

令和元年6月19日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10903

研究課題名（和文）質量分析による軟骨基質構成分子網羅的解析の変性疾患、再生医学への応用

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of cartilage matrix with mass spectrometry for possible application to degenerative disease or regenerative medicine.

研究代表者

土屋 美加子 (Tsuchiya, Mikako)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：90188582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：質量分析計を用いて、軟骨の構成成分であるコラーゲン、グリコサミノグリカン、黄色靭帯に多く存在するエラスチンの量の変動を調べる方法を確立しました。また、解析するための前処理として熱に安定な酵素を使って70度という高い温度で硬い軟骨を完全に溶かす方法を開発しました。これらの方法を使って肥厚黄色靭帯の構成成分の解析を行うことができます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨組織は細胞がほとんどなく、コラーゲンとグリコサミノグリカンと呼ばれる負に帯電した糖質の重合体を多く含んでいますが、解析が困難でした。今回質量分析を用いて定量的にこれらの構成成分を特異的に解析できる方法を確立しました。また黄色靭帯に多く存在するエラスチンというタンパク質の解析も可能です。脊柱管狭窄症という疾患の原因となる黄色靭帯の肥厚には軟骨化生が起こるため、この方法が肥厚黄色靭帯の解析に有用であると考えられます。

研究成果の概要（英文）：For comprehensive analyses of glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, keratan sulfate, heparan sulfate and hyaluronate, and specific crosslinks of collagen and elastin, pyridinolines and desmosines, respectively, optimized conditions were determined for mass spectrometric quantification. Together, complete solubilization of connective tissues such as cartilage and tendon were achieved with heat-stable protease thermolysin. These procedures will be useful to examine the quantitative change of collagen and glycosaminoglycan as well as elastin, major components of extracellular matrix-rich tissues during the development of degenerative diseases.

研究分野：生化学

キーワード：グリコサミノグリカン コラーゲン エラスチン 架橋 関節軟骨 黄色靭帯 ピリジノリン デスモシン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成人関節軟骨の主体は2型コラーゲンとコンドロイチン硫酸などのGAGからなる細胞外基質である。関節軟骨の滑らかな表面と負荷に耐える粘弾性は、アグリカンに結合したコンドロイチン硫酸鎖の酸性基が2型コラーゲンの架橋による網状構造の中で水を保持することによって形成される。これらの軟骨基質構成分子が炎症や変性で破壊されることで容易に軟骨機能は失われる。一方軟骨の再生については再生能を有する細胞の希少性に加え、細胞によってこれらの基質構成分子が適切な時期に適切な割合で新たに産生される必要があるのみならず細胞外において有機的に配列結合して組織を形成することが不可欠であるため、損傷後の軟骨再生を困難にしている。

関節軟骨のMRIや組織切片を用いた形態学的観察や生体力学的手段による機能解析等では医学領域でも最先端の研究がおこなわれており、また軟骨細胞の遺伝子発現解析等により軟骨分化関連のシグナル分子の変化は詳しく調べられ再生医学への応用が進んでいる。しかしながらこれらの研究では関節軟骨の機能的特性に直接反映される軟骨基質構成分子の詳細な変化をとらえることは不可能で生化学的解析が待たれている。

軟骨基質の生化学的解析は、変性疾患の病態生理や軟骨修復の過程を理解する上で必須である。例えば変形性関節症(OA)発症には、マトリックスメタロプロテアーゼによるコラーゲンの分解が関与することが示唆されているが、もう一つの構成成分であるコンドロイチン硫酸については、減少が明らかになっているものの、減少しているのはコンドロイチン硫酸ポリマー鎖の本数なのか、鎖長なのか、硫酸基による修飾なのか、さらには減少がコラーゲン分解と同時に起こるのか、先なのか後なのかは明らかにされていない。従ってその発症機序は不明のままである。また腰部脊椎管狭窄症(LSS)における黄色靭帯肥厚に見られる軟骨化生の構成分子の詳細は不明である。さらに関節軟骨の成熟による機能的特性の発揮には、GAGの水を引き寄せる能力すなわち硫酸基の数と位置、コラーゲンの割合、コラーゲン架橋の程度が重要な働きをしているはずであるがこれらに関する情報は皆無である。軟骨の硬度とGAGおよび架橋の複雑な構造が、軟骨の完全可溶化、網羅的解析による構成分子の正確な同定と定量を阻み、軟骨基質の生化学的解析を遅らせてきた。

### 代表研究者の研究開始当初までの成果

プロテオミクスやメタボロミクスなど生体分子網羅的解析の主流は質量分析であり、科研費(平成25~27年度、基盤研究(C)、「GAGomics グリコサミノグリカンの網羅的解析の軟骨、靭帯、腱への応用」)を得て、世界に先駆けて液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)によるGAGの網羅的解析法(GAGomics)を、確立し、雑誌論文の成果につながる軟骨の発達やムコ多糖症など他の研究領域との共同研究を行うなど発表直後から国内外で高い評価を受けていた。すでに研究開始当初までに膝関節軟骨、黄色靭帯のGAGomicsを連携研究者内尾、桑田、河野の協力のもとに行い、黄色靭帯については予備的結果を発表する(学会発表および)段階にあり、GAGomicsの整形外科領域への応用を推進していた。

