

令和5年度 修士論文

靱帯および腱細胞へのエラスチン刺激と  
組織特異的分子の発現に関する研究

三重大学大学院 工学研究科  
分子素材工学専攻 生体材料化学研究室

山本 祐輔

# 目次

1 緒言 .....	1
1-1 特異的分子(マーカー)	
1-2 靱帯(Ligament)	
1-2-1 靱帯の役割	
1-2-2 前十字靱帯	
1-2-3 外側側副靱帯	
1-3 腱(Tendon)	
1-3-1 腱の役割	
1-3-2 アキレス腱	
1-3-3 膝蓋腱	
1-4 細胞外マトリックス	
1-4-1 コラーゲン	
1-4-2 エラスチン	
1-5 靱帯・腱の差異	
1-6 本研究の目的	
2 方法 .....	7
2-1 水溶性エラスチンの抽出と分画	
2-1-1 水溶性エラスチンの抽出	
2-1-2 水溶性エラスチンの分画	
2-1-3 水溶性エラスチンの弾性率による分画方法	
2-1-4 水溶性エラスチンの凝集温度による分画方法	
2-2 細胞の培養と継代	
2-2-1 ウサギ靱帯・腱由来細胞の単離と継代培養	
2-2-2 エラスチン添加培養	
2-3 細胞からのタンパク抽出	
2-4 SDS-PAGE	
2-5 Flamingo 蛍光染色	
2-6 MALDI-TOFMS 質量分析	
2-6-1 ゲル内消化	
2-6-2 MALDI-TOFMS 質量分析	

2-7 遺伝子発現解析

2-8 統計処理

### 3 結果 .....13

#### 3-1 通常培養した靱帯および腱細胞の差異調査

3-1-1 通常培養した靱帯および腱細胞のもつタンパク質の差異調査

3-1-2 通常培養した靱帯および腱細胞における Fibrillin-3 遺伝子の発現量比較

3-1-3 通常培養した靱帯および腱細胞における Fibrillin ファミリーの遺伝子発現調査

#### 3-2 エラスチン添加刺激に対するマーカー遺伝子発現量の変化

3-2-1 エラスチン添加刺激に対する Nestin の発現量比較

3-2-2 エラスチン添加刺激に対する Scleraxis の発現量比較

3-2-3 エラスチン添加刺激に対する Tenomodulin の発現量比較

#### 3-3 エラスチン添加刺激に対する細胞外マトリックス遺伝子発現量比較

3-3-1 エラスチン添加刺激に対する Elastin の発現量比較

3-3-2 エラスチン添加刺激に対する Collagen1 の発現量比較

3-3-3 エラスチン添加刺激に対する Fibrillin-1 の発現量比較

3-3-4 エラスチン添加刺激に対する Fibrillin-2 の発現量比較

### 4 考察 .....26

#### 4-1 ウサギ由来細胞について

#### 4-2 タンパク質産生と遺伝子発現の差異について

#### 4-3 エラスチン添加刺激に対する応答性の違いについて

4-2-1 エラスチン添加刺激に対する細胞応答

4-3-2 マーカー遺伝子発現量の変化

4-3-3 細胞外マトリックス遺伝子発現量比較

### 5 結論 .....33

### 6 参考文献 .....34

### 7 謝辞 .....37

# 1 緒言

## 1-1 特異的分子(マーカー)

生物を構成する全ての細胞は、同じゲノム配列を持っている。しかし、いくつかの遺伝子は特定の組織(細胞種)にのみ発現する<sup>1)</sup>。それは、それぞれの組織や細胞で遺伝子の発現が制御されており、特定の遺伝子サブセットしか発現しないからである。

組織特異的分子とは、ある組織で特異的に発現しほかの組織では少量、もしくは全く発現しない分子であり、マーカーとも呼ばれている。その特性から、人体を成す様々な器官や臓器を特徴づける役割を果たしている可能性がある<sup>2)</sup>。

マーカーには、平滑筋細胞におけるミオシン<sup>3)</sup>といった細胞骨格や、軟骨細胞の分化や発生に関する Sox9 といった転写因子<sup>4)</sup>、幹細胞の細胞膜表面タンパク質など、様々なタンパク質がある。また、それらの組み合わせや存在比を指標とする場合もある。

がん細胞における細胞膜表面のタンパク質や肝機能障害における $\gamma$ -GTP など、特定の疾患に関するマーカーはバイオマーカー(Biomarker)と呼ばれ、「通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性」と定義される<sup>5)</sup>。

## 1-2 靱帯(Ligament)

### 1-2-1 靱帯の役割

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

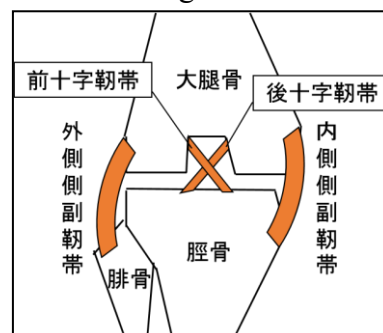


Fig.1-1 膝関節靱帯の模式図

### 1-2-2 前十字靱帯(ACL)

ACL は膝関節内の中央に位置する結合組織であり、大腿骨と脛骨を結び付けている。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といえる<sup>6)</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細胞外マトリックスと、靱帯線維と平行に配向した紡錘状の靱帯細胞で構成されている<sup>7)</sup>。

### 1-2-3 外側側副靱帯(LCL)

外側側副靱帯は関節の外側で、大腿骨と腓骨をつないでいる結合組織である。内側側副靱帯とともに膝の左右の安定を保つ働きがある。膝の内側から外側に強い力が加わり、引っ張られることによって損傷が起こる。この靱帯が単独で損傷するのはまれで、後十字靱帯損傷や半月板損傷と合併して起きる。治療方法としては保存療法が一般的である。

## 1-3 腱(Tendon)

### 1-3-1 腱の役割

腱は、筋肉と骨を接続する筋骨格系の機関の一つである。筋肉で生成された力を骨格に伝達し、関節周りの動きを容易にする。腱の長軸に平行なコラーゲン線維束による階層構造を形成している<sup>8)</sup>。腱は身体の中でも最も負荷が大きく、損傷を受けやすい組織である<sup>9)</sup>。そのうちアキレス腱は人体最大の腱で、腓腹筋及びヒラメ筋によって構成下腿三頭筋と踵骨を結ぶ腱である。

### 1-3-2 アキレス腱(AT)

アキレス腱は、人体最大の腱で、腓腹筋及びヒラメ筋によって構成下腿三頭筋と踵骨を結ぶ腱である。主に I 型コラーゲンからなる膠原線維と、線維に平行に配向した紡錘形の線維芽様細胞(腱細胞)から構成されている<sup>10)</sup>。

その長さは約 150mm、筋肉との接合部の幅は約 68mm、中央部では 18mm と骨との接合部に向かって細くなり、踵骨との接合部では約 34mm である。ヒトアキレス腱の応力は約 86MPa、弾性率は約 861MPa、伸長率は約 10%、破断強度は約 5579N と報告されている<sup>11)</sup>。

腱は筋肉などの組織に比べて細胞分布、血管分布が少ない<sup>12,13)</sup>ため治癒力が低く、損傷前の組織の強度および機能は完全には回復しない。そのため、代替物を用いた研究が注目されている。

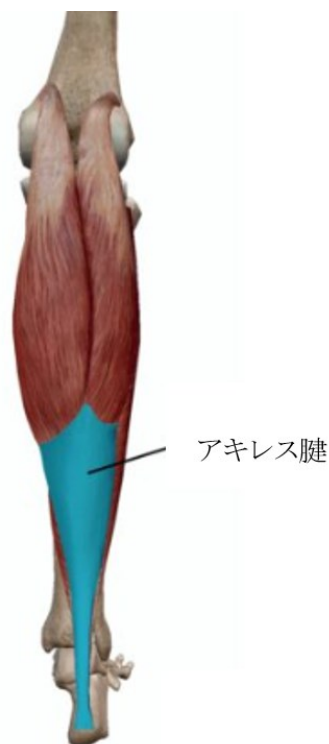


Fig 1-2 左足を後ろから見た模式図<sup>14)</sup>

### 1-3-3 膝蓋腱

膝蓋腱は膝蓋骨と脛骨を繋ぐ結合組織である。膝蓋骨は種子骨であり、成長に伴って形成・肥大することから、大腿四頭筋腱由来の組織であるといえる。また、骨と骨を繋いでいることから膝蓋靭帯とも呼ばれる<sup>15)</sup>。

生化学的には、コラーゲン含有量が多いものの、III型コラーゲンの割合が少ないことから、膝蓋腱と呼ばれることが多い。

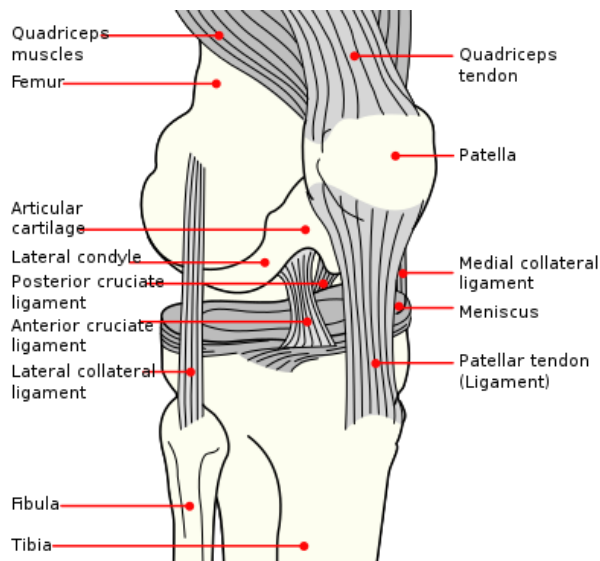


Fig.1-3 膝蓋腱の模式図

### 1-4 細胞外マトリックス(ECM: Extra Cellular Matrix)

組織・臓器の構成成分のうち非細胞性のものを細胞外マトリックスという。コラーゲンやエラスチン、接着タンパクのフィブロネクチンやラミニンといった線維性タンパク質や、グリコサミノグリカンといった非線維性糖タンパク質が構成している。近年では、ECMは細胞にとって物理的な足場となるだけでなく、細胞の形態形成・分化・ホメオスタシスに必要とされる重要な生化学的・生物学的な合図を出す働きもあることが知られている。

細胞外基質は細胞の微小環境として、細胞の増殖や分化形質の発現などを調節する。細胞外基質の一部には分子上に細胞を認識するための配列である RGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列を有するものがある。細胞にはインテグリンと呼ばれる RGD 配列を認識するレセプターが存在し、インテグリンと RGD 配列が結合することにより細胞機能の調節を行っている<sup>16)</sup>。

### 1-4-1 コラーゲン(Collagen)

コラーゲンは骨や腱などの組織に多く存在しているタンパク質である。膠原線維を形成することで主に組織に力学的強度を与えており、約十萬種あるといわれる生体内タンパク質中で3割程度を占めている。

コラーゲンの役割は、体全体だけでなく臓器やその他の形を維持す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。

腱は、コラーゲン線維が平行に密に配列していることによって、筋肉の緊張時に腱が受ける機械的負荷に対して最適な抵抗力を有している(Fig1-3)。腱が高い機械的負荷を支えることができるのは、コラーゲン線維が負荷のかかる方向に配列しているためである。

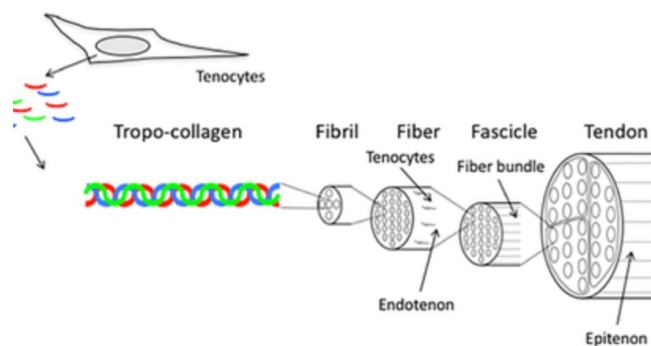


Fig.1-4 コラーゲンと腱構造の関係<sup>17)</sup>

### 1-4-2 エラスチン(Elastin)

エラスチンは、細胞外マトリックスの一つで分子量約 67kDa の不溶性の線維状タンパク質である。コラーゲン線維を支える役割を持つ線維であり、コラーゲンが線維に強度や張力を与えるのに対し、エラスチンは組織に伸縮性や弾性を与える線維状タンパク質で、靱帯、血管、皮膚、肺といった伸縮性や弾性が必要な組織に多く見られ、生体を構成する ECM の中で、コラーゲンに次いで多いため、生体内で重要な構成成分である。

また、エラスチンを構成するアミノ酸の 80～90%はロイシン、アラニン、グリシン、プロリン、バリンの 5 種で構成されている。細胞接着部位として VGVAPG(Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)というアミノ酸配列を持っている。そのため数種類の細胞と相互作用し、その接着及び遊走に関連しているとの報告もある<sup>18)</sup>。



## 1-5 靱帯・腱の差異

一般的に靱帯と腱の細胞外の組成は異なることが知られている。主成分であるコラーゲンとエラスチンについて、靱帯ではコラーゲンが 80%以上、エラスチンが十数%であるのに対し、腱ではコラーゲンが 9 割以上を占め、エラスチンは数%にとどまっている。

具体的な事例として、イヌの前十字靱帯、内側側副靱帯、浅指屈筋腱、長趾伸筋腱の細胞の形状と細胞外マトリックスを比較した実験では、その他とは異なり前十字靱帯において丸状の細胞が見られ、またグリコサミノグリカンや弾性線維が有意に多いことが分かっている。

さらに靱帯・腱においてアグリカンやバーシカンなどのプロテオグリカンの割合が異なり、靱帯で有意に多いことが判明している<sup>19)</sup>。

人の前十字時靱帯と膝蓋腱の細胞外マトリックスの組成を比較した実験では、前十字靱帯において III 型コラーゲンが、膝蓋腱において I 型コラーゲンが多いことが分かっている<sup>20)</sup>。

