

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25253055

研究課題名(和文) 時間病態生理学に基づく分子法医診断学の樹立 時計遺伝子による死のメカニズムの探求

研究課題名(英文) Establishment of molecular forensic diagnosis based on chronopathophysiology

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,700,000円

研究成果の概要(和文)：法医学診断には常に最先端の基礎研究の知見が応用されなければならない。法医実務における時間病態学の影響を検討した。深部静脈血栓，アセトアミノフェン肝障害，薬剤性腎障害(シスプラチン及びヒ素)，再灌流障害による外傷性ショック，敗血症モデル，生活反応として損傷部局所のオートファジー解析を通して，損傷の受傷時期，薬物の服用時期，感染症発症時期を考慮することが各病態をより深く理解するうえで重要と考えられた。また重傷頭部外傷では，心臓における時計遺伝子の発現を抑制することから，死因を考慮した時計遺伝子による死亡時刻推定が求められる。法医実務において時間病態学を考慮した診断が必要不可欠である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the influences of circadian rhythms in forensic practices using several injury/disease models. We have found that the magnitude/severity of deep vein thrombosis, acetaminophen-induced hepatotoxicity, drug-induced nephrotoxicity (cisplatin and arsenite), ischemia-reperfusion muscle injury or systemic organ damages, cecal-ligation and puncture-induced sepsis and wound-induced local autophagy activity could be influenced by individual circadian rhythm, implying that considering time of injury, drug intake and infection onset would be essential for more elucidating each pathophysiological state. Additionally, severe brain injury would suppress clock gene expression in peripheral organs such as heart, indicating that clock gene-based death-time estimation has to be carefully employed in cases with severe head trauma. Collectively, forensic pathologists should always take into consideration the aspects of chronopathophysiology in order to make more accurate diagnosis.

研究分野：法医病理学

キーワード：分子法医診断学 時間病態学 深部静脈血栓 薬剤性臓器障害 外傷性ショック 敗血症 生活反応

1. 研究開始当初の背景

哺乳類には睡眠覚醒、体温、内分泌、免疫、代謝などの生理現象において体内時計と呼ばれる24時間周期のリズムがある。このリズムは時計遺伝子と呼ばれる遺伝子の転写レベルで制御されている。これら時計遺伝子は、生体のあらゆる細胞に存在し、約24時間周期の時間情報を告げることから、我々は時計遺伝子を用いて死亡時間を推定するという法医学領域へ最初に応用した(Int J Legal Med 125:385:2011)。さらに、日内リズムが薬物代謝や免疫応答と関連することから、日内リズムを考慮した薬物濃度、感染や外傷の程度と死因との因果関係や生活反応の判断が必要であると考えた。

2. 研究の目的

日内リズムを考慮した薬物濃度、感染や外傷の程度と死因との因果関係や生活反応の判断が必要であるとの仮説に基づき、時間病態生理学を考慮した「分子法医診断学」の樹立のために本研究を立案した。

3. 研究の方法

法医実務において、概日周期リズムと関連があると考えられる以下のモデルについて検討を行った。

1) 深部静脈血栓モデル

マウスをペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔下で開腹し、下大静脈を結紮し、静脈血栓の形成状態を検討する。

2) 薬物中毒モデル

薬物(アセトアミノフェン、ヒ素、シスプラチン)をマウスに投与して、各薬物による臓器障害を検討する。

3) 外傷性ショックモデル

マウス一側または両側の大腿基部を輪ゴムで90分間圧迫し、開放後の、骨格筋、肺、肝臓の障害を検討する。

4) 重症感染症モデル

重症感染症として、敗血症性ショックモデルを用いた。深麻酔下において開腹したマウスの腹腔内より盲腸を取り出し、盲腸根部を3-0縫合糸で結紮後、20G注射針で盲腸壁全層を穿刺し、結紮穿刺した盲腸を再び腹腔内に戻して閉腹する。

