

Thesis

プロテオーム解析による咀嚼筋腱膜過形成症患者の 側頭筋腱に特異的に発現するタンパク質の同定

臨床医学研究系 口腔外科

中本 文

【目的】咀嚼筋腱膜過形成症は、側頭筋の腱や咬筋の腱膜などが過形成するために、筋の伸展を妨げて開口制限を呈する新しい疾患である。組織学的には正常な腱組織の過形成とされているが、病態について不明な点も多い。本研究では、腱組織のプロテオーム解析により本疾患に特徴的に発現するタンパク質を見出し、病態を解明することを目的とした。

【対象と方法】対象は、疾患群として本疾患患者3名、対照群として開口制限のない顎変形症患者3名の側頭筋腱組織とした。各組織に対してタンパク質の二次元電気泳動を行い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) / 飛行時間型質量分析計 (Time of Flight Mass Spectrometry) (MALDI/TOF MS) を用いたペプチドマスフィンガープリンティング分析 (PMF分析) を行なった。

【結果】同定された24のタンパク質のうち、対照群との比較において疾患群で特徴的な発現がみられたのは、fibrinogen fragment D、 β -crystallin A4、myosin light chain 4の3つであった。

【結語】本研究で特徴的な発現がみられたタンパク質が組織の線維化や腱細胞の機能低下、ストレスに関連していることから、組織学的には正常に見えても、タンパク質レベルでは正常でないことが考えられ、これらのタンパク質が本疾患の有用な診断マーカーとなることも考えられた。

緒 言

咀嚼筋腱膜過形成症は側頭筋の腱や咬筋の腱膜などが過形成するために、筋の伸展を妨げて開口制限を呈する新しい概念の疾患である。

開口制限を呈する疾患は顎関節症や筋突起過長症など種々存在するが、腱ならびに腱膜の変化が主因と考えられる開口制限を呈する疾患が初めて報告されたのは2000年のことである¹⁾。2008年の日本顎関節学会学術大会シンポジウムでは、名称・診断・治療・病理所見などについて検証され²⁾、以降、本邦では徐々に周知されてきたものの国際学会誌上での本邦以外からの報告は未だみられていない^{3,4)}。

本疾患の開口制限は緩徐に進行し、一部の患者では下顎角の張り出しによる特徴的な square mandible 顔貌を呈することもある。現在最も有効な診断方法は、咬筋前縁部の張り出しの触知である。治療は全身麻酔下での腱および腱膜切除術であり、開口訓練を適切に行えば長期的な予後も良好である³⁾。しかしながら、

現時点で病態は不明な点も多く、正確な診断基準も確立されていない。

千場らは咬筋腱膜切除標本を組織学的に観察し、本疾患の腱および腱膜に炎症性変化や基本的構造の異常はなく、正常な腱組織であることが支持されるとした⁵⁾。しかしながら、臨床的には腱ならびに腱膜切除中に剪刀で腱を切離する際に音がするほど腱組織が硬固であり³⁾、何らかの病理学的変化が生じている可能性があると考えられる。また、本疾患は必ず両側性に発症することや、学童期より発症する症例もあることから先天的要因があることも考えられる。

今回我々は、本疾患の病態究明ならびに有用な診断マーカーを模索することを目的とし、本疾患患者ならびに対照患者の側頭筋腱組織の二次元電気泳動を行ない、MALDI/TOF MSによるPMF分析により本疾患に特有に発現するタンパク質の同定を行ったので報告する。

材料および方法

対象

疾患群は側頭筋腱切除および咬筋腱膜切除を施行

した本疾患患者3名(女性3名:35歳, 41歳, 44歳)とし, 対照群は下顎枝矢状分割法による外科矯正法を行った腭の異常及び開口制限のない顎変形症患者3名(女性1名:25歳, 男性2名:19歳, 29歳)とした。両群ともに, 他の内科的基礎疾患, 関節疾患, 代謝性疾患を有さないものとした。組織検体は, 手術時に切除した筋突起周辺の側頭筋腱とした。

