

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659727

研究課題名(和文) 結合組織マトリックスタンパクの質量解析の確立

研究課題名(英文) Proteomic analysis of extracellular matrix proteins

研究代表者

佐藤 紀 (SATO, Nori)

徳島大学・大学病院・医員

研究者番号：00448333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：腱と靭帯などの結合組織のマトリックスは巨大分子の集合であるため、不溶性である。そのため、従来のタンパク解析方法では、組織が完全に可溶化されておらず、成分解析を十分に行うことが出来なかった。本研究では、腱と靭帯の完全可溶化に初めて成功し、質量解析法にて、構成タンパク質の同定を行うことができた。本研究方法の確立により、腱・靭帯以外の様々な結合組織(骨・軟骨・血管・皮膚等)の質量解析にも応用が期待でき、結合組織に生じる様々な疾患の病態解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tendons and ligaments are mostly composed of extracellular matrix. These tissues are insoluble, and any study in whole proteomic analysis of them has not yet been reported. We succeeded in complete solubilization of human Achilles tendon and yellow ligament for HPLC-ESI-MS/MS. Our method will be applicable to investigation on protein composition of other extracellular matrix such as bone, cartilage, vessel, skin and so on, and it will be helpful to reveal the pathophysiology of pathological them.

研究分野：整形外科学

キーワード：細胞外マトリックス コラーゲン エラスチン 質量解析 不溶性 電子顕微鏡 腰部脊柱管狭窄症

### 1. 研究開始当初の背景

腱と靭帯などの結合組織のマトリックスは巨大分子の集合であるため、不溶性である。そのため、従来のタンパク解析方法では、組織が完全に可溶化されておらず、成分解析を十分に行うことが出来なかった。

腱と靭帯などの結合組織には様々な疾患が起こり得る。黄色靭帯が肥厚することにより生じる腰部脊柱管狭窄症もその一つであるが、組織の不溶性により、これまでは十分な成分解析を行うことは出来ず病態把握を行うことは困難であった。研究代表者は、結合組織疾患の病態把握にはマトリックスタンパクそのものの解析を行う必要があると考え、本研究の着想を得た。

### 2. 研究の目的

今まで不可能と言われていた結合組織マトリックスタンパクの質量解析を確立することである。

腱と靭帯など結合組織のマトリックスは巨大分子の集まりで不溶性であり、従来のタンパク解析方法では成分解析すら満足に行うことが出来なかった。結合組織疾患の病態を把握するには、マトリックスタンパクそのものの解析を行う必要があるが、未だ成されておらず、そのため、結合組織に生じる疾患の多くでは、病態が解明されていない。

本研究では、今まで誰も成し得なかった結合組織マトリックスタンパクの完全可溶化に挑み、ペプチドから親分子であるタンパク質を同定する方法を確立し、結合組織に生じる疾患の病態把握に応用することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト腱・靭帯の可溶化と質量解析

方法確立のため、ヒトの腱と靭帯に焦点を絞って研究を行った。腱はアキレス腱を、靭帯は黄色靭帯を用いた。ともに、手術時に得られたものであり、検体採取に当たっては、当大学病院臨床研究倫理審査委員会で承認を受け、インフォームド・コンセントを得た上で組織採取を行っている。アキレス腱は下肢近位腫瘍のため切断術を要した下肢より採取（アキレス腱には腫瘍は及んでいないもの）、黄色靭帯は腰部脊柱管狭窄のため手術で切除したものを採取した。

アキレス腱・黄色靭帯を十分に洗浄し、血液除去した。洗浄したアキレス腱・黄色靭帯をそれぞれ薄切した後、臭化シアン (CNBr) および複数のタンパク分解酵素（トリプシンやエラスターゼ等）を連続的に用いることにより、マトリックス成分を低分子化し、腱（ヒトアキレス腱）と靭帯（ヒト黄色靭帯）の可

溶化に初めて成功した（図1）。

可溶化したサンプル（アキレス腱と黄色靭帯）を、当大学疾患酵素学研究中心の疾患プロテオミクス研究部門の協力を得て、液体クロマトグラフィー/質量解析法（Liquid Chromatography/Mass Spectrometry）にて、質量解析を行った。可溶化して得られたペプチド混合物の分子量を既知のデータベースで検索し、アキレス腱・黄色靭帯の構成タンパク質の同定を行った。

