

## 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 5 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659137

研究課題名（和文） 体内時計を指標とする新規法医診断法の確立

研究課題名（英文） Establishment of novel forensic diagnostic methods based on biological clock

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

研究成果の概要（和文）：体内時計は全身の細胞に存在し、正確に概日性リズムを刻んでいる。体内時計の機能は生体の恒常性維持に必須であり、その変調は様々な疾病の原因となることが報告されている。本研究は、種々の臓器障害が引き起こす体内時計の変調をマウスモデルを用いて解析し、体内時計が法医診断の指標と成り得るかを検討したものである。心不全、薬剤性腎障害、皮膚損傷について時計遺伝子の発現を解析し、臓器障害は時計遺伝子の発現を強く抑制することを見出し、法医診断の新しい指標と成る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Biological clock exists in most tissues and is involved in their homeostasis. Malfunction of biological clock can cause various diseases. In this study, we examined the possibility that forensic diagnosis can be performed by analysis of biological clock in the tissues. We found that significant reduction of clock gene expression in the hypertrophic heart, kidney damaged with a toxic compound and injured skin tissue, suggesting that biological clock in the damaged tissues might be a novel diagnostic marker in forensic medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,200,000	0	1,200,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	2,400,000	360,000	2,760,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：体内時計，法医診断，時計遺伝子，Real-time PCR

## 1. 研究開始当初の背景

法医学において死因の究明は最も重要な課題であり、実務および研究の何れにおいても主要な領域となっている。法医解剖で取り扱

う事例には、生前の情報に乏しく、且つ死因に繋がる病理所見に乏しいものが少なくない。従って法医学者は剖検により得られるマクロ・ミクロの所見に加え生化学的および中

毒学的データ、更に遺伝子解析をも駆使して死因の究明に努めている。しかし、現在の法医診断学では死因の究明が困難な事例も少なくないと言わざるを得ない。

## 2. 研究の目的

精度の高い死因究明を行うには出来るだけ多くの指標を用いることが重要であり、また、各指標の独立性が高いことが望ましい。即ち、既存の指標と全く異なる視点から見出された新しい指標は死因究明に大きく貢献することが予想される。研究代表者らは、挑戦的萌芽研究（平成 19-20 年）の科学研究費補助金を受けて体内時計に基づく死亡時刻推定法の開発を行い、死後数日経過した遺体の各臓器から real-time R-PCR 法により死亡時刻で停止した体内時計が正確に読み取れることを明らかにした。その研究において、正常な個体では各臓器の体内時計が正しく同期して生体の恒常性を維持していることに深い感銘を受けた。そのことから、感染や外的あるいは内的侵襲を受けた個体では特定の臓器の体内時計に変調が生じる、あるいは特定の臓器の体内時計の変調が組織障害を誘起する可能性があるとの着想に至った。そこで、本研究は体内時計が組織障害の指標に成り得るかを検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) 心不全マウスモデル

8 週齢雄の BALB/c マウスの大動脈弓を 27G の注射針の太さに 7 号絹縫合糸で結紮し (transverse aortic banding, TAB)、3 週間後に所定の時刻にエーテル過麻酔により安楽死させ、心臓、肝、腎を採取した。各臓器における時計遺伝子 (*mBmal1*, *mPer2*) の発現を real-time RT-PCR で解析した。心臓については心肥大を組織学および生化学的に評価した。

### 2) cisplatin 腎炎マウスモデル

8 週齢雄の BALB/c マウスに cisplatin (15 mg/kg) を腹腔内投与し、投与後 5 日目の所定の時刻にエーテル過麻酔により安楽死させ、心臓、肝、腎を採取した。腎障害は経時的に採血し、血清尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン (CRE) を測定するとともに採取した腎を組織学的に検索することで評価した。各臓器における時計遺伝子の発現を心不全マウスモデルと同様に行った。

### 3) 皮膚損傷マウスモデル

所定の時刻に 8 週齢雄の BALB/c マウスの背部皮膚にペントバルビタール麻酔下 5 mm の生検トレパンで打ち抜き損傷を作製し、打ち抜いた皮膚組織を正常皮膚試料とした。損傷作成の 24 時間後に損傷部皮膚を 8 mm の生検トレパンで打ち抜き創傷部皮膚試料とした。採取した試料は心不全マウスモデルと同様に時計遺伝子の発現を解析するとともに、western blotting により autophagy 関連分子お

よび HO-1 のタンパク発現を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 大動脈弓結紮による心肥大における体内時計の変調

マウスの腎、肝および心臓においては図 1 に示す様に *mBmal1* と *mPer2* の発現は明確な概日性振動している。

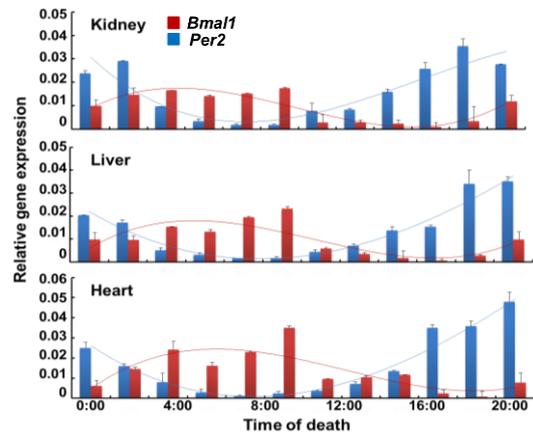


図 1. Circadian expression profiles of *mBmal1* and *mPer2* in mouse tissue. Gene expression for *mBmal1* and *mPer2* in mouse fresh tissues was analyzed by real-time PCR. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6). Significant circadian oscillation of gene expression for *mBmal1* and *mPer2* was observed in all mouse tissues.

この正確な時計遺伝子発現の概日性パターンに及ぼす心肥大の影響を解析する為、大動脈弓結紮術をマウスに施した。術後 3 週目のマウスの心臓は図 2 に示す様に、心重量・体重比の著明な増加と線維化を認めた。

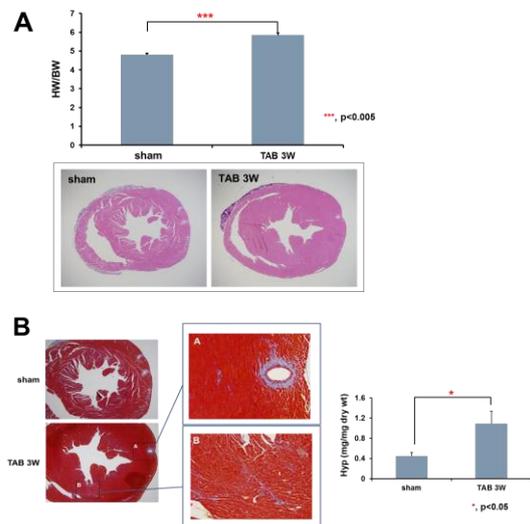


図 2. Analyses of cardiac hypertrophy and fibrosis. (A) Cardiac hypertrophy was evaluated by the heart weight/body weight ratio. (n=13). Representative HE staining of the heart cross sections. (B) Representative Masson's Trichrome staining of the heart cross sections. Cardiac hydroxyproline content. All values represent means  $\pm$  SEM (n=6)

よって、大動脈弓結紮術後 3 週目のマウスを

10:00、17:00 および 20:00 に安楽死させて心臓、腎および肝を採取し *mBmal1* と *mPer2* の発現を解析した。図 3 に示す様に TAB により誘起される心肥大および心筋組織の線維化は心臓のみならず腎および肝における *mBmal1* と *mPer2* の遺伝子発現を著しく減弱させた。しかし、概日性発現のパターンに変化は認められなかった。

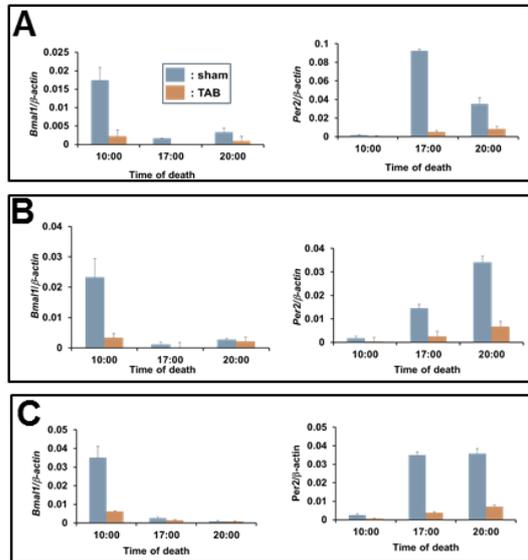


図 3. Effects of TAB on *mBmal1* and *mPer2* gene expression in the kidneys (A), livers (B) and hearts (C). All values represent means  $\pm$  SEM (n=6)

(2) cisplatin 腎炎における体内時計の変調  
マウスに cisplatin (15 mg/kg) を腹腔内投与すると、図 4 に示す様に投与後 5 日目までに出血、尿細管壊死、刷子縁の消失および fibrin cap 形成を伴う著明な組織学的変化と血清 BUN および CRE の上昇を認め、cisplatin による強い腎炎が誘起された。

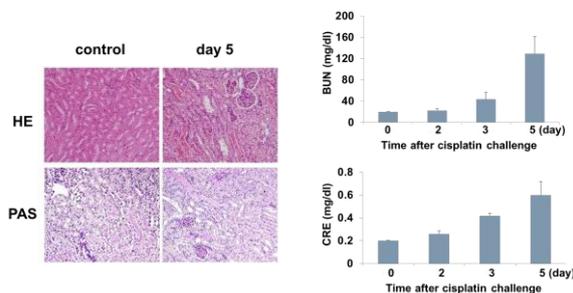


図 4. Analysis of cisplatin-induced renal injury in mice. Histopathological examinations on the kidneys from mice at 0 and 5 days after cisplatin challenge. Determination of serum BUN and serum CRE at the indicated time intervals after cisplatin challenge. All values represent means  $\pm$  SEM (n = 15).

Cisplatin 投与 5 日目のマウスを 10:00、17:00 および 20:00 に安楽死させて心臓、腎および

肝を採取し *mPer2* と *mBmal1* の発現を解析した。図 5 に示す様に Cisplatin 腎炎は腎のみならず肝および心臓における *mBmal1* と *mPer2* の遺伝子発現を著しく減弱させた。心肥大の影響とは異なり、cisplatin 腎炎では遺伝子発

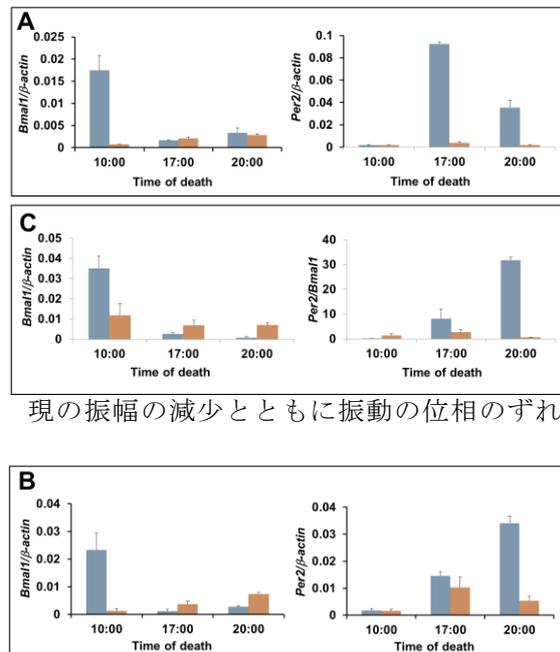


図 5. Effects of cisplatin-induced renal injury on *mBmal1* and *mPer2* gene expression in the kidneys (A), livers (B) and hearts (C). All values represent means  $\pm$  SEM (n=6)

(3) 皮膚損傷による体内時計の変調  
皮膚組織においても体内時計が機能しており、時計遺伝子の発現は腎、肝および心臓と

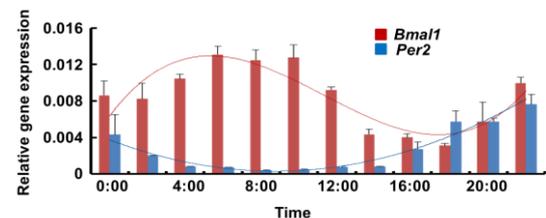
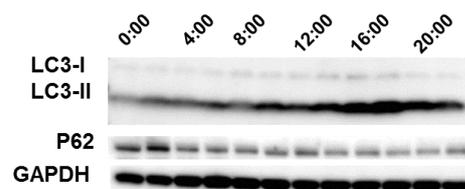