## 1-6 本研究の目的

靱帯・腱における組織特異的分子として、スクレラキシス(Scleraxis: SCX)やテネイシン C、テノモジュリン(Tenomodulin: TNMD)がよく知られている。しかしながら、靱帯と腱の細胞を明確に区別するマーカーは今のところ報告されていない。

また、それぞれの細胞に対するエラスチンの影響は明らかになっていない部分も多く、先行研究において、靱帯細胞および腱細胞の培養時にエラスチンを添加するとことで腱細胞においてのみ Nestin と呼ばれる中間系フィラメントタンパク質の発現が認められた。ZI YIN らの報告によると、腱由来幹/前駆細胞(TSPC)における Nestin の発現と、腱マーカーとして用いられる転写因子 Scx や Mxk、腱関連マトリックスであるエラスチンの発現との間には関連があり、Nestin が腱分化において重要な役割を果たしている<sup>21)</sup>と述べられている。

そこで本研究では、腱細胞および靱帯細胞のエラスチンに対する応答について、上述の転写因子やマトリックスタンパク質の遺伝子発現変化を観察することで、細胞間に違いが見られるか調査を行った。

## 2 方法

### 2-1 水溶性エラスチンの抽出

ブタ大動脈から中膜層以外の脂肪、血塊、外膜を除去し、細かくミンチした後エタノールで脱水を行い乾燥し、不溶性エラスチンを得た。得られた不溶性エラスチンを熱シュウ酸処理し、上澄み液を透析チューブに入れ、透析外液の pH が 4.5 以上、浸透圧が 0mOsm 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、液を凍結乾燥させて水溶性エラスチンを精製した。

#### 2-1-2 水溶性エラスチンの分画

2-1 で抽出した水溶性エラスチンをゲルの弾性率、凝集温度を測定して、分類を行った。本研究ではエラスチン A～E の 5 種類にクラスを分けた。

#### 2-1-3 水溶性エラスチンの弾性率による分画方法

エラスチン濃度 40%、架橋倍率 2 倍となるように水溶性エラスチン、架橋剤である DSP、milli-Q 水をアシストチューブ内で混合、完全に溶解させて遠心した。脱気したエラスチン溶液をキャピラリーチューブに注入し、栓をして密封した後、ねじり試験管に入れて 15000rpm 3 min の遠心分離を行った。遠心後、キャピラリーチューブの入った試験管を脱イオン水で満たし、70℃のウォーターバスで 30 分間加熱した。その後、試験管をアルミホイルで包み、オートクレーブで 121℃、30 分 加熱した。加熱後、キャピラリーチューブからエラスチンゲルを取り出して、脱イオン水に浸した後、インキュベーター内で一晩静置し、翌日各サンプルの弾性率を測定した。

##### 【弾性率(ヤング率)の求め方】

面積  $A(m^2)$  の物体を一軸方向に力  $F(N)$  で引き伸ばし、物体の長さが  $I_0(m)$  から  $I(m)$  へと変形したとき、その時の応力  $\sigma$  (Pa) と歪み  $\gamma$  は次式で求められる。

$$\sigma = F/A$$

$$\gamma = (I - I_0)/I_0$$

フックの法則より、応力の大きさが限界内にあるときは、応力と歪みは比例関係にあるので、弾性率  $E(Pa)$  は次式で求められる。

$$E = \sigma / \gamma$$

Table 2-1 弾性率による水溶性エラスチンの分画

クラス	A	B	C	D	E
弾性率(kPa)	50~	25~50	5~25	~5	ゲル化しない

#### 2-1-4 水溶性エラスチンの凝集温度による分画方法

サンプルチューブに、水溶性エラスチンの濃度が 1%(v/v)になるように Milli-Q 水を加えて調整した。溶液を試料セルに移し替えて透過光測定装置にセットした。恒温槽で溶液温度を少しずつ増加させ、透過光の変化を測定することで凝集温度を求めることで分画した。

Table 2-2 凝集温度による水溶性エラスチンの分画

クラス	A	B	C	D	E
凝集温度(°C)	20~22.5	22.5~25	25~30	30~35	35~50

## 2-2 細胞の培養と継代

### 2-2-1 ウサギ靱帯・腱由来細胞の単離と継代培養

ウサギ前十字靱帯、外側側副靱帯、アキレス腱、膝蓋腱の細胞から、移植片培養法によって細胞の単離を行った。まず、購入したウサギ膝関節組織から、付着したほかの組織を取り除き、2-3mm 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)(通常培地)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走していることが確認出来たら、トリプシン処理にて細胞を剥離させた。この細胞を Passage 0 と定義し、rACL,rLCL,rAT,rPT とした。培地交換は 3 日ごとに行った。

### 2-2-2 エラスチン添加培養

通常培地に分画エラスチン A を 1.0mg/mL になるように溶解し、エラスチン添加培地を作製した。75cm<sup>2</sup> フラスコに 3.75×10<sup>5</sup>Cells 播種したのち、1 週間培養した後、細胞内タンパクの調査を行った。また、35 φシャーレに 1.0×10<sup>5</sup>Cells 播種し、1 週間または 2 週間培養した後、遺伝子発現量調査を行った。

## 2-3 細胞からのタンパク抽出

75cm<sup>2</sup>フラスコにて通常培地でコンフルエントにまで培養した細胞またはエラスチン A 添加培地で 1 週間培養した細胞を氷冷した PBS で内壁を洗浄した。それを捨て、新たに PBS1ml を入れた状態で、氷上でセルスクレーパーを用いて秤量済のチューブにかき集めた。5000rpm、4℃ で 5 分遠心し、上澄みを除いて秤量することで細胞の湿重量を測定した。湿重量に対して 4 倍量のタンパク質抽出液を加えて、氷冷下で超音波破碎した。15000rpm、4℃ で 20 分間遠心を行い、上澄みを Protein Lo Bind Tube(エッペンドルフ)に入れた。タンパク質抽出液は、尿素 30%(w/v),チオ尿素 15%(w/v),CHAPS 0.2%(w/v),Dithiothreitol0.1%,Pharmalyte0.2%に調整した。抽出したタンパク質は減圧乾燥により濃縮した。

## 2-4 SDS-PAGE

2-3 で得られたサンプルを使用した。12.5%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 20 mA、定電圧で電気泳動を行った(Fig.2-2)。

## 2-5 Flamingo 蛍光染色

泳動プレートからアクリルアミドゲルを取り出し、固定液250mL で 30min 震とうした。固定液はメタノール 50%、酢酸10%の溶液であった。その後 Milli-Q 250mL で 3 回洗浄した。10 倍希釈した染色液をアルミホイルで十分に遮光したタッパーに入れ、1 時間震とうした。染色液を遮光した容器に回収し、Milli-Q250mL で洗浄した。このゲルを、三重大学生命科学研究支援センター遺伝子実験施設のフルオロフォレスター3900 で撮影した。ImageJ による輝度解析の後、必要なスポットを切り出した。

## 2-6MALDI-TOFMS 質量分析

### 2-6-1 ゲル内消化

SDS-PAGE のゲルから切り出したバンドを 1~2mm 程度の小片にして 1.5mL の Protein Lo Bind Tube(エッペンドルフ)に入れた。還元処理液とアルキル化処理液を用いて還元アルキル化を行い、脱色液 A(エタノール:重炭酸アンモニウム=1:1)と脱色液 B(アセトニトリル:100mM 重炭酸アンモニウム)を用いてゲル片の脱色を行った後、トリプシンによりゲル内のタンパク質を分解。抽出し、得られたサンプルを減圧乾燥機(DNAmini)で濃縮した。濃縮後、サンプルプレートにサンプル 0.5μL とマトリックス(CHCA:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma)0.5μL を添加し overnight で乾燥させた。

### 2-6-2 MALDI-TOFMS 質量分析

サンプルを添加したプレートは三重大学遺伝子実験施設の MALDI-TOFMS(4800plus,Applied Biosystems)を使用し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。得られた検索結果を基にタンパク質を同定した。信頼度 95%以上のペプチド配列を含むものを同定されたものとし、その配列がタンパク中でどの程度の割合を占めているかを“%Cov”で示した。

## 2-7 遺伝子発現解析

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

サンプルは Passage4 の各細胞を用いた。RNAisoPlus (TaKaRa)を用いて RNA を抽出した。抽出 RNA を chloroform-isoamylalcohol 24:1 (SIGMA)、isopropanol (SIGMA)を用いて精製し、Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer (BIO RAD)にて定量した。定量後、5xPrimeScript RT Master Mix (TOYOBO)を用いて逆転写させた。得られた cDNA を SYBR Premix Ex Taq (TOYOBO)を用いて PCR 解析をした。

本実験でターゲットとした遺伝子 (Table.2-4) とそのプライマー (Table.2-5) について次に示す。

Table 2-4 ターゲット遺伝子

Name	機能
GAPDH	ハウスキーピング:内部標準として使用
Collagen I	靱帯・腱の主要成分
Elastin	弾性線維の主要成分
Scleraxis	靱帯・腱の初期マーカー
Tenomodulin	靱帯・腱の成熟マーカー
Nestin	Elastin や Scleraxis との関連が示唆されているタンパク質
Fibrillin1	弾性線維の主要成分
Fibrillin2	弾性線維形成の初期段階に関与
Fibrillin3	発生段階の弾性線維に寄与

Table. 2-2 ターゲット遺伝子のプライマー配列

Name	配列
GAPDH	F:TCACCATCTTCCAGGAGCGA R:CACAATGCCGAAGTGGTCGT
Collagen I	F:GATGCGTTCCAGTTCGAGTA R:GGTCTTCCGGTGGTCTTGTA
Elastin	F: GCAGCTAAGGCAGCGAAATAC R: TCCAGCATCTACTGCACCTG
Scleraxis	F: ACAGGAAGACTGCGATACGG R: TCCATCTGTCCATCTGTCCATC
Tenomodulin	F:GAACAAAATGAGCAGTGGGTGGTC R:TTGCAAGGCATGATGACACGACAG
Nestin	F: AGAATTGCTGGGGTCTTTGG R: TCCACGTCCTTTTCTTCCAC
Fibrillin-1	F: ATTTGGAGGCTGGGAATGTG R: CATCCAGGGCAACAATAAGC
Fibrillin-2	F: ACCCTGAAATCCGAATGCTG R: AATCCTGGCAAACCCTCTTG
Fibrillin-3	F: CAATGGCTATCGCTGCTTTG R: GGTGGTGTTGAAAGGTTTAGGC

Nestin,Fibrillin-1,2,3 については NCBI データベースで配列を選択し、Primer 3 plus を用いて設計した。

得られた結果を  $\Delta \Delta Ct$  法を用いて解析し、基準群を1として相対発現量を算出した。

### $\Delta \Delta Ct$ 法

#### ① $\Delta Ct$ の算出

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

#### ② $\Delta \Delta Ct$ の算出

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{各サンプル})} - \Delta Ct_{(\text{基準群})}$$

#### ③ 相対発現量の算出

$$(\text{遺伝子の相対発現量}) = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

## 2-8 統計処理

結果は解析ソフト（ StatView ）を使用し、Tukey-Kramer 法により統計的有意差検定を行なった。\*:  $P < 0.05$ , で統計的な有意差ありとした。

### 3 結果

#### 3-1 通常培養した靱帯および腱細胞の差異調査

##### 3-1-1 通常培養した靱帯および腱細胞のもつタンパク質の差異調査

Passage4 の外側側副靱帯(LCL)、アキレス腱(AT)の細胞を、75cm<sup>2</sup> フラスコと通常培地(10%FBS/DMEM)を用いて培養した。これらの細胞からタンパク質を抽出し、ゲル電気泳動を用いて分子量分画を行ったところ、以下の結果が得られた(Fig 3-1)。

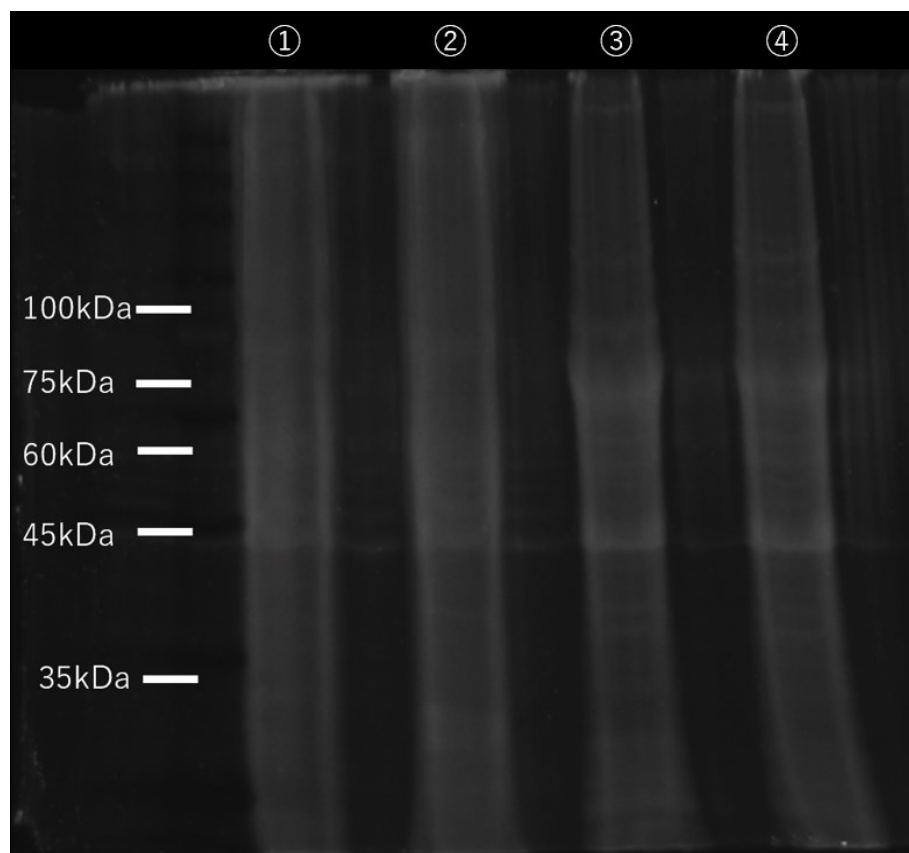


Fig 3-1 通常培養した LCL(①②)、AT(③④)の細胞抽出液の分子量分画

このゲルを、ImageJを用いて輝度解析を行ったところ、以下のC,D,F,G,H,I,Jにピークが見られた(Fig 3-2)。これらのバンドについて質量分析を行い、タンパク質の同定を行った。



