

平成30年度 博士学位論文

エラスチンを用いた靱帯組織再建に関する研究

三重大学大学院 工学研究科 材料科学専攻

晝河 政希



# 目 次

<b>1 緒言</b> .....	<b>1</b>
<b>1-1 再生医学と組織工学</b> .....	<b>2</b>
<b>1-2 膝関節靭帯</b> .....	<b>2</b>
1-2-1 前十字靭帯	3
1-2-2 内側側副靭帯	4
1-2-3 靭帯損傷と再建手術	5
<b>1-3 人工靭帯</b> .....	<b>5</b>
<b>1-4 細胞外マトリックス(ECM)</b> .....	<b>6</b>
1-4-1 エラスチン	7
1-4-2 コラーゲン	8
<b>1-5 エラスチン結合タンパク質</b> .....	<b>8</b>
1-5-1 エラスチン結合タンパク質の種類	8
1-5-2 エラスチン結合タンパク質の機能	9
<b>1-6 本研究に関わる先行研究</b> .....	<b>12</b>
1-6-1 靭帯細胞へのエラスチン添加培養	12
1-6-2 靭帯細胞の ECM ファイバー足場培養	13
<b>1-7 本研究の目的</b> .....	<b>15</b>
<b>2 方法</b> .....	<b>16</b>
<b>2-1 膝靭帯損傷動物モデルへのエラスチン投与試験</b> .....	<b>17</b>
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	17
2-1-2 膝靭帯損傷動物モデルの作製	17
2-1-3 靭帯組織の遺伝子発現解析	18
2-1-4 靭帯組織のタンパク質発現解析	20

2-1-5 靱帯組織の力学的評価	20
2-1-6 靱帯組織の組織学的評価	21
<b>2-2 人工靱帯—骨接合に対するエラスチンの効果</b>	<b>23</b>
2-2-1 ポリジオキサノン (PDS) へのエラスチンコーティング	23
2-2-2 PDS 人工靱帯の作製と移植	23
2-2-3 人工靱帯骨挿入部近傍の組織学的評価	24
2-2-4 人工靱帯の引き抜き荷重測定	25
<b>2-3 組織工学的人工靱帯の移植試験</b>	<b>25</b>
2-3-1 水溶性コラーゲンの抽出	25
2-3-2 ECM 足場材料の作製	25
2-3-3 靱帯細胞の単離と継代培養	26
2-3-4 組織工学的人工靱帯の作製	27
2-3-5 膝靱帯損傷動物モデルの作製と人工靱帯移植	27
2-3-6 人工靱帯骨挿入部近傍の組織学的評価	28
2-3-7 移植後靱帯の力学的評価	28
<b>2-4 エラスチン結合タンパク質の探索</b>	<b>29</b>
2-4-1 不溶性エラスチン粒子の作製	29
2-4-2 細胞からのタンパク質抽出	29
2-4-3 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ	29
2-4-4 タンパク質の定量	29
2-4-5 タンパク質の同定	30
2-4-6 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> )	31
<b>2-5 統計処理</b>	<b>31</b>
<b>3 結果</b>	<b>32</b>
<b>3-1 膝靱帯損傷動物モデルへのエラスチン投与試験</b>	<b>33</b>
3-1-1 靱帯損傷部へのエラスチンの作用	33
3-1-2 靱帯—骨接合部へのエラスチンの作用	37

3-1-3	組織力学特性へのエラスチンの作用	41
3-1-4	損傷部の組織学的評価	42
3-1-5	エラスチン投与試験結果一覧	46
<b>3-2</b>	<b>エラスチンコーティングによる人工靭帯—骨接合強度の変化</b>	<b>48</b>
3-2-1	人工靭帯へのエラスチンコーティング	48
3-2-2	人工靭帯骨挿入部近傍の組織学的評価	48
3-2-3	人工靭帯の引き抜き荷重測定	49
<b>3-3</b>	<b>組織工学的人工靭帯の移植</b>	<b>50</b>
3-3-1	移植後6週における人工靭帯移植部の肉眼的観察	50
3-3-2	人工靭帯骨挿入部近傍の組織学的評価	51
3-3-3	移植後靭帯の力学的評価	52
<b>3-4</b>	<b>エラスチン結合タンパク質の探索</b>	<b>54</b>
3-4-1	不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ	54
3-4-2	Elastin Binding Protein (EBP)の発現確認	55
3-4-3	SDS-PAGE	55
3-4-4	MALDI-TOFMSによるタンパク質同定	56
3-4-5	MALDI-TOFMS解析結果詳細	57
3-4-6	エラスチン添加培養による同定タンパク質の遺伝子発現変化	65
<b>4</b>	<b>考察</b>	<b>66</b>
<b>4-1</b>	<b>損傷靭帯に対するエラスチン投与の作用</b>	<b>67</b>
4-1-1	エラスチン投与による組織損傷部の遺伝子・タンパク質発現への作用	67
4-1-2	エラスチン投与による骨接合部の遺伝子・タンパク質発現への作用	73
4-1-3	エラスチン投与による組織力学特性への作用	74
<b>4-2</b>	<b>エラスチンによる細胞の骨分化誘導</b>	<b>77</b>

4-3 組織工学的人工靱帯の評価	79
4-3-1 本研究で用いた足場材料について	79
4-3-2 組織工学的人工靱帯の評価	81
4-4 細胞によるエラスチンの認識	83
4-4-1 本研究で用いたエラスチンについて	83
4-4-2 Galectin-3 を介したエラスチン認識	84
4-4-3 Cyclophilin B を介したエラスチン認識	88
4-4-4 CAP18 を介したエラスチン認識	89
4-5 エラスチンと靱帯組織	91
4-6 組織工学的人工靱帯の発展	93
5 結論	94
6 参考文献	96
7 謝辞	102

# 1 緒言

## Introduction

# 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付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しまう。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近年注目されている。

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とするためには、細胞の機能制御や細胞と細胞が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。細胞が存在している環境として、細胞周囲には細胞外基質 (ECM: Extra Cellular Matrix) と呼ばれる物質が多く存在しており、この ECM と細胞の関係や機能制御に関して理解することが組織工学における重要事項となっている<sup>1)</sup>。

## 1-2 膝関節靭帯

靭帯は結合性の組織であり、関節において骨と骨を接合し、その安定性を維持している。実際、ヒトの膝関節には 4 つの靭帯 (Ligament) が存在し、関節内で前十字靭帯 (ACL: Anterior Cruciate Ligament) と後十字靭帯 (PCL: Posterior Cruciate Ligament) が、関節外で内側側副靭帯 (MCL: Medial Collateral Ligament) と外側側副靭帯 (LCL: Lateral Collateral Ligament) が大腿骨と脛骨および腓骨とを接合しており、そのどれもが膝の安定性に寄与している (Fig.1-1)。



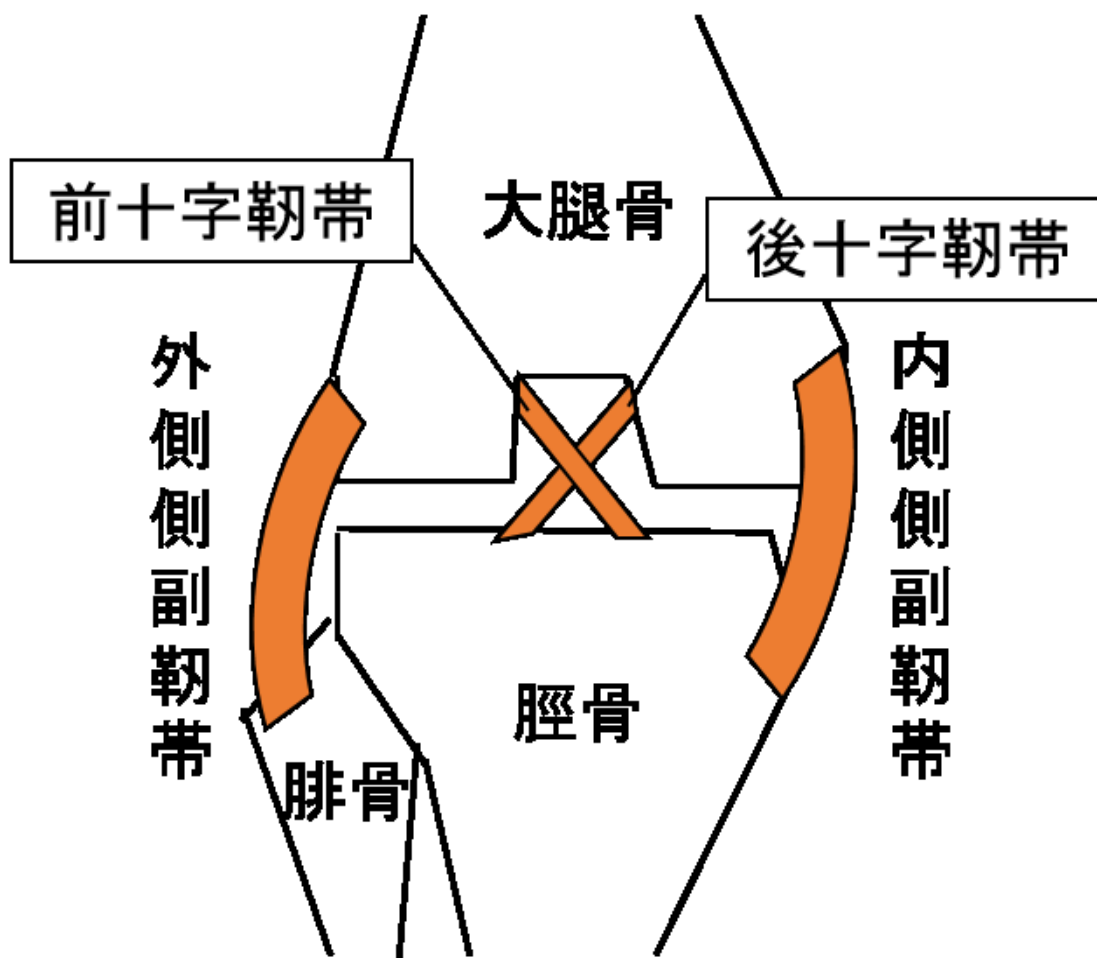


Fig.1-1 膝関節靭帯の模式図

### 1-2-1 前十字靭帯(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<sup>2)3)</sup>。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、ECMから構成されている靭帯線維と平行に配向した紡錘状の靭帯細胞で構成されている<sup>4)</sup>。

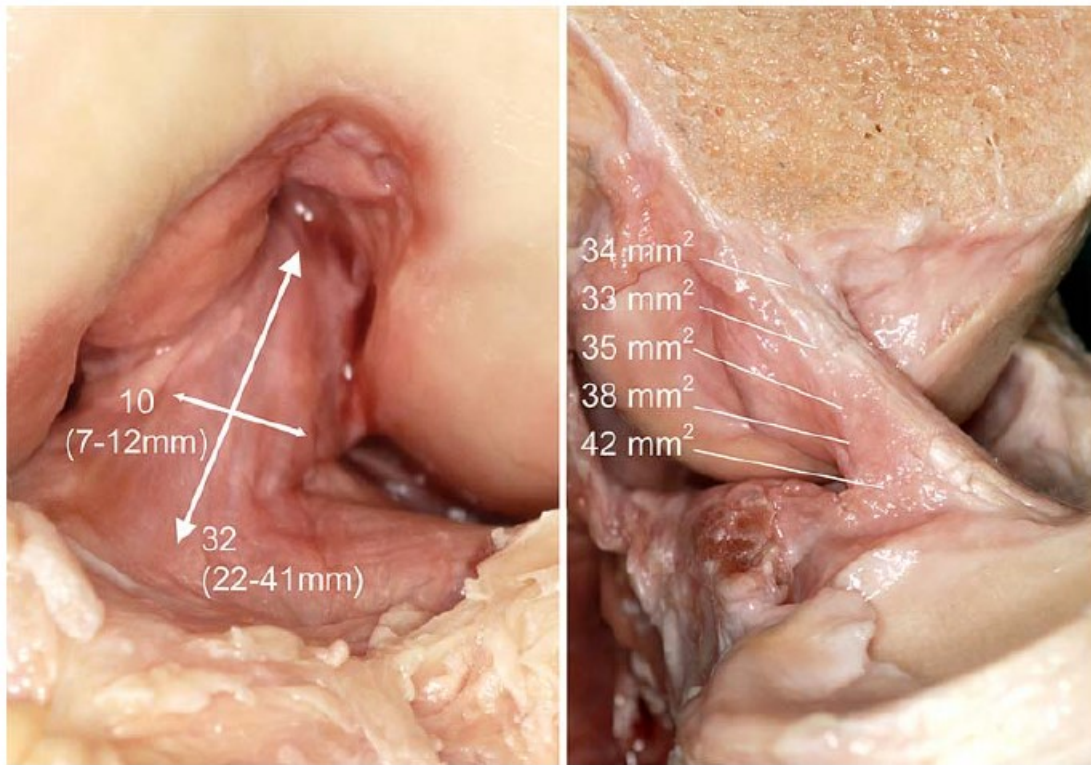


Fig.1-2 ヒト膝関節内 ACL<sup>5)</sup>  
 左図:膝関節正面図、右図:関節断面図

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<sup>6)</sup>。また、ACL は血管の乏しい環境下にあるため、一般に断裂 ACL の自然治癒による再生は見込めない。

### 1-2-2 内側側副靭帯(MCL: Medial Collateral Ligament)

MCL は膝関節靭帯の中で損傷を受けやすい靭帯のひとつであり、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<sup>7)</sup>。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人工靱帯の開発が必要とされている。

### 1-3 人工靱帯

合成材料を用いた人工靱帯は、1970年代に Jenkins らがカーボンファイバーを用いたモデルを報告し<sup>8)</sup>、続いて Bolton らや Lukianov らがそれぞれ Gore-Tex (poly tetra fluor ethylene; PTFE)、Dacron (poly ethylene terephthalate; PET)を用いた人工靱帯モデルを報告した<sup>9) 10)</sup>。近年では、poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) や poly L-lactic acid (PLLA)といった生分解性合成材料を用いたモデルが報告されている(Fig.1-3)<sup>11)</sup>。また、シルクフィブロインやコラーゲン—セルロースの複合材料といった天然由来材料を用いた人工靱帯の報告も多い<sup>12) 13)</sup>。しかし、現状では課題が残っており、実用化には至っていない。

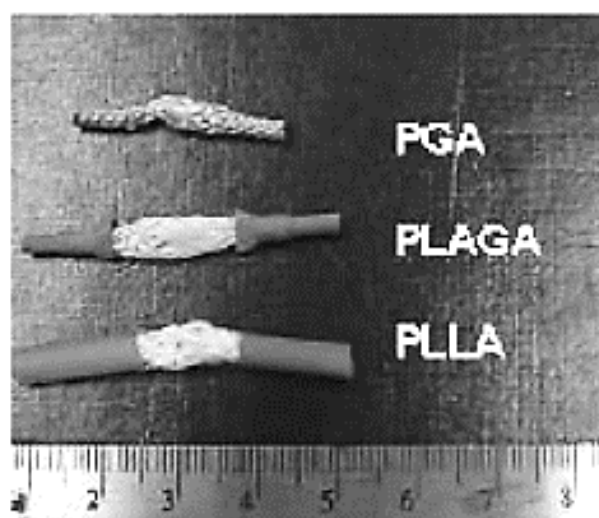


Fig.1-3 生分解性合成ポリマーを用いた足場<sup>11)</sup>

人工靭帯の移植にはその固定方法も重要となる。一般的にはスクリュー、エンドボタン、ステープルを用いて骨孔に通した自家腱または人工靭帯を固定する。しかし、固定時の材質や条件によっては移植片(グラフト)および骨を損傷させてしまう恐れがある。チタン製スクリューによる固定ではグラフト本体の損傷が<sup>14)</sup>、エンドボタンによる固定ではボタンおよびグラフトの破壊が、ステープルによる固定ではステープル下のグラフトが滑ってしまう<sup>15)</sup>といったケースも報告されている。Faunoら及びBaumfeldらによると、移植時にあけた骨孔の大きさは固定具の種類および固定位置によって影響を受ける(Table.1-1)<sup>16) 17)</sup>。したがって、手術後の再断裂や引き抜けといったリスクを低下させるには最適な固定方法も同時に考える必要がある。

Table.1-1 固定位置による骨孔サイズの変化(術後2週間)<sup>16)</sup>

	Close-to-Joint Fixation (n = 41)	Extracortical Fixation (n = 46)
≥8 mm	0 (0)	0 (0)
6-8 mm	1 (0)	7 (3)
4-6 mm	3 (0)	5 (5)
2-4 mm	3 (5)	8 (8)
<2 mm	34 (36)	26 (30)

#### 1-4 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<sup>18)</sup>。

### 1-4-1 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.1-4)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<sup>18)</sup>、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。特に靭帯、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<sup>19)</sup>。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マシン、イソデスマ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<sup>19) 20)</sup>。

また、エラスチン分子内の VGVAPG (Val:バリン-Gly:グリシン-Val:バリン-Ala:アラニン-Pro:プロリン-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<sup>19) 21)</sup>。

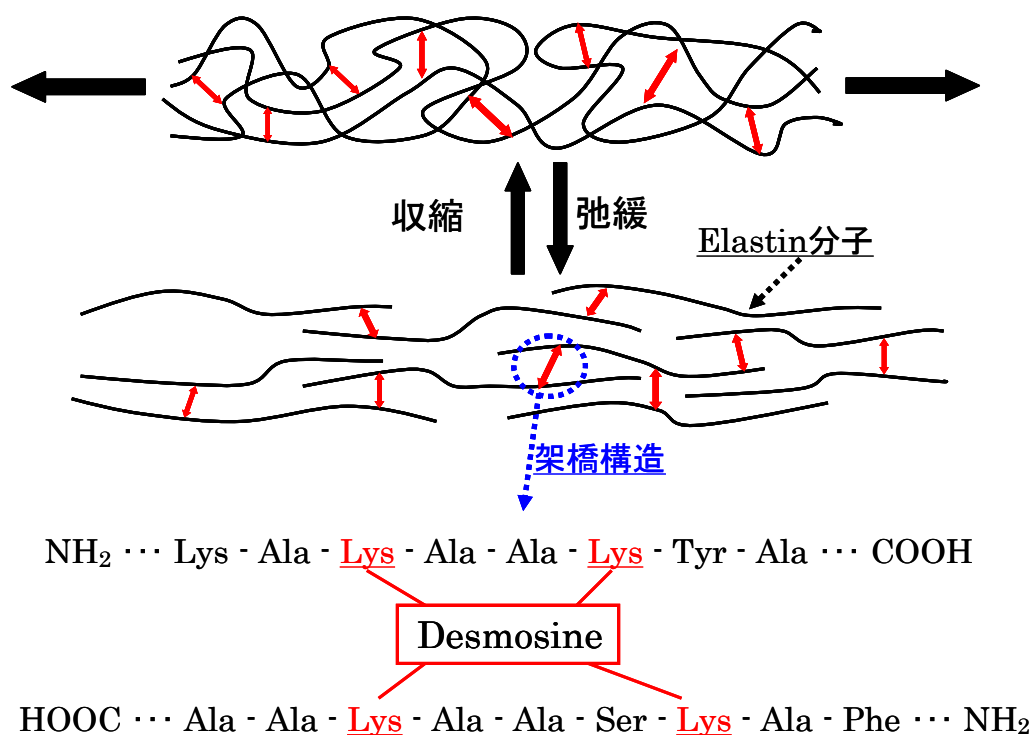


Fig.1-4 エラスチンの構造

### 1-4-2 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、コラーゲンは約十萬種ある生体内のタンパク質の総量のうち、約3割を占める。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-P:プロリン-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。

## 1-5 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、靭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。

### 1-5-1 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.1-2)。しかし、ここに挙げたタンパク質以外において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.1-2 既知のエラスチン結合タンパク 22-29)

Elastin binding protein	
Elastin Receptor	ERC (Elastin Receptor Complex)
	$\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 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)	

### 1-5-2 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<sup>23)</sup>。

## ERC : Elastin Receptor Complex

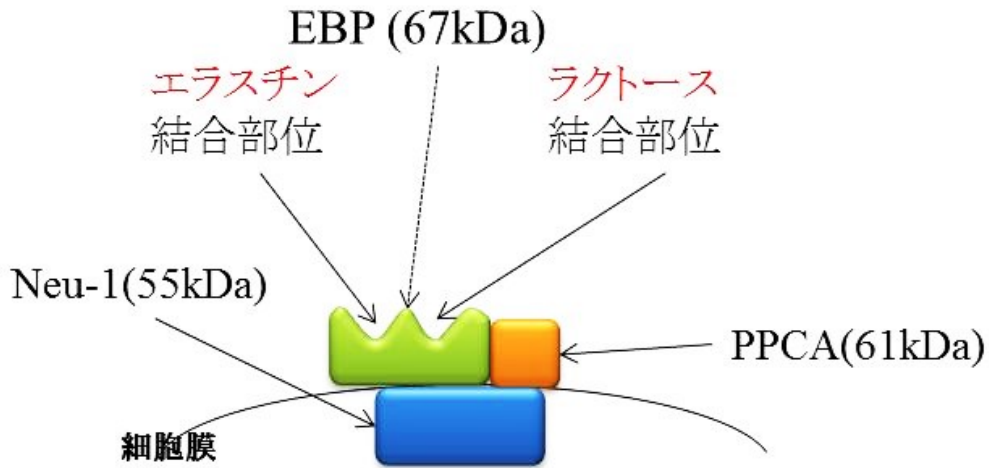


Fig.1-5 ERC 三量体構造

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<sup>30)</sup>。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<sup>29)</sup>。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。



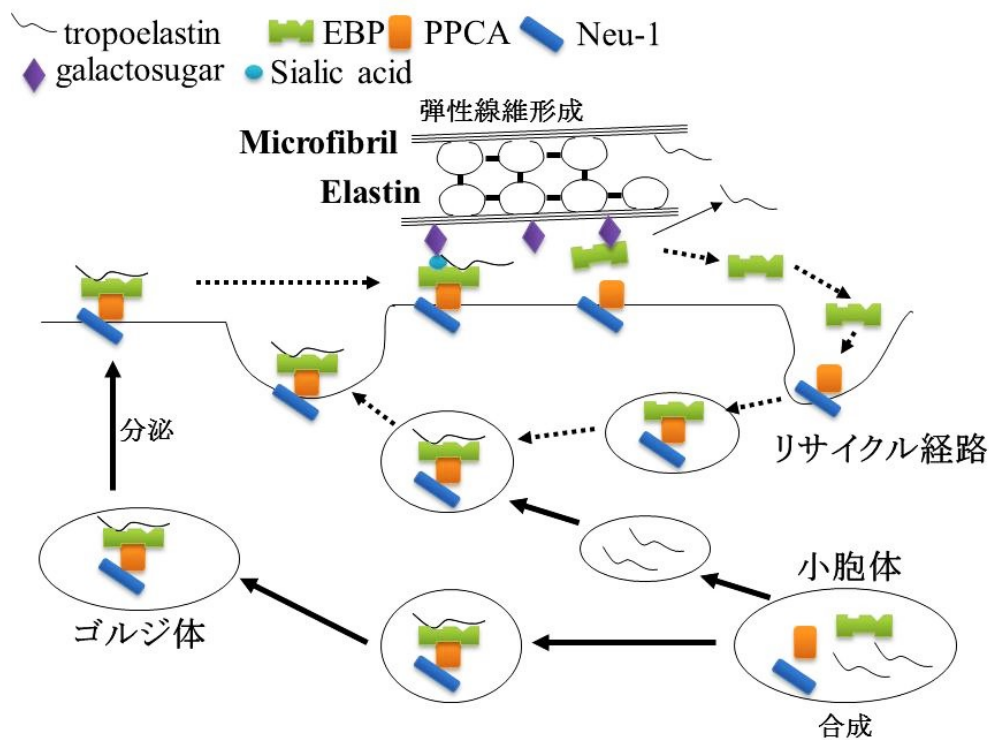


Fig.1-6 ERC エラスチン産生段階～線維形成段階<sup>30)</sup>

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  $\alpha\beta3$ integrin によりマイクロフィブリル上に転移される<sup>31)</sup>。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、 $\alpha\beta3$ integrin はヒ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<sup>32)</sup>。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<sup>23)</sup>。

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。

## 1-6 本研究に関わる先行研究

靱帯基質であるエラスチン、コラーゲンが靱帯細胞に対しどのような影響を与えるかに関して、これまでの先行研究結果について述べる。

### 1-6-1 靱帯細胞へのエラスチン添加培養

ウサギ靱帯細胞に対し、分画エラスチン A (25kDa、2mg/ml)を添加し、1 週間培養時の遺伝子発現変化を示す (Fig.1-7)。エラスチン無添加の遺伝子発現を 1 とした時の相対発現量を表す。

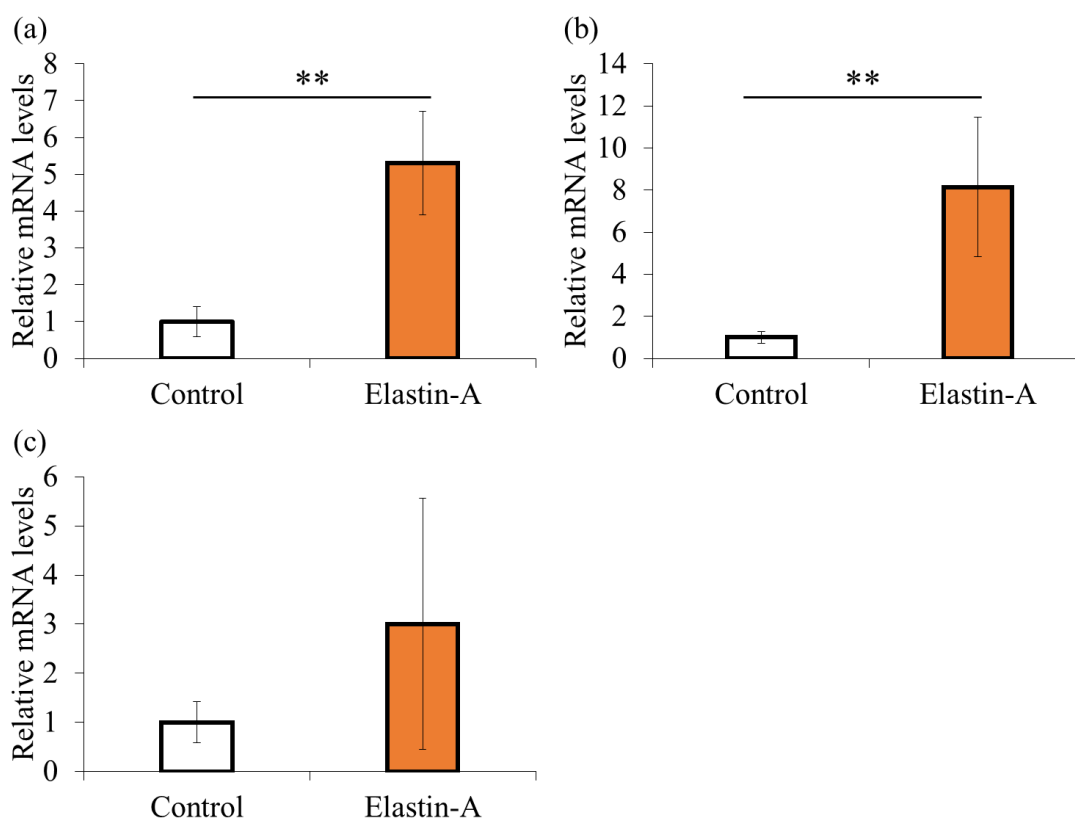


Fig.1-7 エラスチン添加培養による遺伝子発現変化(各 n=3)

(a)I 型コラーゲン (b) III 型コラーゲン (c) テノモジュリン、\*\* : p<0.01

Control: 通常培地、Elastin-A: 2mg/ml エラスチン添加培地、培養 1 週間

エラスチン添加により靱帯基質の I 型コラーゲン、III 型コラーゲンおよび靱帯マーカーとして知られるテノモジュリンの発現がそれぞれ 5.3 倍、8.1 倍、3.0 倍に増加したことが明らかとなった。

### 1-6-2 靭帯細胞の ECM ファイバー足場 上培養

配向性を持った ECM ファイバー足場 (エラスチン A およびコラーゲン) の上でウサギ靭帯細胞を 1 週間培養した際の遺伝子発現結果を示す (Fig.1-8)<sup>33)</sup>。シャーレ上培養の遺伝子発現を 1 とした時の相対発現量を表す。

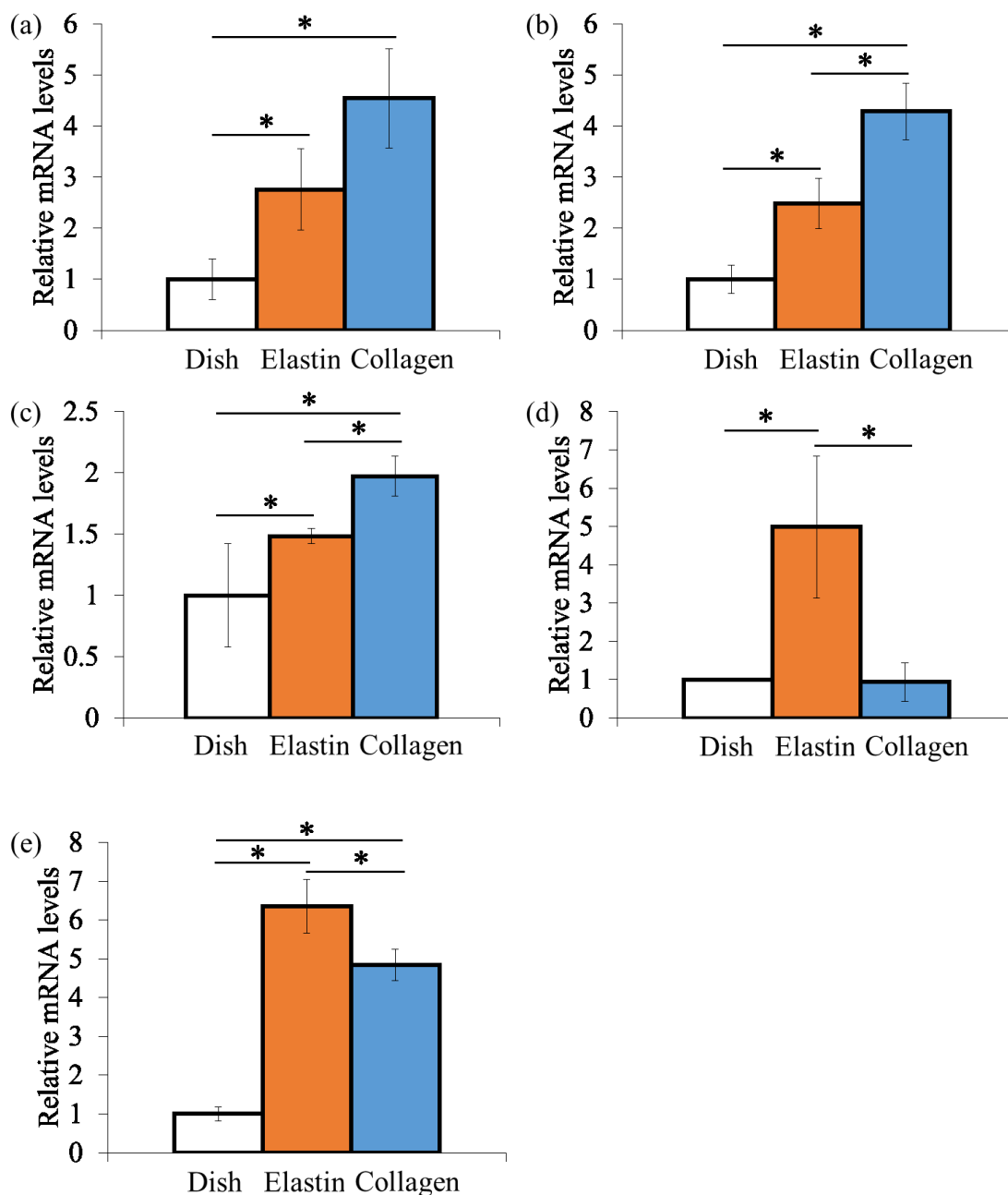


Fig.1-8 ECM 足場 上培養による遺伝子発現変化 (各 n=3)<sup>33)</sup>

(a) I 型コラーゲン (b) III 型コラーゲン (c) テノモジュリン

(d) ALP (e) オステオポンチン、\* : p<0.05、培養 1 週間

Dish:シャーレ、Elastin:エラスチン足場、Collagen:コラーゲン足場

ECM 足場上での培養は靭帯細胞の各遺伝子発現を増加させることが明らかとなった。ECM の違いにより比較すると、エラスチン足場上では骨分化初期マーカーとして知られる ALP と骨分化中期マーカーとして知られるオステオポンチンの発現が有意に増加し、コラーゲン足場上では靭帯基質である I 型コラーゲン、III 型コラーゲンおよび靭帯マーカーのテノモジュリンの発現増加が確認された。

また、エラスチン足場上で 1 週間培養した ACL 細胞の ALP 活性を測定すると、活性値が 12.7 units/ mg protein を示し、コラーゲン足場上の細胞 (7.3 units/ mg protein) よりも 1.8 倍高い値を示した (Fig.1-9)<sup>34)</sup>。

