

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591902

研究課題名（和文）

プロテオーム解析を用いた黄色靭帯肥厚機序の検討

研究課題名（英文）

Proteomic analysis for the degenerative changes of yellow ligament

研究代表者

荻久保 修（OGIKUBO OSAMU）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00291584

研究成果の概要(和文)：

腰部脊柱管狭窄症の本態である黄色靭帯の変性肥厚機序の一因を黄色靭帯内血管の破綻とそれに続発して起こる多機能血漿タンパク質の生理活性にあると予測し、肥厚靭帯内における血漿タンパク質の存在とその局在を明らかとした。

加えて、本研究の標的タンパク質である Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein (ZAG) の定量的測定法を確立し、ZAG の生理活性が脂肪代謝に関与するとの報告があることから、メタボリック症候群における ZAG の重要性について検討した。

研究成果の概要(英文)：

The mechanism of the degenerative thickening of yellow ligament was investigated by proteomic analysis. We demonstrated some multifunctional plasma proteins, such as Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein, amyloid P component, in the pathological focus of the degenerative yellow ligament histochemically.

On the other hand, we could construct the quantitative analysis system of ZAG to confirm the function of this protein.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・整形外科学

キーワード:

プロテオーム解析、プロテアーゼ、インヒビター、靭帯、  
変性肥厚、脂質代謝、メタボリック症候群、

## 1. 研究開始当初の背景

近年、人口の高齢化に伴い腰痛・下肢痛を愁訴に医療機関を受診する患者は増加の一途をたどる。我が国の平成 19 年度国民生活基礎調査における“脊柱障害”の外来受療率は

“歯及び歯の支持組織の疾患”、“高血圧性疾患”について第 3 位であり、総患者数でも第 4 位と高い割合をしめる。“脊柱障害”の原因疾患として中高年以降では腰部脊柱管狭窄症が高い頻度を占め、近

年増加の一途をたどる。

我々は 2004 年以来、ヨーテボリ大学整形外科(スウェーデン)との共同研究により腰部脊柱管狭窄症における腰痛、下肢痛、間欠性跛行などの主要症候が硬膜管の最小狭窄部断面積と相関性があることを見いだすとともに、疾患が QOL(生活の質)に与える影響についても標準的な健康関連 QOL 評価法の一つである EuroQol (EQ5D)を用いて検討した。(Spine 32; 1423-1428, 2007)本研究において腰部脊柱管狭窄症における EQ5D スコアは平均 0.21 であり、本疾患の QOL に与える影響が大きなものであることを示唆している。

ヨーテボリ大学整形外科との共同研究結果として、腰部脊柱管狭窄症における動的因子の関与を確かめるため実験的加重モデルを考案し脊柱管断面積の変化や黄色靭帯の変化などに新しい知見を得ている(第 110 回中部日本整形外科災害外科・学術集会学会賞受賞)。

腰部脊柱管狭窄症は脊椎前方要素である椎間板の変性・膨隆とともに後方要素である黄色靭帯の変性・肥厚、椎間関節の変形性変化により硬膜管の圧排や神経組織への圧迫を来す疾患であり、黄色靭帯の変性肥厚は本疾患における主要な病因の一つである。黄色靭帯の変性・肥厚は経年的に変化することから加齢現象と考えられているが、その病理学的、分子生物学的な成因機序についてはいまだ不明な点が多い。

我々は本疾患患者の黄色靭帯の病理学的特徴として靭帯内線維成分の規則的配列の乱れや破断、膠原線維の癒痕性増殖像、軟骨仮成像などがあることから考え、靭帯内の微小外傷・出血、微小炎症巣の出現とそれに続発する生体防御反応としての線維性癒痕形成が黄色靭帯肥厚の原因ではないかと仮説を立て研究を進めてきた。本仮説のもと、機能性血漿タンパク質が靭帯肥厚機序に関与している可能性を考慮し、肥厚靭帯の免疫組織染色を通して肥厚靭帯内での機能性血漿タンパク質の証明と局在の解明を目指した。

一方、我々の共同研究施設である滋賀医科大学学生化学・分子生物学講座分子病態生化学部門において研究を進めている Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein (ZAG) はビトロネクチンやフィブロネクチンなどと同様に細胞接着性タンパク質

