

平成 27 年度 修士論文

靱帯修復過程における
エラスチンの機能に関する研究

三重大学大学院 工学研究科

博士前期課程 分子素材工学専攻

晝河 政希

目 次

1 緒言	1
1-1 再生医学と組織工学	1
1-2 膝関節靱帯	1
1-2-1 前十字靱帯	
1-2-2 内側側副靱帯	
1-2-3 靱帯損傷と再建手術	
1-3 細胞外マトリックス	3
1-3-1 エラスチン	
1-3-2 コラーゲン	
1-4 エラスチン結合タンパク質	5
1-4-1 エラスチン結合タンパク質の種類	
1-4-2 エラスチン結合タンパク質の機能	
1-5 本研究の目的	8
2 方法	9
2-1 靱帯損傷モデルへのエラスチン投与試験	9
2-1-1 不溶性エラスチンおよび水溶性エラスチンの抽出と分画	
2-1-2 ウサギ靱帯損傷モデルの作製	
2-1-3 遺伝子発現解析	
2-1-4 タンパク質発現解析	
2-1-5 組織の力学試験	
2-2 エラスチン結合タンパク質の探索	13
2-2-1 靱帯細胞の単離と継代培養	
2-2-2 不溶性エラスチン粒子の作製	
2-2-3 細胞からのタンパク質抽出	
2-2-4 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ	
2-2-5 タンパク質の定量	
2-2-6 タンパク質の同定	
2-2-7 エラスチンによる同定タンパク質の遺伝子発現変化(<i>in vitro</i>)	
2-2-8 エラスチンによる同定タンパク質の遺伝子発現変化(<i>in vivo</i>)	
2-3 統計処理	16

3 結果	17
3-1 靱帯損傷モデルへのエラスチン投与試験	17
3-1-1 靱帯断裂部へのエラスチンの効果	
3-1-2 靱帯―骨接合部へのエラスチンの効果	
3-1-3 組織力学特性へのエラスチンの効果	
3-1-4 エラスチン投与試験結果一覧	
3-2 エラスチン結合タンパク質の探索	23
3-2-1 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ	
3-2-2 Elastin Binding Protein (EBP)の発現確認	
3-2-3 SDS-PAGE	
3-2-4 MALDI-TOFMS によるタンパク質同定	
3-2-5 MALDI-TOFMS 解析結果詳細	
3-2-6 エラスチンによる同定タンパク質の遺伝子発現変化(<i>in vitro</i>)	
3-2-7 エラスチンによる同定タンパク質の遺伝子発現変化(<i>in vivo</i>)	
4 考察	39
4-1 靱帯修復時のエラスチンの機能	39
4-1-1 エラスチン投与による遺伝子・タンパク質発現への影響	
4-1-2 エラスチン投与による力学特性への影響	
4-2 損傷靱帯の治癒プロセスおよび試験期間に関して	42
4-3 靱帯細胞と創傷治癒	43
4-3-1 靱帯細胞	
4-3-2 創傷部位における細胞の働き	
4-4 細胞によるエラスチンの認識	44
4-4-1 Galectin-3 による認識	
4-4-2 Cyclophilin B による認識	
4-4-3 CAP18 による認識	
4-5 材料としてのエラスチンおよびエラスチン結合タンパク質	49
4-5-1 本研究で用いたエラスチンについて	
4-5-2 組織工学的人工材料への応用	
5 結論	55
6 参考文献	56
7 謝辞	60

1 緒言

1-1 再生医学と組織工学

生体の組織や細胞には自己再生能力が備わっているが、そのような再生能力が追いつけない程の大きな障害等を受けた場合、治療方法として臓器移植が検討されることがある。しかし、臓器移植にはドナー不足や生体適合性等の様々な問題が存在するため、実際に治療を受けられる患者は限られている。そこで、生体が持つ自己再生能力に注目し、患者自身の細胞を用いることによって生体適合性の高い人工組織・臓器を再建するといった再生医学が注目されている。

再生医学の分野の中には、生きた細胞を用いることで、より本来の機能に近いような臓器や組織をつくり出すことを目的とする組織工学という分野が存在する。この再生医学・組織工学を確かなものにするためには、細胞の機能制御や細胞とその存在している環境について詳細に調査することが必要となる。細胞外の環境として、細胞の周りには細胞外マトリックス(ECM:Extra Cellular Matrix)と呼ばれる物質が多く存在しており、近年ではこの ECM と細胞の関係や機能制御に関する理解が組織工学における重要事項となっている¹⁾²⁾。

1-2 膝関節靱帯

靱帯は結合性の組織であり、関節で骨と骨を接合し、その安定性を維持している。実際、ヒトの膝関節には 4 つの靱帯組織(Ligament)が存在し、関節内で前十字靱帯(ACL: Anterior Cruciate Ligament)と後十字靱帯(PCL: Posterior Cruciate Ligament)が、関節外で内側側副靱帯(MCL: Medial Collateral Ligament)と外側側副靱帯(LCL: Lateral Collateral Ligament)が大腿骨(太もも側)と脛骨(すね側)を接合しており、どれもが膝の安定性に寄与している(Fig.1-1)。

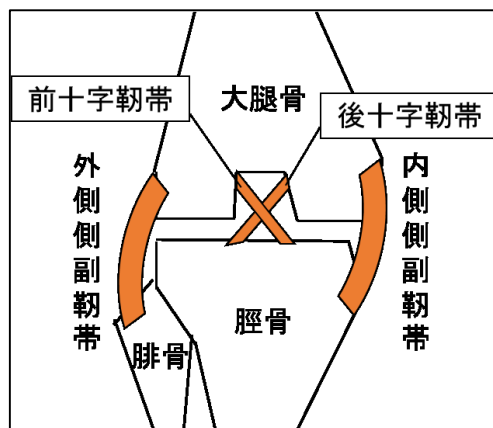


Fig.1-1 膝関節靱帯の模式図

1-2-1 前十字靱帯(ACL: Anterior Cruciate Ligament)

ACL は膝関節内の中央に位置している線維性結合組織であり、大腿骨と脛骨を強く結び付けている(Fig.1-2)。ACL は、大腿骨に対して脛骨が前方へずれることを防ぐ役割を果たしており、膝の安定性維持において非常に重要な役割を果たしている³⁾⁴⁾。ACL は主に組織に強度を与えるコラーゲンや、弾性を与えるエラスチンといった ECM と、靱帯線維と平行に配向した紡錘状の靱帯細胞で構成されている⁵⁾。

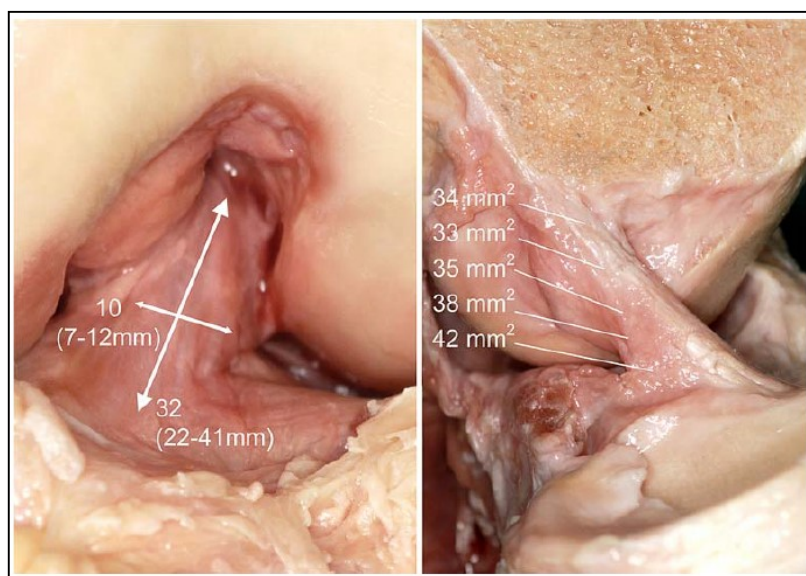


Fig.1-2 ヒト膝関節内 ACL⁶⁾
左図:膝関節正面図、右図:関節断面図

ヒト ACL においては、長径約 32 mm のうち、6 %程度の伸張(約 2 mm)により損傷することが報告されている⁷⁾。また、ACL は血管の乏しい環境下にあるため、一般に断裂 ACL が自然治癒による再生は見込めないとされている。

1-2-2 内側側副靱帯(MCL: Medial Collateral Ligament)

MCL は膝関節靱帯の中で損傷を受けやすい靱帯のひとつであり、関節の外反方向の動きを制御している。損傷原因としては、サッカーやスキーといったスポーツ時に損傷することが多く、MCL 損傷時には保存療法がとられることが多い。

1-2-3 靱帯損傷と再建手術

近年、スポーツ等の運動時に起こる無理な動きや加齢、肥満が原因となって靱帯に負荷がかかり、靱帯損傷が起こるケースが多くなっている。また、ACLなどの関節内靱帯は血管が乏しい環境下に存在しているため、周囲からの修復が望めず、損傷した状態で長期間放置すると組織が退縮するという報告もある⁸⁾。また、靱帯損傷により関節の安定性が損なわれることで変形性関節症などの二次的損傷につながることも多い。そこで靱帯損傷時には、人工靱帯を移植する方法、代替組織として自分の腱を移植する方法(自家移植)によって再建手術が行われる。しかし再建手術には問題となる点が存在し、人工靱帯では磨耗粉や生体適合性、自家移植では代替組織の採取部位の強度低下やそもそも採取困難なケースが挙げられる。このような問題点を解決するために、患者自身の細胞から作製するような生体適合性の高い組織工学的な人工靱帯の開発が必要とされている。

1-3 細胞外マトリックス(ECM:Extra Cellular Matrix)

多細胞生物においては、組織中の細胞同士の間、あるいは細胞集団同士の隙間を埋めるような物質が必要となる。この物質をECMと呼び、細胞の外側で細胞間の接着や引張り、また、圧縮などの外圧に対抗するための強度を持った物質の総称である。

ECMは細胞が存在するところには必ず存在している。そのため全身のあらゆる臓器、組織に存在しており、臓器の支持や、境界をつくるといった役割を果たしている。他にもECMは細胞の生存環境を形成しているため、細胞の移動や接着といった機能にも関係している。

ECMには、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン等の線維状タンパク質や糖タンパク質が主として含まれており、組織によって組成やその種類は極めて多様性に富むことが知られている⁹⁾。

1-3-1 エラスチン(Elastin)

細胞外マトリックスの一つであるエラスチン(Fig.1-3)は分子量が約 67 kDa の不溶性タンパク質である。エラスチンは線維状のタンパク質で、生体を構成しているECMの中でコラーゲンに次いで多く⁹⁾、その役割は、コラーゲンは組織に強度や張力を与えているのに対して、エラスチンは組織に伸縮性や弾性を与えている。特に靱帯、大動脈、肺、皮膚などの伸縮性や弾性を伴う組織に多く見られ、その組織中の細胞(線維芽細胞や平滑筋細胞など)によって前駆体であるトロポエラスチンとして産生される¹⁰⁾。産生されたトロポエラスチンは、生体内架橋反応(分子中のリシン側鎖に銅イオン、リシルオキシダーゼが働く)を経て不溶性のエラスチンとして形成

される。架橋構造は、トロポエラスチン分子間の 4 つのリシン側鎖から成るデスモシン、イソデスモシンと呼ばれる特徴的なもので、この架橋の存在によってエラスチンは弾性に富むタンパク質となっている。また、生体内のエラスチンが不溶性であるのもこの架橋構造を有しているからである^{10) 11)}。

また、エラスチン分子内の VGVAPG (Val: バリンー Gly: グリシンー Val: バリンー Ala: アラニンー Pro: プロリンー Gly: グリシン) という特徴的なアミノ酸配列が細胞の認識する部位であり、細胞の接着領域となる^{10) 12)}。

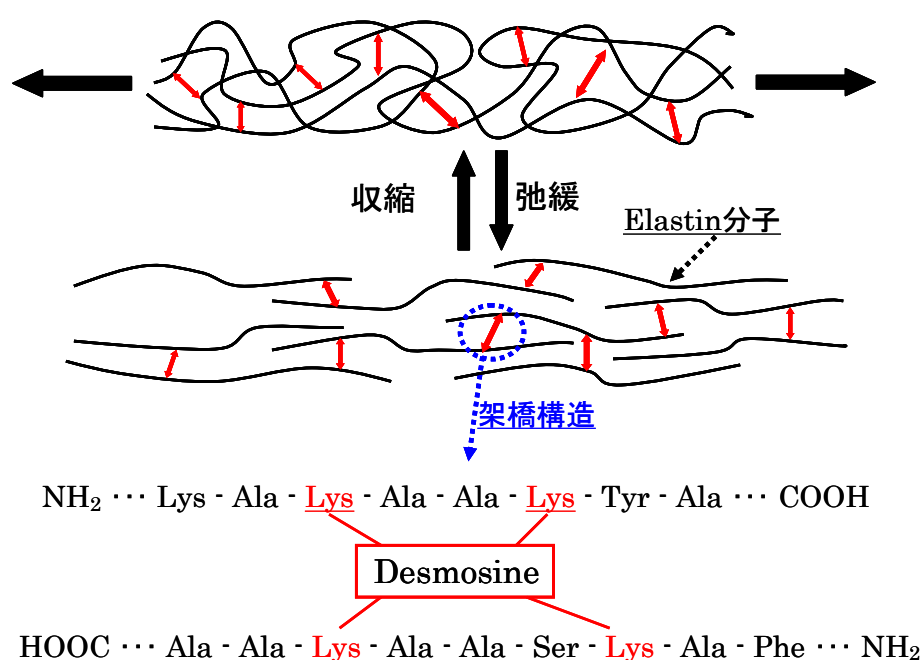


Fig.1-3 エラスチンの構造

1-3-2 コラーゲン (Collagen)

コラーゲンはタンパク質の一種であり、骨や腱などの組織に多く存在している、主に組織に力学的強度を与えている。また、コラーゲンは約十万種ある生体内のタンパク質の中で 3 割程度を占めている。

コラーゲンの役割は、体全体だけでなく臓器やその他の形を維持し、境界を作ることが挙げられる。また、細胞の足場としても働いており、この足場としてのコラーゲンの存在により細胞は分裂や増殖をすることが可能となっている。

コラーゲンのペプチド鎖を構成しているアミノ酸配列は、GPHyp (G: グリシンー P: プロリンー Hyp: ヒドロキシプロリン) と、グリシンが 3 残基ごとに繰り返す一次構造である。また、大部分のコラーゲンのタイプは、トロポコラーゲン (分子量 100kDa 程度

の1本のペプチド鎖)が3本集まり、らせん構造を形成し、コラーゲン分子となっている。さらにこの分子同士が架橋構造を形成して結びつくことで、その結合強度を高めている。

1-4 エラスチン結合タンパク(エラスチンレセプター)

生体内で伸縮性を必要とされている心臓や肺、靱帯にはエラスチンと微細線維(マイクロフィブリル)から構成される弾性線維が存在している。これらの臓器が損傷を受け修復する際には、線維形成に関わるタンパク質が重要となる。

1-4-1 組織中のエラスチン結合タンパク質の種類

弾性線維の主要成分であるエラスチンに結合能を示すタンパク質は、現在11種類が報告されている。また、これらのうちの4種類がエラスチンレセプターとして報告されている(Table.1-1)。しかし、ここに挙げたタンパク質以外にもエラスチンと相互作用を持つ事が報告されており、今後も引き続き調査が必要である。

Table.1-1 既知のエラスチン結合タンパク 13-20)

Elastin binding protein	
Elastin Receptor	ERC (Elastin Receptor Complex)
	$\alpha\text{v}\beta 3$ integrin
	Galectin-3
	Lactose-insensitive receptor
L-ficolin	
Fibrillin-1	
Fibrin-5	
MAGP-1 (Microfibril Associated GlycoProtein)	
EMILIN-1 (Elastin Microfibril Interface Located protein)	
EbpS (Elastin binding protein Staphylococcus aureus)	
FKBP10 (FK506 Binding Protein)	

1-4-2 エラスチン結合タンパク質の機能

エラスチンを含む組織が損傷した際には、エラスチンと相互作用するタンパク質がその治癒に関与すると考えられる。エラスチン結合タンパク質は組織の治癒プロセスにおいて組織再生を促進し、その機能回復および維持を行うため、以下の3つのプロセスに関与する。

- i) トロポエラスチンの産生
- ii) エラスチン線維の形成
- iii) 線維形成後段階(エラスチン保護段階)

第一段階であるトロポエラスチンの産生では、エラスチン産生細胞が損傷部位に遊走し、基質産生が促される必要がある。この時、損傷時に発生したエラスチン断片が細胞の遊走能を活性化させる報告がある。この活性化のシグナリングを仲介するエラスチンレセプターは ERC (Elastin Receptor Complex) であると考えられているが、ERC 以外によるシグナリングの報告もある¹⁴⁾。

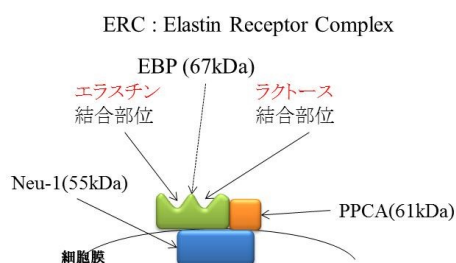


Fig.1-5 ERC 三量体構造

ERC は EBP (Elastin Binding Protein, 67kDa) と細胞膜貫通型の Neu-1 (Neuraminidase-1, 55kDa)、PPCA (Protective Protein Cathepsin-A, 61kDa) と三量体を形成する (Fig.1-5)。三量体内、EBP がエラスチンと結合能を持ち、Neu-1 と PPCA は酵素からのエラスチン分解を保護する役割を持つと考えられている²¹⁾。EBP はエラスチン分子内の XGXXPG 配列 (X: 任意アミノ酸) を認識し結合する。エラスチンと結合した EBP は ERC を形成した状態でシャペロンとして機能し、ラクトース結合部位へのラクトース結合によってエラスチンとの結合を解離していると考えられている (Fig.1-6)。また、細胞膜上ではレセプターとし、細胞の走化性や MMP-1 などの活性化に関与すると考えられている。

断片化エラスチンにより活性化された細胞はエラスチンを産生する。細胞内で産生されたトロポエラスチンは ERC により細胞表面まで輸送される (Fig.1-6)。この時、ERC 以外に FKBP10 (FK506 Binding Protein 10) と呼ばれるタンパク質が細胞内シャペロンとして機能する事が報告されている²⁰⁾。しかし、ERC と比較しエラスチンの結合部位やどのようなメカニズムでシャペロンとしての機能を持つかは不明である。また、遊走後の基質産生の活性化シグナリングを仲介するレセプターの詳細も不明である。

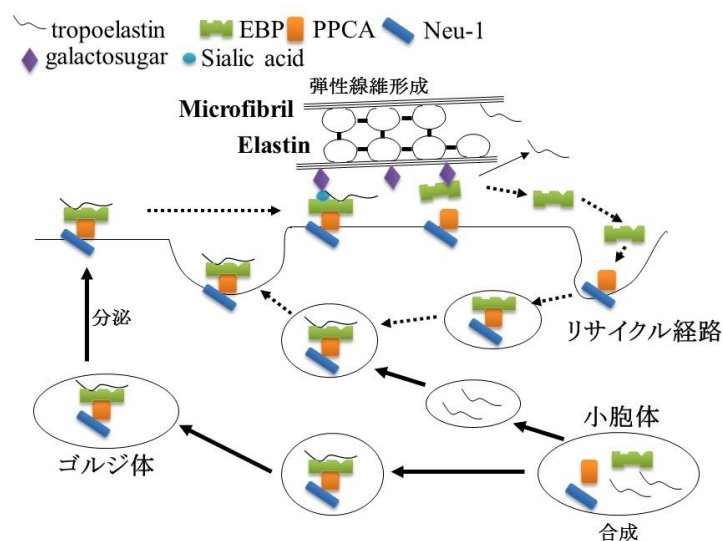


Fig.1-6 ERC エラスチン産生段階～線維形成段階²¹⁾

第二段階であるエラスチン線維形成段階では、細胞表面まで輸送されたトロポエラスチンが ERC や $\alpha\beta$ integrin によりマイクロフィブリル上に転移される²²⁾。そして、マイクロフィブリル内に存在する Fibrin-5 や Fibrillin-1 などと相互作用し、エラスチン線維形成に関与する。しかし、エラスチンとの結合部位や結合能における点は不明である。また、 $\alpha\beta$ integrin はヒトトロポエラスチンとのみ結合能をもち、異種においては ERC のみに関与するとされ、未知なタンパク質の関与も示唆されている。

最後の第三段階であるエラスチン保護段階では、健常状態においてエラスチンは複雑な架橋構造を有する事から高い分解抵抗性を持ち、分解されていない²³⁾。しかし、癌や動脈硬化の様な病変進行時において、エラスチン分解が起こり、そのエラスチン分解産物が更なるエラスチン分解や病的進行を誘発すると考えられている。この時、エラスチン分解酵素の活性化シグナリングを制御する際にもエラスチンレセプターが関与している。しかし、既知のレセプターの関与は確認されず、未知のエラスチンレセプターの存在が報告されている¹⁴⁾。

この様に組織再生を制御する上で、再生過程だけでなく分解過程においてもエラスチン結合タンパクが関与し、未知のエラスチン結合タンパクの存在も示唆されている。今後これらの存在と機能を明らかにする事で、組織再生および機能維持を制御する技術に繋げる事が期待できる。その為に、未だ不明なエラスチン結合タンパクの解明が求められている。

1-5 本研究の目的

本研究の最終的な目的は靱帯組織の再生である。当研究室ではこの目的を達するために、靱帯細胞へのエラスチンの影響や、靱帯細胞と靱帯基質であるエラスチンを組み合わせた組織工学的的人工靱帯を作製する方法について研究を行ってきた。今回の研究目的は以下の通りである。

①生体内(*in vivo*)でのエラスチンの影響調査

当研究室ではこれまでに膝靱帯細胞を用いた *in vitro* での実験を行ってきた。前研究ではエラスチンを靱帯細胞へ添加することで基質産生が促される等のエラスチンの効果が示された。*in vitro* での実験は生体内を模倣した条件下で行われるものであるが、完全に生体内の環境を再現できているわけではない。そこで本研究では実際にウサギモデルを用いることで、*in vivo* での靱帯修復時にエラスチンがどのような役割を果たすのか、その影響調査を行う。

②細胞によるエラスチン認識機構の解明

①で述べたように、*in vitro* においてエラスチンの効果が見られたことから、細胞が何らかの方法によってエラスチンを認識していることは確かである。1-4 で述べたようなエラスチン結合タンパク質の関与が考えられるが、今回用いるウサギモデルにおいても同様の認識機構が関与しているかは不明である。そこで、ウサギ靱帯細胞中のエラスチン結合タンパク質の同定およびその認識機構の解明を行う。