5) 皮膚損傷の Autophagy と日内リズム

マウスの非損傷部皮膚を時間を変えて採取し、各採取時間における LC3-I および LC3-II 並びに p62 の発現を検討する。さらに、非損傷部皮膚を採取した時間に各々マウス背部に径4mmの打ち抜き損傷を作成し、受傷後1日目に採取して、同様の検討を行う。

6) 中枢障害が末梢体内時計に及ぼす影響

抗利尿ホルモンを事前に投与したマウスに体重の19%の蒸留水を腹腔に注入し、脳浮腫モデルを作成し、蒸留水注入2時間後に脳と心臓を採取して、脳の浮腫率と心臓における時計遺伝子の発現を調べる。

さらに、法医剖検試料において心臓を採取して、重傷頭部外傷と非重傷頭部外傷例で心臓における時計遺伝子の発現を検索し、各事例における死因が時計遺伝子の発現に与える影響を検討する。

4. 研究成果

1) 深部静脈血栓モデル

下大静脈を結紮する時を7:00と12:00の群に分けたところ、12:00結紮群では有意に死亡率が高く、血栓形成も大きかった(図1)。プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)については両群間で差は認められなかった(図2)。

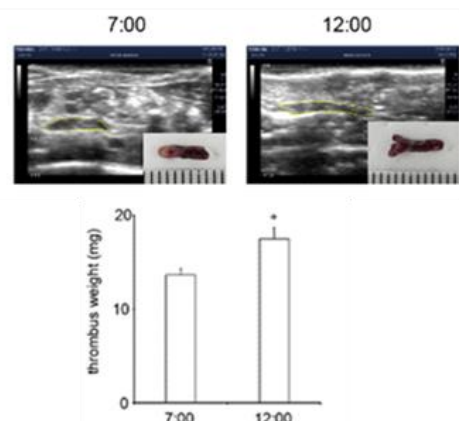


図1. 血栓形成の程度。

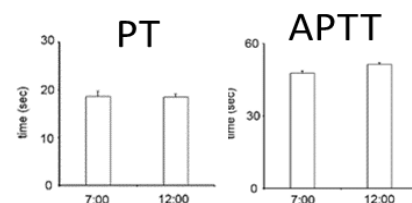


図2. 血液凝固能。

血栓内の好中球の浸潤程度については7:00に結紮したマウスより、12:00に結紮したマウスで、好中球数が少なかった(図3)。

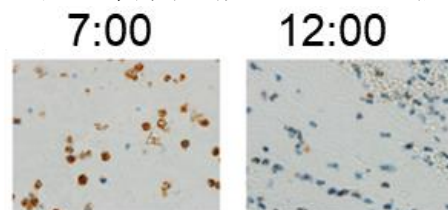


図3. 血栓内好中球浸潤。

血栓融解に重要なMMP9遺伝子発現が12:00結紮群で有意に減弱していたことから、MMP9の差が血栓の大きさに関与していると考えられ、血栓内におけるMMP9遺伝子発現と日内リズムの関係が示唆された(図4)。

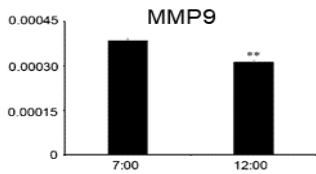


図 4. MMP9 遺伝子発現.

2) アセトアミノフェン (APAP) 肝障害

8-12 週齢 Balb/c 雄マウスを用いて、午前 8:00 と午後 8:00 に APAP (600mg/kg) を腹腔内投与したところ、午前投与群と比較して、午後投与群では 48 時間以内の死亡率は約 90% と有意に高く (図 5)、肝臓逸脱酵素の著明な上昇と広範な小葉中心性壊死を認めた (図 6)。また、午後投与群では午前投与群と比較して、マクロファージ・T 細胞浸潤が顕著であった (図 7)。

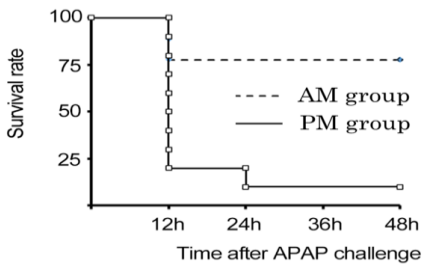


図 5. APAP 投与後の生存率.