なお, 本学倫理委員会の承認(埼玉医科大学医学部倫理委員会承認番号No.595)を得た上で, 該当患者に対して本研究に関する十分な説明を行い, 研究に対する同意を得た。

サンプル処理

採取組織に付着している筋組織を可能な限り除去した後, SKミル(トッケン社)で凍結破碎し, 抽出バッファー(7M urea, 2M thiourea, 30 mM Tris, 3% 3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate, 1% Triton X-100)にて溶解した。その後, 遠心分離を40,000 rpm, 20℃, 60分間行ない, 採取した上清をSlide-A-Lyzer Dialysis Cassettes kit, 3.5 K 分画分子量, 0.5-3 ml (Thermo Scientific Pierce 社)にて透析した。減圧遠心濃縮装置(Thermo Scientific 社)にて乾燥させたものを再溶解し, Pierce 660 nm Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce 社)にて蛋白定量を行い, 1解析あたり1 mg 蛋白量に調整した。

電気泳動

電気泳動は, Hirosawaらの報告に一部準じた方法で行なった⁶⁾。一次元電気泳動は膨潤液(8 M urea, 2% 3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate, 2% Immobilized pH gradient buffer, 0.3% dithiothreitol, a few grains of bromophenol blue dye)とサンプルを混和したものでImmobilized pH gradient (IPG) strips pH 3-10 L, 18 cm (GE Healthcare 社)を12時間膨潤させた。Ettan IPGphor II (GE Healthcare 社)を使用し, プログラムは100 Vで2時間(step-and-hold), 500 Vで1時間(gradient), 1000 Vで1時間(gradient), 8000 Vで1時間(gradient), 8000 Vで40時間(step-and-hold)とした。一次元電気泳動を終えたIPG stripを, 最初に平衡化バッファー(50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, and 2% sodium dodecyl sulfate, bromophenol blue)に0.2% dithiothreitolを加えた溶液に浸け20分間静置し, 次に4% iodoacetamideを加えた溶液で同様に処理した。二次元電気泳動はExcelGel SDS XL Gradient 12-14%, 245 cm × 180 cm (GE Healthcare 社)を用い, Multiphor II 2-D (GE Healthcare 社)にて1000 V, 20 mA, 40 Wで45分間, 1000 V, 40 mA, 40 Wで5分間, 1000 V, 40 mA, 40 Wで160分間のプログラムで施行した。

画像解析

Coomassie Brilliant Blue G-250にて染色を行ったものをGS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD 社)

にてスキャンし, PDQuest 2-DE Gel Analysis software (Version 7.10, BIO-RAD 社)にて画像解析を行い両者間の蛋白スポットの差異解析を行った。

インゲル消化, データベース解析

切り出したゲルに50% methanolを100 µL加え, 超音波装置に10分間かけた後に液を除去した。これを4回繰り返した後, 50% acetonitrile, 100% acetonitrile, 50 mM ammonium bicarbonate, 100% acetonitrile, 50 mM ammonium bicarbonate, 50% acetonitrile/50 mM ammonium bicarbonateの順で, それぞれ100 µLを加えて10分間室温で放置した後に液を除去した。その後, 100% acetonitrileを100 µL加え, 室温で10分間放置後に液を除去する操作を2回行い, 最後の液は十分にに取り除き自然乾燥させた。続いて, trypsin (Promega 社)を50 mM ammonium bicarbonateで希釈したものを5 µL加え, 密封し37℃で一晩インキュベートした。翌日, 45% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acidを15 µLを加え, 超音波装置に10分間かけた後, 液を回収する操作を2回行い, 回収した液を減圧遠心濃縮装置(Thermo Scientific 社)にて20分間遠心濃縮後, 0.1% trifluoroacetic acidを5 µL加えた。このようにして抽出したサンプルをMALDI-TOF MS(島津製作所)にて解析を行ない, 得られた結果をデータベース(MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html))を用いてタンパク質の同定を行なった。

