

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659339

研究課題名(和文) 遺伝子発現の変化に基づくアナフィラキシーショックの新規診断法の開発

研究課題名(英文) Development of novel diagnostic methods for anaphylactic shock based on gene expression

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：剖検時に得られる指標のみに基づいてアナフィラキシーショックを死因として特定することはしばしば困難を伴う。そこで、本研究ではマウスモデルを用いて法医実務に有用な新規アナフィラキシーショック診断法の開発を試みた。ペニシリンVを抗原としてアナフィラキシーショックを誘起し、死亡したマウスの種々の臓器を採取して、サイトカイン、ケモカイン、免疫調節に関わる分子、増殖因子、転写因子およびシグナル伝達分子の発現をreal-time RT-PCRで遺伝子発現を解析することでアナフィラキシーショックに特異な遺伝子発現の変化を探索したが、現時点では新しい指標となりえる分子の発見には至っていない。

研究成果の概要(英文)：Specifying an anaphylactic shock as the cause of death only based on the autopsy findings often encounters difficulties. So, in this research, we tried development of the novel diagnostic method for anaphylactic shock using the mouse model. Anaphylactic shock was induced by challenge of penicillin V as an antigen, and total RNA was extracted from the various organs of mice died. The extracted RNA was subjected to real-time RT-PCR for analyses of the gene expression of cytokines, chemokines, the molecules for immune regulation, growth factors, transcription factors and signal transducers to identify the changes in specific gene expression anaphylactic shock. However, at present, we did not find the changes of gene expression specific for anaphylactic shock.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：アナフィラキシーショック 法医診断 急性死

1. 研究開始当初の背景

突然死の死因究明は法医学の重要且つ困難な課題の一つである。臨床の場と異なり、法医学で取り扱う事例には生前の情報に乏しく、死亡時および死亡から発見までの状況も不明な事例も多い。したがって、法医学者は剖検所見と剖検試料を用いた検査所見のみから診断を下すことを求められる場合も多い。急性死の死因の一つであるアナフィラキシーショックは、極めて急速な経過で死に至るが、特異的な指標に乏しく診断に苦慮することが多い。我が国においてアナフィラキシーショックを死因とする死亡は年間50~60と非常に少数であるが、急性死の死因究明に関わる法医学の場ではそれほど稀な死因でない。米国では人口の1.24~16.76%がアナフィラキシーを起こし、0.002%が死亡している可能性があると報告されている。しかし、統計上アナフィラキシーショックを死因とする死亡はその数分の一に留まっており、多くが見落とされているものと思われる。同様に我が国においても多くのアナフィラキシーショックによる死亡が見落とされている可能性が高く、診断の困難さがその原因の一つと考えられる。アナフィラキシーショックの新たな診断指標を見出すことは、より確かな診断に繋がるものと思われる。

2. 研究の目的

臨床の場と異なり、法医実務では生前の情報に乏しく、剖検時に得られる指標のみに基づいてアナフィラキシーショックを死因として特定することはしばしば困難を伴う。また、アナフィラキシーショックの組織学的指標や生化学的指標は必ずしもアナフィラキシーショックに特異的ではないとの指摘もある。したがって、アナフィラキシーショックに特異的、且つ剖検試料中にも安定して見出せる新しい指標の探索は法医学にとって極めて重要と思われる。本研究はマウスモデルを用いて免疫組織化学的、生化学的および分子生物学的な新しい指標を、特に死後の安定性に重点をおいて検索し、法医実務におけるアナフィラキシーショックの診断をより確実なものにすることを旨とするものである。

3. 研究の方法

本研究はアナフィラキシーショックに特異的で且つ死体中でも安定な遺伝子発現の変化を見出し、新しいアナフィラキシーショック診断の指標となる分子を見出すことを目的とするものであり、マウスを用いた動物実験による基礎的データの収集と剖検試料を用いた実務的検討から成る。

1) PenV-OVA および PenV-BSA の調製

20 mg の OVA あるいは BSA を 5 ml のホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、5 ml の同緩衝液に溶解した 100 mg の PenV を加えて 37 度で一晩攪拌する。反応液を遠心し、上清を PBS に対して 7 日間透析後、5 mg/ml に調整して冷凍保存した。