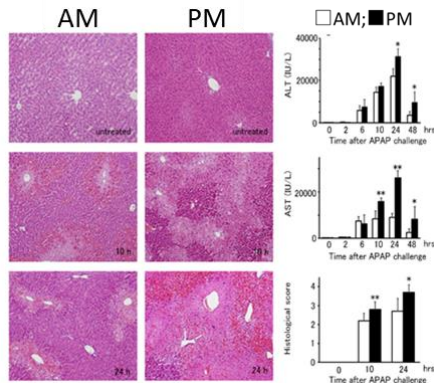


図 6. APAP 投与後の肝障害.

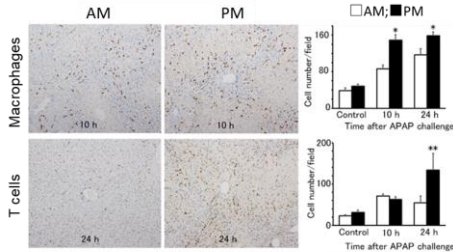


図 7. APAP 投与後の白血球浸潤の程度

次に肝障害に関与する炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF, IFN γ , CCL3, CXCL1) の遺伝子発現も午後投与群で高かった (図 8)

アセトアミノフェン代謝及び解毒について検討した。午後群では代謝に関与するチトクロム P450 の CYP2E1 の発現レベルが高く、解毒に関するグルタミルシステイン合成酵

素 (GCLC) の遺伝子発現が低かった (図 9)。すなわち、午後群では、アセトアミノフェンの代謝が亢進し中毒代謝物である NAPQI が多量に産生され、且つ解毒能が低下していることが、肝障害を増悪させる原因と考えられた。

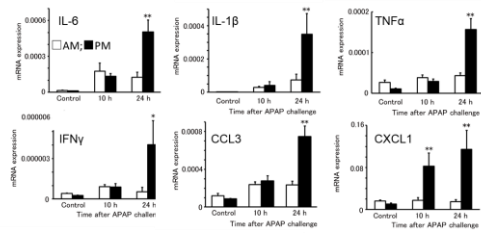


図 8. APAP 投与後の遺伝子発現.

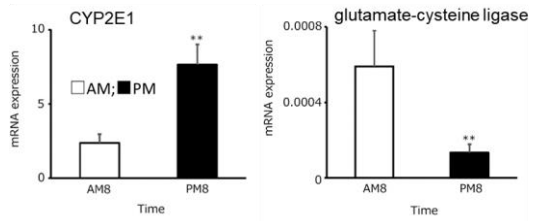


図 9. APAP 投与前の CYP2E1 と GCLC の遺伝子発現

3) 薬剤性腎障害

マウスに午前 8:00 または午後 8:00 にシスプラチン (15 mg/kg) を腹腔内投与、または亜ヒ酸 (12.5 mg/kg) を皮下投与した。シスプラチン投与後 4 日目までは両群間で BUN, CRE に有意差は認められなかったが、投与後 5, 6 日目において、BUN, CRE とともに午前投与群において高値を示した (図 10)。

また、亜ヒ酸を投与した時、BUN は両群でも程度の上昇を認めたが、CRE については、投与後 6 及び 10 時間後では、午前投与群で有意に高い値を示した (図 11)。

以上のことから、薬物中毒の程度に日内リズムが関与していることが示唆された。特に我々がこれまで明らかにしてきた腎臓における時計遺伝子の日内リズムが密接に関与していると考えられた。

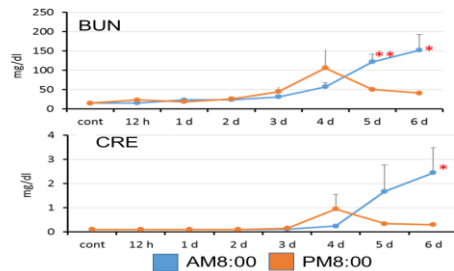


図 10. シスプラチン投与後の腎障害.