2.方法

2-1 靱帯損傷モデルへのエラスチン投与試験

2-1-1 不溶性エラスチンおよび水溶性エラスチンの抽出と分画

三重県松阪食肉流通センターから提供を受けたブタ大動脈から、中膜層以外の部分を除去した。組織を細かく粉碎した後、エタノールで脱水を行い乾燥させ、不溶性エラスチンを得た。得られた不溶性エラスチンに対してシュウ酸による熱処理分解を行い水溶化処理した後、上澄み液を透析チューブに入れ、外液の pH が 5~6 程度になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を遠心し、上澄み液を凍結乾燥させることで水溶性エラスチンを得た。抽出した水溶性エラスチンを数平均分子量、凝集温度、ゲル弾性率によって分類した。本実験では各分画エラスチンを A、B、C、D、E の 5 種類に分画した。

2-1-2 ウサギ靱帯損傷モデルの作製

ジャパニーズホワイトラビット(メス、12 週齢)の内側側副靱帯(MCL)を金属棒を用いて鈍的に損傷させ(Fig.2-1)、傷口を縫合した。この作業を両膝行い、片膝につき 1 つのサンプルとして用いた。

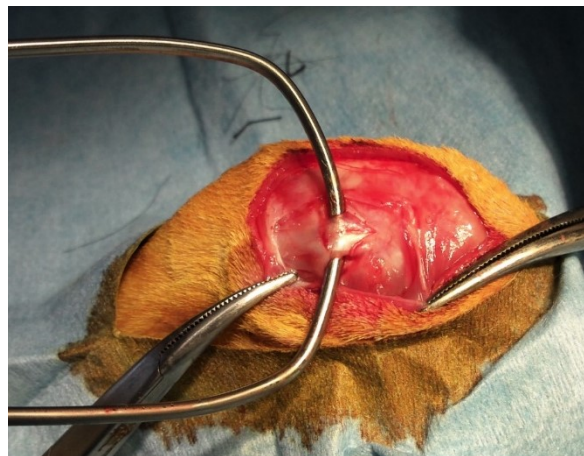


Fig.2-1 MCL 鈍的損傷の様子

手術直後と術後 1 週間ごとに注射により生理食塩水もしくはエラスチン A 溶液(2mg/ml)を手術部位へ投与し、6 週後、12 週後に組織採取を行った。

採取した組織を損傷させた部位(瘢痕組織含む患部)とそれ以外の部位(骨接合部付近の端部)に切り分け、それぞれ real-time PCR により遺伝子およびタンパク質発現を解析した。

実験群は以下に示す 5 つのグループ (Table.2-1) を作製した。注射による投与量は片膝 0.5ml とした。

Table.2-1 エラスチン投与試験の実験群

実験群	A (6 週)	A2 (12 週)	B (6 週)	B2 (12 週)	C
投与液	生理食塩水	生理食塩水	エラスチン A 2mg/ml	エラスチン A 2mg/ml	投与なし
作製数	8 羽	8 羽	8 羽	8 羽	3 羽

*C 群は正常例として作製し、靱帯を損傷させていない。

2-1-3 遺伝子発現解析

三重大学生命科学研究支援センター 遺伝子実験施設の StepOnePlus (Applied Biosystems) を使用して各サンプルの遺伝子発現解析を行った。

サンプルは採取した靱帯組織を凍結磨砕し、RNAisoPlus (TaKaRa) を用いて RNA を抽出した。抽出 RNA を chloroform - isoamylalcohol 24:1 (SIGMA)、isopropanol (SIGMA) を用いて精製し、Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer (BIO RAD) にて定量した。定量後、5xPrimeScript RT Master Mix (TaKaRa) を用いて逆転写させた。得られた cDNA を SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて PCR 解析をした。

本実験でターゲットとした遺伝子 (Table.2-2) とそのプライマー (Table.2-3) について以下に示す。

Table.2-2 ターゲット遺伝子

ターゲット遺伝子	機能
GAPDH	内部標準として使用
I 型コラーゲン	靱帯の主要成分
エラスチン	弾性繊維の主要成分
テノモジュリン	靱帯マーカー
ALP (alkaline phosphatase)	骨分化マーカー、骨形成の初期に発現する。

Table.2-3 PCR プライマー一覧

ターゲット遺伝子	配列
GAPDH ²⁴⁾	Sense: TCACCATCTTCCAGGAGCGA Antisense: CACAATGCCGAAGTGGTCGT
I 型コラーゲン ²⁴⁾	Sense: GATGCGTTCCAGTTCGAGTA Antisense: GGTCTTCCGGTGGTCTTGTA
エラスチン	Sense: GCAGCTAAGGCAGCGAAATAC Antisense: TCCAGCATCTACTGCACCTG
テノモジュリン ²⁵⁾	Sense: CCCAGCAGAAAAGCCTAT TG Antisense: GCGTGACGGGTCTTCTCTAC
ALP (alkaline phosphatase)	Sense: CGAGCTGAACAGGAACAACATC Antisense: GTCAATCCTGCCTCCTTCCA

エラスチン、ALP、のプライマーに関しては Primer 3 Plus、Primer Express 3.0 を用いて設計した。(NCBI で配列を選択した)

得られた結果を $\Delta \Delta C_T$ 法により解析を行い、正常群の値を 1 として相対発現量を算出した。

$\Delta \Delta C_T$ 法

① ΔC_T の算出

$$\Delta C_T = C_T \text{ 値 (ターゲット遺伝子)} - C_T \text{ 値 (GAPDH)}$$

② $\Delta \Delta C_T$ の算出

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ (各サンプル)} - \Delta C_T \text{ (リファレンス (= 正常群))}$$

③ 相対発現量の算出

$$[\text{遺伝子の相対発現量}] = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

2-1-4 タンパク質発現解析

採取した靱帯組織をプラスチック製包埋皿 (Tissue Tek 社) と O.C.T.Compound (Tissue Tek 社) を用いて包埋した。包埋組織は液体窒素を用いて急速凍結した後、組織薄切までの間 -80°C で保存した。薄切にはクライオスタット (MICROM 社) を用い、厚さ $10\mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。靱帯を構成する主な ECM であるコラーゲンおよびエラスチンについて、その存在割合を免疫蛍光染色法における輝度解析によって調査した。

作製した MCL 切片を -20 °C aceton / methanol (1:1) 内にて 5 分間固定した。固定液からサンプルを取り出し、風乾した。乾燥後、1 % BSA/ PBS でブロッキングし、一次抗体 (anti-type I collagen antibody、anti-elastin antibody、alkaline phosphatase、Tenomodulin) を添加し 4 °C の飽和湿度条件下で一晩静置した。PBS にて十分に洗浄した後、二次抗体 (DyLight 649 標識) を添加し、室温で 90 分間静置した。その後、PBS にて十分に洗浄を行ない、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。撮影した画像を、画像解析ソフト ImageJ を用いて画像内の輝度に対しヒストグラムを作成した。ヒストグラムの各度数をそれに対応する階級 (輝度値: 0~255) の値と乗算し、これを合算することでヒストグラムの積分値を測定し、その組織の輝度を算出した。

2-1-5 組織の力学試験

採取した靱帯組織は、厚さ (mm)、自然長 (mm)、幅 (mm)、骨接合部 (大腿骨側 mm、脛骨側 mm)、全長 (mm) をノギスで計測した。

応力歪測定を 15N 程度までの応力で測定し、可逆的な力学刺激状態で繰り返し測定を行った。得られた値から以下の式により弾性率を算出した。測定には Fig.2-2 の装置を用いた。

$$\text{弾性率 (Pa)} = \text{応力 (Pa)} / \text{ひずみ (測定長 mm / 自然長 mm)}$$



Fig.2-2 弾性率測定装置

引張り速度 0.105 mm/s、応力データ収集速度 (10point/s)、測定最大歪 0.3~0.4、測定最大応力 15N の条件で測定した。

2-2 エラスチン結合タンパク質の探索

2-2-1 靱帯細胞の単離と継代培養

ジャパニーズホワイトラビット(メス、12 週齢)から採取した内側側副靱帯から細胞単離を移植片培養法にて行なった。まず、組織に付着した他の組織を取り除き、2-3 mm 程度の大きさに切り分けた。切り分けた組織切片を細胞培養シャーレ上に静置し、37 °C / 5 % CO₂ インキュベータ(池本理化工業)内で 1 時間インキュベートした。その後、組織が剥がれないよう慎重に 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) 含有 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を添加し、培養を開始した。数日後、組織から細胞が十分に遊出したことが確認出来たら (passage 0 と定義)、トリプシン処理にて細胞を剥離させ、靱帯細胞の継代培養を行なった。3 日に 1 度培地交換を行ない、コンフルエント (80%~100%) まで細胞が増殖した時点で細胞からタンパク質を抽出し、使用した。

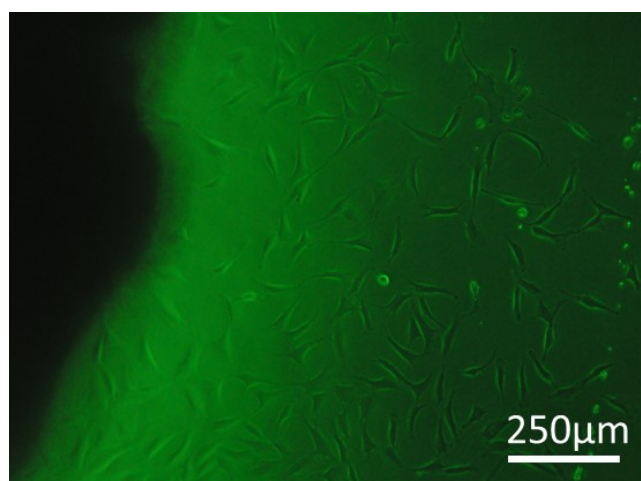


Fig.2-3 単離したウサギ靱帯細胞(位相差顕微鏡)

2-2-2 不溶性エラスチン粒子の作製

乾燥させた不溶性エラスチンをミルにより細かく破碎し、ふるいにかけて粒子径 106 μm 以下を除去した。

得られた不溶性エラスチン粒子を 1.5ml アシストチューブに入れ、0.05M Tris-HCl (pH7.4) で膨潤後、280nm における吸光度測定により 0.5M NaCl、5M 尿素でバックグラウンドレベルまで洗浄し、不溶性エラスチンの非特異的吸着タンパク質の除去を行った。洗浄後の不溶性エラスチン粒子は、0.1%アジ化ナトリウムを含む保存液に浸し 4 °C にて冷蔵保存した。

2-2-3 細胞からのタンパク質抽出

75cm²フラスコにてコンフルエントにまで培養した細胞を PBS で洗浄し、RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz) 及び PMSF、Protease inhibitor cocktail、オルトバナジン酸ナトリウムを添加し 10 分間浸透した。その後超音波破碎にて抽出した。細胞抽出液は、約 500μl ずつ分注し、-80 °C にて凍結保存した。

2-2-4 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ

作製した不溶性エラスチン粒子に細胞抽出液を添加し、4 °C で 1 時間ローターにて攪拌した。その後、遠心分離 (10000 × rpm, 1min) を行い、上澄み (エラスチン非結合タンパク) を除去した。そして、Tris-HCl buffer にてバックグラウンドレベルまで洗浄後、残った不溶性エラスチンとエラスチン結合タンパクにラクトースや NaCl、尿素を含むバッファーでそれぞれ溶出した。各溶出後は限外濾過フィルター (Amicon Ultra-0.5 3kDa) (Millipore) で濃縮後、-80 °C で凍結保存した。

2-2-5 タンパク質の定量

Pierce™ 660nm Protein Assay (ThermoFisher) とサンプル溶液を 1:1 で混合し、室温で 5 分間静置させた後、660nm における吸光度を測定した。BSA (Bovine Serum Albumin) をタンパク量 0、0.5、1、1.5、2μg になる様にスタンダードを作製し、スタンダードのタンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸に取り、検量線を作成した。作成した検量線よりサンプルのタンパク質濃度を決定した。

2-2-6 タンパク質の同定

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィで回収した上澄みをサンプルとした。10%アクリルアミドゲルに、サンプルとサンプルバッファーを 1:1 で混合したものを 15mA ・定電圧で電気泳動を行った。スタンダードとして ExcelBand 3-color Broad Range Protein Marker (コスモ・バイオ株式会社) を使用した。電気泳動終了後、Flamingo gel stain (Invitrogen) によりゲルを染色した。染色後のゲルを撮影し、Gel-pro analyzer (Nippon roper) にてスタンダードからタンパクバンドの分子量測定を行った。

Western blotting

SDS-PAGE 後のタンパク質に対しエラスチンレセプターの EBP (Elastin binding protein) の存在確認を目的に行った。SDS-PAGE 後ゲルに含まれるタンパク質を PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) 膜に 109mA で 1 時間転写した。転写後の膜は固定、洗浄を行い、一次抗体に anti-GLB1 antibody (Abcam)、二次抗体に HRP-

Goat anti-Mouse IgG(H+L) (Abcam)を使用した。抗体処理後、ECL (Enhanced Chemi Luminescence) (GE lifescience)を添加し、ルミノイメージアナライザー (LAS-4000 mini EPUV, FUJIFILM)で撮影した。

MALDI-TOFMS (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) 質量分析

SDS-PAGE のゲルから切り出したスポットに含まれるタンパク質の同定を目的に行った。それぞれのゲルから回収したスポット及びバンドは東京都老人総合研究所産学公連携プロテオーム共同研究センターの標準操作法にしたがって、還元アルキル化とトリプシン(Promega)によるゲル内消化をした²⁶⁾。得られた消化液を回収し、減圧乾燥機(DNAmini)で濃縮した。濃縮後プレートにサンプル 0.5 μ l とマトリックス(CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) (Sigma) 0.5 μ l を 1:1 の比率で添加し、overnight で乾燥した。マトリックスとはサンプルを結晶化させイオン化させやすくする化合物である。サンプル添加後プレートは MALDI TOF-MS (4800plus、Applied Biosystems)にて質量分析を行った。質量分析は MS/MS を行い、測定後の MS/MS データは Protein Pilot (Applied Biosystems)ソフトウェアにてデータベース検索を行った。データベースは NCBI (National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を使用した。得られた検索結果(配列包括度:%Cov、信頼性の高いペプチド数:peptides (95%))をもとにタンパク質を同定した。



Fig.2-4 MALDI-TOFMS 装置

2-2-7 エラスチンによる同定タンパク質の遺伝子発現変化(*in vitro*)

ウサギ外側側副靱帯(LCL)から細胞を単離し、エラスチン A 添加培地を用いて培養した後、real-time PCR によって遺伝子発現解析を行った。培地交換は 1 週間ごとに行い、培地量は 1ml とした。ターゲット遺伝子と実験群を以下に示す。(Table.2-4,2-5) (GAPDH、I 型コラーゲン、テノモジュリンは Table.2-3 と同様)

Table.2-4 ターゲット遺伝子

ターゲット遺伝子	機能
GAPDH	内部標準として使用
I 型コラーゲン	靱帯の主要成分
テノモジュリン	靱帯マーカー
Galectin-3	エラスチン結合タンパク質

Table.2-5 プライマー配列

ターゲット遺伝子	配列
Galectin-3	Sense: GTGAAGCCCAATGCAAACAG Antisense: TTGAAGCGGGGGTTAAAGTG

Galectin-3 のプライマーは Primer 3 Plus を用いて設計した。(NCBI で配列を選択した)

以下の実験群 (Table.2-6) に分け、それぞれ 1 週間と 2 週間の期間で試験を行った。

Table.2-6 エラスチン添加試験の実験群

実験群	コントロール	エラスチン添加
投与液	通常培地 (エラスチン無添加)	エラスチン A 2mg/ml

エラスチン無添加群を 1 として得られた結果を $\Delta \Delta C_t$ 法により解析を行い、相対発現量を算出した。

2-2-8 エラスチンによる同定タンパク質の遺伝子発現変化 (*in vivo*)

Galectin-3 に関して 2-1-2 で作製した各サンプルを用いて 2-1-3 の手順と同様に real-time PCR による試験を行った。プライマーは Table.2-5 のものを使用した。得られた結果を $\Delta \Delta C_T$ 法により解析を行い、正常群の値を 1 として相対発現量を算出した。

2-3 統計処理

結果は解析ソフト (StatView version 5.0) を使用し、Tukey-Kramer 法にて統計的有意差検定を行なった。p<0.05 で統計的な有意差ありとした。

3. 結果

3-1 靱帯損傷モデルへのエラスチン投与試験

以降の遺伝子発現結果の縦軸は正常群を 1 としたときの相対発現量を示す。
(全て n=3~4、* :p<0.05、** :p<0.01)

3-1-1 靱帯断裂部へのエラスチンの効果

採取した靱帯組織のうち、損傷部近辺に関する結果を示す。

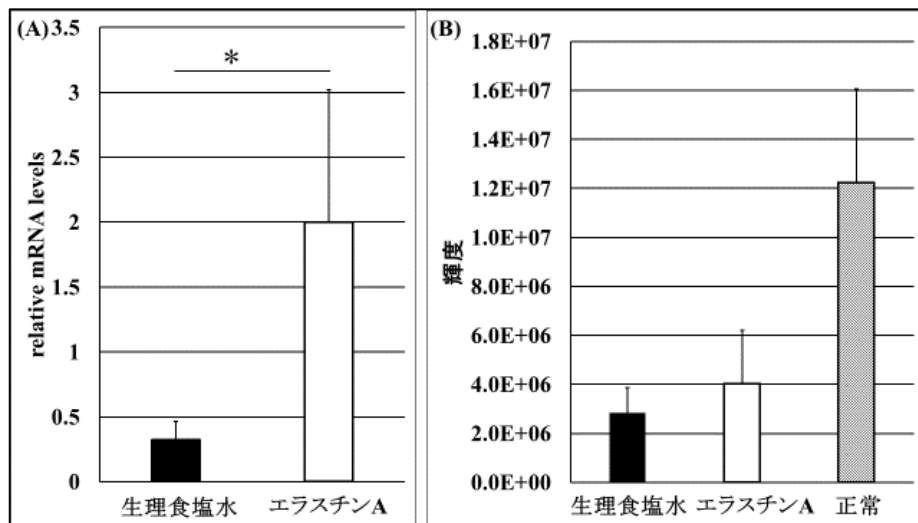


Fig.3-1 投与 6 週における I 型コラーゲンの遺伝子発現 (A) とタンパク質発現 (B)

エラスチン投与 6 週で I 型コラーゲンの遺伝子発現が 6.2 倍、タンパク質発現が 1.4 倍の増加を示し(vs 生食)、遺伝子発現では有意な差が得られた (Fig.3-1)。

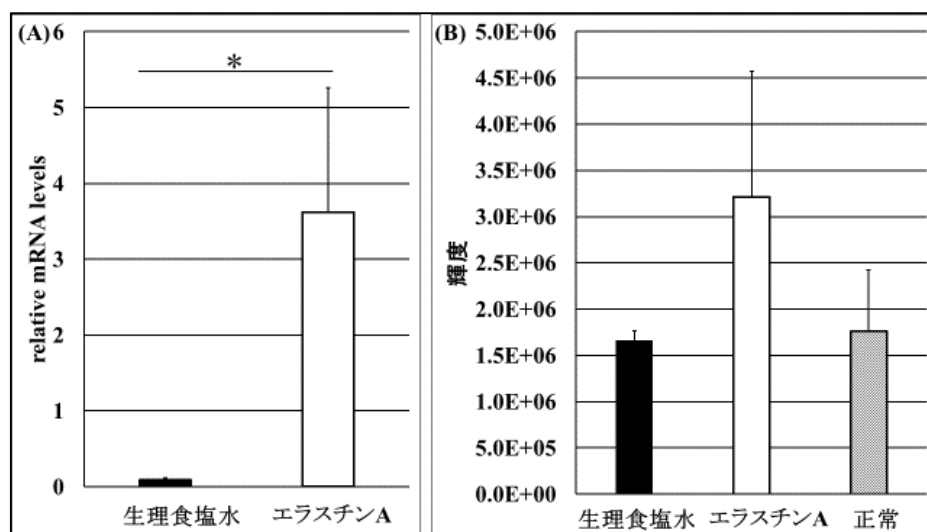


Fig.3-2 投与 6 週におけるエラスチンの遺伝子発現 (A) とタンパク質発現 (B)

エラスチン投与 6 週でエラスチンの遺伝子発現が 40 倍、タンパク質発現が 1.9 倍の増加を示し(vs 生食)、遺伝子発現では有意な差が得られた (Fig.3-2)。

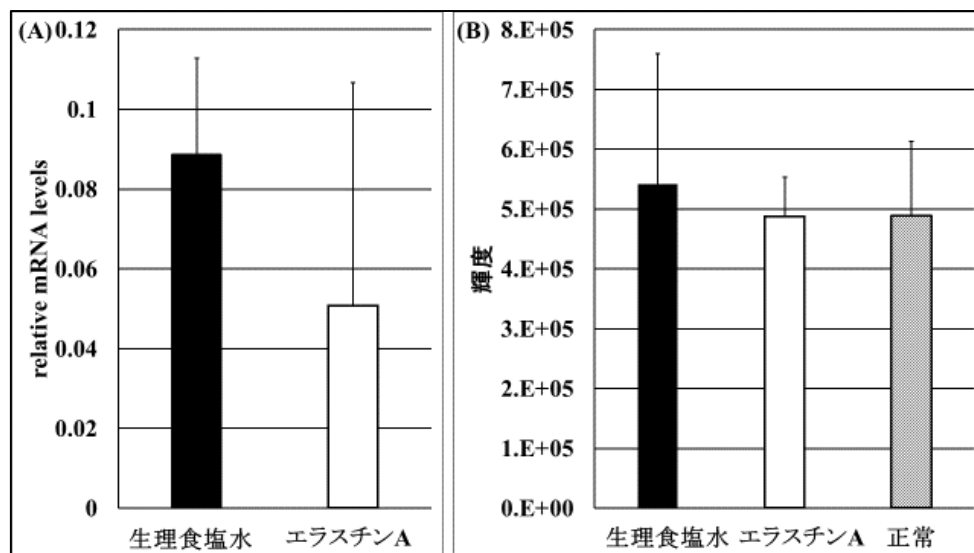


Fig.3-3 投与 12 週における I 型コラーゲンの遺伝子発現(A)とタンパク質発現(B)

エラスチン投与 12 週で I 型コラーゲンの遺伝子発現が 0.6 倍、タンパク質発現が 0.9 倍を示し(vs 生食)、実験群による差は得られなかった (Fig.3-3)。

