

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460876

研究課題名(和文) 死戦期に発現する遺伝子発現に基づくForensic pathogenesis

研究課題名(英文) Forensic pathogenesis based on gene expression expressed during death interval.

研究代表者

西 克治(nishi, katsuji)

滋賀医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：60073681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳と心臓で死戦期に発現される諸抗原の分布や特徴を用いて法医病理診断に役立てようと試みた。認知記憶障害患者では、海馬歯状核分子層に複合糖鎖の沈着が観られること、脳と心臓で虚血再灌流が起こるとそれぞれの障害が高度となること、脳での低酸素関連抗原(HIF1)の発現は死戦期の長さで多くなること、凍死防御抗原である RBM3 抗原は、血管拡張因子としても働くこと、頸部圧迫による死亡事例では、黒質細胞の細胞核に RBM3 の発現が特異的に観られることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We examined distribution of hypoxic related antigens, which are expressed during agonal duration in the brain and heart, for application to forensic pathogenesis and diagnosis. We could observed that (1) glycoconjugate deposits in the molecular layer of hippocampus from cognitive patients, (2) reperfusion in brain or heart causes intensive injury, (3) expression of HIF1 is increasing with length of agonal duration, (4) RBM3 which is protector item to hypothermia has an important role as vaso-expansion, and (5) RBM3 is independently expressed in the nuclei of Substantia nigra of individuals died from neck-compression deaths.

研究分野：法医学

キーワード：法医病理 脳・心関連 法医病理学

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 鑑定のみざましい発達に対し法医病理学的診断、とりわけ各種原因による死戦期状態の診断方法の開発は遅々として進まない。脳や心筋の虚血変化は法医病理学的に、重要検査項目であるにもかかわらず、法医学領域での主要な研究課題となっていない。今回我々は、ヒト組織を用いて、ヒトの死に深く関わっている脳・心関連を検討し、法医病理学検索に新しい考え方を導入したい。

### 2. 研究の目的

ヒトの死戦期に遺伝子発現に伴い生じてくる諸物質につき、死後経過時間の違いを様々な死亡原因別に retrospective に検索し、それらの結果を法医病理学診断への応用、特に、傷病の法医病理診断、死戦期の長さ推定、死亡メカニズム、組織修復過程などの Forensic Pathogenesis を確立しようと研究を計画した。

### 3. 研究の方法

我々は、法医解剖時に事後の病理学的検索の必要性から、脳では、海馬、視床、黒質部、延髄、歯状回を含む小脳を、心臓では、右室、左室、中隔部の横断、中隔部の縦断切片を常に摘出、固定してきた。今回の研究では、法医学分野で多くの報告が成されている心臓の法医病理学的検索について、心筋細胞好酸性変化や contraction band などの conventional な所見と pathogenesis cascade の融合、加えて活発に実施されているとは言い難い脳各部の虚血関連抗原の cascade 検索に重点を置いた。今回の研究で検討した抗原は、Hypoxic induced factor 1(HIF1)、血管内皮性一酸化窒素合成酵素(e-NOS)、Sirtune(Sirt1)、RNA binding protein 3(RBM3)、cold inducible RNA binding protein(CIRBP)、Apoptotic induced factor 1(AIF1)、Heat shock protein 70(HSP)、complement component no 9(CCC9)、neuroglobin、c-Fos である。

### 4. 研究成果

研究で得られた結果を心臓、脳の順に記載し、次いで、脳と心臓の関連(Brain - Heart Axis) についての今後の研究への広がりにつき記載する。

#### A. 心臓

##### (1): Contraction Band(CB)

CB は心臓病理学的検査でよく見いだされる所見であるがその pathogenesis は未だ十分に解明されたとは言い難い。我々も検査時に CB とそれに類似する所見 (pseudo contraction band: PB) に遭遇することが多くあった(発表論文1: )。多くの解剖例の状況と組織化学的所見から PD は焼死事例、救急蘇生時の心臓マッサージなどで発生することを見だし、CB と PB の区別は、心筋組織での SIRT1 と CC9 抗原の発現の違いから区別可能であることを報告した(発表論文