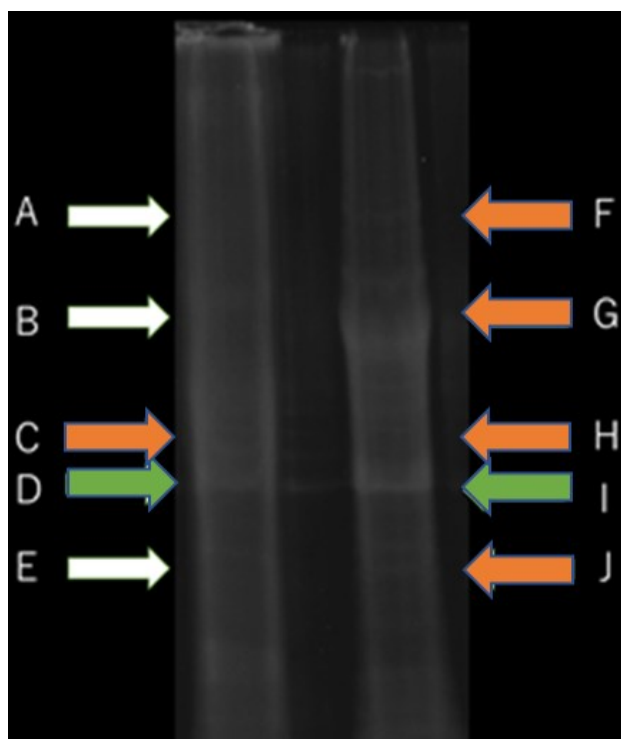


Fig 3-2 質量分析に用いたスポットの位置  
 橙矢印(C,F,G,H,J)はピークの見られたスポット 緑矢印(D,I)は基準としたスポット  
 白矢印(A,B,E)はそれぞれ F,G,J の対照実験

それぞれのバンドにおける解析結果を次の表に記す(Table 3-1)。

Table.3-1 同定されたタンパク質とバンド

バンド	%Cov	Peptide (95%)	Name
A	2.4	1	uncharacterized protein LOC103346516
	0.7	1	sodium/hydrogen exchanger 10 isoform X5
	2.3	1	chromobox protein homolog 1-like
	0.6	1	WD repeat-containing protein 66 isoform X6
	1.3	1	N-lysine methyltransferase SETD6
	3.7	1	calcyphosin-2 isoform X4
	0.3	1	bromodomain and WD repeat-containing protein 1 isoform X3
B			ヒットなし
C	2	1	vacuolar protein sorting-associated protein 37C isoform X3

C	2.9	1	actin, aortic smooth muscle isoform X1
	0.8	1	adenylate cyclase type 4 isoform X2
	0.2	1	low-density lipoprotein receptor-related protein 1B
	1.8	1	ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHA
	4.9	1	serine/arginine repetitive matrix protein 1-like
	2.9	1	Beta-actin
	2.3	1	LOW QUALITY PROTEIN: transcriptional protein SWT1
	0.7	1	fibrillin-3
	2	1	E3 ubiquitin-protein ligase ZNRF3
	0.9	1	uncharacterized protein KIAA0947 homolog
	1.2	1	slit homolog 2 protein isoform X3
D	5.6	1	actin, aortic smooth muscle isoform X1
	0.5	1	microtubule-actin cross-linking factor 1
	3.8	1	protein FAM122A
E			ヒットなし
F			ヒットなし
G	0.9	1	SH2 domain-containing protein 3C
	1.9	1	vitamin K-dependent protein C isoform X1
	0.3	1	acetyl-CoA carboxylase 1 isoform X6
	1.7	1	vacuolar protein sorting-associated protein 26A
H	3.7	1	calcyphosin-2 isoform X4
	1.9	1	vitamin K-dependent protein C isoform X1
I	10.1	1	Beta-actin
	2.9	1	actin, aortic smooth muscle isoform X1
	0.8	1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4
	1.3	1	leucine zipper protein 1 isoform X3
	2	1	uncharacterized protein LOC103351332
	5.6	1	actin, aortic smooth muscle isoform X1
	3.8	1	serine/arginine repetitive matrix protein 3-like
	2.9	1	actin, aortic smooth muscle isoform X1
J			ヒットなし

これらの結果から、特に細胞外基質を形成する Fibrillin-3 について着目した。

### 3-1-2 通常培養した細胞における Fibrillin-3 遺伝子の発現量比較

通常培地(10%FBS/DMEM)で培養した前十字靱帯(ACL)、外側側副靱帯(LCL)、アキレス腱(AT)、膝蓋腱(PT)の細胞での、Fibrillin-3 発現量を比較した。発現量は ACL のものを基準とし、それぞれの相対発現量を記した(Fig.3-3)。

Fibrillin-3 発現は、ACL と比較して LCL、PT での相対発現量は低く、アキレス腱で高くなる傾向を示した。

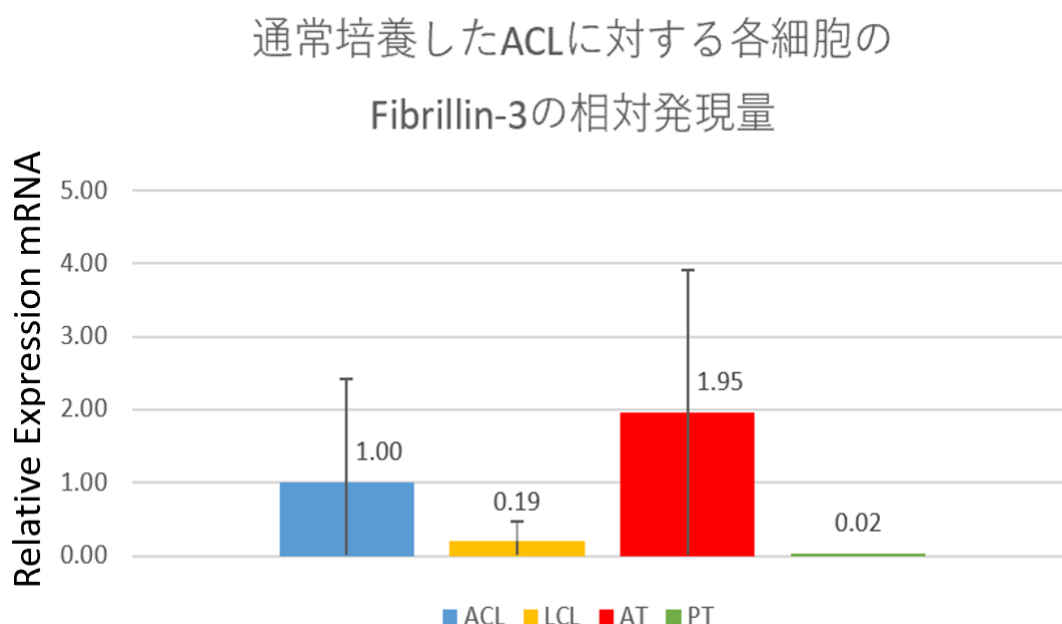


Fig 3-3 通常培養した靱帯及び腱細胞における Fibrillin-3 遺伝子の発現量比較 (n=3)

### 3-1-3 通常培養した靱帯及び腱細胞における Fibrillin ファミリー遺伝子の発現調査

質量分析によって得られた配列と近い配列が Fibrillin-2 に存在している。関連する可能性が高いため、これらを含む Fibrillin ファミリーである Fibrillin-1 と Fibrillin-2 について遺伝子発現量調査を行った。

通常培地で培養したそれぞれの細胞について、Fibrillin-1 と Fibrillin-2 についての相対発現量を調査した。発現量は ACL のものを基準とし、それぞれの相対発現量を記した。

Fibrillin-1 について、すべての細胞で同レベルの遺伝子発現が確認された(Fig.3-4)。また、Fibrillin-2 については、ACL と LCL、PT で同レベルの遺伝子発現が確認されたが、AT において相対的に低い発現量を示した(Fig.3-5)。

### 通常培養したACLに対する各細胞のFib-1相対発現量

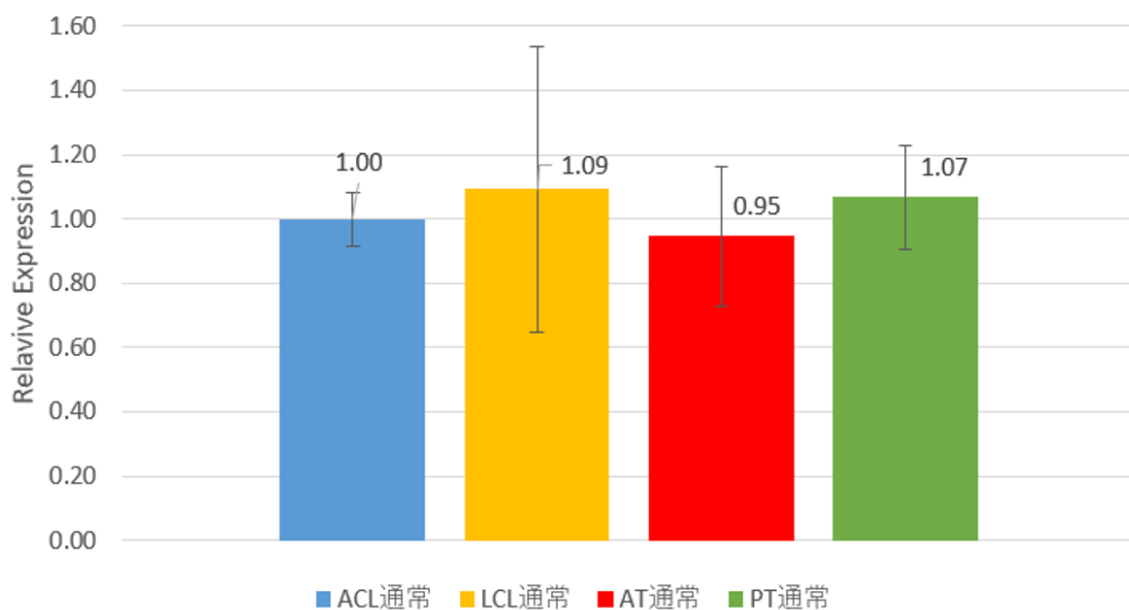


Fig 3-4 通常培養した靱帯及び腱細胞における Fibrillin-1 遺伝子の発現量比較 (n=3)

### 通常培養したACLに対する各細胞のFib-2相対発現量

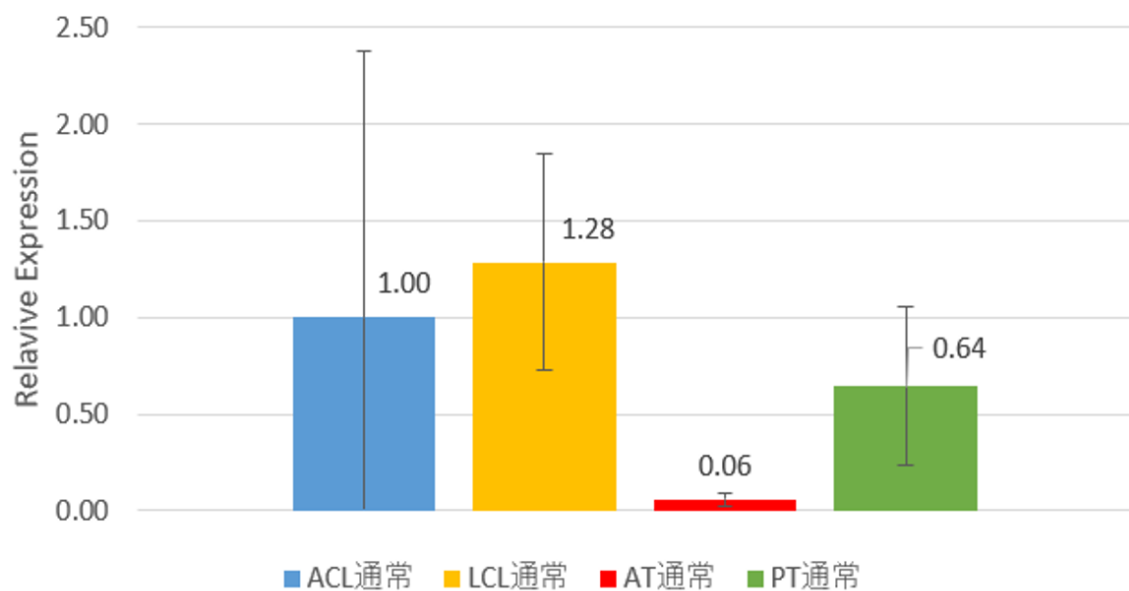


Fig 3-5 通常培養した靱帯及び腱細胞における Fibrillin-2 遺伝子の発現量比較 (n=3)

### 3-2 エラスチン添加刺激に対するマーカー遺伝子発現量の変化

先行研究において、エラスチン添加培養した LCL と AT の細胞について、Nestin の産生量が LCL で多いことが分かった。また、その他の先行研究において、Nestin と靱帯・腱特異的分子である Scleraxis の発現量は正の相関関係にあることが分かっている。また、成熟度を確認するため、成熟靱帯・腱組織特異的分子である Tenomodulin を確認した。また、エラスチン添加刺激に対して、細胞外基質の産生量が増加すると予想し、エラスチン、コラーゲン、Fibrillin-1,-2,-3 の発現量を調査した。しかし、Fibrillin-3 については結果が得られなかったため省略する。