結 果

疾患群, 対照群ともに症例ごとの泳動パターンには共通性がみられ, 全症例で発現量の違いがみられたのはスポット5, 7, 11, 14, 19, 24であった(図1A~E)。

差異スポットを含め, 切り出し可能であったスポット全てをMALDI/TOF MSによるPMF解析を行った結果, 全部で24の蛋白質を同定し得た(表1, 2)。共通して発現していたのは, VI型コラーゲン(スポット1), アクチン(スポット9, 10), ミオシン(スポット15~17), などであった。対照群との比較において, 疾患群で増加したスポット5, 7, 11, 14はfibrinogen fragment Dと同定され, スポット19はβ-crytsallin A4であった。疾患群で減少したスポット24はmyosin light chain 4であった。

考 察

プロテオーム解析とは, 構造と機能を対象としたタンパク質の大規模な研究のことであり⁷⁾, 特にタンパク質の機能や疾病との関わりを明らかにするプロテオーム研究が注目を集めている⁸⁾。二次元電気泳動はプロテオーム解析の手法の中心的な役割を担っているが, 膜たんぱく質, 難溶性タンパク質, 超微量タンパク質などの解析は困難であるとされている。

腱組織はコラーゲンを主体とする細胞外基質に富む難溶性の組織であり、我々が渉猟し得た限り、顎口腔領域以外で腱組織のプロテオーム解析に関する報告はなかった。

本研究では、変化のあったタンパク質を除き、同定されたタンパク質の多くは筋肉もしくは血液由来のものであった。これは、腱組織の中に入り込んだ筋組織や微細血管を完全には除去できなかったことが原因と考えられる。腱由来と考えられたのはスポット1のVI型コラーゲンであった。VI型コラーゲンは $\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI), $\alpha 3$ (VI) の3つの鎖からなる3量体であり、

細胞外基質の異なる成分同士や細胞との結合に関与する⁹⁾。VI型コラーゲンは非線維性コラーゲンであるため可溶化され、観察可能であったと考えられる。本研究から、プロテオーム解析で腱組織の網羅的な研究をするためには多くの課題が残ると考えられるが、本研究のような病態不明の疾患においては、今後の研究の標的となるタンパク質を探すための一つの手法として有用であったと考えられた。

咀嚼筋腱膜過形成症患者で減少がみられた myosin light chain 4 は myosin II の調節軽鎖であり、そのリン酸化を介して myosin II は活性される¹⁰⁾。