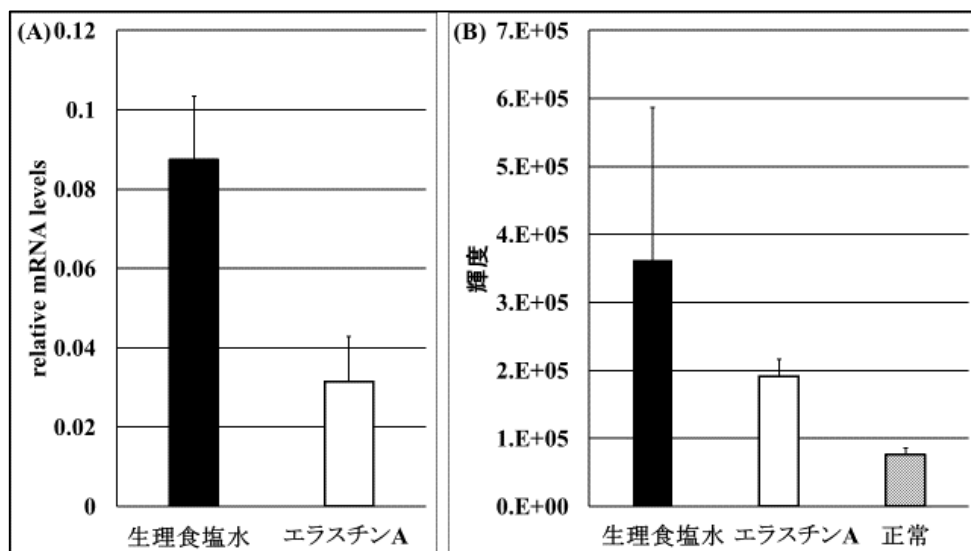


Fig.3-4 投与 12 週におけるエラスチンの遺伝子発現(A)とタンパク質発現(B)

エラスチン投与 12 週でエラスチンの遺伝子発現が 0.3 倍、タンパク質発現が 0.5 倍を示し(vs 生食)、実験群による差は得られなかった (Fig.3-4)。

3-1-2 靱帯―骨接合部へのエラスチンの効果

採取した靱帯組織のうち、損傷部を除いた靱帯―骨接合部に関する結果を示す。

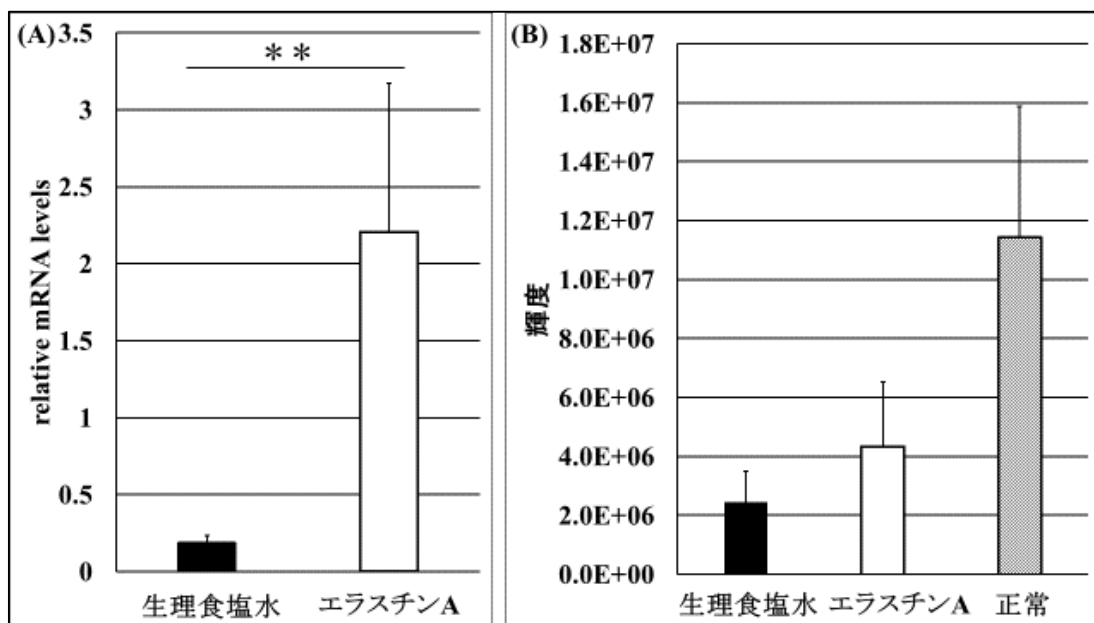


Fig.3-5 投与 6 週における I 型コラーゲンの遺伝子発現(A)とタンパク質発現(B)

エラスチン投与 6 週で I 型コラーゲンの遺伝子発現が 12 倍、タンパク質発現が 1.8 倍の増加を示し(vs 生食)、有意な差が得られた (Fig.3-5)。

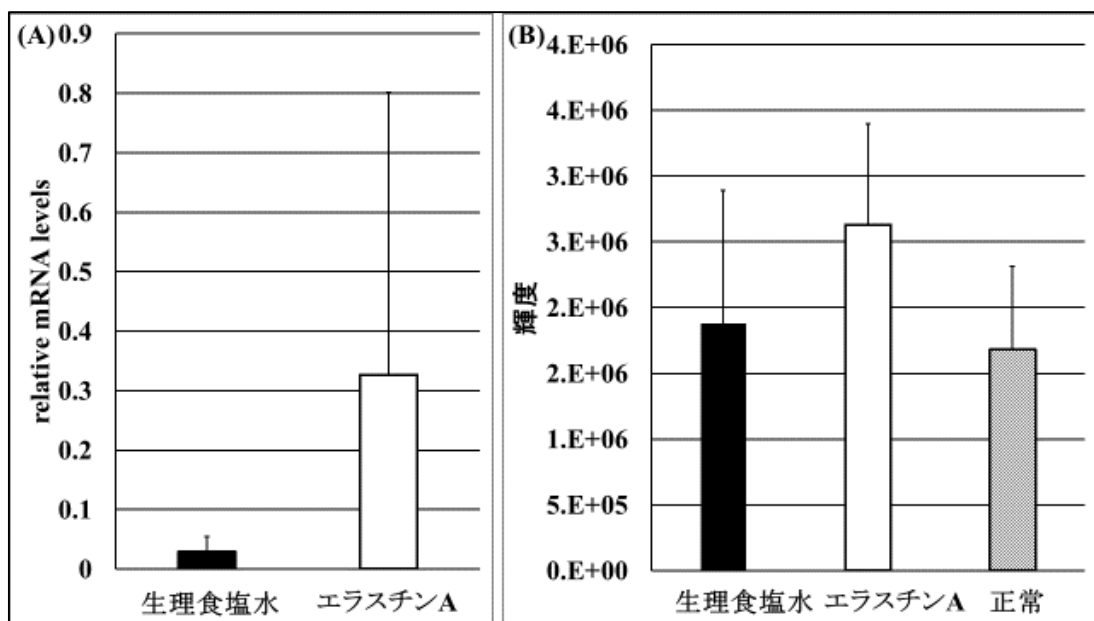


Fig.3-6 投与 6 週における ALP の遺伝子発現(A)とタンパク質発現(B)

エラスチン投与 6 週で ALP の遺伝子発現が 11 倍、タンパク質発現が 1.4 倍の増加を示し(vs 生食)、実験群による差は得られなかったが発現の増加傾向が見られた (Fig.3-6)。

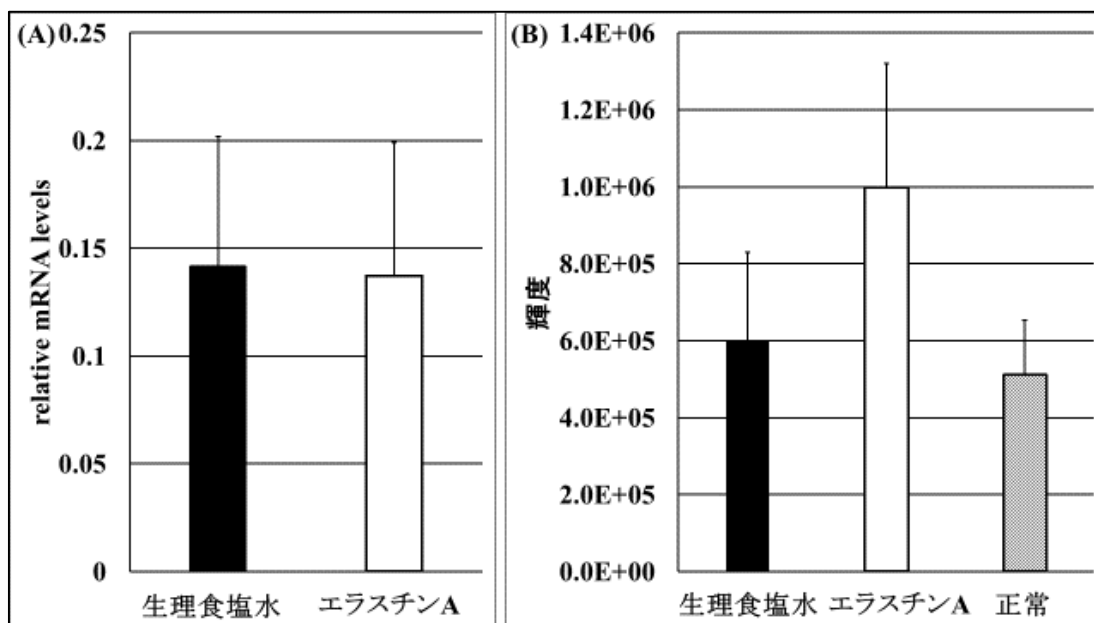


Fig.3-7 投与 12 週における I 型コラーゲンの遺伝子発現(A)とタンパク質発現(B)

エラスチン投与 12 週で I 型コラーゲンの遺伝子発現が 1 倍、タンパク質発現が 1.7 倍の増加を示し(vs 生食)、実験群による差は得られなかった (Fig.3-7)。

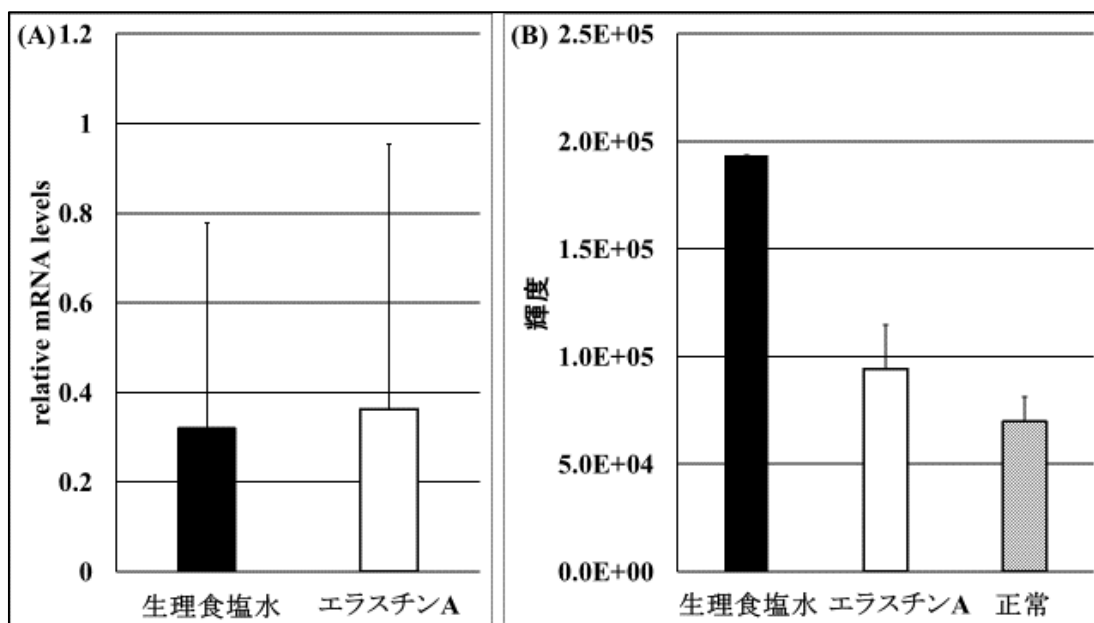


Fig.3-8 投与 12 週における ALP の遺伝子発現(A)とタンパク質発現(B)

エラスチン投与 6 週で ALP の遺伝子発現が 1.1 倍、タンパク質発現が 0.5 倍を示し(vs 生食)、実験群による差は得られなかった(Fig.3-8)。

3-1-3 組織力学特性へのエラスチンの効果

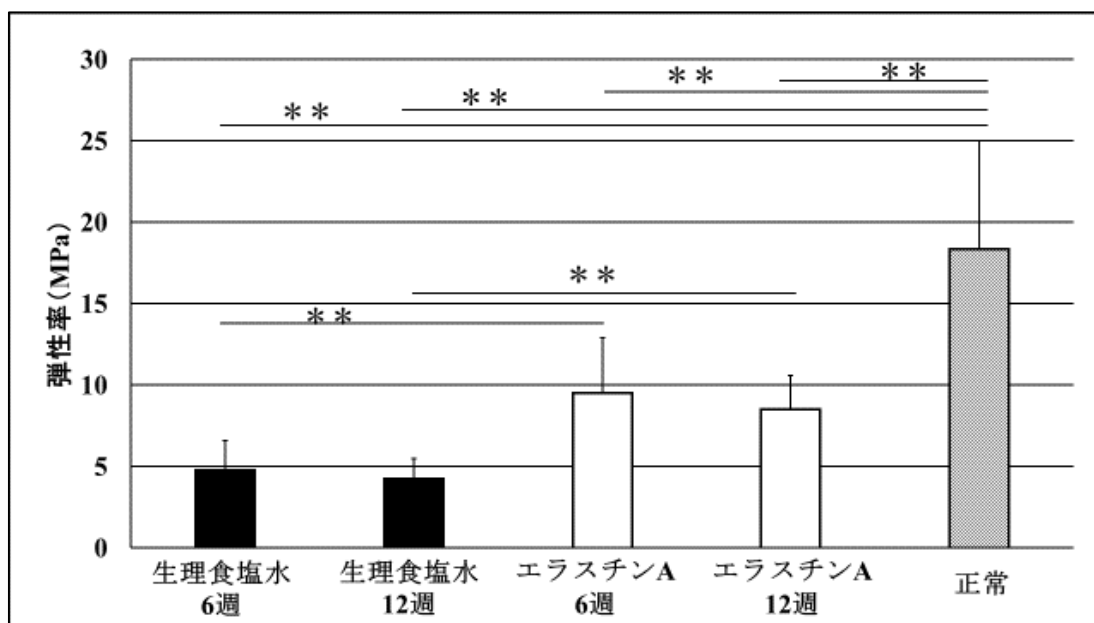


Fig.3-9 靱帯組織の弾性率

エラスチン投与により 6 週、12 週いずれにおいても生理食塩水投与群よりも有意に高い弾性率を示した。生食群では 4～5MPa、エラスチン群では 8.5～9.5MPa であった(Fig.3-9)。

3-1-4 エラスチン投与試験結果一覧

以下にエラスチン投与試験に関する結果をまとめて示す。

Table.3-1 エラスチン投与 6 週間 (a:遺伝子相対発現量(vs 正常)と
b:タンパク質発現量)

(a)	靱帯断裂部		骨—靱帯接合部	
	I 型コラーゲン	エラスチン	I 型コラーゲン	ALP
生理食塩水	0.321	0.087	0.188	0.029
エラスチン A	1.999	3.619	2.205	0.326

(b)	靱帯断裂部		骨—靱帯接合部	
	I 型コラーゲン	エラスチン	I 型コラーゲン	ALP
生理食塩水	2.8.E+06	1.7.E+06	2.4.E+06	1.9.E+06
エラスチン A	4.0.E+06	3.2.E+06	4.3.E+06	2.6.E+06
正常	1.2.E+07	1.8.E+06	1.1.E+07	1.7.E+06

Table.3-2 エラスチン投与 12 週間 (a:遺伝子相対発現量(vs 正常)と
b:タンパク質発現量)

(a)	靱帯断裂部		骨—靱帯接合部	
	I 型コラーゲン	エラスチン	I 型コラーゲン	ALP
生理食塩水	0.089	0.088	0.142	0.320
エラスチン A	0.051	0.031	0.137	0.363

(b)	靱帯断裂部		骨—靱帯接合部	
	I 型コラーゲン	エラスチン	I 型コラーゲン	ALP
生理食塩水	5.4.E+05	3.6.E+05	6.0.E+05	1.9.E+05
エラスチン A	4.9.E+05	1.9.E+05	1.0.E+06	9.4.E+04
正常	4.9.E+05	7.6.E+04	5.1.E+05	7.0.E+04

Table.3-3 組織の弾性率 (MPa)

	6 週間投与	12 週間投与
生理食塩水	4.80	4.26
エラスチン A	9.52	8.53
正常	18.35	

3-2 エラスチン結合タンパク質の探索

3-2-1 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ

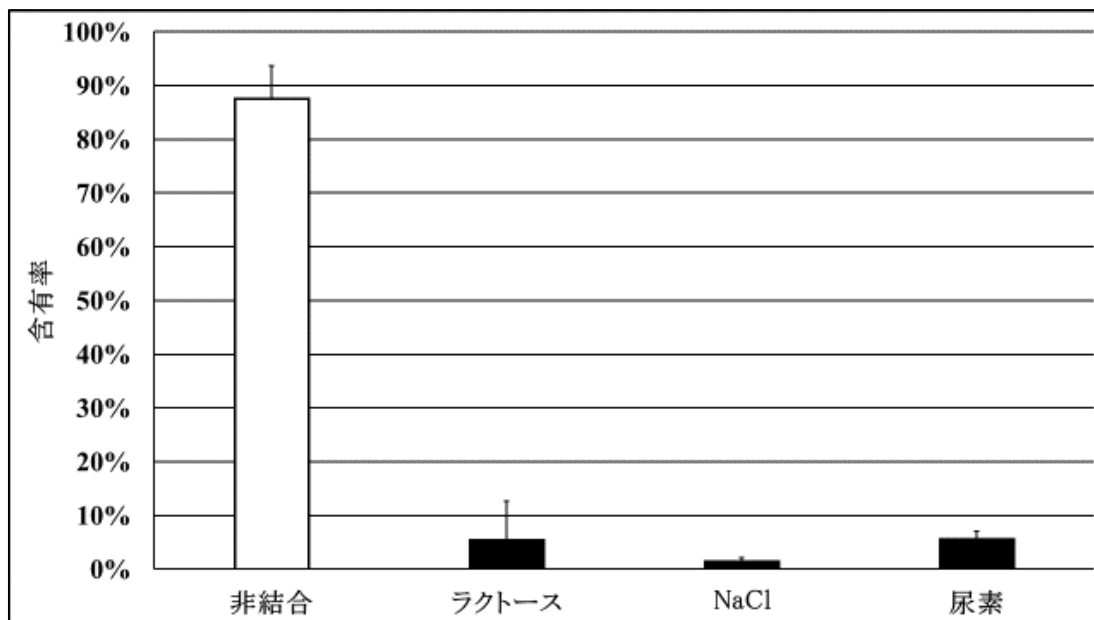


Fig.3-10 ウサギ MCL 細胞中のエラスチン結合タンパク質含有量 (n=17)

不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィによって得られた各サンプルの吸光度を測定した。吸光度はサンプルの濃度に比例するため、エラスチン非結合タンパク質とエラスチン結合タンパク質を合わせた量を、細胞抽出液中の全タンパク質量と仮定することで各溶出タンパク質の割合をグラフに示した (Fig.3-10)。

溶出タンパク質の含有率(%)=溶出タンパク質量/細胞抽出液中の全タンパク質量

上記の式よりラクトース溶出タンパク質が 5.4 (±7.3) %、NaCl 溶出タンパク質が 1.5 (±0.7) %、尿素溶出タンパク質が 5.5 (±1.6) % 得られたことがわかった。

3-2-2 Elastin Binding Protein (EBP)の発現確認

Western blotting により Elastin Binding Protein (EBP) の発現確認を行った。以下にその結果を示す。

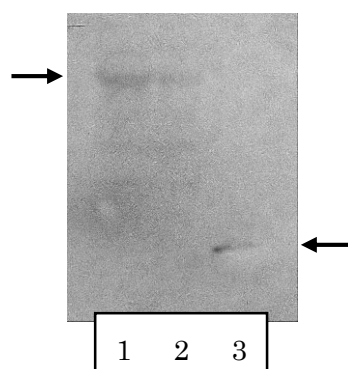


Fig.3-11 Western blotting
(Lane1:細胞抽出液、Lane2:非結合、Lane3:ラクトース溶出)

Lane1 と Lane2 では 60kDa 付近に、Lane3 では 30kDa 付近にバンドが検出された (Fig.3-11)。このことから、ウサギ靱帯細胞中に EBP が存在し、エラスチン結合能を持つことが示された。また、ラクトース結合による EBP の構造変化が示唆された。

3-2-3 SDS-PAGE

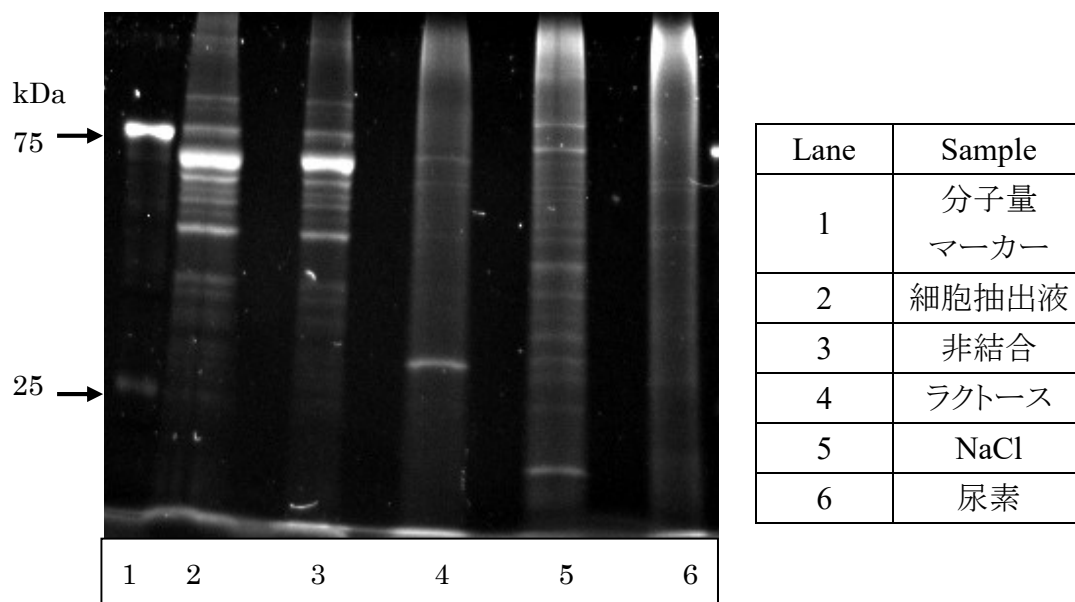


Fig.3-12-a SDS-PAGE (ウサギ MCL:ラクトース、NaCl、尿素溶出)

