

# レーザーマイクロダイセクション・プロテオーム解析を用いた、 椎間板変性の分子病態解析

江角眞理子<sup>1)</sup>, 海老原貴之<sup>2)</sup>, 山口裕美<sup>1)3)</sup>, 楠美嘉晃<sup>1)</sup>,  
黒田和道<sup>4)</sup>, 尾花ゆかり<sup>1)</sup>, 徳橋泰明<sup>2)</sup>

## Molecular pathophysiology of intervertebral disc degeneration analyzed by proteomics of laser-microdissected samples

Mariko ESUMI<sup>1)</sup>, Takayuki EBIHARA<sup>2)</sup>, Hiromi YAMAGUCHI<sup>1)3)</sup>, Yoshiaki KUSUMI<sup>1)</sup>,  
Kazumichi KURODA<sup>4)</sup>, Yukari OBANA<sup>1)</sup>, Yasuaki TOKUHASHI<sup>2)</sup>

### 要旨

ヒト椎間板変性を病理組織学的に5つに分類し、各々のサンプルを顕微鏡下レーザーマイクロダイセクションにて採取した。各組織サンプルに存在するタンパク質をLC-MS/MS解析にて同定した結果、線維輪では変性に伴い、proteaseおよびprotease inhibitorなどが減り、collagen VIやperiostin (osteoblast specific factor)が特徴的に出現していた。髄核では変性に伴い、補体因子、血清たんぱく質など様々なタンパク質が出現し、一部の変性に免疫応答が関連することが示唆された。骨化変性部位では血液細胞浸潤、補体成分が特徴的に観察され、免疫応答や炎症反応が骨化変性に関わる可能性も考えられた。以上、特徴ある様々な椎間板変性像に特異的タンパク質の出現を同定できた。レーザーマイクロダイセクション・プロテオーム解析が、生体局所における病変の本態解明に有用な手段であることが示された。

### 1. はじめに

本研究ではレーザーマイクロダイセクションとプロテオミクスの融合技術(ここではマイクロプロテオミクスと呼ぶ)を使って、腰椎椎間板変性の病態をタンパク質レベルで起こる変化として解明する。我々は肝疾患病態をタンパク質レベルの変化から捉え、病態の機序や診断・治療・予防のターゲット分子を解明してきた。たとえば肝細胞癌の再発の難易に関わる分子や、肝炎ウイルス量の違いに関連するウイルス制御分子である。どちらもmRNAやタンパク質の発現変化を網羅的に解析し比較する「疾患オミクス」を導入している。が、これらの解析結果から、病態を捉える組織は思いのほか多様であり、オミクス解析にはより詳細な細胞の識別、組織中の局在、微小環境の把握が、重要であるとわかってきた。一方我々は、急増する高齢者運動器疾患にみられる軟骨組織変性機序について、組織学的分子生物学的研究を行っている。これらの組織は自然修復能

が乏しく、有効な薬物療法もないのが現状である。最近、健全と思われる腰椎でも場所により、また椎間板の内部(髄核)や外側(線維輪)によって、多少の変化や変性が起こっていることがわかってきた。限られた微量な試料だけに、タンパク質の量的変化を効率的にしかも包括的にとらえる必要がある。そこで本研究では、さまざまな変化を示す椎間板について、マイクロプロテオミクスを導入する。包括的にタンパク質発現の変化を捉えることにより、病態を分子レベルで明らかにし、予防・治療のターゲット分子候補を提案する。

### 2. 対象および方法

死後5時間以内のヒト剖検例15例を対象とした。5つある腰椎椎間板のうち上位と下位の2か所(L1/L2, L4/L5)を様々な年齢の症例から29か所採取した。固定・脱灰・包埋し、薄切後HE染色で変性の程度を評価した。椎間板周囲の線維輪(AF)と中央

1) 日本大学医学部病態病理学系病理学分野  
2) 日本大学医学部外科系整形外科学分野  
3) 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野  
4) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野  
江角眞理子: esumi.mariko@nihon-u.ac.jp

の髄核 (NP)に分け、それぞれに起こる変性を組織学的に分類した。変性度 (severe/mild)によりAFs, AFm, NPs, NPmそしてOS (AF内層骨化変性)に分類した。各代表的部位を4検体ずつレーザーマイクロダイセクションで採取した。検体をRapiGestで溶解後にトリプシン消化を行い、ペプチドをLC-MS/MS解析した。タンパク質同定はMascot/Swiss-Protで行い、発現タンパク質の比較解析に Scaffold3を用いた。

### 3. 結果および考察

11300~14300のマスシグナル数から64~482個のタンパク質が同定された。全体にシグナルの割に同定タンパク質数が少ない。AFmとNPmでは同定タンパク質数は $142 \pm 53$ 個と $157 \pm 27$ 個とでほぼ変わらないが、肝臓組織 (32000シグナル数に対し2200個のタンパク質数)に比べるとかなり少ない。椎間板組織には糖鎖など修飾を受けたタンパク質が多く未同定のシグナルが残されている可能性、また限られたタンパク質の発現量が極めて多いため、他の組織に比べ発現タンパク質種が極度に少ないことが考えられた。さらに変性がひどくなると、AFsでは $99 \pm 35$ 個、NPsでは $328 \pm 50$ 個、OSでは $355 \pm 86$ 個と同定タンパク質数の増減がみられた。AFsでは少なくとも、NPsおよびOSでは2倍に増えた。AFでは変

性に伴い、恒常性維持に発現していたと思われるタンパク質—特にproteaseおよびprotease inhibitorなどが減り、collagen VIやperiostin (osteoblast specific factor)が特徴的に出現していた。これらはAF変性関連分子として特徴づけられた。NPでは変性に伴い様々なタンパク質が出現した。中でも無血管野でありながら補体因子、血清たんぱく質などが出現し、一部の変性には免疫応答が関連することも示唆された。OSでは骨化変性に伴い周囲に血液細胞浸潤がみられ、補体成分など血清たんぱく質が意外にも特徴的に出現していた。免疫応答や炎症反応が骨化変性に関わるか、興味深いところである。

以上、特徴ある様々な椎間板変性像に特異的タンパク質の出現を同定できた。今後症例数を増やし、これらの分子が普遍的変性関連分子であるか証明する必要がある。本研究から、レーザーマイクロダイセクション・プロテオーム解析が、椎間板変性をはじめとして、生体局所におこる病変の本態解明に有用な手段であることが示された。

### 4. 学会発表

海老原貴之, 山口裕美, 江角真理子ほか, ヒト剖検例椎間板組織の多様性とそのプロテオミクス。第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月; 福岡。