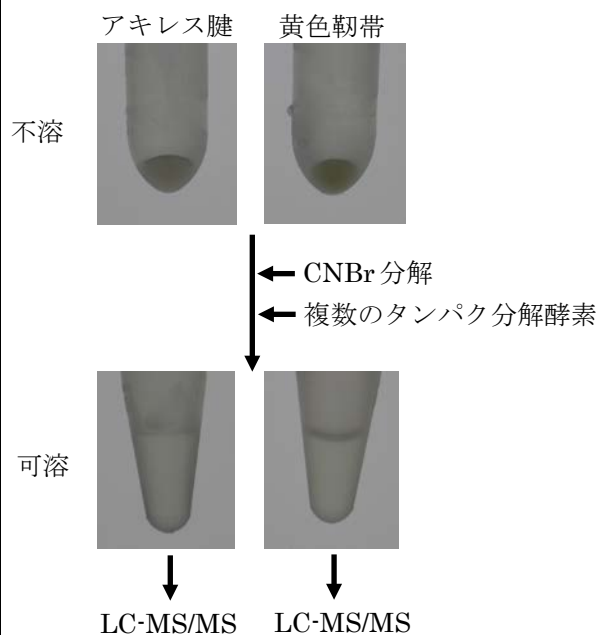


図1. ヒトアキレス腱・黄色靭帯の可溶化法

#### (2) 腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯の組織学的検討

##### ① 光学顕微鏡での観察

腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯を光学顕微鏡にて観察した。Elastica van Gieson 染色 (EVG 染色)、Masson Trichrome 染色 (MT 染色) を行った。

##### ② 電子顕微鏡での観察

腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯を電子顕微鏡にて観察した。タンニン酸・酢酸ウラニル・鉛染色の三重染色を行い、観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒトアキレス腱・黄色靭帯の可溶化と質量解析

ヒトアキレス腱・黄色靭帯の完全可溶化に成功し、プロテオーム解析を行うことができた。その結果、種々のコラーゲン (COL) やエラスチン (ELN)、グリコプロテイン、プロ

テオグリカン、ECM-associated proteins の同定を行うことができた。黄色靭帯では弾性線維を形成する ELN が主要成分であり、さらに癒痕形成時に見られるユニークな COL アイソフォームが見られたのに対し、アキレス腱では ELN は殆どみられず、膠原線維を形成する I 型 COL をはじめとする多くの COL アイソフォームが同定された。

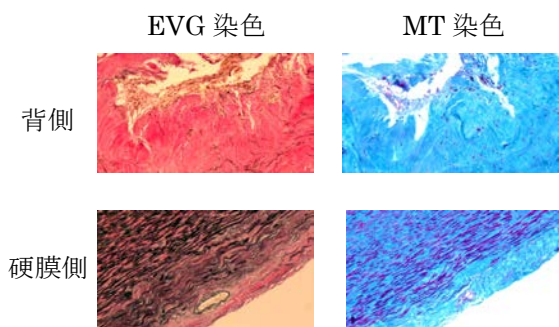
また、複数の COL、ELN を定量するために、精製された複数の COL および ELN を用いて、サンプル（アキレス腱・黄色靭帯）と同様の可溶化処理を行い、検量線を作成し、定量化にも成功した。

腱と靭帯以外の様々な結合組織（骨・軟骨・血管・皮膚等）の質量解析へも応用でき、様々な疾患の病態解明に貢献すると期待できる。

## (2) 腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯の組織学的検討

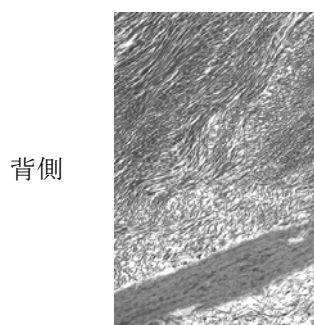
### ① 光学顕微鏡での観察

EVG 染色と MT 染色を行った。EVG 染色では、弾性線維は黄色靭帯の硬膜側で豊富に見られ、背側では少なかった。一方、MT 染色では、背側に膠原線維が豊富に見られた。

