

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590853

研究課題名(和文) プロテオームを活用した新規受傷時期推定マーカーの開発とその法医学的応用

研究課題名(英文) Identification of wound age estimation maker with proteome and it's forensic application

研究代表者

賀川 慎一郎(KAGAWA, Shinichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：70562213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：法医実務における損傷受傷時期の診断は極めて重要である。しかし、受傷後早期(3-5日)の時期証明は困難である。そこで、プロテオーム解析法を用いて、蛋白質発現動態を検索した。Chitinase 3-like 3(Chi313)を同定した。Chi313 mRNA が受傷後3日という時期に、特異的な爆発的発現(他時期に比して400倍)が認められた。Chi313抗体を作成、Western blottingを行い、受傷後3日での蛋白質の特異的な増加、組織学的検討にてマクロファージへの局在と受傷後3日の増加が確認した。Chi313は受傷後3日に発現する受傷時期推定マーカーとなるものと考ええる。

研究成果の概要(英文)：In forensic practice, it is important to diagnose accurately the wound age. We analyzed the proteome of mice injured skin to establish a new valuable protein marker which could estimate wound age after injury. We employed the samples of the 3 day after injury, and the 0 day as control. The proteins were separated using two dimensional electrophoresis. Chitinase 3 like 3 (Chi313), which we found the differences with statistical analysis, were able to be identified by proteome. The mRNA expression represented the time-course changes and peaked at the 2 day after injury. The analysis of the protein time course expression with WB and Immunohistochemistry (IHC) revealed that the pattern was similar to the mRNA and the peak also was at the 2 day. We examined what kind of cells expressed Chi313. Fluorescent IHC revealed that the expressed cells were macrophages. Our result implied that the observation of Chi313 in injured skin could serve to aid in the accurate diagnosis of wound age.

研究分野：法医病理学

キーワード：損傷 受傷時期推定 マーカー Chitinase 3-like 3 マウス

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)」等で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週間以内)の受傷時期を診断することは不可能であった。

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受傷後5日で最大発現量を示す遺伝子に着目し、「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PLGF、MCP-5が受傷後約5日にそれぞれの遺伝子発現量(mRNA)が2~4倍程度増加することを明らかにした(Kagawa et al. *Legal Medicine*, 2008)。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、より死後変化(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。そこで、PLGFについて、Western Blot法・免疫組織化学法(IHC)にて蛋白質発現状態を確認したところ、有意な差は確認できなかった。従って、2~4倍程度のmRNA発現量では、決定的な蛋白質量として確認できないことが示唆された。また、このことからmRNAを介さず、より直接的に蛋白質発現量を比較することが肝要と考える。

そこで、本研究ではプロテオーム解析、つまり、二次元電気泳動法を用いて、皮膚損傷

部における蛋白質発現状態を直接的に比較したい。この方法は、蛋白質の等電点と分子量の違いを利用し、未知、既知にかかわらず組織や細胞における蛋白質の質的・量的変化を何千という単位で包括的・大規模、かつ、鋭敏に検索でき、さらに、発現解析データを厳密に数値化できることから、蛋白質の発現動態解析に最適な方法である。

既に申請者らは、この研究計画に着手しており、プロテオーム解析法を受傷後3日経過したマウス損傷部皮膚に応用し、1回の泳動にて2000程度のspot出現を確認し、かつ、受傷後3日に特異的発現するspotを30個程度見出した。

spotについては、MALDI-TOF-MSにて蛋白質同定検索を行い、chitinase 3-like 3(Chi3l3)と同定した。さらに、遺伝子発現量をReal Time PCR法にて検討し、Chi3l3 mRNAが受傷後3日という時期に、特異的に爆発的発現(他時期に比して400倍!)することを明らかにした。現在、我々はChi3l3の抗体を作製中である。今後、作製する抗体にて、改めてマウスモデルにおける蛋白質発現量を確認した後に、法医実務での応用を考えている。

このように、本研究ではプロテオーム解析を用いて、損傷時期における蛋白質発現プロファイリングを行うことによって、損傷皮膚における時期特異的蛋白質を同定する。さらに、その結果を法医剖検例に応用して、損傷の受傷時期を同定する法医分子病理学的診断法を確立したい。これらの基礎的研究の結果を応用することにより、迅速かつ確実に早期の受傷時期が同定できる法医分子病理学的診断法が確立できる。