として働く血漿タンパク質の一つであり、インテグリンを介して細胞接着作用を有する。

創傷治癒過程において細胞接着性タンパク質は重要な働きをするが ZAG も他接着性タンパク質と同様に重要な働きをもち、変性靭帯内でのその局在の証明は黄色靭帯の変性肥厚と ZAG の関連性を予感させるものである。また本タンパク質はその一次構造において主要組織適合抗原 (HLA-class I-a 鎖や HLA class II)と高い相同性を示すことから免疫応答に深く関与していることが推定されており、肥厚靭帯内組織病変で確認されるサイトカインの発現にも関与することが推定される。

本研究では黄色靭帯肥厚機序の解明を目的として肥厚黄色靭帯の詳細な組織学的検討を行い、黄色靭帯肥厚における接着性タンパク質やその制御タンパク質およびプロテアーゼインヒビターの相互作用の解明を行い、靭帯肥厚における各種機能性タンパク質の作用から黄色靭帯肥厚機序の解明を目指す。

一方、本研究における着目因子のひとつである ZAG は近年、脂肪動員因子として作用し脂質代謝に関与することが報告されている。我々はこの点にも着目し、広く中胚葉性組織に対する ZAG タンパク質作用の解明を目的として脂肪代謝における ZAG の生理作用を検討した。特に近年メタボリック症候群は臨床医学分野において重要な疾患であり、本症候群における ZAG の関与を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究では、腰部脊柱管狭窄症の病因である黄色靭帯肥厚機序の解明を目指すことを目的とし靭帯外より作用する生理活性物質として機能性血漿タンパク質である ZAG や高分子および低分子キナーゼなどに注目し、変性肥厚靭帯内における各タンパク質の存在を免疫組織染色法により証明する。同時にその局在にも着目し、靭帯内の病理学的異常像と各タンパク質の局在から、各タンパク質の生理機能を検討する。

また我々が研究を進めている ZAG は新規機能性血漿タンパク質であり、その定量的測定法はいまだ確立していない。そこで、本タンパク質の定量的測定法を確立し、血液や尿などの生体被検材料における測定を行う。この結果を検討し、黄色靭帯肥厚のみでなく、脂肪代謝異常など他の中胚葉性組織での作用も検討する。

## 3. 研究の方法

### (1)肥厚黄色靭帯の組織学的検討

手術時に患者の同意の上、採取した黄色靭帯を研究に供す。一塊として摘出した黄色靭帯より組織標本を作製し組織学的検討を行った。

#### ① HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色標本における検討

靭帯内の変成・肥厚、靭帯構造の配列異常・断裂、斑状異常像など一般的組織所見について評価する。予備実験の段階では定量的評価判定には適さず現段階では変成度をおおまかに判定する染色法と考え評価した。

#### ②弾性繊維染色 (Victoria blue 染色) 標本における検討

線維配列の乱れや断裂が弾性線維の断裂に続発する膨化、断片化、消失に続発し、膠原線維の増殖につながるなどの報告があることから弾性線維染色標本において同様の評価を行った。

#### ③特殊免疫染色における検討

血漿タンパク質である ZAG、フィブロネクチン、ビトロネクチンなどの細胞接着性タンパク質および高分子および低分子キナーゼ、シスタチン C、 $\beta$ トランスなどのプロテアーゼインヒビター (組織障害発生時に細胞内より逸脱するプロテアーゼに対抗し二次的障害を抑制する作用がある)、慢性炎症の指標となるアミロイド P コンポーネント (SAP) に対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を用いて黄色靭帯の免疫染色を行い、各物質の局在、病理異常像との関係などについて検討した。

### (2)ZAG 定量的測定系の確立

ZAG は今回の研究における主要な標的糖タンパク質であるが、その測定系はいまだ確立していない。今回、ZAG 定量的測定系 (ELISA 法) を確立し、同時に作製したモノクローナル抗体のエピトープを解析した。

#### ①抗 ZAG 抗体 (ポリクローナル抗体・モノクローナル抗体) の確立

抗体作製に必要な ZAG 標準物質はヒト精漿中より単離生精製し獲得した。ポリクローナル抗体は標準物質を用いてウサギに免疫し、その後血清を採取し抗 ZAG ポリクローナル抗体を精製分離した。