#### 3-2-1 エラスチン刺激に対する Nestin の発現量比較

エラスチン添加培地(1mg/mL Elastin + 10%FBS/DMEM)で、前十字靱帯(ACL)、外側副靱帯(LCL)、アキレス腱(AT)、膝蓋腱(PT)の細胞を 1 週間と 2 週間培養し、Nestin 発現量を比較した。発現量は通常培地(10%FBS/DMEM)で培養したそれぞれの細胞のものを基準とし、それぞれの相対発現量を記した。(Fig.3-6)

ACL において、1 週間エラスチン添加培養したものは通常培養に比べて約 2.4 倍の Nestin 相対発現量を示した。2 週間培養時には発現レベルが低下し、通常培養時と同レベルの発現を示した。LCL ではエラスチン添加刺激に対して減少傾向を示し、継続的な添加に対して減少傾向を示した。AT ではエラスチン添加刺激に対して増加傾向を示し、継続的な添加刺激に対しては通常状態よりも低い発現量を示した。PT においては、エラスチン添加刺激に対して遺伝子発現量を変化させることはなかったが、継続的な刺激に対しては通常状態よりも低い発現量を示した。

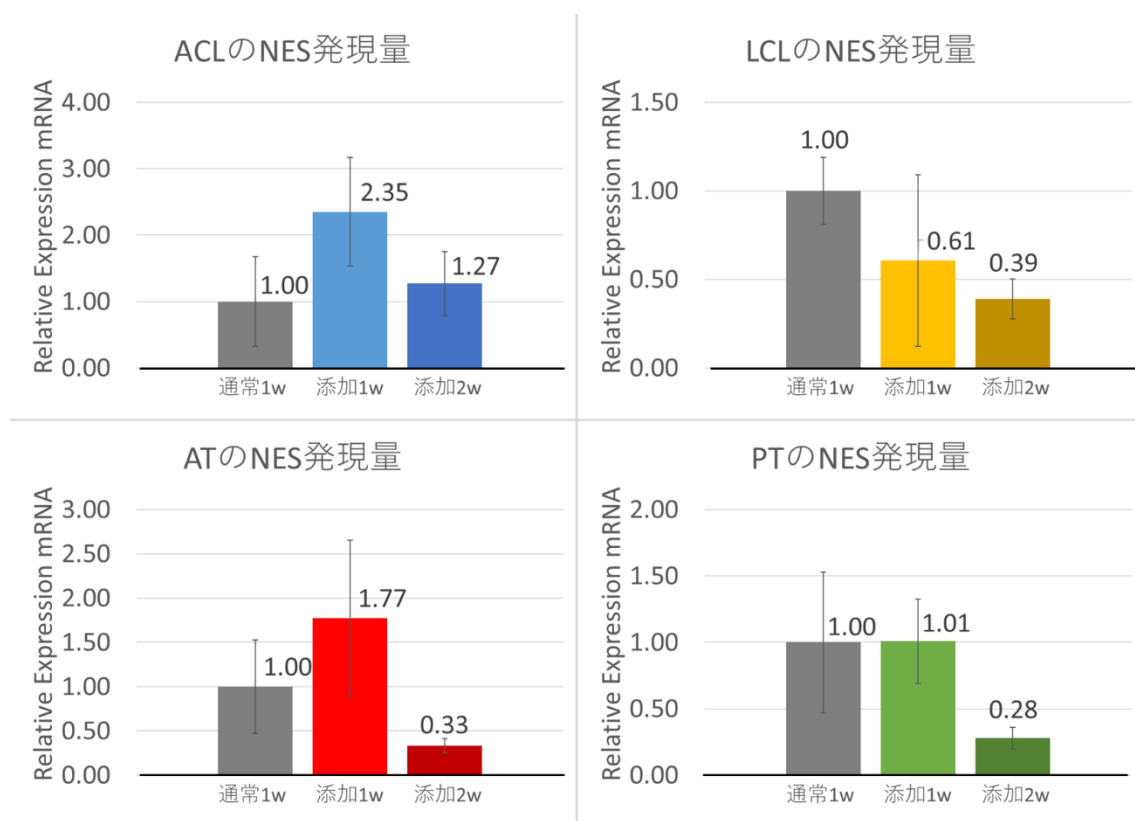


Fig 3-6 エラスチン添加培養した靱帯及び腱細胞における Nestin 遺伝子の通常培養に対する経時的な発現量比較(n=3)

### 3-2-2 エラスチン刺激に対する Scleraxis の発現量比較

エラスチン添加培地で 1 週間または 2 週間培養した ACL、LCL、AT、PT の細胞において、靱帯・腱の発生や再生に寄与する転写因子であるスクレラキシン(Scleraxis: SCX)の遺伝子発現を調査した。それぞれ、通常培地で1週間培養した各細胞の SCX 発現量に対して規格化した(Fig.3-7)。

ACL において、エラスチン添加培養 1 週間で大きく増加していることが確認できた。2 週間目では減少していたものの、通常培養に対しては大きく増加していることが分かった。

LCL、AT、PT においても同様に、エラスチン添加培養 1 週間時点で大きく増加しており、その後は漸減傾向にあると見て取れる。すべての細胞で同様の挙動を示しており、由来する組織ごとの差異は確認できなかった。

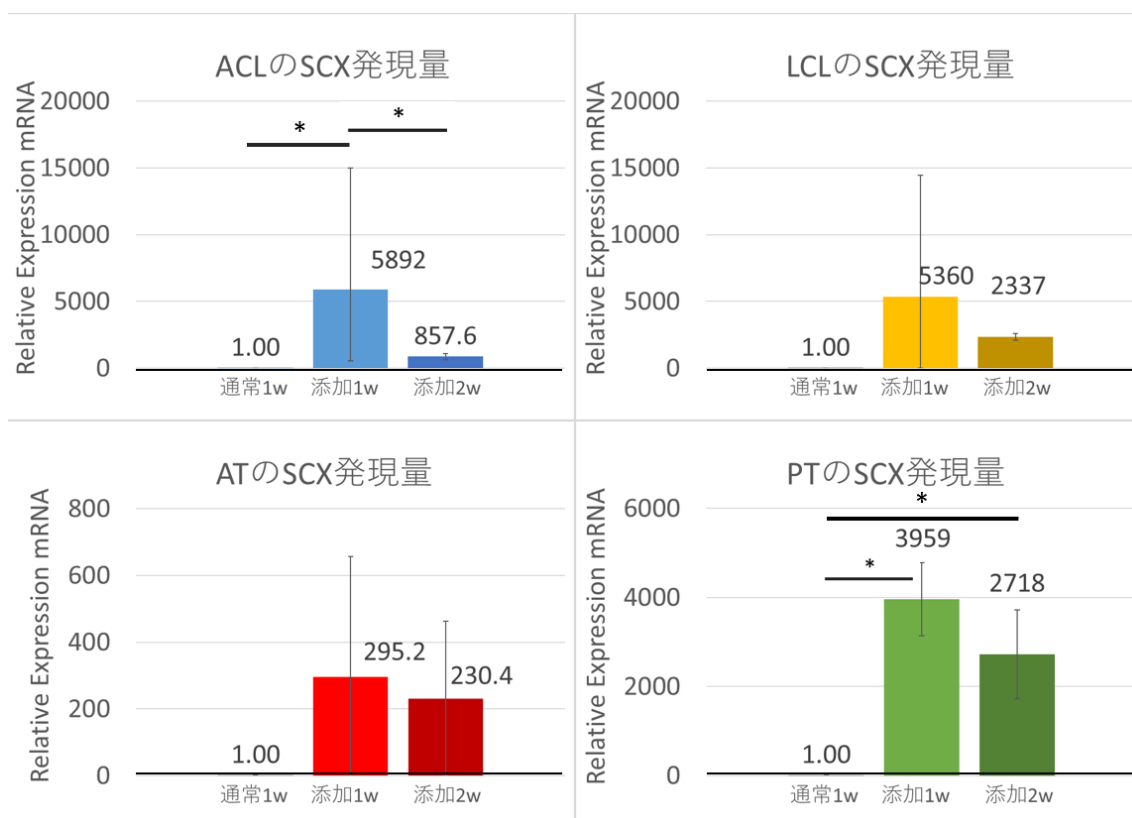


Fig 3-7 エラスチン添加培養した靱帯及び腱細胞における Scleraxis 遺伝子の通常培養に対する経時的な発現量比較 n=3 \*:p<0.05

### 3-2-3 エラスチン刺激に対する Tenomodulin の発現量比較

エラスチン添加培地で 1 週間または 2 週間培養した ACL、LCL、AT、PT の細胞において、靱帯・腱の成熟マーカーとして知られる、II 型膜貫通糖タンパク質であるテノモジュリン(Tenomodulin: TNMD)の遺伝子発現を調査した。それぞれ、通常培地で 1 週間培養した各細胞の TNMD 発現量に対して規格化した(Fig.3-8)。

ACL において、エラスチン添加培養 1 週間で発現量の増加が見られた。しかし 2 週間添加培養においては、通常培養時よりも約 0.3 倍の低い発現レベルを示した。

LCL、AT において、エラスチン添加培養 1 週間で発現量の大きな増加が確認できた。2 週間目時点では発現の低下が見られるものの、通常培養と比較して大きく増加している。

PT においては、エラスチン添加培養 1 週間で大きく発現が増加しており、2 週間目時点でも持続的な傾向を示した。

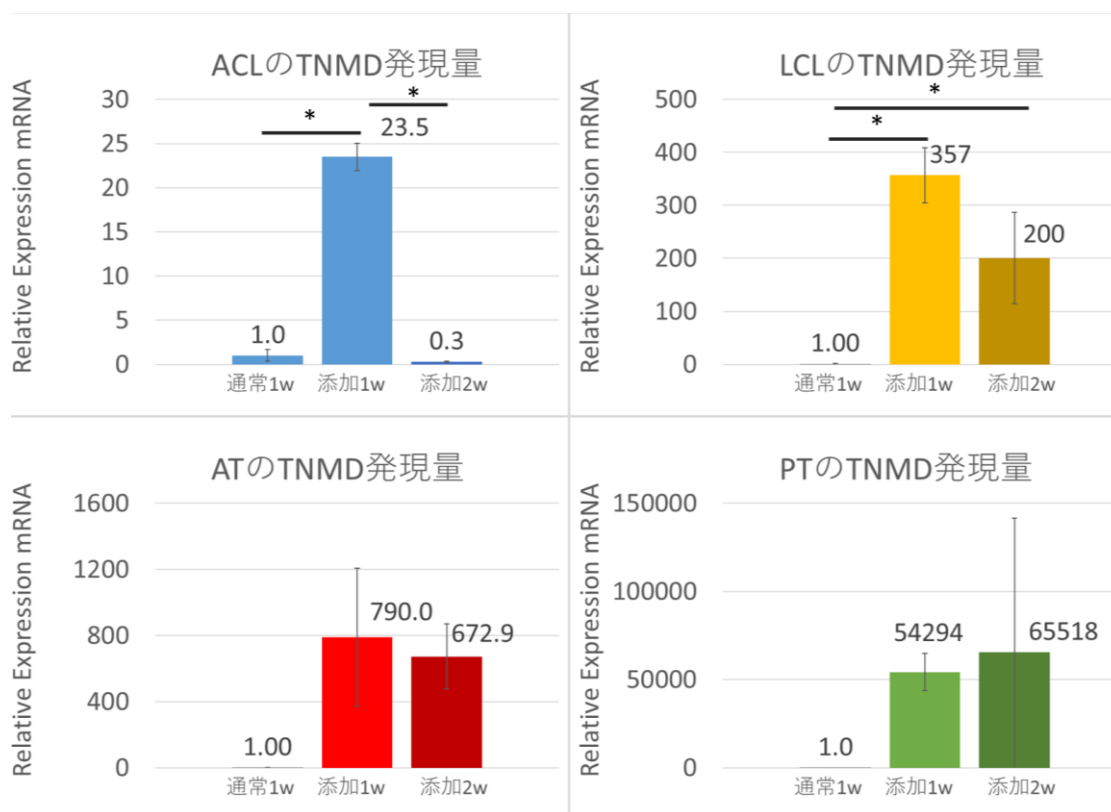


Fig.3-8 エラスチン添加培養した靱帯及び腱細胞における Tenomodulin 遺伝子の通常培養に対する経時的な発現量比較 n=3 \*:p<0.05

### 3-3 エラスチン添加刺激に対する細胞外マトリックス遺伝子発現量比較

#### 3-3-1 エラスチン刺激に対する Elastin の発現量比較

エラスチン添加培地で1週間または2週間培養したACL、LCL、AT、PTの細胞において、靱帯・腱において組成が異なることが確認されている細胞外基質であるエラスチン(Elastin: ELN)の遺伝子発現を調査した。それぞれ、通常培地で1週間培養した各細胞のELN発現量に対して規格化した(Fig.3-9)。