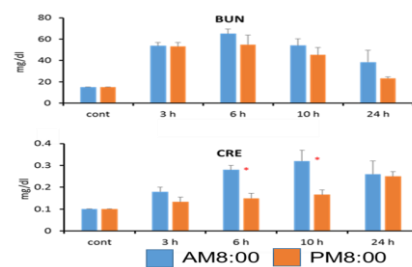


図 11. ヒ素投与後の腎障害.

4) 外傷性ショック

外傷性ショックのモデルとして、マウスの一側または両側の大腿部を輪ゴムで圧迫し、90分後に開放する。大腿部を圧迫する時間帯を午前9時半と午後5時半の2群で検討した。一側圧迫モデルにおいては、午前圧迫群・午後圧迫群共に死亡例は認められなかった。

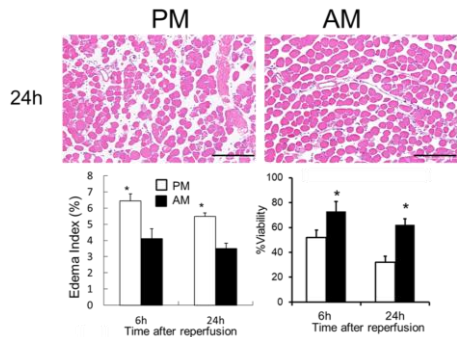


図 12. 片側後肢圧迫開放後の骨格筋障害.

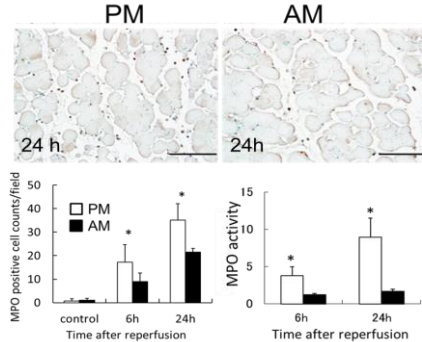


図 13. 片側後肢圧迫開放後の好中球浸潤.

しかしながら、下肢骨格筋の傷害程度については、午前圧迫群に比べて午後圧迫群では、筋細胞の壊死および筋組織の浮腫が顕著で(図 12), 好中球浸潤も午後圧迫群で有意に多かった(図 13).

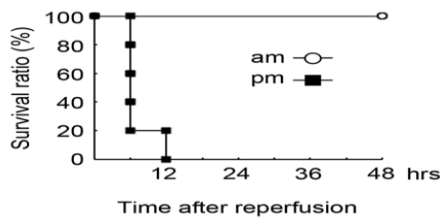


図 14. 両側後肢圧迫開放後の死亡率.

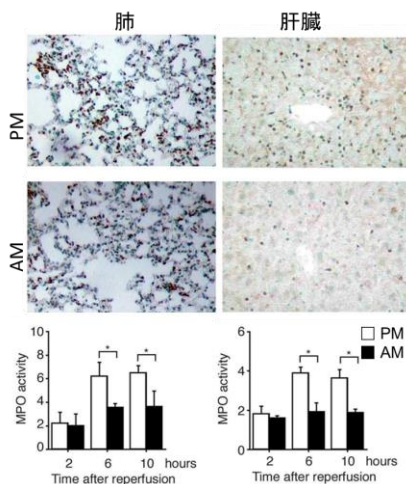


図 15. 両側後肢圧迫開放後の臓器障害.

また両側圧迫したマウスは、午前圧迫群では全例生存し、午後圧迫群では大腿部の圧迫解放後 12 時間以内に全例死亡した(図 14). さらに、午後群では肺および肝臓の好中球浸潤が顕著であった(図 15).

