

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670357

研究課題名(和文)オートファジーを新規指標とする皮膚損傷受傷後経過時間判定法の樹立

研究課題名(英文) Detection of autophagy in human skin wounds and its application for wound age determination

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスの背部皮膚に直径4 mmの打ち抜き損傷を作製したところ、オートファゴソーム形成のマーカーであるLC3の発現が受傷前と比べて受傷後1日で有意に減少していた。一方LC3に直接結合してオートファジーにおいて選択的に分解される基質であるp62の発現は、受傷前と比べて受傷後1日で有意に亢進していた。またLC3並びにp62の発現をマクロファージに認めた。以上より皮膚損傷部では治癒過程初期に主にマクロファージにおいてオートファジーが抑制されてマクロファージが活性化し、創傷治癒に重要な役割を担っていることが示され、オートファジーが受傷後経過時間判定における新しい指標となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The dorsal skin of Balb/c wild-type mice were wounded with a diameter of 4 mm biopsy punch. Gene and protein expressions of LC3 were significantly reduced at 1 day after the injury compared with unwounded skin. On the other hand, gene and protein expressions of p62 were significantly increased at 1 day after the injury compared with unwounded skin. Moreover, protein expression of LC3 and p62 were found in F4/80-positive macrophages on the tissue sections. Collectively, macrophages might be activated after injury along with autophagy inhibition, therefore, autophagy detection can be a useful marker for wound age determination.

研究分野：実験病理

キーワード：創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

(1) ギリシャ語で自分を食するという意味のオートファジーは、酵母からヒトに至る真核生物のほとんど全ての細胞に備えられた細胞内大規模分解・リサイクルシステムである。永らく不明であったその分子基盤の解明が近年急速に進むと同時に、予想外の生理機能が次々と発見され、生命科学における最もホットな分野の一つとなっている (Science. 334:1573. 2011; Nature. 469:323. 2011)。実際、2013年の医学・生理学ノーベル賞候補として取り上げられた。

(2) 法医実務において、正確な死因の判定は最重要課題である。特に多数の損傷が存在した場合、いずれの損傷が死因と密接に関与しているのか、また虐待事例においてはいつ頃から虐待が継続しているのかを判定することが求められ、損傷の受傷後経過時間の判定が必須となる。受傷後経過時間判定は、損傷治癒に関与する種々の細胞やそれらから産生される分子を指標として行われてきた。研究代表者らはこれまで、サイトカインが受傷後経過時間判定のための有用な指標となることを明らかにしてきた (J Clin Invest. 122:711. 2012; Int J Legal Med. 126:435. 2012; Forensic Sci Int. 203:93. 2010. etc)。しかしながら法医鑑定においては、単一の指標よりも複数の指標を用いることで、より客観性の高い鑑定結果が得られると考えられる。オートファジーは細胞内外の環境に応じて精密に制御される必要があることから、炎症反応や免疫応答において重要な役割を果たすことが明らかになってきており、損傷治癒にも密接に関係していることが予想される。しかしながら、損傷治癒過程におけるオートファジーの出現様態は明らかにされておらず、また法医診断学の領域でオートファジーを対象とした研究は国内・国外を通じて全く行われていない。本研究は、既存の指標に基づく皮膚損傷の受傷後経過時間判定法をより客観性に富んだものとするため、オートファジーが新しい指標となり得るかを検証する初めての研究である。

2. 研究の目的

本研究は、近年生命科学の分野で大きな注目を集めている細胞内のタンパク分解システム「オートファジー (autophagy)」が、皮膚損傷の受傷後経過時間判定のための指標となり得るかについて検討するものである。法医実務において受傷後経過時間判定は必須であるが、より精度の高い判定を行うには可能な限り多くの客観的指標を用いることが重要である。また、各指標の独立性が高いほどそれらの価値は高まるものと考えられる。法医学の領域でこれまでオートファジーに着目した研究はほとんどみられない。そこで本研究では、既存の指標とは全く異なった視点から、皮膚損傷治癒過程における損傷部局所でのオートフ

ァジー検出にチャレンジしてその出現様態を明らかにし、それが受傷後経過時間判定のための有用な指標となり得るか否かについて検証する。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚損傷モデルは、研究代表者らの研究室ですでに確立している。具体的には、マウスをペントバルビタール (50 mg/kg, 腹腔内投与) により麻酔し、剃毛した背部皮膚に直径 4 mm の打ち抜き損傷を作製した。損傷作製後経時的にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、損傷部組織を採取した。対照試料は損傷を作成していないマウスの正常皮膚より採取した。

(2) 経時的に採取した皮膚損傷部試料の一部を用いて、パラフィン包埋切片を作製した。各切片について、オートファジーの進行に関与する分子である microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), beclin 1, p62/SQSTM1 (p62), cathepsin D, ならびに vacuole membrane protein 1 (VMP1) に対する抗体をそれぞれ用いて、オートファジーを組織レベルで検出した。