4)。すなわち、CB 部に限った検索で、CCC9 の発現が観られる CB は心筋虚血に由来する、CCC9 の発現が観られない CB の内、SIRT1 発現が見られないものは低体温症による死亡例で、SIRT1 の発現が観られる CB は心臓マッサージに起因することを示唆する結果が得られた(発表論文4)。この結果は、CB が心臓マッサージが成されたか、純粋虚血心疾患での死亡かの法医病理診断に寄与するところ大きいと判断される。

(2) 心筋虚血部の変化: 古くから心筋虚血部は HE 染色で好酸性に染色されると信じられてきたが、その根拠は不確実なものであった。今回の重量 1000 g を超える心臓の研究で、我々は HE 染色で好酸性に染色される部が、Azan 染色で帯青色に染色され、RBM3 の発現は、HE や Azan 染色部の変色部では見出せず、周辺の心筋細胞核に顕著に発現されていた。e-NOS の発現は、同様の変色部では細胞質に弱く、周辺の心筋細胞室に顕著に発現されていた。早期心筋虚血変化マーカーといわれている CCC9 の発現が HE, Azan 染色の変色部に一致して見出されたことから、HE, Azan 染色での変色は心筋虚血を表していることが確認された(発表論文8)。以前の我々の凍死事例での心筋の HE, Azan 染色の変色部も低体温時の酸素解離減少に基づく低酸素に因ることがさらに推認される結果となった。一方、アミロイド沈着心では、アミロイド沈着部では、従来のアミロイド染色方法が優位であり、虚血・低酸素関連抗原の発現が見られず、最新の抗原発現検出手法にも弱点があることが証明された(発表論文5)。Conventional な染色方法も同時に用いて検討すべきであるという結論がえられた。

B. 血管拡張因子: Murad ら(Murad, F. et al., Adv. Pharmacol. Ther., 3, 123-132. 1978) の NO と血管拡張現象発見以来硫化水素(H<sub>2</sub>S) や一酸化炭素(CO) にも血管拡張作用がある事(Andreadouat et al., Bri. J. Pharm, 172, 1587-1606, 2015) が次々と明らかにされてきた。我々も虚血組織で血管内皮 NO 合成酵素である e-NOS が発現されていることを知り、同様に虚血組織で発現されている RBM3、CIRBP の虚血心筋や脳梗塞部での発現状態を e-NOS の発現状態と比較検討した。e-NOS は血管内皮細胞に発現され、RBM3 と CIRBP も同様に血管内皮細胞に発現され、発現強度は e-NOS に比して顕著であった。本来、冬眠動物の冬期に発現される RBM3 と CIRBP は血管拡張因子としても働いていることを示す結果が得られた(発表論文6)。

#### C. 脳

(1) 脳の死後変化と法医病理学的検索の適正根拠: 小脳の死後変化につき検討を行った。我々は、研究開始前の時点で約 20 時間の再灌流が生じたヒトの小脳では、顆粒細胞層の細胞崩壊が、死後 42 日間土中に埋められ

ていたヒトの変化より顕著・高度である事を示していた。また、ドイツ連邦共和国ミュンスター大学法医学研究所に学生を派遣して得られたデータから、死戦期の長さや顆粒細胞減少程度に相関関係が観られ(学会発表6)、死戦期の再灌流がない症例は、今回の検討に適切であると判断した。また、HIF1 の大脳黒質周辺での発現も同様に死戦期の長さや相関するという結果が得られた(発表論文7)。