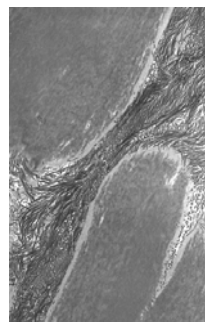


### ② 電子顕微鏡での観察

タンニン酸・酢酸ウラニル・鉛染色の三重染色を行った。背側ではコラーゲン線維が豊富に見られたのに対し、硬膜側では豊富なエラスチン線維が見られた。



硬膜側



以上より、腰部脊柱管狭窄症の肥厚した黄色靭帯においては、背側では“弾性線維の減少および膠原線維の増加”が生じていることが分かった。これより、腰部脊柱管狭窄症の病態の主座は、黄色靭帯の背側で生じている可能性のあることが示唆された。

## 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）

〔学会発表〕（計 9 件）

(1) 合田有一郎, 佐藤紀, 谷口貴子, 高田洋一郎, 小坂浩史, 酒井紀典, 東野恒作, 谷口寿章, 西良浩一: 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯のタンパク解析. 第 29 回日本整形外科基礎学術集会, 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市), 2014 年 10 月 9-10 日.

(2) Goda Y, Sato N, Taniguchi T, Takata Y, Kosaka H, Sakai T, Higashino K, Sairyo K, Katoh S, Taniguchi H, Yasui N. Proteomic analysis of ligamentum flavum. 52<sup>nd</sup> International Spinal Cord Society. Halic Congress Center, Istanbul, Turkey. October 28-30, 2013.

(3) Goda Y, Sato N, Taniguchi T, Takata Y, Kosaka H, Sakai T, Higashino K, Sairyo K, Katoh S, Taniguchi H, Yasui N. Proteomic analysis of ligamentum flavum from lumbar spinal canal stenosis. International Society for Study of the Lumbar Spine 2013. Fairmont Scottsdale Princess, Scottsdale, AZ, USA. May 13-17, 2013.

(4) 合田有一郎, 佐藤紀, 酒井紀典, 東野恒作, 加藤真介, 西良浩一. 腰部脊柱管狭窄症における肥厚黄色靭帯のプロテオーム解析. 第 120 回中部日本整形外科災害外科学会学術集会, 2013 年 4 月 5 日~6 日, 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国 (和歌山県和歌山市)

(5) Goda Y, Sato N, Taniguchi T, Takata Y, Kosaka H, Sakai T, Higashino K,

Sairyo K, Katoh S, Taniguchi H, Yasui N. Proteomic analysis of ligamentum flavum from lumbar spinal canal stenosis. 59th Annual meeting of Orthopedic Research Society. Henry B Gonzalez Convention Center, San Antonio, USA. January 26-9, 2013.

(6) 合田有一郎, 佐藤紀, 谷口貴子, 高田洋一郎, 小坂浩史, 酒井紀典, 東野恒作, 西良浩一, 加藤真介, 谷口寿章, 安井夏生: 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯のタンパク質解析. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(愛知県名古屋市), 2012年10月26-27日.

(7) 合田有一郎, 谷口貴子, 佐藤紀, 安井夏生, 谷口寿章: 腰部脊柱管狭窄症における肥厚黄色靭帯のプロテオーム解析. 第37回日本医用マスメクトル学会(愛知県名古屋市), 2012年10月25-6日.

(8) Sato N, Taniguchi T, Goda Y, Kosaka H, Higashino K, Sakai T, Sairyo K, Katoh S, Taniguchi H, Yasui N. Quantitative proteomic analysis of human tendon and ligament. 2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA. February 4-7, 2012.

(9) 佐藤紀, 谷口貴子, 合田有一郎, 小坂浩史, 東野恒作, 酒井紀典, 西良浩一, 加藤真介, 谷口寿章, 安井夏生: 不溶性細胞外マトリックスの可溶化と解析ーヒト腱・靭帯のプロテオーム解析ー. 第43回日本結合組織学会学術集会, 別府ビーコンプラザ(大分県別府市), 2011年6月10-11日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 紀 (SATO, Nori)  
徳島大学・病院・医員  
研究者番号: 00448333

### (2) 研究分担者

安井 夏生 (YASUI, Natsuo)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 00157984  
(~平成25年3月31日)

東野 恒作 (HIGASHINO, Kosaku)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号: 80380129

合田 有一郎 (GODA, Yuichiro)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号: 70581148

### (3) 連携研究者

谷口 寿章 (TANIGUCHI, Hisaaki)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授  
研究者番号: 10257636