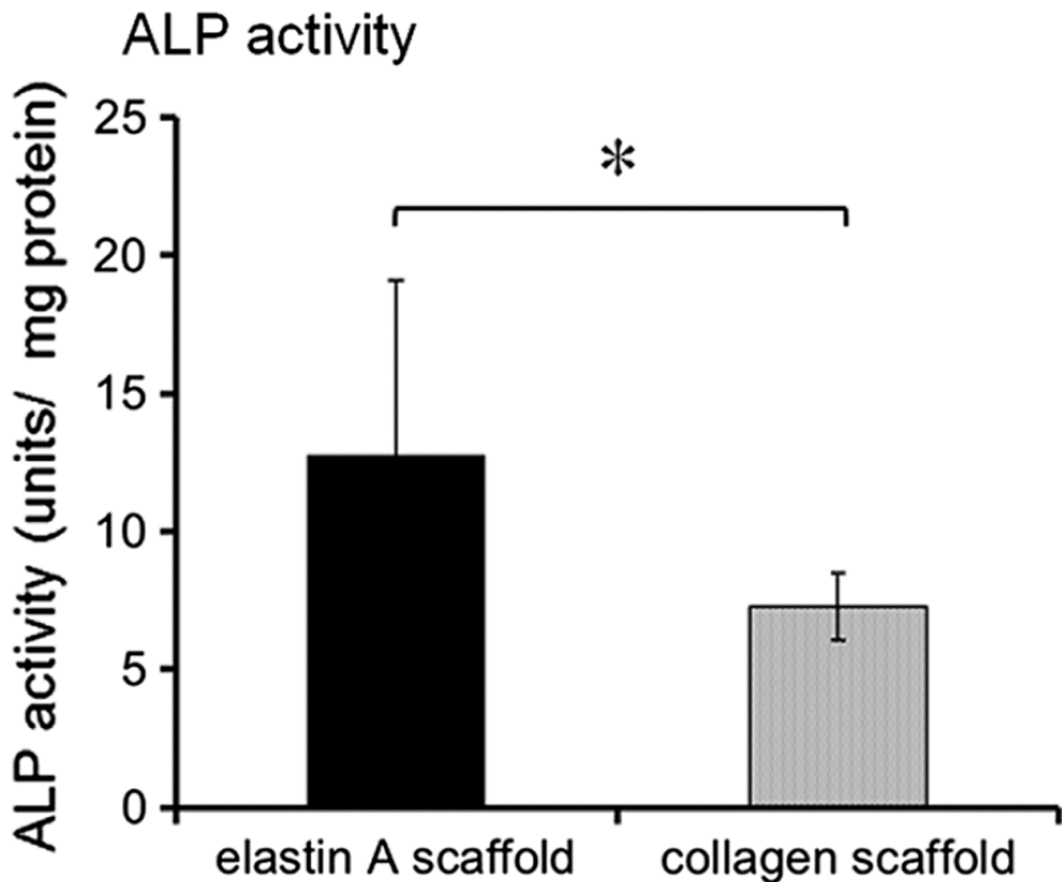


Fig.1-9 ECM 足場上培養による ALP 活性<sup>34)</sup>

Elastin A scaffold: エラスチン足場 (n=6)、collagen scaffold: コラーゲン足場 (n=7)

\* : p<0.05 、培養 1 週間

## 1-7 本研究の目的

本研究の最終的な目的は、移植後に自家組織へと徐々に置換していく組織工学的靭帯の開発である。この目的を達するために、靭帯細胞へのエラスチンの影響や、靭帯細胞と靭帯基質であるエラスチンを組み合わせた組織工学的人工靭帯を作製する方法についてこれまで研究を行ってきた。本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

先行研究(1-6-1)では *in vitro* においてエラスチンを靭帯細胞へ添加することで基質産生が促される等、エラスチンが靭帯再生に効果的であると考えられる結果が示された。しかし *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膝靭帯損傷動物モデルを用いることで、*in vivo* での靭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。

### ②ECM 材料と靭帯細胞を用いた組織工学的人工靭帯の開発

先行研究(1-6-2)より、エラスチン足場上での靭帯細胞培養により細胞の骨分化が誘導される結果が得られたため、まず人工靭帯移植後の骨接合の強化にエラスチンが有効であるかの調査を行う。また、靭帯組織の ECM であるコラーゲン、エラスチンより足場材料を作製し、靭帯細胞を複合した組織工学的人工靭帯の開発を試みる。本研究では、初期強度を向上させるため、また移植後に生体内に人工材料を残存させないため、生分解性材料であるポリジオキサノン縫合糸を併用する。さらに、移植時に靭帯—軟骨—骨の段階構造を模倣するため、構造を壊す恐れのある固定具を必要としない人工靭帯構造を考案する。

### ③細胞によるエラスチン認識機構の解明

*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。先に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、ウサギ靭帯細胞中のエラスチン結合タンパク質の同定を行うことでエラスチン認識機構の解明を目指す。



## 2 方法

### **Materials and Methods**

## 2.方法

本研究に関わる動物実験は全て、三重大学 動物実験委員会の承認を受けた後に実施した。(承認番号 27-9)

### 2-1 膝靭帯損傷動物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。組織を細かく粉砕した後、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凝集温度、ゲル弾性率によって A、B、C、D、E の 5 種類に分画し、各実験に用いた。

#### 2-1-2 膝靭帯損傷動物モデルの作製

ジャパニーズホワイトラビット(メス、12 週齢)の MCL を金属棒を用いて鈍的に損傷させ (Fig.2-1)、膝靭帯損傷モデルとした。両膝を同様に損傷させ、片膝を 1 例として用いた。

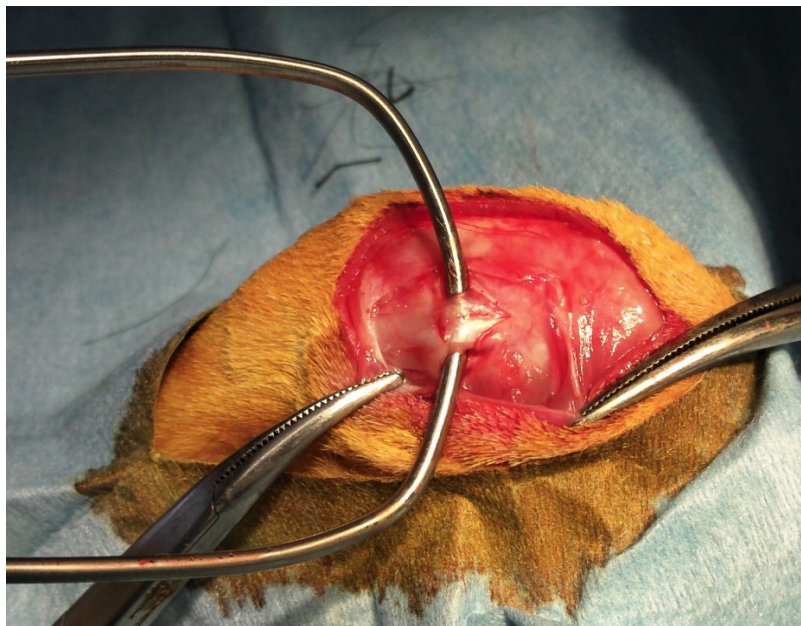


Fig.2-1 MCL 鈍的損傷の様子



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 / 生理食塩水溶液 (2mg/ml) を損傷部位へ注射投与し、術後 6 週、12 週時点で組織を採取した。採取した靭帯組織は、手術時に損傷させた部位 (癒痕組織含む、以下「損傷部」とそれ以外の部位 (骨接合部付近を含む、以下「接合部」) に分け、それぞれ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	6 週対照群	12 週対照群	6 週比較群	12 週比較群	正常群
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

正常群は手術を行っていない。

### 2-1-3 靭帯組織の遺伝子発現解析

採取した靭帯組織片を十分に洗浄した後に凍結磨砕し、RNAisoPlus (TaKaRa) を用いて RNA を抽出した。抽出した 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、5×PrimeScript 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 StepOnePlus (Applied Biosystems) にて 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	役割
GAPDH	内部標準として使用
I 型コラーゲン	靭帯組織中の主要成分
III 型コラーゲン	靭帯組織中の主要成分
エラスチン	弾性繊維の主要成分
ALP (alkaline phosphatase)	骨分化マーカー、骨形成の初期に発現する。
オステオポンチン	骨分化マーカー、骨形成の中期に発現する。

Table.2-3 PCR プライマー一覽

Gene	Primer sequence	Primer source
GAPDH	F:5´-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3´	Boykiw et al. <sup>35)</sup>
	R:5´-CACAATGCCGAAGTGGTCGT-3´	
Type I collagen	F:5´-GATGCGTTCCAGTTCGAGTA-3´	Boykiw et al. <sup>35)</sup>
	R:5´-GGTCTTCCGGTGGTCTTGTA-3´	
Type III collagen	F:5´-TTATAAACCAACCTCTTCCT-3´	Boykiw et al. <sup>35)</sup>
	R:5´-TATTATAGCACCATTGAGAC-3´	
Elastin	F:5´-GCAGCTAAGGCAGCGAAATAC-3´	XM_008249087
	R:5´-TCCAGCATCTACTGCACCTG-3´	
ALP	F:5´-CGAGCTGAACAGGAACAACATC-3´	XM_017346489
	R:5´-GTCAATCCTGCCTCCTTCCA-3´	
osteopontin	F:5´-CCGTGATTTGCTTTTGTCTCTTG-3´	NM_001082194
	R:5´-CTCGAGCTGCCCCGAAT-3´	

F: Forward、R: Reverse

エラスチン、ALP、Osteopontin 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。

得られた値を  $\Delta \Delta C_T$  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 $\Delta C_T$ 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 靱帯組織のタンパク質発現解析

採取した靱帯組織片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  $-80^{\circ}\text{C}$  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。免疫蛍光染色法を以下に示す。

薄切片を  $-20^{\circ}\text{C}$  acetone / 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  $4^{\circ}\text{C}$  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:  $0\sim 255$ ) 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 靱帯組織の力学的評価

組織の力学的評価を行うため、靱帯組織を膝関節のまま採取し、MCL のみで大腿骨と脛骨が繋がるよう、他の組織 (ACL など) を切除した。靱帯組織の、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。

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



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。

#### 2-1-6 靱帯組織の組織学的評価

靱帯組織の組織学的評価を行うため、損傷部の HE 染色を行った。組織切片は 2-1-4 と同様の手順で作製した。薄切片を洗浄し、ヘマトキシリン溶液で 20 分染色した。15 分洗浄後、エタノールに 1 分間浸漬し、エオジン溶液で 1 分染色した。洗浄後、エタノールによる段階脱水を行い、キシレン中で透徹した後に封入した。

##### 1) 細胞密度測定

切片の撮影面積あたりの細胞密度の算出を行なった。撮影には光学顕微鏡を使用し、上記の方法で作成した HE 染色切片に対し、400 倍の倍率で撮影した画像を用いて以下の式により細胞密度の算出を行なった。

$$\text{細胞密度}(\text{cells} / \text{mm}^2) = \frac{\text{撮影画像あたりの細胞数(個)}}{\text{撮影画像内の組織面積}(\text{mm}^2)}$$

サンプルの撮影位置による測定誤差の防止のため、サンプルは1切片につき 10 箇所を撮影し、個々の撮影領域での細胞数と細胞面積より得られた細胞密度の平均値をその組織の細胞密度とした。

##### 2) 損傷部のスコアリング

再生過程の組織の修復度合を点数化してスコアリングを行った。組織損傷部のスコアリングには Fig.2-3 のスコアを使用した<sup>36)</sup>。この画像を画像解析ソフト Image J を用いて画像に存在する各細胞の線維長軸に対する傾きの相違を計測し、Table.2-4 の基準にしたがって評価した。

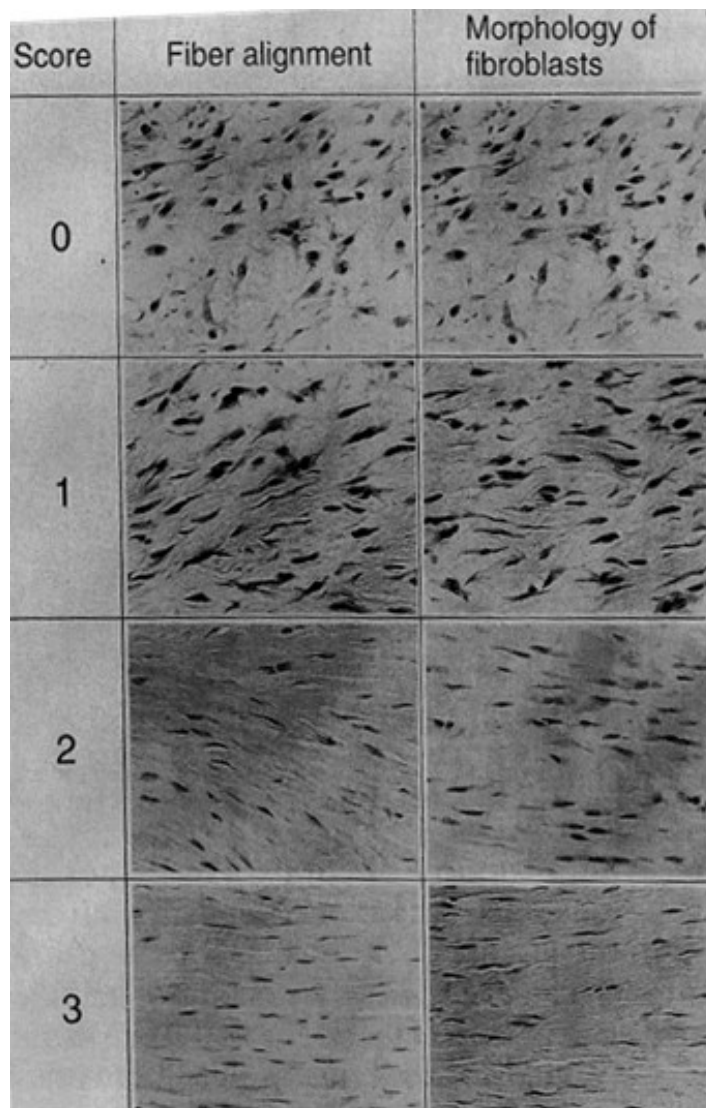


Fig.2-3 組織の線維配向(左)および細胞形態(右)のスコアリング<sup>36)</sup>

Table.2-4 細胞配向のスコアリング基準

線維長軸に対する細胞の角度	0~15°	15° ~30°	30° ~45°	45° ~
スコア	3	2	1	0

### 3) 弾性線維の比率測定

エラスチカワンギーソン染色(Elastica Van Gieson, EVG 染色)を用いて組織切片の弾性線維および膠原繊維の染め分けを以下の手順により行なった。

薄切片を洗浄し、70%エタノールに 1 分間浸漬し、レゾルシン・フクシン液で 12 時間染色した。100%エタノールに 3 分間、3 回浸漬し、洗浄後にヘマトキシリン溶液で 5 分染色した。10 分洗浄後。ワンギーソン溶液で 30 秒染色し、100%エタノールに 1 分間浸漬し、キシレン中で透徹した後に封入した。光学顕微鏡を×400 に設定し、1 サンプルあたり 5 枚の染色画像を切片全体で撮影した。この画像を用いて画像解析ソフト ImageJ により染色された弾性線維の面積を算出した。

## 2-2 人工靭帯一骨接合に対するエラスチンの効果

### 2-2-1 ポリジオキサノン(PDS)へのエラスチンコーティング

PDS に片面 30 秒ずつコロナ放電処理を行った後、コーティング溶液(0.1mg/ml エラスチン A)に浸し、4 °C で 24 時間静置した。コーティング溶液を取り除き、乾燥した。操作は全て無菌環境下で行った。また、免疫蛍光染色によりエラスチンがコーティングされていることを確認した。

### 2-2-2 PDS 人工靭帯の作製と移植

PDS を 120 °C の熱で溶融接着させることでリング状の PDS を作製した。リング状 PDS を 2 つ重ね合わせ、シルク縫合糸を用いて両端及び両端から 1cm のところで固定し、人工靭帯を作製した(Fig.2-4)。



Fig.2-4 作製した人工靭帯

作製した人工靭帯をジャパニーズホワイトラビット(メス、12 週齢)の脛骨へ移植した。脛骨にドリルで直径 2.4mm、深さ 1.0cm の骨孔を 2 つ作製した。人工靭帯(コーティングなし人工靭帯、エラスチンコーティング人工靭帯)の両端部を骨孔に挿入し(Fig.2-5)、閉創した。同種の人工靭帯を両足に移植し、移植 6 週後に片足につき 1 例として採取した。作製した実験群を以下に示す(Table.2-5)。

Table.2-5 人工靭帯移植の実験群

実験群	対照群	比較群
表面処理	非処理	エラスチンコーティング
作製数	6羽	6羽



Fig.2-5 人工靭帯の移植(矢印:挿入した位置)

### 2-2-3 人工靭帯骨挿入部近傍の組織学的評価

移植後6週時点で脛骨ごと人工靭帯を採取した。人工靭帯周辺の不要な組織を取り除き、パラフィン包埋した。サンプルを薄切片し、キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンを行った。

#### ・HE 染色

薄切片を洗浄し、ヘマトキシリン溶液で3分染色した。10分洗浄後、エタノールに2分間浸漬し、エオジン溶液で4分染色した。10分洗浄後、エタノールによる段階脱水を行い、キシレン中で透徹した後に封入した。

#### ・Safranin-O 染色

薄切片を洗浄し、ヘマトキシリン溶液で1分染色した。洗浄後、0.05% Fast Green 溶液で2分染色し、1%酢酸で5回洗浄した。0.1% Safranin-O 溶液(武藤化学)で5分染色した。洗浄後、エタノールによる段階脱水を行い、キシレン中で透徹した後に封入した。

#### 2-2-4 人工靭帯の引き抜き荷重測定

移植後 6 週時点で脛骨ごと人工靭帯を採取し、人工靭帯周辺の不要な組織を取り除いた。人工靭帯を両骨孔の中央辺りで切断した。人工靭帯、脛骨を測定装置 (Fig.2-6) に固定し、人工靭帯-骨の引き抜き強度を測定した。

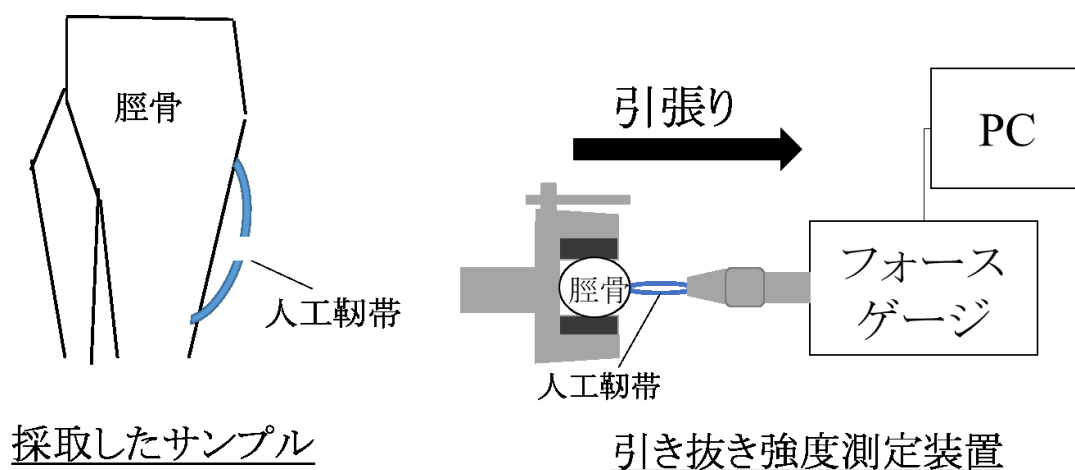


Fig.2-6 採取したサンプルおよび測定装置図

### 2-3 組織工学的人工靭帯の移植試験

#### 2-3-1 水溶性コラーゲンの抽出

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を洗浄し、血塊や脂質等の組織を取り除いた後、10%食塩水中で1日静置した。外膜を除去し、0.1%ペプシン/0.5M酢酸(Wako)中に2週間浸漬させた。溶液を濾過した後、遠心分離し、不溶画分を取り除いた。得られた溶液の1/10量のジエチルエーテル(Wako)を加え、滅菌した。溶液を遠心分離し、ジエチルエーテルを除いた後、凍結乾燥し、コラーゲン粉末を得た。

#### 2-3-2 ECM足場材料の作製

エレクトロスピンニングにより、Fig.2-7の装置を用いてECMファイバーを作製した。ECM粉末(水溶性分画エラスチンAまたは水溶性コラーゲン)、glycidyl glycerol ether (Polysciences Inc.)をtri fluoro ethanolに溶解し、印加電圧15 kV、注入速度1.2 ml/hrの条件でターゲット電極へ吐出した。作製したECMファイバーを120 °Cで20分架橋した。





Fig.2-7 エレクトロスピング装置

### 2-3-3 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。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 % CO<sub>2</sub> 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、Fig.2-8)、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 度培地交換を行なった。

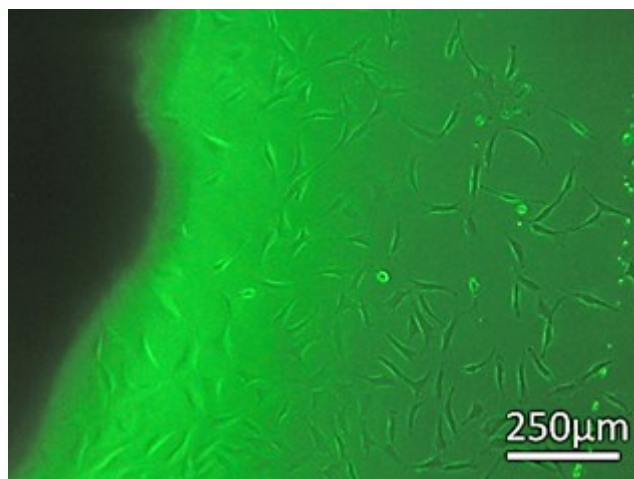


Fig.2-8 単離したウサギ靱帯細胞(位相差顕微鏡)

#### 2-3-4 組織工学的人工靭帯の作製

生体吸収性縫合糸であるポリジオキサノン (PDS) 縫合糸を軸として人工靭帯を作成した。1-PDS (直径 0.400~0.499mm) の両端を球状に加熱成型し、コロナ放電によるエラスチンコーティングを施した。その後、PDS の中央にコラーゲンファイバーを、両端にはエラスチンファイバーを巻きつけ、中央にはさらにエラスチンファイバーを巻いた。また、5-0PDS (直径 0.100~0.149mm) を用いて 2 本同様に作製し、合計 3 本を束ねて 1 つの人工靭帯とした。この際、ウサギ靭帯細胞を播種したファイバーを用いた人工靭帯 (Fig.2-9b) と、細胞を播種していないファイバーを用いた人工靭帯 (Fig.2-9a) を作製した。

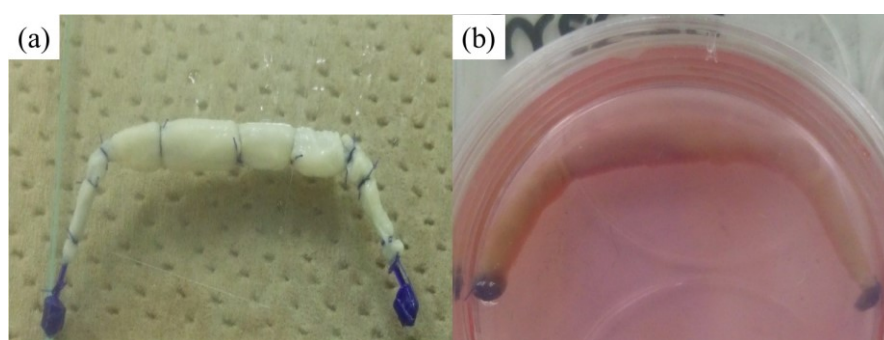


Fig.2-9 作製した組織工学的人工靭帯  
(a)細胞なし人工靭帯、(b)細胞あり人工靭帯

#### 2-3-5 膝靭帯損傷動物モデルの作製と人工靭帯移植

ジャパニーズホワイトラビット (12 週齢、メス) の内側側副靭帯 (MCL) を半切し、大腿骨および脛骨にドリルで孔 (2.4mm 径) を空け、作製した人工靭帯を損傷させた MCL に隣接した位置に移植した (Fig.2-10)。

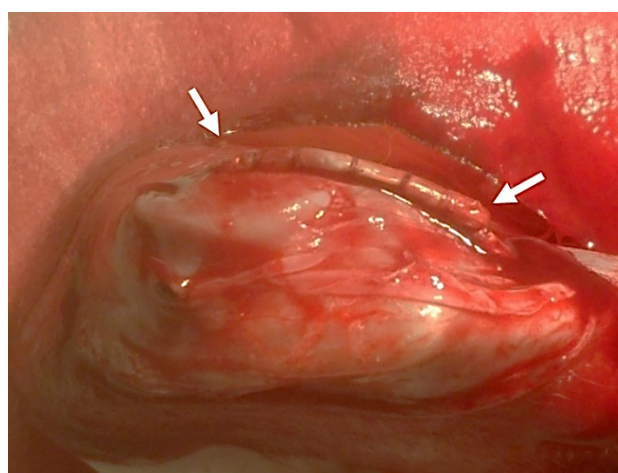


Fig.2-10 組織工学的人工靭帯の移植 (矢印:挿入した位置)

移植時、対照群には無細胞エラスチンゲルを、比較群には靭帯細胞包埋エラスチンゲル( $5.5 \times 10^6$  cells)を骨孔に注入した。同種の人工靭帯を両足に移植し、移植6週後に片足につき1例として採取した。作製した実験群を以下に示す(Table.2-6)。

Table.2-6 組織工学的人工靭帯移植の実験群

実験群	対照群	比較群
細胞	なし	$9.0 \times 10^6$ cells / 人工靭帯
作製数	6羽	6羽

### 2-3-6 人工靭帯骨挿入部近傍の組織学的評価

大腿骨、脛骨ごと靭帯組織を採取し、2-2-3と同様の手順により骨孔挿入部に関してパラフィン切片を作製し、HE染色およびSafranin-O染色により評価した。

### 2-3-7 移植後靭帯の力学的評価

組織の力学的評価を行うため、靭帯組織を膝関節のまま採取し、MCLのみで大腿骨と脛骨が繋がるよう、他の組織(ACLなど)を切除した。靭帯組織の、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。Fig.2-11の装置を用いて、破断強度および弾性率を算出した。

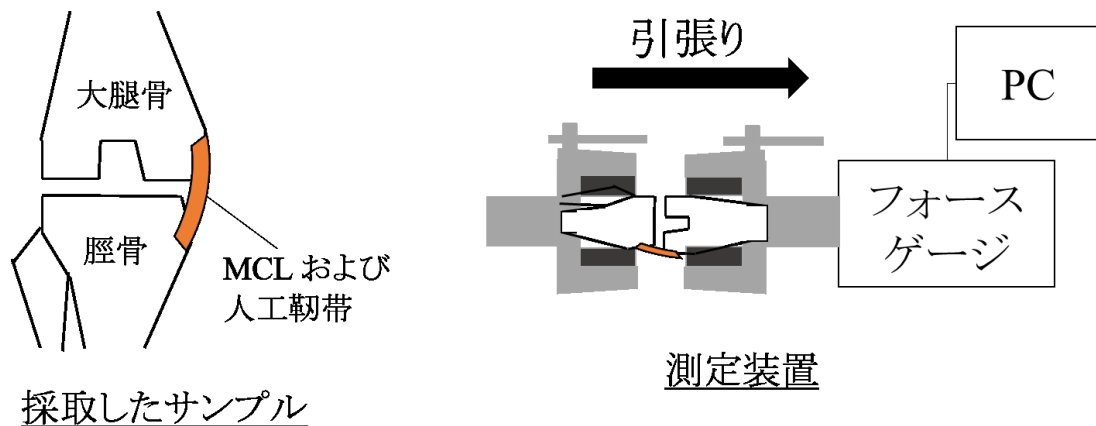


Fig.2-11 採取したサンプルおよび測定装置図

## 2-4 エラスチン結合タンパク質の探索

### 2-4-1 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 $\mu\text{m}$  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。

### 2-4-2 細胞からのタンパク質抽出

2-3-3 と同様の手順で靱帯細胞を培養した。75cm<sup>2</sup> 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、PMSF、Protease inhibitor cocktail、オルトバナジン酸ナトリウムを添加した RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz) で 10 分間振盪した。その後超音波破碎にて抽出した。細胞抽出液は、約 500 $\mu\text{l}$  ずつ分注し、-80 °C にて凍結保存した。

### 2-4-3 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 $\times$  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 (AmiconUltra-0.5 3kDa) (Millipore) で濃縮後、-80 °C で凍結保存した。

### 2-4-4 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、2 $\mu\text{g}$  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。

#### 2-4-5 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) 膜にゲル面積 1cm<sup>2</sup>あたり 2mA の条件で 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<sup>37)</sup>。得られた消化液を回収し、減圧乾燥機 (DNAmimi) で濃縮した。濃縮後プレートにサンプル 0.5μl とマトリックス (CHCA: α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) (Sigma) 0.5μl 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、Fig.2-12) 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.2-12 MALDI-TOFMS 装置

#### 2-4-6 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*)

ウサギ外側側副靭帯 (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 Galectin-3 の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。添加 1 週時点および 2 週時点で評価を行った。ターゲット遺伝子と実験群を以下に示す (Table.2-7、2-8)。GAPDH は Table.2-3 と同じものを使用した。エラスチン無添加群を 1 として得られた結果を  $\Delta \Delta Ct$  法により解析を行い、相対発現量を算出した。

Table.2-7 プライマー配列

Gene	Primer sequence	Primer source
Galectin-3	F: 5'-GTGAAGCCCAATGCAAACAG-3'	NM_001082338.1
	R: 5'-TTGAAGCGGGGGTTAAAGTG-3'	

F: Forward、R: Reverse

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)

Table.2-8 エラスチン添加試験の実験群

実験群	対照群	比較群
添加溶液	通常培地 (エラスチン無添加)	エラスチン A 2mg/ml

## 2-5 統計処理

結果は解析ソフト (StatView version 5.0) を使用し、t-test および 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

## Results

### 3. 結果

#### 3-1 膝靭帯損傷動物モデルへのエラスチン投与試験

本研究では、遺伝子発現およびタンパク質発現解析を行った。一般的に遺伝子発現とタンパク質発現は相関するものであるが、本研究では靭帯組織の修復反応およびエラスチン投与の薬理的作用を十分に評価するため、それぞれの試験を行った。以降の遺伝子発現結果における縦軸は、正常群の発現量を1としたときの各実験群の相対発現量を示し、タンパク質発現結果の縦軸は染色画像の輝度解析により得られた値を示す。

##### 3-1-1 靭帯損傷部へのエラスチンの作用

採取した靭帯組織のうち、損傷部位に関する結果を示す。

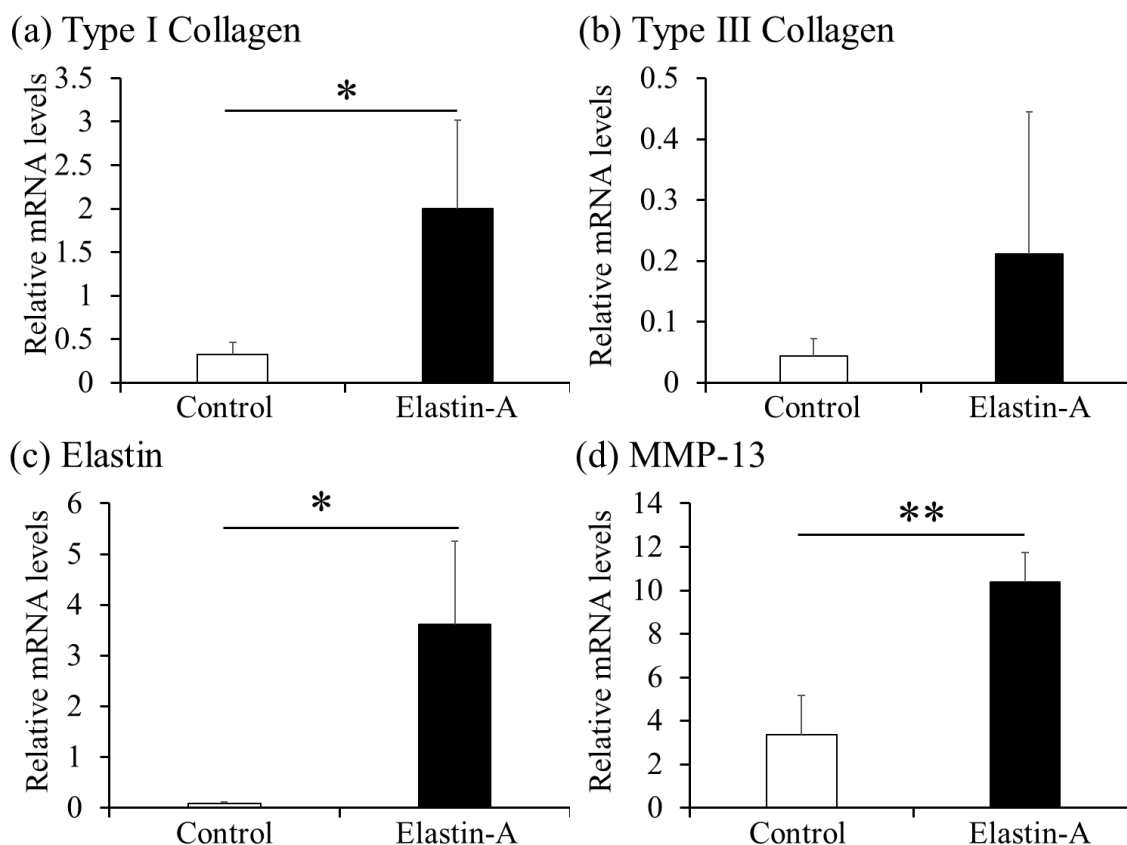


Fig.3-1 投与6週における靭帯損傷部の遺伝子発現

(a) I型コラーゲン (b) III型コラーゲン (c) エラスチン (d) MMP-13

□: Control (生理食塩水投与) ■: Elastin-A (エラスチンA投与)

n=3~4, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, 縦軸: 正常群の発現量を1としたときの相対値



エラスチン A 投与 6 週後の遺伝子発現解析において、I 型コラーゲンが  $6.2 \pm 1.8$  倍、III 型コラーゲンが  $4.9 \pm 4.2$  倍、エラスチンが  $41.6 \pm 13.7$  倍、MMP-13 が  $3.1 \pm 0.3$  倍の発現を示し(vs 生理食塩水投与)、III 型コラーゲン以外では有意な発現増加が見られた(Fig.3-1)。