(2) 脳組織での疾病と糖鎖構造物質：今回の脳での検索中、偶然、海馬歯状回顆粒細胞層の分子層のレクチンやコンドロイチン硫酸などの抗複合糖鎖抗体に反応する所見を見いだした。光学顕微鏡レベルの染色性と電子顕微鏡レベルの観察からこれらの沈着物は、日本で呼称されているアミロイド小体(Corpora amylacea)とは別の物質で、統合失調症患者、Down syndrome 患者及び認知症患者に特異的に見いだされたことが明らかとなった。投薬との関連も調査したが有意な関連は示されなかった。海馬分子層には、多くの神経伝達シナプスの存在が示されているところから複合糖鎖の多くの沈着がシナプス伝達を阻害して、認知機能の障害を引き起こしていることを示す結果が得られた。顆粒細胞層は成人に達しても幹細胞から細胞分裂が生じることが示されていることから、細胞分裂時の糖鎖機能に何らかの障害が生じていると示唆された(発表論文2)。複合糖鎖の沈着は認知症や統合失調症、Down 症患者的の記憶障害に関与していることを示唆する所見と判断され、統合失調症病因解明の為に「死後脳の研究」に寄与すると推測される。

(3) 脳虚血に対応する虚血関連抗原物質の発現：研究期間中、多発脳梗塞で、且つ、脳梗塞発症が多時期に及び1例の男性の解剖例を経験した。この患者では、新鮮な脳梗塞部ではRBM3 や CIRBP の発現が観られ、幾分陳旧な脳梗塞部位では、RBM3 や CIRBP、HSP はじめ多くの抗原の発現が観られ、陳旧な脳梗塞部では、RBM3 や CIRBP の発現が認められたが、他の抗原発現は観られなくなっていた。脳虚血部には、RBM3 や CIRBP の発現がほぼ常に観られ、他の抗原は梗塞部の修復に伴い、発現してくると推測された(発表論文3)。

(4) 頸部圧迫による死亡事例の脳所見特徴：大脳黒質部は、法医学初心者にとっても部位確定が容易である。この部に何らかの抗原発現の特徴があれば、その特徴・特性を法医学病理診断に応用しようと、頸部圧迫に基づく死亡例19例(縊頸9例、絞殺4例、扼殺3例)、一酸化炭素中毒死、凍死、肝硬変、脳損傷死亡例など全32例の黒質部での諸抗原発現を検索した。その結果、黒質部は、その細胞内顆粒のため、核に発現する抗原としてRBM3 が見いだされ、19例の黒質細胞核に発現が見いだされ、頸部圧迫に基づく死亡の法医学病理診断に役立つことを示唆する結果を得た(発表論文9)。

(5) 脳・心関連について：古くから、法医学領域や臨床医学領域で、くも膜下出血、脳梗塞・脳出血やてんかん発作重責状態などでは、心臓の活動力現象が早期に起こり、心筋収縮力低下・不整脈などの変化が顕著となり、急な死亡が生じることが知られている。延髄からの自律神経刺激や自律神経刺激に基づくアドレナリンの分泌亢進が原因とされてきている。これまで、急性の脳変化とそれに伴う心臓の変化を組織学的に示した例は観られていない。今回の研究の中で、2例の自絞死事例があり、それらから得られた脳各部の組織と心筋細胞での虚血・低酸素関連抗原の発現を検討した。我々のこれまでの検索では観られなかったような結果が得られた。特に、虚血関連抗原として最も知られている

Hypoxia inducing factor 1 alpha(HIF1 )の発現に注目した。この抗原は、2名の自絞死事例から得られた海馬、視床、黒質、脳皮質部、小脳のいずれの部位でも発現は観られなかった。ただ、延髄の孤束核などの細胞群では、細胞質や細胞核に発現が観られた。この部の発現は、自絞時に閉塞されない椎骨動脈からの血液供給による結果延髄組織の生存のためと思われる。一方、これまでの経験では、心筋組織では、HIF1 抗原は、凍死事例などで、心筋内膜側の細胞質に淡く発現されることが観られたが、その他の死因では発現の確認が全く困難であったが、この自絞死2例では、心筋細胞の細胞核に顕著な発現が2例共に確認された。HIF1 は、虚血や酸素低下状態に陥ると、先ず、細胞質に抗原発現が生じ、低酸素状態が持続すると次第に核に抗原が移動していくと報告されている。さらに最近の報告では、細胞内でのHIF1 の過剰発現は、細胞のApoptosis や Autophagy を誘発し細胞群の死滅を起こすことが示されている。今回の上記の結果は、脳と心臓の間に、虚血時に何らかの抗原発現機序の相関(brain-heart axis)が存在することを示しているとも考えられる。今後、この分野の検討を進めていきたい(学会発表4・予定)。