モノクローナル抗体は、精製 ZAG タンパク質を完全フロイントアジュバントと混和して抗原とした。皮下に 5 回の免疫を 2 週間毎に行い、脾臓摘出 3 日前に 50~80  $\mu$ g 精製 ZAG タンパク質で免疫した。脾臓を摘出後、免疫細胞を単離してハイブリドーマ作成に供した。このハイブリドーマ細胞は、PEG1500 を用いて作成して、選択培地により抗 ZAG モノクローナル抗体を獲得した。

#### ②ELISA 測定系の確立

作製した抗 ZAG ポリクローナル抗体を固定化抗体として用いて ELISA 測定系を確立した。すなわち、固定化抗体を 96 穴マイクロプレートに固相化し、その後標準抗原、もしくは被検サンプルを添加して固相化した。作成したモノクローナル抗体と反応してサンドイッチしたのち、HRPO 結合抗マウス IgG 抗体と反応して測定系を作成した。それぞれの抗体同士の相性を確認しながら、最も相性の良い組み合わせで ELISA 系を構築した。

#### ③モノクローナル抗体のエピトープ解析

ヒト脾臓細胞の cDNA から ZAG 遺伝子を単離後、大腸菌に遺伝子導入した。塩基配列を確認後、タンパク質発現ベクター pET22b へ導入して、大腸菌内でタンパク質を発現させた。発現したタンパク質はヒスタグを持っており、これを用いてタンパク質を精製した。発現タンパク質は、 $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 3ドメイン、MHCドメインおよび ZAG タンパク質全長であった。これらの蛋白資質を用いてモノクローナル抗体のエピトープ解析を行い本タンパク質の機能解析を行う。

### (3)メタボリック症候群における血清 ZAG 値の検討

ZAG は今回の研究における主要な標的糖タンパク質であるが、本糖タンパク質は脂質動員因子として作用することが報告されている。今回、ZAG の定量的測定系の確

立を行うとともに、脂質代謝異常症との関係を検討する目的で、被験者の同意を得た上で健康診断時に採取した血清において、ZAG 濃度を測定し、メタボリック症候群の診断において重要な因子(腹位、BMI、血清コレステロール値・トリグリセド値・血糖値、血圧)と比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1)肥厚黄色靭帯の組織学的検討

腰部脊柱管狭窄症患者手術時に患者の同意を得て採取した肥厚黄色靭帯について組織学的検討を行った(被検検体数=22)。

##### ① HE 染色における検討

一般的組織染色法として HE 染色を行った。線維成分の配列異常・破断、膨化などの異常像を全例で認めた(図 1)。



図 1

##### ②膠原線維染色(アザン染色)および弾性線維染色(ビクトリアブルー染色)における検討

膠原線維成分についての病理学的異常像(配列異常・破綻像、塊状化)は全例に認め(図 2)、弾性線維成分の異常(配列異常・破綻像、密度低下)は約 73%の症例で認めた(図 3)。

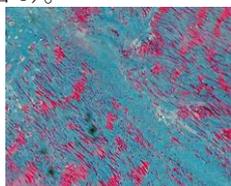


図 2



図 3

線維成分の配列内に巣状無構造野を認めたが(図 4)、同部はサブラニナーO 染色にて染色性を認め(図 5)、軟骨仮成像と考えられた。本異常像は約 64%の症例で認めた。

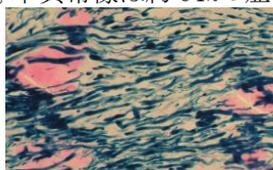


図 4

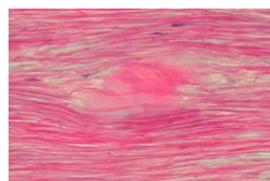


図 5

##### ③免疫組織染色標本における検討

血漿性タンパク質の指標として今回の研究の標的分子である ZAG と慢性炎症の指標としてアミロイド P コンポーネント(SAP)について免疫組織染色を行った。

ZAG の免疫組織染色においては、靭帯内線維細胞周囲での染色性の増加を認めなかったが、靭帯内血管周囲で染色性の増加を認め、斑状軟骨仮成内での点状染色像を認めた(図 6)。



図 6

SAP の免疫組織染色においては全例で血管内皮に染色性の増加を認め、約 78%に軟骨仮成像内の染色性の増加を認めた。線維成分構造の異常像を呈する部分に染色性の上昇を認めた症例もあった(図 7)。