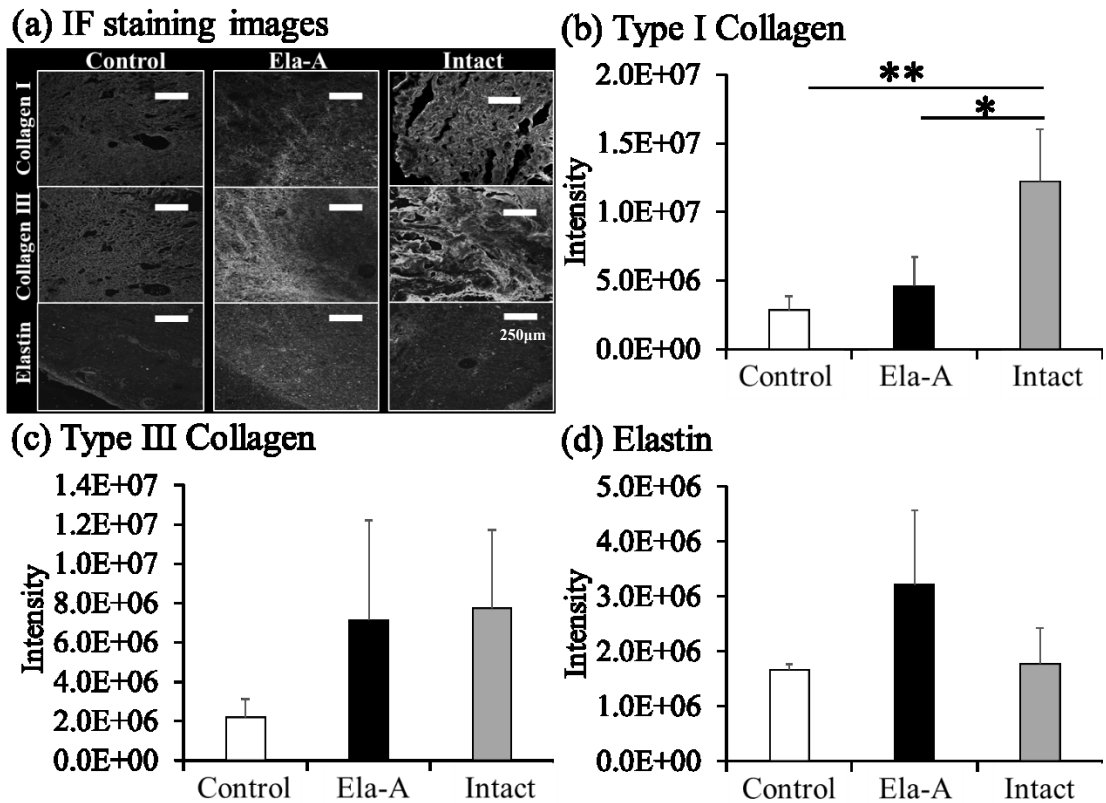


Fig.3-2 投与 6 週における靭帯損傷部のタンパク質発現

(a)免疫蛍光染色画像 (b)I 型コラーゲン (c) III 型コラーゲン (d) エラスチン

□ : Control (生理食塩水投与) ■ : Elastin-A (エラスチン A 投与)

■ : Intact (正常靭帯)、n=3~4、\* : p<0.05、\*\* : p<0.01

エラスチン A 投与 6 週後のタンパク質発現解析において、I 型コラーゲンが  $1.6 \pm 0.8$  倍、III 型コラーゲンが  $3.2 \pm 2.3$  倍、エラスチンが  $1.9 \pm 0.8$  倍の発現を示し(vs 生理食塩水投与、Fig.3-2)、発現の増加傾向が見られた。

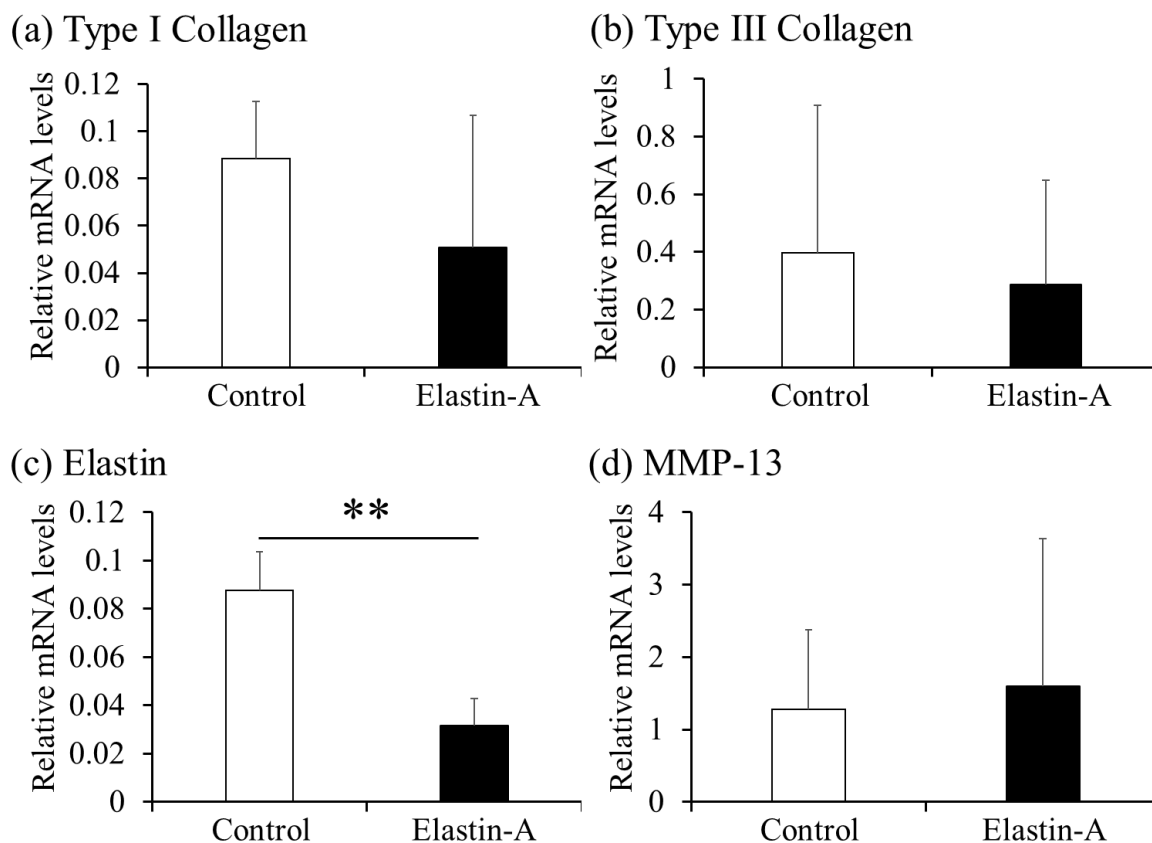


Fig.3-3 投与 12 週における靱帯損傷部の遺伝子発現  
 (a) I 型コラーゲン (b) III 型コラーゲン (c) エラスチン (d) MMP-13  
 □: Control (生理食塩水投与) ■: Elastin-A (エラスチン A 投与)  
 n=3~4、\*\* : p<0.01、縦軸: 正常群の発現量を 1 としたときの相対値

エラスチン A 投与 12 週後の遺伝子発現解析において、I 型コラーゲンが  $0.6 \pm 0.6$  倍、III 型コラーゲンが  $0.7 \pm 2.3$  倍、エラスチンが  $0.4 \pm 0.1$  倍、MMP-13 が  $1.3 \pm 3.6$  倍の発現を示し (vs 生理食塩水投与)、エラスチン以外有意な差は無かった (Fig.3-3)。

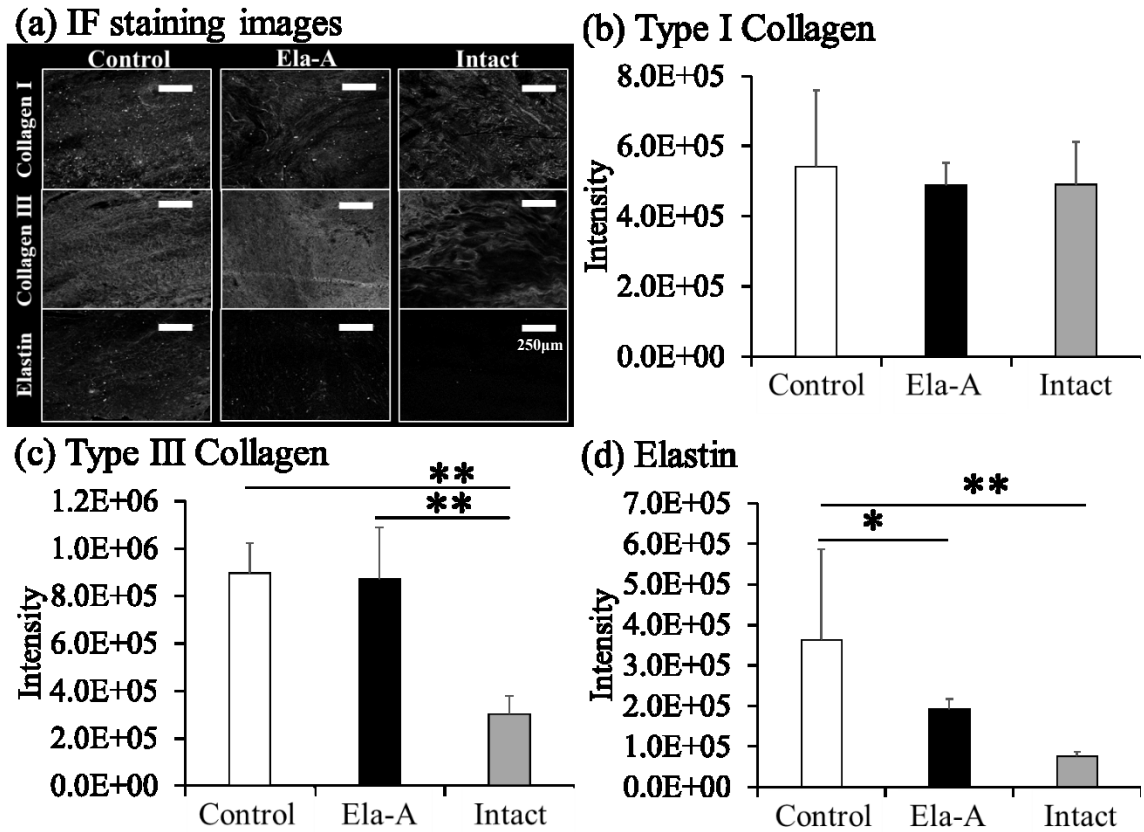


Fig.3-4 投与 12 週における靭帯損傷部のタンパク質発現

(a)免疫蛍光染色画像 (b)I 型コラーゲン (c) III 型コラーゲン (d) エラスチン

□ : Control (生理食塩水投与) ■ : Elastin-A (エラスチン A 投与)

■ : Intact (正常靭帯)、n=3~4、\* : p<0.05、\*\* : p<0.01

エラスチン投与 12 週後のタンパク質発現解析において、I 型コラーゲンが  $0.9 \pm 0.1$  倍、III 型コラーゲンが  $1.0 \pm 0.2$  倍、エラスチンが  $0.5 \pm 0.1$  倍の発現を示し (vs 生食、Fig.3-4)、エラスチンは正常群と近い値が得られた。

### 3-1-2 靱帯—骨接合部へのエラスチンの作用

採取した靱帯組織の損傷部を除いた靱帯—骨接合部位に関する結果を示す。

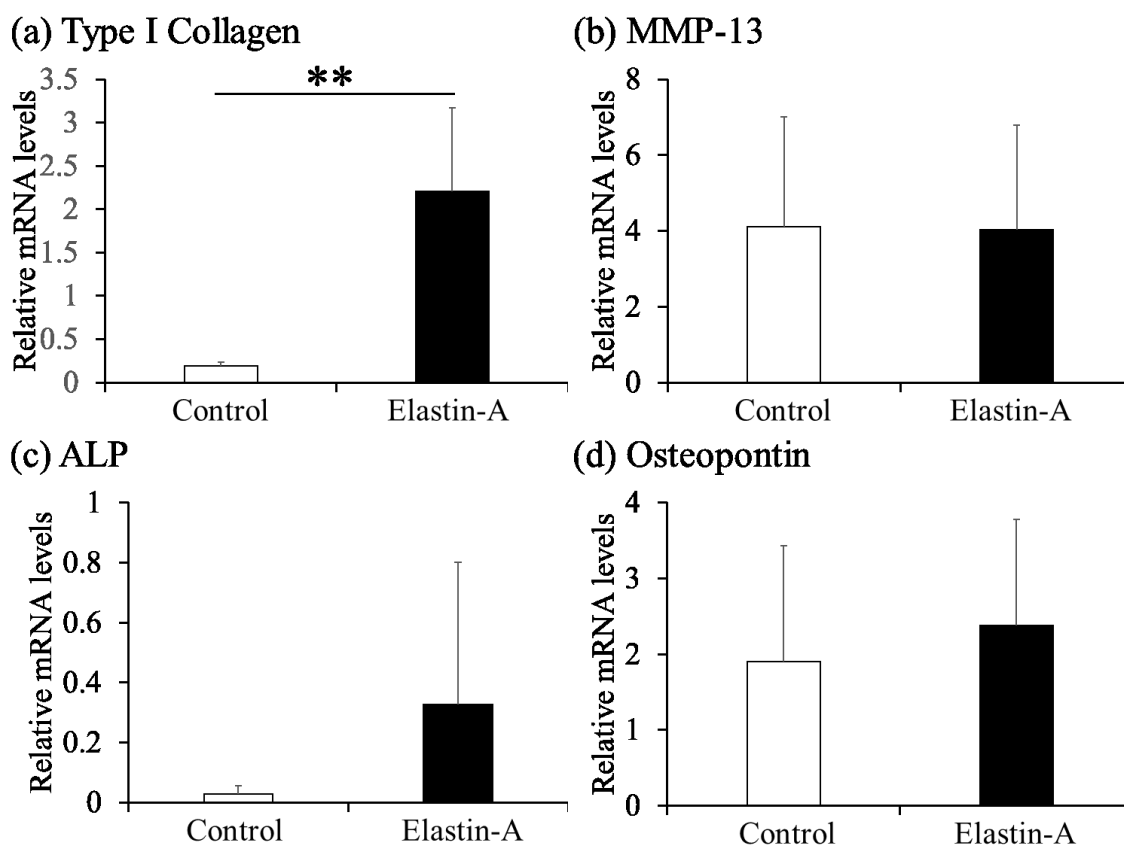


Fig.3-5 投与 6 週における骨接合部の遺伝子発現

(a) I 型コラーゲン (b) MMP-13 (c) ALP (d) オステオポンチン

□: Control (生理食塩水投与) ■: Elastin-A (エラスチン A 投与)

n=3~4、\* \*: p<0.01、縦軸: 正常群の発現量を 1 としたときの相対値

エラスチン投与 6 週後の遺伝子発現解析において、I 型コラーゲンが  $11.7 \pm 5.3$  倍、MMP-13 が  $1.0 \pm 0.9$  倍、ALP が  $11.2 \pm 47.3$  倍、オステオポンチンが  $1.2 \pm 1.1$  倍の発現を示し (vs 生理食塩水投与)、I 型コラーゲンでは有意な発現増加が見られた (Fig.3-5)。また、ALP およびオステオポンチンは増加傾向が見られた。

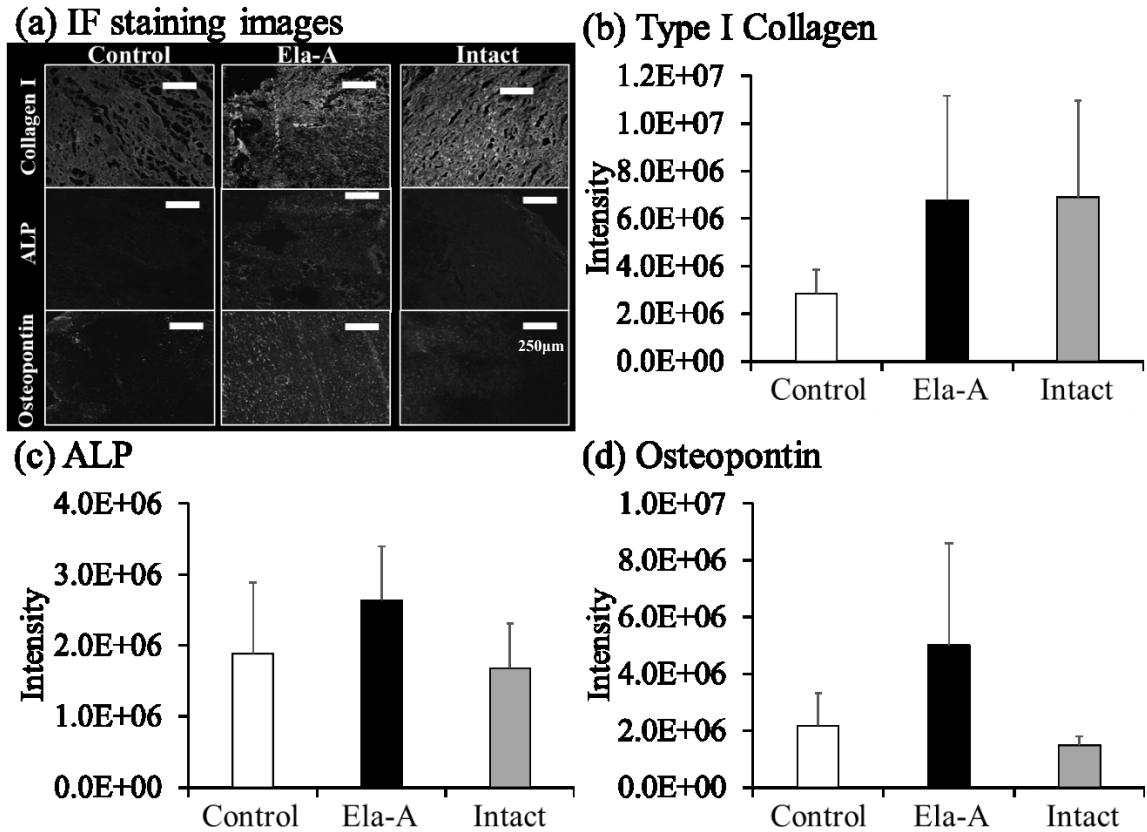


Fig.3-6 投与 6 週における骨接合部のタンパク質発現  
 (a)免疫蛍光染色画像 (b)I 型コラーゲン (c) ALP (d) オステオポンチン  
 □ : Control (生理食塩水投与) ■ : Elastin-A (エラスチン A 投与)  
 ▒ : Intact (正常靱帯)、n=3~4

エラスチン投与 6 週後のタンパク質発現解析において、I 型コラーゲンが  $2.4 \pm 1.6$  倍、ALP が  $1.4 \pm 0.4$  倍、オステオポンチンが  $2.3 \pm 1.6$  倍の発現を示し (vs 生理食塩水投与、Fig.3-6)、それぞれ発現の増加傾向が見られた。

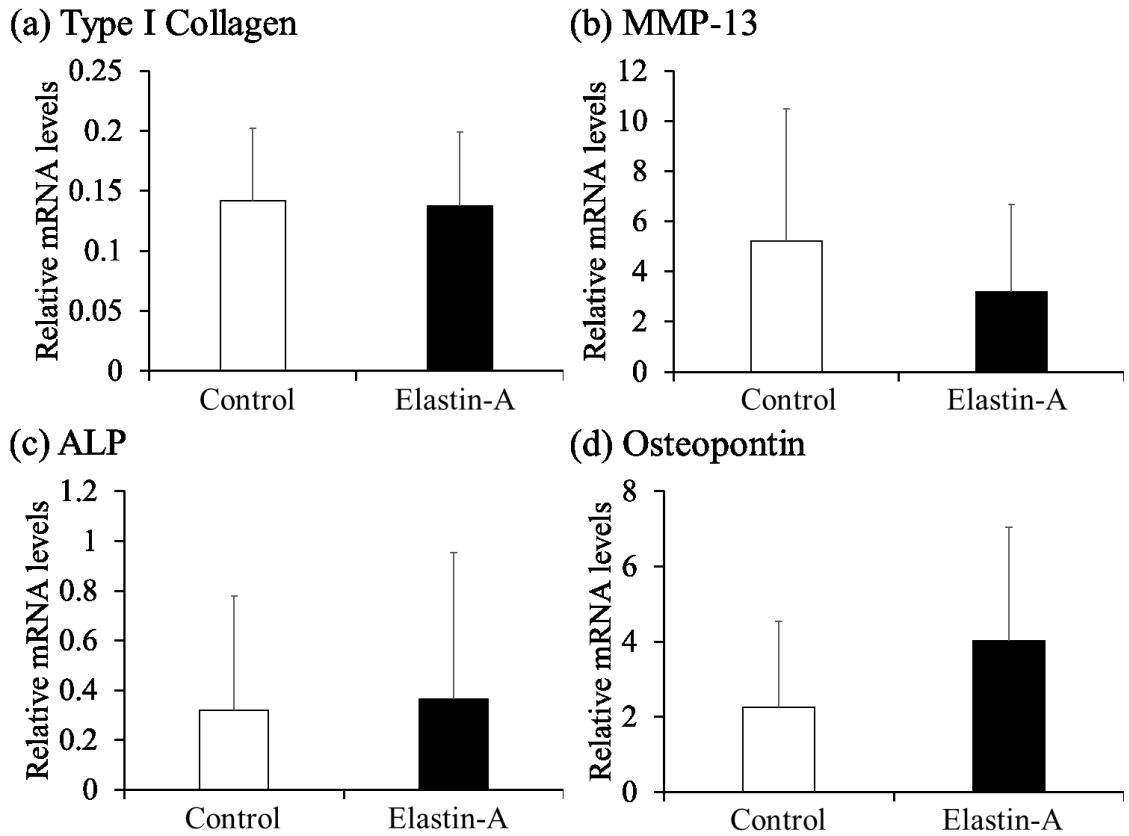


Fig.3-7 投与 12 週における骨接合部の遺伝子発現  
 (a) I 型コラーゲン (b) MMP-13 (c) ALP (d) オステオポンチン  
 □ : Control (生理食塩水投与) ■ : Elastin-A (エラスチン A 投与)、n=3~4、  
 縦軸: 正常群の発現量を 1 としたときの相対値

エラスチン投与 12 週後の遺伝子発現解析において、I 型コラーゲンが  $1.0 \pm 0.5$  倍、MMP-13 が  $0.6 \pm 1.3$  倍、ALP が  $1.1 \pm 4.0$  倍、オステオポンチンが  $1.8 \pm 2.5$  倍を示し(vs 生理食塩水投与、Fig.3-7)、いずれも有意な差は見られなかった。

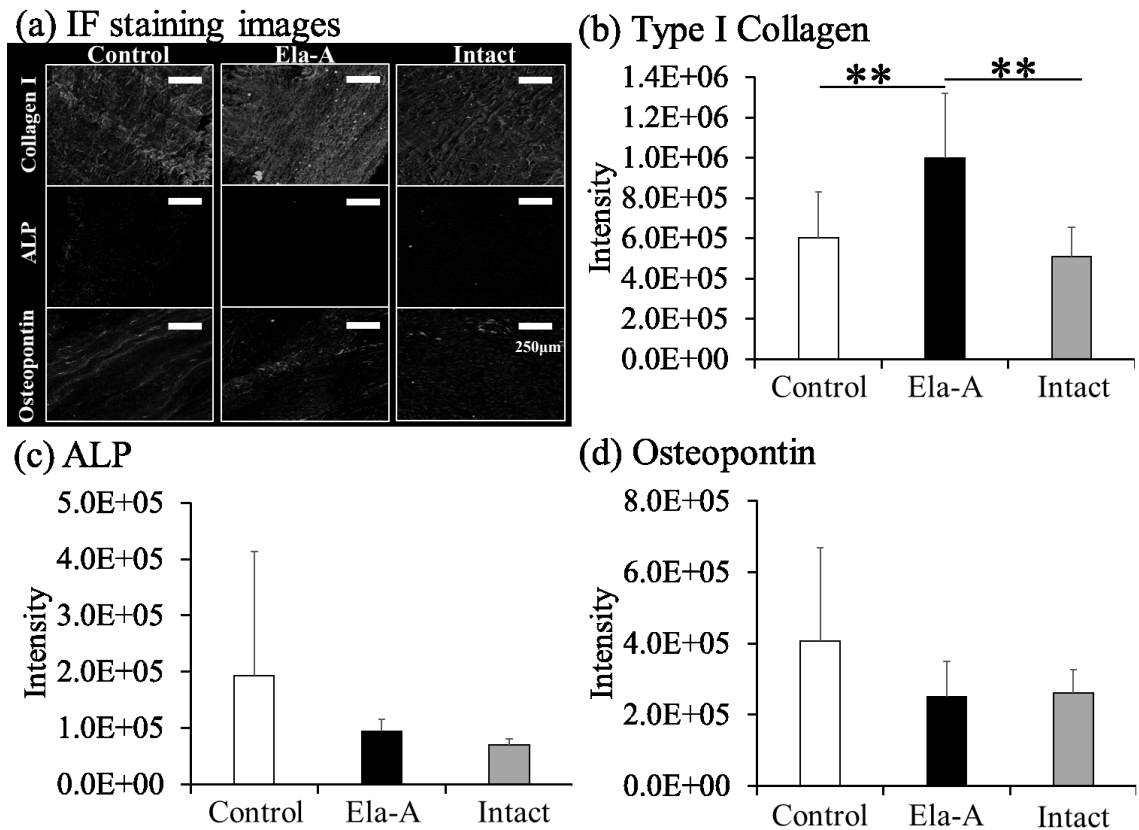


Fig.3-8 投与 12 週における骨接合部のタンパク質発現  
 (a)免疫蛍光染色画像 (b)I 型コラーゲン (c) ALP (d) オステオポンチン  
 □ : Control (生理食塩水投与) ■ : Elastin-A (エラスチン A 投与)  
 ■ : Intact (正常靭帯)、n=3~4、\* \* : p<0.01

エラスチン投与 12 週後のタンパク質発現解析において、I 型コラーゲンが  $1.7 \pm 0.5$  倍、ALP が  $0.5 \pm 0.1$  倍、オステオポンチンが  $0.6 \pm 0.2$  倍を示し (vs 生理食塩水投与、Fig.3-8)、I 型コラーゲンでは有意な発現増加が見られた。

### 3-1-3 組織力学特性へのエラスチンの作用

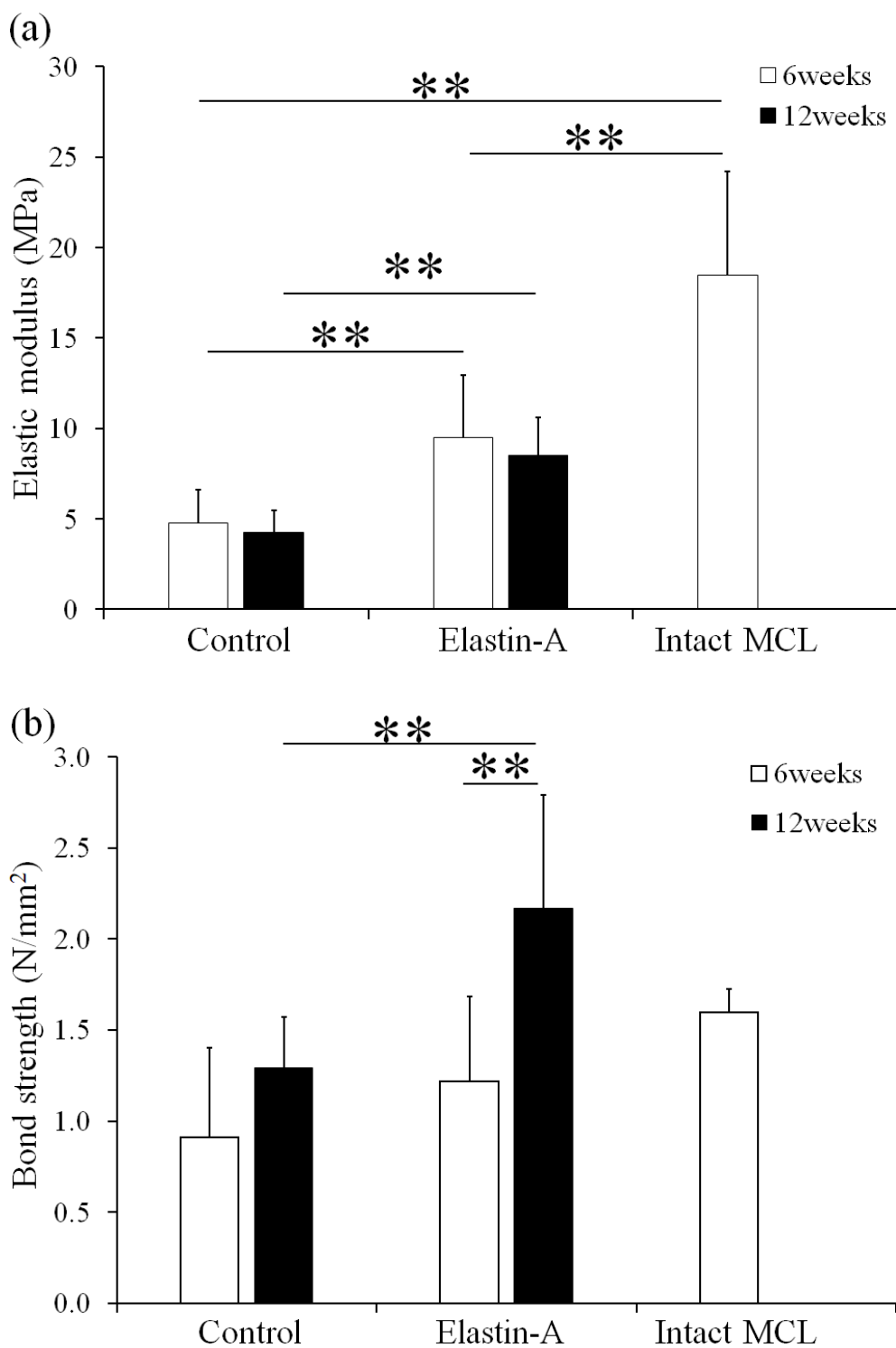


Fig.3-9 靱帯組織の弾性率(a)および靱帯—骨接合強度(b)  
 □:投与6週後、■:投与12週後、Control(生理食塩水投与)  
 Elastin-A(エラスチンA投与)Intact MCL(正常靱帯)、n=3~4、\*\* :p<0.01



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。生食群では約 4.6MPa、エラスチン群では約 9MPa であった (Fig.3-9a)。破断強度に関してもエラスチン投与により生理食塩水投与群よりも有意に高い値を示した。生食群では約 1.1N、エラスチン群では約 1.7N であった (Fig.3-9b)。

### 3-1-4 損傷部の組織学的評価

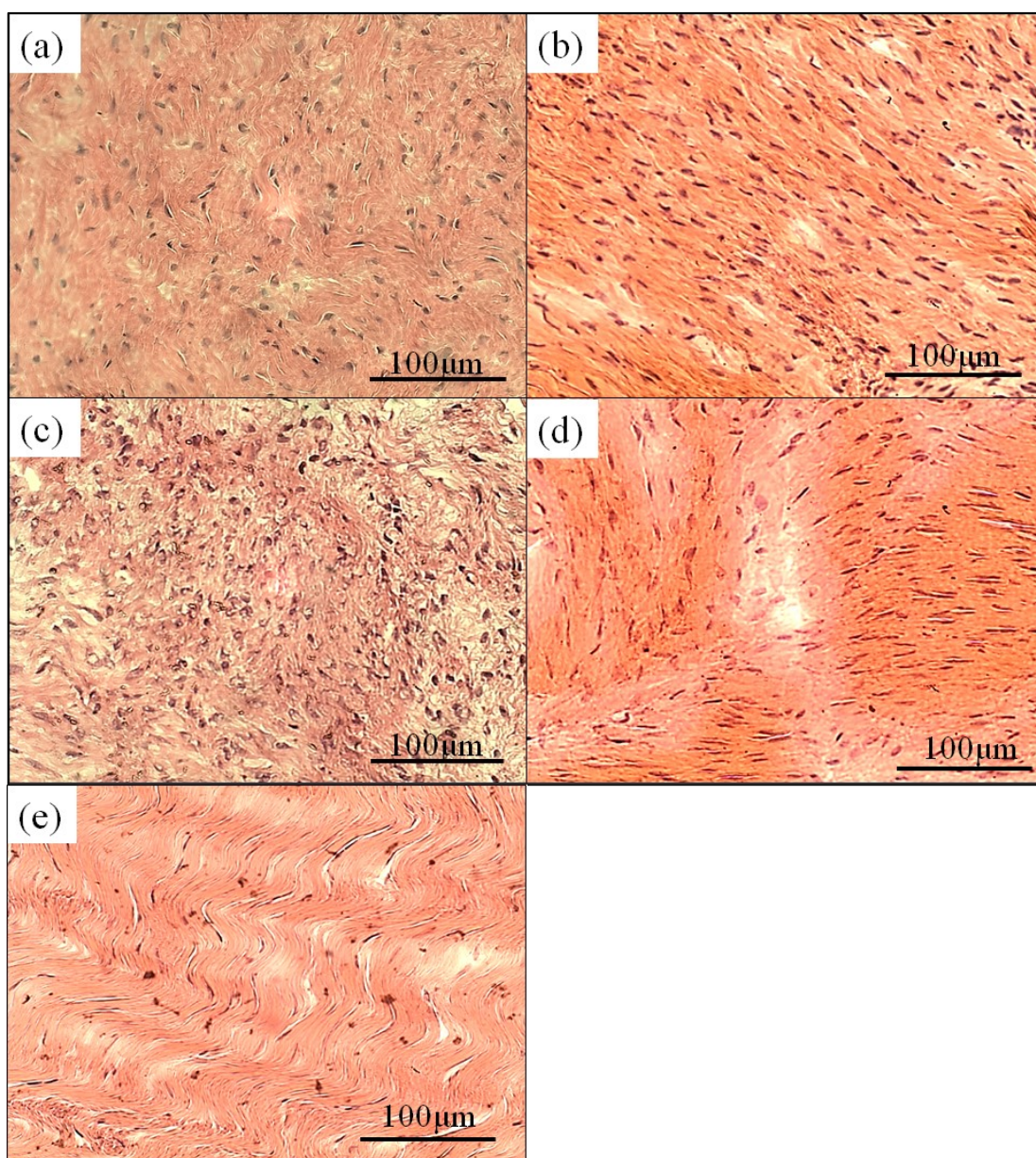


Fig.3-10 靭帯損傷部の HE 染色

(a)生理食塩水投与(6週) (b)生理食塩水投与(12週) (c)エラスチン投与(6週)  
(d)エラスチン投与(12週) (e)正常靭帯

投与 6 週において、実験群による差は見られず、線維の配向が不規則な構造が観察された(Fig.3-10a, c)。投与 12 週では、線維の配向性が投与 6 週時点と比較して改善された様子が観察された。正常群の組織では「クリンプパターン」と呼ばれる正常組織のコラーゲン線維特有の構造が確認できた。