#### 結論と今後の展開

脳と心臓では、死戦期の状況により、虚血・窒息関連に関する種々の抗原が発現されていた。その発現部位は、抗原により様々で、細胞質に発現する、細胞質に発現され、発現量が多くなると核に移行することを推測せざるを得ない抗原(HIF1 など)、主として核にのみ発現される抗原(RBM3、CIRBP など)等の特性が観られた。発現には死戦期の長さが関連していること、頸部圧迫死に関して、黒質細胞の細胞核に発現されるRBM3 がその指標となり得る事が明らかとなった。また、統合失調症患者の海馬歯状回分子層に複合糖鎖の沈着物が見いだされた。今回の研究で、再灌流が生じなかった脳組織は通常いわれているような死後変化が少なく、死後脳の研究に適切と推測された。また、2例の自絞死の検

索からに限られるが、脳と心臓間に自律神経系や脳-視床下部-下垂体系のホルモン系が強く関連していると報告されている Brain-Heart Axis といわれている関係が抗原発現の面からも推認される結果が得られた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. S Furukawa, M Kataoka, S Morita, A Uno, M Hitosugi, H Matsumoto, K Nishi. Histochemical Characteristics of Myocardium Obtained from Two huge Cardiomegaly with over 1000g in Weight. SM J Clin Med. 2016; 2(1): 1011-1015. [smjournals.com/clinical-medicine/download.php?file...v2...](http://smjournals.com/clinical-medicine/download.php?file...v2...) 査読あり
2. K Nishi, S Furukawa, S Morita, M Hitosugi, L Eberle, Expression of RNA binding motif protein 3(RBM3) in the Substantia Nigra might be utilized to distinguish neck compression deaths from other deaths. Rev of Alb Leg Med. 2016, 12, 59-66. 査読あり
3. K Maeda et al, (7 番目著者), Clinical Phenotype and Segregation of Mitochondrial 3243A> G mutation in 2 pairs of monozygotic twins, JAMA Neurolog. 2016, 20,E1-E4. doi:10.1001/jamaneurol.2016.0886. 査読あり
4. K Nishi, S Furukawa, S Morita, M Hitosugi, L Eberle, Postmortem brains obtained acute death without reperfusion are utilizable and reliable to examine the expression of hypoxia related antigens. Alb J Med & Helth Sci, 2016, 47, in press 査読あり
5. S Morita, S Furukawa, K Nishi, Classification of contraction bands using immunohistochemistry. Am J Forensic Med Pathol. 2015, 36, 23- 26, doi: 10.1097/PAF.000000000000124, 査読あり
6. S Furukawa, S Morita, I Sakaguchi, A Uno, T Nakagawa, M Hitosugi, K Nishi. Evaluation of the Progressed Stage of the Hypoxic and Ischemic Cascade Pathway in the Myocardium using Antibodies against Hypoxic Related Antigens. Journal of Advances in Life and Natural Sciences. 2015; 1 (1): 30-34. <http://nebula.wsimg.com/7e51d053fefecac6237b50c9602f1c9?AccessKeyId=638139448EC3C95C7DBE&disposition=0&lloworigin=1> 査読あり
7. S Furukawa, S Morita, L Wingenfeld, M Hitosugi, K Nishi, RBM3 and CIRBP may play an important role as a vasodilator. A preliminary study. Review of Alb Leg Med, 2015, 11, 74-83, 査読あり
8. S Furukawa, S Morita, M Hitosugi, L Wingenfeld, K Nishi, Histochemical difference of neurons in Substantia Nigra induces by global brain ischemia/hypoxia, Alb J Med & Helth Sci, 2015, 46, 13-20. <http://ajmhs.umed.edu.al/> 査読あり
9. S Morita, S Furukawa, K Nishi Immunohistochemical evaluation of hypoxia markers in the myocardium. Aust J Forensic Sci 2014 DOI:10.1080/00450618.2014.906653. 査読あり。
10. K Ikemoto, K Nishi, A Nishimura, Lectin-positive deposits (SPD) detected in the molecular layer of Hippocampal dentate gyrus of dementia, Down ' s syndrome, and schizophrenia, Alzheimer ' s Disease & Parkinsinism 2014, 4, doi:10.4172/2161-0460.1000169. 査読あり。
11. Furukawa S, Morita S, Wingenfeld L, Matsuda W, Nakagawa T, Sakaguchi I, Takaya A, Nishi K. Immunohistochemical staining of the brain tissue obtained from a man with multiple focal brain infarctions and different staging. Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology. 2014, 15(1), [http://www.anilaggrawal.com/ij/vol015\\_no\\_001/papers/paper002.html](http://www.anilaggrawal.com/ij/vol015_no_001/papers/paper002.html), 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