2) アナフィラキシーショックマウスモデルの作製

8-10 週齢雄の C57BL/6 マウスに 0.5 mg の PenV-OVA と 1 mg の alum を 300 ng の B. pertussis toxin と共に腹腔内投与する。投与 2 週間後 100 µg の PenV-BSA を 0.2 ml の PBS に溶かして静脈内投与して致死性的アナフィラキシーショックを誘起する。ほとんどのマウスは 15 分程度で死亡するが、死亡後室温に置き、未処理(対照)、死亡直後、12 時間後、24 時間後、36 時間後および 48 時間後の各時間に個別のマウスの死体から肺、心臓、腸の組織を採取し、一部をホルマリン固定、残りを液体窒素で急速に凍結し -80 度で保存した。

3) Real-time RT PCR によるアナフィラキシーショック特異的遺伝子発現変化の解析

採取したマウスの各臓器から Isogen を用いて RNA を抽出し、random 6 oligonucleotide を primer として逆転写する。得られた cDNA を鋳型として、抗原刺激による肥満細胞の活性化に際して著しく発現が増加するとされているサイトカイン (IL-1b, CSF1)、ケモカイン (CCL4, CCL7)、免疫調節に関わる遺伝子 (BL34, LIF, CD69)、増殖因子 (EGR3, FOSB)、

転写因子(MAFF)、シグナル伝達分子(DUSP2, THBD, NR4A2)に特異的なプライマーセットを用いて Real-time RT-PCR を行い、アナフィラキシーショックに特異的な遺伝子の発現変化を定量的に解析した。

4) Western blotting によるアナフィラキシーショック特異的タンパク指標の解析

マウスの各臓器からタンパクを抽出し、Real-time RT-PCR による解析でアナフィラキシーショック特異的に遺伝子発現が増強することが示された分子について、特異抗体を用いて Western blotting を行い、densitometry により定量して、アナフィラキシーショックで特異的に発現が増加するタンパクの特定を試みた。

5)アナフィラキシーショック特異的タンパクの免疫組織化学的検出

ホルマリン固定パラフィン包埋マウス組織の切片について、実験 3, 4)で見出した新しい指標となるタンパク、tryptase、chymase および BMP に対する抗体を用いて免疫染色と免疫蛍光染色を行い、マウスの組織におけるアナフィラキシーショックの指標となるタンパクの検出とその発現細胞の特定を行って、固定組織上で検出可能な新たな指標の選定を試みた。

6) アナフィラキシーショックを含めた急死事例の剖検試料の収集を行った。

1) 剖検試料におけるアナフィラキシーショック指標分子の検出

マウスを用いた実験で見出したアナフィラキシーショックの指標となる分子の免疫組織化学的検出をヒト剖検試料(教室の過去の剖検例)について検討する。また、研究期間内にアナフィラキシーショックと考えられる事例を経験した際には、Real-time RT-PCR および Western blotting による解析も行う。

4 . 研究成果

C57B6 マウスの腹腔に PenV-OVA をアジュバント免疫し、2 週間後に PenV-BSA を静脈

内投与すると、約 80% のマウスは 15 分以内に死亡した。死亡後直ちに肺、心臓、腸の組織を採取し、一部をホルマリン固定、残りを液体窒素で急速に凍結し-80 度で保存した。採取した各臓器から total RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を作成し、サイトカイン(IL-1b, CSF1)、ケモカイン(CCL4, CCL7)、免疫調節に関わる遺伝子(BL34, LIF, CD69)、増殖因子(EGR3, FOSB)、転写因子(MAFF)、シグナル伝達分子(DUSP2, THBD, NR4A2)(Jayapal M ら BMC Genomics 2006;7:210)に特異的なプライマーセットを用いて Real-time RT-PCR を行ったが、PenV-BSA の静脈内投与のみを行った対照群と比較して、解析した遺伝子の発現に有意な差は見出せなかった。

さらに、組織から抽出したタンパクを用いて、アナフィラキシーショックにおいて早期に発現が増加することが予想される DUSP2、THBD および EGR3 について western blotting が解析を行ったが、対照群との間に有意な差を見出すことはできなかった。