### 1)細胞密度

投与 6 週における組織中の細胞密度を測定した結果、生理食塩水投与群では 2070 cells/mm<sup>2</sup>、エラスチン投与群では 1885 cells/mm<sup>2</sup> となり、正常群の細胞密度 (1237 cells/mm<sup>2</sup>) よりも有意に高い値を示した (Fig.3-11)。

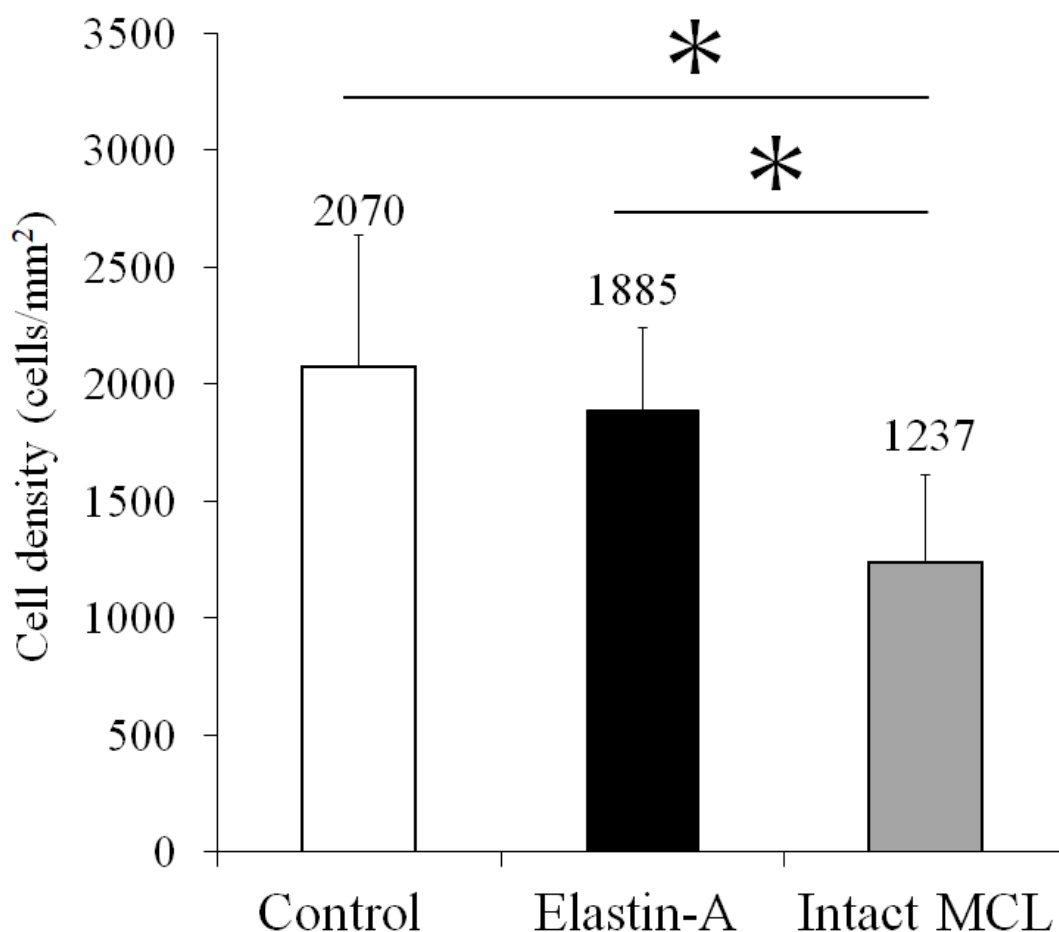


Fig.3-11 靭帯損傷部の細胞密度

Control:生理食塩水投与、Elastin-A:エラスチン投与、Intact MCL:正常靭帯

\* :p<0.05、n=3

## 2) 損傷部のスコアリング

組織構造を比較するため、投与 6 週間での組織中に存在する細胞の線維に対する配向角度を測定し、スコアを算出した。結果、エラスチン投与群では 0.9 点を示し、生理食塩水投与群の 0.5 点よりも高いことが示されたが、正常群(2.3 点)には及ばなかった(Fig.3-12)。

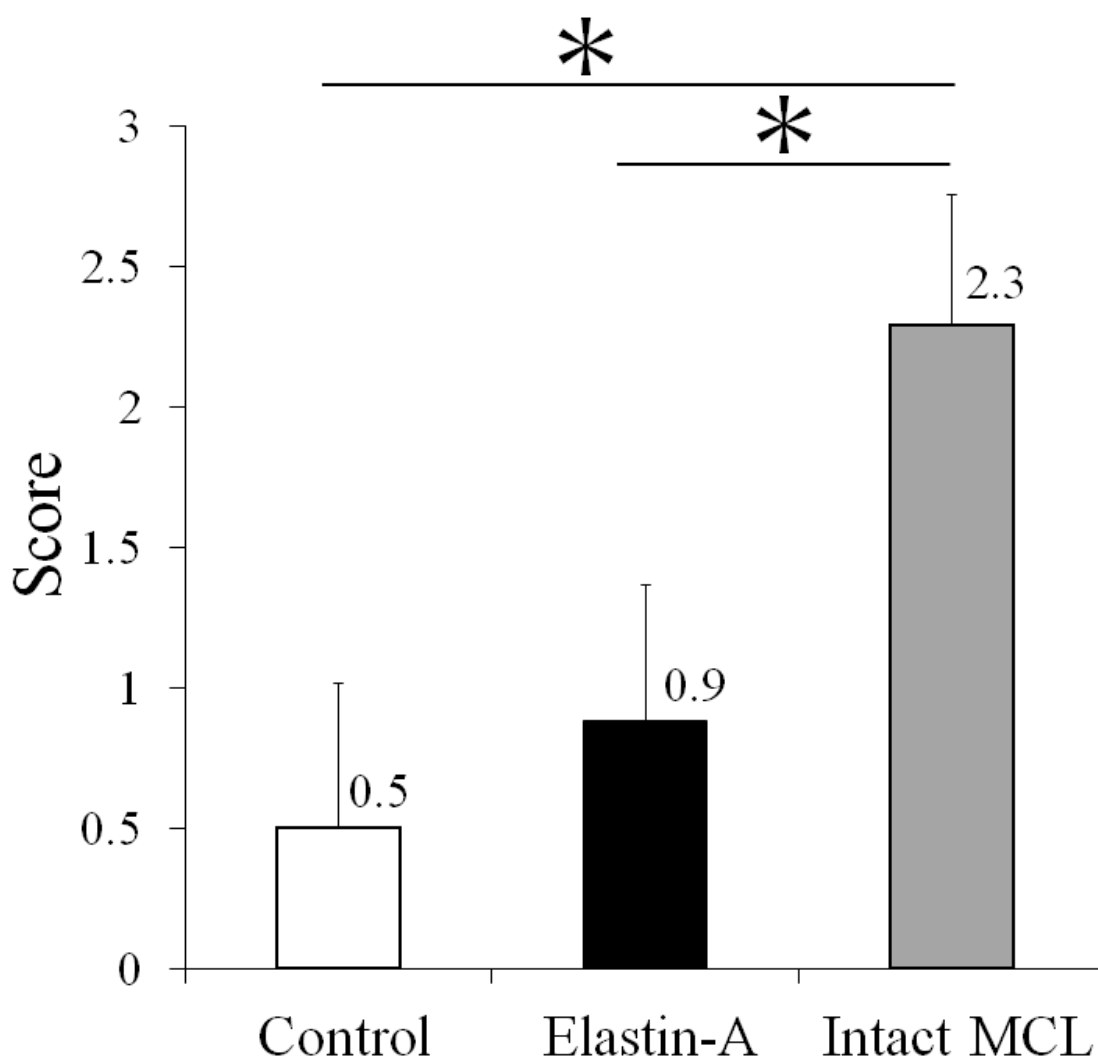


Fig.3-12 靭帯損傷部の細胞配向度(スコア)

Control: 生理食塩水投与、Elastin-A: エラスチン投与、Intact MCL: 正常靭帯

\* : p<0.05、n=3

### 3) 弾性線維の比率測定

弾性線維の比率に関して、組織染色画像を解析ソフトにより解析した結果、投与6週間において、エラスチン投与によって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(生理食塩水投与群:0.5%、エラスチン投与群:0.8%)が、正常群(1%)には及ばなかった(Fig.3-13)。

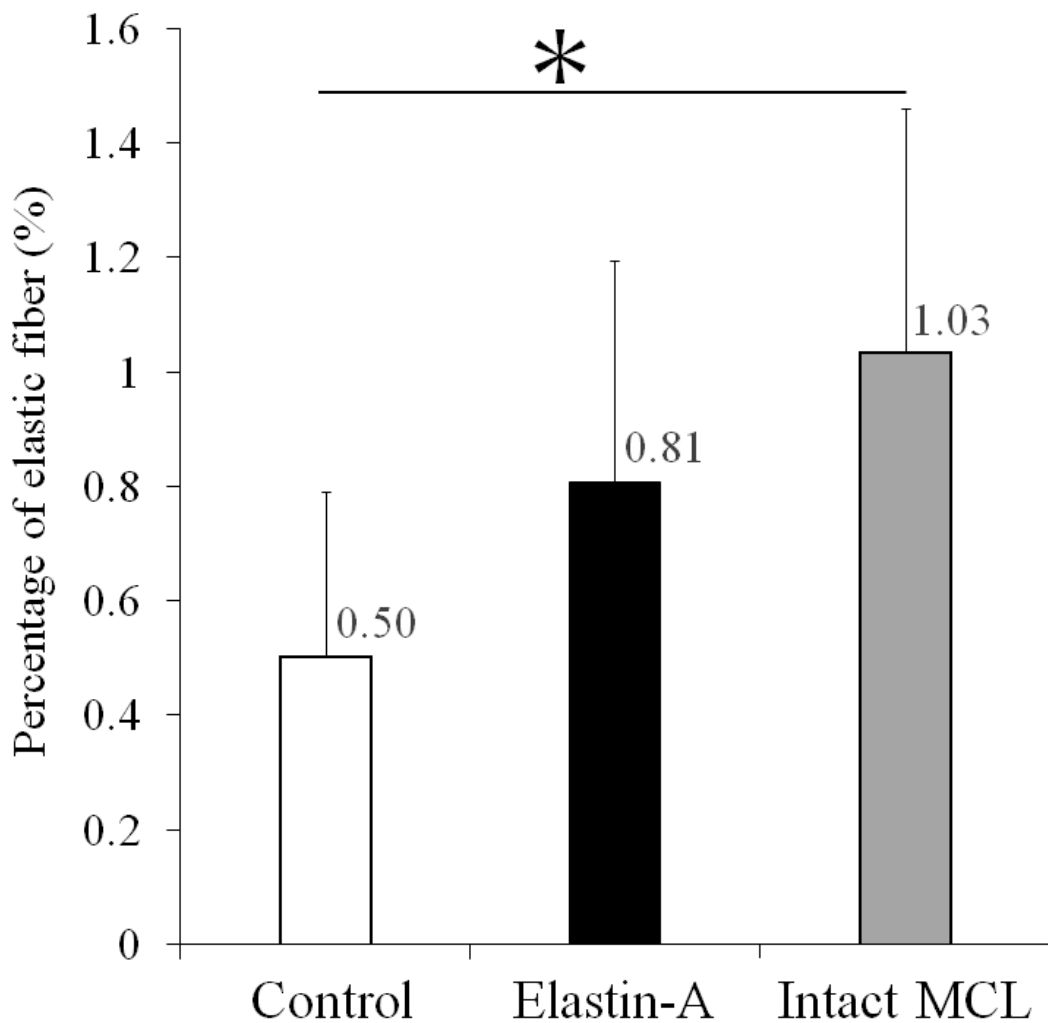


Fig.3-13 損傷部における単位面積あたりの弾性線維の比率

Control:生理食塩水投与、Elastin-A:エラスチン投与、Intact MCL:正常靱帯

\* : $p < 0.05$ ,  $n = 5$

### 3-1-5 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一覧を示す。

Table.3-1 エラスチン投与 6 週間{a: 損傷部の遺伝子相対発現量(vs 正常群)、b: 接合部の遺伝子相対発現量(vs 正常群)、c: 損傷部のタンパク質発現量(輝度)、d: 接合部のタンパク質発現量(輝度)}

(a)	ruptured region			
	Type I collagen	Type III collagen	Elastin	MMP-13
Control	0.32 ± 0.14	0.04 ± 0.03	0.09 ± 0.03	3.37 ± 1.79
Elastin-A	2.00 ± 1.02	0.21 ± 0.23	3.62 ± 1.64	10.34 ± 1.36

(b)	bone interface region			
	Type I collagen	MMP-13	ALP	Osteopontin
Control	0.19 ± 0.05	4.11 ± 2.90	0.03 ± 0.03	1.91 ± 1.53
Elastin-A	2.20 ± 0.97	4.03 ± 2.75	0.33 ± 0.48	2.38 ± 1.41

(c)	ruptured region		
	Type I collagen	Type III collagen	Elastin
Control	2.8.E+06 ± 1.0.E+06	2.2.E+06 ± 9.3.E+05	1.7.E+06 ± 1.1.E+05
Elastin-A	4.0.E+06 ± 2.2.E+06	7.1.E+06 ± 5.1.E+06	3.2.E+06 ± 1.4.E+06
Intact MCL	1.2.E+07 ± 3.8.E+06	7.7.E+06 ± 4.0.E+06	1.8.E+06 ± 6.6.E+05

(d)	bone interface region		
	Type I collagen	ALP	Osteopontin
Control	2.8.E+06 ± 1.0.E+06	1.9.E+06 ± 1.0.E+06	2.2.E+06 ± 1.1.E+06
Elastin-A	6.8.E+06 ± 4.4.E+06	2.6.E+06 ± 7.6.E+05	5.0.E+06 ± 3.6.E+06
Intact MCL	6.9.E+06 ± 4.1.E+06	1.7.E+06 ± 6.3.E+05	1.5.E+06 ± 3.2.E+05

Table.3-2 エラスチン投与 12 週間{a: 損傷部の遺伝子相対発現量(vs 正常群)、b: 接合部の遺伝子相対発現量(vs 正常群)、c: 損傷部のタンパク質発現量(輝度)、d: 接合部のタンパク質発現量(輝度)}

(a)	ruptured region			
	Type I collagen	Type III collagen	Elastin	MMP-13
Control	0.09 ± 0.02	0.40 ± 0.51	0.09 ± 0.02	1.28 ± 1.10
Elastin-A	0.05 ± 0.06	0.29 ± 0.36	0.03 ± 0.01	1.60 ± 2.04

(b)	bone interface region			
	Type I collagen	MMP-13	ALP	Osteopontin
Control	0.14 ± 0.06	5.23 ± 5.27	0.32 ± 0.46	2.26 ± 2.29
Elastin-A	0.14 ± 0.06	3.20 ± 3.47	0.36 ± 0.59	4.03 ± 3.01

(c)	ruptured region		
	Type I collagen	Type III collagen	Elastin
Control	5.4.E+05 ± 2.2.E+05	8.9.E+05 ± 1.3.E+05	3.6.E+05 ± 2.2.E+05
Elastin-A	4.9.E+05 ± 6.5.E+04	8.7.E+05 ± 2.2.E+05	1.9.E+05 ± 2.5.E+04
Intact MCL	4.9.E+05 ± 1.2.E+05	3.0.E+05 ± 7.7.E+04	7.6.E+04 ± 1.0.E+04

(d)	bone interface region		
	Type I collagen	ALP	Osteopontin
Control	6.0.E+05 ± 2.3.E+05	1.9.E+05 ± 2.2.E+05	4.1.E+05 ± 2.6.E+05
Elastin-A	1.0.E+06 ± 3.2.E+05	9.4.E+04 ± 2.1.E+04	2.5.E+05 ± 9.9.E+04
Intact MCL	5.1.E+05 ± 1.4.E+05	7.0.E+04 ± 1.2.E+04	2.6.E+05 ± 6.7.E+04

Table.3-3 靱帯組織の弾性率(MPa)

	6 weeks	12 weeks
Control	4.8 ± 1.8	4.3 ± 1.2
Elastin-A	9.5 ± 3.4	8.5 ± 2.1
Intact MCL	18.5 ± 5.7	

Table.3-4 靱帯組織の接合強度(N/mm<sup>2</sup>)

	6 weeks	12 weeks
Control	0.9 ± 0.5	1.3 ± 0.3
Elastin-A	1.2 ± 0.5	2.2 ± 0.6
Intact MCL	1.6 ± 0.1	

## 3-2 エラスチンコーティングによる人工靭帯—骨接合強度の変化

### 3-2-1 人工靭帯へのエラスチンコーティング

人工靭帯の作製時に、PDS 表面にコロナ放電処理を施し、エラスチン溶液中に静置することで材料表面にエラスチンをコーティングさせた。PDS 表面に対しエラスチンの免疫蛍光染色を行うことで、コーティングを施した PDS においてエラスチンの蛍光が確認された (Fig.3-14)。

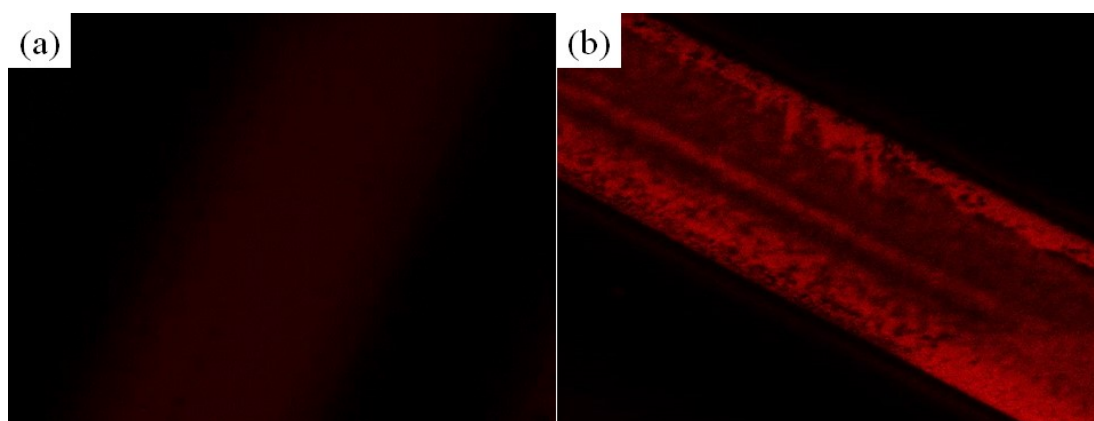


Fig.3-14 エラスチンコーティング PDS の免疫蛍光染色結果  
(a: 非コーティング、b: エラスチンコーティング)

### 3-2-2 人工靭帯骨挿入部近傍の組織学的評価

エラスチンコーティングを施した人工靭帯および非コーティング人工靭帯をウサギ脛骨に移植した。人工靭帯挿入部の組織染色結果より、挿入部近傍の組織形態はコーティングの有無による違いは見られなかったが、Safranin-O 染色結果より、人工靭帯挿入部周辺は赤く染色されたため、軟骨基質の存在が確認された (Fig.3-15)。

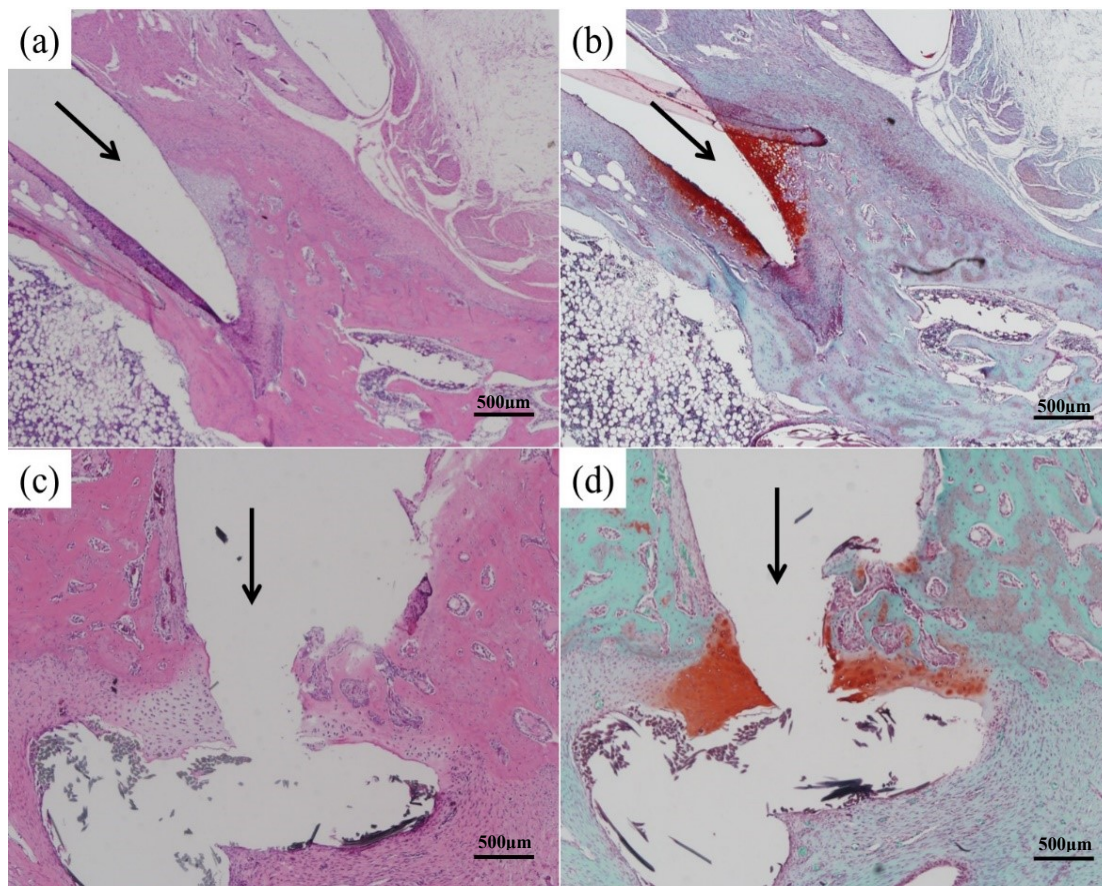


Fig.3-15 人工靭帯挿入部の HE 染色 (a, c) および Safranin-O 染色 (b, d)  
 (a, b) 非コーティング人工靭帯、(c, d) エラスチンコーティング人工靭帯  
 (矢印: 人工靭帯の挿入方向)

### 3-2-3 人工靭帯の引き抜き荷重測定

人工靭帯の骨との接合強度を評価するため、人工靭帯が骨から引き抜ける際に必要な荷重を測定した。エラスチンコーティングにおいて有意に引き抜き荷重が増加した。非コーティングでは  $7.6 \pm 4.6\text{N}$  を示し、エラスチンコーティングでは  $28.0 \pm 15.1\text{N}$  を示した (Fig.3-16)。



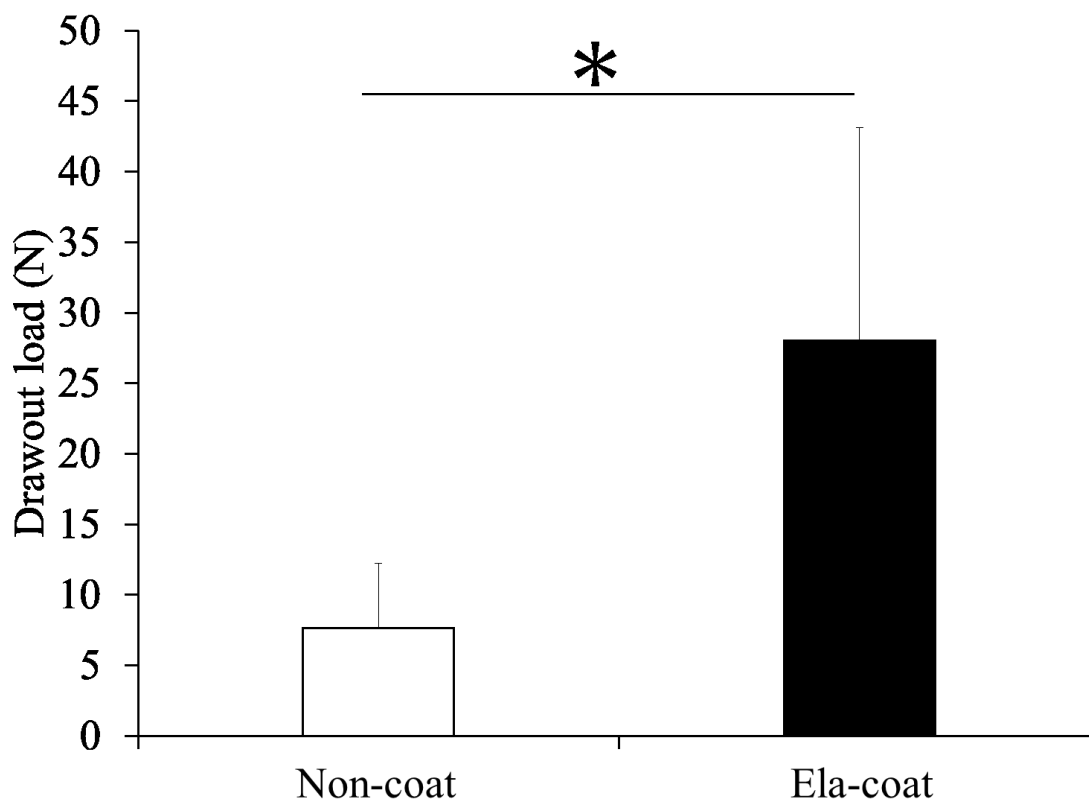


Fig.3-16 人工靭帯引き抜き荷重、Non-coat:非コーティング (n=5)  
Ela-coat: エラスチンコーティング (n=4)、\* : p<0.05

### 3-3 組織工学的人工靭帯の移植

#### 3-3-1 移植後 6 週における人工靭帯移植部の肉眼的観察

移植後 6 週時点において、肉眼的観察による移植部の異状などは見られなかった (Fig.3-17a)。また、力学強度測定後の人工靭帯が引き抜けた骨孔を観察すると、周辺には硬組織の形成が見られた (Fig.3-17b)。

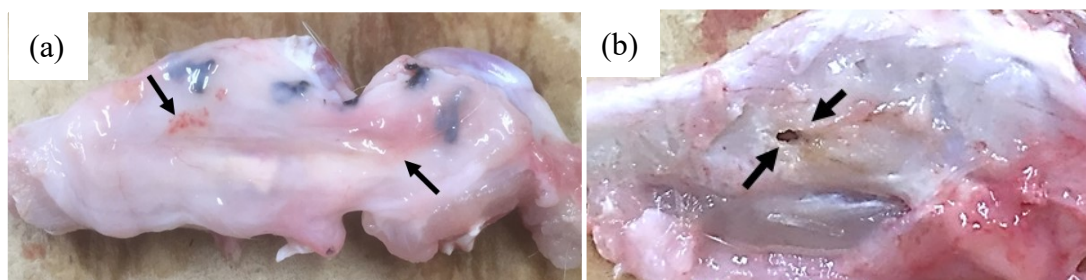


Fig.3-17 移植6週後の膝関節内側(a、矢印:人工靭帯移植位置)  
および移植部骨孔(b、矢印:骨孔位置)

### 3-3-2 人工靭帯骨挿入部近傍の組織学的評価

人工靭帯挿入部の組織染色結果より、挿入部近傍の組織形態はコーティングの有無による違いは見られなかったが、Safranin-O 染色結果より、人工靭帯挿入部周辺は赤く染色されたため、軟骨基質の存在が確認された (Fig.3-18)。

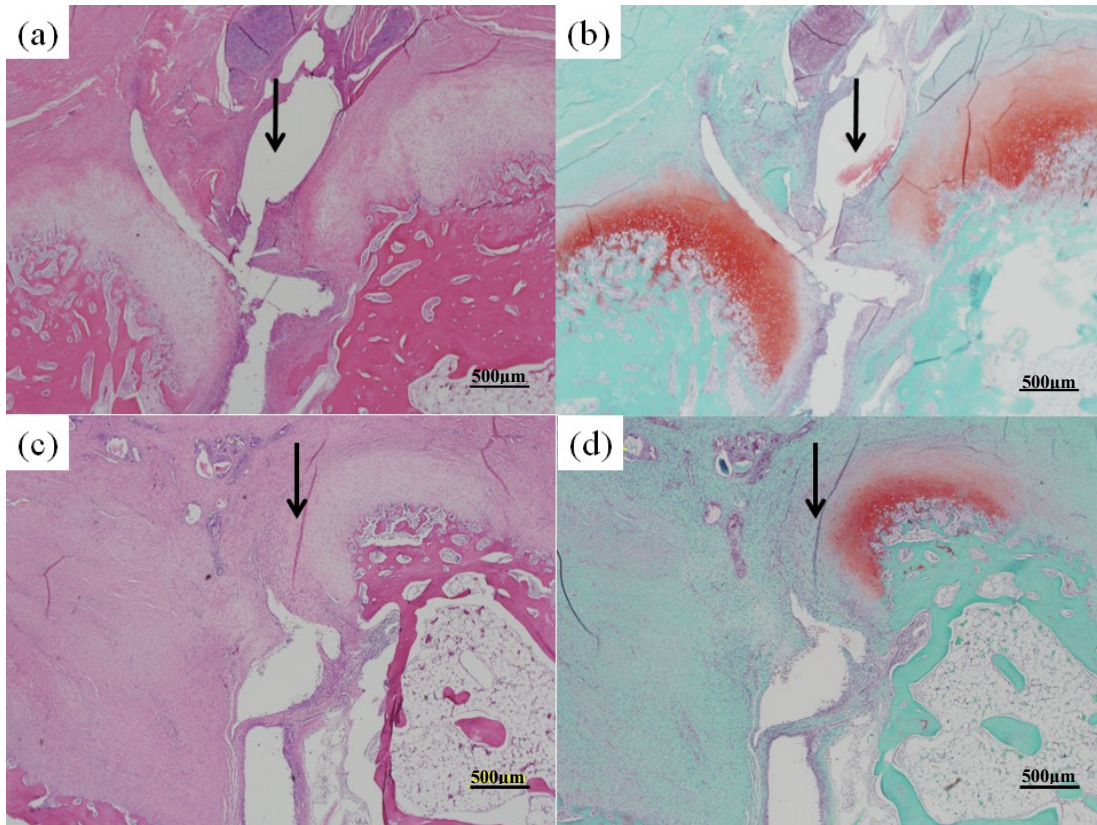


Fig.3-18 人工靭帯挿入部の HE 染色 (a, c) および Safranin-O 染色 (b, d)  
(a, b) 細胞なし人工靭帯、(c, d) 細胞あり人工靭帯 (矢印: 人工靭帯挿入方向)

### 3-3-3 移植後靭帯の力学的評価

移植後 6 週における、靭帯の力学的特性を評価するため、弾性率および破断荷重を測定した。測定値より応力-ひずみ曲線を作製し(Fig.3-19)、弾性率を算出した。この時、人工靭帯に使用した PDS は分解が進行しており、PDS に強度は残っていないため、靭帯組織の強度に影響しなかった。

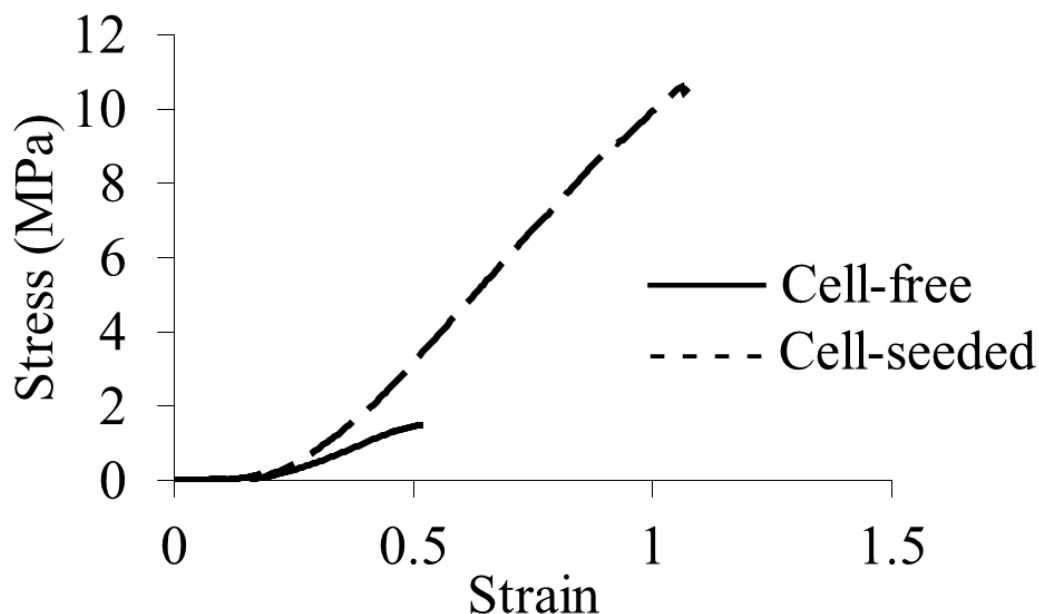


Fig.3-19 移植 6 週後の靭帯の応力-ひずみ曲線  
——: Cell-free (細胞なし) - - - : Cell-seeded (細胞あり)

弾性率に関して、細胞あり人工靭帯では  $15.4 \pm 1.3$  MPa を示し、細胞なし人工靭帯 ( $5.7 \pm 3.6$  MPa) に比較して有意に高い値が得られた (Fig.3-20a)。また、正常群の弾性率 ( $18.5 \pm 5.7$  MPa) と比較しても近い値を示した。

破断荷重に関して、細胞なし人工靭帯では  $48.1 \pm 11.3$  N を示し、正常群の破断荷重 ( $104.8 \pm 21.8$  N) と比較して有意に低い値を示したが、細胞あり人工靭帯では  $73.0 \pm 23.4$  N と正常群に近い値が得られた (Fig.3-20b)。

