

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09600

研究課題名（和文）グリコサミノグリカン分解による黄色靭帯の肥厚軽減のための基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental study of glycosaminoglycan degradation to reduce thickening of the yellow ligament

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） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：量分析法と熱安定タンパク質分解酵素による組織完全可溶化法を用いて、腰部脊椎管狭窄症患者的肥厚黄色靭帯の生化学的解析を行った。グリコサミノグリカン、コラーゲン、エラスチンを定量し、正常の黄色靭帯と比較した。グリコサミノグリカンのうち、コンドロイチン硫酸の一硫酸体とケラタン硫酸が増加していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥厚黄色靭帯で増加している構成成分がグリコサミノグリカンのうち、コンドロイチン硫酸の一硫酸体とケラタン硫酸であることが明らかになったことで、これらの分子が脊椎管狭窄症の治療標的をなり得ることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Biochemical analysis of the thickened yellow ligament of patients with lumbar spinal canal stenosis were performed using mass spectrometry and complete solubilization of the tissue with heat-stable proteolytic enzymes. Glycosaminoglycans, collagen, and elastin were quantified and compared to normal yellow ligament. Among glycosaminoglycans, the monosulfate of chondroitin sulfate and keratan sulfate were found to be increased.

研究分野：生化学

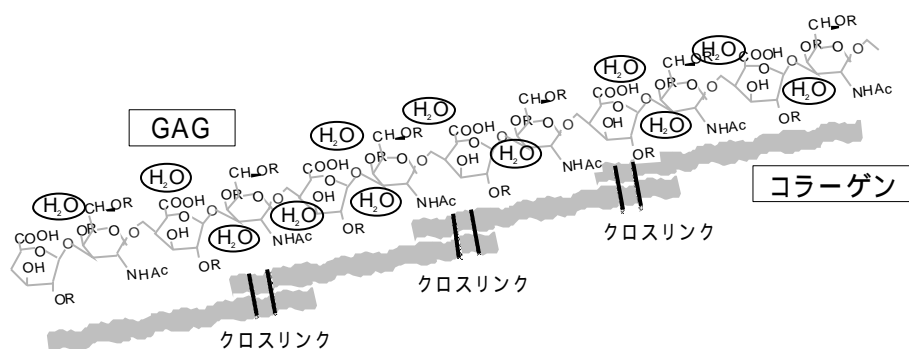
キーワード：腰部脊椎管狭窄症 黄色靭帯 グリコサミノグリカン コンドロイチン硫酸 ケラタン硫酸