不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィにより得られたサンプル中に複数のバンドを確認することができたため、エラスチン結合タンパク質が得られたことが示された (Fig.3-12-a)。次に各溶出タンパク質について述べる。

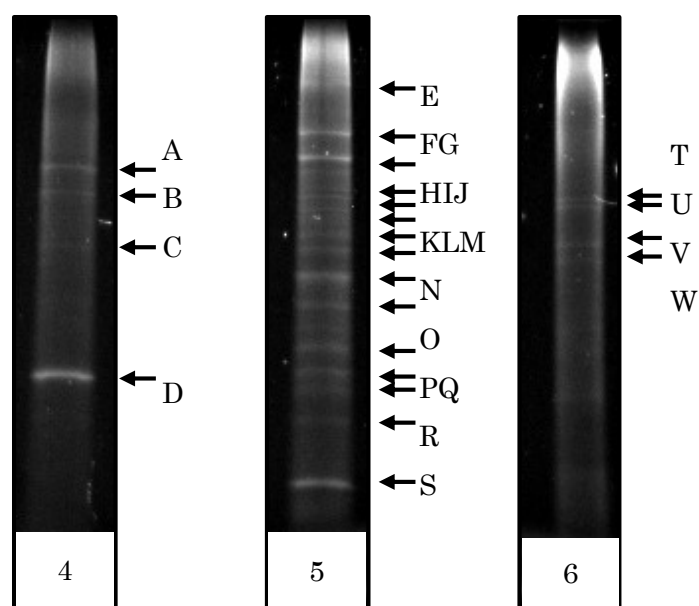


Fig.3-12-b SDS-PAGE (ウサギ MCL:ラクトース、NaCl、尿素溶出)

ラクトース溶出タンパク質では 4 本、NaCl 溶出タンパク質では 15 本、尿素溶出タンパク質では 4 本のバンドが検出された (Fig3-12-b)。

3-2-4 MALDI-TOFMS によるタンパク質同定

3-2-3 で検出された各溶出タンパク質について MALDI-TOFMS を用いてタンパク質を同定した。NaCl 溶出タンパク質に関しては、特徴的な 4 つのバンド (F,G,M,S) について解析した。

Table.3-4 TOF-MS 解析結果

サンプル	バンド	%Cov	Peptides (95%)	Name
ラクトース 溶出	A			No Hit
	B	2.795	1	Neurofilament medium polypeptide; NF-M; (160 kDa neurofilament protein; (Neurofilament 3; (Neurofilament triplet M protein
		4.775	1	hyaluronan synthase 1
		1.461	1	RNA-binding protein 27 isoform X6
		1.397	1	RNA-binding protein 27 isoform X5
		1.396	1	RNA-binding protein 27 isoform X4
		1.382	1	RNA-binding protein 27 isoform X3
		1.323	1	RNA-binding protein 27 isoform X1
		1.325	1	RNA-binding protein 27 isoform X2
	C			No Hit
	D	33.88	8	Galectin-3; Gal-3; (35 kDa lectin; (Carbohydrate-binding protein 35; CBP 35; (Galactose-specific lectin 3; (IgE-binding protein; (Laminin-binding protein; (Lectin L-29; (Mac-2 antigen
		1.355	0	nuclear pore complex protein Nup160

NaCl溶出	F	2.343	1	fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X6
		2.254	1	fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X5
		2.174	1	fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X4
		2.097	1	fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X3
		2.092	1	fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X2
		2.02	1	fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X1
		1.808	1	L-fucose kinase isoform X5
		1.745	1	L-fucose kinase isoform X4
		1.634	1	L-fucose kinase isoform X3
		1.498	1	L-fucose kinase isoform X2
		1.491	1	L-fucose kinase isoform X1
		5.449	0	olfactory receptor 1L6-like
		1.395	0	WD repeat-containing protein 11
	G	3.07	1	coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4
		2.966	1	coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X3
		2.893	1	coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X2
		2.8	1	coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X1
		0.491	1	serine-protein kinase ATM
		3.226	1	keratin, type II cytoskeletal 1b
		2.514	1	pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial
	M	5.532	1	antimicrobial protein CAP18 isoform X1
		7.602	1	antimicrobial protein CAP18 precursor
		7.602	1	Antimicrobial protein CAP18; (18 kDa cationic protein; (18 kDa lipopolysaccharide-binding protein; (CAP18-A; Contains: Antimicrobial protein CAP7; Flags: Precursor
	S	3.226	1	keratin, type II cytoskeletal 1b
		34.26	5	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
		33.51	4	cyclophilin B, partial
		3.448	0	serine protease 55
		2.299	0	interleukin-1 receptor accessory protein-like 1
		2.632	0	type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase
尿素溶出	T	0.491	0	serine-protein kinase ATM
	U	0.491	0	serine-protein kinase ATM
	V			No Hit
	W			No Hit

これまでにエラスチン結合タンパク質として報告されている Galectin-3 が同定された。他にも複数のエラスチン結合能を持つと考えられるタンパク質が同定された (Table.3-4)。

3-2-5 MALDI-TOFMS 解析結果詳細

Table.3-4 で同定されたタンパク質についての詳細を記載する。以降の Fig の a は MS スペクトル、b は Protein Pilot (画像上段: 同定されたタンパク質一覧、画像中段: 同定されたペプチド一覧、画像下段: タンパク質の Sequence Coverage) での検索結果画面を示す。

1) バンド B:Neurofilament protein M

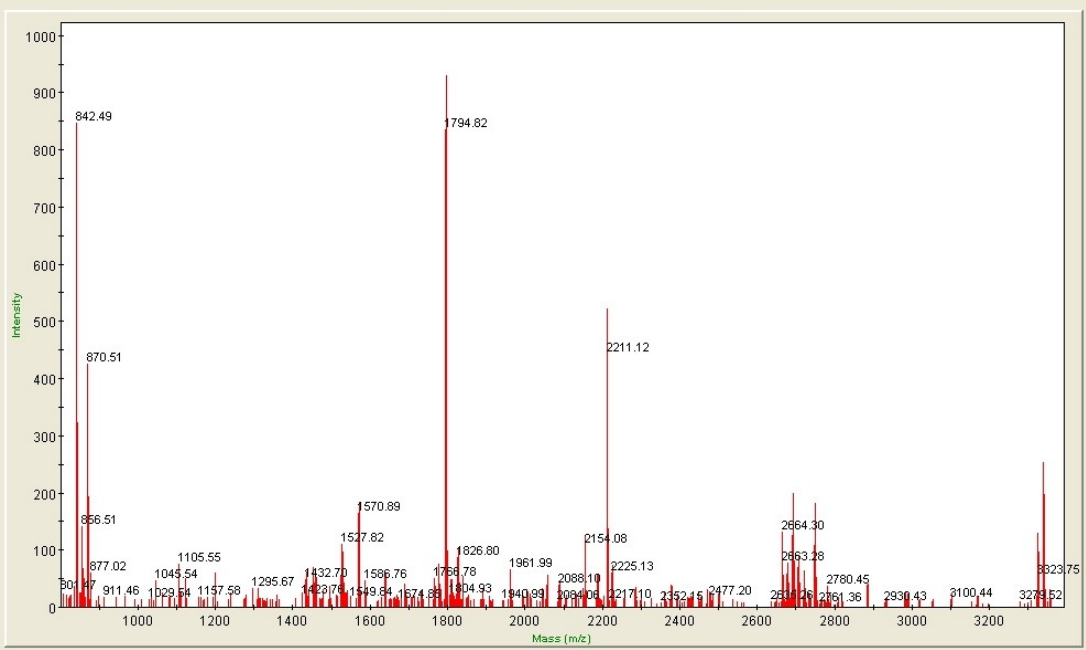


Fig.3-13a バンド B の MS スペクトル

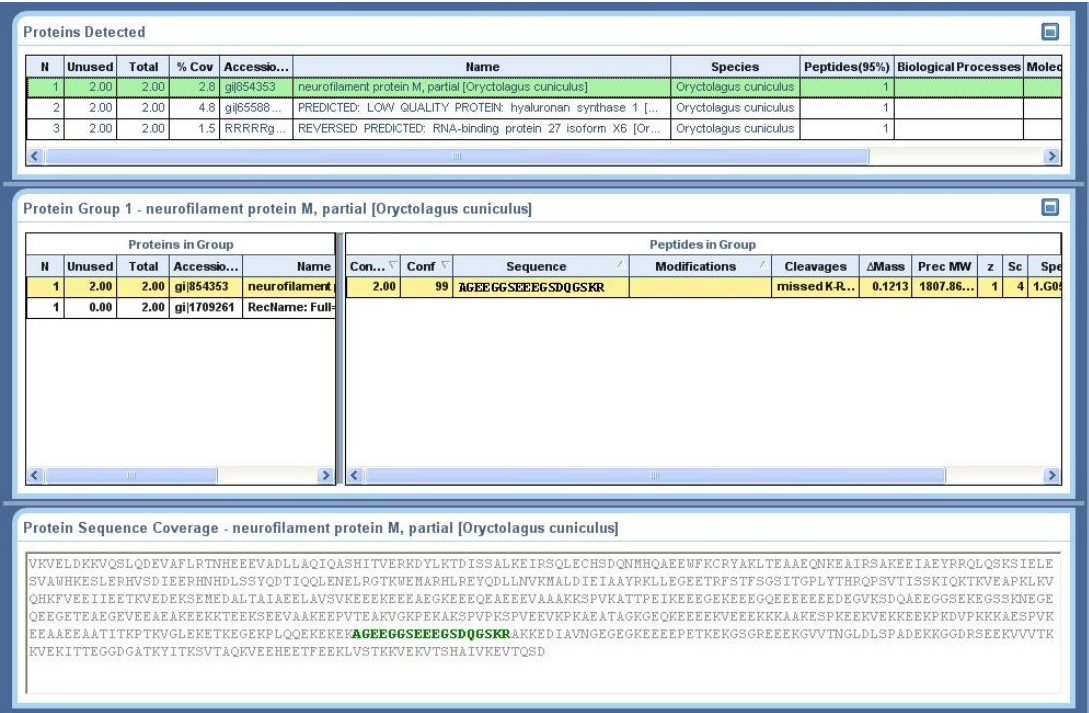


Fig.3-13b Neurofilament protein M 結果詳細

2) バンド D: Galectin-3

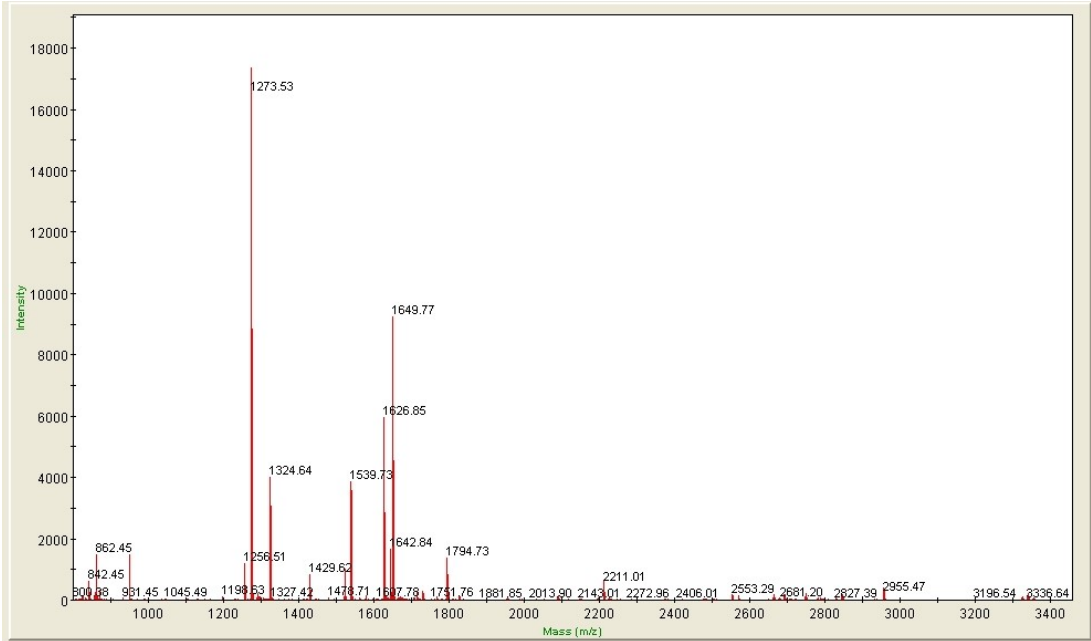


Fig.3-14a バンド D の MS スペクトル

Proteins Detected									
N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Processes	Molecular Functions
1	11.35	11.35	33.9	gi 606795	galectin-3 [Oryctolagus cuniculus]	Oryctolagus cuniculus	8		
2	0.16	0.16	1.4	RRRRRg...	REVERSED PREDICTED: nuclear pore comple...	Oryctolagus cuniculus	0		

Protein Group 1 - galectin-3 [Oryctolagus cuniculus]									
Proteins in Group					Peptides in Group				
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages
1	11.35	11.35	gi 606795	galectin-3 [Ory	2.00	99	GNDVAFHENPR		-0.0800
1	0.00	11.35	gi 1346429	RecName: Full	2.00	99	IQVLVEPDHFK		-0.0890
1	0.00	11.35	gi 12672...	galectin-3 [Ory	2.00	99	LGISGDIQLTSASHMI		-0.1002
					2.00	99	QTTFPEIGKPEK		-0.0922
					2.00	99	VAVNDAHLQYNHR		-0.0852
					1.35	95.5	MLITIVGTVKPNRNR		-0.0847
					0.00	< 1	IQVLVEPDHFKVAVNDAHL...	missed K-V...	-0.0839
					0.00	98.6	LGISGDIQLTSASHMI	Oxidation(M)@16	-0.0936
					0.00	98.6	QTTFPEIGKPEK	Gln->pyro-Glu@N-term	-0.0791

Protein Sequence Coverage - galectin-3 [Oryctolagus cuniculus]									
MADGFSLNDAISGSGHPNQGWPFGWGNOPAGPGGYGAAYPGAYPGHAPGAYPGQAPPGPYPGPGAHGAYPGQPGGPGAYPSGPQPSGAGAYPGASPYASAGPLPVPYDLPLPGG VMPF MLITIVGTVKPNRNR ALDFR GNDVAFHENPR FNENNRVIVCNTKVDNWNUGREER QTTFPEIGKPFKI QVLVEPDHFKVAVNDAHLQYNHRMRNLKEIN LGISGDIQL TSASHMI									

Fig.3-14b Galectin-3 結果詳細

3) バンド F :Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1

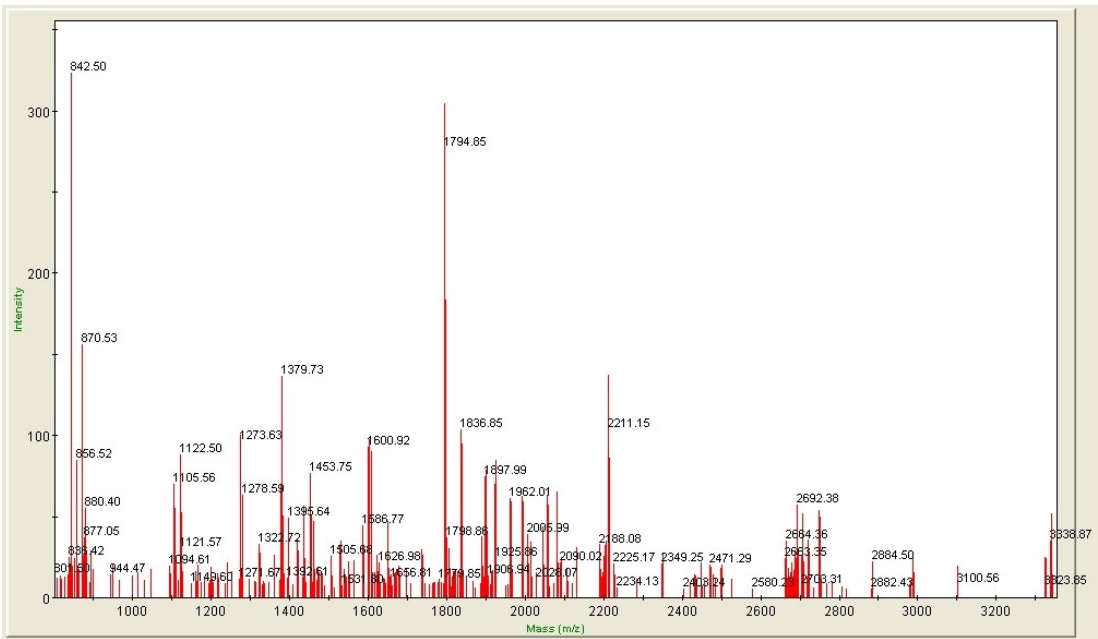


Fig.3-15a バンド F の MS スペクトル

Proteins Detected									
N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Pro	
1	1.92	1.92	2.3	gi 65585...	PREDICTED: fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X6 [...]	Oryctolagus cuniculus	1		
2	1.74	1.92	1.8	RRRRRg...	REVERSED PREDICTED: L-fucose kinase isoform X5 [Oryctolagus cuniculus]	Oryctolagus cuniculus	1		
3	0.14	0.14	5.4	gi 29140...	PREDICTED: olfactory receptor 1L6-like [Oryctolagus cuniculus]	Oryctolagus cuniculus	0		
4	0.08	0.14	1.4	gi 29140...	PREDICTED: VWD repeat-containing protein 11 [Oryctolagus cuniculus]	Oryctolagus cuniculus	0		

Protein Group 1 - PREDICTED: fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X6 [Oryctolagus cuniculus]									
Proteins in Group					Peptides in Group				
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages
1	1.92	1.92	gi 65585...	PREDICTED: fra	1.92	98.8	ARGLEFVEDFIQVPR		missed R...
1	0.00	1.92	gi 65585...	PREDICTED: fra					
1	0.00	1.92	gi 65585...	PREDICTED: fra					
1	0.00	1.92	gi 65585...	PREDICTED: fra					
1	0.00	1.92	gi 65585...	PREDICTED: fra					
1	0.00	1.92	gi 65585...	PREDICTED: fra					

Protein Sequence Coverage - PREDICTED: fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 isoform X6 [Oryctolagus cuniculus]									
MREVLASRQPEPGLRAPRGGAAGAGQQRSDCVGRRAGRRRRRAEPGARDVRSGGIPPGESGRHAETPGVWGGGQSPFCLPHSPRLLAPPSSPLVGKFLSLPSGLCGSNMA ELTVEVRGSGNGAFYKGFIKDVHEDSLTVVFENNWPQRFVNEVRLPPPPDIKKEISEGDEVEVYSRANDQPCGWLAKVRMMKGEFYVIEYAACDATYNEIVTFERLPPVNQNK TVKKNTFFKCTVDVPEDLREACANENAHKDFKKAVGACRIFYHPETTLMLLSASEATVVRNLSMDHMLRSIRTKLMLMSRNEEATKHLECTKQLAAAFHEEFVVRDLMLGLAIGT HGSNIQQAQKVPVGTALIEDDTGTFRIGESADAVKKAARGLEFVEDFIQVPRNLVGVKIGENGKVIQEIIVDKSGVVVRVRIEEDNENKLPREDGHVPFVFGTKESIGNVQVLLLEY HIAYLKEVEQLRMRLOIDQLRQIGHGFRPSSTRGPEKEKGYTTDESTVSSVQGRSRSYSGRGRGRGPNYTSYGYTNSLSNPSETESERKDELSDWSLAGEDDRESRHQDRSRR PGGRGRSVSGGRGGRGGPGKSSISSVLKDPDSNPFYLLDNWTESDQTDADTASESHHSNRRRRSRRRTDDEAVLMDGHTSDTASVNNENGLGKRCD									

Fig.3-15b Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 結果詳細

4) バンド G: Coiled-coil domain-containing protein 77

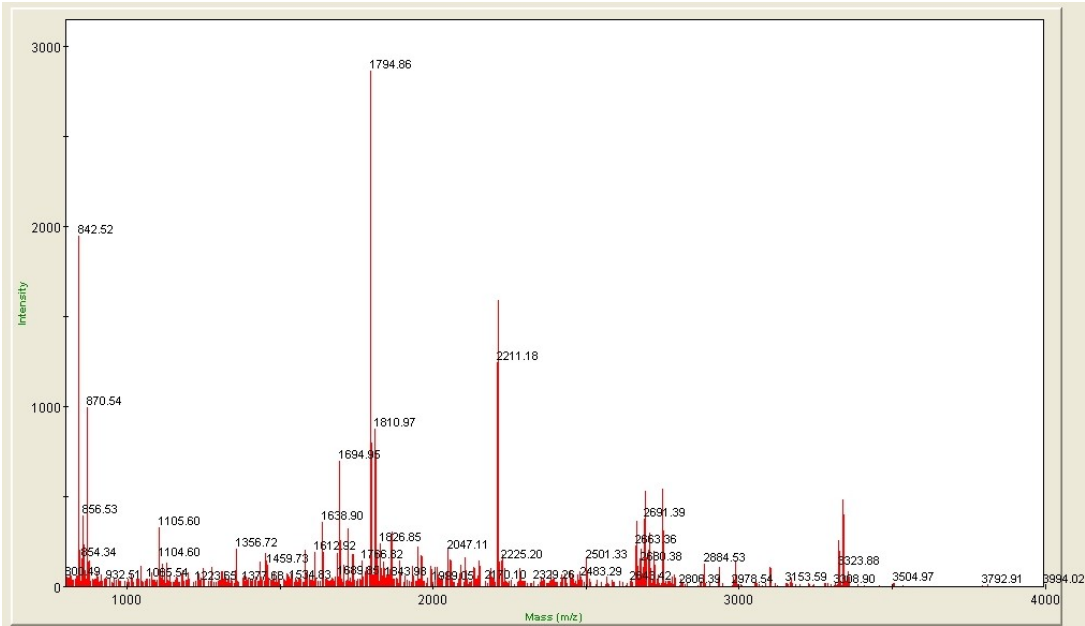


Fig.3-16a バンド G の MS スペクトル

Proteins Detected									
N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Pr	
1	2.00	2.00	3.1	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuni...	Oryctolagus cuniculus	1		
2	2.00	2.00	0.5	RRRRRg...	REVERSED: PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine-protein kinase ATM [...	Oryctolagus cuniculus	1		
3	1.33	1.33	3.2	gi 65573...	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 1b [Oryctolagus cuniculus]	Oryctolagus cuniculus	1		
4	0.53	0.53	2.5	gi 65588...	PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial [Oryctola...	Oryctolagus cuniculus	1		