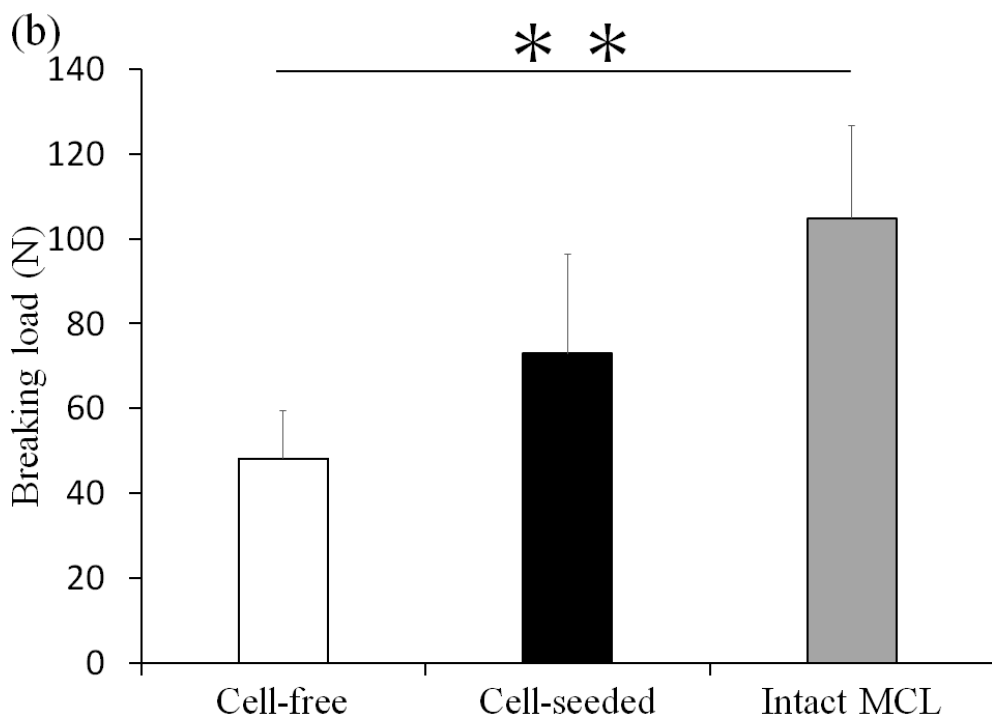
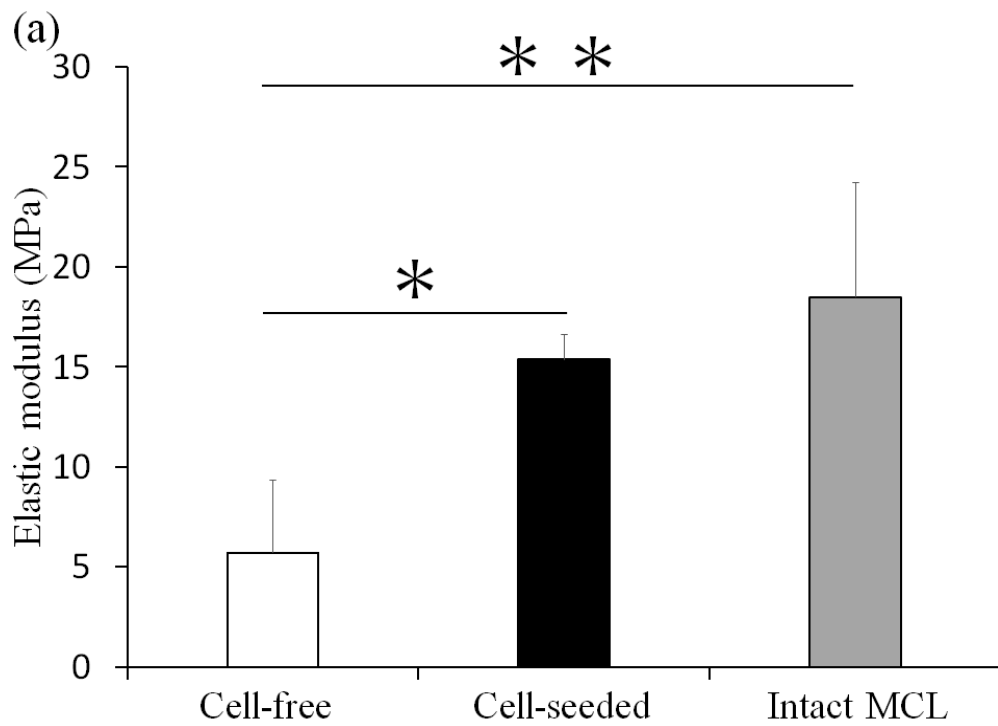


Fig.3-20 人工靭帯力学強度(a:弾性率、b:破断応力)

□:Cell-free(細胞なし、n=5) ■:Cell-seeded(細胞あり、n=3)

■:Intact MCL(正常靭帯、n=8)、\*:p<0.05、\*\* :p<0.01

### 3-4 エラスチン結合タンパク質の探索

#### 3-4-1 不溶性エラスチンアフィニティクロマトグラフィ

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.3-21)。

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。

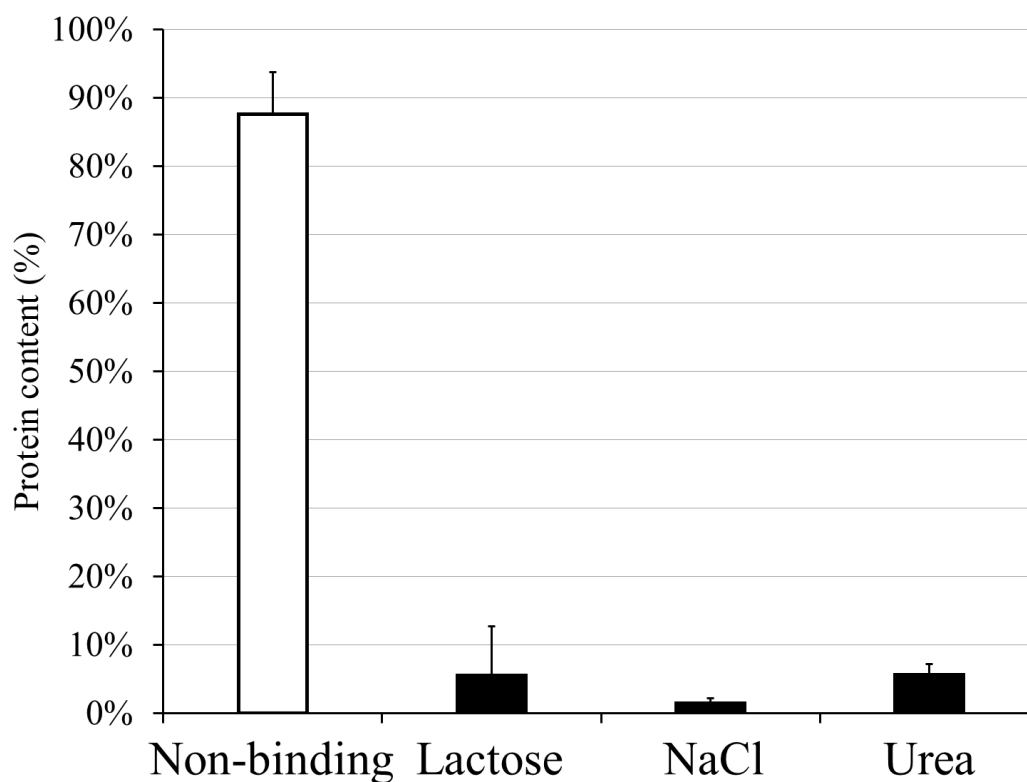


Fig.3-21 ウサギ MCL 細胞中のエラスチン結合タンパク質含有量 (n=17)

### 3-4-2 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。EBP はラクトースとの結合部位も有しており、アンタゴニストとして用いた<sup>38)39)</sup>。

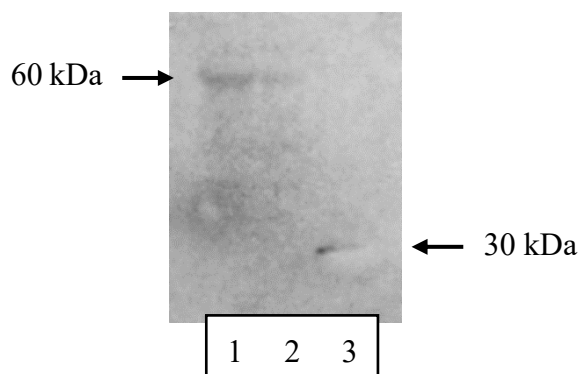


Fig.3-22 Western blotting

(Lane1:細胞抽出液、Lane2:非結合、Lane3:ラクトース溶出)

Lane1 では 60kDa 付近に、Lane3 では 30kDa 付近にバンドが検出された (Fig.3-22)。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。

### 3-4-3 SDS-PAGE

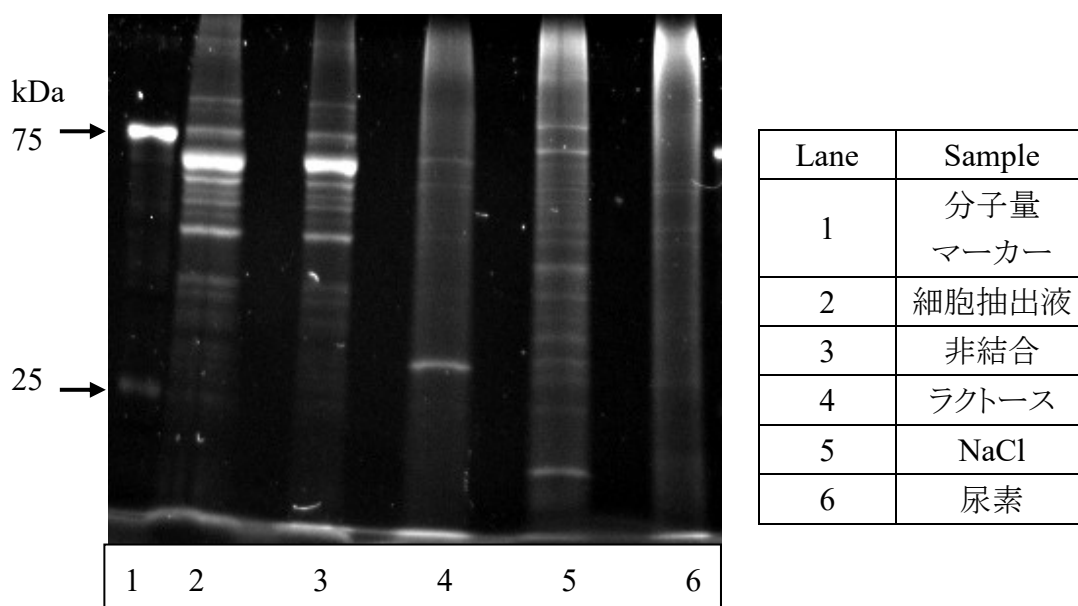


Fig.3-23a SDS-PAGE (ウサギ MCL:ラクトース、NaCl、尿素溶出)

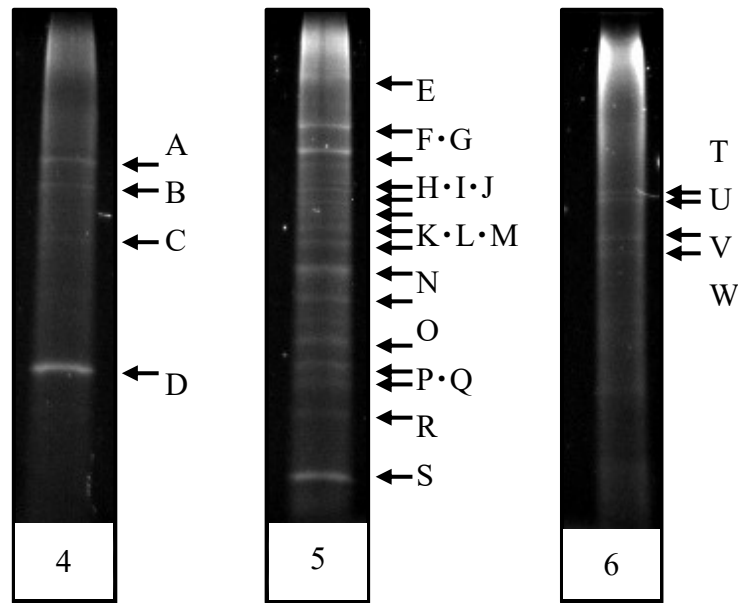


Fig.3-23b SDS-PAGE (ウサギ MCL:ラクトース、NaCl、尿素溶出)

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.3-23a)。さらに複数のタンパク質の存在が示唆された。次に各溶出タンパク質について述べる。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 (Fig3-23b)。

### 3-4-4 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、明瞭に確認できた 4 つのバンド (F,G,M,S) について解析した。

Table.3-5 TOF-MS 解析結果

Sample	Band	%Cov	Peptides (95%)	Name
Lactose fraction	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 fraction	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
		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	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

Urea fraction	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.3-5)。

### 3-4-5 MALDI-TOFMS 解析結果詳細

Table.3-5 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

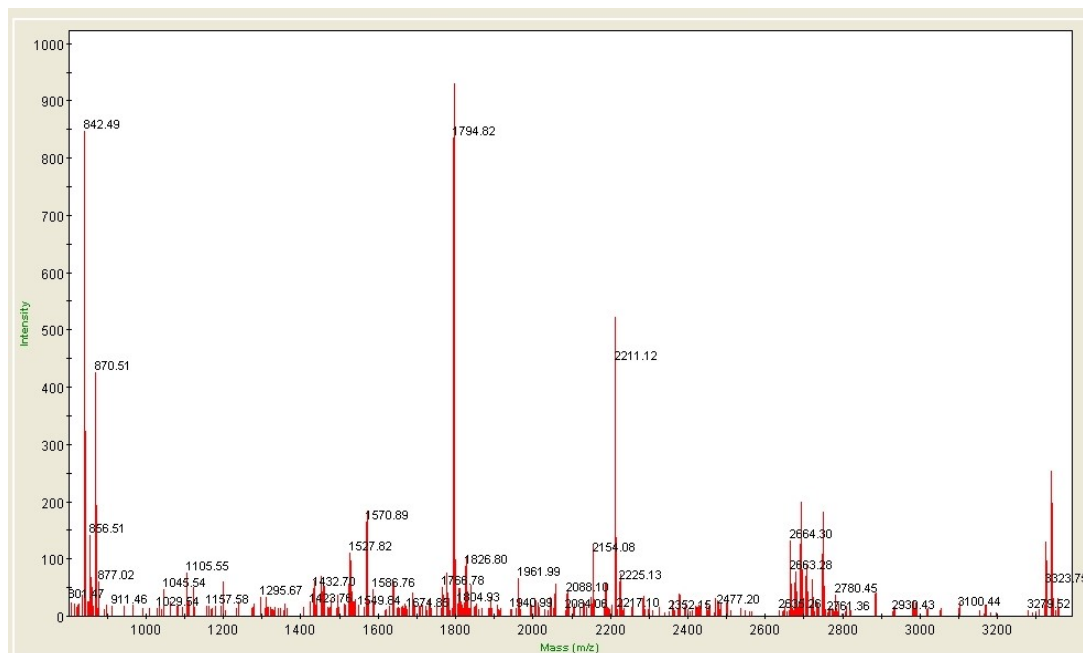


Fig.3-24a バンド B の MS スペクトル

**Proteins Detected**

N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Processes	Molec
1	2.00	2.00	2.8	gi 854353	neurofilament protein M, partial [Oryctolagus cuniculus]	Oryctolagus cuniculus	1		
2	2.00	2.00	4.8	gi 85568...	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: hyaluronan synthase 1 [...]	Oryctolagus cuniculus	1		
3	2.00	2.00	1.5	RRRRRg...	REVERSED PREDICTED: RNA-binding protein 27 isoform X6 [Or...	Oryctolagus cuniculus	1		

**Protein Group 1 - neurofilament protein M, partial [Oryctolagus cuniculus]**

Proteins in Group				Peptides in Group										
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spe
1	2.00	2.00	gi 854353	neurofilament	2.00	99	AGEEGGSEEGSDQGSKR		missed K-R...	0.4213	1807.86...	1	4	1.60
1	0.00	2.00	gi 1709261	RecName: Full-										

**Protein Sequence Coverage - neurofilament protein M, partial [Oryctolagus cuniculus]**

```

VVVELDKKQSLQDEVAFRLTNHEEVDLLAQIQASHITVERKDYDKTDISSALKEIRSOLECHSDQNMHQAEWFRCRYAKLTEAAEQNKEAIRSAKEEIAEYRPLQSKSIELE
SVAWHKESLERHVSDEIERHNDLSSYQDTIQOLENELRGTKWEHARHLREYQDLLNVKMALDIEIAAYRKLLEGEETRFSTFSGSITGPLYTHROPSVTISSKIQKTKVEAPKLV
QHKFVEEILIEETKVEDEKSEMEDALTAIAEELAVSVKKEEKEEAEAGKEEEOEAEVEVAAAKKSPVKATTPPEIKKEEKEEKEEEOEVEEEDGKVDQAEEGGSEKESKNEGE
QEEGTEAEGVEVEEAIAKEEKKTEEKSEVEAAKEEVPVTEARVGGPKAKSPVPSVPEEVKPKAEATAGKGEQKEEVEEKKKAAKESPKKEKVEKKEPKDVPKKKAESPVK
EEAAEEAATITKPTKVGLEKETKEGKPLQEQEKEEYAGEE6GSEEGSDQGSKRKKEDIAVNGEGEKEEPEETKEKGSREEEKGVVINGLDLSPADEKKGDRSEKVVVTK
KVEKITTEGGDGATKYITKSVTAQRVEEHEETFEELVSTKRVKVTSHAIKVEKVTQSD
    
```

Fig.3-24b Neurofilament protein M 結果詳細

## 2) バンド D: Galectin-3

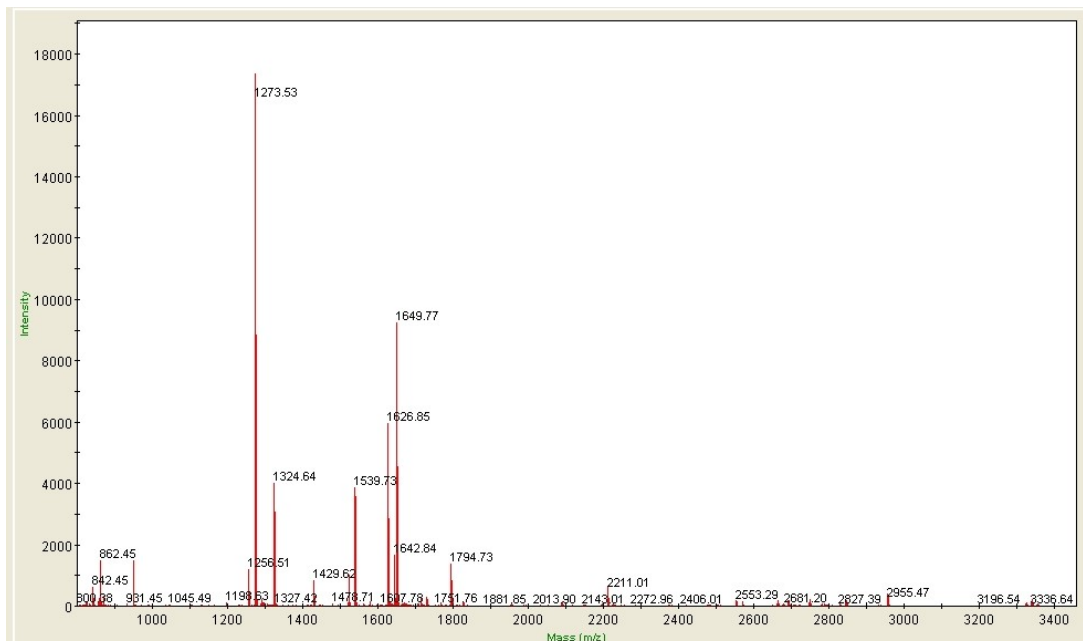


Fig.3-25a バンド D の MS スペクトル

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	ΔMass	Prec MW	z	Sc
1	11.35	11.35	gi 606795	galectin-3 [Ory	2.00	99	GNDVAFHENPR			-0.0800	1272.51...	1	13 1.
1	0.00	11.35	gi 1346429	RecName: Full	2.00	99	IQVLVEPDHEK			-0.0890	1323.62...	1	11 1.
1	0.00	11.35	gi 12672...	galectin-3 [Ory	2.00	99	LGISGD IQLTSASHMI			-0.1002	1712.77...	1	8 1.
					2.00	99	QTTF PFEIGKPEK			-0.0922	1538.72...	1	15 1.
					2.00	99	VAVND AHL QYNHR			-0.0852	1648.75...	1	16 1.
					1.35	95.5	MLITIVGTVKPNRNR			-0.0847	1625.84...	1	6 1.
					0.00	< 1	IQVLVEPDHEK VAVND AHL...		missed K-V...	-0.0839	2954.46...	1	3 1.
					0.00	98.6	LGISGD IQLTSASHMI	Oxidation(M)@16		-0.0936	1728.77...	1	9 1.
					0.00	98.6	QTTF PFEIGKPEK	Gln->pyro-Glu@N-term		-0.0791	1521.70...	1	7 1.

Protein Sequence Coverage - galectin-3 [Oryctolagus cuniculus]
MADGFSLNDALSGSHPPNQWPGFMGNOPAGPGGYPGAAYPGAYPGHAPGAYPGQAPPYYPGG&HGAYPGQPGGPGAYPSGQPSGAGAYPGASPYAS&GPLPVPYDLPLPGG VMPIMLITIVGTVKPNRNRALDFKRGNDVAFHENPRFNENNRVIVCNTKVDNMGREERQTTFPFEIGKPKFIQVLVEPDHEK VAVND AHL QYNHRMRNLKE INKLGISGD IQL TSASHMI

Fig.3-25b Galectin-3 結果詳細

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

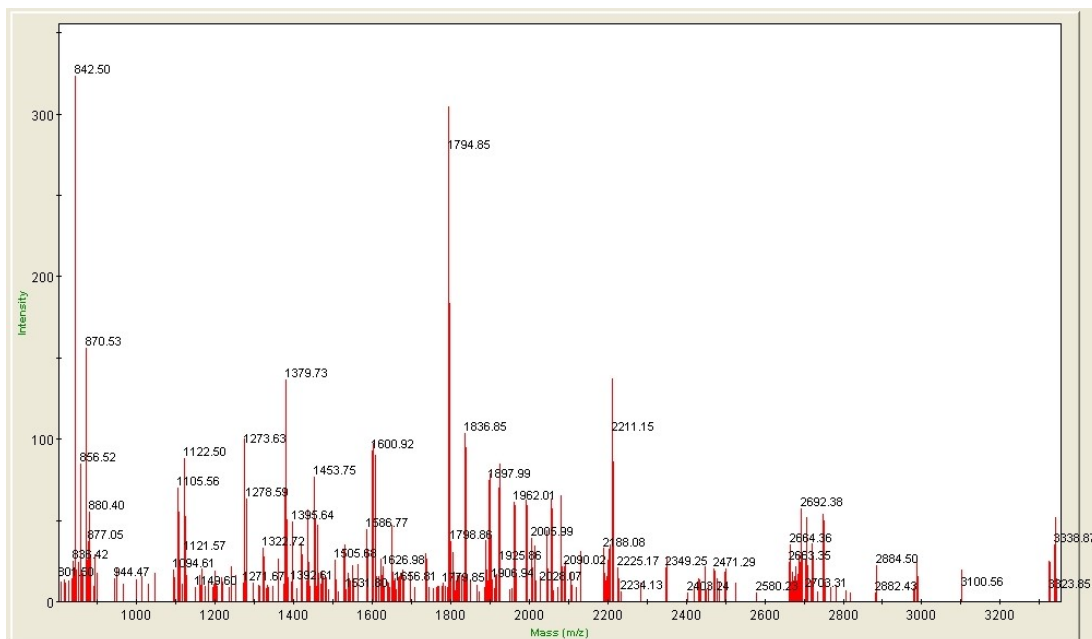


Fig.3-26a バンド F の MS スペクトル

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-tucose 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: WD 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	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spe
1	1.92	1.92	gi 65585...	PREDICTED: fra	1.92	98.8	ARGELEFVEDFIQVPR		missed R...	-0.1471	1921.85...	1	3	1.61
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]
MREVLASRQPEPGLRAPRGGAGAGQQRSDCVGRRRAGRRRRRAEPGARVRSRGGIPGSEGRHAETPGVWGGGQSPCLPHPSRLLAPPSSPLVGFLESPLSGLCGSNMA ELTVEVRGSGNGAFYRGIKDVHEDSLTVFENNQPERQVPFNEVRLPPPPDIKKEISEGDEVEVYSRANDQPCGWLAKVRHMRGEFVVEYAACDATYNEIVTFERLRPVNQNK TVKRNFTFKCTVDVPEDLREACANENAHKDFKAVGACRIFYHPETTOLMILSASEATVTKRVNILDMLHLSIRTKLMLMSRNEEATKHECTKQLAAAFHEEFVREDLMGLAIGT HGSNIQQAQKVPVGTAIELDEDGTGFRYIGESADAVKARGLEFVEDFIQVPRNLVGVKVIKNGKVIQEIIVDKSGVVRVRIEGDNEKNLPREDGHVPPFVFGTKESIGNVQVLLLEY HIALYKVEVQLRMRQLDQLRQLQIGMFRPSSSTRGPEKEKGYTTDESTVSSVQCSRSYSGRGRRRGNVYTSVGYTNSSELNPSSETESERKDELSDSLAGEDDRESRHQRDSRRR PGRGRSVSGGRGRRGPKGSSISSVLDKDPDSNPYSLLDNVTSDDQTADTDAESHHSINRRRRSRRRTDEDAVLMGDHTSPTASVNWENGLGKRC

Fig.3-26b Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 結果詳細

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

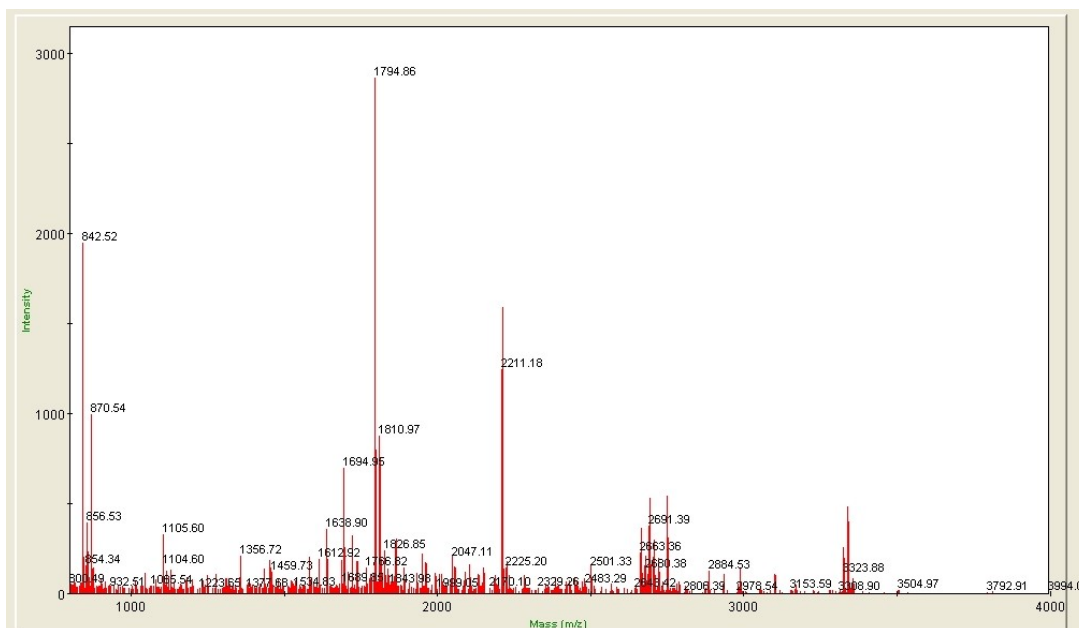


Fig.3-27a バンド G の MS スペクトル

Proteins Detected									
#	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 cuniculus]	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 [Oryctolagus cuniculus]	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	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spe
1	2.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]	2.00	99	FENQNK <b>EKA</b> WLEK		missed KA...	-0.0234	1793.85...	1	3	1.61
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]										
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]										
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]										
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]										
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]										
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]										
1	0.00	2.00	gi 65583...	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]										

Protein Sequence Coverage - PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 77 isoform X4 [Oryctolagus cuniculus]
MADSLSTPLPSIQDRLAVLCPSELLEYQKMAECEAENEDLLKLELYREACEGQHKLEWDLQQREEEIAELQKALSDMQACLFQEREHVLRLYSENDRLRIRLEDKPKKIQSL LALVGTDTGEVTFYFKEPPHRVSIQKTIQAVGVCEQSEATPNADPKVNRSAAREKVGSSQYHRDMQTLILQVEALQAQGEQTKLSKEQVEGLMEDRRIRAEETIQVQHQRNOD RIKELTONLHQTELLYESTKDFLQLR <b>FENQNK<b>EKA</b>WLEK</b> DDLSKIQYRVQCKKEDKVGKVLVPLHDSHTQNEYIKSLKDKLAQEKRLSTMYQEQCISLEEELARIREEAGV RREIFKDRDTKMGKRLQVHTRRYALEHRRLLVEVGFKTDIKALRQLKDLQMLYKATMNAQANQDLAHLCEVRNGNRRRAHKLQELKSLKSLFGLLENELRLC

Fig.3-27b Coiled-coil domain-containing protein 77 結果詳細

5) バンド M: Antimicrobial protein CAP18

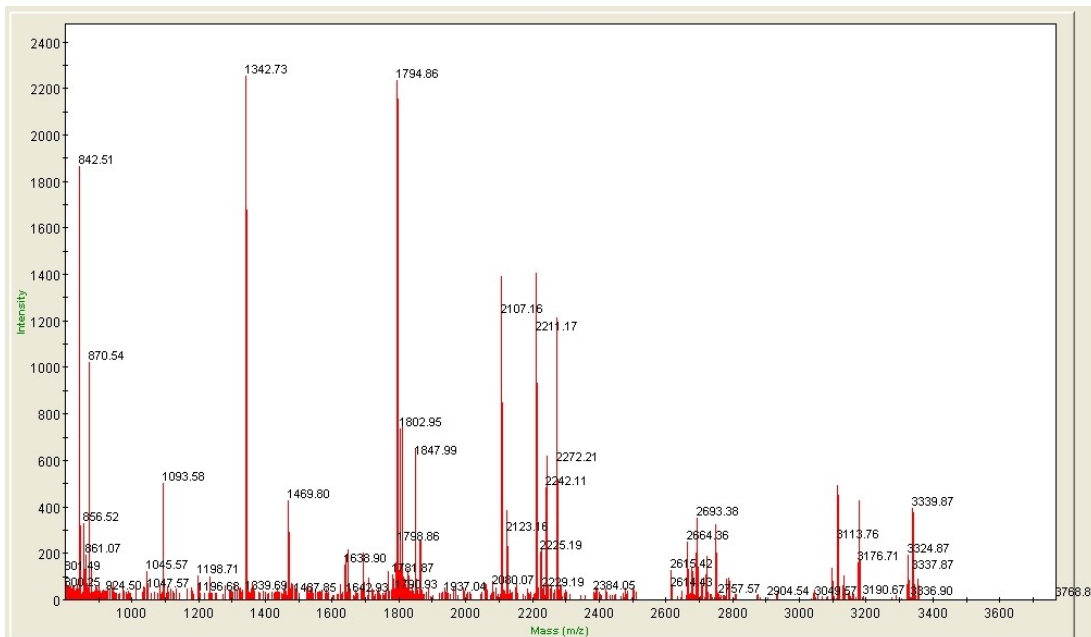


Fig.3-28a バンド M の MS スペクトル

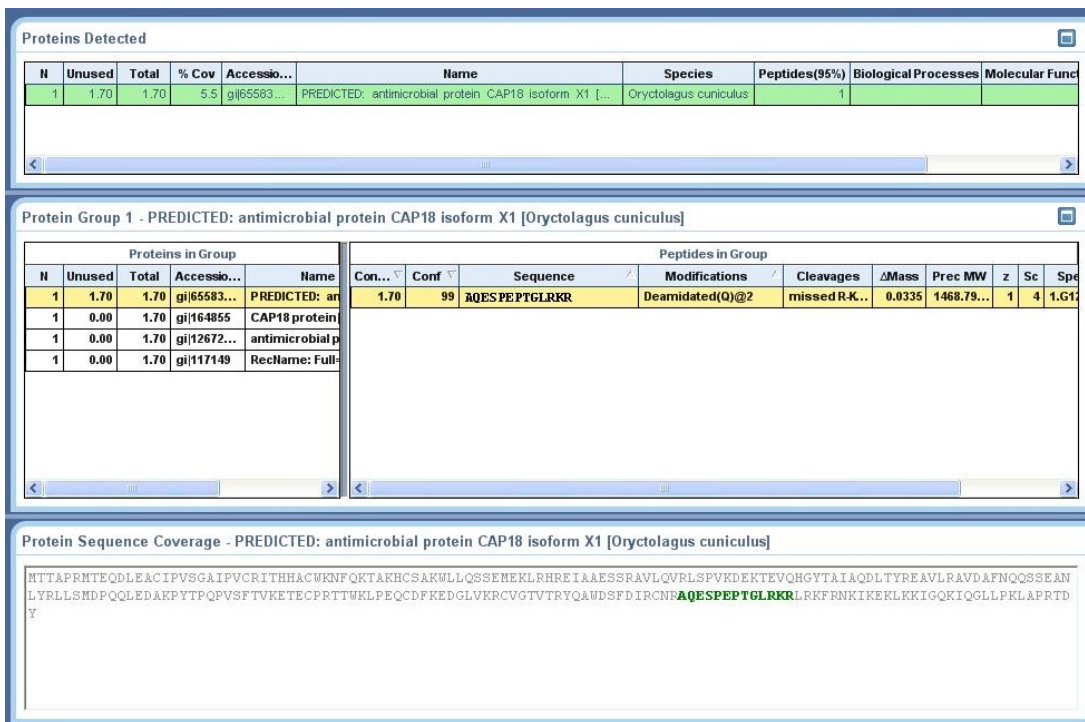


Fig.3-28b Antimicrobial protein CAP18 結果詳細

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

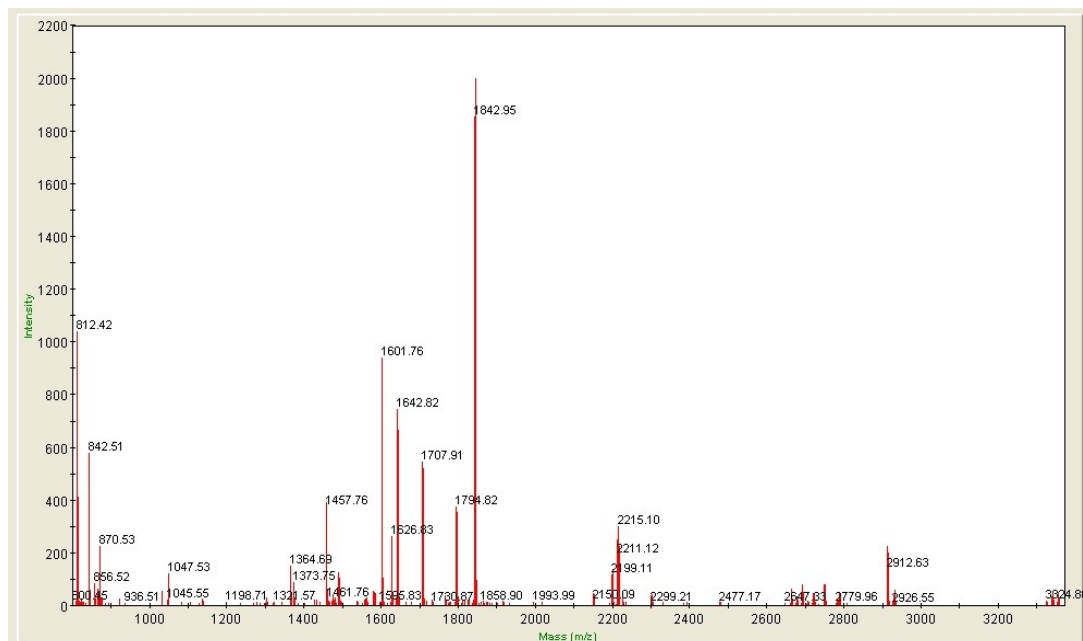


Fig.3-29a バンド S の MS スペクトル

Proteins Detected								
N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Proce
1	9.05	9.05	34.3	gi 29140...	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B [...]	Oryctolagus cuniculus	5	
2	0.65	0.65	3.4	gi 65560...	PREDICTED: serine protease 55 [Oryctolagus cuniculus]	Oryctolagus cuniculus	0	
3	0.22	0.22	2.3	RRRRRg...	REVERSED PREDICTED: interleukin-1 receptor accessory protein-like 1 [Oryct...	Oryctolagus cuniculus	0	
4	0.11	0.11	2.6	RRRRRg...	REVERSED PREDICTED: type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase [O...	Oryctolagus cuniculus	0	