以上のことから、外傷性ショックの病態においても日内リズムの関係が示唆された。

5) 重症感染症

8 週齢の雄 BALB/c マウスを用いて、開腹下に回盲部を結紮後、20G 針で 1 回穿通した後、閉腹して生存率を 120 時間 (5 日) まで観察した。午前 8:00 の施術群では、施術後 60 時間で 20% のマウスが死亡したものの、その後死亡例は観察されず、120 時間後の生存率は 80% であった。一方午後 8:00 施術群では、24 時間目までは死亡例は観察されなかったが、36 時間では 60% が死亡し、48 時間では生存率 20% となり、120 時間で全例が死亡した(図 16)。このように、細菌に対する免疫反応における日内リズムの関係が示唆された。

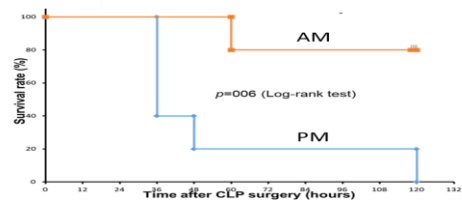


図 16. 敗血症による死亡率.

6) 皮膚損傷の生活反応

Autophagy が皮膚損傷の生前・死後の鑑別、ための指標として有用であるとの報告をしてきた (Int J Legal Med 129:537:2015). 具体的には、非損傷部に比べて損傷部位では、Autophagy が抑制されて LC3-II が減少し、p62 が増加する。しかし、非損傷部の Autophagy 活性にも日内リズムが存在する。すなわち、損傷部のみの Autophagy 活性の検索だけでは、生活反応の有無を判定に誤りが生じる可能性がことから、受傷時間を考慮した判定が必要となる。そこで、皮膚損傷の生活反応の判定には必ず非損傷部と損傷部の皮膚の Autophagy 活性を対比する必要がある。

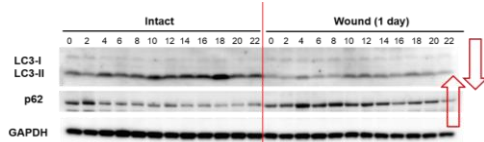


図 17. 非損傷部・損傷部の Autophagy 活性 (Western blotting).

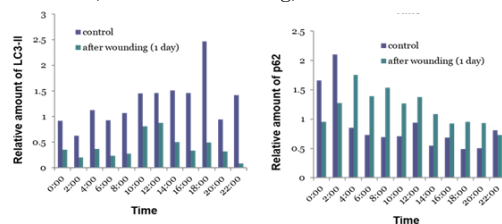


図 18. 非損傷部・損傷部の Autophagy 活性 (半定量結果).

7) 中枢神経障害と時計遺伝子

体内時計には中枢性と末梢性が存在するが、中枢障害が末梢性の体内時計に及ぼす影響についてマウス脳浮腫モデルで検討したところ、脳浮腫マウスでは心臓における時計遺伝子の発現について Per2 遺伝子発現が有意に減弱し、Bmal1 の遺伝子発現については有意な変化を認めなかった。

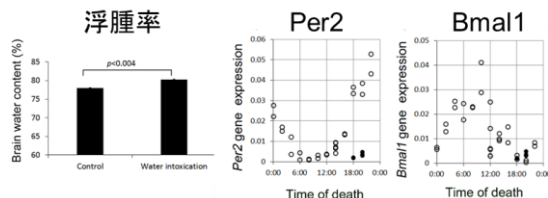


図 19. 脳浮腫による時計遺伝子の発現。

さらにヒト剖検試料について検討したところ、重篤な頭蓋内損傷を伴う場合、末梢組織での時計遺伝子の発現が時間に関係なく抑制されることが明らかとなった(図 20)。このことは、重篤な頭部外傷を伴う事例では、時計遺伝子の発現解釈を慎重に行われなければならない。