図 7

##### (2)ZAG 定量的測定系の確立と分子内エピトープの解析

ELISA 法を用いた ZAG タンパク質測定系においては、精製 ZAG タンパク質を用いた実験より 0.05  $\mu$ g/ml から 0.7  $\mu$ g/ml までの範囲で直線性を示した。そこで、臨床検体を一定倍数に希釈後測定を行った。

本 ELISA 法に用いた精製モノクローナル抗体のエピトープ解析を行った。抗原は、大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質を用いた。抗原の精製はニッケル NTA カラムを用いて、ヒスタグを固定して行なった(図 8)。

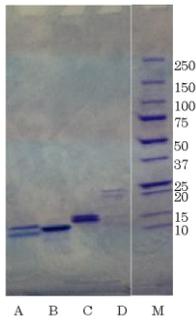


図 8

A,B,C,D はそれぞれ、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、MHC ドメインの精製タンパク質像である。Mは分子量マーカーを示す。ウエスタンブロット法を用いたエピトープ解析の結果、確立した7種類のモノクローナル抗体のうち、2種類は、 $\alpha 3$ ドメインを認識していた。また、3種類はMHCドメインを認識しており、5種類については認識領域を確定することができた(図9)。

	PcAb	M01	M02	M03	M04	M05	M06	M08
ZAG	+	+	+	+	+	+	+	+
MHC	+	-	-	-	-	+	+	+
$\alpha 3$	+	+	-	-	+	-	-	-
$\alpha 2$	+	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 1$	-	-	-	-	-	-	-	-

図 9

ZAG 定量的測定系に供したモノクローナル抗体は、M01を用いて行なったので、ZAGタンパク質の $\alpha 3$ ドメインを認識する抗体であることが明確になった。

### (3)メタボリック症候群における血清

健康診断の折りに、被験者の同意を得て採取した血清(n=200)についてZAG濃度を測定し、メタボリック症候群の診断基準に關与する各因子(腹囲・BMI、血清コレステロール値・トリグリセリド値、血糖値、血圧)と比較検討した。

ZAGの血中濃度には性差を認め男性  $78.98 \pm 19.23 \mu\text{g/ml}$ (n=112)、女性  $67.64 \pm 15.01 \mu\text{g/ml}$ (n=88)であった。

このうち、メタボリック症候群の診断基準に照らし合わせると、男性では66例が、女性では5例が該当した。女性において統計学的差を檢討するには例数が少なすぎたため、男性においてのみ統計学的検討を行った。

最も重要な因子とされる腹囲85cmにて2群の検定を行うと、85cm未満の群では  $84.66 \pm 19.55 \mu\text{g/ml}$ (n=54)、85cm以上の群  $74.32 \pm 12.33 \mu\text{g/ml}$ (n=66)であり統計学的有意差を認めた(P<0.05)。また、高脂血症を合併する症例においては  $71.52 \pm 11.90 \mu\text{g/ml}$ (n=47)であり、より低値になる傾向にあった。

重回帰分析を行うと血圧との相関性も認め(P=0.048)、メタボリック症候群におけるZAGの重要性が示唆された。

現在、症例数を増やし、統計解析を続行しているが、近々論文として報告する予定である。

## 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1件)

①Taniguchi S, Ogikubo O, Nakamura T, et al. A Rare Case of Extramedullary-Intradural Hemangioblastoma in the Thoracic Spine. Spine.34(26): E969-E972, December 15, 2009.

[学会発表](計1件)

①竹内 圭介、林 良美、荻久保 修、大塚隆信、大久保 岩男. 血漿 Zn- $\alpha 2$ -glycoprotein 測定値と肥満との相關について. 第83回日本生化学学会、2010/12/07-12、神戸

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

荻久保 修(OGIKUBO OSAMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号:00291584

(2)研究分担者

林 良美(HAYASHI YOSHIMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号:80444967

(3)連携研究者

大久保 岩男(OHKUBO IWAO)

天使大学・看護栄養学部・教授

研究者番号:80152073

竹内 圭介(TAKEUCHI KEISUKE)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号:40432306

石黒 啓司(ISHIGURO HIROSHI)

岐阜医療科学大学・保健科学部・教授

研究者番号:20211039