Protein Group 1 - PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B [Oryctolagus cuniculus]														
Proteins in Group				Peptides in Group										
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spe
1	9.05	9.05	gi 29140...	PREDICTED: LC	2.00	99	IEVEKPFALAKE			-0.0192	1372.74...	1	5	1.611
	0.00	6.72	gi 78498...	cyclophilin B, pa	2.00	99	SIYGERFPDENFELK		missed R-F...	0.0098	1841.94...	1	6	1.611
					2.00	99	TAWLDGKHVVFVK		missed K-H...	-0.0325	1456.74...	1	4	1.611
					2.00	99	TVDNFVALATGEK			-0.0132	1363.68...	1	4	1.611
					1.05	98	VIKDFMIQGGDFTRGDGTG...	Oxidation(M)@6	missed R-G...	0.0167	2214.09...	1	5	1.611
					0.00	<1	VIKDFMIQGGDFTRGDGTG...		missed R-G...	0.0192	2198.09...	1	3	1.611

Protein Sequence Coverage - PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B [Oryctolagus cuniculus]
MLRLSERNHKVLFAAALIVASVFFLLLPGPSVADEKKRGPVTVKVFYDLRIGDEDVGRVVFGLFGKTVPK <b>TVDNFVALATGEK</b> GFQYKNSKFP <b>VIKDFMIQGGDFTRGDGTG</b> GGK <b>SIYGERFPDENFELK</b> HYGPGVWVSHANAGKDTNGSQFFITTTVK <b>TAWLDGKHVVFVK</b> XLEGHEVVRKVESTKTDSRDKPLKDVVIADCGK <b>IEVEKPFALAKE</b>

Fig.3-29b Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B 結果詳細

7) バンド T: Serine-protein kinase ATM

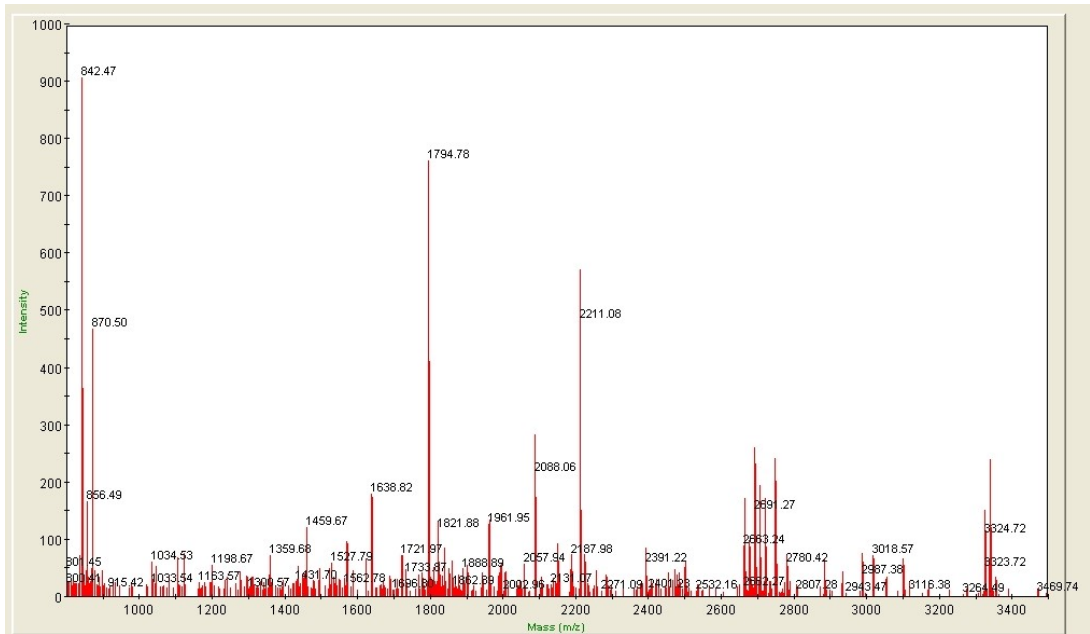


Fig.3-30a バンド T の MS スペクトル

Proteins Detected

N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Pr...
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	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spe
1	0.14	0.14	RRRRRg...	REVERSED PR...	0.14	27.6	MDQFLRNISEAALMR		missed R.H...	-0.1000	4793.79...	1	3	1.62

Protein Sequence Coverage - REVERSED PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine-protein kinase ATM [Oryctolagus cuniculus]

```

VWAQWGPFLRSLNKPDMHAQILLNVQGSVSLVTGEEVGRKLEQLRLVREAVKNLSQDILSNRKCQDDANPTSQFETEDPRQQLYLAKLPNNTWDFLPDYLVEVITLLTEQ
SNRMVENTKECCRRFVGVGTIGHGDVIDRTRFRFVTEPTPLIKGQEFVAVGLDIHVLEASQENILINQIHRDGLGLIYGVISSTAVSRITYALRKEFVWVAPDLFKMCFYRFVFPQF
HKCINMF TKYKEEFSKQIEIMKQCQVSSFDTPRYRKHAGGESDITLFEPIPITGTCWELVGRQSLPVVYKTCITLKRKRTETNRQLLMNCLQVQVQVADQRLDDRGRVLRQR
ERGDSSGVCDDIIRKPLNIGGALRFEARFSQITVNLNEYEGTPDKVIENTPVVVAELNKLKTIPODAP I IIGKRQTKWQTADLNALLIYADCLAEVSRVWQPKRSRITS I INNAEMRD
EDLQSSQKPAKNTIRSRRAAEPKTLFEDKNANALAL IIFLTHHPDMSVRSILNMLVEHFVGGMMKTHRAALQYMLPLFKYSP IEMGPGKMMGNVPEVPGSNELVLSCLRFVVM
DHEEGSLLCNIYNEVAKCLFRKRDEKLARLACEDLELERQKVITYRNTQIKHERLLGVEEKARKLLAQKNEFESSKMYNEIRQYQDTSFRALSFLAKMRGNLEDNNEGDCSEAV
EVAKELYTQMIIVTPELCTEALWNGCVRLCETHILKLRSDNERCSTDLKKIMQKLSLALSQEKAWFVQAEELQWESVHSVSNYQKIQVAREPLQTNKFTRALISFETLHKLT
LIDKFCERQSNVKEKMLIELIVTRLAMIPEQFNFDSDKLLQSHKQKVVYVESQDMVRSVLEGINELGIAQLRSLRPLYSVSELSGKLEEVKVRAYKLEFFTSFERD
RLSOLANYLSEHYSTGEIGKVVSTCHDQMNRAAQHLEOLEACCEVNEHDLGKLYVSLIHLGLNQLAQIIGAQRTPSCIATELDYTVLAKDWAAEHVYTRTLRTPOLMKGGG
CGYLSDPPEGISRYIELLGLQSLGTEHRSKESLSSITTNQSGEFTLSRKEQDLSKKDAYIEAYLLATFHAACSQAVKAVELVNFDLWFADDFVTGISPRKQRMYDVVALNTR
QSKKDVCCRRFHESDILNAPPTTSRSTOSNHRFCSTTFQGHASLNRSWENTDQLLIDHILYPLVTOCFDTRVCEHPKLLQLTESKIGGSDLLACTLTKIWDHMSQPIWLSST
DDLSELPEKDRPVFELFKKSRTRFPQLYLMPDTSMKVVEWFSHTCTALINLCKTAAASRVVCDVLTNNLYTLLITWCLEKDEFKFAKTYTSDKHQIAITSFIDIPGLE
GLCSGVAELVEREGTHNVATKSLHLLITVLKVMIGDKPNDQSAFRLDMMQDKKALQRGLDKLGERLPLADYISVSLFHNIEELLSFGRCYKIKQQTIRLDFKPVVHDPFPDL
LKITTYLNENDKNDIVLYRLDLVLRQVQEVQDHLVPLITGVIVHLNHELADRCHTVATQCVRSLLDCCLSFSRLSVDHFRSPRKNYHILTYIVDRLVFA@AGGLGSKI DKLLES
VFLHYIKLIRHRYVNTTEAAQEICIALIKQYSDPSKSLIELISKLTKHCNSIYAF TAKIVHSPFPHPNPAPDLDGFSLESDTSQSADSNAPHEL TMLLEVVIPLNSIFLHD I
QKGLNESKLMVDVTS AIERQAMGSDKADYAFYPLINVLKFPDVLVSKWDEIQONAKRVDFHSRIVLHPLILIKYCSRYFDVNMVNYLLIYFSSLRVYETNQCNLWELV
YDLHSAFDELNRYGFAESVVELVKKVLPHELGNKVKSCLAFLAQKCVPSCLYVAVIMMLLVSKRNYTEDLIEPNEASHSVRMEGQTKLCANDFATQQLKLP LAKWLRPCDG
QKMDQFLRNISEAALMRVQHDDALFQPFVNVVDFDKGHVNLIAWKSYPDAELLTKLCQVLA VRVSFTCKRERTLHWFAGIVTLFQGGQADRNEADLNQGLNVTVPVLVHNLVTK
CVDQDRRYSVCVNSLPHLEVIDEMPLPYEGRPLEKLLVYMLHVSXKTPDLISSDVLHLLKRRIDAARFSVTSQSTTVCMCLFKVMDLLLDHKSLYEELPNNMAGITNQEG
    
```

Fig.3-30b Serine-protein kinase ATM 結果詳細

### 3-4-6 エラスチン添加培養による同定タンパク質の遺伝子発現変化

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。

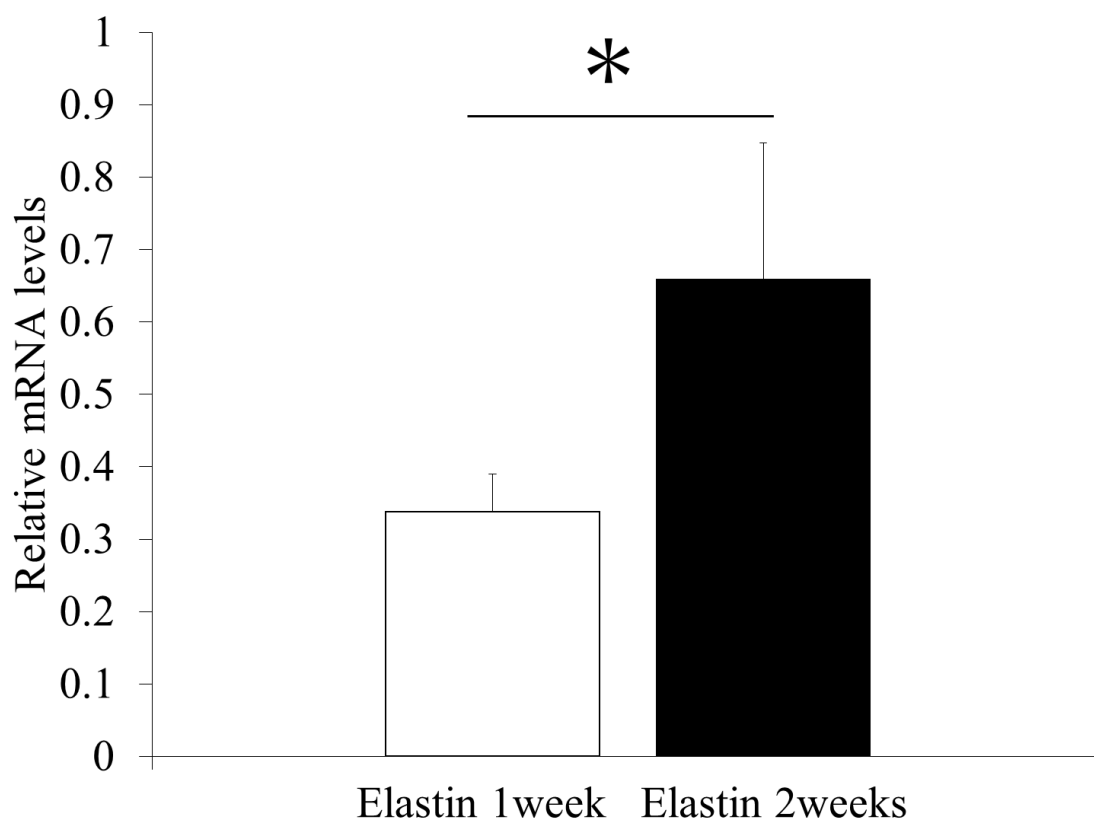


Fig.3-31 エラスチン A 添加による Galectin-3 の遺伝子発現変化  
(無添加培養を 1 とした相対発現量、n=3、\* :p<0.05)

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  $0.34 \pm 0.05$  倍を示し、添加 2 週間では  $0.66 \pm 0.19$  倍を示した (vs 無添加培養、Fig.3-31)。



## 4 考察

### Discussion

## 4. 考察

### 4-1 損傷靭帯に対するエラスチン投与の作用

*in vivo* におけるエラスチンの損傷靭帯への作用を調査するため、エラスチン A の注射による投与試験を行った。また、本研究では手術を行っていない正常群を比較対象に加えることで、組織修復の指標とした。

#### 4-1-1 エラスチン投与による組織損傷部の遺伝子・タンパク質発現への作用

まず、試験時に断裂させた組織損傷部について考察する。エラスチン投与 6 週後に採取した組織は、手術前と比較して損傷部に癒痕だと思われる組織が覆っていた (Fig.4-1、4-2)。靭帯組織について評価するため、癒痕組織を含む他の不要な組織を可能な限り取り除き、各種試験を行った。しかし癒痕組織と靭帯組織を完全に分離採取することは困難であるため、本研究で得られた結果は靭帯およびその周辺組織を含む結果である可能性が考えられる。また、エラスチン投与 12 週時点では癒痕組織はほとんど確認されなかった。

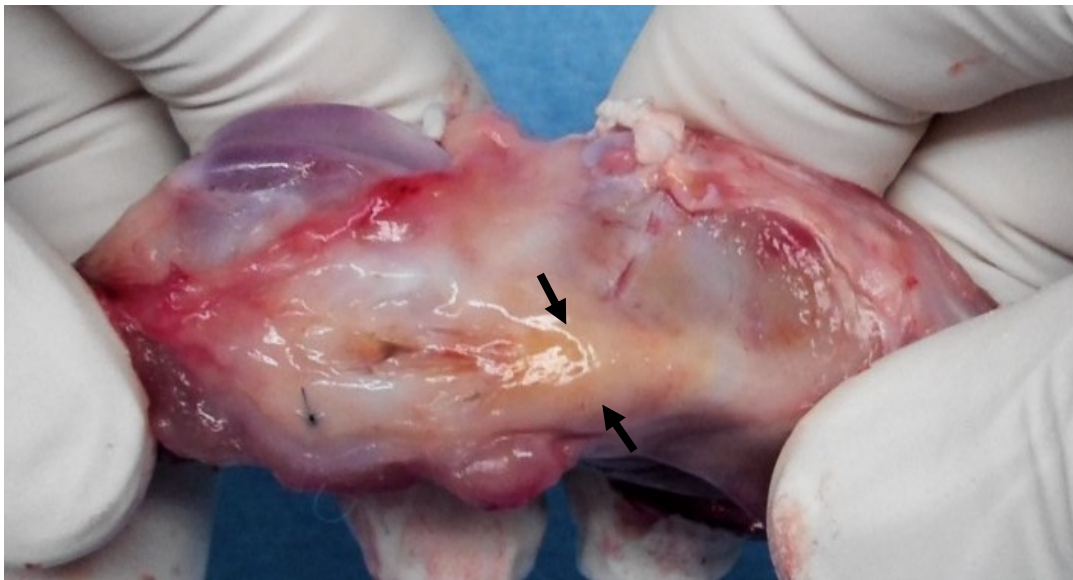


Fig.4-1 靭帯損傷部の様子 (投与 6 週間、矢印:靭帯損傷部近傍)

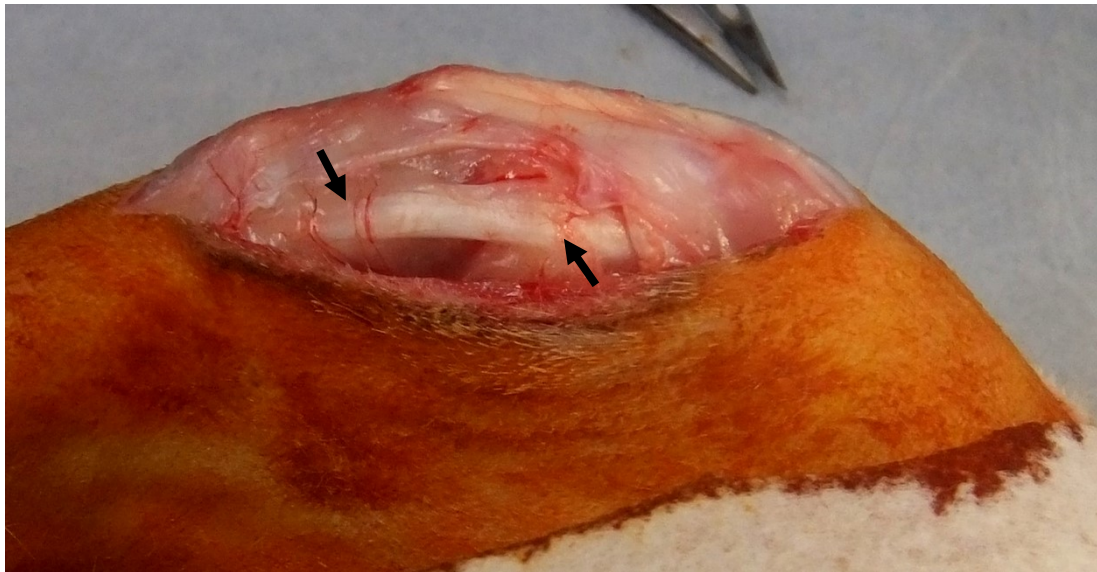


Fig.4-2 損傷前の MCL (矢印:MCL)

エラスチン投与 6 週および 12 週における各種評価試験結果を、組織の修復反応と合わせて考察する。靭帯が損傷を受けた場合、以下に示す 3 ステップで修復反応が進行するとされる<sup>40)</sup>。本研究では MCL を損傷させた動物モデルを用いて実験を行った。MCL は関節外靭帯であり、関節内靭帯と比較して血管が多く存在しているため、本研究においてもこの修復反応 (Fig.4-7,4-8,4-9) が進行したと考えられる。

#### 1) 初期反応 (Fig.4-3)

損傷部は出血し、血栓が形成される。その後、炎症が発生し、癒痕が形成される。

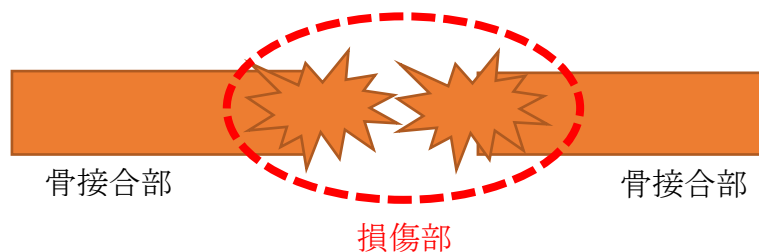


Fig.4-3 損傷靭帯の修復反応初期

## 2) 中期反応 (Fig.4-4)

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。

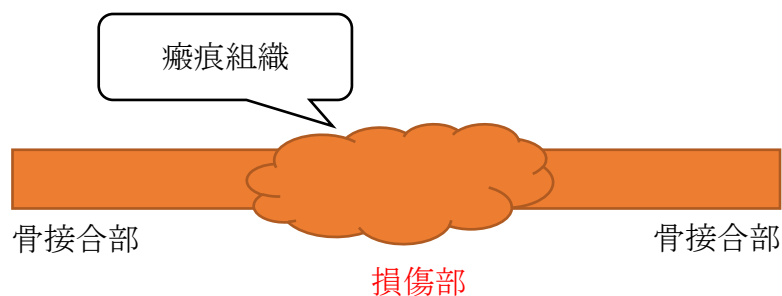


Fig.4-4 損傷靭帯の修復反応中期

## 3) 後期反応 (Fig.4-5)

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、癒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癒痕から靭帯様組織へと移り変わっていく。



Fig.4-5 損傷靭帯の修復反応後期

採取した組織の肉眼的所見より、エラスチン投与 6 週では癒痕組織が存在しているため、初期～中期の反応であると考えられ、投与 12 週では癒痕組織があまり観察されなかったことより、後期反応であると考えられる。

組織学的評価より、細胞密度は正常群で最も低く (Fig.3-11)、スコアも高い (Fig.3-12) ことから細胞の配向性も良いことがわかる。また、HE 染色画像 (Fig.3-10) より、靭帯組織特有の「クrimpパターン」と呼ばれる線維が波打った構造も確認できた。

一方、生理食塩水投与群では最も細胞が密であり、細胞配向性も低いため、炎症細胞が集まる修復の初期反応または細胞増殖が始まる中期反応であることが予想される。エラスチン投与群の結果は正常群と生理食塩水投与群の間に位置しているが、生理食塩水投与群との差は有意でないため、初期～中期反応の段階であると考えられる。

ここで、組織修復に関わる細胞について考える。靭帯組織中には靭帯細胞が存在しており、一般的に紡錘状の線維芽細胞と類似した形態である<sup>5)</sup> (Fig.4-6)。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。靭帯細胞は線維芽細胞と似た機能を持っており、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。

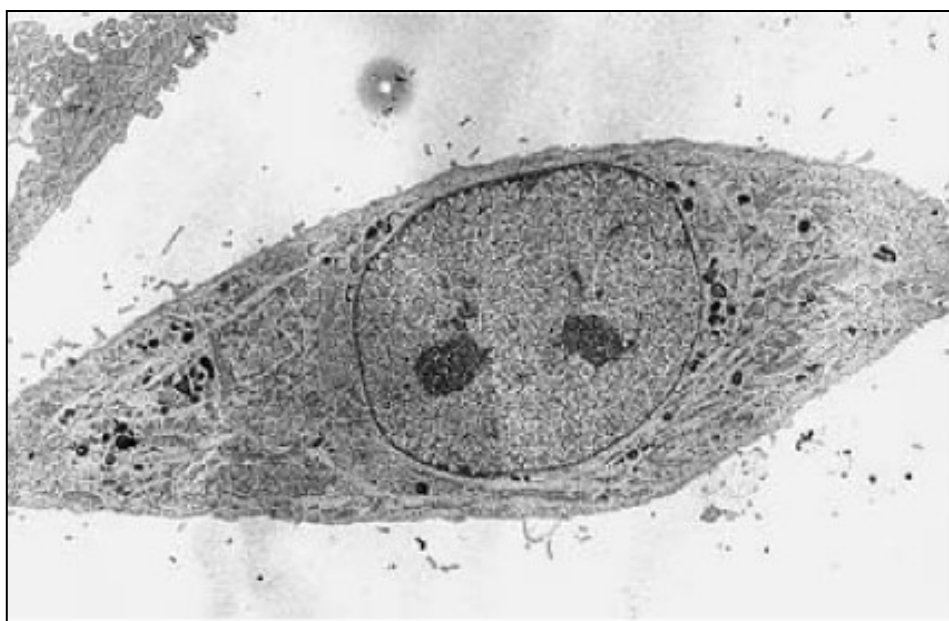


Fig.4-6 線維芽細胞<sup>5)</sup>

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<sup>4)</sup> (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<sup>41)</sup>

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 $\beta$ (TGF- $\beta$ )*

\*TGF- $\beta$ 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細胞の遊走因子となるため、本研究における損傷部の細胞密度増加は、組織リモデリング中に生じるコラーゲンの産生・分解による産物が、周辺の線維芽細胞や靭帯細胞等の細胞遊走を引き起こしたことも一因と考えられる。

次に投与 6 週モデルに着目する。本研究では、遺伝子発現およびタンパク質発現解析を行った。一般的に遺伝子発現とタンパク質発現は相関するものであるが、本研究では靭帯組織の修復反応およびエラスチン投与の薬理的効果を十分に評価するため、それぞれを調査する必要があると考えた。組織損傷部の細胞の遺伝子発現は、靭帯基質である I 型コラーゲン、エラスチンと組織の修復過程で産生される基質分解酵素である MMP-13 が、エラスチン投与によってそれぞれ有意に増加した (Fig.3-1)。III 型コラーゲンでは有意な差は得られなかったものの、他遺伝子と同様に増加傾向を示した。この結果は *in vitro* におけるウサギ靭帯細胞のエラスチン添加培養試験 (Fig.1-7) と一致しており、*in vivo* においても投与したエラスチンが組織中の靭帯細胞へ作用したと考えられる。

タンパク質発現に関して、おおよそ遺伝子発現の結果と一致していた。エラスチン投与群において、I 型コラーゲンの遺伝子発現が正常群を上回っている (2.0 倍、Table.3-1) にも関わらず、タンパク質発現が低い理由として、MMP-13 による分解が考えられる。本研究では MMP-13 のタンパク質発現に関しての評価を行っていないが、MMP-13 はコラーゲナーゼとして知られる分解酵素であり、エラスチン投与群では高い遺伝子発現 (10.3 倍、Table.3-1) を示したため、可能性は十分に考えられる。

基質発現と分解酵素発現の結果より、いずれについてもエラスチン投与群で増加していることから、エラスチンの投与は細胞の活発な基質産生と分解を促進し、修復反応を助ける(反応を早める)ことが考えられる。また、本研究では癒痕組織を多少含んでいる靭帯組織を用いて評価しているため、靭帯細胞以外の細胞種も存在している可能性があり、遺伝子およびタンパク質発現の結果は、例えば組織修復に関わる炎症細胞や周辺から遊走してきた線維芽細胞といった細胞の影響も含んでいるものと考えられる。

続いて投与 12 週モデルに着目する。遺伝子発現結果より、エラスチン投与によりエラスチンの発現が有意に減少する結果であった (Fig.3-3)。また、各基質遺伝子は正常群に比較していずれも低発現状態 (0.4 倍未満、Table.3-2) であり、MMP-13 は正常群と同程度の発現であった。

タンパク質発現に関して、それぞれ遺伝子発現と一致している結果であった。I 型コラーゲンはいずれの実験群においても同じような値であり、投与 6 週から 12 週にかけて実験群においては基質産生が進んだと推察される (Fig.3-4)。III 型コラーゲンについては、損傷組織の修復過程において初期に産生された後に I 型コラーゲンへ置き換わっていくことが知られている。今回、III 型コラーゲンの発現が正常靭帯よりも有意に高いことに関して、組織修復の過程で活発に産生され、投与 12 週時点でも I 型コラーゲンへ置き換わっていない部分が残っているためだと考えられる。エラスチンの発現は生理食塩水投与群より有意に低い結果を示した。エラスチン投与により正常靭帯の値へと近づいたことは、エラスチンの投与は細胞のエラスチン産生を促進するだけでなく、同時に分解酵素である MMPs の産生も促すことを示唆している。実際に、MMP-13 に関しては投与 6 週時点で遺伝子発現が増加した結果が示されている。しかし、エラスチンの分解に関与するのは MMP-2 および MMP-9 であり、本研究ではターゲットとしていなかったため、実際にどの程度産生されていたか知ることはできないが、創傷治癒過程において MMP-2 または MMP-9 が発現されることはすでに報告がある<sup>42)</sup>。これらより、12 週時点での組織損傷部では細胞の ECM 産生が落ち着き、分解酵素による組織のリモデリングが起こっている後期反応の最中であることが考えられる。

#### 4-1-2 エラスチン投与による骨接合部の遺伝子・タンパク質発現への作用

本研究では、生理食塩水またはエラスチン溶液を注射によって膝関節内側に投与したため、投与液は靭帯損傷部だけでなく、骨との接合部にも作用していることが考えられる。

まず投与 6 週間モデルに着目する。ここでは、骨基質である I 型コラーゲンと骨分化マーカーである ALP、オステオポンチンをターゲットとした。MMP-13 については、損傷部における修復反応が骨接合部に影響を及ぼすか判断するためターゲットとした。結果より、骨接合部の細胞はエラスチン投与により I 型コラーゲンが有意に発現増加し、ALP も増加傾向を示した (Fig.3-5)。MMP-13 とオステオポンチンについては大きな変化が見られなかった。今回、I 型コラーゲンと ALP の発現が増加したことから、投与したエラスチンが細胞の骨分化を誘導することが示唆され、先行研究におけるエラスチン足場上の靭帯細胞は ALP 発現が増加するという結果と一致した (Fig.1-8)。

タンパク質について、いずれのタンパク質においても有意ではないがエラスチン投与による増加傾向が観察され、遺伝子発現結果と同じ傾向を示した (Fig.3-6)。正常群とエラスチン投与群を比較すると、エラスチン投与群において各タンパク質発現が高い傾向となっており、骨分化マーカーの ALP、オステオポンチンの発現上昇は、組織中の細胞の骨芽細胞への分化を表していると考えられるため、エラスチンが骨接合部の組織をより骨化させたと推測される。

投与 12 週モデルにおいて、遺伝子発現に関しては実験群による発現の差は見られなかったが、タンパク質については I 型コラーゲンの有意な発現増加が見られた (Fig.3-7,3-8)。12 週間の継続したエラスチン投与は、骨接合部の基質を増加させ、靭帯と骨の接合をより強固にすることが示唆された。

以上の結果より、損傷靭帯に対するエラスチンの注射投与は、組織損傷部だけでなく骨接合部にも作用していることが明らかとなった。また、12 週間の継続したエラスチン投与は、骨接合部に存在している細胞の骨芽細胞への分化促進および I 型コラーゲンの産生促進による、靭帯の骨接合強化を誘導することが示唆された。



### 4-1-3 エラスチン投与による組織力学特性への作用

ここまでは靭帯組織の形態や構造、構成成分などについて述べたが、これらの要素と靭帯の力学特性がどのように関係しているか考察する。

結果より、エラスチンの投与によって正常靭帯ほどではないが、生理食塩水投与群に比べて弾性率が有意に高くなった (Fig.3-9a)。また、骨接合強度に関しては特に投与 12 週時点で最も高い値を示し、正常靭帯よりも高い値となった (Fig.3-9b)。組織の力学特性に関わる要因として、靭帯組織成分であるコラーゲンとエラスチンが考えられる。

まずコラーゲンについて考える。靭帯組織においてコラーゲンは組織に強度、張力を与えており、その発現量はエラスチンの投与によって高くなることは先に述べた (4-1-1, 4-1-2)。そのため、弾性率および骨接合強度は組織に含まれるコラーゲン量が影響していると考えられる。

#### 1) 生理食塩水投与群とエラスチン投与群について

タンパク質発現結果より、生理食塩水投与群ではコラーゲン量が少ないため、弾性率、骨接合強度ともに低値となったことが考えられる (Fig.4-7)。

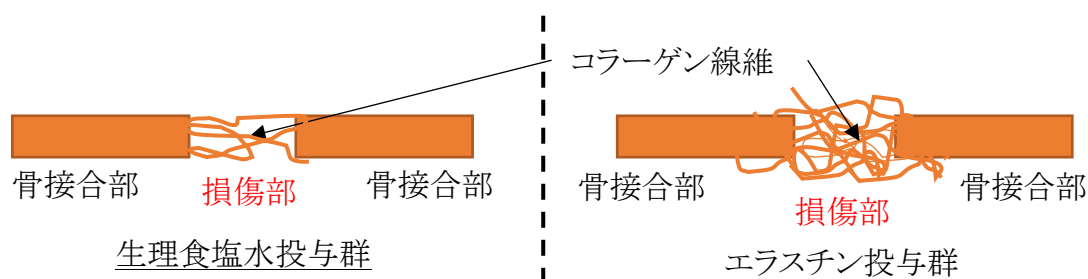


Fig.4-7 損傷部のコラーゲン線維の様子

#### 2) エラスチン投与群と正常靭帯について

投与 12 週時点における損傷部のコラーゲン量に差は見られなかったにもかかわらず、弾性率には差が見られた。2 群間の違いは次の 2 点が考えられる。

- ① 損傷部分の組織構造 (線維の配向性)
- ② ① 以外の要因

①{損傷部分の組織構造(線維の配向性)}について、エラスチン投与群では弾性率が正常群の半分ほどであるため、組織修復が12週時点においても完全ではないと考えられる。損傷部組織の細胞配向を表すスコアリング評価より、エラスチン投与群のスコアは正常靭帯の半分未満であった(Fig.3-12)。細胞の配向性は足場である線維の配向性に影響されるため、修復された部分の線維配向も低いと言える。靭帯組織はその役割上、一軸方向に伸展(もしくは「ねじれ」)負荷を受ける。正常靭帯ではほとんど全ての線維が同一方向に配向しているため、力学負荷を受けた際に多くの線維が同時に負荷に抵抗する。エラスチン投与群では、負荷方向と配向方向が一致していない(=配向性が低い)線維が多く存在し、力学負荷を受けた際に正常靭帯ほど抵抗できないと考えられる。