### 2. 研究の目的

#### (1) 何をどこまで明らかにしようとするのか

LC/MS/MSにより新たに細胞外基質のコラーゲンの架橋状態を評価する条件を確立し、この方法とGAGomicsで、ヒトOA患者の膝関節軟骨、LSS患者の肥厚黄色靭帯、およびウサギ修復軟骨のGAG、コラーゲン架橋を正確に同定し定量的に測定することが目的である。

#### (2) 予想された効果と意義、独創性

OA患者の膝関節軟骨、LSS患者の肥厚黄色靭帯、修復軟骨の生化学的詳細が明らかになれば、

OAではコラーゲンに対するコンドロイチン硫酸の減少、鎖長の減少が認められれば脱硫酸化酵素やガラクトサミニダーゼなどコンドロイチン硫酸分解に関わる酵素の関与が示唆され、新たな治療標的となる。

LSSで増加しているGAGが明らかになれば、これを分解する酵素による治療の可能性もある。コラーゲン架橋は既に腱の機能評価に用いられているが、今回関節軟骨でGAGomicsとコラーゲン架橋の両者を同時に測定することによって得られるデータは修復軟骨の成熟度評価の指標となる可能性がある。

生化学的解析を整形外科領域に応用し軟骨基質分子の変化を明らかにすることにより、従来不明であった疾患の病態生理の解明や再生医学を含めた新しい治療法の開発につながる事が期待される独創性の高い有望なTranslational Researchである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究計画

1年目:すでに開始していたOA患者の膝関節軟骨、LSS患者の肥厚黄色靭帯のGAGomicsを続ける一方で、コラーゲンの架橋部から生ずるピリジノリンとその誘導体、エラスチンの架橋部から得られるデスモシンとその誘導体を質量分析で定量する架橋解析の方法を確立した。

2年目以降： OA 患者の膝関節軟骨、 LSS 患者の黄色靭帯の GAGomics と共に架橋解析を行った。 ウサギ修復軟骨については試料調整に手間取り、解析中である。

## (2) 研究方法

### A. 解析対象組織の採取

#### ヒト膝関節軟骨

OA 患者で関節置換術のため切除された膝関節軟骨を肉眼的に健常部、変性部にわけ、ニードルによって直径 2mm の軟骨円柱を得て、その表面からの距離によって、表層、深層に分ける。

#### ヒト黄色靭帯

LSS 患者の肥厚黄色靭帯を垂直及び水平方向それぞれを 3 つに区分し、9 点からニードルによって検体を得る。

### B. 組織検体の処理

検体は凍結乾燥前後で秤量して水分含量と乾燥重量を得た後、70℃ 加熱下にサーモリンでコラーゲンを切断して完全可溶化し、C. GAGomics と D. 架橋解析に供する。

### C. GAGomics

可溶化サンプルにエタノールを加えて GAG を沈殿させ遠心にて回収する。

GAG 二糖化：コンドロイチナーゼ ABC、ヘパリチナーゼ、ケラタナーゼ、ヒアルロニダーゼを加えて、GAG を二糖単位に分解する。

LC-MS/MS にて二糖単位の種類、硫酸基の数と位置の違いにより 23 種を区別する GAG 解析が可能である。さらに GAG 鎖長推定もできる。

### D. 架橋解析

可溶化サンプルを 9M 塩酸で加熱処理する。

コラーゲンのヒドロキシプロリンに加え、コラーゲンの架橋に由来するヒドロキシピリジノリン、ピリジノリンと、エラスチンの架橋に由来するデスマシン、イソデスマシンを LC-MS/MS で同時に定量する条件を確立する。

## 4. 研究成果

H28: OA 患者の膝関節軟骨及び LSS 患者の肥厚黄色靭帯からのグリコサミノグリカンの網羅的解析 (GAGomics) を行う上でその再現性を高めるための組織可溶化法の検討を行い、従来法より高温で可溶化を行うことが有用である結果を得て学会発表した (学会発表)。またヒト腰部黄色靭帯のグリコサミノグリカン組成の解析に質量分析法が有用であること、及びその組成が特徴的であることをも報告している (学会発表)。これらの結果は、OA や LSS に限らず、他の軟骨組織の疾患や軟骨化生におけるグリコサミノグリカンの変化を解析する上で有用な手段となることが予想される。さらにコラーゲンの架橋部から生ずるピリジノリンとその誘導体、エラスチンの架橋部から得られるデスマシンとその誘導体を質量分析で定量する架橋解析の方法をこれらの標準品を用いて行った。コラーゲンは末端部で架橋を作ることで互いに結合してグリコサミノグリカンを緊縛していることから、架橋の状態を調べることが軟骨機能の分子レベルでの評価法の一つとしての有用性の有無を検討することの端緒についたと言える。