1. K Nishi, Mystical expression of HIF1 in the several regions of the brain and the heart muscle obtained from two self-strangulation cases might indicate the existence brain-heart axis. 10<sup>th</sup> International Symposium of Advance in Legal Medicine, 2017, Sep. 12-15 , Dusseldorf, Germany.発表予定
2. Nishi K, Furukawa S, Morita S, Hitosugi M, Eberle L. Expression of RNA binding motif protein 3 (RBM3) in Substantia Nigra might be utilized to distinguish neck compression

- deaths from other deaths. 95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin. 2016; Aug. 30- Sep 3, Hidelberg. Germany.
3. 西 克治, 片岡真弓, 古川智之, 森田沙斗武, 宇野亜加里, 田村佳映, 辻野正樹, 荒木尚美, 一杉正仁, 松本博志. 重量1kg超え心肥大の2解剖例. 第100次日本法医学会学術全国集会. 2016; 6月15～17日、品川区、東京都.
  4. S Furukawa, S Morita, M Hitosugi, L Wingenfeld, K Nishi K. Histochemical findings of neurons in substantia nigra induced by global brain ischemia/hypoxia. 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin. 2015; Sep 12-16, Leipzig, Germany.
  5. 奥長 隼, 森田 沙斗武, 西 克治, 宇野 亜加里, 中川 希子, 古川 智之, 一杉 正仁, 写真画像処理ソフトを用いた、心臓突然死例における小脳顆粒細胞層核密度の組織学的検討, 第51回日本医学写真学会総会、2015年7月4日～5日、高松市、香川県.
  6. 西 克治, 古川智之, 森田沙斗武, 一杉 正仁. 黒質細胞は、頸部圧迫死や縊死の診断に応用出来るか. 第99次日本法医学会学術全国集会. 2015 年6月10日～12日、高知市、高知県.
  7. S Furukawa, S Morita, H Okunaga, L Wingenfeld, K Nishi, Rare forensic pathological findings due to variation of blood vessels in the cranial-cervical legion. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin. 2014; Sep 11-15, Heringsdorf, Germany.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西 克治 (NISHI Katsuji)  
滋賀医科大学・医学部・客員教授  
研究者番号：60073681

### (2)研究分担者

古川 智之 (FURUKAWA Satoshi)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60422888  
森田 沙斗武 (MORITA Satomu)  
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：80721894

### (3)連携研究者

研究者番号：

### (4)研究協力者

坂口 生夫 (SAKAGUCHI Ikuo)  
奥長 隼 (OKUNAGA Hayato)  
中川 季子 (NAKAGAWA Tokiko)