

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390216

研究課題名（和文）

受傷後早期に発現する新しいマーカーを利用した法医病理学的診断法の確立

研究課題名（英文）

The establishment of new marker to diagnose the wound age

研究代表者

中園一郎（NAKASONO ICHIRO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30108287

研究成果の概要（和文）：法医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一つであり，その結果をもとに成傷方法や成傷時期の推定等が行われる。しかし，これまでの種々のマーカーを利用した検査法では，早期（1から5日以内）の受傷時期を診断することは困難であり，新しいマーカーの開発は法医実務上必須である。我々は，マウス皮膚損傷モデルにて c-fos、FosB、MKP-1 が損傷後1時間以内に，CD14、CCL9 が12時間から24時間に，PlGF、MCP-5 が約5日にそれぞれの遺伝子発現量（mRNA）に有意なピークが存在することを明らかにしている。この結果をもとに，c-fos、FosB、CD14 では蛋白質レベルにおいて検討を行い，ウエスタンブロッティング法にて，c-fos、FosB は受傷後1及び2日目に，また，CD14 は，3から5日に特異的に各蛋白質の発現が認められることを確認した。また，組織学的検討では，CD14 は，損傷部周囲のマクロファージに特異的に発現していた。従って，法医実務における CD14 の発現検討は，受傷時期推定に極めて有用であると推定される。

研究成果の概要（英文）：RNA analysis has been applied to forensic work to determine wound age. We already investigated mRNA expression using quantitative RT-PCR of ten genes, including c-fos, fosB, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), CD14, chemokine (C-C motif) ligand 9 (CCL9), placenta growth factor (PlGF), mast cell protease-5 (MCP-5), growth arrest specific 5 (Gas5), beta-2 microglobulin (B2M) and major urinary protein-1 (MUP-1), in terms of repair response in adult mice of wound age. In this study, we focused on the CD14 protein expression during wound healing. We demonstrated that the CD14 protein only expressed from 3 to 5 day after wound with immunohistological and western blot method. In addition, the CD14 specifically expressed at macrophage around wound. These results indicated that investigation of CD 14 protein must be useful of estimation for wound age in forensic practice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

法医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一つであり、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法医病理学的判断を求められることも多い。受傷時期の推定に関しては、受傷後約1週間程度より出現するとされる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から3日以内）の受傷時期を診断することは困難であった。

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。

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から3日以内）及び5から7日で最大発現量を示す遺伝子、c-fos、FosB、MKP-1、CD14、CCL9、Mcpt5、β-MB等に着目し、「損傷皮膚の治癒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実務への応用（課題番号 19590676）」にて平成19・20年度日本学術振興会の助成を受け、マウス皮膚損傷モデルにてc-fos、FosB、MKP-1が損傷後1時間以内に、CD14、CCL9が12時間から24時間に、PIGF、MCP-5が約5日にそれぞれの遺伝子発現量（mRNA）に有意なピークが存在することを明らかにした（Kagawa et al. Legal Medicine, 2009.）（図1、図2）。

ところで、法医実務では解剖着手までである程度の死後経過時間を伴い、死後変化にてmRNAの変性が生じるため、剖検症例からのmRNA検出は甚だ困難であり、これらの結果は残念ながら実務上は応用困難であった。従って、より変性に強い遺伝子産物（蛋白質）を検討対象とした方がより実務的であることが示唆される。また、法医学分野では、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いてレ

トロスペクティブな症例の解析が行われることが一般的である。

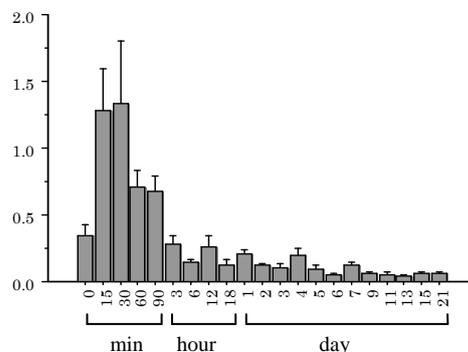


図1 c-fos mRNAの経時的発現変化

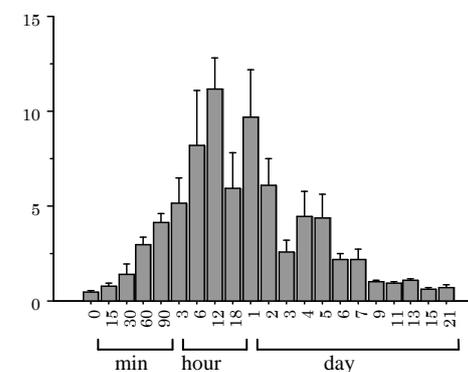


図2 CD14 mRNAの経時的発現変化

2. 研究の目的

そこで、我々は、これらの遺伝子の蛋白質発現動態についてマウス損傷モデルにて検討することとした。特に、CD14 および Cc19 mRNA が12時間から24時間に発現するという動態に着目し、これらの蛋白質の発現動態を集中的に検討した。さらに、c-fos、FosB、MKP-1が損傷後1時間以内に、また、PIGF、MCP-5が約5日にそれぞれの遺伝子発現量（mRNA）に有意なピークが存在することからこれらの遺伝子産物（蛋白質）についても定量的検討を行うこととした。

また、前記するように法医学分野では、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いてレトロスペクティブな症例の解析が行われることから、免疫組織学的検討がより実務的であるとかがえられることから、免疫組織学的検討も付せておこなった。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚損傷モデルの作成

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 12 時間から 21 日まで 15 群 (n=5~7) に設定した。各時間経過後に屠殺後、損傷周辺部皮膚を採取した。

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、動物実験倫理委員会から承認を得た。

(2) 蛋白質の定量

採取した皮膚片から蛋白質を抽出した。なお、目的蛋白質が CD14 等膜タンパク質であることから、蛋白抽出液は両極性界面活性剤を含む低張抽出液とした (Tris-HCl pH 8.0 30 mM, IGEPAL 1%, CHAPS 0.5%, SDS 0.1%, NaCl 100 mM)。Tissue Lysizer を用いてホモゲナイズ後に、抽出液を添加し、15000g 30 分遠心分離し、上清を試料とした。

蛋白質の濃度について Bradford 法を用いて定量後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に PVDF 膜に転写し、Western Breeze (Life Sciences) を用いて発光させ、LAS-3000 Mini (Fuji Film) を用いて検出し、バンド濃度を解析・定量した。

(3) 免疫組織化学的検討

各遺伝子産物 (蛋白質) の経時的発現動態を損傷皮膚について、各々の抗蛋白質抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

具体的には、損傷部皮膚を採取後、4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋切片を作成した。また、凍結切片も作成した。脱パラフィン後、親水化し、ヒストファインユニバーサル試薬を用いて免疫染色を行った。DAB を用いて可視化した。

4. 研究成果

(1) 各蛋白質の定量

ウェスタンブロッティング法を用いて、蛋白質の発現を検討したところ、c-fos、Fos-B は 1 日をピークとする発現が認められた。MKP-1 の発現を検出することはできなかった。また、CD14 は 3 から 5 日に特異的に CD14 蛋白質の発現が認められた (図 3、図 4)。

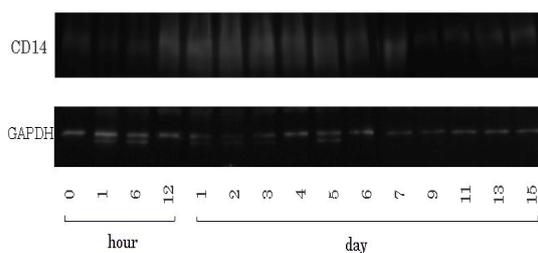


図 3 経時的 CD14 蛋白質のウェスタンブロッティング像

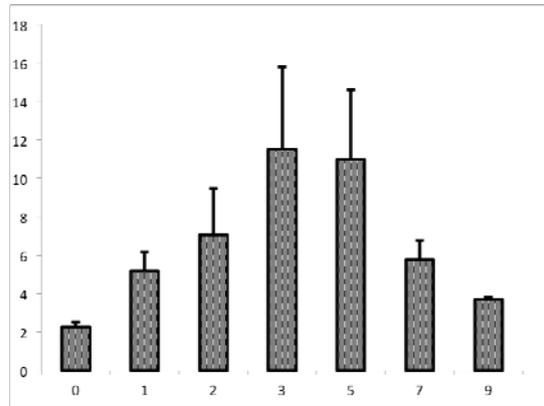


図 4 経時的な CD14 蛋白質発現量

しかし、Cc19 については、ウェスタンブロッティングにて発現を確認することはできなかった。

また、PlGF、MCP-5 は約 7 日をピークに発現を呈することが判明した。

(2) 免疫組織化学的検討

CD14、PlGF について、免疫組織学的検討を行った。



図 5 受傷直後の CD14 免疫染色像 (凍結切片)

受傷直後の免疫染色では、CD14、PlGF ともに陽性細胞は全く認められなかった (図 5)。しかし、受傷 3 日後では、CD14 陽性細胞が認められ (図 6)、この陽性像は受傷 5 日まで認められた。PlGF は、受傷 9 日まで陽性像が認められた。

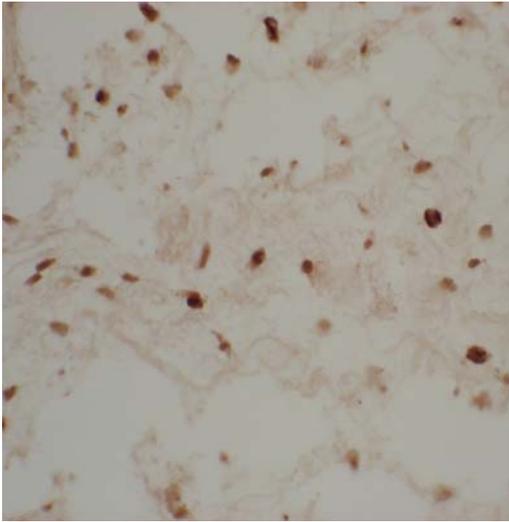


図6 受傷3日後のCD14免疫染色像(凍結切片)

従って、CD14は確実に受傷時期特定のためのマーカーとして法医実務へ応用できるものとする。

今後、損傷皮膚における種々の遺伝子産物の時期特異性同定という我々が今までに確立している結果を踏まえ、法医剖検例に応用して損傷の受傷時期を同定する法医病理学的診断法を確立したい。現在までの我々の基礎的研究の結果を応用することにより、迅速かつ確実に受傷時期を同定する法医病理学的診断法が確立できるものと確信している。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 研究分協力者

八木 洋一 (YAGI YOICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

村瀬 壮彦 (MURASE TAKEHIKO)

長崎大学・医学部・学生