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

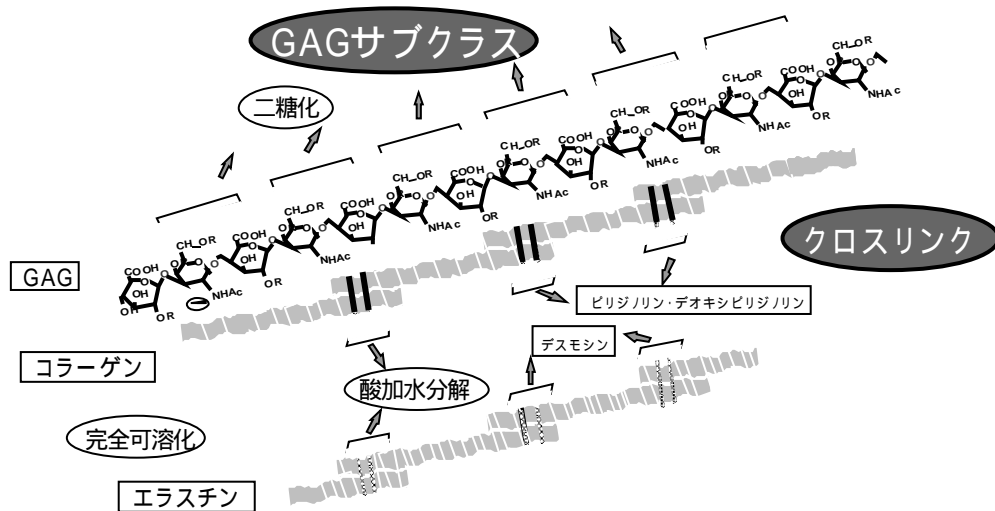
1. 研究開始当初の背景

椎間板ヘルニアや肥厚黄色靭帯は神経を圧迫して疼痛や痺れを引き起こすため、外科的切除が行われている。近年、椎間板では GAG を分解する酵素を椎間板内に注入する治療法が可能になっている。この方法を黄色靭帯肥厚に用いることが可能であれば患者への侵襲を軽減することができる。椎間板は硝子軟骨の一種であり構成成分として GAG サブクラスのコンドロイチン硫酸を多く含むので、治療にはコンドロイチン硫酸を分解する酵素コンドロイチナーゼが用いられる。しかしながら黄色靭帯の肥厚部では軟骨化生が起きていることやトルイジンブルー染色陽性の GAG 様物質が存在することが報告されていることから GAG の存在が推測されるものの、実際に GAG が正常の黄色靭帯と比較して増加しているのか、そのサブクラスはコンドロイチン硫酸であるのか、軟骨でよく見られる他の GAG は存在するのか、さらには、増加量はどの程度なのか、また肥厚のある患者すべてに GAG が増加しているのかなど、GAG を標的とした分解酵素による治療法の開発に着手するに際して明らかにされるべき点が多くある。



2. 研究の目的

腰部脊椎管狭窄症の原因となる黄色靭帯肥厚では、コラーゲンのみならずグリコサミノグリカン(GAG)も増加している可能性がある。GAG は関節軟骨ではその陰性電荷によって水分子を保持して体積を増加させ関節にかかる衝撃を和らげている。軟骨化生の起こった黄色靭帯で GAG による体積の増加が脊椎管の狭窄に寄与しているとすれば、GAG を標的として GAG 分解酵素によって肥厚を軽減するという脊椎管狭窄症の新規治療法を開発できる。しかし実際に肥厚黄色靭帯で GAG が増えているか否かの生化学的検討は行われていない。申請者はタンデム質量分析計を用いた GAG の網羅的定量解析法と熱安定性タンパク質分解酵素サーモリシンを用いた結合組織の完全可溶化法を組み合わせることで肥厚黄色靭帯の生化学的成分析を行うことで新規治療法の実現可能性を明らかにすることを目的とする。



3. 研究の方法

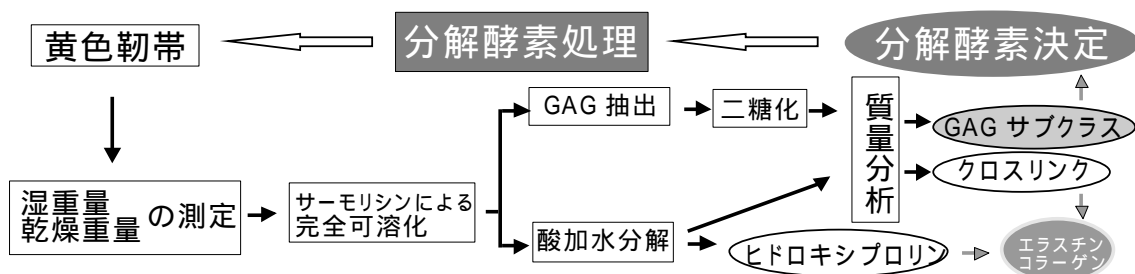
(1) GAG、コラーゲン、エラスチンの定量

脊柱管狭窄症の患者から切除された腰部黄色靭帯からパンチによって4.5 mm 径の円型標品を作成する。部位を頭部、中央部、尾部の3つに分ける。標品の湿重量を測定した後凍結乾燥し、再度秤量する。凍結乾燥前後の重量の差を含水量とする。

凍結乾燥標品を耐熱性タンパク質分解酵素サーモリシンを用いて70度で消化する。可溶化液からエタノール沈殿によってGAGを分離し、呈色反応によってGAG総量を定量する。さらに可溶化液を塩酸加水分解してコラーゲンエラスチンに含まれる水酸化プロリンを呈色反応で、コラーゲンに特徴的なクロスリンク構造であるピリジノリンとデオキシピリジノリン、エラスチンに特異的なクロスリンク構造であるデスモシンを質量分析で定量する。黄色靭帯に多く含まれるエラスチンでGAG、コラーゲンを標準化する。