ACLにおいて、エラスチン添加培養1週間において一時的な減少が見られたが、エラスチン添加培養2週間目では大きく増加する傾向が見られた。

一方、LCL、AT、PTでは継続的な上昇が確認できた。



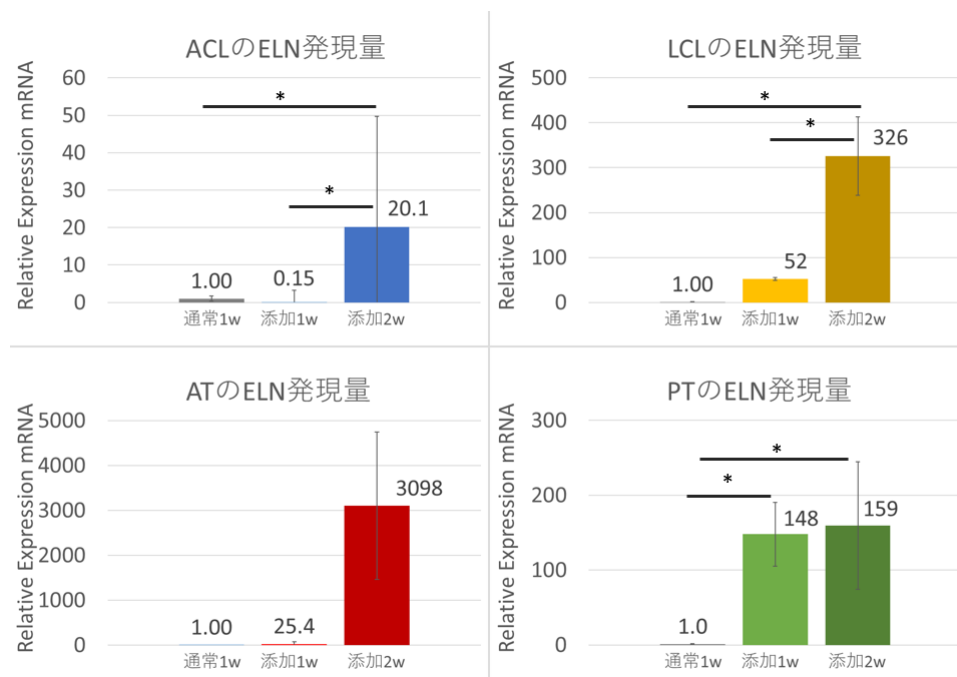


Fig.3-9 エラスチン添加培養した靱帯及び腱細胞における Elastin 遺伝子の通常培養に対する経時的な発現量比較 n=3 \*:p<0.05

### 3-3-2 エラスチン刺激に対する Collagen1 の発現量比較

エラスチン添加培地で1週間培養したACL、LCL、AT、PTの細胞において、靱帯・腱において組成が異なることが確認されている細胞外基質であるI型コラーゲン(Collagen1:Col1)の遺伝子発現を調査した。それぞれ、通常培地で1週間培養した各細胞のCol1発現量に対して規格化した(Fig.3-10)。2週間については結果が得られなかったため、省略する。

ACL、LCLにおいて、エラスチン添加培養1週間において大きく増加した。

一方、ATでは減少し、PTでは通常と同じレベルで発現していた。

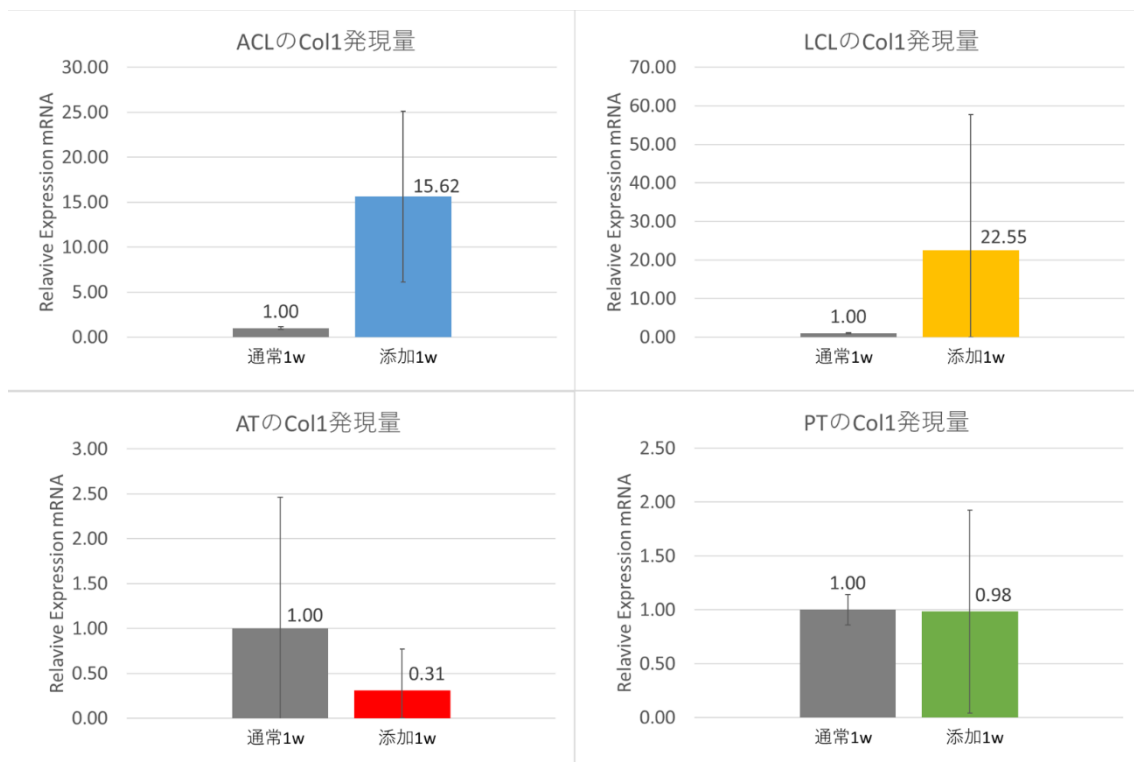


Fig.3-10 エラスチン添加培養した靱帯及び腱細胞における Col1 遺伝子の通常培養に対する発現量比較 n=3

### 3-3-3 エラスチン刺激に対する Fibrillin-1 の発現量比較

エラスチン添加培地で 1 週間または 2 週間培養した ACL、LCL、AT、PT の細胞において、靱帯・腱においてタンパク発現が異なる可能性のある細胞外基質であるフィブリリン-1(Fibrillin-1: FIB1)の遺伝子発現を調査した。それぞれ、通常培地で 1 週間培養した各細胞の FIB1 発現量に対して規格化した(Fig.3-11)。

ACL において、エラスチン添加 1 週間での大幅な増加が確認された。また、添加 2 週間では増加量は減少していたものの、通常培養と比較して約 20 倍の増加を見せた。

LCL では添加 1 週間、2 週間の両方で発現量が低下していた。

AT では添加 1 週間で約 0.3 倍の発現量まで低下し、2 週間でもそのレベルを維持していた。

PT では添加 1 週間で大きな変化が見られなかったが、2 週間では AT の 2 週間目と同じレベルの、約 0.3 倍にまで低下していた。

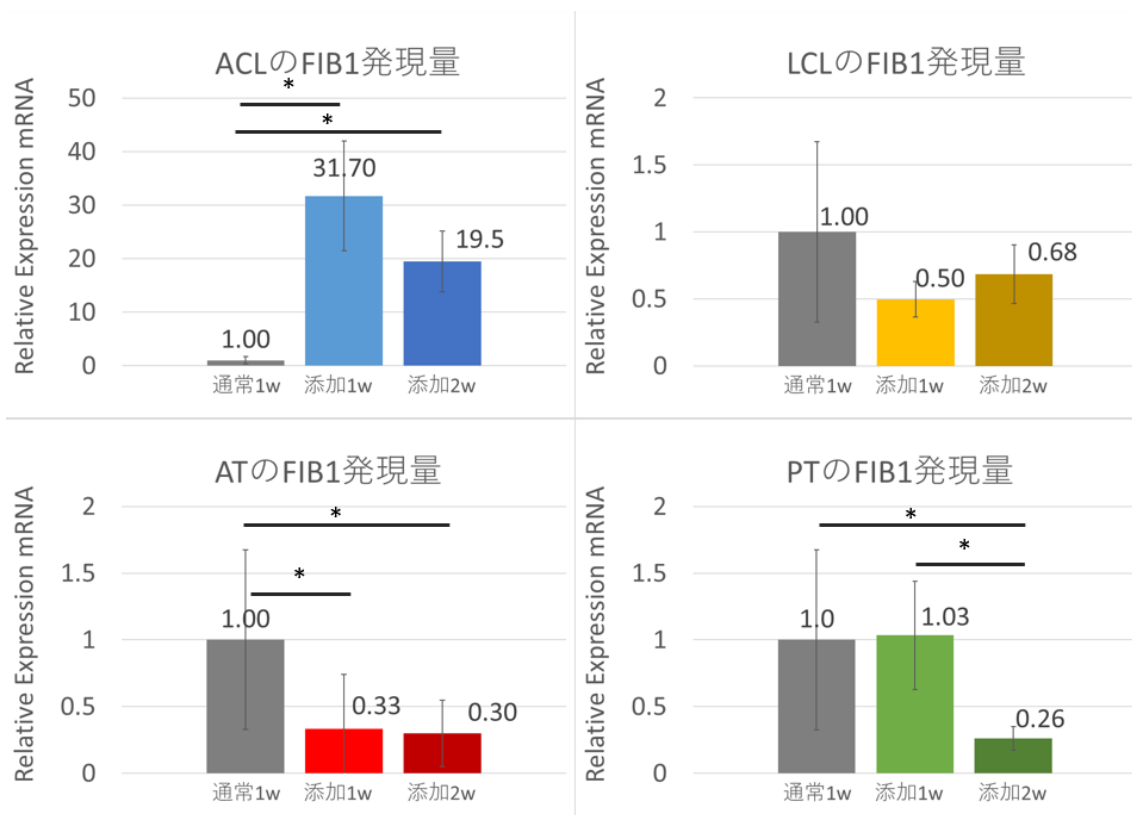


Fig.3-11 エラスチン添加培養した靱帯及び腱細胞における Fibrillin-1 遺伝子の通常培養に対する経時的な発現量比較 n=3 \*:p<0.05

### 3-3-4 エラスチン刺激に対する Fibrillin-2 の発現量比較

エラスチン添加培地で 1 週間または 2 週間培養した ACL、LCL、AT、PT の細胞において、靱帯・腱においてタンパク発現が異なる可能性のある細胞外基質であるフィブリリン-2(Fibrillin-2: FIB2)の遺伝子発現を調査した。それぞれ、通常培地で 1 週間培養した各細胞の FIB2 発現量に対して規格化した(Fig.3-12)。

ACL のエラスチン添加 2 週間では発現を確認できなかったが、すべての組織においてエラスチン添加 1 週間で増加しており、2 週間目の時点でも継続的な上昇を示した。

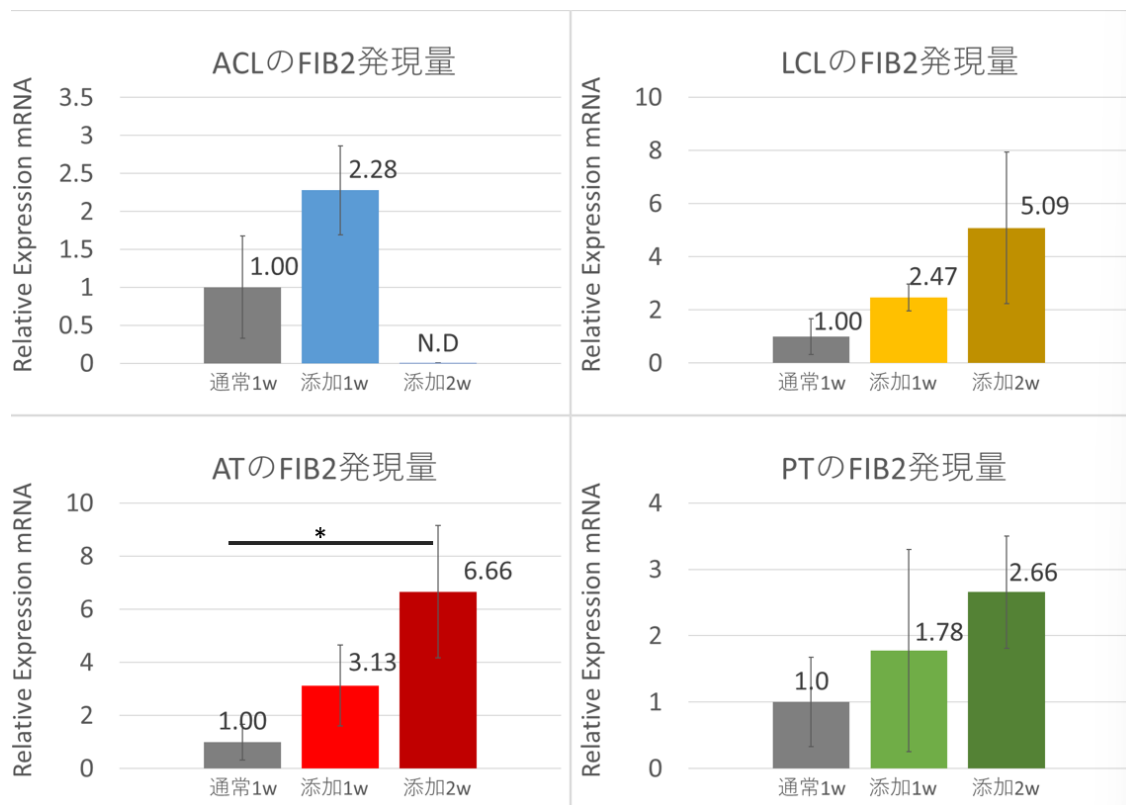


Fig.3-12 エラスチン添加培養した靱帯及び腱細胞における Fibrillin-2 遺伝子の通常培養に対する経時的な発現量比較(N.D は未検出) n=3 \*:p<0.05

## 4 考察

### 4-1 ウサギ細胞について

本研究で単離したウサギ細胞は、膝関節内の前十字靱帯、外側側副靱帯、アキレス腱、膝蓋腱の組織から移植片培養法によって単離された。靱帯組織は骨と骨を接続する組織であり、靱帯部分、靱帯-軟骨-骨のグラデーションとなる接続部分、骨部分からなっている。また、組織内には新陳代謝や再生のための前駆細胞が一定数保持されている。そのため、組織全体としては靱帯細胞のほかに、靱帯前駆細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞などが存在している。移植片単離の段階で、組織のトリミングは十分に行っているが、本実験で用いた靱帯細胞はこれらを含んでいる可能性がある。骨系の細胞の増殖能は靱帯細胞・靱帯前駆細胞に比べて低いため、本実験に用いた細胞は Passage4 の細胞群では十分に排除できていると考えられる。そのため、本実験での遺伝子発現は靱帯細胞と靱帯前駆細胞の合算値となる。