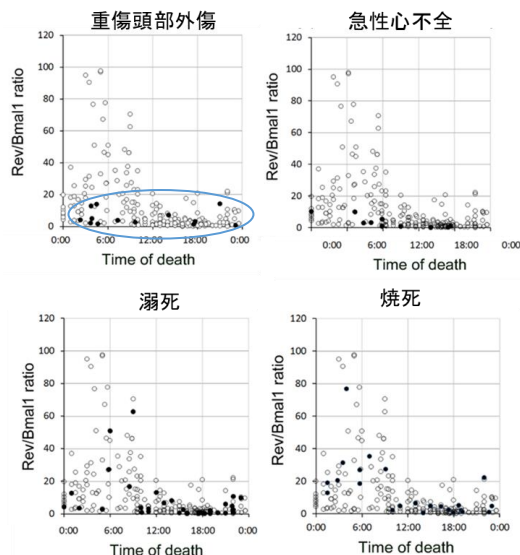


図 20. 死因別にみた時計遺伝子発現(心臓)。

8) まとめ

従来、我々は死亡時刻を推定に時計遺伝子の発現を応用してきた。しかしながら、時計遺伝子による日内リズムの変化が種々の病態に影響を与えるのではないかという仮説に基づき本研究を実施した。この研究結果を通じて、死因判断や生活反応の判定といった、重要な法医実務事項において、精度の高い法医診断を行うためには、日内リズムの影響を考慮することも重要な要素と考えられる。

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 13 件)

1. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Shimada E, Hata S, Yamamoto H, Hashizume Y, Kimura A, Furukawa F, Kondo T. Forensic

application of epidermal AQP3 expression to determination of wound vitality in human compressed neck skin. *Int J Legal Med.* 132:237-242.2018. 査読有.
doi: 10.1007/s00414-018-1780-1.

2. Kimura A, Ishida Y, Furuta M, Nosaka M, Kuninaka Y, Taruya A, Mukaida N and Kondo T. Protective Roles of Interferon- γ in Cardiac Hypertrophy Induced by Sustained Pressure Overload. *J Am Heart Assoc.* 7: pii: e008145. 2018. 査読有.
doi: 10.1161/JAHA.117.008145
3. Ishida Y, Kuninaka Y, Furukawa F, Kimura A, Nosaka M, Fukami M, Yamamoto H, Kato T, Shimada E, Hata S, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Immunohistochemical analysis on aquaporin-1 and aquaporin-3 in skin wounds from the aspects of wound age determination. *Int J Legal Med* 132:237-242.2018 査読有.
doi:10.1007/s00414-017-1725-0.
4. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Yamamoto H, Kuninaka Y, Shimada E, Okumoto K, Okada M, Hata S, and Kondo T. Influence of circadian rhythm on thrombus formation of murine deep vein thrombosis model. *Ann Hematol Oncol.* 4:1171. 2017. 査読有.
doi: 10.26420/annhematoloncol.2017.1171
5. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Hemmi H, Sasaki I, Kaisho T, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of fibrocyte and M2 macrophage migration. *Sci Rep.* 7:16833. 2017. 査読有.
doi: 10.1038/s41598-017-17007-8.
6. Zhao J, Nishimura Y, Kimura A, Ozawa K, Kondo T, Tanaka T, Yoshizumi M. Chemokines protect vascular smooth muscle cells from cell death induced by cyclic mechanical stretch. *Sci Rep.* 7:16128. 2017. 査読有. doi: 10.1038/s41598-017-15867-8.
7. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Yamamoto H, Kato T, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Detection of intrathrombotic endothelial progenitor cells and its application to thrombus age estimation in a murine deep vein thrombosis model. *Int J Legal Med.* 131:1633-1638. 2017. 査読有.
doi: 10.1007/s00414-017-1668-5.
8. 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 Legal Med,* 131:179-183. 2017. 査読有.
doi: 10.1007/s00414-016-1465-6
9. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Hama M, Kawaguchi T, Sakamoto S, Shinozaki K, Iwahashi Y, Takayasu T, Kondo T. Exaggerated arsenic nephrotoxicity in female mice through estrogen-dependent impairments in the autophagic flux. *Toxicology,* 339:9-18. 2016. 査読有.
doi: 10.1016/j.tox.2015.11.005.
10. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Shimada E, Yamamoto H, Nishiyama K, Inaka S, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Detection of endothelial progenitor cells in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int J Legal Med,*