適切に線維を配向させるには、修復過程において、組織が適度な力学的負荷を受ける必要がある<sup>43)</sup>。本研究で用いた全ての動物モデルは、手術後に膝関節の固定は行わず、ケージ内を自由に動ける環境下で試験しており、修復靭帯組織は正常群と同様の力学的負荷を受けていると考えられる。同じ力学的負荷を受けているにも関わらず、線維配向性に違いが見られたため、配向性に影響する因子は他にも存在すると言える。その一つとして腫脹や浮腫が挙げられる。炎症が長期化すると損傷部に形成された血管が拡張され、滲出液(血漿などを含む)が線維中に蓄積される。このような浮腫によってコラーゲン線維の配列が分散される<sup>43)</sup>。

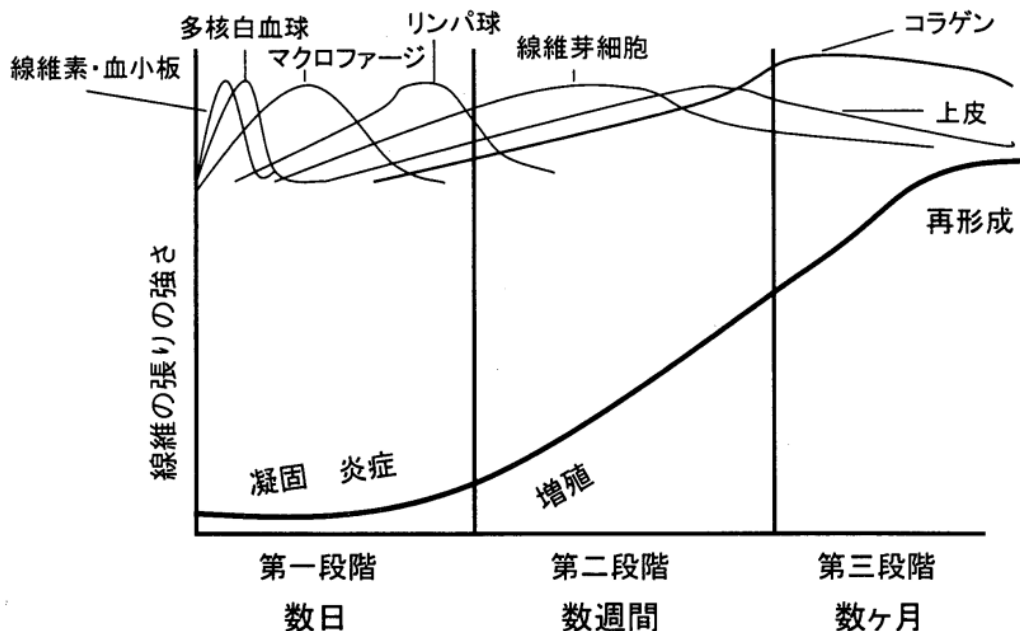


図5 治癒過程における凝固作用，食作用，そして線維芽細胞の増殖とコラーゲン線維の再形成に対する張力の向上の経緯を示した模式図 (Leadbetter, 1988 p. 539 より引用)

Fig.4-8 組織修復時の細胞増殖と線維の張力<sup>43)</sup>

線維配向性と細胞密度について考えると、4-1-1 でも述べたが、エラスチン投与群では正常群と生理食塩水投与群の間であった。修復反応時の細胞増殖とコラーゲン線維の張力を見ると、細胞増殖が落ち着いた中期～後期反応にかけて線維の張力が向上することが分かる(Fig.4-8)。このことからエラスチン投与群は中期反応の前半であり、生理食塩水投与群では初期反応の終盤であると考えられる。

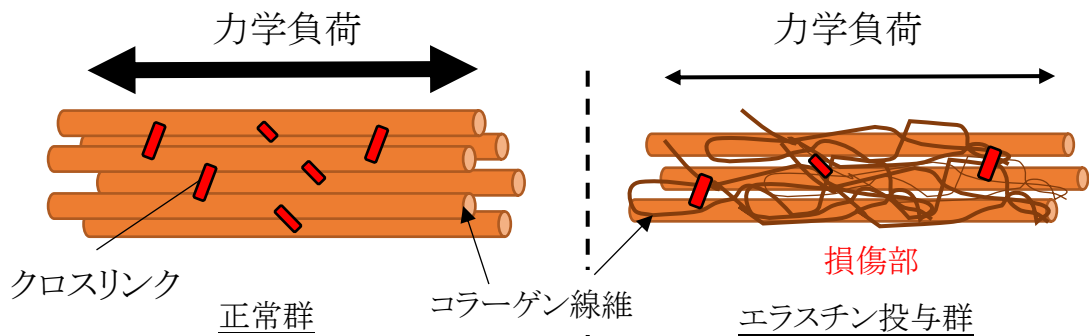


Fig.4-9 靱帯組織のコラーゲン線維の配向

②(①以外の要因)について、コラーゲン線維間のクロスリンクが挙げられる。クロスリンクはコラーゲンに含まれるヒドロキシリシンによって分子内または分子間に形成される架橋である。修復反応において、規則正しいクロスリンクが徐々に増加していくが、この時に何らかの不具合により不規則なクロスリンクが形成されると、その後のコラーゲン線維合成に影響を与えると言われる<sup>43)</sup>。正常靱帯ではクロスリンクが十分であり、力学負荷を各線維に分散させることができるが、エラスチン投与群ではまだ十分でないため、高い力学的特性を持つことができないと考えられる(Fig.4-9)。

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るタンパク質のため、力学特性に関与していると考えられる。損傷部組織の弾性線維の比率測定結果より、エラスチン投与群における弾性線維の比率は正常靱帯よりも若干低い値であった(Fig.3-13)ため、本研究においては①②の2つの要因により、組織の力学強度に差が生じたと考えられる。

以上より、エラスチン投与は特に6週時点において炎症反応後の組織周辺に存在する細胞の基質産生能を向上させ、速やかにリモデリング段階へ誘導することが示されたため、損傷靱帯の早期治療に有効であることが示唆された。12週間のエラスチン投与は基質産生(遺伝子発現)に対して効果が小さく、治療の観点においてはエラスチンの作用は見られないが、靱帯―骨接合強度が向上しているため、靱帯組織の強化の観点からは効果があると言える。

## 4-2 エラスチンによる細胞の骨分化誘導

エラスチンは靭帯細胞に対し、骨分化を誘導することが先行研究よりすでに示されてきた(1-6-2)。そして、靭帯組織に対してエラスチンを投与することで、骨接合部の骨基質産生を促すことは4-1-2で述べた。人工靭帯を開発する上で、人工靭帯—骨接合部の強度は非常に重要である。靭帯基質であり、細胞の骨分化を誘導するエラスチンは靭帯—骨接合部の材料として期待できる。実験項目3-2では、エラスチンを表面にコーティングしたPDS人工靭帯を生体内への移植することで実用可能であるかの評価を行った。

結果、人工靭帯へのエラスチンコーティングは骨からの引き抜き荷重を増加させ、エラスチンが人工靭帯と骨の接合強化効果的であることが示唆された(Fig.3-16)。引き抜き試験後の組織の肉眼的観察より、特にエラスチンコーティング群の人工靭帯挿入部付近には、骨様の硬組織が見られ、若干ではあるが骨孔サイズが小さくなった様子が観察された。

safranin-O染色による組織学的評価では、コーティングの有無によらず、人工靭帯挿入部に軟骨基質の存在が確認された(Fig.3-18)。これは骨組織に骨孔をあけたことにより、骨の修復反応である内軟骨性骨化が進行したためと考えられる。内軟骨性骨化は間葉系組織が損傷部に補填された後、線維芽細胞、軟骨芽細胞、骨芽細胞などの細胞が誘導される<sup>41)</sup>。誘導された軟骨芽細胞や軟骨細胞が産生した軟骨基質がsafranin-O染色により今回観察されたと考えられる。

接合強度の上昇に関しては、エラスチン投与試験と同様、細胞の骨分化が誘導され、骨基質の産生が促進されたためだと考えられる。存在する細胞は内軟骨性骨化により集まった線維芽細胞などが考えられる。エラスチンが細胞の骨分化に関与するという例は幾つか報告されており、Leiらは平滑筋細胞から骨芽細胞への、Huらは骨髄由来幹細胞(MSC)から骨芽細胞への分化にエラスチンが関わると報告している<sup>44)45)</sup>。例えば、シルクエラスチン50:50(SE50)足場上のMSCは、カルシウム産生量がシルク(SE100)足場上のMSCと比較して有意に高くなり(Fig.4-10)、ALP活性も上昇する。しかし、現在までにエラスチンによる細胞の骨分化誘導メカニズムは明確にされていないため、エラスチン認識メカニズムと合わせて後に考察する。

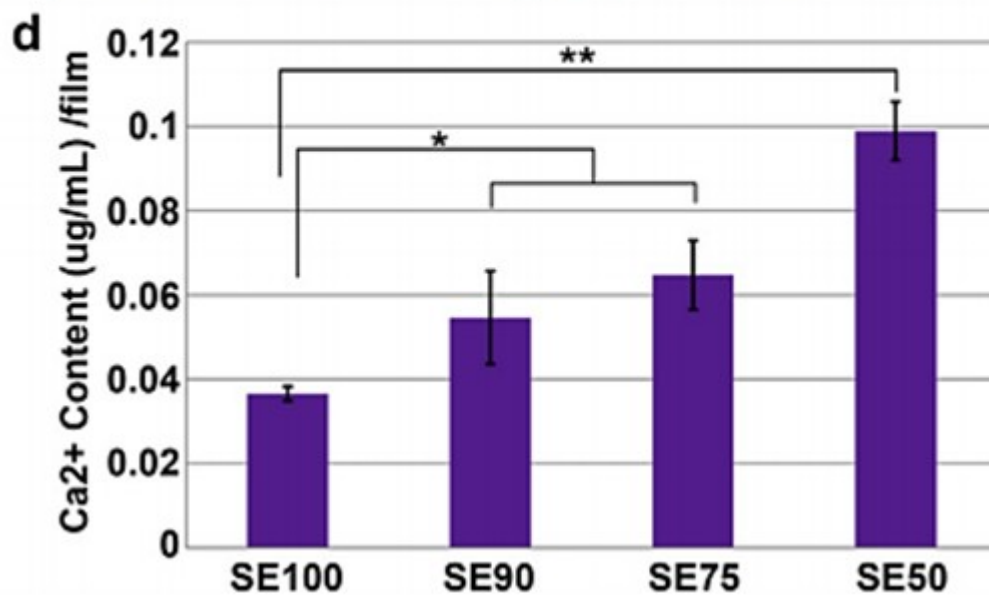
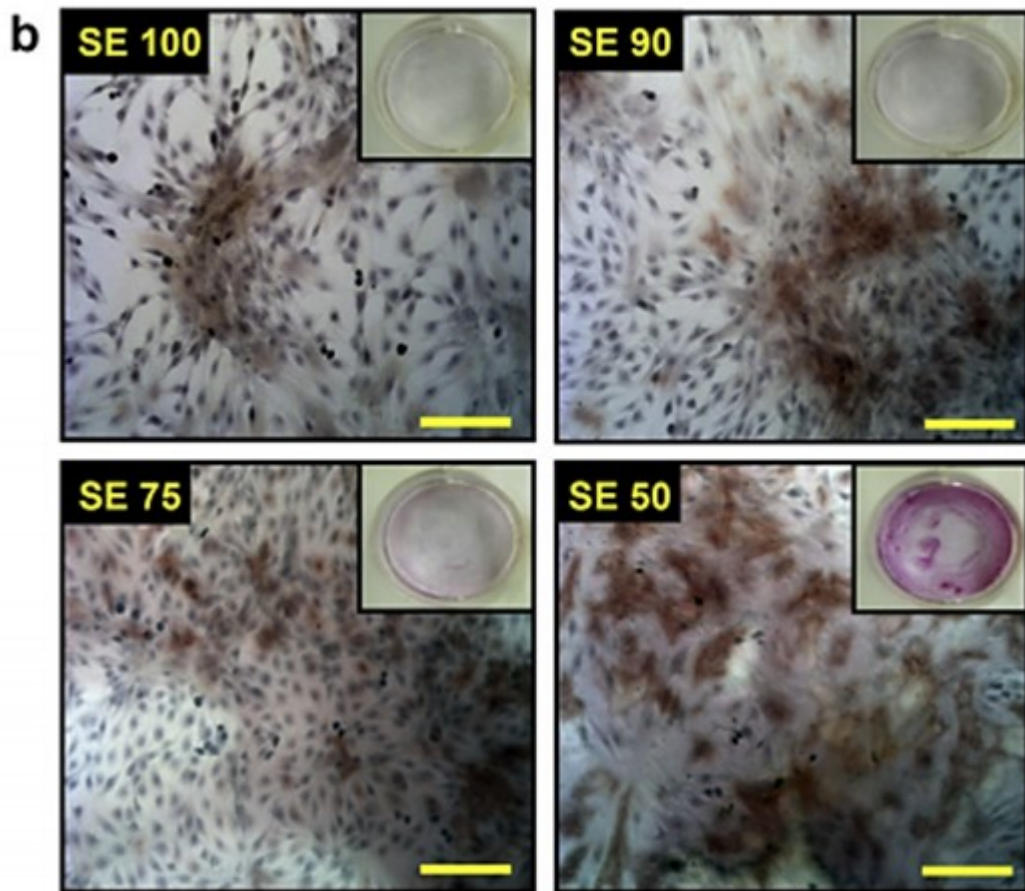


Fig.4-10 シルク-エラスチン足場上細胞のカルシウム産生量<sup>45)</sup>  
 (SE100;シルク 100:エラスチン 0、SE50;シルク 50:エラスチン 50)

### 4-3 組織工学的人工靭帯の評価

#### 4-3-1 本研究で用いた足場材料について

本研究で使用した ECM ファイバーに関しては、エラスチンファイバー上で靭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 (Fig.1-8)。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 (Fig.4-11)、培養細胞の配向を誘導できることもわかっている (Fig.4-12)。実際の生体内でも靭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と考えられる<sup>5)</sup>。

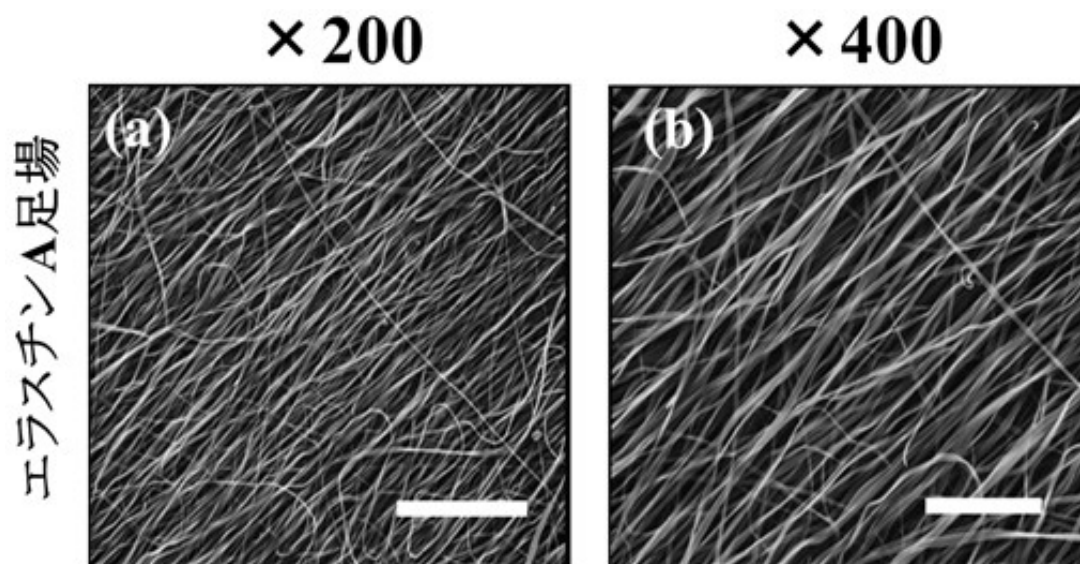


Fig.4-11 エラスチンファイバーの SEM 写真 (Scale bar: a=90um、b=45um)<sup>46)</sup>

また、足場自体の強度もコラーゲンの方が強く、人工靭帯の作製には強度を保つために必要であると言える (Fig.4-13)。

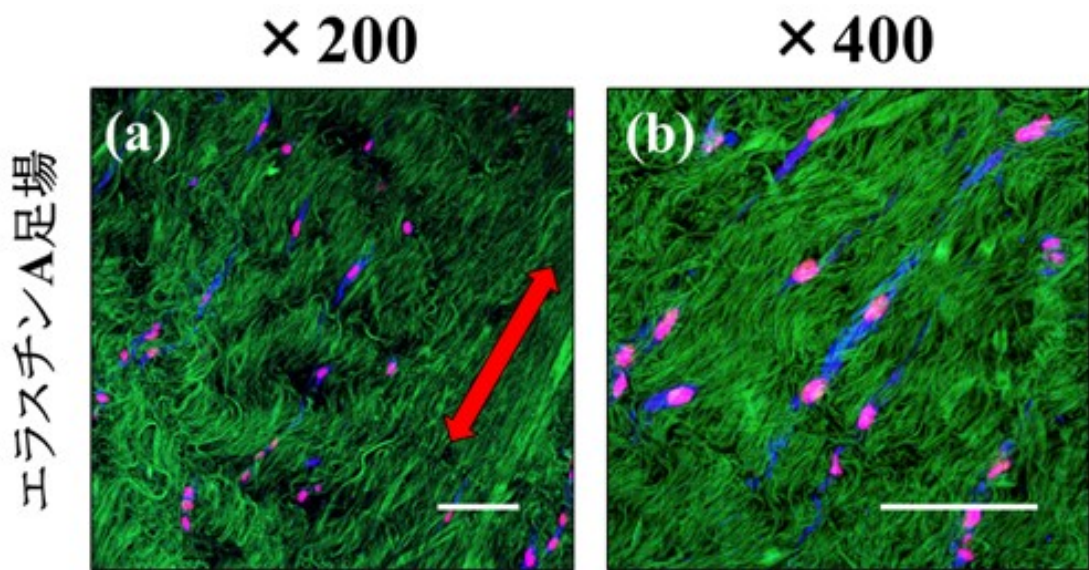


Fig.4-12 エラスチンファイバー上の歯周靱帯細胞  
 (赤色:細胞核、青色: $\alpha$ -smooth muscle actin、緑色:ECM ファイバー足場の自己蛍光、  
 図中矢印:線維の配向方向、Scale bar: 100um)<sup>46)</sup>

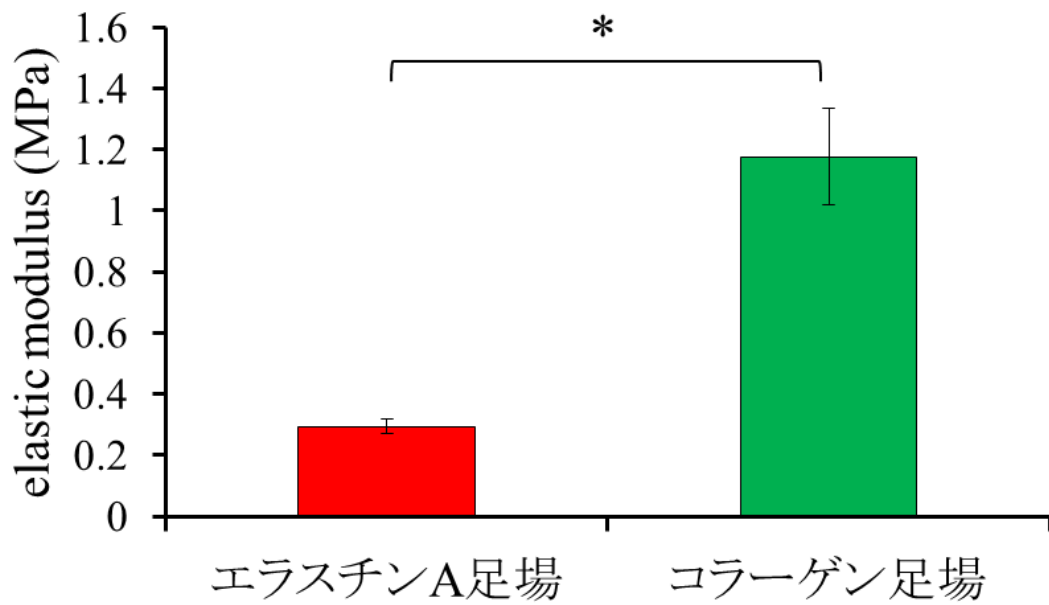


Fig.4-13 ECM ファイバーの弾性率 (\* :p<0.05)<sup>46)</sup>

組織工学的人工靭帯に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。そのため、人工靭帯中央部には靭帯マーカの発現を促すコラーゲン足場を、そして骨挿入部に細胞の骨分化を促すエラスチン足場を用いることで、人工靭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。本研究では人工靭帯の初期強度を担保するため、また、移植後に生体由来材料のみを残すため、生分解性材料の PDS を人工靭帯の中軸に使用した。

#### 4-3-2 組織工学的人工靭帯の評価

本研究で開発した組織工学的人工靭帯の特徴として、固定具を用いない独自の骨挿入構造を用いたことが挙げられる。現在の靭帯再建の課題として、靭帯—軟骨—骨の段階構造の再現が困難であることが知られており、多くの研究者が取り組んでいるが、未だ画期的な方法は見つかっていない。今回、固定具を用いなかった理由は、段階構造再現のために固定具による人工靭帯へのダメージを避けるためである。先にも述べたが、一般的な固定方法ではスクリューやエンドボタン、ステープルといった固定具を使用するが、靭帯および骨構造の破壊や骨孔サイズの増加といった問題が残る<sup>14-17)</sup>。

そこで、本研究では生分解性合成ポリマーの PDS 縫合糸を用いることで、材料自体を成型することによりこの問題を解決した。具体的には PDS の骨挿入部を加熱により、移植時の骨孔サイズより若干直径を大きくした球状にすることで、移植時に圧着する構造を開発した。移植 6 週間間に人工靭帯が引き抜けた例はなかった。

結果について考察する。safranin-O 染色による組織学的評価では、細胞の有無によらず、人工靭帯挿入部に軟骨基質の存在が確認された。この理由は 4-2 と同様の理由であることが考えられる。

PDS の特性として、本研究で使用した 1 PDS および 5-0 PDS は生体に移植した後 6 週においてそれぞれ残留抗張力 (Table.4-2、製品説明書より抜粋) が 60%、35%とされている。しかし、移植 6 週後の肉眼的観察より、人工靭帯に用いた PDS は分解が進んでおり (Fig.4-14)、特に細胞あり人工靭帯では PDS にほとんど強度が残っておらず、サンプル採取時に破断する例もあったが、靭帯組織の強度測定に影響はなかった。これは、PDS 周辺に移植時点ですでに細胞が存在しているため、移植後の分解が加速されたためと考えられる。これより、今回得られた靭帯の力学試験結果は PDS に依存しない再建靭帯組織の強度を表していることがわかった。

Table.4-2 PDS の残留抗張力 (PDS 製品説明書より抜粋)



埋没後日数	残留抗張力(5-0号)	残留抗張力(1号)
14日	60%	80%
28日	40%	70%
42日	35%	60%

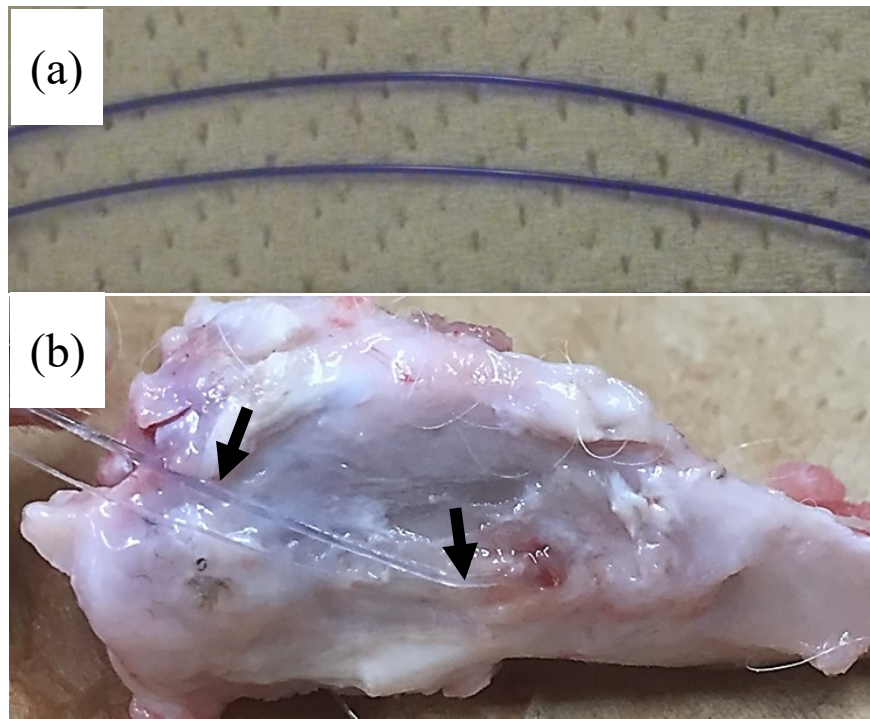


Fig.4-14 本研究で用いたPDS(a)、移植6週後のPDSの様子(b)  
(矢印:PDS)

力学試験結果より、細胞あり人工靭帯において、弾性率および破断荷重が正常靭帯に近い値を示したことから、あらかじめ細胞を複合させておくことで、移植後すぐに基質産生や組織リモデリングに働き、細胞遊走などに必要となる時間が短縮された結果であると考えられる。

組織学的評価において差が見られなかったものの、力学的強度に差が見られたことに関して、人工靭帯にあらかじめ細胞を複合させることは特に人工靭帯の組織化に有効であることを示唆している。

また、本研究では靭帯実質部の遺伝子やタンパク質、構造そして、挿入部の骨基質に関して評価を行っていないため、これらを調べることで、細胞の有無による違いがより明確に判断できたのではないかと考えられる。

## 4-4 細胞によるエラスチンの認識

### 4-4-1 本研究で用いたエラスチンについて

本研究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.4-3)。

Table.4-3 分画エラスチンの性質

	数平均分子量 (kDa)	デスモシン含有量 (mol%)
<b>Elastin A</b>	<b>25.2</b>	<b>2.87</b>
Elastin B	21.4	
Elastin C	18.7	2.53
Elastin D	10.3	
Elastin E	10.1	0.94

\*凝集温度により分画した

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 の投与により生理食塩水投与群と比較して遺伝子やタンパク質の発現が上昇し、弾性率にも回復が見られた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る。

また、4-1-2 と 4-2 でも述べたが、エラスチンを用いることにより組織の骨化が誘導されているため、エラスチン A に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 (Fig.4-15)。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が、エラスチン結合能を持つタンパク質が関与しているのは確かである。本研究では Elastin Binding Protein (EBP) がウサギ靭帯細胞中に存在していることが示された (Fig.3-19)。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タンパク質 (Table.3-5) の中から、同定されたペプチド配列数 (Peptides 95%) および配列包括度 (%cov) が高い値を示した、Galectin-3、Cyclophilin B、CAP18 に関して考察する。

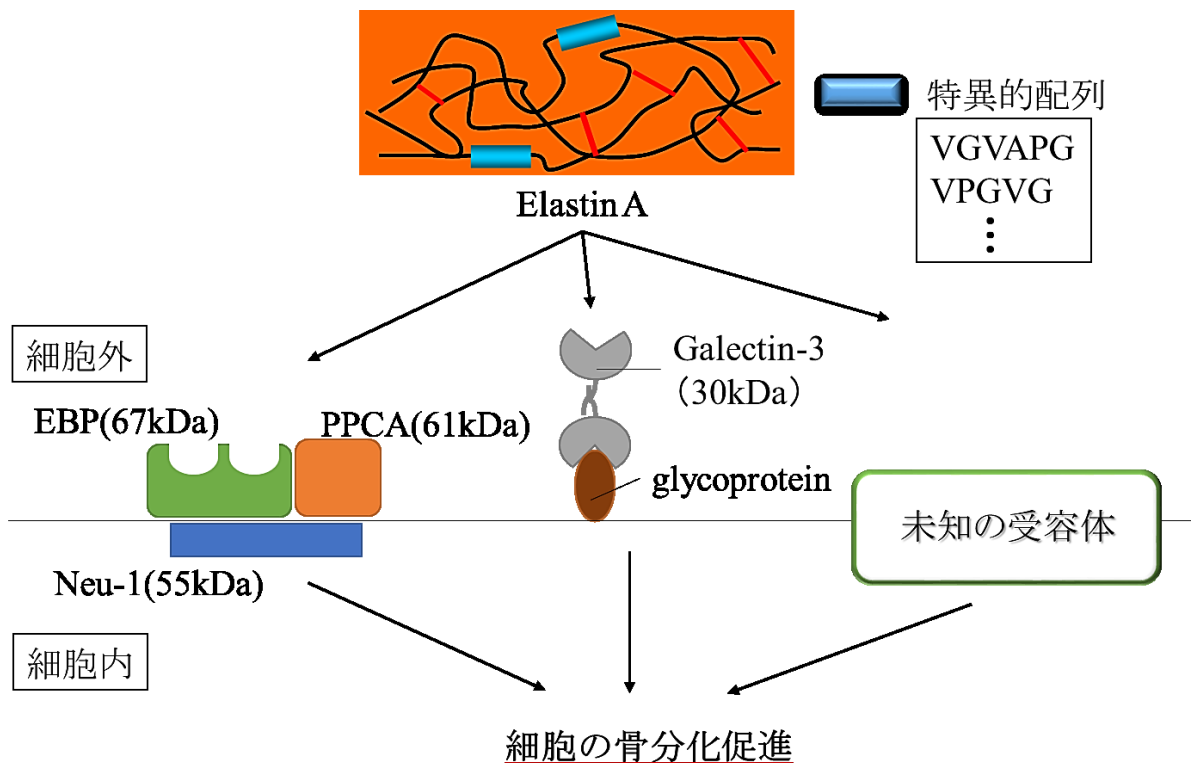


Fig.4-15 エラスチンの骨分化への影響

#### 4-4-2 Galectin-3 を介したエラスチン認識

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.4-16)。

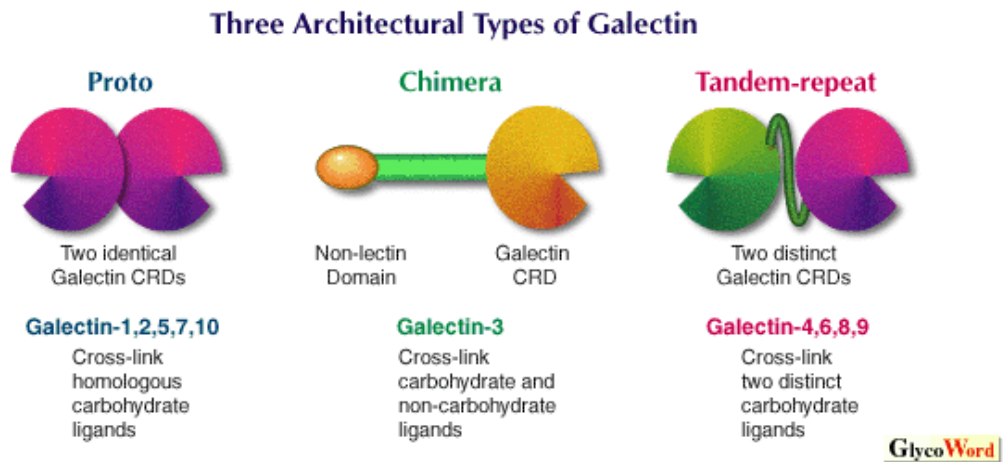


Fig.4-16 Galectin のサブタイプ <sup>47)</sup>

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 <sup>26)</sup>。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。

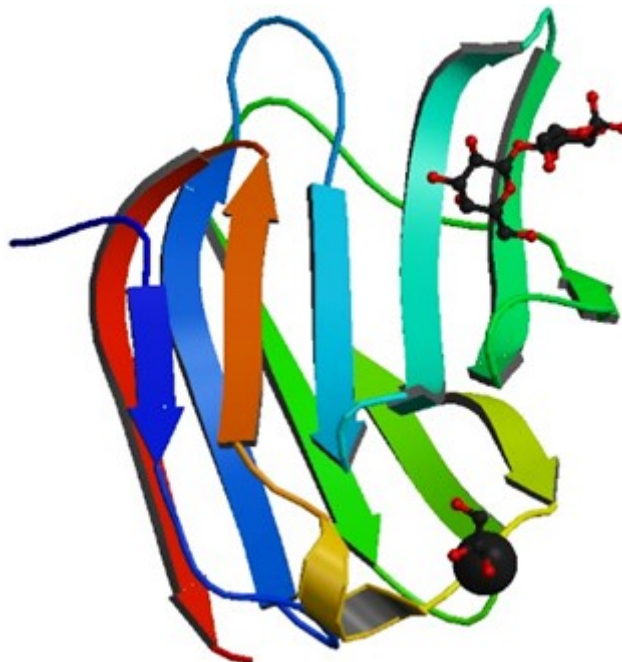


Fig.4-17 Galectin-3 の糖鎖認識部位 <sup>48) 49)</sup>

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。遺伝子発現解析の結果、エラスチン添加 1 週間において Galectin-3 は発現の減少を示した(vs 無添加、Fig.3-31)。エラスチン添加により Galectin-3 の発現量に変化が見られたため、Galectin-3 とエラスチンに関与があることが示唆された。