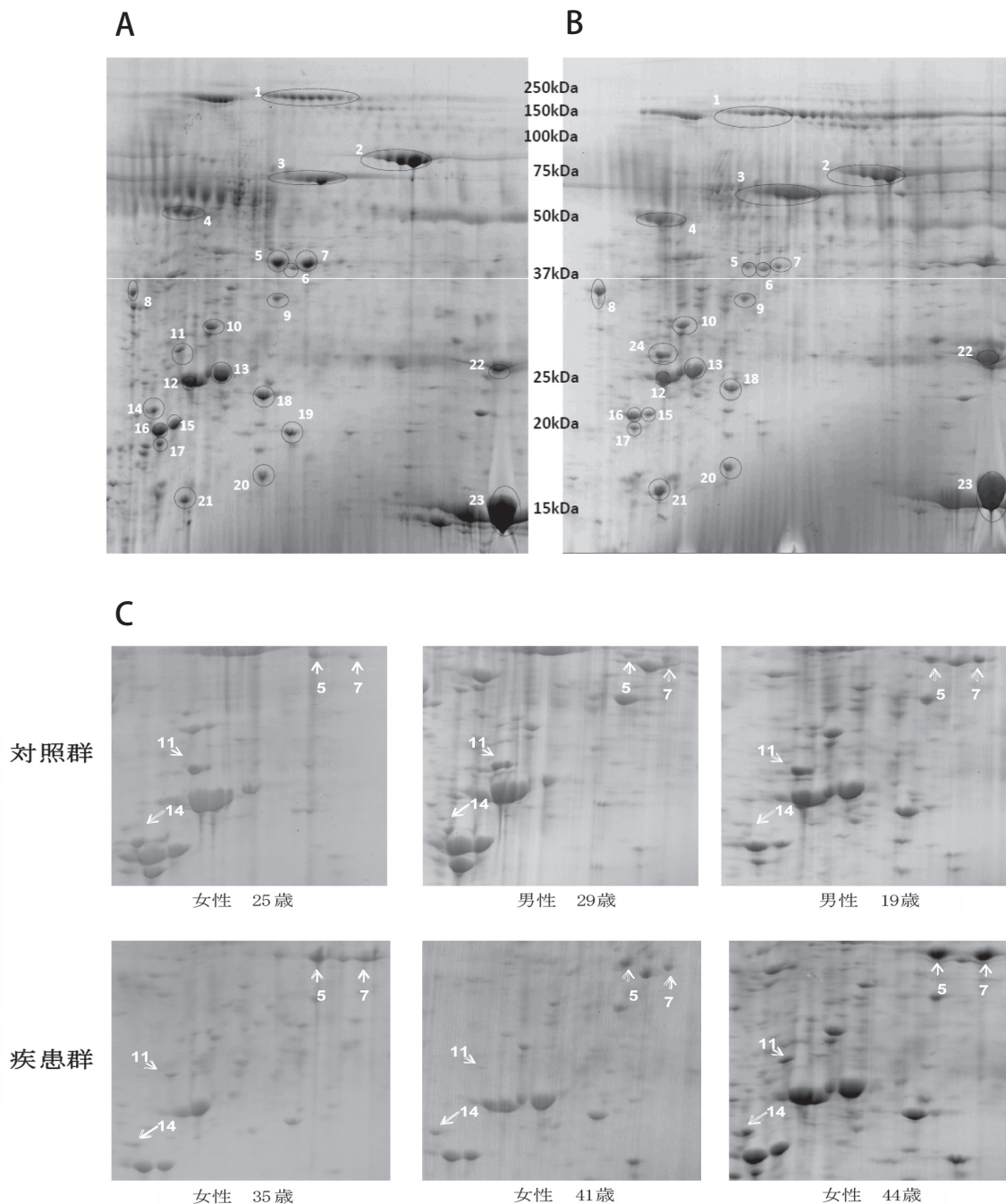
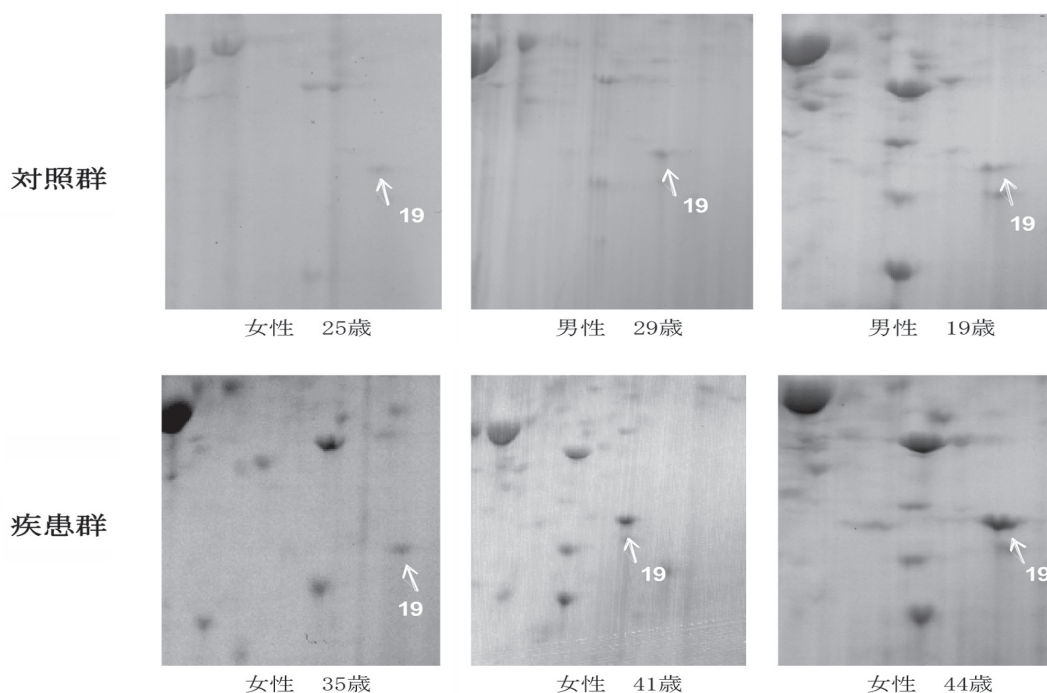