また、腱は筋と骨を接続する組織であり、微量ながら血管も存在するため靱帯よりも多種の細胞からなる組織である。こちらも十分なトリミングを行い、細胞形態も線維芽用であることを確認したため、本実験での遺伝子発現は腱細胞と腱前駆細胞の合算値となる。また、腱において、腱細胞よりも腱前駆細胞の増殖能が大きいことが分かっているため<sup>22)</sup>、結果には、用いた細胞群における前駆細胞の占める割合の差が影響している可能性がある。

また、本研究に用いたウサギは6週齢のジャパニーズホワイトラビットで、これは人間に換算すると約 2 歳となる。未成熟個体における一部の器官の細胞は、前駆細胞の占める割合が成熟個体と比較し大きいという報告があり<sup>21)</sup>、これらの影響も考えられる。

エラスチン添加刺激に対する靱帯・腱成熟細胞と靱帯・腱前駆細胞の応答性の差については明らかになっていないが、本実験においてのエラスチン刺激の影響は前駆細胞への影響の割合が成熟個体の組織に対して大きいと考えられる。

## 4-2 タンパク質産生と遺伝子発現の差異について

Fibrillin-3 の遺伝子発現解析では、質量分析で得られた結果と反して、LCL と比べ AT で大きく発現していた。この結果について、AT における相対発現量が約 0.04、約 0.58、約 5.2 であり、外れ値である約 5.2 が大きく影響していると考えられる。この影響を踏まえると、LCL と AT で同程度発現しており、実際の遺伝子発現に大きな差はないのではないかと考えられる。また、Fibrillin-2 の遺伝子発現解析では AT で非常に低い発現であったため、質量分析で得られた結果には Fibrillin-2 の発現比も少なからず影響しているのではないかと推測されるため、タンパク質の解析についても改めて確認する必要がある。

エラスチン添加培養によって差異のみられた Nestin は、添加 1 週間において LCL で相対発現量が低下する傾向を示し、AT で上昇していた。これは質量分析により得られた結果と一致する。

今回 Fibrillin-3 でタンパク質解析の結果と異なる遺伝子発現の結果が得られたことについて考察する。質量分析で得られた Fibrillin-3 に特異的な配列は YCVDLDECQTPGICVNG であったが、これと同じファミリーに属するタンパク質である Fibrillin-1, 2 の配列(Uniplot)と、LALIGN を用いて配列を比較したところ、類似する配列が Fibrillin-1、Fibrillin-2 に存在しており、Fibrillin-1 では 72.2%一致(94.4%相同)、82.4%一致(100%相同)であった (Fig 4-1,2)。Fibrillin-2 との相同性が高かったため、通常培養においての LCL と AT の差異は、Fibrillin-2 の発現が、タンパク質解析に影響している可能性がある。

```

                                620
Fibrillin-1の配列 EMBOSS YCKDINECETPGICMNGR
                                :: .....
同定された配列 EMBOSS YCVDLDECQTPGICVNGR
                                10
```

Fig.4-1 Fibrillin-1 における相同性の高い配列

```

                                660          670
Fibrillin-2の配列 EMBOSS YCTDVDECQTPGICMNG
                                .....
同定された配列 EMBOSS YCVDLDECQTPGICVNG
                                10
```

Fig.4-2 Fibrillin-2 における相同性の高い配列

### 4-3 エラスチン添加刺激に対する応答性の違いについて

#### 4-3-1 マーカー遺伝子発現量の変化

細胞は、膜表面の受容体を介して外界を認識している。受容体からのシグナル伝達物質を介して、核内に情報が伝達される。エラスチンの認識は、細胞表面の EBP(Elastin Binding Protein)や Integrin  $\alpha V \beta 3$  などによって行われることが分かっている(参考文献)。先行研究において、エラスチン添加によって ERK 経路が活性化されることが分かっている(Fig 4-3,左図)。一方、トランスフォーミング増殖因子  $\beta$ (TGF $\beta$ ) は、多くの細胞種で増殖や分化を制御するペプチドである。腱細胞は様々な細胞で産生された TGF $\beta$  や FGF などのシグナル伝達物質によって間葉系幹細胞から分化し、Scleraxis が発現する<sup>17)</sup>(Fig. 4-4)。一部の組織を除き、Scleraxis は組織の成熟とともに減少するが、成熟腱細胞であっても TGF  $\beta$  の添加によって Scleraxis が発現し、コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスの産生を行うことが分かっている(Fig4-3,右図)。本実験においてエラスチン添加によって Scleraxis の発現が増加したことは、この経路を通じて活性化されている可能性がある。

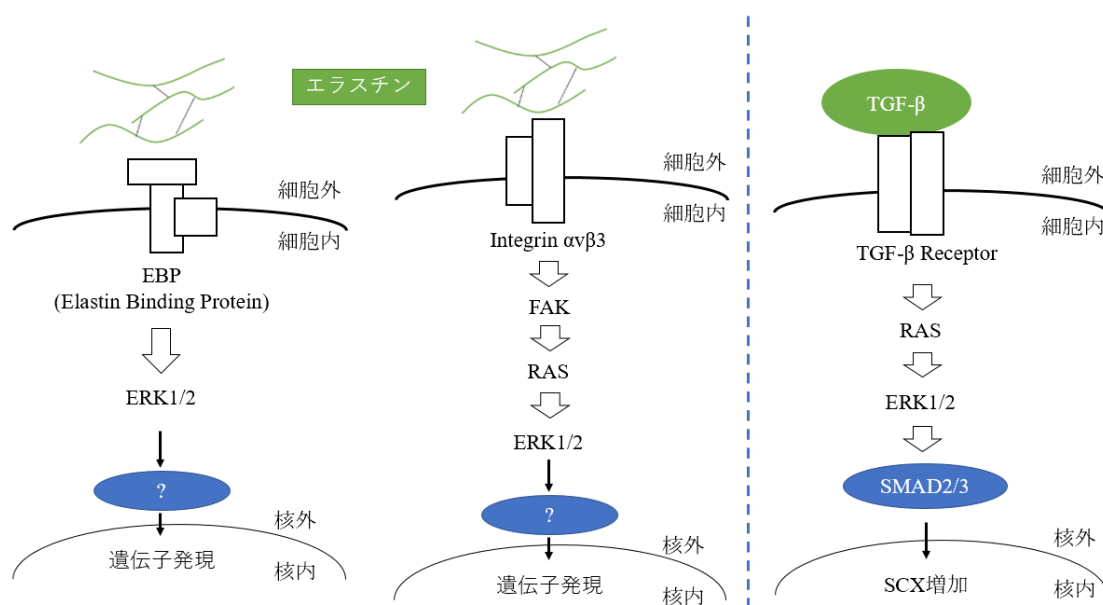


Fig 4-3 エラスチンと TGF  $\beta$  のシグナル伝達経路

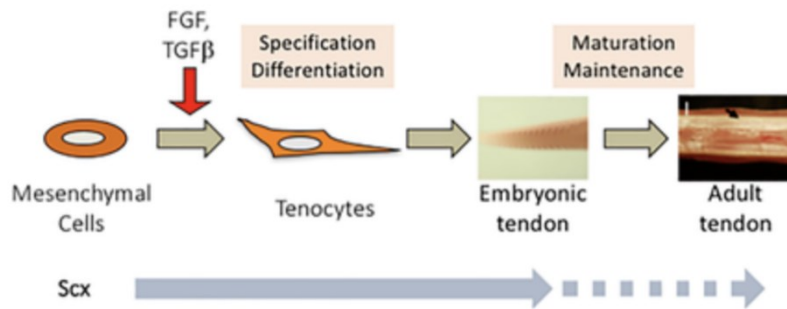


Fig. 4-4 腱成熟と SCX の発現

また、Scleraxis 欠損マウスでは靱帯・腱成熟マーカーである Tenomodulin の発現がほとんど消失することが分かっている<sup>25)</sup>。それによって腱の低形成が認められた領域では、細胞内のシグナル伝達分子である Smad1/5 及び Smad3 のリン酸化が減少していることから<sup>26)</sup>、Scleraxis シグナルの下流ではこれらが反応することで Tenomodulin の産生に関与している可能性がある。

また、エラスチンをノックアウトしたヒトの血管平滑筋細胞において、Notch 経路と呼ばれるシグナル伝達カスケードが下方制御されることが分かっている<sup>27)</sup>。そして、活性化された Notch 経路は転写因子である CBF1 を増加させることで、細胞内での Nestin 産生に寄与することが知られている。このとき CBF1 は SMAD2/3 に結合している。エラスチン添加刺激に対して Notch 経路が活性化されると考えると、Nestin の発現はこの経路に関与している可能性があると考えられる。以上をまとめると、本研究における Nestin, SCX, TNMD 発現の経路は次のように予想される(Fig4-5)。

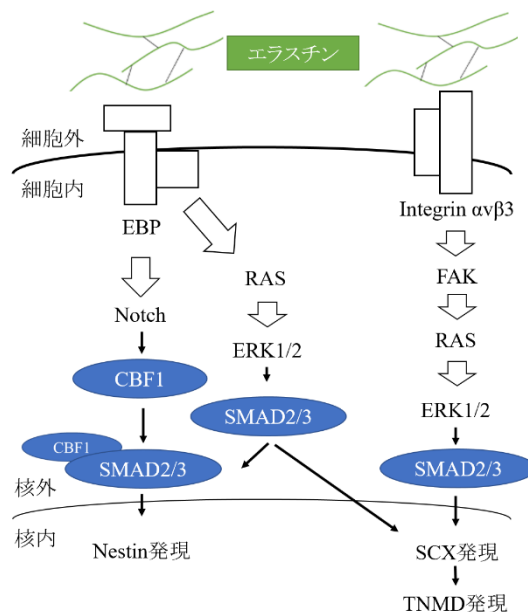


Fig 4-5 エラスチン添加刺激に対する Nestin, SCX, TNMD 発現の経路



本研究において、エラスチン添加による AT での Nestin 発現量上昇は、Nestin 陽性細胞が増加したことを示すのであれば、先行研究において TGF  $\beta$  によって Nestin 陽性細胞が増加した結果にも類似している<sup>28)</sup>。

ACL においても同様に、Nestin 陰性の細胞で発現されるようになったわけではなく、Nestin 陽性の細胞の増殖能が活性化された可能性がある。

LCL ではエラスチン刺激に対して減少傾向を示し、刺激が継続することでさらに減少傾向を示した。また、PT ではエラスチン刺激に対して Nestin の遺伝子発現量は変化しなかった。しかしながら、エラスチン刺激を長期間加えることで減少することが分かった。これらのことから、ACL・AT、LCL、PT ではエラスチン刺激に対する Nestin の応答性や反応経路が異なる可能性がある。

また、靱帯・腱特異的分子である Tenomodulin の発現量減少は、靱帯・腱の表現形を失っていることを示している。先行研究では、靱帯細胞・腱細胞はエラスチン刺激によって骨分化が促進されることが分かっているため、この結果は骨分化を示している可能性がある。そのため、骨分化マーカーである Runx2 の発現量比較が求められる。

また、ACL と AT において、グラフの概形がよく類似していることから、Nestin 、Scleraxis、Tenomodulin の遺伝子発現は関連した経路を通過しており、エラスチン刺激に対して変化する可能性が考えられる。

総括として、組織特異的分子の発現量は、ACL と AT において連動しており、エラスチン添加刺激に対して上昇し、継続的な添加刺激に対しては減少する傾向を見せた。また、継続的な添加刺激に対して発現量が減少する傾向は、PT での Tenomodulin 以外で共通して見られた傾向であった。

#### 4-3-2 細胞外マトリックス遺伝子発現量比較

Elastin 遺伝子の発現は、ACL において、エラスチン刺激に対する減少傾向を見せた。しかし、継続的なエラスチン刺激によって発現量の上昇が確認された。一方でそのほかの細胞群ではエラスチン刺激によって増加し、継続的な刺激に対しても上昇傾向を見せた。

ACL は LCL、AT、PT と比較して組織内のエラスチン含有率が高いことが分かっている<sup>27)</sup>。したがってエラスチン添加刺激が組織損傷のシグナルとして機能していた場合、ACL におけるエラスチン放出は軽微な損傷であってもほかの 3 つの組織と比べて大きいものとなる。したがってエラスチン添加刺激に対して組織再生が誘導された場合、エラスチン産生量が促されにくい可能性がある。継続的なエラスチン添加刺激に対してもほかの細胞と比べて、通常状態からの発現量の上昇率は低い。これらのことから ACL はエラスチン刺激に対する応答性が低い可能性がある。

全体の傾向としては継続的なエラスチン添加に対しての発現量の上昇がみられたことから、細胞間での差異は小さいと考えられる。

先行研究では Nestin の発現量と Elastin の発現量は正の相関関係にあることがわかっているが<sup>29)</sup>、エラスチン添加に対する応答性が異なったことから、通常状態における Elastin 遺伝子の発現とエラスチン添加刺激に対する応答では、反応経路が異なる可能性がある。

ACL においてエラスチン添加刺激によって Fibrillin-1 は有意に上昇し、継続的な刺激によって発現量は弱まったが、通常状態と比較しても有意に増加していた。これは Nestin、Scleraxis と連動する結果である。一方 AT ではエラスチン刺激に対して減少を示し、PT では継続的な刺激によって減少を示した。

Fibrillin-1 の変異によっておこるマルファン症候群とよく似た状態とされているロイス・デーツ症候群は TGF  $\beta$  シグナル伝達の異常な増加を引き起こすことが分かっている。TGF  $\beta$  シグナル伝達を活性化させた Fibrillin-1 欠損マウスとマルファン症候群患者では、Smad2/3 と Erk1/2 の両方が増加していたことから、エラスチン添加刺激に対する Fibrillin-1 の応答は、転写因子である Scleraxis の影響を受けている可能性がある<sup>13)</sup>。

Fibrillin-2 はすべての組織でエラスチン添加刺激に対する発現量の増加が確認できた。また ACL の添加 2 週間では発現が確認できなかったが、そのほかの組織では継続的な刺激に対する発現の増加が確認された。

