

研究題目 腰部脊柱管狭窄症における肥厚黄色靱帯のタンパク解析

研究組織

研究代表者：佐藤紀（徳島大学病院医員）

共同研究者：谷口寿章（徳島大学疾患酵素学研究センター）

谷口貴子（徳島大学疾患酵素学研究センター）

研究分担者：安井夏生（徳島大学 HBS 研究部）

合田有一郎（徳島大学病院医員）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

腰部脊柱管狭窄症は、高齢者の代表的脊椎疾患である。社会全体の高齢化がすすみ、本疾患に罹患する患者数は非常に多い。腰部脊柱管狭窄症は、脊柱管内を走行している神経組織に対する圧迫であり、主な原因に黄色靱帯の肥厚が挙げられる。しかし、なぜ黄色靱帯が肥厚するのかは未だ解明されていない。黄色靱帯肥厚の原因は細胞外マトリックス（ECM）の変化にある。そこで、肥厚に伴う ECM の構成タンパク質の変化を解析することが可能となれば、靱帯肥厚の機序解明の一助になると考えられる。

過去に黄色靱帯の詳細なタンパク質解析を行った報告は無い。一つの原因は、黄色靱帯はエラスチン（不溶性）を主とする ECM が豊富な組織であり、これまで組織の完全可溶化が出来なかったからである。従来の方法（加水分解）では、アミノ酸組成から組織に含まれるコラーゲンとエラスチンの比は分かっても、コラーゲンの詳細（タイプ別）や、その他の構成タンパク質を調べることは出来なかった。

我々は、前年度に（平成 22 年度）、黄色靱帯の完全可溶化に成功し、初めて、質量解析にて黄色靱帯の構成タンパク質の同定に成功した（2011 年米国整形外科基礎学会にて発表）。このように組織の完全可溶化が可能となったので、今後、病的な黄色靱帯（腰部脊柱管狭窄症における肥厚した高齢者黄色靱帯）と正常な黄色靱帯（肥厚の無い若年者黄色靱帯）間におけるタンパク質レベルでの違いを明らかにし、本疾患の病態解明に繋げることを目的としている。

[1-2] 研究の方法・経過

手術時に得られた肥厚したヒト黄色靱帯（肥厚群）と肥厚していないヒト黄色靱帯（非肥厚群）を用いた。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にて承認を受け、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。

黄色靱帯を十分に洗浄し、血液を除去した。洗浄した黄色靱帯を薄切後、化学物質（臭化シアニド：BrCN）や複数のタンパク分解酵素（酵素 X、lysyl endopeptidase、trypsin）を用いて、全てのタンパクをペプチドに分解し、完全可溶化した（図 1）。こうして得られたペプチド混合物を質量解析計（Finnigan LTQ-FT）を用いたプロテオミクスにより解析した。Mascot を用いたデータベース検索により、黄色靱帯の構成タンパク質の同定を行った。

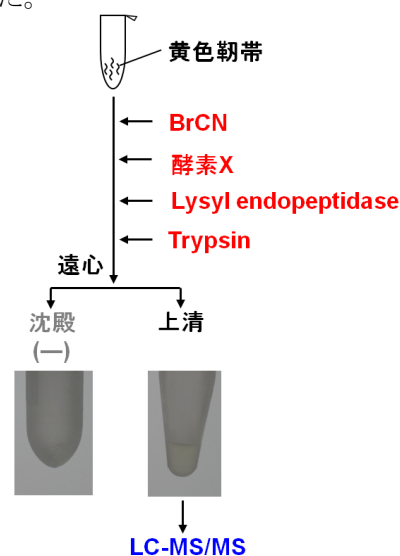


図 1：ヒト黄色靱帯の可溶化法

【2】研究成果

【2-1】本共同研究で明らかになった研究成果

ヒト黄色靭帯（肥厚群と非肥厚群）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。また、アキレス腱も同様の手法により解析することが出来た。その結果、エラスチン、種々のコラーゲン（タイプ別）等の同定を行うことができた。構成タンパクの割合を調べることができた。大まかに言って、黄色靭帯においては弾性線維を形成するエラスチンが主要成分であり、さらにユニークなコラーゲンアイソフォームが見られたのに対し、アキレス腱においてはエラスチンは殆どみられず、膠原線維を形成するI型コラーゲンをはじめとする多くのコラーゲンアイソフォームが同定された。

一方、黄色靭帯において、非肥厚群では、弾性線維が多く膠原線維が少ないのに対し、肥厚群では弾性線維が減少し、膠原線維が増加することが分かった。これらの結果は、黄色靭帯とアキレス腱の機能の相違がタンパク質構成に反映していること、黄色靭帯の肥厚が膠原線維の増加を伴うことなどを示している。

【2-2】本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本年度の共同研究を通じ、黄色靭帯組織の完全可溶化とプロテオーム解析に成功した（腱組織でも同様に成功した）。これにより、今まで不可能と言われていた、ECMが豊富な組織（腱・靭帯だけでなく、皮膚・血管・骨・軟骨等）への応用も期待できる。これら組織への応用が可能となれば、各組織のタンパク質組成が判明するだけでなく、正常な組織と病的な組織との違いが分かり、将来的に各疾患の病態解明に貢献すると期待される。

【3】主な発表論文等

論文発表、学会発表、成果資料等

<学会発表>

Quantitative Proteomic Analysis of Human Tendon and Ligament

Sato, N; Taniguchi, T; Goda, Y; Kosaka, H; Higashino, K; Sakai, T; Sairyō, K; Katoh, S; Taniguchi, H; Yasui, N

(2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, USA, 2012.2.4-7.)

不溶性細胞外マトリックスの可溶化と解析

—ヒト腱・靭帯のプロテオーム解析—

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

(第43回日本結合組織学会学術集会、別府市、2011.6.10-11)

Development of a Method for Proteomic Analysis of Human Yellow Ligament

Sato, N; Taniguchi, T; Goda, Y; Kosaka, H; Higashino, K; Sakai, T; Sairyō, K; Katoh, S; Taniguchi, H; Yasui, N

(2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Long Beach, USA, 2011.1.13-16.)

Establishment of a Method for Proteomic Analysis of Human Achilles Tendon

Sato, N; Taniguchi, T; Goda, Y; Kosaka, H; Higashino, K; Sakai, T; Sairyō, K; Katoh, S; Taniguchi, H; Yasui, N

(2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Long Beach, USA, 2011.1.13-16.)

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後、肥厚した黄色靭帯の部位別のプロテオーム解析を行い、各部位でタンパク質構成がどのように変化しているかを明らかにしたい。これにより、靭帯肥厚の機序解明の一助となると考えている。腰部脊柱管狭窄症の根治的治療として、黄色靭帯の外科的摘出に頼っているのが現状である。靭帯の肥厚の機序が明らかとなれば、創薬等新たな治療法の開発へと繋げていくことができると期待される。