

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：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593005

研究課題名(和文)咀嚼筋腱・腱膜過形成症におけるプロテオミクスと元素分析

研究課題名(英文) Proteome analysis and energy dispersive X-ray analysis in masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia

研究代表者

依田 哲也 (Yoda, Tetsuya)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60242210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：開口制限を呈する新しい疾患である咀嚼筋腱・腱膜過形成症について次のような解析を行った。当大学の倫理委員会の承認を得た研究として、手術対象の同患者(疾患群)および顎変形症患者(対照群)の側頭筋腱組織を採取して、光学あるいは電子顕微鏡による観察と元素分析法による元素の種類分布について解析を行った。組織学的観察では疾患群で石灰化を認めた。疾患群において、腱表面における粒子様物質の散在がみられた。粒子様物質に対して行った測定では、カルシウムおよびリンに加えケイ素が検出され、元素マッピングにおいて、粒子様物質周辺の腱組織および粒子様物質に集積するケイ素がみられた。

研究成果の概要(英文)：Masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia (MMAH) is a new disease entity associated with limited mouth opening. In this study, we analyzed the microstructural characteristics of muscles and tendons in MMAH by electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis to determine the elemental composition. Histological analysis was performed to detect the calcification. Transmission electron microscopy and scanning electron microscopy were conducted to clarify the microstructural characteristics of muscles and tendons. Energy dispersive X-ray microanalysis was performed to identify the distribution of elements. Mineralized nodules were observed in tendon tissues of MMAH as compared with facial deformity. Electron microscopy revealed that the muscle and tendon tissues in MMAH showed degenerative changes and distinctive histological findings as compared with tissues in facial deformity. We found that Ca, P, and Si were detected only in MMAH.

研究分野：口腔外科

キーワード：咀嚼筋腱・腱膜過形成症 プロテオーム解析 元素分析 ケイ素 石灰化 腱

1. 研究開始当初の背景

咀嚼筋腱・腱膜過形成症は、側頭筋の腱や咬筋の腱膜などが過形成するために、筋の伸展を妨げて開口制限を呈する疾患で、遺伝的要因や環境的要因の関与が示唆されているが、その成因についてはいまだ不明である。以前は、難治性の顎関節症あるいは筋突起過長症などと誤診され、適切な治療が行われないことも少なくなかった。2008年の日本顎関節学会学術大会シンポジウムでは全国から集計され143症例のデータをもとに、名称・診断・治療・病理所見などについて討論され、咬筋前縁部の張り出しの触知とMRIによる診断の有用性と、腱・腱膜切除術で高い治療結果を得られることが確認された。また、我々は術後の開口訓練を適切に行えば長期的にも良好であることを報告した。しかしながら本疾患の特徴である腱および腱膜の過形成の病態および成因は明らかになっていない。必ず両側性に発症することや学童期より発症する症例もあることから、何らかの遺伝的要因があり、そこに環境要因が相乗して発症するのではないかと考えている。

2. 研究の目的

咀嚼筋腱・腱膜過形成症の患者の腱組織において、特異的に発現するタンパク質を同定し、電子顕微鏡により組織学的解析を行い、病態解明のための有用なデータを得ることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

<プロテオーム解析>

咀嚼筋腱・腱膜過形成症患者3名(疾患群)と開口制限のない顎変形症患者3名(対照群)の側頭筋腱を採取した(本学倫理委員会承認番号595)。採取組織をSKミル(トッケン社)で凍結破砕し、抽出バッファー(7M urea, 2M thiourea, 30mM Tris, 3% CHAPS, 1% Triton X-100)にて溶解後、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes kit, 3.5K MWCO, 0.5-3ml (PIERCE)にて脱塩を行った。凍結・乾燥後に再溶解し、PIERCE 660nm Protein Assay (PIERCE)にて蛋白定量を行い1mg蛋白量に調整した。等電点電気泳動はImmobiline Dry Strip pH3-11 18cm(GE Healthcare)を用いてEttan IPGphor II (GE Healthcare)にて以下のプログラムで試行した。100V、2時間(step-and-hold); 500V、1時間(gradient); 1000V、1時間(gradient); 8000V、1時間(gradient); 8000V、40時間(step-and-hold)。その後、SDS電気泳動をExcelGel SDS XL 12-14% 245 x 180cm(GE Healthcare)を用いてMultiphor II 2-D (GE Healthcare)にて以下のプログラムで試行した。1000V、20mA、40W、45分間; 1000V、40mA、40W、5分間; 1000V、40mA、40W、160分間。CBB G-250にて染色を行ったものをGS-800 Calibrated Densitometer(BIO-RAD)にてスキャナし、PDQuest (2-D Analysis Software Version 7.3)にて画像解析を行い両者間の蛋白スポットの差異解析を行った。スポットに有意な濃度差を認める蛋白群に