Protein Group 1 - PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]									
Proteins in Group					Peptides in Group				
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages
1	2.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co	2.00	99	FENQNKEKAWLEK		missed KA...
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co					
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co					
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co					
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co					
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co					
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co					
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: co					

Protein Sequence Coverage - PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]									
MADSLSTPLPSIQDRLAVLCPSQELLEYQKKMAECEAENEDLLKKLELYREACEGQHKLEWDLQQRREEIAELQKALSDHQACLQEREHVLRLYSENDRLRIRELEDKKKIQSL LALVGTDTGEVYTFYKPEPPHRVSLQKTIQAVGVCEQSEATPNADPKVNKRSAREKVGSSQYHRDMQTLILQVEALQAQLGEQTKLSKEQVEGLMEDRRIRAEELIQVQHQRNQD RIKELTONLHQTELLYESTKDFLQLR FENQNKEKAWLEK DDLSKIKQYRVQCKKEDKVGKVLVPLHDSHTQNEYIKSLKDKLAQEKKLSHTMYQEQCISLEEELARIREEAGV RREIFKDRDTRMGKRLQVMTRRYALEHRRRLVEVGFKTDIKALQRLKDLQMLKYATMNAQANQDLAILCEVRNGNRRRAHKLQELKSLKSLFGLNELRLC									

Fig.3-16b Coiled-coil domain-containing protein 77 結果詳細

5) バンド M: Antimicrobial protein CAP18

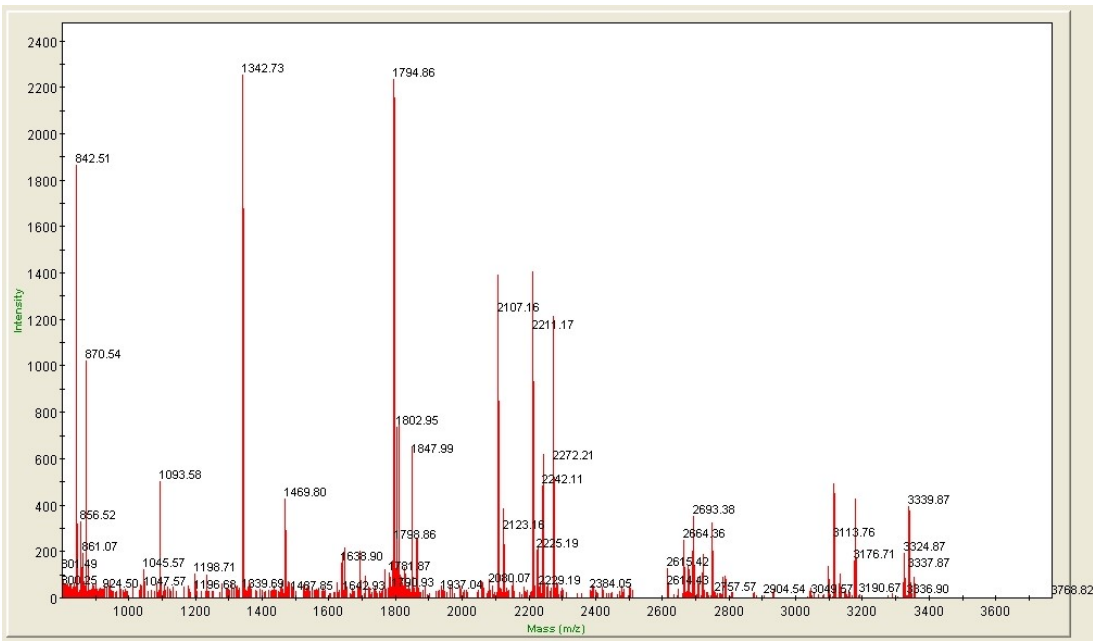


Fig.3-17a バンド M の MS スペクトル

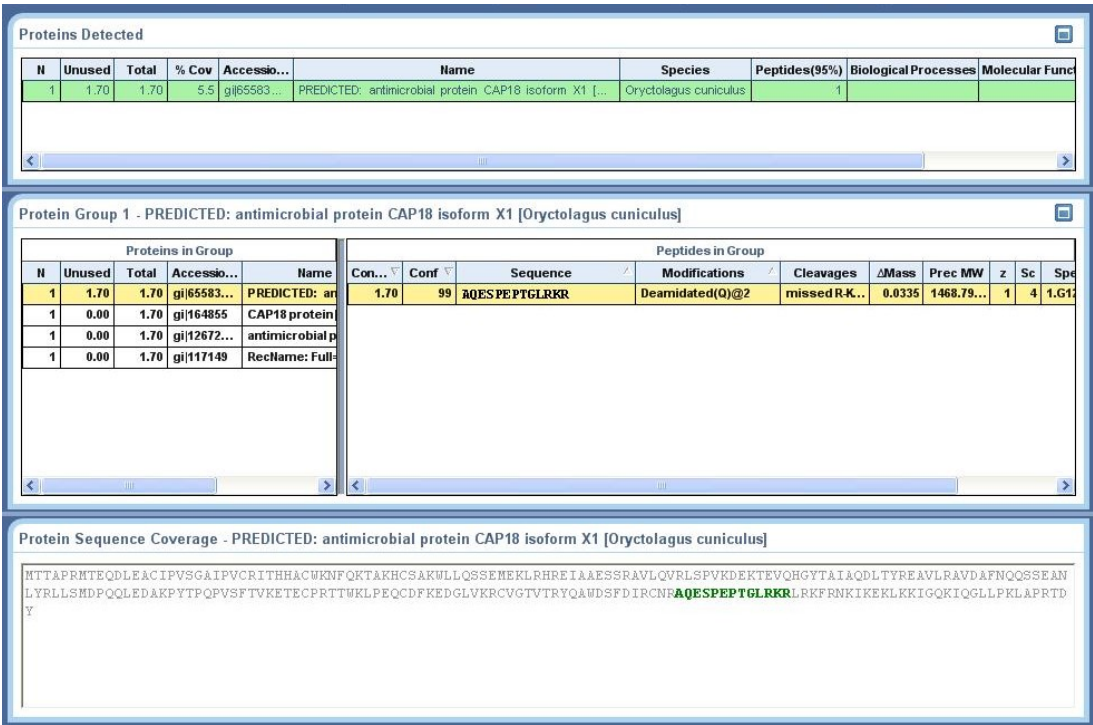


Fig.3-17b Antimicrobial protein CAP18 結果詳細

6) バンド S:Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (Cyclophilin B)

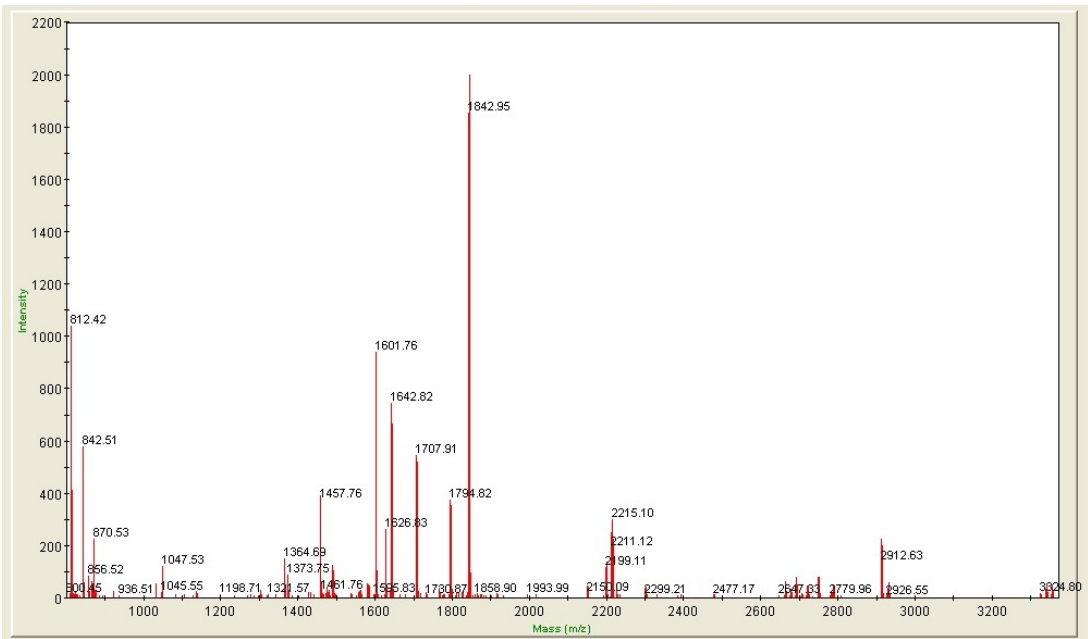


Fig.3-18a バンド S の MS スペクトル

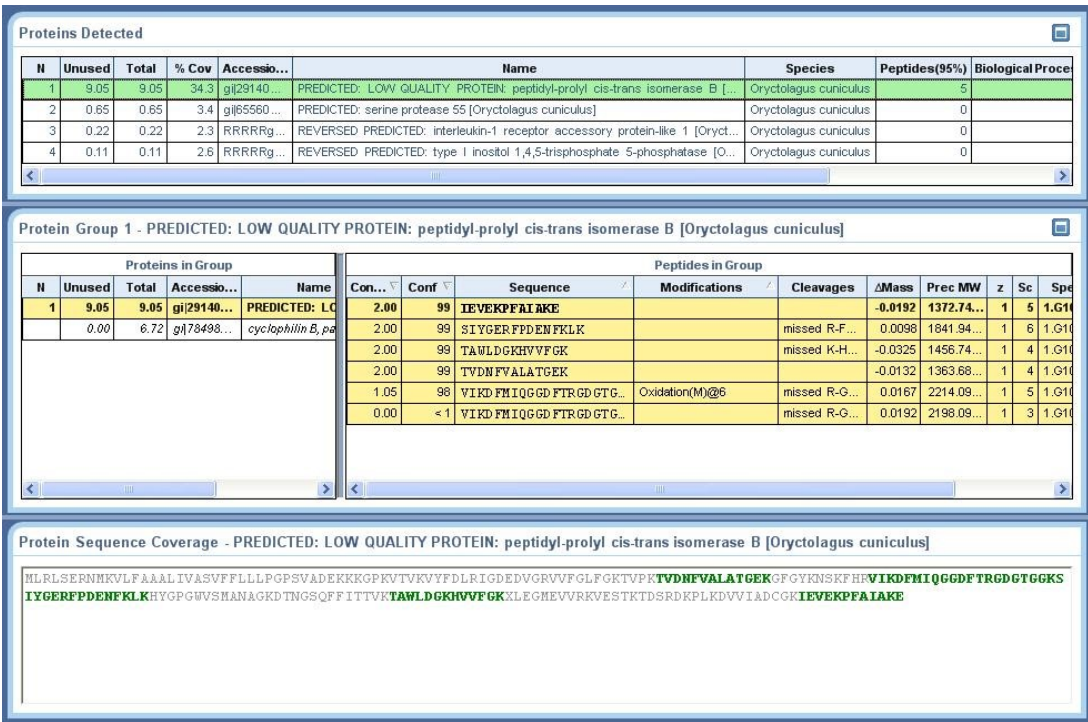


Fig.3-18b Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B 結果詳細

7) バンド T: Serine-protein kinase ATM

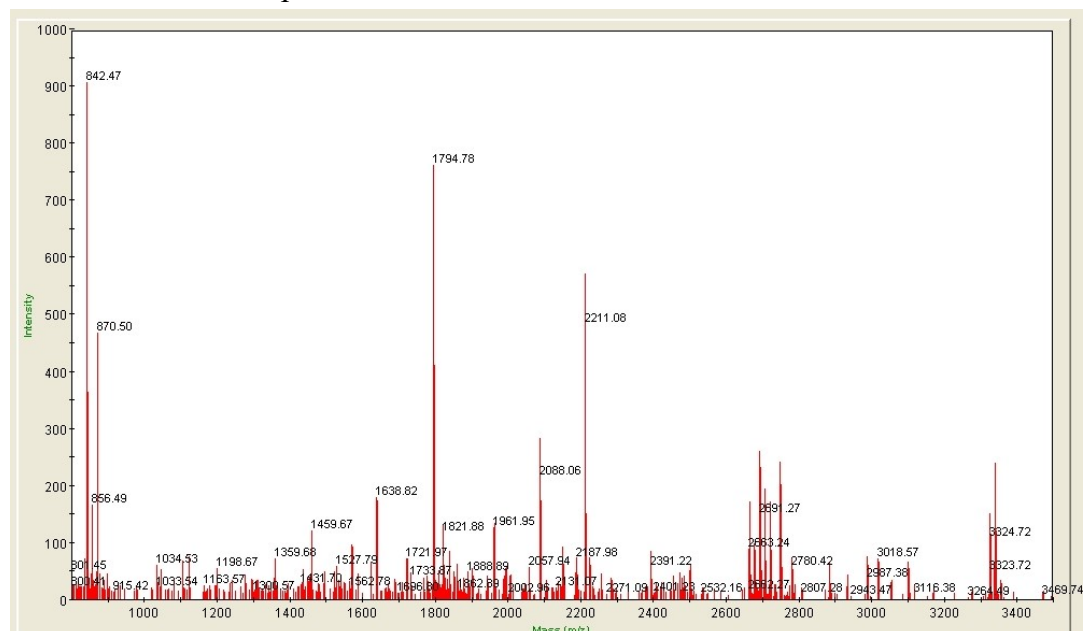


Fig.3-19a バンド T の MS スペクトル

Proteins Detected									
N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Pro	
1	0.14	0.14	0.5	RRRRRg...	REVERSED PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine-protein kinase ATM [...]	Oryctolagus cuniculus	0		

Protein Group 1 - REVERSED PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine-protein kinase ATM [Oryctolagus cuniculus]									
Proteins in Group					Peptides in Group				
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages
1	0.14	0.14	RRRRRg...	REVERSED PR	0.14	27.6	MDQFLRNISEAALMR		missed R.L...

Protein Sequence Coverage - REVERSED PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine-protein kinase ATM [Oryctolagus cuniculus]									
VAAKVGPFRLSLNKPDMQAQILLNVQGSVSLVTGEEVQKLEQLRLVREAVKNLSQDDSLNRKCEQDDANPTSQFETEDEPRQQLVLAKLPNNTWDFLPDYLLEVEITLLTEQ SNRMVENTKECCRRFVGEVGTIGHGDVIDRTLRFVPTETPLINGQEFVAGLDIHVLEASQENILINQIHRDGLGLIYGVISSTAVSRITYALRKEFVWAPDLFKEMCFYRFVPQF HKCINMFTRYKEFSKKQIEIMKQCQVSSFDTPRYRKHAGGESDITLFEGIPITGTGCELVGRQSLPVVKYTCITLKRKRTETNRQLLMNCLQFVQGMVADQRLDDRGKVLQRR ERGDGSCVCDIIKPLNIGGALRFEAFSQITVLNEYEGTPDKIENTPVVVAELNKLKTIQDAPIIIGKRQTKWQTADLNALLIYADCLAEVSRVHQPFRSRIITSIINNAEMRD EDLQSSQKPAKNTIRSRRAEPKTLFEDKKNANALALIIIFLTHPHDMSVRSILNNLVEHFGVGGHMKTGMRALQYMLPLFKYSP IEMGPGKMMGNVEPVGSNELVLSCLRFVWM DHEEGSLLCNIYNEVAKCLFRKRDEKLARLACEDLELERQVKVITYRNTQIKHERLLGVEEKARKLLAQKNEFESSKMYNEIRQYQDTSFRALSFLAKMKNRLEDNNEGDCSEAV EVAKELYTQMIVTNPMLCTEALWNGCVRLCETHILKLRSDNERCSTDLKKIMQKLSLALSQEKKAWFVQAEELQWESVHSVSNYQKIQFVAREPLQTNKFTALISFETLHKT LIDKFCEQSNNVKEMLIELIVTRLAMIPEQNFDSKLLQSHKQKVVESFQKDMVSRVLEGINELGIAQLRSLRPLYSVSELGSKLEEVEKVRAYKLEFFTSFERD RLSOLANYLSEHYSTGEIGKVNSTCHDWQMNRAAAQTHLEQLEACCEVNEHDLGKLYVSLIHCLGLNQLAQIIGAORTSPCIATELDYTVLAKDWAAEHYETRLRTLPLMKGGG CGYLSDPPEGISRYIELLDQLSIGTEERSKESLSSITTNQSGEFTLSRKEQDLSKKDAYIEAYLLATFHAACSQAVKAVELYNFDLWFADDFVTGISPRKQRMYPVVALNTR QSKKDVCCRFHESDSDLNAPTTSRSTOSNHRFCSTFFGQIHASLLNRWSNETDOLLIHDLVPLVTCQFDTRKVECHPKLLQLIESKIGGSDLLACTLTKNIDHNSQPIWLS DDLSELSPSEKDPFVPELFFKRSTPQLYILNPDTSKTYVWFSHTKTALINKLCTAAASRVVVCDEVLTNNLYTILTLWLEKDEFLKARTYTDKNHQIATTSFDPICPE GLCSGVAELVEREGTHNVATKSLHLTLIVLKVHIGDKPNDQSAHMLDHMQDKHALQQLDKLGLRLTLPLADYISVSLFHNIEELLFSGRGYKIKQQTIRLDKFFVHDPFPDDL LKITTYLNENDKNDIVLYKLLDLVQEQVEVDHVLPLITGVIVHLMNELADKCHTVATQCVSRLLDCCLSFSRLSVDHFRSPRKNYHILTYIVDRLVFAWAGGLGSKIDKLLLS VFLHYIKLIRHRYVNTEAAQECIALLIKQYSDPSKSLIELISKLTCKHNSIYAFATAKVHSPFHPNPAPDLDDGSFESLDTQSADSNAPHEHLLLEVVIEPLNSIFLHDI QKGLNLSKLMYVTSIAERQAMGSDKADEYAFYPLINVLKPFCDVLLSKWDEIQONAIARVEDFHSRIVLHPILIKYCSRYFDEVNKYLLIYFSSRLYETNPQCNLWRLPL YDLHSAFMDNISEYGAESVVKELVKKVLHPELGNEKVSCKLAFLAQKCEVPSCYLVVAMMLVSKRNYTEDLIEPNEASHSVERMGEQTKLCANDFATQQLKRLTQCNLWRLPCDG QKMDQFLRNISEAALMRVQHDDALFPFVENVPFDKGHVNIAWKSYPDAELLTKLCQVLAVRVSTCKRERTLHWFAGIVTLFQGGADRNEADLNQGLNLTVPVVLHNLVTK CVDQDRRYLSCVNSLPKLEVIDEMPLPYEGRPLEKLLVLYMHLHVSCTPDLISSDVLMLKRRIDAARFSVTSQSTTTCMCLFKVMDLLLDHKSLEYEALPNMAGITNQNEG									

Fig.3-19b Serine-protein kinase ATM 結果詳細

3-2-6 エラスチンによる同定タンパク質の発現変化 (*in vitro*)

TOF-MS によって同定された Galectin-3 について、*in vitro* でエラスチンの有無によるウサギ靱帯細胞の遺伝子の相対発現変化を観察した。(n=3, †:p<0.05)

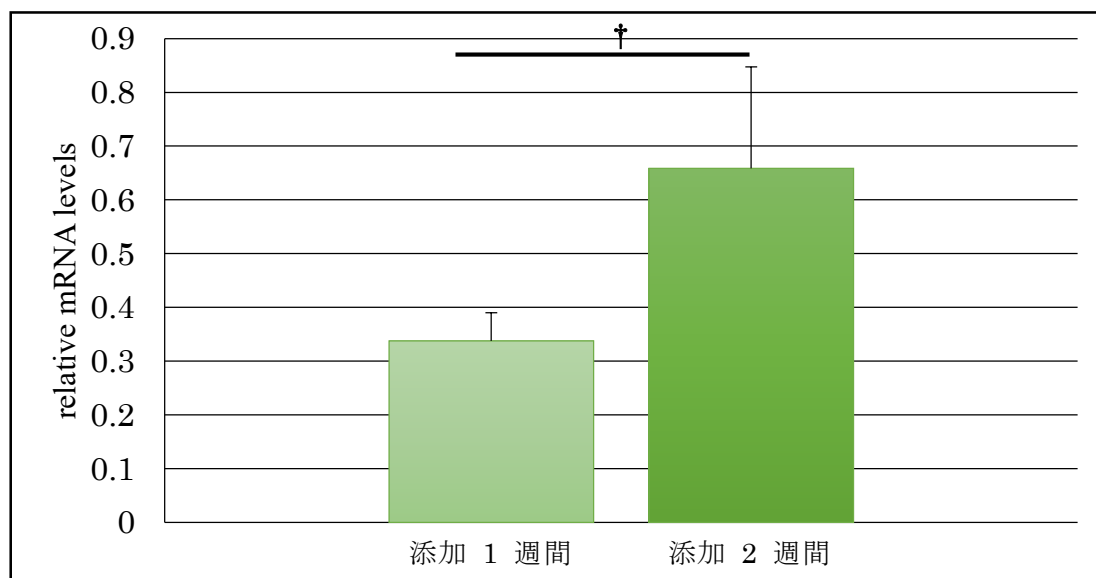


Fig.3-20 エラスチン A 添加による Galectin-3 の遺伝子発現変化(vs 無添加)

エラスチン A 添加により Galectin-3 の発現減少が確認された。添加 1 週間において 0.34 倍を示し、添加 2 週間では 0.66 倍を示した (Fig.3-20)。

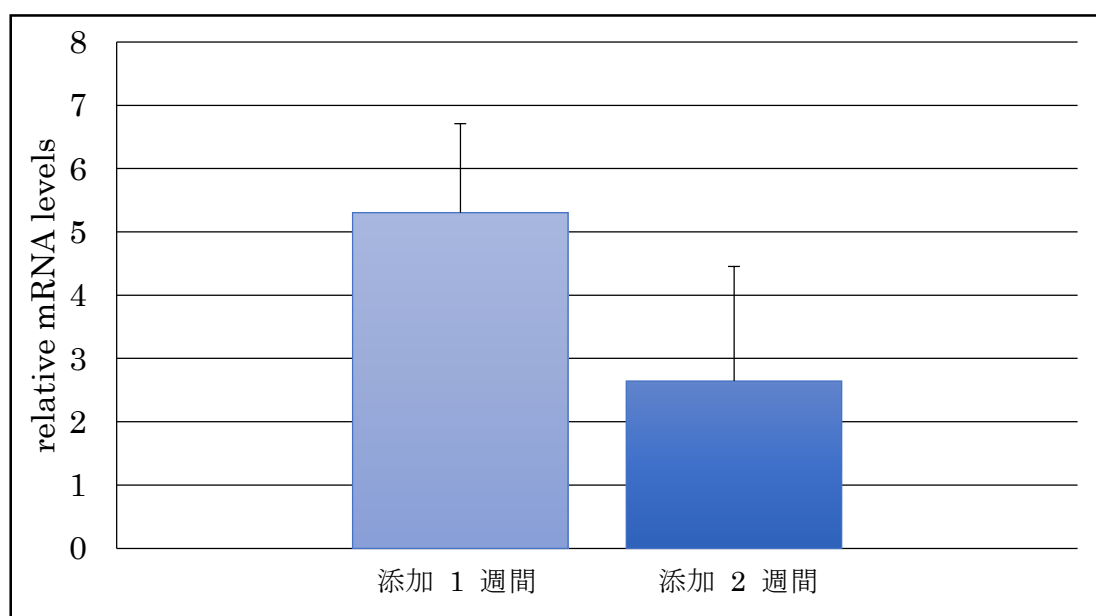


Fig.3-21 エラスチン A 添加による I 型コラーゲンの遺伝子発現変化(vs 無添加)

