

(第7号様式)

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	中林 ゆき
審査委員	主査 増本 純也 副査 田中 潤也 副査 渡邊 英昭 副査 伊賀 淳一 副査 日野 聡史

論文名 新規死後経過時間推定方法：サポシンDの増加と海馬ニューロンの変化  
審査結果の要旨 (2,000字以内)

### 【背景と目的】

死体検案および法医解剖において、死後経過時間を推定することは、正確な死因究明はもちろんのこと、事件性のある症例に関して、法廷で決定的な証拠として求められる可能性があるため極めて重要である。死後経過時間(postmortem interval:PMI)の推定のために、これまで様々な死後変化が利用されてきた。例えば、死後早期では、冷却、硬直、死斑、超生体反応の程度などが利用されている。また、後期では、節足動物の活動などによる物理的な変化、腐敗や融解などの生理的变化の程度が利用されている。しかしながら、いずれの方法でも、死体の状況や置かれた環境などによって、変化の程度が影響されるため、PMIの正確な推定にとって十分ではない。そこで、本研究では、PMIを正確に推定するための客観的で普遍的な新規の方法を開発することを目的とした。

### 【方法】

申請者は、死後、分解により増加するプロサポシンの分解産物であるサポシンA/B/C/Dというタンパク質に着目した。プロサポシンは約66kDaの糖タンパク質で、分解産物であるサポシンA/B/C/Dは神経栄養因子としても機能する。また、脳の組織学的変化についても着目した。実験には、生後8週目の雄Wisterラットを使用した。各ラットを二酸化炭素吸入により安楽死させ、摂氏21度に設定した恒温庫に保存した。それぞれ死後0、3、6、12時間、1、2、3、5、7日後に解剖し、組織を採取した。ラットの脳をホモジナイズし、遠心分離で得られ

た上清を抗プロサポシン抗体、抗サポシンD抗体、抗 GAPDH 抗体、および細胞骨格を形成するタンパク質である  $\alpha$ -tubulin と  $\beta$ -catenin に対する抗体でウェスタンブロット解析を行った。各ラットの脳の残り半分のうち、抗 MAP2 抗体、抗プロサポシン抗体を用いた免疫組織学的手法により海馬 CA1 領域での錐体細胞のプロサポシンの発現を解析した。

#### 【結果】

脳のリホジナイズ検体を用いたウェスタンブロット解析で、プロサポシンと  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -catenin、GAPDH は、死後、経時的に減少したのに対し、サポシンDは、経時的に増加した。海馬の CA1 領域の組織では、錐体細胞、先端樹状突起、基底樹状突起に組織学的な変化が出現した。死後 6 時間後で基底樹状突起の減少が出現し、12 時間後には先端樹状突起の萎縮がみられた。その後も徐々に各樹状突起の萎縮が進行し、錐体細胞は 5 日前後で崩壊した。プロサポシンは通常組織全体に発現しているが、死後 2-3 日後には核内に移行しているようにみえた。

#### 【結論】

海馬での形態学的死後変化と同調して、プロサポシンは死後経時的に減少し、その分解産物であるサポシンDが増加するという結果が得られた。サポシンDの特異的抗体が利用可能であるため、簡便に PMI の推定ができる可能性が示された。将来的に検体数を増やし、信頼できる死後変化のデータを蓄積できれば、ヒト検体を用いた新規の PMI 推定方法の開発ができる。

本論文に対する公開審査会は令和 2 年 12 月 25 日に開催された。申請者から研究内容が英語で口頭発表された後に、審査委員から本研究に関連する以下の質問がなされた。

- 1) プロサポシンがサポシン A/B/C/D になるメカニズムとそれらの機能について。
- 2) 組織のリホジナイズにおける界面活性剤の添加の効果について。
- 3) プロサポシンをサポシンDに切断する酵素について。
- 4) ウェスタンブロットに使用したゲルでのサポシンD以外の変化について。
- 5) プロサポシンとサポシンDの比率について。
- 6) サポシンDが検出できなくなる時期以降の PMI の推定について。
- 7) リホジナイザーの使用法によるサポシンDの分画とデータの解釈について。
- 8) 死後の脳の取り扱いとデータの解釈について。
- 9) 死後サポシンDが細胞の核に移行する理由について。
- 10) 一例のラット脳組織での観察が一般化できるかどうかについて。
- 11) 海馬 CA1 領域に生前に存在するプロサポシンとサポシン A/B/C/D の量について。
- 12) サポシンDによる PMI の推定が可能な時間について。
- 13) 死後のタンパク質の変化から特にサポシンDに着目した理由について。
- 14) サポシンDが核に移行するとき、核膜が存在しているのかどうかについて。
- 15) 死後の錐体細胞の細胞死の種類について。

これらに対して申請者は、質問の意図を十分に理解した上で、詳細かつ明解に回答した。本論文は、サポシンDが死後増加することを初めて明らかにし、死後時間を推定する指標となるタンパク質候補として重要な知見を含んでおり、今後の研究の発展が期待される。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。