図 1-1. 対照群ならびに疾患群の電気泳動結果。A: 疾患群(44歳, 女性), B: 対照群(19歳, 男性), C: fibrinogen fragment D.

D



E

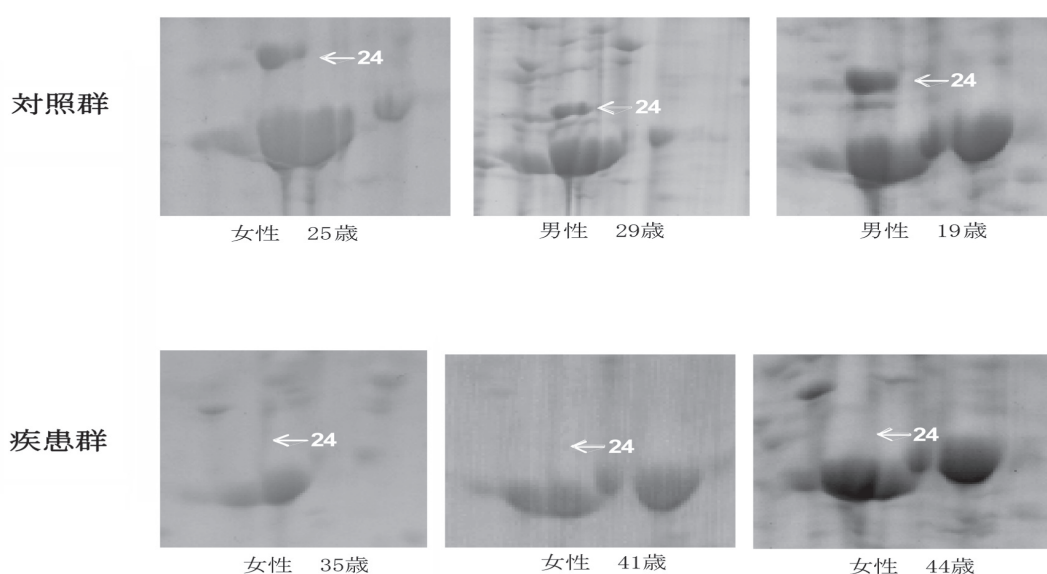


図 1-2. 対照群ならびに疾患群の電気泳動結果. D: β -crystallin A4, E: myosin light chain 4.

myosin IIは細胞骨格の張力を生成する重要なモータータンパク質で¹¹⁾, 腱細胞(線維芽細胞)においてmyosin IIは腱のコラーゲン線維の配列や安定, 腱の機械的性質(引張強度, 剛性)の生成に必要であり, Kalsonらはin vitroでmyosin IIを不活化させた腱細胞は腱組織を収縮させなかったと報告している¹²⁾. 今回

の実験でmyosin light chain 4が減少したことはmyosin IIの不活化を意味し, 本疾患の腱組織にはコラーゲン線維の異常や収縮機能ならびに機械的性質の低下が起きていることが考えられた.

