 1) 実験動物

8 から 10 週齢の雄 C57BL/6 を遺伝的背景とする CCR5 遺伝子欠損マウスおよび同週齢の雄 C57BL/6 マウスを野生型マウスとして用いる

#### 2) ストレスモデルの作成

ストレスモデルとして、Wang et al. の報告にしたがって、拘束モデルを用いる。野生型マウスおよび CCR5 遺伝子欠損マウスを、早朝 (午前 9 時頃)、室温  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  に設定された実験室内で、空気穴を開けたファルコンチューブ (50ml) 内に無麻酔下で入れ、1 時間拘束する処置を 3 日間 (拘束→自由→拘束→自由→拘束) 継続する。なお、拘束中は絶飲食とするが、自由時間は給餌・給水等は通常通りに行う。拘束中の脱水予防のため、拘束処置の前後に滅菌生理食塩水 1ml を皮下投与する。



#### 3) 各臓器の萎縮・肥大の検討

採取した胸腺、副腎の重量を測定し、各マウスの体重に対する各臓器重量比を算出して、拘束ストレスによる各臓器の萎縮または肥大の程度を野生型マウスと CCR5 遺伝子欠損マウスで比較・検討する。

#### 4) 病理組織学的検討

各臓器組織を 10% PBS 緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋切片を作成する。各切片について HE 染色を行い、形態学的変化を観察する。拘束による組織学的変化について野生型マウスと CCR5 遺伝子欠損マウスで比較・検討する。

#### 5) 胸腺細胞のアポトーシスの検討

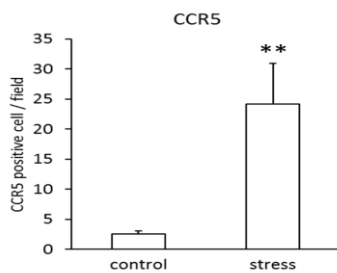
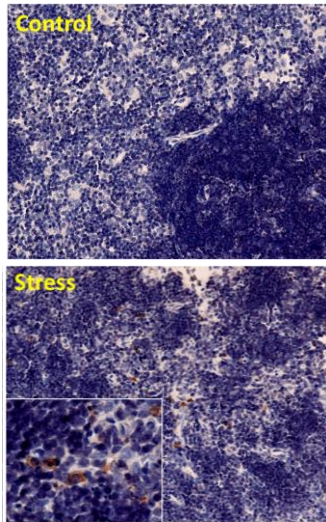
作成したパラフィン包埋切片を用いて、in situ TUNEL 法で胸腺細胞のアポトーシスを検出する。野生型マウスと CCR5 遺

伝子欠損ウスで胸腺細胞のアポトーシスの程度を比較・検討する.

#### 4. 研究成果

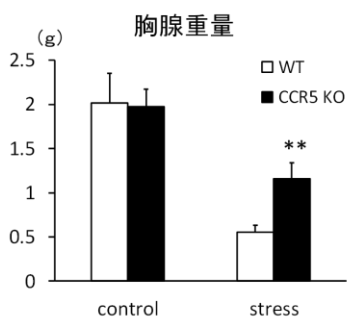
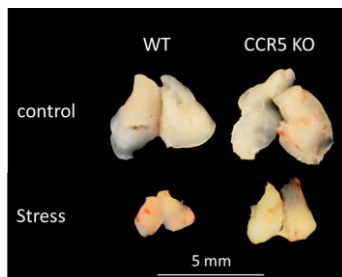
##### 1) 胸腺における CCR5 陽性細胞の発現

拘束ストレスによって野生型マウスの胸腺では CCR5 陽性細胞の数が増加した.



