

論 文 内 容 要 旨

題目 Proteomic Analysis of Human Tendon and Ligament:
Solubilization and Analysis of Insoluble Extracellular Matrix
in Connective Tissues

(ヒト腱・靭帯のプロテオーム解析:結合組織における不溶性細胞
外マトリックスの可溶化と解析)

著者 Nori Sato, Takako Taniguchi, Yuichiro Goda, Hirofumi Kosaka,
Kosaku Higashino, Toshinori Sakai, Shinsuke Katoh, Natsuo Yasui,
Koichi Sairyo, Hisaaki Taniguchi
平成 28 年 12 月発行 Journal of Proteome Research 第 15 巻第
12 号
4709 ページから 4721 ページに発表済

内容要旨

【背景】

近年、ヒトプロテオームマップの発表などプロテオミクスの発展がみ
られているが、腱、靭帯などの結合組織は不溶性であるため、それらのプロ
テオーム解析は、ほとんど報告がない。腱、靭帯は、細胞成分が少なく、
細胞外マトリックスに富み、分子間の架橋等のため、プロテオーム解析に
適した可溶性サンプルを調製することは、これまでは出来ないとされてい
た。本研究では、腱、靭帯のプロテオーム解析を可能とするために、化学
分解と複数のタンパク質分解酵素の組み合わせにより、これらの組織の完
全可溶化を試みた。

【方法・結果】

解析試料には、下肢切断手術時に得られたヒトアキレス腱 (AT)、手術
時に得られた腰部脊柱管狭窄症患者のヒト黄色靭帯 (YL) を用いた。臭化
シアンと複数のタンパク質分解酵素 (エラスターゼ、リジルエンドペプチ
ダーゼ、トリプシン) を用い、ペプチドに分解し、完全可溶化した。可溶
化および解析方法として、①処理順に得られた 4 つの画分をそれぞれ解析
し微量タンパク質の検出を可能とする質的解析方法、②分画せず全てを一
度に可溶化し目的のタンパク質を定量する定量的解析方法、の 2 方法を用
いた。タンパク質の同定には、質量分析によるプロテオミクスの手法を用

いた。

質的解析方法では、ATでは502個、YLでは378個のタンパク質が同定された。エラスチン、種々のコラーゲン、グリコプロテイン、プロテオグリカン等が認められた。コラーゲン類は、ATではI型コラーゲンが大半を占め、YLではI型に次いでIII型コラーゲンが多く認められた。その他の細胞外マトリックスタンパク質として、ATではCartilage oligomeric matrix protein (COMP)、YLではフィブロネクチンが多く認められた。

定量的解析方法では、標準タンパク質（精製I型コラーゲン、III型コラーゲン、エラスチン）をAT・YLと同様に処理し、ピーク強度を比較することで、AT・YLにおけるこれらタンパク質の定量が可能となった。

さらに、I型コラーゲン、III型コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンについては、免疫染色による発現の確認と局在を明らかにした。

【考察】

アキレス腱、黄色靭帯の完全可溶化とプロテオーム解析に成功し、構成タンパク質を網羅的に同定し、組織特異的な細胞外マトリックス関連タンパク質の発現を突き止めた。これらの特異性は、アキレス腱、黄色靭帯における膠原線維や弾性線維との分子間ネットワークの違いによるものと考えられる。

ヒト黄色靭帯のコラーゲンとエラスチンの量比について、従来報告されているよりもエラスチンの占める割合が高いことが分かった。また、これまで報告のない、コラーゲンのタイプ別発現についても詳細に示すことができた。臨床的には腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯において、III型コラーゲン、フィブロネクチンが多く認められ、黄色靭帯肥厚の病態に線維化および創傷治癒の関与の可能性が示唆された。

【結論】

腱・靭帯のタンパク質の完全可溶化法を確立し、網羅的プロテオーム解析により、組織特異的タンパク質の発現およびコラーゲンのタイプ別の詳細な発現パターンを明らかにした。腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯肥厚の病態に線維化および創傷治癒が関与している可能性を示し、黄色靭帯肥厚の分子メカニズムの解明への道を開いた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	甲医第 1313 号	氏 名	佐藤 紀
審査委員	主査 福井 清 副査 橋本 一郎 副査 久保 宜明		

題目 Proteomic Analysis of Human Tendon and Ligament: Solubilization and Analysis of Insoluble Extracellular Matrix in Connective Tissues

(ヒト腱・靭帯のプロテオーム解析: 結合組織における不溶性細胞外マトリックスの可溶化と解析)

著者 Nori Sato, Takako Taniguchi, Yuichiro Goda, Hirofumi Kosaka, Kosaku Higashino, Toshinori Sakai, Shinsuke Katoh, Natsuo Yasui, Koichi Sairyō, Hisaaki Taniguchi
 平成 28 年 12 月発行 Journal of Proteome Research 第 15 巻第 12 号
 4709 ページから 4721 ページに発表済
 (主任教授 西良 浩一)

要旨 腱、靭帯などの結合組織は不溶性であるため、それらのプロテオーム解析は、ほとんど報告がない。本研究では、腱、靭帯のプロテオーム解析を可能とするために、化学分解と複数のタンパク質分解酵素の組み合わせにより、これらの組織の完全可溶化を試み、プロテオーム解析を行った。解析試料には、手術時に得られたヒトアキレス腱、腰部脊柱管狭窄症患者のヒト黄色靭帯を用いた。得られた結果は以下の通りである。

①臭化シアンと複数のタンパク質分解酵素を用いてペプチドに分

解し、完全可溶化することに成功し、腱、靭帯のプロテオーム解析を可能とした。

②質的解析方法では、アキレス腱では 502 個、黄色靭帯では 378 個のタンパク質が同定された。アキレス腱では I 型コラーゲン、Cartilage oligomeric matrix protein 等が多く認められた。黄色靭帯ではエラスチン、I 型コラーゲンに加え、創傷治癒に関与する III 型コラーゲン、フィブロネクチン等が多く認められた。

③定量的解析方法では、標準タンパク質をアキレス腱・黄色靭帯と同様に処理し、ピーク強度を比較することで、従来の報告と比べて、より正確なコラーゲン、エラスチン組成を得た。

④ I 型コラーゲン、III 型コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンについて、免疫染色による発現の確認と局在を明らかにした。

以上の結果から、腱・靭帯のタンパク質の完全可溶化法を確立し、網羅的プロテオーム解析により、組織特異的タンパク質の発現およびコラーゲンのタイプ別の詳細な発現パターンを明らかにした。さらに臨床的には、腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯肥厚の病態に線維化および創傷治癒が関与している可能性を示した。本研究は、今まで不可能とされていた不溶性細胞外マトリックスの完全可溶化とプロテオーム解析に成功し、様々な結合組織疾患の病態解明への道を開いたもので、学位授与に値するものと判定した。