関してMALDI/TOF MS (AXIMA-GFR、島津製作所)によるPeptide Mass Fingerprinting (PMF)分析を行った。

<電子顕微鏡解析>

対象

疾患群は本疾患患者のうち、側頭筋腱膜部分切除術を行った6名(女性6名;平均年齢44.7歳,術前最大開口域20~32mm)である。対照群は外科矯正手術を行った、開口制限のない顎変形症患者6名(男性2名,女性4名;平均年齢26.3歳)とした。両群ともに、他の内科的基礎疾患・関節疾患・代謝性疾患を有さないものとした。組織検体としては、筋突起周辺の側頭筋腱組織を採取した。組織学的観察および元素組成分析は、全検体に対して行った。透過型電子顕微鏡を用いた構造観察と卓上電子顕微鏡を用いた表面構造観察は、対照群1検体、疾患群側頭筋腱検体2検体に対してのみ行った。

組織学的観察

筋を含む腱組織を10%中性緩衝ホルマリンにて48時間固定し、エタノール系列にて脱水後、パラフィン包埋とした。滑走式マイクロトームで厚さ2.5µmに薄切した組織に対し、Hematoxylin-Eosin(H-E)染色、Toluidine blue染色、Von Kossa染色、Azan染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

透過型電子顕微鏡による観察

筋組織を2.5%グルタルアルデヒド(0.1Mリン酸緩衝液)および1%四酸化オスミウム(0.1Mリン酸緩衝液)にて固定し、エタノール系列にて脱水後、エポキシ樹脂包埋した。組織超薄切片を作成し、酢酸ウラン飽和液ならびにクエン酸鉛液にて電子染色を施した後、透過型電子顕微鏡JEM-1010型(日本電子)にて、筋線維ならびに脈管周囲組織を中心に観察を行った。

卓上電子顕微鏡による観察

腱組織を10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、エタノールで脱水後、組織表面にオスミウム蒸着処理を行い、卓上電子顕微鏡Miniscope TM-1000S(日立製作所)にて腱表面構造の観察を行った。

元素組成分析

腱組織の元素組成分析には、組織学的・免疫組織化学的観察と同じパラフィン包埋標本を使用した。滑走式マイクロトームで厚さ2.5µmに薄切した組織を、脱パラフィン処理した。あらかじめ行ったH-E染色、Von Kossa染色の結果から元素組成分析を行う部位を決定した。この観察試料を、走査型電子顕微鏡用のアルミニウム製試料台上に、カーボンテープを用いて固定し、エネルギー分散型X線分析装置SwiftED3000(日立製作所)を用いて、加速電圧15kVの設定にて電子線を照射した。電子線を受けた試料から分光されたX線強度を定性的に分析し、元素情報を得るEDSスペクトル測定により構成元素の分析を行った。また、この測定により得られた各元素の出力を、元素マッピングとして

カラーイメージ表示した。なお、EDS スペクトルのキャリブレーション用試料として、本装置付属の標準試料である銅メッシュを用い、スペクトルのピーク位置を補正したものを使用した。

4. 研究成果

< プロテオーム解析 >

96 のスポットに対して解析を行った結果、29 を同定し、発現量に違いはみられた蛋白質は 4 つであった (図 1・2)。コントロール群と比較して疾患群で増加したものは ChainB, Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D、-crytsallin A 4 であり、減少したものは myosin light chain 4、collagen 2 () であった (図 3)。