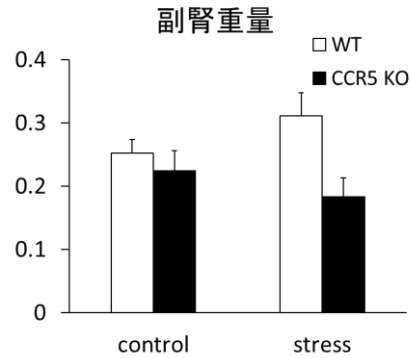
##### 2) 胸腺重量について

拘束ストレスによって野生型マウスでは、胸腺重量が約 25%程度まで減少していた。しかしながら、同様の拘束ストレス後の CCR5 遺伝子欠損マウスにおける胸腺重量の減少は約 50%程度までであり、明らかにストレス誘発胸腺萎縮が抑制されていた。



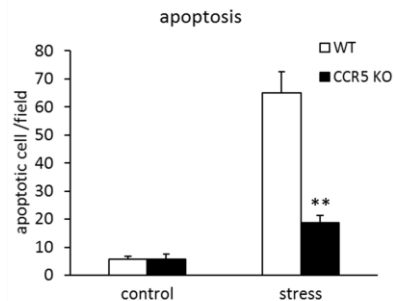
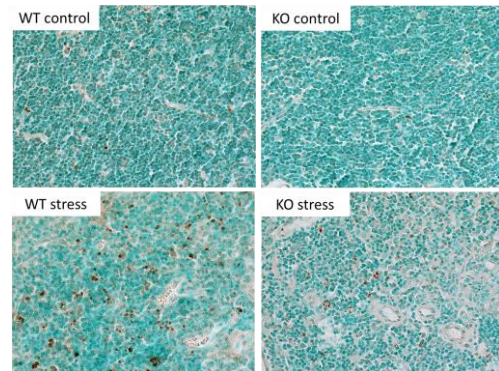
##### 3) 副腎重量について

野生型マウスでは、ストレス拘束後に約 20%程度増加していたが、CCR5 遺伝子欠損マウスでは拘束ストレス前と比較して有意な重量増加は認められなかった。すなわち、ストレスによる副腎腫大が抑制されていた。



##### 4) 胸腺細胞のアポトーシス

胸腺細胞がストレスによりアポトーシスが誘導されることから、各マウスにおける胸腺細胞のアポトーシスを検討したところ、野生型マウスではアポトーシス細胞が著明に増加していたが、CCR5 遺伝子欠損マウスにおけるアポトーシス細胞数は野生型マウスの 25%程度しか認められなかった。



##### 5) まとめ

T 細胞に発現していることが知られているケモカインレセプターである CCR5 の遺伝子欠損マウスを用いて拘束ストレスによる胸腺萎縮における病態生理学的役割を検討したところ、CCR5 遺伝子欠損マウス

では拘束ストレスによる胸腺萎縮が野生型マウスと比較して有意に抑制されていた。そのメカニズムの1つとして胸腺細胞のアポトーシスの減少の関与が示唆された。

#### 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3件)

① Murakami K, Kawaguchi T, Hashizume Y, Kitamura K, Okada M, Okumoto K, Sakamoto S, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Takatsu A, Kondo T, Suicide by plastic bag suffocation combined with the mixture of citric acid and baking soda in an adolescent, Int J Legal Med, 査読有, 2018, in press  
DOI: 10.1007/s00414-018-1856-y

② Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Kondo T, Immunohistochemical detection of intrathrombotic fibrocytes and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model, Int J LegalMed, 査読有, 131, 2017, 179-183  
DOI: 10.1007/s00414-016-1465-6

③ Yamamoto H, Takayasu T, Nosaka M, Kimura A, Ishida Y, Kawaguchi T, Fukami M, Okada M, Kondo T, Fatal acute intoxication of accidentally ingested nifedipine in an infant -A case report. Leg Med (Tokyo), 査読有, 24, 2017, 12-18  
DOI: 10.1016/j.legalmed. 2016. 11. 002

[学会発表] (計1件)

① Kondo T, Kawaguchi T, Kawaguchi M, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Yamamoto H, Sakamoto S, Shimada E, Kimura A. The involvement of CCR5 in stress-induced thymic atrophy, 97th Annual Meeting of German Society of Legal Medicine, 2018

[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

川口 敬士 (KAWAGUCHI, Takashi)  
和歌山県立医科大学・医学部・準客員研究員  
研究者番号：60781284

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )