

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293315

研究課題名(和文) プロテオーム解析による五十肩の病態解明と新規治療・診断法の開発

研究課題名(英文) Proteomics analysis of frozen shoulder and development of novel therapy and diagnosis

研究代表者

萩原 嘉廣 (Hagiwara, Yoshihiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90436139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,900,000円

研究成果の概要(和文)：五十肩(凍結肩)に代表される関節拘縮(関節可動域の制限)は、未だにその原因が解明されておらず、患者は治療後も日常生活動作の制限を強いられている。そのためにリハビリテーション期間も長くなっている。医療費抑制の観点からも早急に関節拘縮の病因を解明し、その治療法の開発が望まれる。本研究では凍結肩の関節包(腱板疎部、烏口上腕靭帯、下上腕関節靭帯)を用いて網羅的なタンパク解析を行った。従来考えられていたコラーゲンの増生による線維化や炎症だけでなく、癒着を主体とした新たな病態を推定できた。

研究成果の概要(英文)：Joint stiffness is a very common problem in clinical settings. However, there is no consensus as well as appropriate therapy for it. Frozen shoulder is a common disease with a decrease in range of motion (ROM) and pain resulting in disturbing activity of daily living. We collected samples(ther otator interval coracohumeral ligament, and inferior glenohumeral ligament) from frozen shoulder during arthroscopic pancapsular release. They were analyzed with nanoLC/ESI-MSMS for identification of proteins and each relative expression levels by intensity on each LC-MS data. Besides fibrosis and inflammation, increased adhesion and coagulation cascades may deteriorate pathology of idiopathic frozen shoulder.

研究分野：整形外科

キーワード：凍結肩 プロテオーム解析 関節包 超音響顕微鏡装置 腱板断裂 GO解析

## 1. 研究開始当初の背景

五十肩(凍結肩)に代表される関節拘縮(関節可動域の制限)は、未だにその原因が解明されておらず、患者は治療後も日常生活動作の制限を強いられる。結果としてリハビリテーションの期間も長くなるため、医療費抑制の観点からも早急に関節拘縮の病因を解明し、その治療法の開発が望まれる。激的な疼痛と関節可動域制限を主訴とする「五十肩(凍結肩)」は5%の有病率との報告(Sheridan, 2006)があり、本邦では600万人以上が罹患しているものと予想される。「五十肩は自然に治る」という一般認識が浸透し、適切な治療が必要にも関わらず受診をしていない可能性も高く、潜在的な患者は相当数存在するものと考えられる。

これまで我々が行った凍結肩を対象(497肩)にした保存療法の研究から、(1)罹患側は健側と同じ関節可動域まで改善しない、(2)糖尿病合併および初診時の下垂位外旋制限(0度以下)は回復が不良であることが明らかとなった(Ando, 2013)。また、非観血的授動術(52肩)においても、糖尿病患者では改善が悪く、非糖尿病患者と比較して有意に結帯(オッズ比: 9.49, 95% CI: 1.75-51.5)で十分な可動域が得られなかった(投稿中)。「結帯(背中に手を回す)」は非観血的授動術、鏡視下授動術を行っても改善しないことが臨床的によく知られている。保存療法に抵抗性で手術(鏡視下関節包切離術)が必要な患者から関節包を採取し、網羅的な遺伝子解析(DNAマイクロアレイ)と定量PCRを行った。関節可動域制限のない腱板断裂患者から採取した関節包(コントロール)と比較すると、凍結肩群では(1)細胞数が増加すること、(2)関節包が硬くなること、(3)炎症性マーカー(IL-6, IL-1)、線維化マーカー(COL1A1, COL11A1,  $\alpha$ -SMAなど)、軟骨分化マーカー(AGCN, COL2A1, COL10A1など)、血管新生因子(CYR61)が増加することを明らかにした(Hagiwara, 2012)。これまで病態仮説として炎症、線維化が提唱されており、関節包が硬くなる要因がコラーゲンの増生なのかを確認するため、物性を計測可能な超音波顕微鏡を用いてI型コラーゲン免疫染色画像との比較を行った。しかし両者には殆ど相関はなかった(ピアソンの相関係数: 0.075)。つまりI型コラーゲンの増加は単純に組織の硬さとは相関せず、架橋構造など他の修飾因子が重要となる。

これまで我々は関節拘縮を起こす「ラット膝関節不動化モデル」を独自に作製し、(1)関節拘縮の主病因が関節包であること(Ando, 2007)、(2)関節包が不動化期間とともに硬化すること(Hagiwara, 2006)、(3)不動化後に再運動を行っても関節包は修復しないこと(Ando, 2012)、(4)関節の不動化によって虚血および炎症性マーカーが上昇すること(Yabe, 2013)、(5)関節血腫によって関節可動域制限が増悪すること(Onoda,

2014)を明らかにした。

一般に五十肩を罹患する患者は不良姿勢(猫背)であることが多く、姿勢の変化が五十肩の発症に影響することが疑われている。解剖体において凍結肩の主病因である前方関節包を栄養する前上腕回旋動脈は、後上腕回旋動脈と比較して細径(1.3 v.s. 3.5mm,  $P=0.0068$ )であり、従来考えられてきた両動脈の交通は存在しないことが明らかとなった(Hagiwara, 2015)。また健常ボランティア( $N=119$ )に対しMRIで両動脈の描出を試みると、良姿勢に対して不良姿勢(猫背)になると、全例で前上腕回旋動脈の描出が不良となった(Hagiwara, 2015)。つまり前上腕回旋動脈は姿勢によって血流低下を招きやすく、側副血行を得にくい環境下にある。

以上の動物実験、ヒトサンプルなどの解析結果および好発年齢などから、凍結肩は加齢による血管性病変および姿勢の変化を起因とした「虚血による低酸素」がその発症原因である可能性が示唆され、病態解明のための新たな解析が必要である。凍結肩の病態解明は、その他の関節に生じる拘縮にも応用が可能であり、病態解明が急がれる。

また研究代表者は、東北大学医工学研究科・医用イメージング研究分野で開発された「光音響イメージング装置」を用いて非侵襲的に正常関節軟骨、変性関節軟骨および軟骨下骨の同時評価に成功している(Hagiwara, 2015)。本装置は小型化が試みられ、術中診断装置の開発途中である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、網羅的なタンパク解析により凍結肩の病態を解明すること、および光音響顕微鏡装置の凍結肩の診断ツールとしての有効性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 網羅的なタンパク解析

東北大学、JR 仙台病院、松田病院、JCHO 仙台病院の倫理委員会の承認を得たのち、本研究を開始した。鏡視下関節包切離術を要した凍結肩群とコントロール群(関節可動域制限のない腱板断裂肩)の関節包(腱板疎部、烏口上腕靭帯、下上腕関節靭帯)をそれぞれ採取した。サンプルはタンパクの変性を防ぐため、速やかに液体窒素で凍結し、解析まで冷凍保存した。

### 破砕溶媒の検討・再現性の検討

関節包を構成するたんぱく質はI型コラーゲンが80%以上(Kleftogiannis, 1994)であり、他の臓器と比較して硬い(破砕しづらい)。特に五十肩群では硬いため、分析の再現性を事前に確認しておくことは極めて重要である。

サンプル( $n=3$ )を約20mg切り出して、組織破砕溶媒(8M Ureaと12mM SDC/12mM SDDS)の中でホモジェナイズ(Wako製のバイ

オマッシャー を使用)した後、遠心(4 , 105,000g, 1 時間)して上清の細胞可溶性画分を回収した. Bradford法でタンパク定量を行ってから, 1 nmol (分子量 5万で換算)ずつ分注して減圧乾燥した後, 50mM 重炭酸アンモニウム水溶液に再溶解してトリプシン消化(基質:酵素 = 50:1 mol/mol)した, 反応液を再び減圧乾燥した後に 1%ギ酸水溶液に再溶解したものを nanoLC/ESI-MS/MS によるショットガンプロテオーム解析に付した. NanoLC システムには, ポンプとして Ultimate3000 システムと NANOSPACE SI-2, オートサンプラーとして HTC PAL システムを組み合わせて使用した. また, 分析カラムには MonoCapC18 (100  $\mu$ m i.d.  $\times$  2000 mm) とフューズドシリカ製キャピラリーニードル (20  $\mu$ m i.d.  $\times$  50 mm) を組み合わせたもの, トラップカラムには Monolith Trap C18-50-150 (50  $\mu$ m i.d.  $\times$  150 mm) を使用した. はじめに, トリプシン消化物 10 pmol をシステムに注入した後, 0.1%ギ酸 2%メタノール水溶液を流速 10  $\mu$ L で 10 分間送液して, トラップカラム上で脱塩・濃縮した. 続いて, バルブを切り換えて試料を分析カラムに通導してリニアグラジエント溶出 (A 液: 0.1%ギ酸 2%メタノール水溶液, B 液: 0.1%ギ酸 98%メタノール水溶液, 12 時間で (B) 0% 75%, 流速: 400 nL/分) 行った. 溶出液は ESI のポジティブイオンモードでイオン化して QSTAR XL に導入して MS スキャンした後, マススペクトルの中で強度の高い上位 3 本のピークを順次 MS/MS する data-dependent スキャンを行った. 取得した全スペクトルを MASCOT Server を利用するデータベース解析に付して, 試料中のタンパク質を同定した.

#### 五十肩サンプルの解析

前記で決定した破砕液を用い, ホモジェナイズと超音波処理にて組織を破砕してタンパク質を抽出した後, トリプシン消化処理したものを nanoLC/ESI-MS/MS で測定して試料中のタンパク質の相対発現量を解析した. 凍結肩と腱板断裂肩で, 同一部位のサンプル間で発現量に有意差 (マンホイットニー検定:  $p < 0.05$ ) の認められたタンパク質に着目し, Biological process および KEGG process に基づく Gene ontology 解析を実施して変動のあったタンパク質の機能について解析した.

#### (2) 光音響顕微鏡装置の開発

これまでの解析から, 凍結肩の関節包では幼弱な血管新生が認められているため, 本研究では血管の描出に主眼を置いた装置開発を行った. 採取したサンプルを生理食塩水に浸し, 中心周波数 20 MHz, 128 ch の超音波リニアアレイプローブに光ファイバー 7 本を挿入した超音波/光音響センサーを用い, 各チャンネルから得られた超音波/

光音響 RF 信号を画像化した. 照射するレーザーの波長は可変で最適なレーザー波長および出力を調整した.

#### 4. 研究成果

##### (1)- 破砕溶媒の検討・再現性の検討

破砕液 (8 M Urea) で処理したサンプルを測定して同定されたタンパク質は 1,161 種 (サブタイプを含む) であった. また, 破砕液 (12 mM SDC/12mM SDDS) で処理したサンプルを測定して同定されたタンパク質は, 1,314 種 (サブタイプを含む) であった. サンプルに含まれるタンパク質濃度と正の相関を示す値 (emPAI) は, 両破砕液によって異なる傾向を示した.

一方, 同定できるタンパク質の種類や量の再現性を検討した結果, 両破砕液とも emPAI のばらつきは 2 倍以内に収まっており, ある程度の再現性は確保できたものと判断した.

以上より本研究の目的は網羅的なタンパク質解析のため, 同定数のより多い 12 mM SDC/12mM SDDS が適切な破砕液であるものと判断した.

##### (1)- 五十肩サンプルの解析

2014 年 1 月から 2014 年 12 月まで, 凍結肩で手術を行った特発性凍結肩 12 肩, および関節可動域制限のない腱板断裂肩 7 肩 (コントロール群) から (腱板疎部, 烏口上腕靭帯, 下上腕関節靭帯) をそれぞれ採取した. 平均年齢と内訳は凍結肩で 56.3 歳 (44-71, 男性 3 肩, 女性 9 肩), 腱板断裂肩では 63 歳 (51-76, 男性 5 肩, 女性 2 肩) であった. 両群間の年齢に有意差はなかった ( $p = 0.31$ ). 凍結肩および腱板断裂肩で 1,342 個のタンパク質を同定できた. 腱板断裂肩と比較して凍結肩では, 腱板疎部で 98 個, 烏口上腕靭帯で 90 個, 下上腕関節靭帯で 14 個のタンパク質が有意に増加していた (図 1).

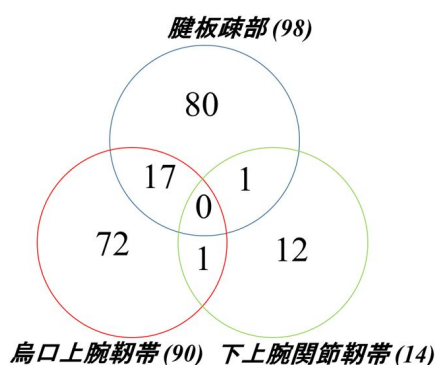


図1: 凍結肩 > 腱板断裂

逆に凍結肩において, 腱板疎部で 13 個, 烏口上腕靭帯で 43 個, 下上腕関節靭帯で 197 個のタンパク質が減少していた (図 2).

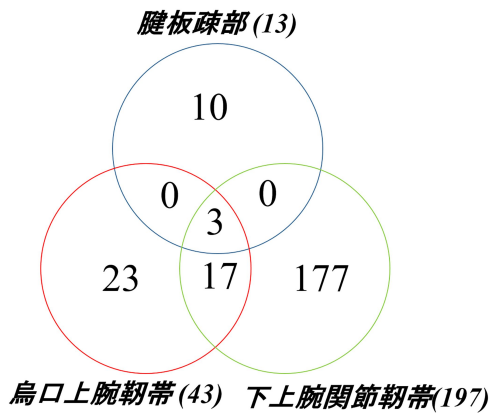


図2: 凍結肩 < 腱板断裂

凍結肩で増加するタンパク質は、3 部位とも共通したものはなく、腱板疎部と烏口上腕靭帯との間で 17 個、腱板疎部と下上腕関節靭帯および烏口上腕靭帯と下上腕関節靭帯との間でそれぞれ 1 個ずつであった。逆に凍結肩で 3 部位とも共通して減少しているタンパク質は 3 個、烏口上腕靭帯と下上腕関節靭帯との間で 17 個あった。凍結肩で増加するタンパク質は腱板疎部と烏口上腕靭帯で、減少するタンパク質は烏口上腕靭帯と下上腕関節靭帯で類似性が認められた。

次に凍結肩と腱板断裂のサンプルの内、1 部位で有意差があり、尚且つ、1.5 倍以上の発現量変動があるタンパク質に対して、Gene ontology 解析を行った。凍結肩で有意に促進されている機能は、Biological process では、腱板疎部で 12 個、烏口上腕靭帯で 24 個、下上腕関節靭帯で 5 個、逆に凍結肩で有意に減少している機能は、腱板疎部で 1 個、烏口上腕靭帯で 6 個、下上腕関節靭帯で 45 個であった。凍結肩で増加している上位 10 個については、腱板疎部で cell adhesion, collagen catabolic process, collagen fibril organization, cell adhesion, ER to Golgi vesicle-mediated transport, endodermal cell differentiation, skeletal system development, skin development, acute-phase response, response to hydrogen peroxide, 烏口上腕靭帯で extracellular matrix organization, cell adhesion, hemidesmosome assembly, blood coagulation, fibrin clot formation, response to hydrogen peroxide, collagen catabolic process, negative regulation of endopeptidase activity, brown fat cell differentiation, positive regulation of peptide hormone secretion, complement activation, classical pathway, 下上腕関節靭帯で muscle organ development, collagen fibril organization, response to hydrogen peroxide, collagen catabolic process, skeletal system development であ

り、3 部位で 4 つの機能が共通していた。逆に凍結肩で減少している上位 10 個については、腱板疎部で cell adhesion, 烏口上腕靭帯で receptor-mediated endocytosis, antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent, inflammatory response, proteolysis, phagocytosis, engulfment, innate immune response, 下上腕関節靭帯で platelet degranulation, complement activation, classical pathway, receptor-mediated endocytosis, complement activation, negative regulation of endopeptidase activity, innate immune response, regulation of complement activation, proteolysis, lipoprotein metabolic process, retinoid metabolic process であり 3 部位で共通した機能はなく、烏口上腕靭帯と下上腕関節靭帯で 3 つの機能が共通していた。KEGG pathway では、凍結肩では腱板疎部で 5 個、烏口上腕靭帯で 9 個、下上腕関節靭帯で 4 個が増加し、腱板疎部で 0 個、烏口上腕靭帯で 2 個、下上腕関節靭帯で 8 個が減少していた。凍結肩の 3 部位で増加していたのは ECM-receptor interaction, Protein digestion and absorption, Focal adhesion, Amoebiasis であり、凍結肩の烏口上腕靭帯と下上腕関節靭帯で減少するのは Phagosome と Prion diseases であった。解剖学的には腱板疎部が最上位、下上腕関節靭帯が最下位に位置しているが、両者のタンパク機能は共通する部分がほとんどなく、中間に位置する烏口上腕靭帯は両者の中間のタンパク機能をも有することが明らかとなった。

#### (2) 超音波顕微鏡装置の開発

ヒトの指における細動脈の描出には、赤色に吸収される 532nm が最適であった。凍結肩及び腱板断裂肩のサンプルでは、実際の血流がなく、残存する赤血球を頼り描出を試みたが難しかった。今後は、凍結肩で増加しているプロテオグリカンの描出に向けた、最適な周波数の設定が必要である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. 関節拘縮の機序. 萩原嘉麿, 矢部 裕, 金澤憲治, 小出将志, 関口拓矢, 西條芳文, 井樋 栄二. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、セッション：パネルディスカッション 「癒着、癒痕、拘縮の制御」 2015.10.22-23, 富山(富山国際会議場)
2. プロテオーム解析による凍結肩の病態解明. 萩原嘉麿, 安藤晃, 金澤憲治, 小出将志,

関口拓矢, 森大, 井樋栄二. 第 43 回日本肩  
関節学会). 2016.10.21-22, 広島 (リーガ  
ロイヤルホテル広島) (Best abstract)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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

萩原 嘉廣 (HAGIWARA YOSHIHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：90436139

##### (2) 研究分担者

西條 芳文 (SAIJO YOSHI FUMI)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：00292277

土谷 昌広 (MASAHIRO TSUCHIYA)  
東北福祉大学・健康科学部・准教授  
研究者番号：60372322

森 大 (MASARU MORI)  
慶応義塾大学・先端生命科学研究所・助教  
研究者番号：00588981

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )