

賀川 慎一郎 論文内容の要旨

主 論 文

The time-course analysis of gene expression during wound healing in mouse skin

(マウス皮膚における損傷治癒過程での遺伝子発現の経時的検討)

賀川慎一郎、松尾綾、八木洋一、池松和哉、津田亮一、中園一郎

Legal Medicine (in press) 2008

Legal Medicine 11 (2009) 70-75

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 (主任指導教員：中園一郎教授)

諸言

損傷の受傷時期の推定は、法医剖検時に認められる損傷が事件発生時に成傷されたか否かを区別する必要があるため、重要な検査事項の1つである。現在、鉄染色による組織学的検査が汎用されているが、推定可能な受傷時期は約1週間以降と限定されている。従って1週間以内の受傷後初期の損傷治癒に関する新規マーカーの開発は必須である。

Cooper らは、新生児マウスを使用し、マイクロアレイ解析による損傷治癒及び炎症に関連する1000個以上の遺伝子の発現動態に変化があることを報告している。

今回我々は、Cooper らが報告した遺伝子のうち、fosB、mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1)、CD14、chemokine (C-C motif) ligand 9 (CCL9)、mast cell protease-5 (MCP-5)、growth arrest specific 5 (Gas5)、beta-2 microglobulin (B2M)、major urinary protein-1 (MUP-1)の8遺伝子及び損傷治癒過程時に発現が報告されているc-fos及びplacenta growth factor (PlGF)について、8週齢マウスにおける損傷治癒時の経時的変化を検討し、損傷皮膚の受傷時期の推定に応用可能か否かを検討した。

対象と方法

8週齢BALB/cマウスを使用し、麻酔下で背部に医療用パンチにより4mmの打ち抜き損傷を作製した。損傷後0分時に皮膚を採取した群をコントロールとして、受傷経過時間を15分から21日まで20群(n=5)に設定した。各時間経過後犠牲死、損傷周辺皮膚を採取した。本研究のプロトコルは、長崎大学動物実験ガイドラインに準拠した。

採取した皮膚片からtotal RNAを抽出し、逆転写反応後、Real-Time PCR法によって各遺伝子発現量の相対定量を行った。内因性リファレンス遺伝子については18S rRNAを設定した。

結果

c-fos、fosB 及び MKP-1 の mRNA 発現量は、受傷後 1 時間以内にピークが認められ、3 時間後対照群レベルまで減少した。CD14 及び CCL9 の mRNA 発現量は、受傷後 12~24 時間でピークに達し、その後減少した。PlGF mRNA は、受傷後 2 日及び 4 日後においてピークに達し、MCP-5 の mRNA 発現量は、受傷後 5 日後にピークが観察された。また Gas5、B2M、MUP-1 の mRNA は、損傷治癒過程において有意な変化は認められなかった。

考察

c-fos 及び fosB は、Immediately early genes (IEGs) であり、これらの mRNA は受傷後 1 時間以内に増加した。この経時的変化は、IEGs が刺激後即時に発現することと一致している。

MKP-1 は、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路の抑制因子として機能し、この mRNA は fos 遺伝子群と同様に早期に発現が認められた。この発現は損傷により活性化された MAP キナーゼ経路を制御しているものと考えられた。

CD14 は、単球やマクロファージなどの膜表面に発現する糖タンパク質であり、CD14 mRNA は受傷後 12~24 時間に発現のピークが認められた。

CCL9 は、ケモカインの一種であり、その受容体は単球や T 細胞に存在している。CCL9 mRNA の経時的変化は CD14 に類似しており、これらの発現は単球、マクロファージの炎症性遊走に関連していると考えられた。

PlGF は、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) ファミリーに属し、損傷治癒過程での発現が報告され、本実験においても 2 日及び 4 日後に発現のピークが確認された。

MCP-5 は、マスト細胞から分泌されるキナーゼであり、血管新生への関与を示唆されており、MCP-5 mRNA は受傷後 5 日後でピークが認められた。PlGF 及び MCP-5 の発現は、損傷治癒過程における血管新生の開始時期と相関していると考えられた。

Gas5、B2M、MUP-1 の mRNA は、有意な変化は確認されず、受傷時期推定のためのマーカーとして利用できる可能性は低いと判断された。

本結果より、損傷皮膚における各遺伝子の発現ピークの時期は異なっていた。c-fos、fosB、MKP-1 の mRNA は受傷後極早期に、CD14、CCL9 の mRNA は受傷後 12~24 時間、MCP-5、PlGF の mRNA は、3 日から 5 日後に、それぞれ発現のピークが観察された。

従って、これらの 7 種類の遺伝子発現量を比較することにより、受傷後初期の正確な時期推定が可能であることが示唆された。