これらの結果はエラスチン発現量の結果とグラフの概形が一致している。Fibrillin-2 は Fibrillin-1 の発現が低下しているときに代替物として産生されることが分かっている。エラスチン添加刺激に対して増加したのは組織に対してのダメージを感知したからであると考えられ、刺激に対して継続的に発現が上昇したのは、Fibrillin-1 が分泌されないため、その代替物として発現している可能性が考えられる。

総括として、靱帯細胞ではエラスチン刺激に対して Col1, Elastin, Fibrillin-2 の発現量が上昇していた。ACL においては Fibrillin-1 の上昇傾向が見られたが、LCL では発現が低下していた。

腱においてもエラスチン添加刺激に対して Elastin, Fibrillin-2 は発現を上昇させたが、AT では Col1, Fibrillin-1 が低下し、PT の Col1, Fibrillin-1 は変化しなかった。一方継続的な刺激に対してはどちらも Fibrillin-1 の発現量を低下させていることから、膝蓋腱は骨と骨をつなぐ組織でありながら、由来する腱の性質も持ち合わせていることが示唆された。

組織ごとに考えると、I 型コラーゲンの発現は、靱帯ではエラスチン添加刺激で上昇が見られたが、腱では見られなかった。

## 5 結論

1. 通常培養において、腱細胞と比べ靱帯細胞で Fibrillin の発現が高いことが示唆された。
2. エラスチン添加刺激により培養 1 週間においていずれの細胞もマーカー (Scx,Tnmd)の発現が上昇する傾向が見られ、Nestin とマーカーの連動は ACL および AT において観察された。
3. 経時的なエラスチン刺激によって Elastin および Fibrillin-2 の遺伝子発現がいずれの細胞においても上昇する傾向が示唆された。また、I型コラーゲンの発現は靱帯ではエラスチン添加刺激で上昇が見られたが、腱では見られなかった。

本研究で靱帯および腱細胞の明確な違いを明らかにするには至らなかったが、エラスチン添加刺激による Nestin とマーカーの連動が、損傷の多い ACL および AT で観察されたため、今後この相互作用を明らかにすることで、靱帯・腱再生治療の発展につながると期待される。

## 6 参考文献

- (1) Donald Voet 「ヴォート基礎生化学」第5版 p703
- (2) 赤池情報量基準を用いた遺伝子発現解析 門田幸二 生命情報科学研究センター 2003.6 p28
- (3) Use of Smooth Muscle Myosin Heavy Chain as an Effective Marker of Follicular Dendritic Cells Ioannis et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2019 Jan;27(1):48-53.
- (4) TGF- $\beta$ -Smad3 経路と転写因子 Sox9 による軟骨細胞分化調節 古松ら 岡山医学会雑誌 2010 年 122 巻 2 号 p. 95-99
- (5) Clinical application of pharmacogenetics. Brian B Spear et al, VOLUME 7, Trends in Molecular Medicine ISSUE 5, P201-204, MAY 01, 2001
- (6) Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. Hiroshi Asahara et al. The American Society for Bone and Mineral Research 16 June 2017
- (7) 順天堂大学医学部附属医院 HP 「膝前十字靱帯損傷」  
<https://hosp.juntendo.ac.jp/clinic/department/seikei/disease/disease13>
- (8) Ludovic Gaut, Delphine Duprez. Tendon development and diseases. WIREs Developmental Biology Volume 5, Issue 1 p. 5-23
- (9) Tendon injury and repair - A perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. Jess G. Snedeker. Acta Biomaterialia. Volume 63, November 2017, Pages 18-36
- (10) The past, present and future in scaffold-based tendon treatments. A.J. Lomas et al. Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 84, April 2015, Pages 257-277
- (11) Mechanical properties of the human achilles tendon. Tishya A L Wren. Clinical Biomechanics Volume 16, Issue 3, March 2001, Pages 245-251
- (12) Functional anatomy of the Achilles tendon, Mahmut Nedim Doral et al. Functional anatomy of the Achilles tendon. Volume 18, pages 638-643, 2010
- (13) Stem cell technology for tendon regeneration: current status, challenges, and future research directions. Pauline Po Yee Lui. Stem Cells and Cloning: Advances and Applications. Pages 163-174 | Published online: 11 Dec 2015
- (14) Visible Body Muscle Premium
- (15) Biomechanics of the knee extensor mechanism and its relationship to patella tendinopathy: A review, Michael Dan et al, Journal of orthopedic Research 03 August 2018

- (16) Tropoelastin-Coated Tendon Biomimetic Scaffolds Promote Stem Cell Tenogenic Commitment and Deposition of Elastin-Rich Matrix. Helena Almeida et al. ACS applied Materials and Interfaces 2019, 11, 22, 19830-19840
- (17) Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. Hiroshi Asahara et al. Journal of Bone and Mineral Research Volume 32, Issue 9 p. 1773-1782
- (18) 細胞外マトリックスタンパク質の架橋構造と生成機構。須山亨三。仙台大学紀要 39 (2), 145-160, 2008-03-01
- (19) Variations in internal structure, composition and protein distribution between intra- and extra-articular knee ligaments and tendons. Yalda A Kharaz et al. Journal of Anatomy Volume 232, Issue 6 p. 943-955
- (20) Proteomic Differences between Male and Female Anterior Cruciate Ligament and Patellar Tendon. Dianne Little et al. PLOS ONE May 2014 | Volume 9 | Issue 5 | e96526
- (21) Single-cell analysis reveals a nestin+ tendon stem/progenitor cell population with strong tenogenic potentiality. ZI YIN. SCIENCE ADVANCES 18 Nov 2016 Vol 2, Issue 11
- (22) Regional Differences in Stem Cell/Progenitor Cell Populations from the Mouse Achilles Tendon. Michael J. Mienaltowski,
- (23) Cell Adhesion to Tropoelastin Is Mediated via the C-terminal GRK RK Motif and Integrin  $\alpha V \beta 3$ . Daniel V Bax. Journal of Biological Chemistry GLYCOBIOLOGY AND EXTRACELLULAR MATRICES| VOLUME 284, ISSUE 42, P28616-28623, OCTOBER 2009
- (24) Aberrant TGF- $\beta$  activation in bone tendon insertion induces enthesopathy-like disease. Xiao Wang et al. The Journal of Clinical Investigation . 2018;128(2):846-860.
- (25) The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. Marc A Heim Molecular Biology and Evolution, Volume 20, Issue 5, May 2003, Pages 735-747
- (26) BMP and FGF regulatory pathways control cell lineage diversification of heart valve precursor cells. Joy Lincoln. Developmental Biology Volume 292, Issue 2, 15 April 2006, Pages 290-302
- (27) Molecular Pathways of Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. Joshua Boucher et al. Front. Physiol., 09 April 2012 Sec. Vascular Physiology.

- (28) Signaling Pathways Transduced through the Elastin Receptor Facilitate Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells. Satsuki Mochizuki et al. MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION| VOLUME 277, ISSUE 47, P44854-44863, NOVEMBER 2002
- (29) Comparison of water, hydroxyproline, uronic acid and elastin contents of bovine knee ligaments and patellar tendon and their relationships with biomechanical properties. A. Ristaniemi et al. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials Volume 104, April 2020, 103639

## 7 謝辞

本研究および、修士論文作成にあたり、ご指導、ご鞭撻のほどいただきました三重大学工学研究科 宮本 啓一 教授、晝河 政希 助教に深く御礼申し上げます。宮本先生には、実験に対する姿勢や、研究を進めるにあたり多くの助言をいただきました。晝河先生には、研究の方針や発表方法に始まり、たいへん多くのことを教えていただきました。

また、修士論文発表にあたり、副査を担当していただきました分子生物工学研究室の湊元 幹太 教授に深く感謝いたします。

MALDI-TOFMS や real-time PCR を行うにあたり、設備・装置の使用法および様々な質問にもお答えくださっ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も感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、これまでに卒業された先輩方、同期の青木星河くん、今井康暉くん、大森友貴くん、隅川彰斗くん、森裕馬くん、吉田颯真くん、吉田将明くん、特に「靱帯・腱」のテーマを同じくする川村隆也くん、中西亨允くん、金子竜也くん、石谷まりあさん、森陽祐くん、森山果音さんには多くの時間を割いて実験のサポートをしていただきました。本当にありがとうございました。

また、様々な形でサポートしていただいた村上節子さん、共に研究室生活を過ごした M1,B4 の皆様に感謝いたします。

最後に、大学生活の全体を支えくださった両親に感謝の意を示し、謝辞とさせていただきます。



## 8 付録

### 8-1 タンパク抽出法

#### <タンパク抽出液>

<input type="checkbox"/>	Urea	1.50g
<input type="checkbox"/>	Thiourea	0.75g
<input type="checkbox"/>	20%(w/v)CHAPS	0.50mL (0.10g)
<input type="checkbox"/>	Pharmalyte(pH 3-10; 使用ゲルの pH に合わせる)	0.10mL
<input type="checkbox"/>	Protease Inhibitor	10 $\mu$ L
<input type="checkbox"/>	Dithiothreitol(DTT)	0.05g

以上を Milli-Q で 5mL にメスアップする。

\*タンパク抽出液は DTT を入れずに 1mL ずつに分注し、冷凍庫で保存可能。

\*DTT は強力な還元剤であるため、使用直前に入れる。

#### <操作>

- ①空のアシストチューブの重量を測定する。
- ②培地を除いて、氷冷した PBS 1mL で 1 回容器内壁を洗浄する。
- ③洗浄した PBS を捨て、新たに PBS を 1mL 入れた状態で、氷上でセルスクレーパーなどを用いて細胞を掻き集め、アシストチューブへ移す。
- ④5000rpm、4℃、5 分間遠心する。
- ⑤遠心後、出来るだけ完全に上澄みの PBS を除き、細胞の湿重量を量る。  
(この時点で一回限り凍結保存してもよい。)
- ⑥湿重量に対して 4 倍量のタンパク抽出液を加え、氷冷下で超音波破碎する。
- ⑦15000rpm、4℃、20 分間遠心を行い、上清を採取し、これを試料とする。

#### <試料の調整の注意点>

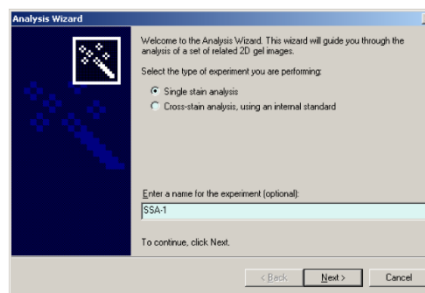
- \*試料を調整したら 1 時間以内に電気泳動を行う方が良い。
- \*タンパク定量を行う場合は、電気泳動と並行して残った試料で定量を行うと良い。
- \*試料によっては抽出物の状態で保存したものを使用すると、超低温条件下で保存した場合でも再現性が得られない場合がある。保存するときは、組織、細胞など破碎をする前の状態で凍結保存すると良い。

## 8-2 Progenesis PG200/PG220

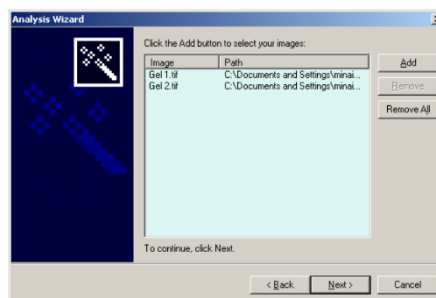
Progenesis は二次元電気泳動ゲル画像を比較して、ディファレンシャルなタンパク質スポットを判定する為の解析ソフトウェアである。

### <設定手順>

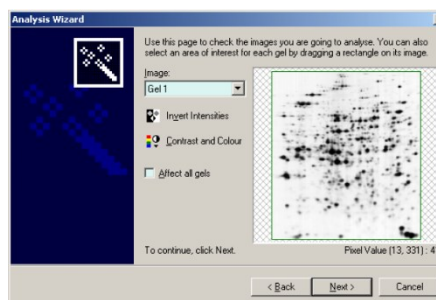
- ① Progenesis PG200/PG220 を起動する。
- ② Single stain analysis 実験を選択し、実験名(日付でも良い)を入力し、Next をクリックする。



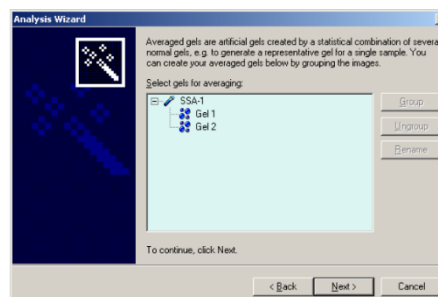
- ③ 画像を選択する。Add ボタンをクリックするとファイル選択画面が開き、必要な画像を選択し、Next をクリックする。



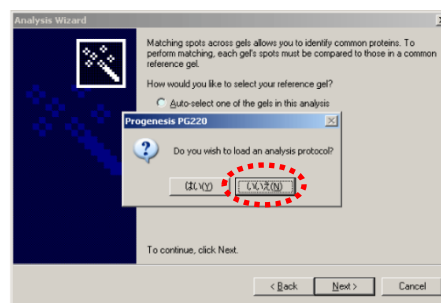
- ④ ゲル画像がプレビューされ、解析する範囲を選択し、Next をクリックする。(2 枚目の画像は Image プルダウンメニューから表示させることができる。)



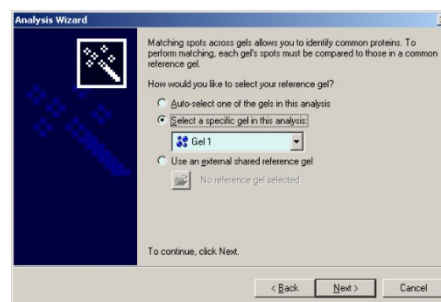
- ⑤ 平均化画像を作成するウィザードが開かれるが、2 枚の画像比較の場合は何もせずに Next をクリックする。