エラスチン A 添加により 1 週間において 5.3 倍を示し、I 型コラーゲンの発現増加が確認された。また、添加 2 週間でも 2.6 倍と増加傾向を示した (Fig.3-21)。

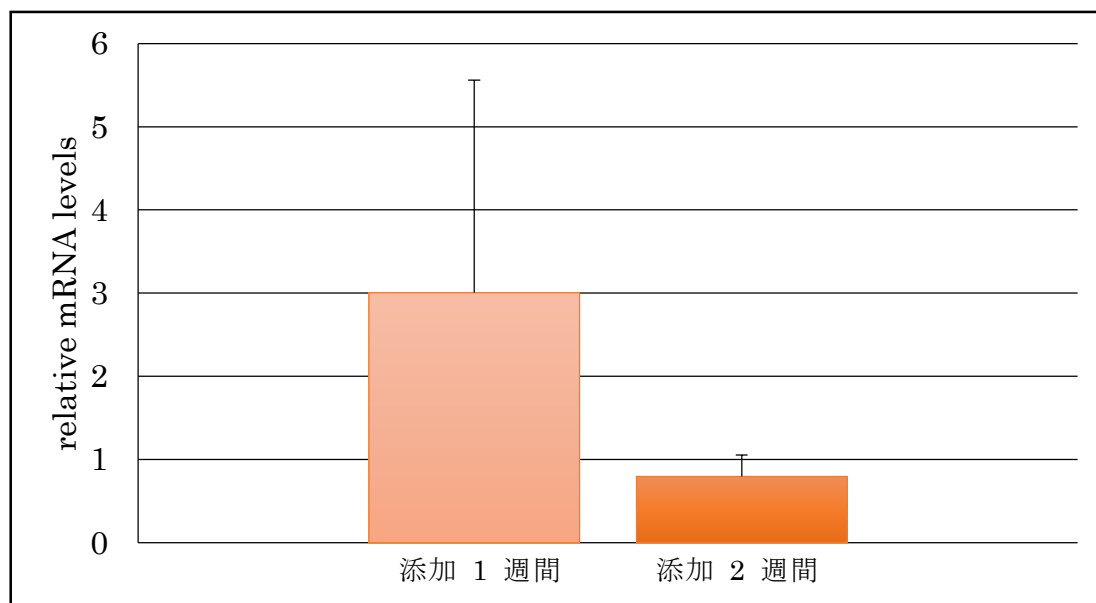


Fig.3-22 エラスチン A 添加によるテノモジュリンの遺伝子発現変化 (vs 無添加)

靱帯マーカーであるテノモジュリンに関して、エラスチン A 添加により 1 週間において 3 倍を示し、2 週間では 0.8 倍の遺伝子発現を示した (Fig.3-22)。エラスチン A 添加により 1 週間の早い段階でテノモジュリンの発現増加傾向が確認された。

PCR による遺伝子発現量の結果一覧を以下に示す (Table.3-5)。

Table.3-5 エラスチン添加による遺伝子相対発現量 (vs 無添加)

	Galectin-3	I 型コラーゲン	テノモジュリン
1 週間	0.338	5.305	3.004
2 週間	0.659	2.642	0.797

3-2-7 エラスチンによる同定タンパク質の発現変化 (*in vivo*)

Galectin-3 について *in vivo* においても 3-2-6 と同様の傾向を示すのか試験を行った。グラフの縦軸は正常群を 1 としたときの相対発現量を示す。(n=3)

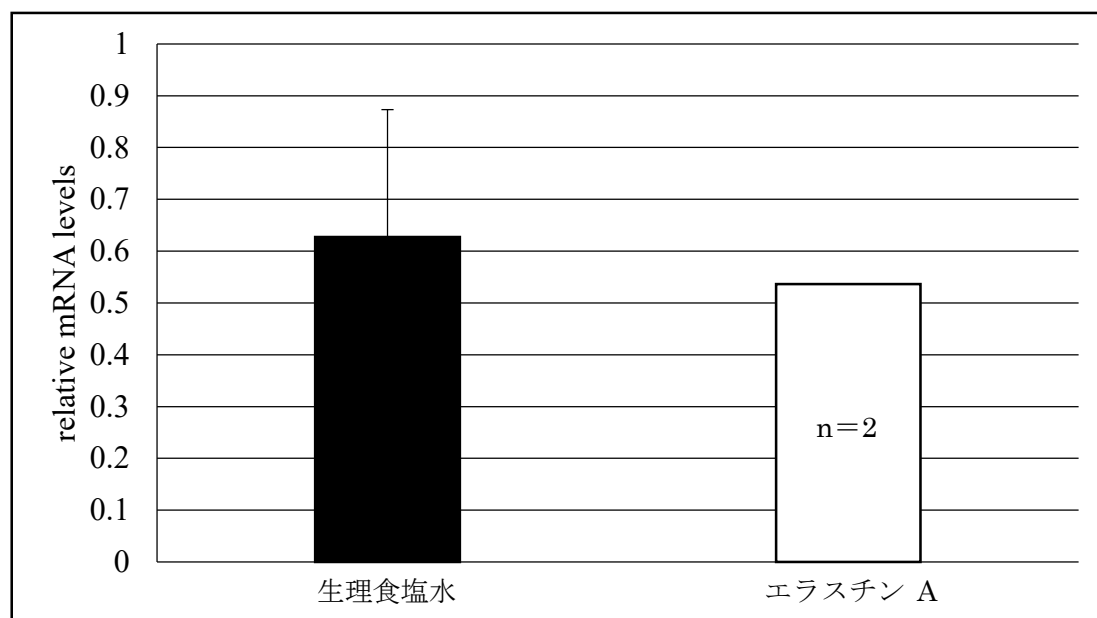


Fig.3-23 患部エラスチン A 投与 6 週における Galectin-3 の遺伝子発現変化

組織患部 6 週におけるエラスチン投与群では 0.86 倍(vs 生食)を示し、エラスチン投与による Galectin-3 の大きな変化は見られなかった (Fig.3-23)。

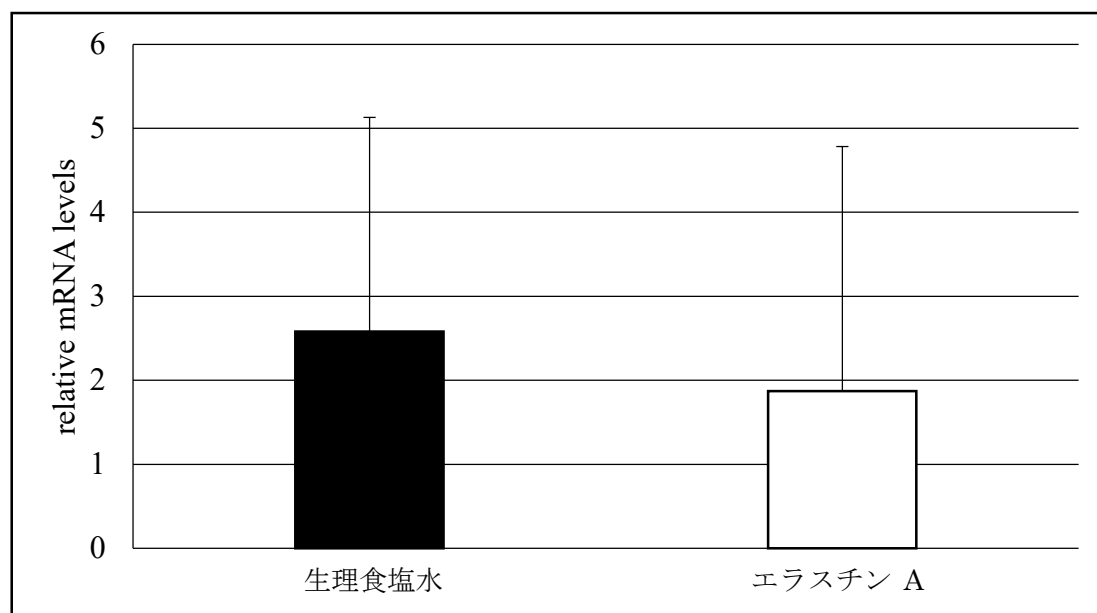


Fig.3-24 患部エラスチン A 投与 12 週における Galectin-3 の遺伝子発現変化

組織患部 12 週におけるエラスチン投与群では 0.73 倍 (vs 生食) を示し、エラスチン投与による Galectin-3 の大きな変化は見られなかった (Fig.3-24)。

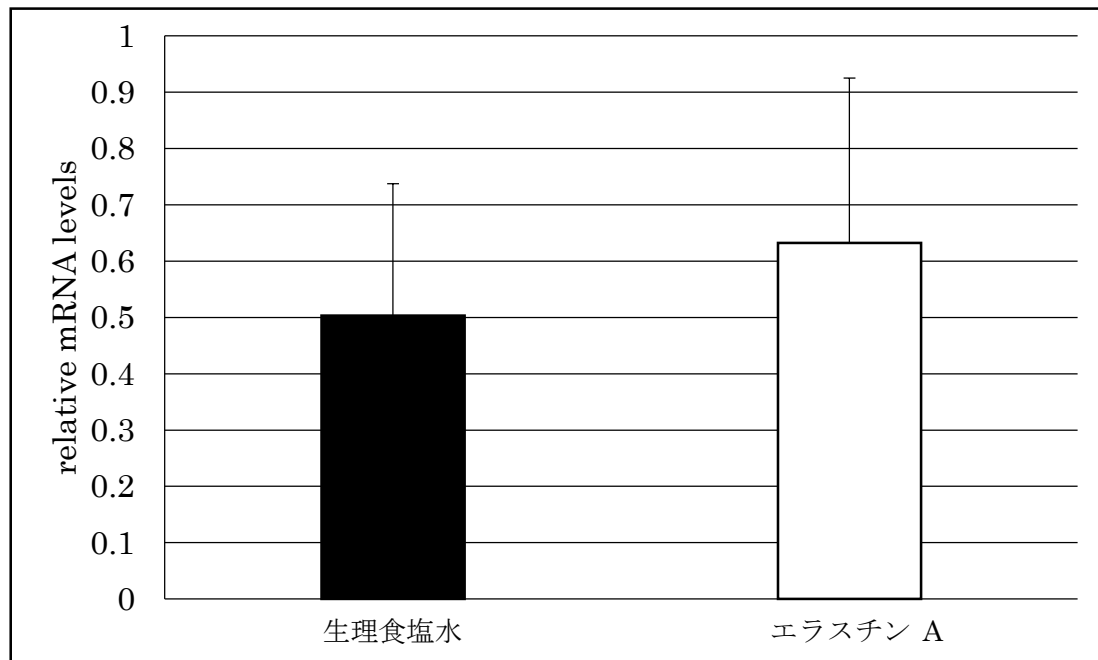


Fig.3-25 端部エラスチン A 投与 6 週における Galectin-3 の遺伝子発現変化

組織端部 6 週におけるエラスチン投与群では 1.26 倍 (vs 生食) を示し、エラスチン投与による Galectin-3 の大きな変化は見られなかった (Fig.3-25)。

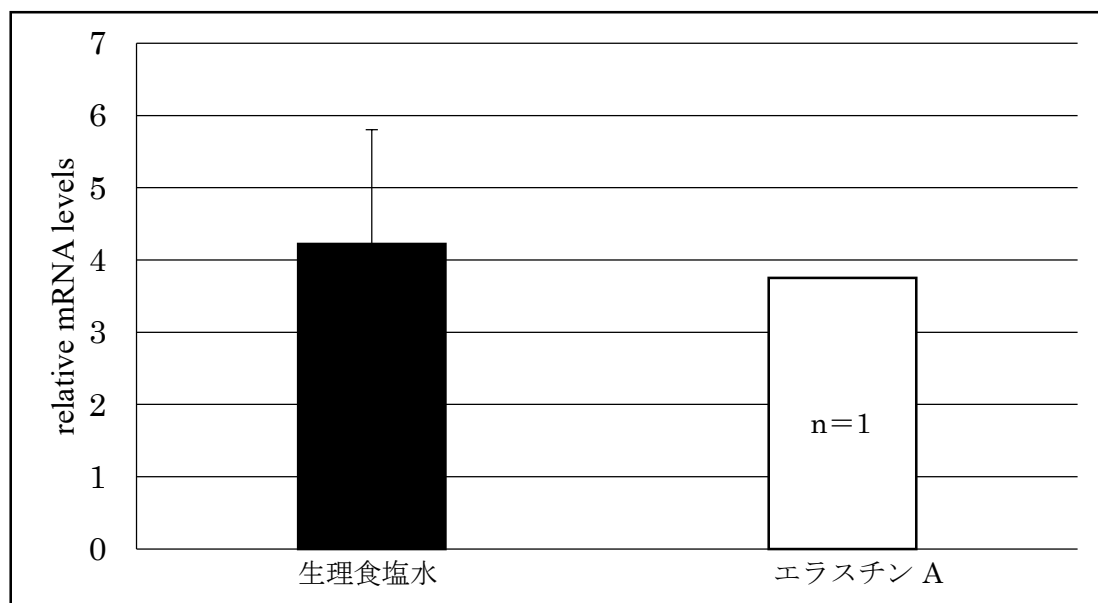


Fig. 3-26 端部エラスチン A 投与 12 週における Galectin-3 の遺伝子発現変化

組織端部 12 週におけるエラスチン投与群では 0.89 倍 (vs 生食) を示し、エラスチン投与による Galectin-3 の大きな変化は見られなかった (Fig.3-26)。

PCR による遺伝子発現量の結果一覧を以下に示す (Table.3-6)。 *in vivo* において Galectin-3 の発現はエラスチン投与による大きな変化は見られず、6 週においては 0.5～0.6 倍の低発現 (vs 正常) を示し、12 週においては 2～4 倍の高発現 (vs 正常) を示した。

Table.3-6 エラスチン投与による遺伝子相対発現量 (vs 正常)

6 週間	靱帯断裂部	骨—靱帯接合部
生理食塩水	0.63	0.50
エラスチン A	0.54	0.63
12 週間	靱帯断裂部	骨—靱帯接合部
生理食塩水	2.58	4.22
エラスチン A	1.87	3.75

4. 考察

4-1 靱帯修復時のエラスチンの機能

4-1-1 エラスチン投与による遺伝子・タンパク質発現への影響

in vivo 試験として鈍的に損傷させた MCL へのエラスチン A の投与試験を行った。また、本研究では手術を行っていない正常例を比較対象に加えることで、正常な靱帯の指標とした。

1) 靱帯断裂部へのエラスチンの効果

採取した組織の損傷部についての結果を考える。組織の採取時、損傷部は癒痕だと思われる組織によって覆われていた (Fig.4-1)。可能な限り取り除いたが、この部位から靱帯組織のみ採取することは困難であるため、得られた結果は靱帯組織のみの結果とは多少異なる可能性がある。12 週時点では癒痕組織はほとんど確認されなかった。

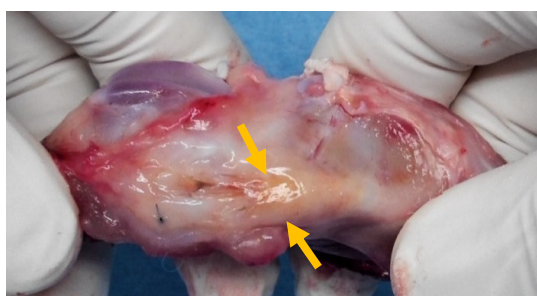


Fig.4-1 靱帯損傷部の様子 (矢印:靱帯損傷部近傍)

まず投与 6 週間の時点において、靱帯成分の I 型コラーゲンとエラスチンがエラスチン A を投与することによって生食群よりも遺伝子発現においては有意に発現が増加し、タンパク質発現においても発現の増加傾向が見られた (Fig.3-1,3-2)。また、投与 12 週では遺伝子、タンパク質発現ともに実験群による違いは見られず、6 週と比較した際にはいずれの値も減少していることが示された (Fig.3-3,3-4)。

2) 靱帯—骨接合部への効果

骨接合部の組織の採取の際に靱帯付近の骨組織もわずかに含まれている可能性があるため、靱帯組織のみの結果とは多少異なる可能性がある。

まず 6 週時点で I 型コラーゲンに注目してみると、生食群に比べ遺伝子発現では有意に上昇しタンパク質発現では増加傾向であることがわかる (Fig.3-5)。骨分化マーカーの ALP は有意な差は得られなかったが、生食群に比較して高い発現を示した (Fig.3-6)。

12 週時点では、1) で述べた様に接合部においても遺伝子、タンパク質発現ともに実験群による違いは見られず、6 週と比較した際にはいずれの値も減少していることが示された (Fig.3-7,3-8)。

1)、2) よりエラスチン A 投与によって 6 週時点で発現量に変化が見られ、12 週時点では違いが見られず、6 週時点よりも低い値を示したことがわかった (Table.3-1,3-2)。

4-1-2 エラスチン投与による力学特性への影響

エラスチンの投与によって正常例ほどではないが、生食群に比べて弾性率が有意に上昇した。靱帯の主成分はコラーゲンとエラスチンであることが知られているが、まずコラーゲンの影響について考察する。

靱帯においてコラーゲンは組織に強度、張力を与えており、本研究においてエラスチンの投与によってその発現量は生食群よりも高くなっていることが確認された (Fig.3-1,3-5)。弾性率も生食群よりも上昇していることから (Fig.3-9)、組織内のコラーゲン量が靱帯の強度に影響しているのではないかと考えられ、特に損傷部のコラーゲン量が大きく寄与していると考えられる。

1) 生食群とエラスチン投与群について

コラーゲン量の差がそのまま弾性率の差に表われていると考えられる。生食群ではコラーゲン発現量が少ないことから (Fig.3-1)、コラーゲン線維の量が少ないと考えられる。(Fig.4-2)

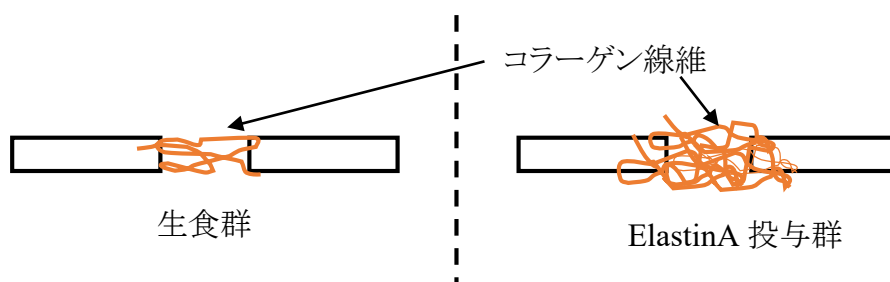


Fig.4-2 損傷部のコラーゲン線維の様子

2) エラスチン投与群と正常例について

コラーゲン発現量に有意な差は見られなかったにも関わらず (Fig.3-1)、弾性率には差が確認された (Fig.3-9)。2 群の間での違いは以下の 2 つが考えられる。

- ①組織の状態(線維の配向性)
- ②コラーゲン以外の要因

①について、エラスチン投与群はまだリモデリングが終了していないと考えられるため、配向性は低いと考えられる。配向性が低い場合、弾性率測定の際に引張り方向に伸展することが出来ず、結果として弾性率は上がらないということが考えられる (Fig.4-3)。本研究室の先行研究より、投与 6 週における組織中に存在する細胞の配向角度を測定し、治療点数を計算した結果、エラスチン投与では 0.9 点を示し、生食群の 0.5 点よりも有意に高いことが示されたが、正常値 (2.3 点) には及ばなかった²⁷⁾。

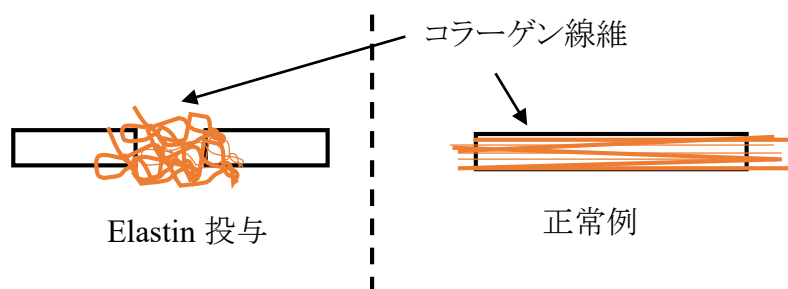


Fig.4-3 コラーゲン線維の配向性の違い

②について、コラーゲン以外に考えられる要因としてエラスチンが挙げられる。靱帯成分の 1 つであり組織に弾性を与えているため、弾性率に大きく寄与していると考えられる。実験結果よりエラスチンの発現量もエラスチン投与によって増加を示した (Fig.3-2)。タンパク質発現に関しては正常よりも高い値を示しているにもかかわらず、弾性率が低い値であることはエラスチンだけが弾性率に影響しているわけではないことを示唆している。産生されたエラスチンが凝集し、形成された弾性線維が組織の弾性率に寄与すると考えられる。弾性線維の比率に関して本研究室の先行研究より、投与 6 週の時点で測定した結果、線維の配向性と同様にエラスチン投与によって生食群よりも単位面積あたりの弾性線維の比率が有意に高いことが示された (生食群:0.5%、エラスチン群:0.8%) が、正常値 (1%) には及ばなかった²⁷⁾。

4-2 損傷靱帯の治癒プロセスおよび試験期間に関して

靱帯が損傷を受けた場合、次の 3 ステップで治癒反応が進行する^{27) 28)}。

1) 初期反応 (Fig.4-4)

損傷部は出血し、血栓が形成される。その後、炎症が発生し、瘢痕が形成される。

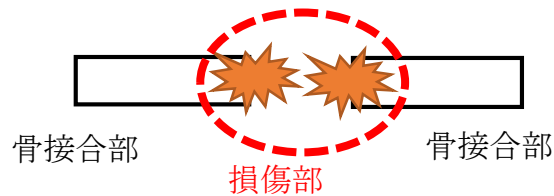


Fig.4-4 治癒反応初期

2) 中期反応 (Fig.4-5)

細胞増殖が始まり、ECM が産生される。このとき、血管新生も始まる。

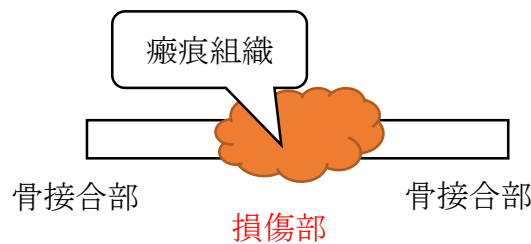


Fig.4-5 治癒反応中期

3) 後期反応 (Fig.4-6)

ゆっくりとしたリモデリング段階に入る。この反応は損傷後数ヶ月～数年続く。損傷後の断端の整復性により、瘢痕の形成やその後の修復に違いが生じる。血管等の成分は徐々に減少し、コラーゲン線維が配向することで瘢痕から靱帯様へと移り変わっていく。

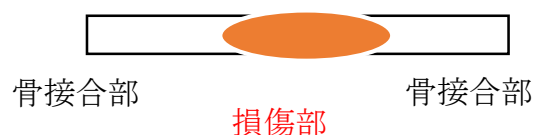


Fig.4-6 治癒反応後期

本研究では靱帯損傷モデルは MCL を損傷させることで実験を行った。MCL は関節外靱帯であり、関節内靱帯と比較して血管が多くこの治癒過程と同様の反応が進行したと考えられる (Fig.4-4,4-5,4-6)。損傷部に癒痕と思われる組織が残っていることと (4-1-1)、上述の結果から、投与 6 週での靱帯組織は上記過程の 2 から 3 への移行途中であることが示唆される。このことから 6 週という実験期間ではまだ靱帯の治癒反応は進行途上であり、治癒過程における靱帯組織の状態を反映していると考えられる。

投与 12 週では遺伝子・タンパク質発現に変化が見られず、力学特性も 6 週と比較してほとんど変化がないことから (Table.3-2,3-3) 上記プロセスの 3 に位置し、損傷部位の治癒プロセスは終息に向かっていると考えられる。

これらから、エラスチンは炎症反応後の細胞による基質産生を促し、損傷靱帯の早期治療に有効であることが示唆された。

4-3 靱帯細胞と創傷治癒

4-3-1 靱帯細胞

組織中の靱帯細胞は、一般的に紡錘状の線維芽細胞⁶⁾であり、この細胞は組織の長軸方向に沿って平行に配向して存在している (Fig.4-7)。



Fig.4-7 線維芽細胞の様子⁶⁾

靱帯細胞は線維芽細胞と似たような機能を持っており、コラーゲンやエラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン等の ECM を産生する。

4-3-2 創傷部での線維芽細胞の役割

創傷の治癒過程では、炎症細胞が損傷部を認識した後、結合組織の細胞が認識し移動する。線維芽細胞は走化性と呼ばれるメカニズムによって創傷部へと引き寄せられ、このメカニズムには様々な遊走因子が関与している²⁹⁾ (Table.4-1)。また、線維芽細胞は自己が産生したECMを分解する酵素も分泌するため、細胞外環境の再構築にも関与している。

Table.4-1 主な線維芽細胞遊走因子²⁹⁾

細胞外マトリックス	コラーゲンおよびその分解産物
	フィブロネクチン
T 細胞由来のもの	lymphocyte-derived chemotactic factor (LDCF-F)
補体系由来のもの	serum (C5)-derived chemotactic factor
血小板由来のもの	platelet-derived growth factor
	transforming growth factor β (TGF- β)*

*TGF- β は血小板以外にも、T 細胞、マクロファージなどで作られる。

コラーゲンとその分解物であるコラーゲンペプチドも遊走因子となっているため、組織のリモデリングが活発に行われることでコラーゲンの分解が進行し、線維芽細胞である靱帯細胞の遊走につながっていると考えられる。

4-4 細胞によるエラスチンの認識

本研究では Elastin Binding Protein (EBP) がウサギ靱帯細胞中に存在していることが示された (Fig.3-11)。EBP によるエラスチンの認識は 1-4 ですでに述べた通りである。ここでは今回同定された Galectin-3 と Cyclophilin B、CAP18 によるエラスチンの認識に関して考察する。

4-4-1 Galectin-3 による認識

Galectin は現在 1 から 15 が知られており、ガラクトースを認識し結合もしくは糖鎖を架橋するタンパク質である。哺乳類においてはさらに以下の 3 つのサブタイプに分類される。①糖鎖結合ドメインを 1 つ有する proto type、②1 つの糖鎖結合ドメインに別のドメインが隣接している chimera type、③2 つの糖鎖結合ドメインを有する tandem repeat type である。Galectin-3 は②の chimera type に分類される (Fig.4-8)。

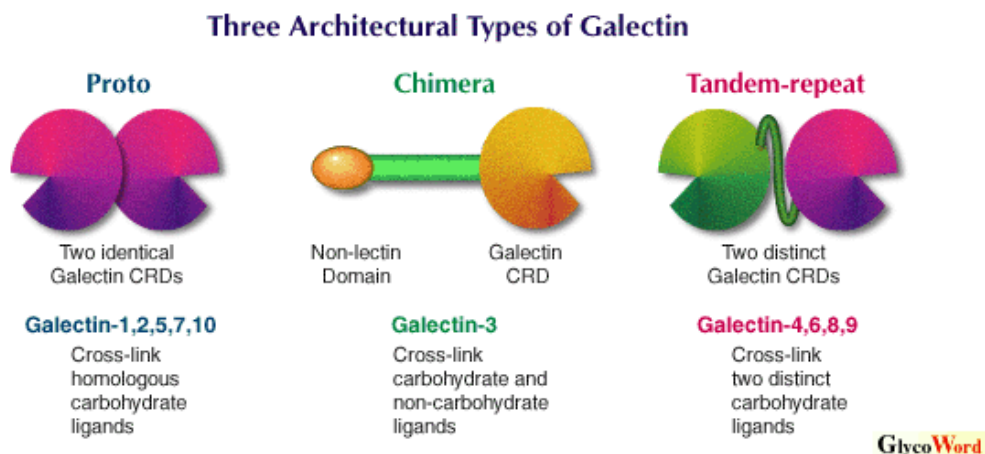


Fig.4-8 Galectin のサブタイプ ³⁰⁾

Galectin-3 は生体の免疫系に深く関与しているレクチンとして知られているが、EBP と同様に VGVAPG 及び VAPG ペプチドを認識することが報告されている ¹⁷⁾。本研究ではエラスチンペプチドではなく、生体内環境を模倣するために不溶性エラスチンを用いたが、結果よりエラスチン結合タンパク質としてラクトースにより単離することができ、不溶性エラスチンに含まれる上記アミノ酸配列を認識したと考えられる。

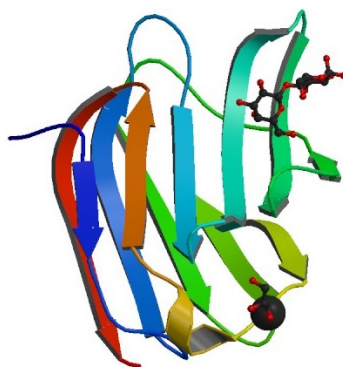


Fig.4-9 Galectin-3 の糖鎖認識部位 ^{31) 32)}

また、*in vitro* でウサギ靱帯細胞へエラスチン添加試験を行うことで、エラスチンによる Galectin-3 の発現に変化が見られるかについても調査した。real-time PCR の結果より、エラスチン添加によって Galectin-3 は発現の減少を示した (Fig.3-20)。エラスチンによって Galectin-3 の発現変化が見られたことから、ウサギ靱帯細胞においてもエラスチン認識能を有していることが示された。同時に I 型コラーゲンとテノモジュリンについても解析した結果、それぞれの発現に増加傾向が見られた (Fig.3-21,3-22)。このことから、今回 *in vivo* 試験で得られた結果は、Galectin-3 を介した経

路においてもエラスチンが細胞に効果を与えたことが示唆された。そこで、*in vivo* での Galectin-3 発現についても試験を行った。その結果、エラスチン投与により組織患部での Galectin-3 の発現は若干の減少傾向を示し、*in vitro* での細胞へのエラスチン添加試験と類似した傾向を示したが、組織端部においてはエラスチンの投与による大きな変化は見られなかった (Table.3-6)。

Galectin-3 とエラスチンに関する Calvier らの研究において、ラット血管平滑筋細胞 (VSMC) の Galectin-3 をプラスミドベクターの導入により過剰発現させた際には、I 型コラーゲンの発現は有意に増加するが、エラスチンなどの ECM に関してはその発現変化が見られないという結果が報告されている (Fig.4-10)。

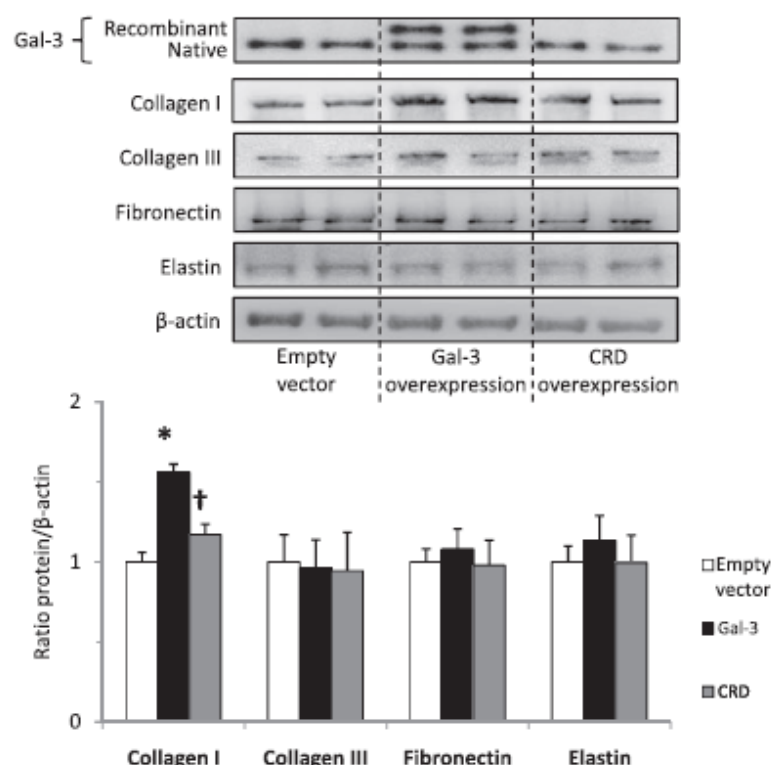


Fig.4-10 Galectin-3 の過剰発現による ECM の発現変化³³⁾

他にも、心臓や肺における Galectin-3 の発現がコラーゲンの発現と関連しており、組織の線維化を引き起こすとの報告がある^{34) 35)}。これらはエラスチンを含む組織であるが Galectin-3 との相互作用に関しては述べられていない。現在、Galectin-3 とエラスチンとの直接的な相互作用としては、乳癌細胞の増殖促進³⁶⁾ およびメラノーマ細胞の遊走促進¹⁷⁾ に関することが知られている。しかし、いずれもエラスチン産生との関連については報告されておらず、今回のエラスチンによる Galectin-3 の発現減少がどのような機序によるものかは明らかでない。

4-4-2 Cyclophilin B による認識

Cyclophilin B (CyPB) は別名 Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase B (PPIB) と呼ばれ、イムノフィリンファミリーに属している。現在知られている機能として、免疫抑制剤である Cyclosporine と結合することや、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 活性を持ち、タンパク質のフォールディングに関わることが報告されている。さらに、細胞内輸送や核内への移行、分子が凝集する間の保護などの役割も報告されており、シャペロンとしての機能も持つと考えられている。細胞質タンパク質として存在することが知られているが、細胞膜にも複合体を形成することで存在するといった報告もある。また、Cyclophilin は A—D の 4 つのタイプが確認されている³⁷⁻³⁹⁾。

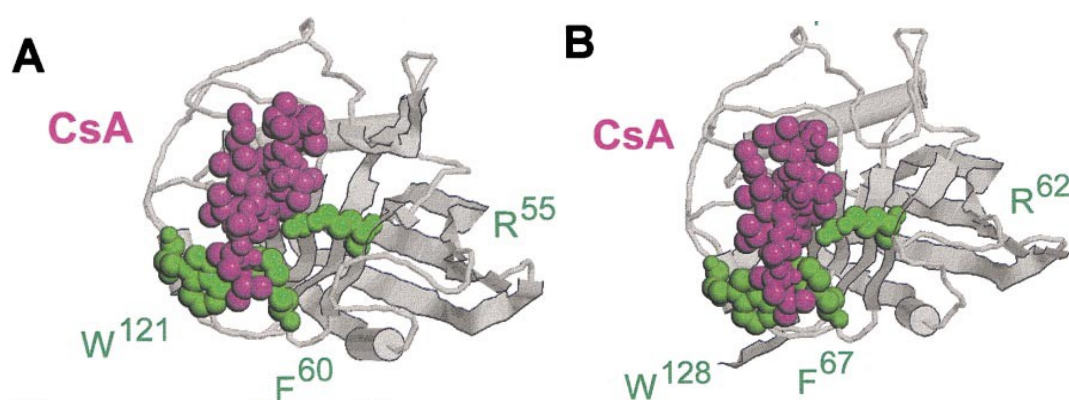


Fig.4-11 CyPA の三次元構造(A)、CyPB の三次元構造(B)³⁸⁾

イムノフィリンファミリーには Cyclophilin と機能的に類似している FK506 Binding Protein (FKBP) ファミリーが存在する。FKBP は 1 から 15 までは確認されており、そのうち FKBP10 (FKBP65) がエラスチンとの相互作用を示したとの報告がある。FKBP10 は細胞内トロポエラスチンのコアセルベーションを制御し、エラスチンの合成・分泌過程での補助的役割を担っていると考えられる^{40) 41)}。今回同定された Cyclophilin は FKBP と機能的には類似しているが、アミノ酸配列という点においては類似性を示さない。したがって、FKBP10 とは別の認識方法、役割でエラスチンに対して関わっていることが推察される。

当研究室では以前よりエラスチン結合タンパク質に関する研究を行ってきたが、FKBP9 に関してもエラスチン結合タンパク質である可能性が示唆されていた⁴²⁾。FKBP9 はこれまでにエラスチンとの相互作用は報告されていなかったが、FKBP10 との配列相同性が 58%を占めていることから、エラスチンと相互作用する可能性は十分にあると考えられた。今回の CyPB もこれまでにエラスチンと相互作用を示したという報告は無く、本研究で新たに示された。これらのことから、イムノフィリンファ

ミリーに属しているタンパク質にはエラスチンと何らかの相互作用を持つ可能性が十分に考えられ、今後より詳細な研究が必要である。

4-4-3 CAP18 による認識

CAP18 はウサギ顆粒球から単離された 18kDa のカチオン性抗菌タンパク質であり、カテリシジンファミリーに属する。CAP18 は α ヘリックス構造をとり (Fig.4-12A)、グラム陰性菌などの膜を構成しているリポ多糖 (LPS) に静電的相互作用によって結合することでその活性を阻害する。CAP18 は 4 つのエクソン、2 つのドメインから構成されており、C 末端 (106-142) に LPS 結合ドメインが、N 末端側 (1-105) には機能が未知であるドメインとシグナルペプチドが確認されている (Fig.4-12B)。

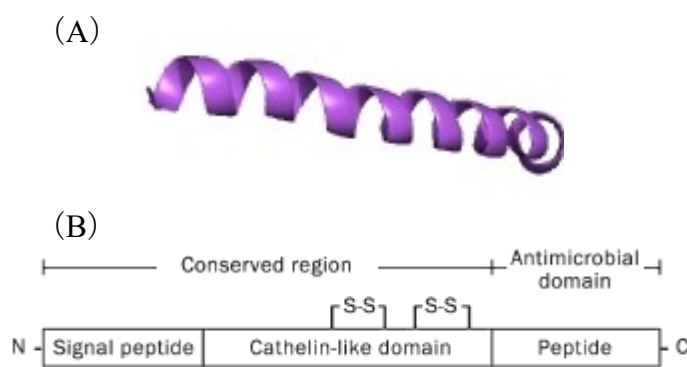


Fig.4-12 (A) CAP18 の三次元構造^{43) 44)} および
(B) カテリシジンファミリーの模式図⁴⁵⁾

ヒトにおいては CAP18 がタンパク質切断を受けることで C 末端ドメインが遊離し、LL-37 として知られる抗菌ペプチドとして機能している。LL-37 は炎症や創傷部位における感染に対する最初の防衛機構として重要となっている。細菌の膜はホスファチジルグリセロールのような酸性リン脂質が多く負に荷電しているため⁴⁶⁾、カチオン性である抗菌性タンパクは選択的に細菌の膜に結合する。哺乳類の細胞膜はホスファチジルコリンのような双性イオン性リン脂質を多く含み、抗菌性タンパクとは疎水性相互作用による結合を形成する⁴⁷⁾。抗菌性タンパクが細菌の膜に結合した後は、膜に小孔を形成し膜を改変させる、細胞内に入り込み、DNA 等の合成阻害などの作用が知られているが、詳細な殺菌の機構は不明である。

今回行った *in vivo* 試験において、MCL 損傷時の炎症によって CAP18 が発現、産生され、損傷部位におけるエラスチンの認識に大きな役割を果たしていた可能性が考えられる。カテリシジンは白血球の誘導因子としての機能も持ち合わせてい

ることから、損傷により露出したエラスチンおよび分解エラスチンに CAP18 が結合し、この CAP18 に白血球が誘導されると考えられ、本研究ではエラスチンを投与したため、損傷部位のエラスチン濃度が高まり、エラスチン投与群では組織の治癒反応が加速したのではないかとと思われる。

このタンパク質がエラスチン結合ドメインを持つのであれば未だ機能が不明である N 末端側に存在する可能性が挙げられる。しかし、切断されたペプチドの状態でも認識できるのか intact な CAP18 の状態でのみ認識できるのかは今回の試験からは断定できない。エラスチンとの結合様式も不明であるため、今後の課題である。

4-5 材料としてのエラスチンおよびエラスチン結合タンパク質

4-5-1 本研究で用いたエラスチンについて

当研究室では不溶性エラスチンを酸処理し、水溶化したエラスチンを 5 つのクラスに分画して使用している。以下に分画エラスチンの性質を示す (Table.4-2)。

Table.4-2 分画エラスチンの性質

※ 凝集温度により分画

	数平均分子量 (kDa) (クロマトグラフィー)		デスモシン含有量 (mol%) (吸光度測定)	
Elastin A	25.2	高	2.87	高
Elastin B	21.4	↑	2.53	↑
Elastin C	18.7			
Elastin D	10.3			
Elastin E	10.1	低	0.94	低

本研究では *in vivo* 試験において、最も生体内でのエラスチンの状態に近いエラスチン A を用いた。結果としてエラスチン A の投与により生食群と比較して遺伝子やタンパク質の発現が上昇し (Table.3-1)、弾性率にも回復が見られた (Table.3-3) ことから細胞がエラスチン A を認識したことは明らかであり、損傷靱帯の治療のための材料として期待できると考えられる。また、エラスチン A は靱帯断裂部だけでなく、靱帯―骨接合部にも効果があることが示唆された (Fig.3-5)。骨基質である I 型コラーゲンの発現上昇と骨分化初期マーカーである ALP の発現が上昇傾向にあること

から接合部の強度増加につながると考えられる。当研究室の先行研究では、作製した ECM ファイバー上での靱帯細胞の応答を確認した。エラスチン A 足場上では ALP だけでなく、骨分化中期マーカーである Osteopontin の発現も上昇した (Fig.4-13)。

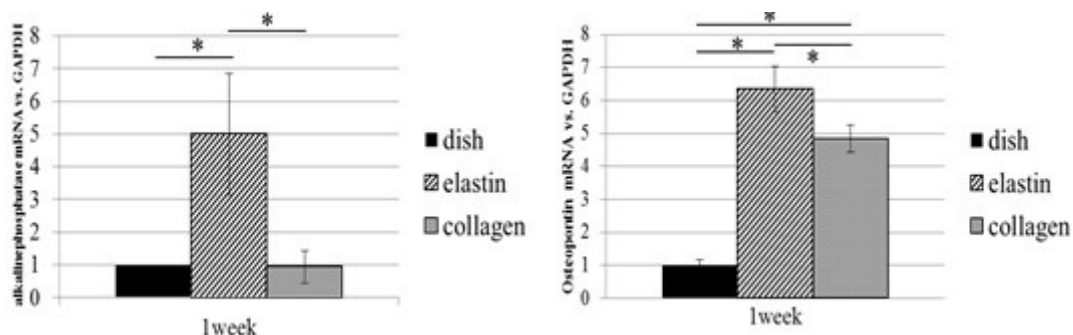


Fig.4-13 ECM ファイバー上での靱帯細胞の遺伝子発現⁴⁸⁾
(左)ALP、(右)Osteopontin、* : $p<0.05$

エラスチン A は骨化を促すような特異的な配列を含んでいることが考えられる。この配列が VGVAPG のような既知のエラスチン特有配列であるのか、他の配列であるかは不明である。VGVAPG であるなら EBP あるいは Galectin-3 を介した経路が考えられるが、細胞内での伝達経路は異なる可能性がある。ほかの配列であるなら今回同定された CyPB や CAP18 が関与している可能性が考えられる (Fig.4-14)。特に CyPB は細胞膜に存在しているという報告もされていることから、エラスチンレセプターとしてシグナル伝達に関与していることも考えられる。

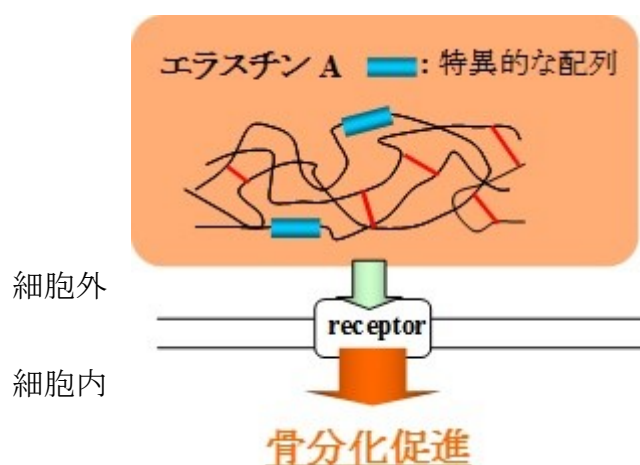


Fig.4-14 エラスチンの骨分化への影響

本研究で使用した水溶性分画エラスチンはファイバーやゲルといった材料として用いることも容易であるため、様々な人工材料への応用が期待できる。

4-5-2 組織工学的人工材料への応用

本研究で使用したような分画エラスチン、また新たに同定されたエラスチン結合タンパク質を用いた具体的な組織工学的人工材料について考察する。

現在、当研究室ではエラスチンを足場とした人工靱帯の開発を進めている。分画エラスチンをファイバー状に形成し、靱帯細胞を培養することで基質産生を促すといった結果が得られている⁴⁸⁾。また、エラスチンファイバーを作製する際に配向させることにより、培養細胞の配向を誘導できることもわかった (Fig.4-15,4-16)。実際の生体内でも靱帯細胞は組織の長軸方向に向かって配向していることが知られているため、足場の線維方向は重要なファクターである⁶⁾。