疾患群で増加がみられた β -crystallin A4は, 主に脊椎動物の水晶体に発現するタンパク質である

クリスタリン群に属し、哺乳類においては α , β , γ に大別される¹³⁾. 最近では、クリスタリン群は眼だけでなく他臓器においても発現し、様々なストレスによる損傷から細胞を守る重要な役割を担うとされている¹⁴⁾. Leeらは網膜色素上皮において、光照射により β -crystallin A3ならびにA4が顕著に増加することを報告し、これは光による酸化ストレスから組織を保護するための変化であるとしている¹⁵⁾. 咀嚼筋腱膜

膜過形成症では、ブラキシズムなどの習癖が発症に関与するという報告がある¹⁶⁾. クリスタリン群の腱組織における発現や働きに関しては明らかになっていないものの、疾患群で β -crystallin A4が増加したことは、本疾患の発症に関わるとされている不良習癖などによる機械的ストレスへの防御反応である可能性もある. 一方、長期間に及ぶ開口制限による筋の伸展障害等が機械的ストレスとなって、結果的な2次変性としての

表 1. 同定タンパク質(疾患群)

Spot ID	Theoretical isoelectric point	Theoretical molecular weight	Sequence Coverage (%)	Approved gene name
1	5.85	109 709	6	collagen alpha-2(VI) Chain
2	6.97	79 310	23	serotransferrin precursor
3	5.92	677 73	16	PR02619
4	5.37	44 280	16	chain A, Alpha1-Antitrypsin
5	5.84	38 081	22	fibrinogen fragment D
6	5.19	37 125	20	actin prepeptide
7	5.84	38 081	23	fibrinogen fragment D
8	4.66	32 945	18	tropomyosin beta chain isoform 1
9	5.23	42 366	18	actin, alpha skeletal muscle
10	5.23	42 334	14	Actin, alpha cardiac muscle 1 proprotein
11	5.84	38 081	14	fibrinogen fragment D fibrinogen
12	4.97	21 189	33	myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform isoform 1f
13	5.27	28061	26	apolipoprotein A-1
14	5.84	38 081	18	fibrinogen fragment D
15	4.92	18 777	27	myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform
16	4.92	18 777	27	myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform
17	4.89	19 102	33	myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform
18	5.66	18 486	23	thiol-specific antioxidant enzyme
19	5.83	22 645	29	beta-crystallin A4
20	5.50	13 809	58	Transthyretin
21	5.34	15 048	33	galectin-1
22	6.03	11 073	66	hemoglobin beta chain
23	6.03	11 073	63	hemoglobin beta chain

増加であることも否定できない。

本研究において疾患群で増加がみられたfibrinogen fragment Dは、佐藤らも蛍光標識二次元ディフュージョンゲル電気泳動解析システムによる本疾患患者の腱組織の解析で同様の増加を報告している⁴⁾。フィブリノゲンは水溶性タンパク質であり¹⁷⁾、2つのDドメインとその間にある1つのEドメインで構成されている¹⁸⁾。トロンビンによりフィブリンへと変換され、出血などの損傷に対して修復細胞の浸潤、

血管新生、細胞増殖、再上皮化、創傷収縮などの治癒メカニズムを促進する¹⁹⁾。しかし、このメカニズムに不均衡が生ずると、過度の瘢痕形成や臓器の線維化を引き起こし、フィブリノゲンの蓄積は、皮膚、筋肉など、いくつかの臓器での線維化を促進する因子とされている^{19, 20)}。したがって、本疾患にみられる腱組織の過形成に大きく関与している可能性があり、疾患の鑑別にも有用であるかもしれない。また、腱組織の変性であるtendinosisにおいて、Aströmら

表 2. 同定タンパク質(対照群)

Spot ID	Theoretical isoelectric point	Theoretical molecular weight	Sequence Coverage (%)	Approved gene name
1	5.85	109 709	11	collagen, type VI, alpha 2
2	6.81	79 280	14	PR01400
3	5.92	70 564	17	albumin, isoform CRA_h
4	5.51	46 978	21	alpha1-antitrypsin
5	5.84	38 081	18	fibrinogen fragment D
6	5.39	38 142	16	actin, alpha skeletal muscle -like isoform 3
7	5.84	38 081	15	fibrinogen beta chain
8	4.66	32 945	22	tropomyosin beta chain isoform 1
9	5.26	32 370	20	actin, alpha 1, skeletal muscle
10	4.88	30498	20	actin, alpha, cardiac muscle, isoform CRA_c
11	5.84	38 081	14	fibrinogen fragment D
12	4.97	21 189	33	myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform
13	5.27	28061	24	apolipoproteinA-1
15	4.92	18 777	32	myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform
16	4.92	18 777	32	myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform
17	4.91	19 116	28	myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform
18	5.66	18 486	21	thiol-specific antioxidant enzyme
20	5.33	12835	51	chain A, a covalent dimer of transthyretin that affects the amyloid pathway
21	5.34	15 048	34	galectin-1
22	6.03	11 073	66	hemoglobin beta chain
23	6.03	11 073	37	hemoglobin beta chain
24	4.97	21 665	31	myosin light chain 4

は正常な腱組織と比べてフィブリノゲンが顕著に増加し、これらにより腱のコラーゲン束の凝集が阻害されると報告している²¹⁾。

今回の研究で3種類のタンパク質の発現に差がみられたが、対象に性差および年齢差があることは考慮にいく必要がある。本疾患は緩徐な進行を示すため手術時の年齢が平均して中年期以降になる。そのため対照も同世代にできれば望ましいが、手術患者以外から腱組織を採取することは倫理的に困難である。開口制限がなく手術の際に腱組織の切除が必要となる患者は顎変形症の他にはなく、現状としてはやむを得ない。また、性差に関しては、対象患者の年間手術件数は決して多くないため、本研究の実施時期には因らずとも女性が多くなってしまった。しかしながら、腱を構成する成分の中で、年齢・性別による変化を受けるとされている水分、コラーゲン²²⁾はサンプル処理の際に除去されている。腱細胞数は加齢に伴い減少する²²⁾が、腱細胞内のactinやmyosinは加齢による変化を受けないとされている²³⁾。以上のことから、対象の性差、年齢差を加味した上で、本研究で増減を示したタンパク質は疾患特有のものと考えられる。

本研究では、可溶化されないため分析の対象外になったコラーゲン群の評価ができないため、その点では制限をうけている。しかしながら、今回の実験で特徴的な出現を示したタンパク質は咀嚼筋腱膜過形成症の病態に関与している可能性を示しており、これらを診断マーカーとして発展させていくための更なる研究が行なわれることが望まれる。

結 語

今回の研究により、咀嚼筋腱膜過形成症患者の腱にはfibrinogen fragment D, β -crystallin A4, myosin light chain 4の出現に特徴があることがわかり、これらが組織の線維化や腱の機能低下、ストレスに関与していることから、タンパク質レベルでは正常ではなく、これらのタンパク質が本疾患の病態解明や有用な診断マーカーとなることも考えられた。

謝 辞

大学院における研究活動において、代表指導教員として終始ご指導ご鞭撻をいただきました、埼玉医科大学病院歯科・口腔外科 依田哲也教授に深謝申し上げます。

本研究における実験手法をご指導いただきました、埼玉医科大学病院歯科・口腔外科 佐藤毅講師に深謝申し上げます。

また、プロテオーム解析の研究手法をご指導いただきました、埼玉医科大学中央研究、施設機能部門坂本安教授および機能部門スタッフの皆様方に謹んで深謝申し上げます。

引用文献

- 1) 井上農夫男, 山口泰彦, 佐藤淳, 佐藤千春, 箕輪和行, 飯塚正. 咬筋腱膜の過形成により開口障害をきたした1例. 日口外誌 2000;46:307-9.
- 2) 覚道健治, 依田哲也. Square mandibleを伴う新概念の開口障害: 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の病態と治療. 日顎誌 2009;21(1):28-30. Kakudo K, and Yoda T, New.
- 3) Yoda T, Sato T, Abe T, Sakamoto I, Tomaru Y, Omura K, et al. Long-term results of surgical therapy for masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia accompanied by limited mouth opening. Int J. Oral Maxillofac Surg 2009;38(11):1143-7.
- 4) Sato T, Nakamoto A, Hori N, Enoki Y, Fukushima Y, Nakamoto N, et al. Proteomic analysis of masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia: A preliminary study using a 2D-DIGE system. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol 2012;24:185-8.
- 5) 千場良治. 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の病理組織学的検索. 日顎誌 2009;21(1):51-4.
- 6) Hirosawa N, Yano K, Suzuki Y, Sakamoto Y. Endocrine disrupting effect of di-(2-ethylhexyl)phthalate on female rats and proteome analyses of their pituitaries. Proteomics 2006;6(3):958-71.
- 7) Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 1998;19(11):1853-61.
- 8) 山田哲司. プロテオミクスの現状と将来—国立がんセンターにおける試み—. モダンメディア 2004;50(10):227-32.
- 9) Izu Y, Ansorge HL, Zhang G, Soslowsky LJ, Bonaldo P, Chu ML, et al. Dysfunctional tendon collagen fibrillogenesis in collagen VI null mice. Matrix Biol 2011;30(1):53-61.
- 10) Gally C, Wissler F, Zahreddine H, Quintin S, Landmann F, Labouesse M. Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. Development 2009;136(18):3109-19.
- 11) Clark K, Langeslag M, Figdor CG, van Leeuwen FN. Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. Trends Cell Biol 2007;17(4):178-86.
- 12) Kalson NS, Holmes DF, Kapacee Z, Otermin I, et al. An experimental model for studying the biomechanics of embryonic tendon: Evidence that the development of mechanical properties depends on the actinomyosin machinery. Matrix Biol 2010;29(8):678-89.

- 13) Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp Eye Res* 2009;88(2):173-89.
- 14) Xi J, Farjo R, Yoshida S, Kern TS, Swaroop A, Andley UP. A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina. *Mol Vis* 2003;9:410-9.
- 15) Lee H, Chung H, Lee SH, Jahng WJ. Light-induced phosphorylation of crystallins in the retinal pigment epithelium. *Int J Biol Macromol* 2011;48(1):194-201.
- 16) 有家巧, 覚道健治. 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の臨床所見. *日顎誌* 2009;21(1):31-4.
- 17) Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Suelves M, Ardite E, De Mori R, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev* 2008;22(13):1747-52.
- 18) Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005;8:1894-904.
- 19) Sørensen I, Susnik N, Inhester T, Degen JL, Melk A, Haller H, et al. Fibrinogen, acting as a mitogen for tubulointerstitial fibroblasts, promotes renal fibrosis. *Kidney Int* 2011;10:1035-44.
- 20) Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Suelves M, Ardite E, De Mori R, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev* 2008;13:1747-52.
- 21) Aström M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res* 1995;316:151-64.
- 22) Lemoine JK, Lee JD, Trappe TA. Impact of sex and chronic resistance training on human patellar tendon dry mass, collagen content, and collagen cross-linking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296(1):119-24.
- 23) Tuite DJ, Renström PA, O'Brien M. The aging tendon. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7(2):72-7.