ホルマリン固定した組織について、DUSP2、THBD および EGR3 に対する得意抗体を用いて、組織上でアナフィラキシーショックに伴う変化を見出すことを検討したが、ショック組織に得意な染色性を見出すことは出来なかった。

以上のように、死亡直後の組織においてはアナフィラキシーショックに特異的な指標を見出すことは出来なかったが、アナフィラキシーショックにより急速に死亡しても、死亡に至る短い期間にショックに得意な遺伝子発現を誘起するスイッチは入っていると思われる、死後の組織においても超生反応により遺伝子発現の変化、更にタンパク発現の変化は進行するものと予想される。よって、死後の時間経過に伴い特異的な指標が顕在化する可能性が十分に考えられる。従って、本研究期間内には遂行することが出来なかった

死後ある程度時間が経過したマウスの組織について、更なる検討を行っていく予定である。

また、研究期間内に教室で行った剖検例にアナフィラキシーショックを死因とする事例は無く、ヒト組織における検討は行えなかったが、今後もアナフィラキシーショックを死因とする事例の試料収集に努め、ヒト組織を用いた検討も行っていく予定である。

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3件)

1. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic macrophage-derived cytokines and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. *Int J Legal Med*, 127(5):937-42. 2013 (査読有)
2. Kimura A, Ishida Y, Inagaki M, Nakamura Y, Sanke T, Mukaida N, Kondo T. Interferon- γ is protective in cisplatin-induced renal injury by enhancing autophagic flux. *Kidney Int*, 82(10):1093-104. 2012 (査読有)
3. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest*, 122(2):711-21. 2012 (査読有)

[学会発表](計12件)

1. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 向田直史, 近藤稔和. マウス急性砒素腎障害モデルにおける IL-6 およびエストロゲンの役割解析. 第13回分子予防環境医学研究会, 和歌山, 2014.1.31-2.1 (2.1)
2. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Lack of IFN-gamma exacerbates ANG II-induced aortic aneurysm through reduction of autophagy. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013.12.11-13 (12.11)
3. 近藤稔和, 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 川口真理子. 皮膚組織における autophagy の circadian rhythm と創傷治癒. 第43回日本創傷治癒学会, 大分, 2013.11.14-15 (11.15)
4. 木村章彦, 野坂みずほ, 向田直史, 近藤稔和. 圧負荷による代償性心肥大の分子メカニズム - IFN- γ の役割について. 第34回日本炎

症・再生医学会, 京都, 2013.7.2-3 (7.2)

5. Kimura A, Ishida Y, Furuta M, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. Pivotal involvement of IFN-gamma / Stat5 axis in compensatory cardiac hypertrophy induced by pressure overload. ESC Congress 2013, Amsterdam (The Netherlands), 2013.8.31-9.4 (9.3)
6. 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. 損傷が体内時計に及ぼす影響 - 皮膚損傷について -. 第97次日本法医学会学術全国集会, 札幌, 2013.6.26-28 (6.27)
7. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. IFN- γ / Stat5 axis is essential in compensatory cardiac hypertrophy induced by pressure overload. JSICR-MMCB2013, Tokyo, 2013.5.20-21 (5.20)
8. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Mukaida N, Kondo T. IFN-gamma plays a protective role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy through PI3K/Akt signaling activation. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012.12.5-7, (12.5)
9. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. A role of IFN-gamma in pressure overload-induced compensatory cardiac hypertrophy. 10th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, Geneva, 2012.9.11-15, (9.14)
10. Kimura A, Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kondo T. Effects of wound on circadian rhythm of skin tissue. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM2012), Istanbul, 2012.7.5-8, (7.5-7)
11. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 向田直史, 近藤稔和. 圧負荷による代償性心肥大における IFN- γ の役割. 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.7.5-6, (7.6)
12. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 川口真理子, 國中由美, 近藤稔和. A role of IFN- γ in the pathogenesis of pressure overload-induced heart failure. 第96次日本法医学会学術全国集会, 静岡, 2012.6.7-9, (6.9)

[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

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
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
近藤 稔和 (KONO TOSHIKAZU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70251923