H29: 前年度確立したコラーゲンの架橋部から生ずるピリジノリンとその誘導体、エラスチンの架橋部から得られるデスマシンとその誘導体を質量分析で定量する架橋解析法を、軟骨、血管、皮膚などコラーゲンとエラスチンが異なった割合で含まれる生体組織の解析に適用し、従来報告されているコラーゲン、エラスチンの含量に見合った結果を得たことで、この方法が生体組織の解析に応用できることを示した (学会発表)。またこの方法をラット関節軟骨に応用して発生過程におけるコラーゲン架橋の変化を明らかにした (学会発表)。さらにこの方法を肥厚黄色靭帯の解析への応用も検討した。またこのような解析を行うための熱安定性プロテアーゼを用いた生体組織の完全可溶化法を論文として発表した (雑誌論文)。

H30: 前年度までに確立した、質量分析による GAG の定量、コラーゲン、エラスチンのクロスリンクの定量、組織のサーモリンによる高温での可溶化法の 3 つを組み合わせる LSS 患者の肥厚黄色靭帯の解析を試みた。黄色靭帯はエラスチンを大量に含む組織であるがコラーゲンも存在しており、肥厚においては軟骨化生が起こることが知られているがその定量的解析は行われていない。従来コラーゲンの定量に用いられてきた水酸化プロリンはエラスチンにも存在するため、黄色靭帯の解析においてはコラーゲン量の増減を適切に反映していない可能性がある。そこでコラーゲン、エラスチンのそれぞれに特異的なクロスリンクを測定して、水酸化プロリンとの相関を検討したところエラスチンでなく、コラーゲンに特異的なクロスリンクと正の相関を示すことが明らかになった。このことから過去の論文で用いられている水酸化プロリンの定量はコラーゲン量の変化を反映していると考えてよいが、より特異性の高いクロスリンクをそれぞれのタンパク質の指標として用いることで曖昧さを回避する方法として推奨できる。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 4 件)

Osago H, Kobayashi-Miura M, Hamasaki Y, Hara N, Hiyoshi M, Tsuchiya M, Complete solubilization of cartilage using the heat-stable protease thermolysin for comprehensive GAG analysis, *Analytical Biochemistry*, 査読有、2018、548 巻、115-118  
doi: 10.1016/j.ab.2018.02.028

Kobayashi-Miura M, Osago H, Hiyoshi M, Hamasaki Y, Hara N, Tsuchiya M, Quantitative analyses of rat articular cartilage matrix during the maturation., mechanisms of development, 査読有、2017、S131

Kubaski F, Osago H, Mason RW, Yamaguchi S, Kobayashi H, Tsuchiya M, Orii T, Tomatsu S., Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry., *Mol Genet Metab*, 査読有、2017、120 巻、67-77  
doi: 10.1016/j.ymgme.2016.09.005

Kobayashi-Miura M, Miura T, Osago H, Yamaguchi Y, Aoyama T, Tanabe T, Matsumoto K, Fujita Y, Rat articular cartilages change their tissue and protein compositions during perinatal period., *Anatomia, Histologia, Embryologi*, 査読有、45 巻、2016、9-18  
doi: 10.1111/ahe.12165.

### [学会発表](計 11 件)

長子、コラーゲンの生理的及び病的架橋の LC-MS/MS による同時解析、第 41 回生理学技術研究会・第 30 回生物学技術研究会、2019

三浦、長子、土屋、他、新生仔から成獣におけるラット膝関節の大腿骨および脛骨関節軟骨のマトリックス構成成分の比較、第 91 回日本生化学大会、2018

長子、土屋、他、関節軟骨におけるグリコサミノグリカン組成、第 91 回日本生化学大会、2018

三浦、長子、土屋、他、ラット関節軟骨組織の成熟過程における GAG とコラーゲンの定量的解析、第 90 回日本生化学大会、2017

長子、土屋、他、ラット関節軟骨組織の成熟過程におけるコラーゲンクロスリンクと GAG 組成の変化、第 90 回日本生化学大会、2017

長子、土屋、他、LC/MS/MS によるコラーゲンとエラスチンの分析、第 42 回日本医用マスペクトル学会年会、2017

Kobayashi-Miura M, Osago H, Tsuchiya M 他、Quantitative analyses of rat articular cartilage matrix during the maturation., 18th International Congress of Developmental Biology, 2017

Kobayashi-Miura M, Osago H, Tsuchiya M 他、The characterization of matrix contents in the articular cartilage of the knee at the perinatal rats., 第 89 回日本生化学大会、2016

長子、土屋、他、定量的オミクス解析のための結合組織の完全可溶化の試み、第 89 回日本生化学大会、2016

河野、長子、土屋、内尾、他、質量分析によるヒト腰椎黄色靭帯のグリコサミノグリカン解析、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016

長子、河野、内尾、土屋、他、ヒト腰部黄色靭帯におけるグリコサミノグリカンの解析、第 41 回日本医用マスペクトル学会年会、2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：長子 晴美

ローマ字氏名：(OSAGO, Harumi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。