2. 研究の目的

法医実務における損傷受傷時期の診断は極めて重要な命題である。しかし、受傷後早期(3~5日)の受傷時期の証明は極めて困難である。しかも、この時期の蛋白質発現動態は全く未知であるために、蛋白質マーカーを利用した解析法を用いることも不可能である。そこで、申請者らは、プロテオーム解析法を用いて、この時期の一部の蛋白質発現動態を検索した、この時期に特異的に発現するスポットを多数見出し、さらに、その中でchitinase 3-like 3(Chi3l3)を同定した。加えて、遺伝子発現量をも検討し、Chi3l3がこの時期特異的に発現することを明らかにしている。本研究では、このように時期特異的に発現する詳細な蛋白質の動態を詳細に検索し、その結果を法医実務へ応用して損傷受傷時期を同定する法医分子病理学的診断法を確立する。

また、Chi3l3とアミノ酸配列相同性の高いChitinase/Chitinase like proteins(C/CLPs)に関して、損傷皮膚におけるmRNAの経時的発現検討を行った。

3. 研究の方法

マウス皮膚に損傷を作製し、経時的に皮膚を採取し、蛋白質を抽出・保存する。

二次元電気泳動(2領域: pI 4~7, 8~10)を用いて、蛋白質発現動態をプロファイリングするとともに、時期特異的 spot を検出し、蛋白質を同定する。

蛋白質をコードする mRNA を定量し、mRNA レベルでの時期特異性を確認。

確認した蛋白質の抗体を作製して、Western Blot 法・免疫組織化学法(IHC)にて蛋白質発現状態を蛋白質レベルにて再確認。抗体をヒトサンプルにて IHC を活用して応用し、発現量を確認。

損傷の受傷時期を同定する法医病理学的診断法を確立する。

C/CLPs の検討対象の mRNA は Chitinase, acidic 1 (*Chia1*)、Chitotriosidase 1 (*Chit1*)、Chitinase 3 like 1 (*Chi3l1*)、Chitinase 3 like 4 (*Chi3l4*)、Oviductal glycoprotein (*Ovgp*)、di-N-acetylchitobiase (*Ctbs*)、Chitinase domain-containing 1 (*Chid1*) の 7 種類とした。

4. 研究成果

2次元電気泳動並びに銀染色にて約1000個程度の Spot を分離可能であった(図1)。コントロールと比較したところ、5つの Spot を同定した(図1, 2)。各 spot については、MALDI-TOF-MS にて蛋白質同定検索を行い、残念ながら以下に述べる2種類のタンパク質のみの同定ががのうであり、。一つは Chi3l3 であり、もう一方は NHL repeat containing 2 (*Nhlrc2*)であった。

転写レベルでの発現状態を検討するため、2者において mRNA の経時的な発現量の検討を行った。*Chi3l3* に関しては受傷後1日目の検体から増加が見られ、2日目でピークを迎え、その後は経時的に減少が見られた。NHL に関しては転写レベルでの発現量変化は認められなかった

Chi3l3 に関しては経過にともなって量的な変化が生じていると考え、発現レベルでの検討を行った。WB での発現量検討に先駆けて、抗体作成、精製を行った。精製抗体を用いて、受傷後2日目のタンパク質抽出検体に対して WB を行った。*Chi3l3* の分子量は 45kDa であり、予想される部位にシングルバンドが得られ(図3) 少なくともマウス検体においては *Chi3l3* に特異的であり、非特異的の反応も認めないと考えられた。

次いで、精製抗体を用いて経時的な発現量検討を行った(図4)。WB においても1日目より増加が見られ、2日目にピークを迎え、その後は経時的に減少が見られた(図5)。

受傷後早期に増加するタンパク質と考えられたが、発現細胞の検討のため、組織免疫染色を行った(図6)。酵素抗体法にて0日目と

2日目の凍結皮膚組織において検討を行った。0日目の検体では陽性細胞はほとんど認められない。一方で2日目の検体では痂皮の深部において陽性細胞が認められ、紡錘形をしており形態的には線維芽細胞のように推定された。

より詳細な発現細胞の検討のため、*Chi3l3* 抗体と F4/80 抗体を用いた蛍光組織二重免疫染色を行った。

図7に示すような画像が得られ、緑(*Chi3l3*)と赤(F4/80)に重複して染まる細胞が散見された。従って、F4/80 が発現するマクロファージに *Chi3l3* が発現しているものと考えられる。

これらの結果より、*Chi3l3* は受傷後2日後に発現のピークがあり、受傷後早期のマーカーとはなりうるものと推定する。。マクロファージの集簇に伴って発現量が増加していると考えられるため、マクロファージの検出でも大まかな時期推定はできると思われる。しかしながら *Chi3l3* を検出することでより鋭敏な時期推定が可能であると考えられる。

さらに、検討を行った7種類の C/CLPs mRNA において、*Chia1* を除き、創傷部での経時的な発現変動が認められた。C/CLPs 間においても、受傷後早期に増加するもの(*Chi3l1*, *Ovgp*, *Ctbs*)、やや遅れて増加するもの(*Chi3l4*, *Chit1*)、早期に増加し継続するもの(*Chid1*)と発現パターンに差異がみられ、創傷部での機能や発現細胞が異なることが示唆された。増加量においても違いを認め、特に *Chi3l1* では他の C/CLPs に比較して約10倍の変化を認めており、検出感度を考慮すると、*Chi3l1* は法医実務への応用が期待される。

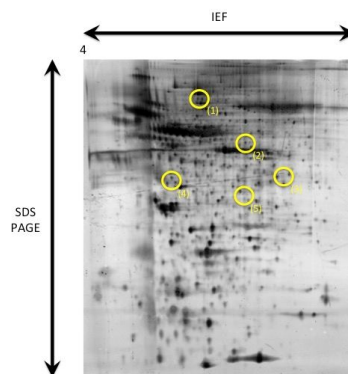


図1: 代表的な2次元電気泳動像とコントロールとの比較にて変動が認められた Spot の位置

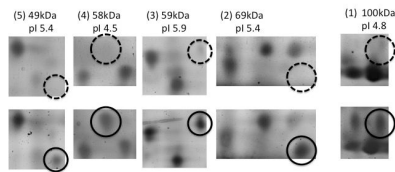


図 2 : 各 Spot の代表的な Spot 像 (上 : コントロール、下 : 受傷後 2 日目)

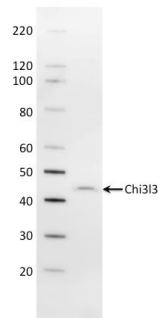


図 3 : 抗 Chi3I3 精製抗体を用い、受傷後 2 日目のタンパク質抽出検体に対する Western Blotting 像

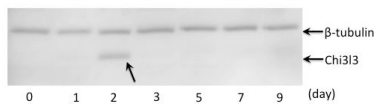


図 4 : 経時的な Chi3I3 の Western Blotting 像

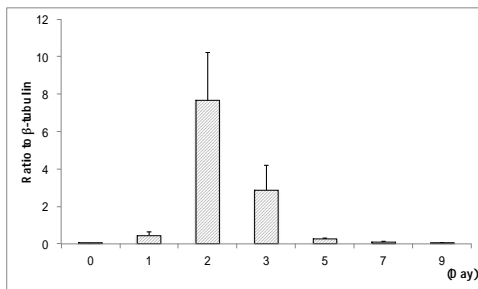


図 5 : Chi3I3 の受傷後経時的な発現量 (n=5)

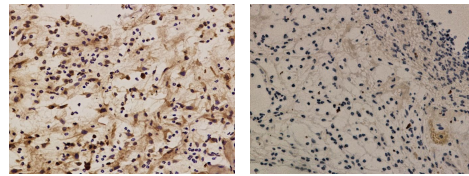


図 6 : Chi3I3 の免疫染色像 (左 : 受傷後 2 日目、受傷後 0 日目)

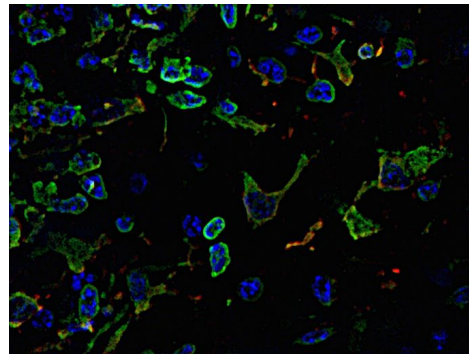


図 7 : Chi3I3 (緑) と F4/80 (赤) の蛍光免疫染色像 (青 : DAPI)

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 損傷皮膚における Chitinase/Chitinase like protein 遺伝子発現の経時的変動. 村瀬 壮彦、梅原 敬弘、山本 琢磨、池松 和哉. 第 99 次日本法医学会学術全国集会. 平成 27 年 6 月 12 日. 高知市文化プラザかるぼーと (高知市).

[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]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

賀川 慎一郎 (KAGAWA, Shinichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)

・客員研究員

研究者番号 : 70562213

(2)研究分担者

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)

・教授

研究者番号 : 80332857

梅原 敬弘 (UMEHARA, Takahiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)

・助教

研究者番号 : 60617421