(2) 二糖解析によるGAGのサブクラスの同定

可溶化液から得られたGAGをGAG分解酵素によって二糖化し、質量分析によってそのサブクラスを同定するとともに定量を行う。



4 . 研究成果

腰部脊椎を繋ぐ黄色靭帯の肥厚によって起こる脊椎管狭窄症の新規治療法開発を目的として、組織学的変化としての軟骨化生が顕著な肥厚黄色靭帯において、実際に生化学的にも軟骨組織様のグリコサミノグリカンのサブタイプが増加していることを明らかにするため、肥厚部位のより詳細な生化学的解析、比較対照となる正常靭帯のさらなる成分解析と、統計解析をおこなった。その結果、肥厚部位ではコンドロイチン硫酸の一硫酸体、ケラタン硫酸の増加が示された。この変化は、肥厚黄色靭帯で組織学的に観察される軟骨化生の所見と一致している。また肥厚黄色靭帯において、これらのグリコサミノグリカンサブタイプが治療の生化学的標的となり得ることを示唆する結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hara N, Osago H, Hiyoshi M, Kobayashi-Miura M, Tsuchiya M.	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Quantitative analysis of the effects of nicotinamide phosphoribosyltransferase induction on the rates of NAD+ synthesis and breakdown in mammalian cells using stable isotope-labeling combined with mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0214000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野通快、長子晴美、土屋美加子、真子卓也、内尾祐司
2. 発表標題 ヒト腰椎変性黄色靭帯における質量分析によるグリコサミノグリカンの二糖解析
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長子 晴美, 河野 通快, 三浦 美樹子, 宮地 葵, 原 伸正, 日吉 峰麗, 内尾 祐司, 土屋 美加子
2. 発表標題 ヒト肥厚黄色靭帯グリコサミノグリカン(GAG)の二糖解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 伸正, 中村 健志, 長子 晴美, 日吉 峰麗, 三浦 美樹子, 土屋 美加子
2. 発表標題 Global acetylation levels of histone H4 lysine 16 and H3 lysine 9 may not represent cellular SIRT1 activity
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野通快、長子晴美、土屋美加子、内尾祐司
2. 発表標題 変性したヒト腰椎黄色靭帯における グリコサミノグリカンの分布
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長子晴美・河野通快・三浦美樹子・原伸正・日吉峰麗・内尾祐司・土屋美加子
2. 発表標題 肥厚黄色靭帯の局所的なコラーゲンとグリコサミノグリカン(GAG)量の変化
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原伸正・長子晴美・日吉峰麗・三浦美樹子・土屋美加子
2. 発表標題 NAD+分解におけるSARM1の関与について
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 美樹子、長子 晴美、日吉 峰麗、原 伸正、土屋 美加子
2. 発表標題 ラット関節内の凸側と凹側の関節軟骨のグリコサミノグリカン (GAG) 量の加齢に伴う減少
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 美樹子、長子 晴美、日吉 峰麗、原 伸正、土屋 美加子
2. 発表標題 ラット硝子軟骨の各関節部位によるコラーゲンとグリコサミノグリカン量の比較と加齢に伴う変化
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日吉 峰麗 , 長子 晴美 , 三浦 美樹子 , 原 伸正 , 土屋 美加子
2. 発表標題 四塩化炭素障害ラット肝内で検出されたD - ドーパクロムトートメラゼ上の修飾
3. 学会等名 第45回日本医用マスメクトル学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長子晴美・河野通快・三浦美樹子・原伸正・日吉峰麗・内尾祐司・土屋美加子
2. 発表標題 黄色靭帯肥厚によるタンパク組成変化
3. 学会等名 第44回日本医用マスメクトル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長子晴美・三浦美樹子・河野道快・原伸正・日吉峰麗・土屋美加子
2. 発表標題 ラット組織におけるコラーゲン、エラスチンのクロスリンク組成の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦美樹子・長子晴美・高野育子・日吉峰麗・原伸正・土屋美加子
2. 発表標題 ラット雌雄間における膝関節大腿骨の関節軟骨のマトリックス成分の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原伸正・長子晴美・日吉峰麗・三浦美樹子・土屋美加子
2. 発表標題 哺乳動物初代培養細胞におけるNAD+代謝の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長子 晴美 (Osago Harumi)	島根大学・医学部・技術専門職員 (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------