図1

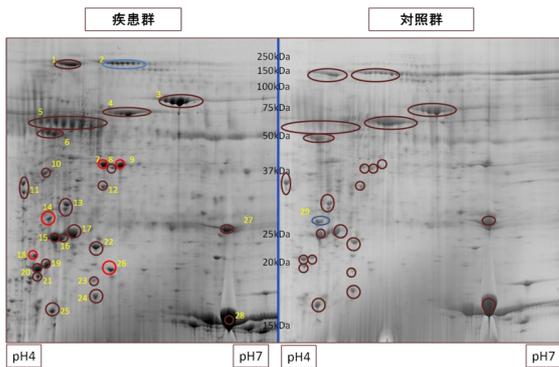
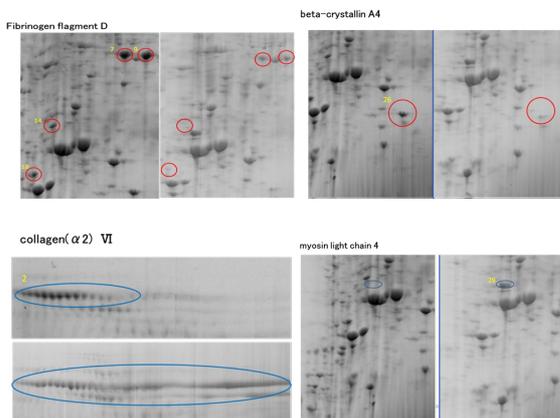


図2

	MW	pI	score	coverage	
1	liprin- α	1326265	5.91	65	6
2	collagen, alpha-2(VI) chain	109709	5.63	58	6
3	serotransferrin	79280	6.97	146	23
4	serum albumin	58513	5.92	92	17
5	nestin	177788	4.35	65	4
6	alpha-1-antitrypsin	44280	5.37	98	16
7	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	36331	5.84	72	15
8	actin prepeptide	37125	5.19	83	20
9	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	36331	5.84	98	22
10	actin, alpha, cardiac muscle isoform CRA_c	30488	5.23	77	17
11	tropomyosin, beta chain isoform 1	32945	4.66	75	18
12	actin, alpha, skeletal muscle	42366	5.23	76	18
13	actin, alpha, skeletal muscle	42334	5.23	67	14
14	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	38081	5.84	67	14
15	myosin light chain 1/2, skeletal muscle isoform II	21189	4.97	92	33
16	myosin light chain 3	22089	5.03	93	34
17	apolipoprotein, A-1 preprotein	30759	5.56	81	26
18	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	38081	5.84	78	18
19	myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	18777	4.92	82	27
20	myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	18777	4.92	79	27
21	myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	19116	4.89	80	33
22	TSA	18486	5.66	92	23
23	TSA	18486	5.66	71	21
24	transferrin	13455	5.5	103	58
25	galactin	14917	5.34	89	33
26	beta-crystallin A4	22645	5.83	82	29
27	hemoglobin, beta chain	11073	6.03	93	66
28	hemoglobin, subunit beta	18102	6.76	91	37
29	myosin light chain 4	21665	4.97	131	31

図3



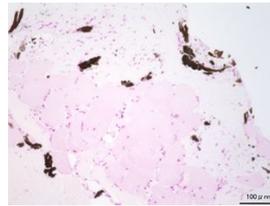
< 電子顕微鏡解析 >

1) 組織学的観察所見

H-E 染色像では、全例で筋および腱組織の構造的な異常は認めなかった。また Toluidine blue 染色、Azan 染色では、硝子

軟骨や膠原線維、筋線維において疾患群と対照群との相違はみられなかった。しかし Von Kossa 染色では、疾患群の腱組織全例において、長径 1 ~ 10 μm 程度の石灰化物と考えられる粒子様物質がみられた (図 4)。