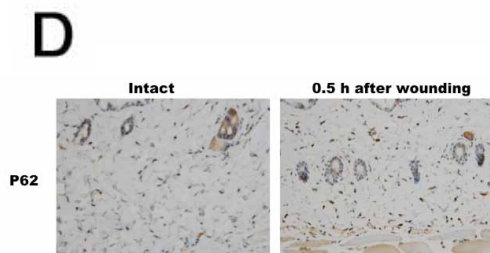
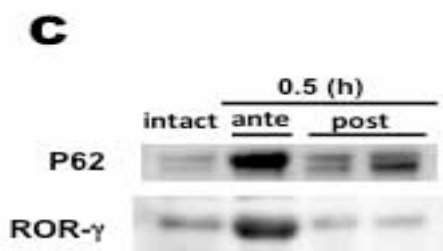
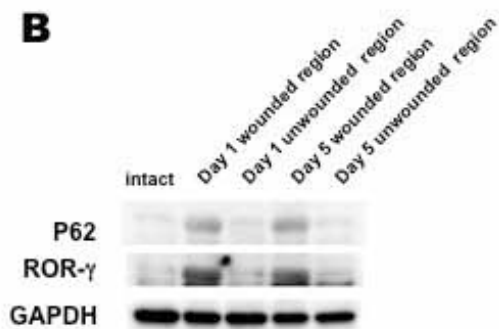
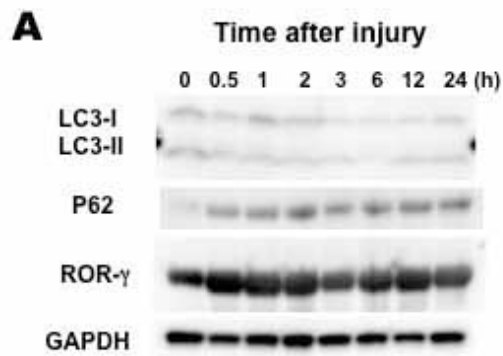
(3) 経時的に採取した皮膚損傷部試料の一部を用いて総タンパクを抽出し、western blotting 法および ELISA 法により LC3, p62, cathepsin D, VMP1 を検出し、損傷治癒過程におけるオートファジーの時間的出現様態を検討した。

(4) 経時的に採取した皮膚損傷部試料の一部を用いて RNA を抽出した。real time RT-PCR 法により LC3 および VMP1 の遺伝子発現を定量解析し、損傷治癒過程とオートファジー出現の関係を検討した。

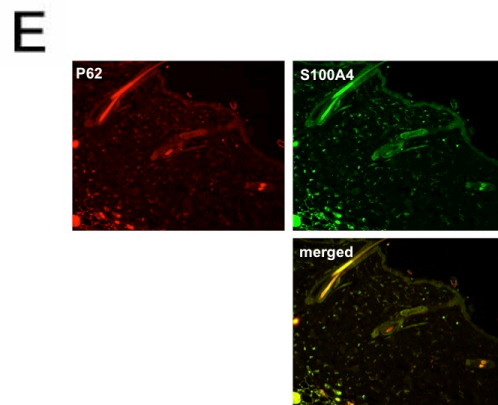
(5) 基礎的研究結果に基づいて皮膚損傷治癒過程におけるオートファジーの時間的・空間的出現様態を解明することにより、法医実務的研究へと発展させるため、法医剖検試料 (ヒト皮膚損傷試料および対照試料) の収集に努めた。

4. 研究成果

(1) 基礎的研究では、マウス皮膚損傷モデルを用いて経時的に損傷部を採取し、治癒過程で出現するオートファジーを生化学的 (図 A, B, C), 免疫組織化学的 (図 D), および分子生物学的に検出してその出現様態を明らかにした。



(2) 皮膚損傷部におけるオートファジーの時間的および空間的出現様態を検討した。Balb/c マウスの背部皮膚に直径 4 mm の打ち抜き損傷を作製したところ、オートファゴソーム形成のマーカである LC3 の遺伝子およびたんぱく質発現が受傷前と比べて、受傷後 1 日で有意に減少していた。一方、LC3 に直接結合してオートファジーにおいて選択的に分解される基質である p62 の発現は、遺伝子およびたんぱく質レベルで受傷前と比べて受傷後 1 日で有意に亢進していた。蛍光二重免疫染色において、LC3, p62, ならびにリソソームのタンパク分解酵素であるカテプシン D のたんぱく質発現を F4/80 陽性マクロファージに認めた (図 E)。以上より、皮膚損傷部では治癒過程初期に主にマクロファージにおいてオートファジーが抑制されてマクロファージが活性化し、創傷治癒に重要な役割を担っていることが示された。したがって、オートファジーは受傷後時間判定における新しい指標となり得る可能性が示唆された。



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)

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 reaction. *Int J Legal Med*. 査読有. 2015 May;129(3):537-41. doi: 10.1007/s00414-015-1168-4.

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*. 査読有. 2015 Sep;129(5):1043-8. doi: 10.1007/s00414-015-1167-5.

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. 査読有. 2015 Sep;129(5):1049-54. doi: 10.1007/s00414-015-1181-7.

〔学会発表〕(計1件)

石田裕子. Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination. 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.

〔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

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

(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：60136611

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

國中 由美 (KUNINAKA, Yumi)

山本 寛記 (YAMAMOTO, Hiroki)