- 129:1049-1054. 2015. 査読有.
doi: 10.1007/s00414-015-1181-7
11. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Kawaguchi T, Hama M, Sakamoto S, Shinozaki K, Eisenmenger W, Kondo T. Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination. *Int J Legal Med*, 129:1043-1048. 2015. 査読有. doi: 10.1007/s00414-015-1167-5
 12. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Hama M, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic IL-6 and its application to thrombus age estimation. *Int J Legal Med*, 129:1021-1025. 2015. 査読有. doi: 10.1007/s00414-015-1147-9
 13. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Shiraki M, Hama M, Kawaguchi T, Kuninaka Y, Shimada E, Yamamoto H, Takayasu T, Kondo T. Autophagy in skin wounds: a novel marker for vital reactions. *Int J Legal Med*, 129:537-541. 2015. 査読有. doi: 10.1007/s00414-015-1168-4

[学会発表] (計 12 件)

1. Kondo T. Skin Wound Healing- from Molecular Biology to Forensic Pathology. 1st International Caparica Conference in Translational Forensics. 2017.
2. Yamamoto H, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Shimada E, Kawaguchi M, Kimura A, Kondo T. Molecular toxicological study on the influence of circadian rhythms on acetaminophen hepatotoxicity. 10th ISALM combined with the 96th Conference of GSLM. 2017.
3. Ishida Y, Kuninaka Y, Hata S, Nosaka M, Kimura A, Yamamoto H, Shimada E, Kawaguchi M, Murakami K, Sakamoto S, Kondo T. The influence of circadian rhythm on thrombus formation, infection and intoxication. 10th ISALM combined with the 96th Conference of GSLM. 2017.
4. Kondo T, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Yamamoto H, Kawaguchi M, Shimada E, Hata S. Forensic diagnosis of compression based on expression of aquaporin-3 in human neck skin. 10th ISALM combined with the 96th Conference of GSLM. 2017.
5. Kuninaka Y, Yamamoto H, Nosaka M, Ishida Y, Shimada E, Kawaguchi M, Kimura A, Kondo T. The influence of circadian rhythm on thrombus formation, infection and intoxication. 第 101 次日本法医学会学術全国集会. 2017.
6. Kondo T, Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Shimada E, Kawaguchi M, Yamamoto H. Autophagy in skin wounds: a novel marker for vital reactions. 26th Spring Meeting of GSLM in North. 2017.
7. 近藤稔和. 侵襲と組織修復—皮膚から心臓まで. 第 46 回日本創傷治癒学会. 2016.
8. Kondo T, Nosaka M, Kimura A, Ishida Y, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kawaguchi M. The influence of circadian rhythm on thrombus formation, infection and intoxication. 95th meeting of DGRM. 2016.
9. Kondo T. New Molecular and Imaging Innovations in Forensic Pathology. IALM Intersocietal Symposium. 2016.

10. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 近藤稔和. 皮膚創傷治癒における autophagy の役割. 第 45 回日本創傷治癒学会. 2015.
11. 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. 2013.
12. 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. 2013

[図書] (計 1 件)

1. Kondo T, Ishida Y, Kimura A, Nosaka M. *New Molecular and Innovations in Forensic Pathology. P5 Medicine and Justice*, SD Ferrara (ed). Springer, 2018, pp127-145. doi.org/10.1007/978-3-319-67092-8_9

[その他]

ホームページ等

1. 学会発表 3 番において, Best Poster Award 受賞



6. 研究組織

(1) 研究代表者

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: 7 0 2 5 1 9 2 3

(2) 研究分担者

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: 6 0 1 3 6 6 1 1

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: 1 0 3 6 4 0 7 7

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: 0 0 2 4 4 7 3 1
00244731

池松和哉 (IKEMATSU, Kazuya)
長崎大学・歯歯薬学総合研究科 (医学系)・教授
研究者番号: 8 0 3 3 2 8 5 7