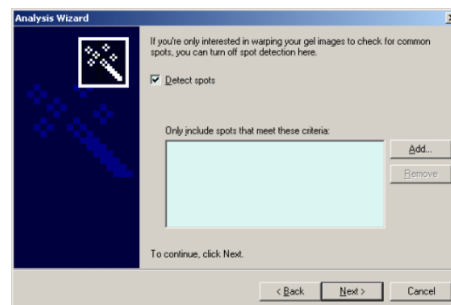
- ⑥ 解析プロトコルをロードするかどうかのアラートが表示されるが、ここではロードせずに No を選択した後、Next をクリックする。



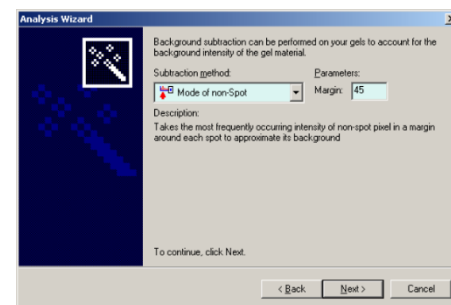
- ⑦ リファレンス画像を選択し、Next をクリックする。



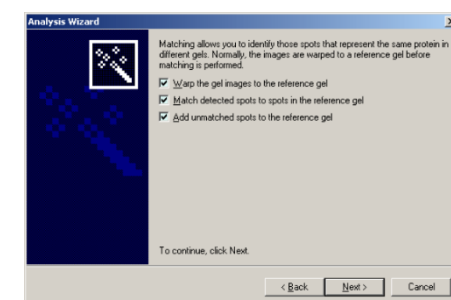
スポット検出にチェックを入れ、Next をクリックする。



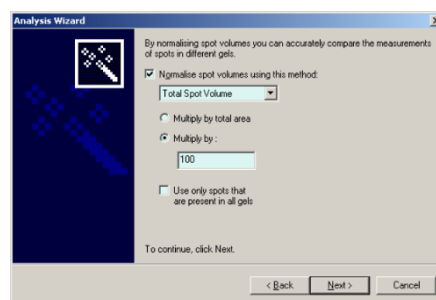
- ⑧ バックグラウンド差分の手法を選択するが、ここではデフォルトで選択されている手法ならびにパラメーターをそのままにし、クリックする。



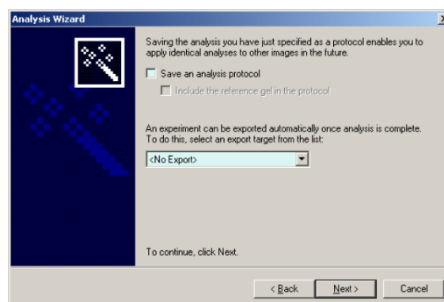
- ⑨ ワーピングとマッチングの確認を行うため、いずれもチェックが入っていることを確認し、Next をクリックする。



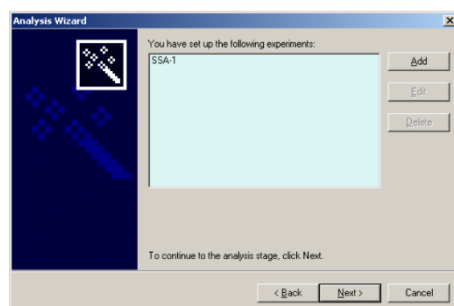
- ⑩ ノーマライゼーションの手法を選択するが、ここではデフォルトで選択されている手法ならびにパラメーターをそのままにし、Next をクリックする。



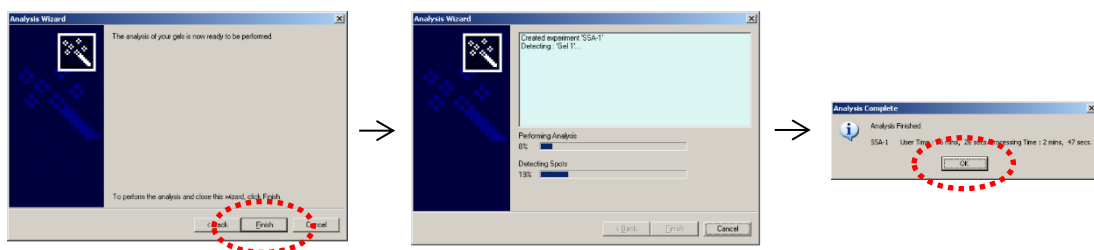
- ⑪ 解析プロトコルの保存を確認するウィザード画面が表示されるが、ここでは保存しないのでチェックを入れずに Next をクリックする。



- ⑫ 設定した実験に加え、必要ならば他の実験も加えることができるが、ここでは設定した実験のみ実施するので選択せずに **Next** をクリックする。



- ⑬ ウィザードの最後の画面が表示され、**Finish** をクリックし、自動解析を実行する。



## <画像解析>

ここでは自動解析後の基本的な表示とスポット編集について取り上げる。詳細は「Progenesis PG200/PG220 操作説明書」に記載。

## 内容

A)ソフトウェアインターフェイスの概要




B)スポット比較(ワーピングの確認)

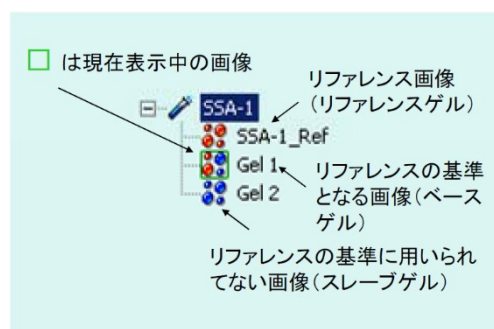


C)スポット編集(スポット数の確認)

## 操作

A) ソフトウェアインターフェイスの概要

- ✓ 解析ウィザードによる自動解析が終了すると解析が表示され、画像の左側にはナビゲーターがあり、実験ビュータブをクリックすると実験構成を確認できる。
- ✓ 実験ビューに表示されるアイコンを右図に示す。緑色の四角の枠は現在表示している画像を示している。
- ✓ メニューツールバーにはスポット編集ならびにスポット検出のためのツールが用意されている。またプログラムウィンドメニューのセレクトバーはいずれもそれぞれ新しいウインドが開く。
- ✓ イメージウインドにあるズームフィットボタン  をクリックすると、ウインドサイズに画像全体が表示される。



## B) スポット比較(ワーピングの確認)

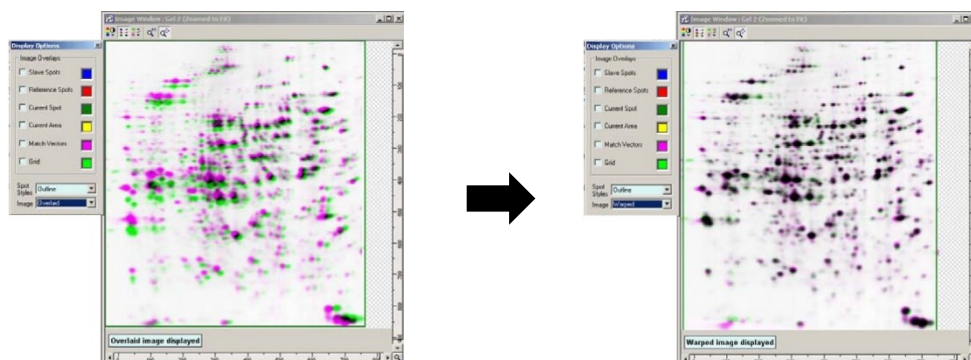
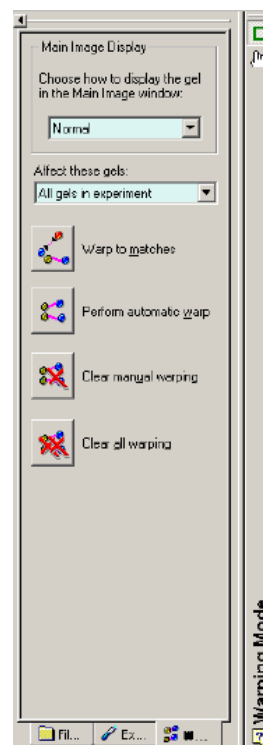
1. メインツールバーのワーブゲルボタンをクリックするとナビゲーターがワーピングモードに変わり、サブモードツールバーを確認することができる。


\*メインツールバーのイメージドロップダウンリストから画像表示を Gel 1 から Gel 2 に変更する。

2. 画像のイメージウインドツールバーにあるディスプレイオプションボタンをクリックするとダイアログボックスが表示され、現在表示されている項目にチェックが入っていることが分かる。

3. チェックを全て外し、イメージ表示をドロップダウンリストの Normal から Overlaid に変更すると現在の画像(Gel 2)が緑色に、リファレンス画像(Gel 1)が紫色に表示されるオーバーレイ表示になる。

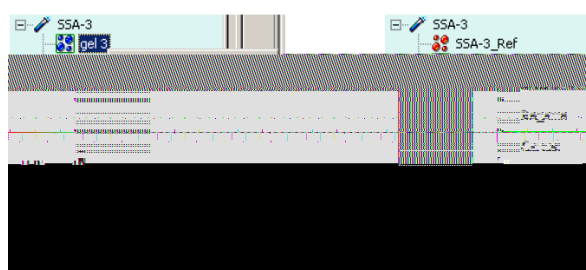
\*灰色、もしくは黒になったスポットワーピングが成功したスポット、緑や紫のままのスポットは画像間で違いのあったスポットである。





4. オーバーレイ表示およびワープ表示の色調を変更するには、イメージウインドツールバーにあるコントラスト&カラーボタン  をクリックして調整できる。

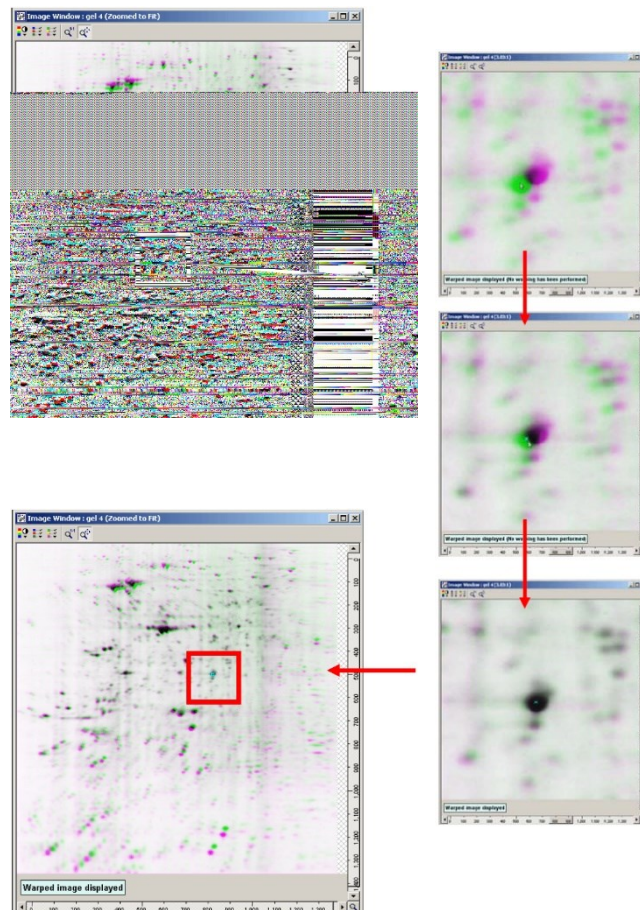
### <手動によるワーピング最適化>

1. 解析ウィザードによる自動解析を行わない場合はリファレンスが存在しないので、リファレンス画像を作成する。Experiment タグの Gel 3 を右クリックし、Create Reference を選択し、リファレンス画像を作成する。





2. ワーピングボタン  をクリックしワーピングモードに入る。
3. 表示画像は Gel 4 を選択した後、ナビゲーターの Main Image Display を Warped に変更し、Affect these gels はドロップダウンリストから Current gel を選択する。
4. サブモードツールバーから手動ワーピングボタンを選択する。
5. カーソルアイコンが緑色の矢印に変わり、ドラッグ&ドロップでランドマークを設定できるようにする。
6. ズームツールを使用し、選択範囲を拡大表示する。  
\*緑色が現在のゲル画像で、紫色がリファレンス画像
7. 緑色のスポットをドラッグし、対象のスポットを少し移動させると、その他の緑色のスポット全てが移動する。目的のリファレンスの位置でマウスボタンを離しドロップすると青い十字(ワープベクター)がランドマークとして表示される。  
\*Zoom to Fit ボタン  で画像全体を表示することができる。





C) スポット編集(スポット数の確認)

1. 左上の Edit を選択し、Chose reference gel を選択する。
2. ツールバーの Create a new gel を選択し、Next をクリック。
3. Gel の名前にスポット数が表示される。

<補足>

- 本電気泳動装置(Anatech 製品)は 2012 年 6 月に納品されたものである。
- 本プロトコルは Anatech のプロトコルを基に本研究室用にアレンジしたものである。
- 更にプロトコルの詳細を見るときや、変更点がある場合は Anatech のプロトコル(橙色のプロトコル 4 部)を参照のこと。
  - プロトコル 4 部
    - クールホレスター IPG-IEF Type-PX
    - コンスタントパワーサプライ パワーホレスター Pro3900
    - SDS-電気泳動装置 クールホレスター SDS-PAGE Dual-200K
    - SDS-PAGE 用ゲルメーカー 37/200、28/200、36/160
- また、タンパク抽出や画像解析等で分からないことがある場合は Anatech 株式会社の古賀正信に e-mail もしくは HP から(e-mail アドレスは以下)質問をするとよい。

Anatech 株式会社

営業部 古賀 正信

E-mail: [koga-m@anatech.co.jp](mailto:koga-m@anatech.co.jp)

URL: <http://www.anatech.co.jp>

Tel: 03-3812-8701

Fax: 03-3818-9167

〒113-0034 東京都文京区湯島 2-31-15

### 8-3 LALIGN による相同性調査

＜操作＞

1. 目的のタンパク質の配列を National Center for Biotechnology Information にアクセスして入手する。
2. EMBL-EBI の LALIGN サービスにアクセスし、一方に相同性を求めたい配列を、もう一方に MALDI-TOFMS で同定された配列を入力する。