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.4-18)<sup>50)</sup>。

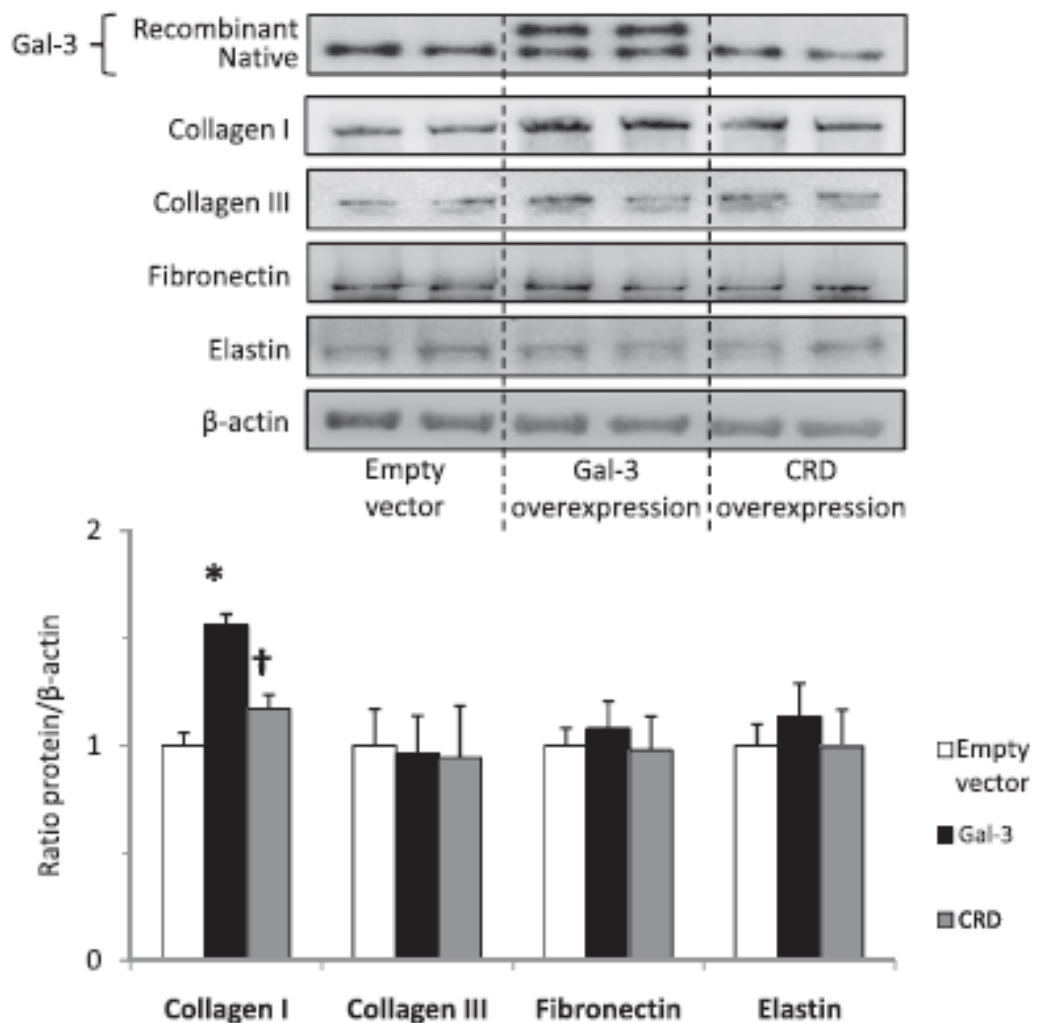


Fig.4-18 Galectin-3 の過剰発現による ECM の発現変化<sup>50)</sup>

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<sup>51) 52)</sup>。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<sup>53)</sup> およびメラノーマ細胞の遊走促進<sup>26)</sup> 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 の遺伝子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。

Galectin-3 が骨形成に関与するとの報告もある (Fig.4-19)<sup>54)</sup>。軟骨芽細胞および骨芽細胞において Galectin-3 の発現が確認されており<sup>55) 56)</sup>、さらに骨分化に関わる重要な転写因子である Runx2 との関係も示唆されている<sup>57)</sup>。また、間葉系幹細胞において Galectin-3 を発現させることにより ALP および Runx2 の発現が促進するという報告もある<sup>58)</sup>。

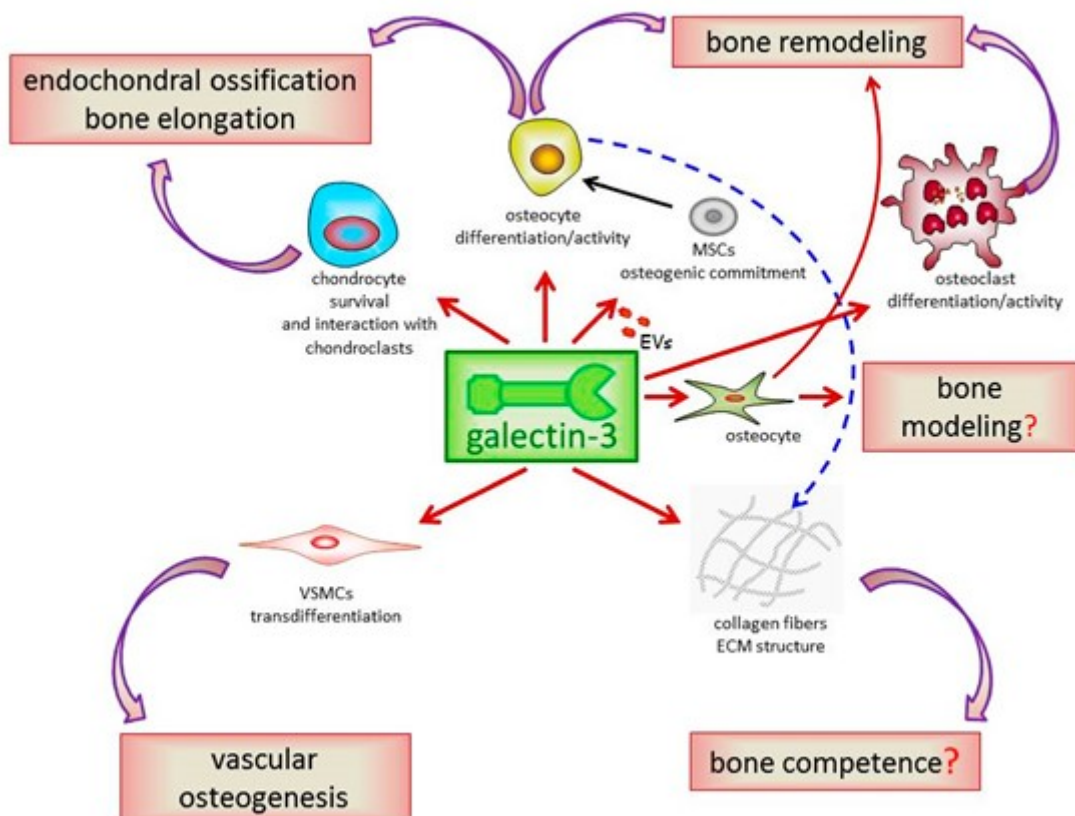


Fig.4-19 骨および血管における Galectin-3 の骨形成活性<sup>54)</sup>

#### 4-4-3 Cyclophilin B を介したエラスチン認識

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<sup>59) 60) 61)</sup>。

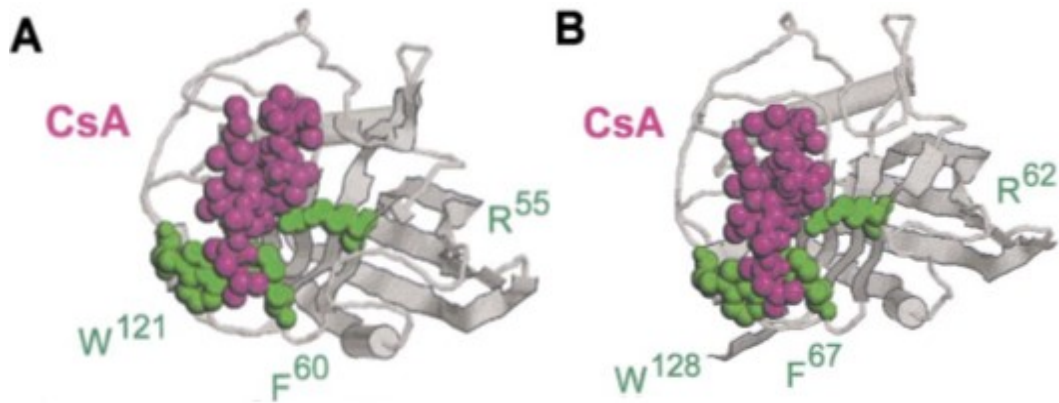


Fig.4-20 CyPA の三次元構造(A)、CyPB の三次元構造(B)<sup>60)</sup>

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 までが確認されており、このうち 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<sup>62) 63)</sup>。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。

これまでも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る<sup>64)</sup>。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を進める必要がある。

#### 4-4-4 CAP18 を介したエラスチン認識

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  $\alpha$  ヘリックス構造をとり(Fig.4-21A)、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.4-21B)。

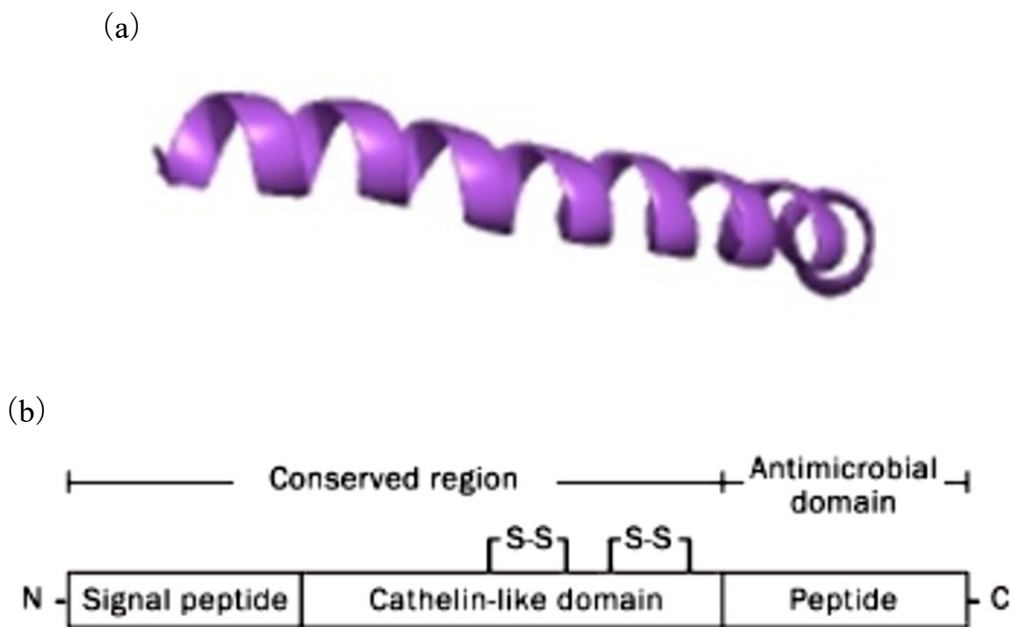


Fig.4-21 (a)CAP18 の三次元構造<sup>65)66)</sup> および  
(b)カテリシジンファミリーの模式図<sup>67)</sup>



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<sup>68)</sup>、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<sup>69)</sup>。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。

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ある。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ず、エラスチンとの結合様式も不明である。

以上、Galectin-3、Cyclophilin B、CAP18 に関して考察した。本研究におけるエラスチン認識のメカニズムとしては、エラスチン結合タンパク質単離の際に比較的明瞭なバンドとして確認された (Fig.3-22b) Galectin-3、Cyclophilin B であると考えている。Galectin-3 に関しては、エラスチンレセプターとして報告されていること、コラーゲンの産生および、細胞の骨分化に関わるという点において最も可能性が高いと考えている。しかし、本研究結果よりエラスチン添加培養により細胞の Galectin-3 遺伝子の発現が減少傾向だったため (Fig.3-30)、今後は Galectin-3 のタンパク質発現量を調査する等のさらなる研究が必要である。Cyclophilin B に関しては、同じスーパーファミリーに属している FKBP10 (FKBP65) がエラスチンとの相互作用を報告されているが、今後 Cyclophilin B 分子内のエラスチン認識領域の特定が必要である。

#### 4-5 エラスチンと靭帯組織

本研究で得られた全ての結果を総合し、考察する。

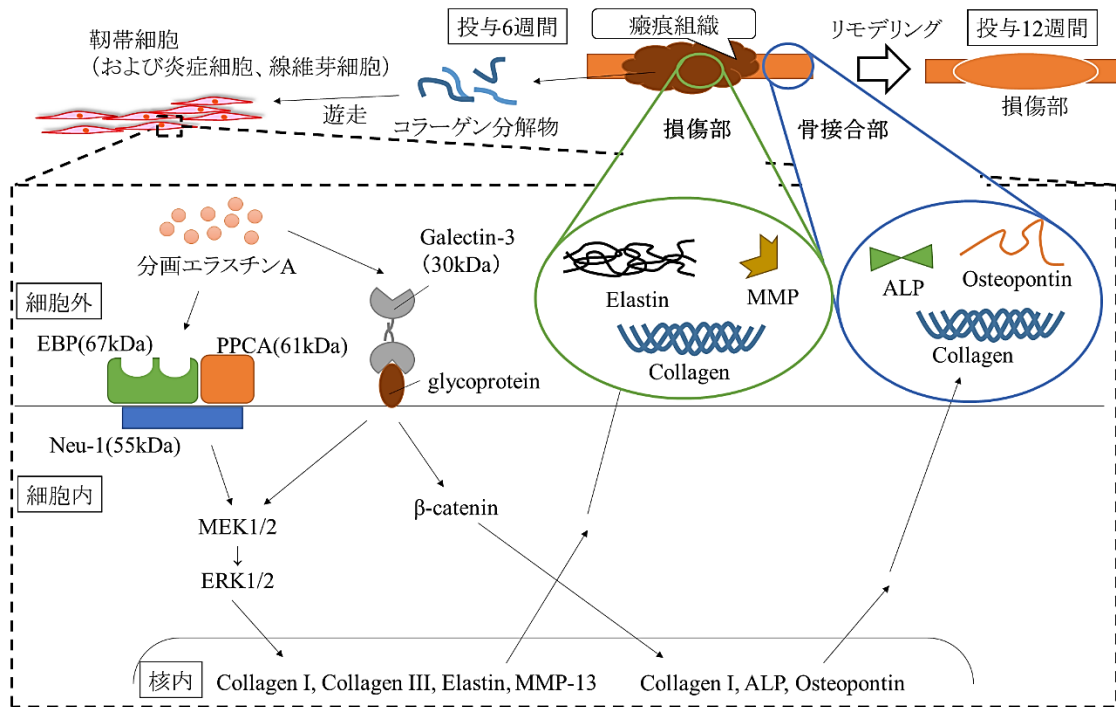


Fig.4-22 エラスチンの認識および靭帯組織修復

まず、靭帯細胞によるエラスチンの認識メカニズムに関して、Western blotting によって同定された EBP および TOF-MS により同定された Galectin-3 の 2 つがエラスチンレセプターとして機能していると考えられる (Fig.4-22)。シグナル経路としては EBP および Galectin-3 のどちらも ERK 経路を通ることが報告されている<sup>70)71)</sup>。この経路により靭帯基質や MMP-13 の産生が促されたと考えられる。また、骨関連のマーカーに関しては、4-4-2 でも述べたが、Galectin-3 の関与が考えられる。Galectin-3 によって  $\beta$ -catenin 経路を経由して、細胞の mineralization が制御されているという報告もある<sup>72)</sup>。

エラスチン投与により特に 6 週間は活発にこの経路により反応が進行していくと考えられる。この過程においてリモデリングで生じたコラーゲンペプチドにより周辺の線維芽細胞が遊走し、投与されたエラスチンでさらに基質産生が促進される。また、エラスチン添加培養試験の結果(実験項目 3-4-6)より、エラスチン添加によって靭帯細胞の Galectin-3 遺伝子発現が減少した。

エラスチン投与 12 週において、細胞のエラスチンによる効果が小さい要因として、エラスチンレセプターとして機能していた **Galectin-3** の減少により、刺激が細胞内へと伝達される経路が減ったためと考えられるが、エラスチンによって **Galectin-3** の発現が減少するメカニズムが不明であるため、確実には言えない。

本研究で作製した人工靭帯においても同様のメカニズムが考えられる。エラスチン投与試験との違いとして、人工靭帯ではエラスチンを足場材料として用いたため、靭帯細胞は常にエラスチンの刺激を受けた状態である。また、コラーゲン材料も同時に用いたため、コラーゲンの刺激も同時に受けていると考えられる。細胞がエラスチン、コラーゲンの刺激を同時に受けることで、人工靭帯移植 6 週の期間において正常靭帯と同等の力学強度を獲得できたと考えられる。

## 4-6 組織工学的人工靭帯の発展

本研究の最終目的が組織工学的人工靭帯の開発であることは 1-6 でも述べた。今回開発した組織工学的人工靭帯は、移植後 6 週時点において正常靭帯と近い力学的強度を示し、順調な経過を観察することができた。実用化のためには今後さらに長期期間の試験を試みる必要がある。また、MCL 損傷に対しての移植試験だけでなく、関節内靭帯の ACL 再建の試験を行っていく必要があると考えている。本研究では靭帯実質部の組織学的評価を行っていないため、再建靭帯組織の構造を観察することも重要である。

人工靭帯について、今回は PDS を用いて作製したが、移植後の靭帯組織再生をより迅速にするためには生体由来材料のみで人工靭帯を構成する必要があると考えている。合成材料を用いた場合は、生体内に残り続けることとなり、徐々に材料の摩耗が起こっていく。生分解性の材料を用いた場合、時間とともに分解、吸収され、いずれは生体内から無くなるが、分解速度によっては再建靭帯の強度が急激に低下してしまう恐れがある。そのため、現在では PDS をコラーゲン材料に置き換えたモデルの開発に取り組んでおり(Fig.4-23)、今後のさらなる発展を目指していく。

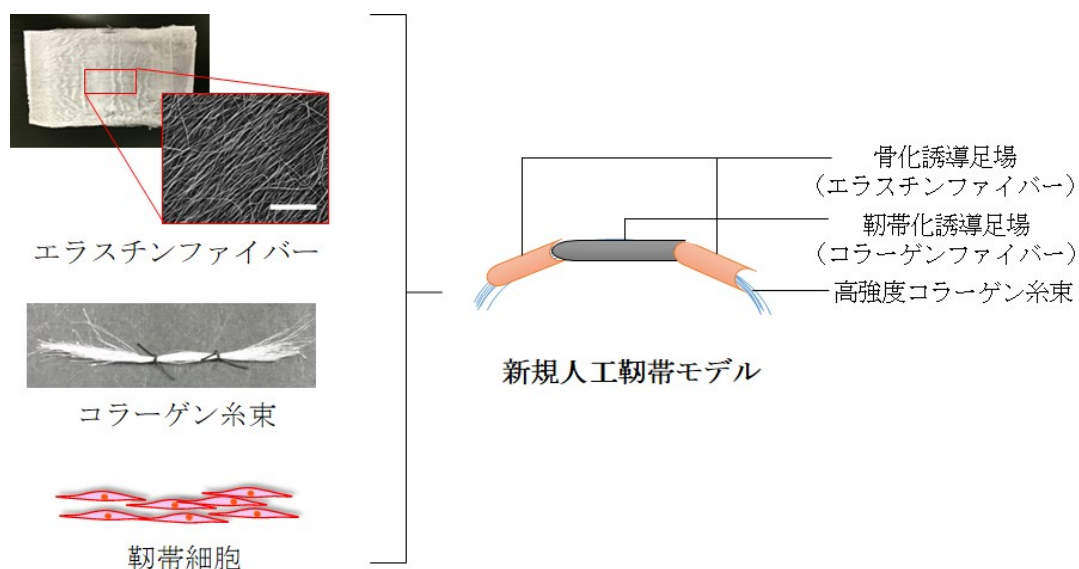


Fig.4-23 組織工学的人工靭帯の発展

## 5 結論

### Conclusion

## 5. 結論

本研究によって

1. 動物モデルを用いた *in vivo* でのエラスチン投与試験によって、エラスチンが損傷靭帯へ与える効果が明らかとなった。本研究結果より、エラスチン投与が損傷靭帯の早期治療に効果的であることが示唆された。具体的には、エラスチン投与により 6 週間までは遺伝子発現の上昇、基質タンパク質の増加とそれに伴う力学的強度の回復が見られた。投与 12 週時点では遺伝子発現およびタンパク質発現に大きな変化は見られなかったため、エラスチン投与は組織修復の早期段階に関与したことが示唆された。また、靭帯組織を靭帯損傷部と骨接合部の領域別に評価することで、エラスチンを投与した際の靭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。

2. エラスチンコーティングにより、人工靭帯の引き抜き荷重が向上したことから、エラスチンが人工靭帯—骨接合の強化に有効であることが示唆された。また、ECM 足場と生分解性合成材料から作製した人工靭帯に靭帯細胞を複合させることで、正常靭帯と同程度の強度を示す組織工学的人工靭帯の開発に成功した。

3. ウサギ靭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、靭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た。そのうち Galectin-3 についてエラスチンの作用を調査した結果、Galectin-3 の遺伝子発現はエラスチン添加によって変化したため、本研究におけるエラスチン認識メカニズムの 1 つには Galectin-3 の関与が示唆された。

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。

## 6. 参考文献

- 1) Petrigliano FA, McAllister DR, Wu BM. Tissue engineering for anterior cruciate ligament reconstruction: a review of current strategies. *Arthroscopy*. 2006;22(4):441-51.
- 2) 林紘三郎, 安達泰治, 宮崎浩, 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.
- 3) 富士川恭輔. 図説膝の臨床. メジカルビュー社. 1999.
- 4) Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials*. 2007;26(36):7530-6.
- 5) Duthon VB, Barea C, Abrassart S, Fasel JH, Fritschy D, Menetrey J. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2006;14(3):204-13.
- 6) Amis AA, Dawkins GP. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament. Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. *J Bone Jt. Surg. Br*. 1991;73(2):260-7.
- 7) Attia E, Brown H, Henshaw R, George S, Hannafin JA. 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(2):348-56.
- 8) Jenkins DH, Forster IW, McKibbin B, Rális ZA. Induction of tendon and ligament formation by carbon implants. *J Bone Joint Surg Br*. 1977;59(1):53-7.
- 9) Bolton W, Bruchman B. Mechanical and biological properties of the GORE-TEX expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) prosthetic ligament. *Aktuelle Probl Chir Orthop*. 1983;26:40-51.
- 10) Lukianov AV, Richmond JC, Barrett GR, Gillquist J. A multicenter study on the results of anterior cruciate ligament reconstruction using a Dacron ligament prosthesis in "salvage" cases. *Am J Sports Med*. 1989;17(3):380-5.
- 11) Lu HH, Cooper JA Jr, Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, Laurencin CT. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials*. 2005;26(23):4805-16.
- 12) Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials*. 2002;23(20):4131-41.
- 13) Mathew AP, Oksman K, Pierron D, Harmand MF. Biocompatible fibrous networks of cellulose nanofibres and collagen crosslinked using genipin: potential as artificial ligament/tendons. *Macromol Biosci*. 2013;13(3):289-98.

- 14) Zantop T, Weimann A, Schmidtko R, Herbort M, Raschke MJ, Petersen W. Graft laceration and pullout strength of soft-tissue anterior cruciate ligament reconstruction: in vitro study comparing titanium, poly-d, l-lactide, and poly-d, l-lactide-tricalcium phosphate screws. *Arthroscopy*. 2006;22(11):1204-10.
- 15) Brand J Jr, Weiler A, Caborn DN, Brown CH Jr, Johnson DL. Graft fixation in cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. 2000;28(5):761-74.
- 16) Fauno P, Kaalund S. Tunnel widening after hamstring anterior cruciate ligament reconstruction is influenced by the type of graft fixation used: a prospective randomized study. *Arthroscopy*. 2005;21(11):1337-41.
- 17) Baumfeld JA, Diduch DR, Rubino LJ, Hart JA, Miller MD, Barr MS, Hart JM. Tunnel widening following anterior cruciate ligament reconstruction using hamstring autograft: a comparison between double cross-pin and suspensory graft fixation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008;16(12):1108-13.
- 18) ウェイン・M. ベッカー, ルイス・J. クレインスミス, ジェフハーディン, 村松正実, 木南凌. 細胞の世界. 西村書店. 2005.
- 19) Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JCM, van Kuppevelt TH. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007;28(30):4378-98.
- 20) Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem*. 1998;258(1):1-18.
- 21) Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 49(3):235-44.
- 22) 矢嶋俊彦, 敦賀英知, 入江一元. 歯周組織の弾性系線維. 日本歯周病学会会誌. 2004;46(3):175-184.
- 23) Toupance S, Brassart B, Rabenoelina F, Ghoneim C, Vallar L, Polette M, Debelle L, Birembaut P. Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(5):511-22.
- 24) Mecham RP, Hinek A, Griffin GL, Senior RM, Liotta LA. The Elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. *J Biol Chem*. 1989;264(28):16652-7.
- 25) Bax DV, Rodgers UR, Bilek MM, Weiss AS. Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRK motif and integrin alphaVbeta3. *J Biol Chem*. 2009;284(42):28616-23.
- 26) Pocza P, Süli-Vargha H, Darvas Z, Falus A. Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer*. 2008;122(9):1972-80.



- 27) 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;4(210):9-15.
- 28) Park PW, Roberts DD, Grosso LE, Parks WC, Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham RP. Binding of elastin to staphylococcus aureus. *J Biol Chem*. 1991;266(34):23399-406.
- 29) Cheung KL, Bates M, Ananthanarayanan VS. Effect of FKBP65, a putative elastin chaperone, on the coacervation of tropoelastin in vitro. *Biochem Cell Biol*. 2010;88(6): 917-25.
- 30) Hinek A, Pshezhetsky AV, von Itzstein M, Starcher B. Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly. *J Biol Chem*. 2006;281(6):3698-710.
- 31) Patel D, Menon R, Taite LJ. 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):432-40.
- 32) Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Adv Protein Chem*. 2005;70:437-61.
- 33) 山田将義. 再生誘導型の人工靭帯の開発. 三重大学平成 26 年度修士論文.
- 34) Mizutani N, Kageyama S, Yamada M, Hasegawa M, Miyamoto K, Horiuchi T. The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds. *J Artif Organs*. 2014;17(1):50-9.
- 35) Boykiw R, Sciore P, Reno C, Marchuk L, Frank CB, Hart DA. Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments. *Matrix Biol*. 1998;17(5):371-8.
- 36) Fukui N, Katsuragawa Y, Sakai H, Oda H, Nakamura K. Effect of local application of basic fibroblast growth factor on ligament healing in rabbits. *Rev Rhum Engl Ed*. 1998;65(6):406-14.
- 37) 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](http://proteome.jp/2D/J_2DEmethod.html)
- 38) Maeda I, Mizoiri N, Briones MP, Okamoto K. Induction of macrophage migration through lactose-insensitive receptor by elastin-derived nonapeptides and their analog. *J Pept Sci*. 2007;13(4):263-8.
- 39) Blanchevoye C, Floquet N, Scandolera A, Baud S, Maurice P, Bocquet O, Blaise S, Ghoneim C, Cantarelli B, Delacoux F, Dauchez M, Efremov RG, Martiny L, Duca L, Debelle L. Interaction between the elastin peptide VGVAPG and human elastin binding protein. *J Biol Chem*. 2013;288(2):1317-28.

- 40) Beye JA, Hart DA, Bray RC, McDougall JJ, Salo PT. Injury-induced changes in mRNA levels differ widely between anterior cruciate ligament and medial collateral ligament. *Am J Sports Med.* 2008;36(7):1337-46.
- 41) 波利井清紀, 森口隆彦. 創傷の治療:最近の進歩 第2版. 克誠堂出版. 2005.
- 42) Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest.* 1994;70(2):176-82.
- 43) 鶴池政明, 上勝也. 損傷した腱・靭帯の治癒過程. 大阪体育大学紀要. 2001;32:149-157.
- 44) Lei Y, Sinha A, Nosoudi N, Grover A, Vyavahare N. Hydroxyapatite and calcified elastin induce osteoblast-like differentiation in rat aortic smooth muscle cells. *Exp Cell Res.* 2014;323(1):198-208.
- 45) Hu X, Park SH, Gil ES, Xia XX, Weiss AS, Kaplan DL. The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. *Biomaterials.* 2011;32(34):8979-89.
- 46) 水谷直紀. 三次元培養基材および力学刺激による靭帯細胞の表現型制御に関する研究. 三重大学平成25年度博士論文.
- 47) Glycoforum: <http://www.glycoforum.gr.jp>
- 48) Collins PM, Hidari KI, Blanchard H. Slow diffusion of lactose out of galectin-3 crystals monitored by X-ray crystallography: possible implications for ligand-exchange protocols. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007;63(Pt 3):415-9.
- 49) PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2nn8>
- 50) Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, Rossignol P, López-Andrés N. Galectin-3 Mediates Aldosterone-Induced Vascular Fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(1):67-75.
- 51) Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. *Circulation.* 2004;110(19):3121-8.
- 52) Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, Simpson AJ, Forbes SJ, Hirani N, Gauldie J, Sethi T. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(5):537-46.

- 53) Ochieng J, Warfield P, Green-Jarvis B, Fentie I. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *J Cell Biochem.* 1999;75(3):505-14.
- 54) Iacobini C, Fantauzzi CB, Pugliese G, Menini S. Role of Galectin-3 in Bone Cell Differentiation, Bone Pathophysiology and Vascular Osteogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11). pii: E2481.
- 55) Colnot C, Sidhu SS, Poirier F, Balmain N. Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999;45(8):1191-202.
- 56) Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone.* 1995;17(2 Suppl):77S-83S.
- 57) Stock M, Schäfer H, Stricker S, Gross G, Mundlos S, Otto F. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *J Biol Chem.* 2003;278(19):17360-7.
- 58) Weilner S, Keider V, Winter M, Harreither E, Salzer B, Weiss F, Schraml E, Messner P, Pietschmann P, Hildner F, Gabriel C, Redl H, Grillari-Voglauer R, Grillari J. Vesicular Galectin-3 levels decrease with donor age and contribute to the reduced osteo-inductive potential of human plasma derived extracellular vesicles. *Aging (Albany NY).* 2016;8(1):16-33.
- 59) Price ER, Jin M, Lim D, Pati S, Walsh CT, McKeon FD. Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(9):3931-5.
- 60) Carpentier M, Allain F, Haendler B, Denys A, Mariller C, Benaïssa M, Spik G. Two Distinct Regions of Cyclophilin B Are Involved in the Recognition of a Functional Receptor and of Glycosaminoglycans on T Lymphocytes. *J Biol Chem.* 1999;274(16):10990-8.
- 61) Bergeron MJ, Bürzle M, Kovacs G, Simonin A, Hediger MA. Synthesis, Maturation, and Trafficking of Human Na<sup>+</sup>- Dicarboxylate Cotransporter NaDC1 Requires the Chaperone Activity of Cyclophilin B. *J Biol Chem.* 2011;286(13):11242-53.
- 62) Cheung KL, Bates M, Ananthanarayanan VS. Effect of FKBP65, a putative elastin chaperone, on the coacervation of tropoelastin in vitro. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(6):917-25.
- 63) Patterson CE, Schaub T, Coleman EJ, Davis EC. Developmental regulation of FKBP65 an ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Mol Biol Cell.* 2000;11(11):3925-35.

- 64) 中村雅広. エラスチン結合タンパクの探索. 三重大学平成 24 年度修士論文.
- 65) Chen C, Brock R, Luh F, Chou PJ, Larrick JW, Huang RF, Huang TH. The solution structure of the active domain of CAP18--a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett.* 1995;370(1-2):46-52.
- 66) Structures: Antimicrobial protein CAP18 (Accession No. P25230). EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/P25230/structures;jsessionid=CDEDA3255D332105CB575AEF7269992C>
- 67) Wu WK, Wong CC, Li ZJ, Zhang L, Ren SX, Cho CH. Cathelicidins in inflammation and tissue repair: Potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(9):1118-22.
- 68) Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(8):1687-92.
- 69) Tennessen JA. Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J Evol Biol.* 2005;18(6):1387-94.
- 70) Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44854-63.
- 71) de Boer RA, Yu L, van Veldhuisen DJ. Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2010;7(1):1-8.
- 72) Menini S, Iacobini C, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Salvi L, Pesce CM, Relucenti M, Familiari G, Taurino M, Pugliese G. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2013;100(3):472-80.

## 7. 謝辞

本研究及び博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宮本 啓一 教授に対し深く御礼申し上げます。また、本研究及び学術論文の投稿において、ご指導いただきました 堀内 孝 名誉教授に深く感謝申し上げます。宮本教授には研究室に所属してから博士後期課程修了まで6年間、実験に関して数多くの助言を頂き、さらには実験に使用する装置の作製など様々な面で何度も助けて頂きました。また、堀内名誉教授には 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、論文投稿の際には論文の構成からレビューワーへの回答に関することまで多くの助言を頂きました。両先生に対して、改めて深く御礼申し上げます。また、お忙しい中、本論文の審査を引き受けて下さいました八尾 浩史教授、鳥飼 直也教授、富田 昌弘教授、湊元 幹太准教授に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、服部 徹也先生、細井 敬先生、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林兼産業株式会社 白土 絵理博士、実験装置の使用にあたり、使用方法および様々な質問にもお答えして下さいま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」をテーマとしてともに研究した影山 聡志さん、長谷川 まりなさん、山田 将義さん、傍嶋 達也さん、堀江 俊貴さん、田島 康裕さん、矢形 将人さん、片山 真梧さん、佐藤 辰哉さん、堀川 公佑さん、石崎 梓さん、井上 綱太さん、豊田 真梨子さん、丹羽 紘介さん、三田 百恵さん、出口 智恵さん、井上 陽太さん、伊藤 悠貴さん、金澤 友希さん、村手 香奈子さん、本当に有難う御座いました。特に、同じ「人工靱帯の開発」を研究テーマとした、影山 聡志さん、山田 将義さん、佐藤 辰哉さん、豊田 真梨子さん、丹羽 紘介さん、井上 陽太さんには時間を割いて実験のサポートをして頂きました。深く感謝致します。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学生の皆様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、あらゆる面において私を支え続けてくれた両親、家族に深く感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

晝河 政希