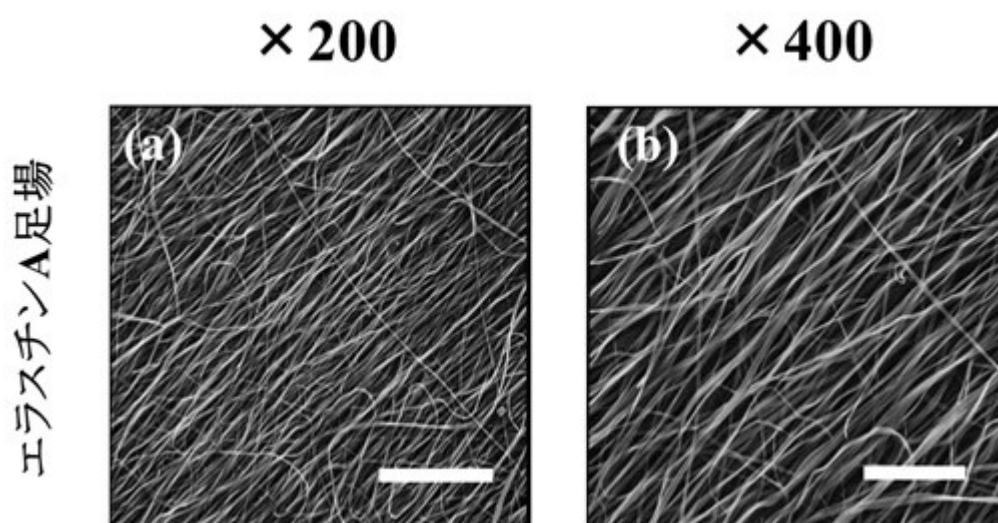


Fig.4-15 エラスチンファイバーの SEM 写真 (Scale bar: a=90um、b=45um)²⁵⁾

また、エラスチン A 足場上で靱帯細胞を培養した場合は細胞の骨化が誘導され、コラーゲン足場上での培養では靱帯マーカーであるテノモジュリンの発現が高いことから靱帯の表現型を維持することがわかった。足場自体の強度もコラーゲンの方が強く、人工靱帯の作製には強度を保つために必要であると言える (Fig.4-17)。

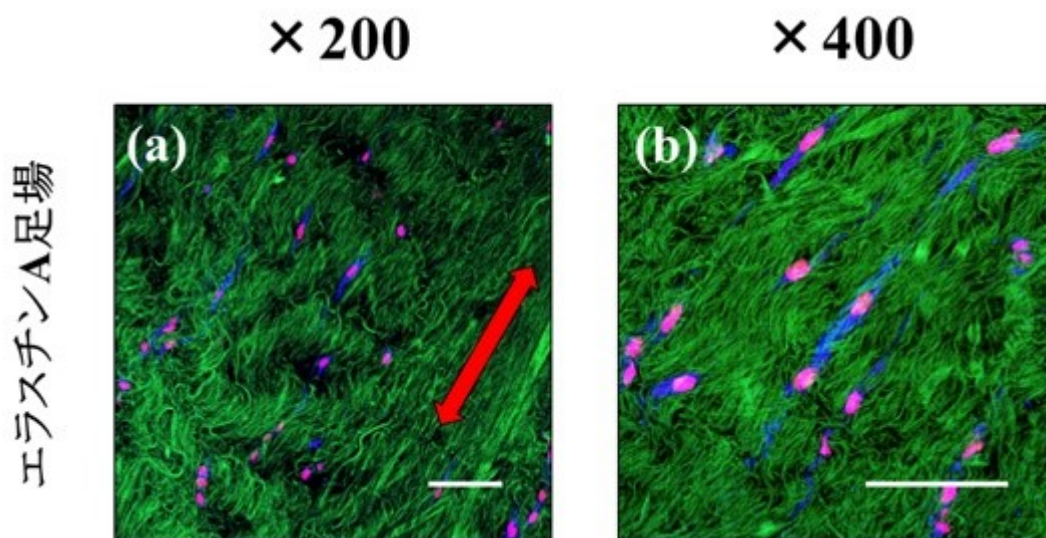


Fig.4-16 エラスチンファイバー上の歯周靱帯細胞
(赤色:細胞核、青色: α -smooth muscle actin、緑色:ECM ファイバー足場の自己蛍光、図中矢印:線維の配向方向、Scale bar: 100um)²⁵⁾

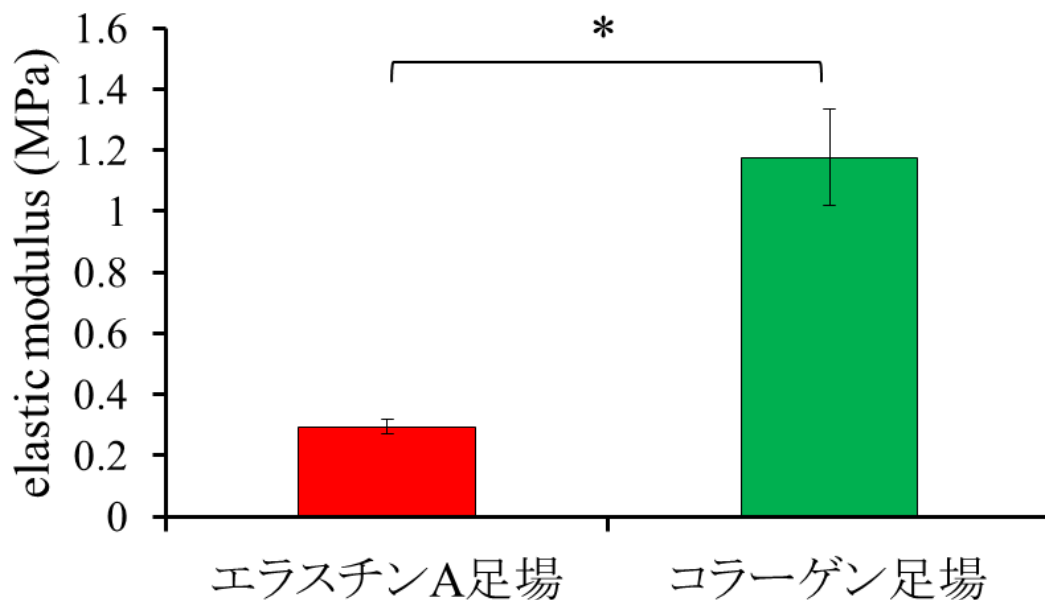


Fig.4-17 ECM ファイバーの弾性率 (* : $p < 0.05$)²⁵⁾

人工靱帯は材料自体の強度だけでなく、生体内へ移植した際に骨との接合部にも強度が求められる。その点、人工靱帯中央部にはコラーゲンを利用し、両端部にエラスチンAを用いることで、人工靱帯の強度維持と骨接合部の骨化誘導による接合強化が期待できる。作製した足場に患者さん自身の細胞を使用することでより生体適合性の高い人工靱帯を開発することが可能であると考えられる(Fig.4-18)。

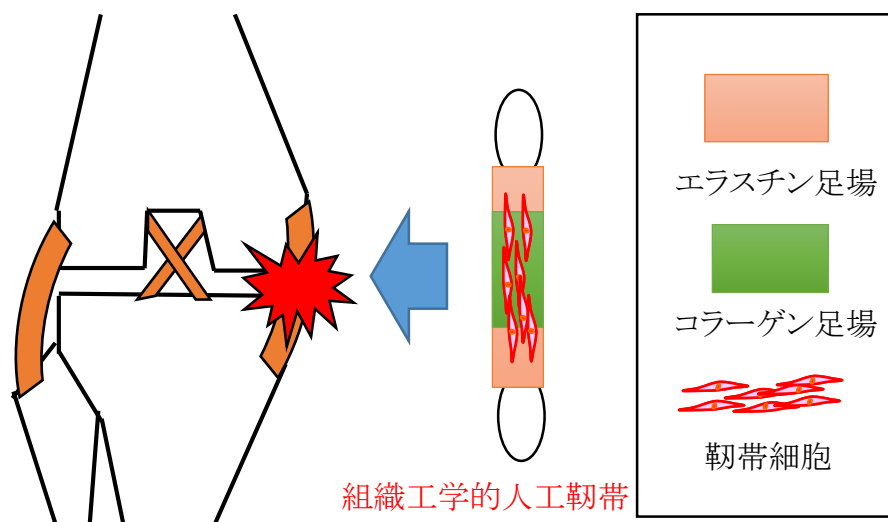


Fig.4-18 組織工学的人工靱帯のモデル

人工靱帯の移植後は細胞による足場材料の分解が進行すると考えられる。つまり、材料の強度低下を防ぎ、細胞が基質産生を促されるような環境を作ることが必要となる。ECM足場での細胞培養時にEBPやGalectin-3、CyPBを足場や培地中に混在させておくことで細胞のエラスチン認識能(エラスチン足場への接着誘導)を高め、移植時にCAP18を足場上のエラスチンに結合させておくことで、移植後の感染を抑えることができればスムーズな靱帯再建が行えるのではないかと考えられる(Fig.4-19)。

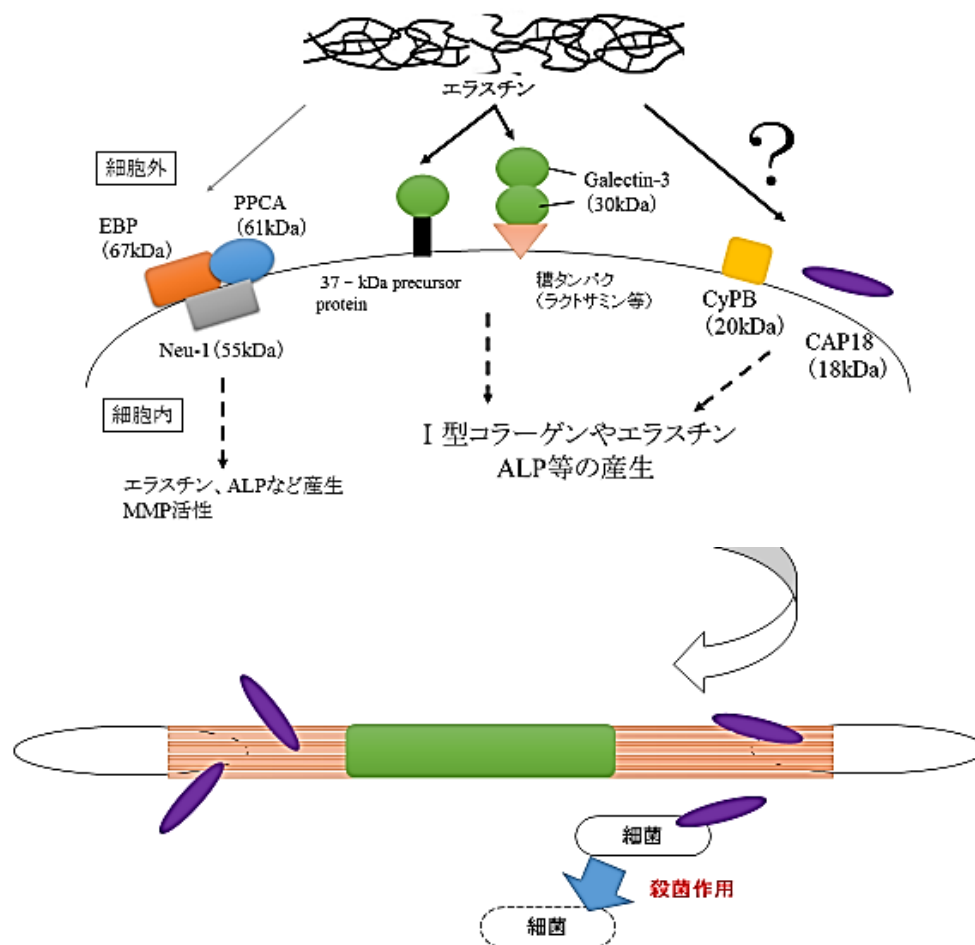


Fig.4-19 人工材料への応用⁴⁹⁾

しかし、これらの同定されたエラスチン結合タンパク質が実際にどのような作用を及ぼすかは不明であるため、これらのタンパク質とエラスチンとの相互作用を検討することで、より詳細な修復過程の理解が期待できる。

5. 結論

本研究によって

1. ウサギモデルを用いた *in vivo* 試験によって、エラスチンが損傷靱帯へ与える効果を知ることが出来た。今回の結果より、エラスチンが靱帯の早期治癒に効果的であることが示唆された。これまでの *in vitro* 試験での結果と類似した傾向を示したため、これまでの実験結果が生体内でも有効であることが示唆された。また、採取した靱帯組織を靱帯断裂部と靱帯―骨接合部に分けて評価することによって、エラスチンを投与した際の靱帯へ与える影響が部位によって異なることが示唆された。

また、エラスチン投与 6 週間、12 週間という期間を設定することで、12 週間の時点で変化が見られなかった事から反応は終了し、6 週間の結果が治癒反応を表現していることが示唆された。

2. ウサギ靱帯細胞中のエラスチン結合タンパク質を単離、同定を行ったことで、靱帯細胞がどのようにエラスチンを認識しているのか、その機構解明につながる貴重な結果が得られた。今回 Galectin-3 や CyPB、CAP18 などがエラスチン結合タンパク質として同定され、そのうち Galectin-3 についてエラスチンの作用を観察した結果、Galectin-3 の遺伝子発現はエラスチン添加によって減少することがわかった。

今後は、ほかの同定されたタンパク質も同様にエラスチンとどのように相互作用するかの実験が必要である。また、水溶性分画エラスチンにも結合を示すのか、その解明も必要である。そして最終的にこれらエラスチン結合タンパク質とエラスチン、コラーゲンを複合することで生体適合性の高い組織工学的な人工靱帯の開発が期待できる。

6. 参考文献

- 1) Nagai M. Design of Biomaterials for Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *SEN 'I GAKKAISHI* 2005; 61: 139-141.
- 2) Petrigliano FA, McAllister DR, Wu B M. Tissue engineering for anterior cruciate ligament reconstruction: a review of current strategies. *Arthroscopy* 2006; 22: 441-51.
- 3) 日本エム・イー学会編. 生体細胞・組織のリモデリングのバイオメカニクス. コロナ社, 2003.
- 4) 富士川恭輔. 図説 膝の臨床. メジカルビュー, 2002.
- 5) Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2007; 26: 7530-6.
- 6) Duthon VB, Barea C, Abrassart S, Fasel JH, Fritschy D, Menetrey JL. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006; 14: 204-13.
- 7) Amis AA., Dawkins GPC. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament: Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. *J. Bone Jt. Surg. Br.* 1991; 73: 260-267.
- 8) Erik Attia, *et al*: Patterns of gene expression in a rabbit partial anterior cruciate ligament transection model: The potential role of mechanical forces. *Am J Sports Med.* 2010; 38: 348.
- 9) 木南凌、ほか: 細胞の世界. 西村書店, 2005.
- 10) Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JC, van Kuppevelt TH. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28: 4378-98.
- 11) Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* 1998; 258: 1-18.
- 12) Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 235-44.
- 13) Toshihiko Y, *et al* Elastic system fibers in the periodontal tissues. *shisyunishi*, 2004; 46(3): 175-184
- 14) Toupance S, *et al* Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis*, 2012; 29: 511-522
- 15) Robert P, *et al* The Elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. *J Biol Chem*, 1989; 264: 16652-16657

- 16) Bax DV, *et al* Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin α V β 3. *J Biol Chem*, 2009; 284(42): 28616-28623
- 17) Pocza P, *et al* Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer*, 2008; 122: 1972-1980
- 18) 松下操: フィコリン 自然免疫に働く新たなレクチンファミリー / *THE CHEMICAL TIMES*, 2008; 210
- 19) Pyong W P, *et al* Binding of elastin to staphylococcus aureus. *J Biol Chem*, 1991; 266: 23399-23406
- 20) Cheung KL, *et al* Effect of FKBP65, a putative elastin chaperone, on the coacervation of tropoelastin in vitro. *Biochem Cell Biol*, 2010; 88(6): 917-925
- 21) Aleksandar H, *et al*. Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly. *J Biol Chem*, 2006; 281: 3698-3710
- 22) Dhaval P, *et al* Self-Assembly of Elastin-Based Peptides into the ECM: the Importance of Integrins and the Elastin Binding Protein in Elastic Fiber Assembly. *Biomacromolecules*, 2011, 12 (2): 432-440
- 23) Mithieux S M, *et al* Elastin, *Adv Protein Chem*. 2005; 70: 437-461
- 24) Raymond boykiw, *et al*: Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments. *Matrix Biology*. 1998; 17: 371-378
- 25) 水谷直紀: 三次元培養基材および力学刺激による靱帯細胞の表現型制御に関する研究. 平成 25 年度 博士論文
- 26) 東京都老人総合研究所産学公連携プロテオーム共同研究センターの標準操作法: http://proteome.jp/2D/J_2DEmethod.html
- 27) 影山聡志: 膝靱帯の再生医療のための組織構造解析およびエラスチンを用いた治療効果の検討. 平成 25 年度 修士論文
- 28) Jasmine A. Beye, *et al*: Injury-induced changes in mRNA levels differ widely between anterior cruciate ligament and medial collateral ligament. *Am J Sports Med*. 2008; 36: 1337-1346.
- 29) 森口隆彦、ほか: 創傷の治療 最近の進歩 第 2 版. 克誠堂出版、2005 年
- 30) Glycoforum: <http://www.glycoforum.gr.jp>
- 31) Patrick M. Collins, *et al*: Slow diffusion of lactose out of galectin-3 crystals monitored by X-ray crystallography: possible implications for ligand-exchange protocols. *Biological Crystallography*. Vol. 63, Part 3, March 2007, 415-419
- 32) PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2nn8>

- 33) Calvier L, *et al*: Galectin-3 Mediates Aldosterone-Induced Vascular Fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:67-75
- 34) Sharma U, *et al*: Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3121-3128
- 35) MacKinnon A, *et al*: Regulation of Transforming Growth Factor- β 1-driven Lung Fibrosis by Galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med*. Vol 185, pp 537–546, 2012
- 36) Ochieng J, *et al*: Galectin-3 Regulates the Adhesive Interaction Between Breast Carcinoma Cells and Elastin. *Journal of Cellular Biochemistry*. 75:505-514, 1999
- 37) Price R, *et al*: Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Cell Biology*. Vol. 91, pp. 3931-3935, April 1994
- 38) Carpentire M, *et al*: Two Distinct Regions of Cyclophilin B Are Involved in the Recognition of a Functional Receptor and of Glycosaminoglycans on T Lymphocytes. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 274, No. 16, Issue of April 16, pp. 10990–10998, 1999
- 39) Marc J. Bergeron, *et al*: Synthesis, Maturation, and Trafficking of Human Na⁺-Dicarboxylate Cotransporter NaDC1 Requires the Chaperone Activity of Cyclophilin B. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. VOL. 286, NO. 13, pp. 11242–11253, April 1, 2011
- 40) Cheung KL, *et al*: Effect of FKBP65, a putative elastin chaperone, on the coacervation of tropoelastin in vitro. *Biochem Cell Biol*, 2010; 88(6): 917-925
- 41) Charles E, *et al*: Developmental regulation of FKBP65 an ER-localized extracellular matrix binding-protein. *MOL BIOL CELL*, 2000; 11: 3925–3935
- 42) 中村雅広: エラスチン結合タンパクの探索. 平成 24 年度 修士論文
- 43) Chen C, *et al*: The solution structure of the active domain of CAP18--a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Letters*. 370 (1995) 46-52
- 44) EMBL-EBI:
<http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/P25230/structures;jsessionid=CDEDA3255D332105CB575AEF7269992C>
- 45) Wu WKK, *et al*: Cathelicidins in inflammation and tissue repair: Potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31: 1118–1122, 2010
- 46) Matsuzaki K: Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788. (2009) 1687–1692

- 47) J. A. TENNESSEN: Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J. EVOL. BIOL.* 18 (2005) 1387–1394
- 48) 山田将義:再生誘導型の人工靱帯の開発. 平成 26 年度 修士論文
- 49) Ochieng *et al*: Galectin-3 Regulates the Adhesive Interaction Between Breast Carcinoma Cells and Elastin. *Journal of Cellular Biochemistry* 75:505–514 (1999)

7. 謝辞

本研究及び修士論文作成にあたり、ご指導いただきました 三重大学工学研究科 堀内 孝 教授、宮本 啓一 准教授に対し深く御礼申し上げます。特に宮本先生には実験に関する助言を頂くなど、様々な面で助けて頂きました。本当に有難う御座いました。来年度からも引き続いて大学院生として、より一層学んでいきたいと考えております。今後ともご指導のほどよろしくお願い致します。

また、堀内先生には Cleveland Clinic (Lerner Research Institute)へのインターンシップという非常に貴重な機会を与えて頂き、またそのサポートなど多くの時間を割いて頂いたこと、深く感謝申し上げます。

動物実験を行うにあたり、ご指導頂きました三重大学医学系研究科の長谷川 正裕先生、三浦 良浩先生、松井 佑梨世先生、海野 弘至先生、鈴木 慶亮先生、伊東 直也先生、動物実験施設の皆様、共同研究者として支援を賜りました白土 絵理博士をはじめとした林兼産業株式会社の皆様、**real-time PCR**を行うにあたり、設備・装置の使用法および様々な質問にもお答えして下さいました小林 裕子先生をはじめとした三重大学生命科学研究支援センター遺伝子実験施設の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、これまでに卒業された諸先輩方、「エラスチン」をテーマとする片山 真梧君、佐藤 辰哉君、堀川 公佑君、石崎 梓さん、井上 綱太君、豊田 真梨子さん、本当に有難う御座いました。特に、同じ「靱帯再生」に関するテーマを持つ、片山 真梧君、佐藤 辰哉君、豊田 真梨子さんには多くの時間を割いて実験のサポートをして頂きました。心の底から感謝致します。また、研究室生活において様々な形でサポートして頂いた村上 節子さん、毎日を共に過ごした M2、M1、4 年生の皆様方に深く御礼申し上げます。

最後に、日々の大学生活を経済面だけでなく様々な生活面においても私を支えて下さった両親に感謝の意を示し、謝辞とさせていただきます。

平成 28 年 2 月
晝河 政希