図 6. Circadian expression profiles of *mBmal1* and *mPer2* in mouse skin. Gene expression for *mBmal1* and *mPer2* in mouse intact skin was analyzed by real-time PCR. (n=4)

更に autophagy も概日性に増減していることを見出した。それに伴って autophagosome で分解される P62 の皮膚組織における量も



autophagy と逆位相で増減していた (図 7)。

図 7. Circadian autophagy rhythm in mouse skin. LC3-I, LC3-II and P62 in mouse intact skin were analyzed by western blotting.

受傷 1 日後の皮膚組織での *mBmal1* の遺伝子発現は正常な皮膚組織に比較して減弱し、概日性振動を示さず (図 8A)、一方、*mPer2* の発現は概日性振動を認めたが、振幅は著しく減弱していた (図 8B)。

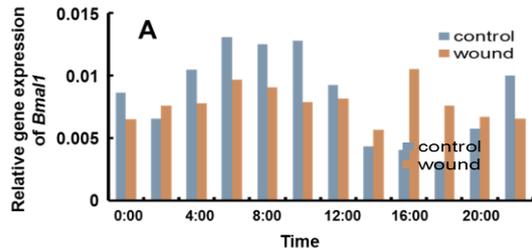
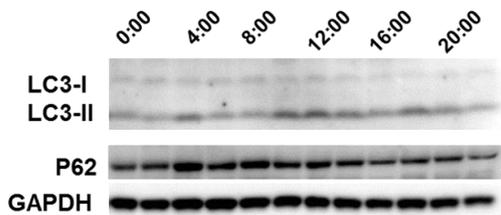


図 8. Effects of excisional wound on *mBmal1* (A) and *mPer2* (B) gene expression in mouse skin. Gene expression of *mBmal1* and *mPer2* in the skin after 1day injury was analyzed by real-time RT-PCR. (n=4)

更に、受傷 1 日後の皮膚組織では autophagy が著明に減少し、それに伴って P62 の著しい増加が認められた (図 9)。

図 9. Effects of excisional wound on autophagy in mouse skin. LC3-I, LC3-II and P62 in mouse skin after 1 day injury



were analyzed by western blotting.

#### (4) 総括

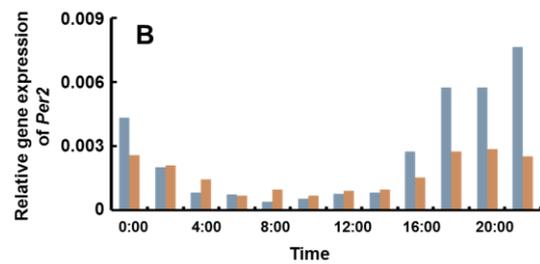
心肥大、腎炎および皮膚損傷における時計遺伝子の発現を解析し、機械的ストレスや炎症は体内時計に顕著な変調を来すことを明らかにした。現時点では、心肥大や腎炎が肝臓等の他の臓器の時計遺伝子の発現にまで変調をきたす機構は明らかに出来ていない。しかしながら、体内時計 (時計遺伝子発現) の解析は、生前に生じた臓器ストレスの評価や、創傷の受傷経過時間の推定等に应用可能であり、法医診断学に大きく寄与することが期待される。

#### 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)

1. Kimura A, Ishida Y, Hayashi T, Nosaka M, Kondo T. Estimating time of death based on



the biological clock. Int J Legal Med. 査読有 2011; 125:385-91.

[学会発表] (計 3 件)

1. 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
2. Kimura A, Ishida Y, Nosaka N, 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
3. 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. 死体臓器における時計遺伝子の発現量に基づく新たな死亡時刻推定法 (第 3 報) -実務への応用例-. 第 95 次日本法医学会学術全国集会, 福島, 2011.6

[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 (KONDO 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

(3)連携研究者

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