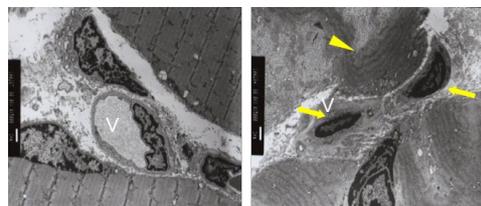
図4



2) 透過型電子顕微鏡による観察所見

疾患群の筋線維横断面において、対照群にはみられない変性した紋様がみられ、周囲血管内腔の狭小化や血管内皮細胞の変性がみられた (図 5)。

図5



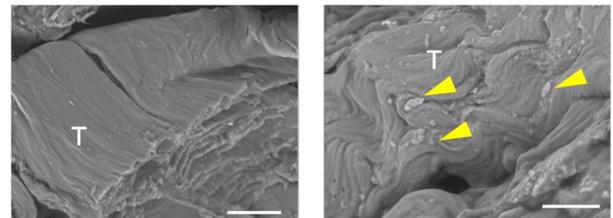
対照群

疾患群

3) 卓上電子顕微鏡による観察所見

疾患群において、腱表面における粒子様物質の散在がみられた (図 6)。

図6



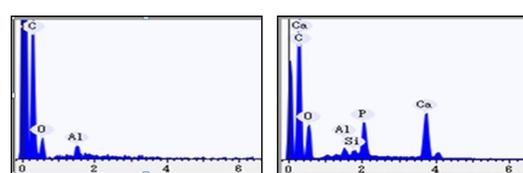
対照群

疾患群

4) 元素組成分析の結果

元素組成分析における EDS スペクトル測定の結果、全例で炭素原子の検出ピークがみられ、アルミニウム原子の検出ピークも散見された。疾患群の腱組織にみられた粒子様物質に対して行った測定では、全例でカルシウムおよびリンが検出された。また疾患群 6 例中 4 例の粒子様物質に対して行った測定では、カルシウムおよびリンに加えケイ素が検出され、元素マッピングにおいて、粒子様物質周辺の腱組織および粒子様物質に集積するケイ素がみられた (図 7)。疾患群の粒子様物質周辺以外の腱組織および対照群の腱組織では、ケイ素の集積はみられなかった。

図7



対照群

疾患群

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)

[雑誌論文](計2件)

- 1) Nakamoto A, Sato T, Hirosawa N, Nakamoto N, Enoki Y, Chida D, Usui M, Takeda S, Nagai T, Sasaki A, Sakamoto Y, Yoda T. Proteomics-based identification of novel proteins in temporal tendons of patients with masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia. Int J Oral Maxillofac Surg 43(1):113-119, 2013
- 2) Sato T, Hori N, Nakamoto N, Akita M, Yoda T. Masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia exhibits heterotopic calcification in temporal tendon. Oral Dis 20(4):404-408, 2013

[学会発表](計3件)

- 1) 林直樹, 佐藤毅, 古株彰一郎, 榎木祐一郎, 大久保正彦, 小宮山雄介, 大庭伸介, 川上哲司, 桐田忠昭, 依田哲也. 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の病態解明のための腱細胞に対するエストロゲンおよびbeta-crystallin A4の機能解析. 第27回日本顎関節学会, 福岡, 2014.7.19-20
- 2) Sato T, Enoki Y, Kokabu S, Okubo M, Yoda T. Masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia exhibits heterotopic calcification in temporal tendon. ASBMR Symposium: Cutting Edge Discoveries in Muscle Biology, Disease and Therapeutics, Baltimore, MD, USA, 2013.10.4-7
- 3) 中本文, 佐藤毅, 中本紀道, 坂本安, 依田哲也: 咀嚼筋腱腱膜過形成症の腱組織に特異的に発現するタンパク質のプロテオーム解析. 第25回日本顎関節学会, 札幌市, 2012.7.14-15

4)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

依田哲也(YODA, Tetsuya)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60242210

(2)研究分担者

穉田真澄(AKITA, Masumi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60105905

(3)研究分担者

坂本安(SAKAMOTO, Yasushi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80178582

(4)研究分担者

佐藤毅(SATO, Tsuyoshi)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60406494

(5)研究分担者

坂田康彰(SAKATA, Yasuaki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50322425