

学内グラント 報告書

平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

咀嚼筋腱膜過形成症のプロテオーム解析

研究代表者 依田 哲也(大学病院 歯科・口腔外科)

研究分担者 坂本 安¹⁾, 佐藤 毅²⁾, 中本 文²⁾

緒言

咀嚼筋腱・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疾患である。以前は、難治性の顎関節症あるいは筋突起過長症などと誤診され、適切な治療が行われないことも少なくなかった。2008年の日本顎関節学会学術大会シンポジウムでは全国から集計された143症例のデータをもとに、名称・診断・治療・病理所見などについて討論され、咬筋前縁部の張り出しの触知とMRIによる診断の有用性と、腱・腱膜切除術で高い治療結果を得られることが確認された。また、我々は術後の開口訓練を適切に行えば長期的にも良好であることを報告した¹⁾。2011年のアジア顎関節学会では特別講演にも取り上げられるなど、近年注目を集めている疾患である。しかしながら本疾患の特徴である腱および腱膜の過形成の病態および成因は明らかになっていない。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、何らかの遺伝的要因があり、そこに環境要因が相乗して発症するのではないかと考えている。発症要因を検討するためにも、まず腱・腱膜過形成の病態を明らかにする必要がある。そこで我々は、本疾患の腱組織に発現するタンパク質の同定を行い、正常な腱組織との比較により、本疾患の腱組織の特徴を見出すことを目的として本研究を行った。

材料と方法

本疾患患者3名(疾患群)と開口制限のない顎変形症患者3名(対照群)の側頭筋腱を採取した(本学倫理委員会承認番号595)。採取組織をSKミル(トッケン社)で凍結破碎し、抽出バッファー(7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris, 3% CHAPS, 1%

Triton X-100)にて溶解後、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes kit, 3.5 K MWCO, 0.5-3 ml (PIERCE)にて脱塩を行った。凍結・乾燥後に再溶解し、PIERCE 660 nm Protein Assay (PIERCE)にて蛋白定量を行い1 mg蛋白量に調整した。等電点電気泳動はImmobiline Dry Strip pH3-11 18 cm (GE Healthcare)を用いてEttan IPGphor II (GE Healthcare)にて以下のプログラムで試行した。100 V, 2時間(step-and-hold); 500 V, 1時間(gradient); 1000 V, 1時間(gradient); 8000 V, 1時間(gradient); 8000 V, 40時間(step-and-hold)。その後、SDS電気泳動をExcelGel SDS XL 12-14 % 245 × 180 cm (GE Healthcare)を用いてMultiphor II 2-D (GE Healthcare)にて以下のプログラムで試行した。1000 V, 20 mA, 40 W, 45分間; 1000 V, 40 mA, 40 W, 5分間; 1000 V, 40 mA, 40 W, 160分間。CBB G-250にて染色を行ったものをGS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD)にてスキャンし、PDQuest (2-D Analysis Software Version 7.3)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。スポットに有意な濃度差を認める蛋白群に関してMALDI/TOF MS (AXIMA-GFR, 島津製作所)によるPeptide Mass Fingerprinting (PMF) 分析を行った。

結果

96のスポットに対して解析を行った結果、29を同定し(図1)、発現量に違いがみられた蛋白質は4つであった(表1)。コントロール群と比較して疾患群で増加したものはChainB, Crystal Structure of Fibrinogen fragment D(図2), β -crystallin A4(図3)であり、減少したものはmyosin light chain4(図4), collagen α 2(VI)(図5)であった。

考察

Fibrinogenは肝臓で生成される分子量340 kDaの糖蛋白質であり、2つのDドメイン(85 ~ 100 kDa)とそ

1) 中央研究施設

2) 大学病院 歯科・口腔外科

の間にある1つのEドメインで構成される^{2,3)}。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。しかし、このメカニズムに不均衡が生ずると過度の癒痕形成や臓器の線維化を引き起こす⁴⁾。フィブリノゲンの蓄積は、腎臓、脾臓、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^{4,5)}、腱組織においても腱障害での蓄積が報告されている^{6,7)}。今回の結果におけるフィブリノゲンの増加は、本疾患の腱組織に何らかの損傷が存在し、その治癒が正常に行われず、線維化亢進・癒痕形成が起きている可能性を示唆していると考えられた。myosin light chain4はmyosin IIの調節軽鎖であり、そのリン酸化を介し

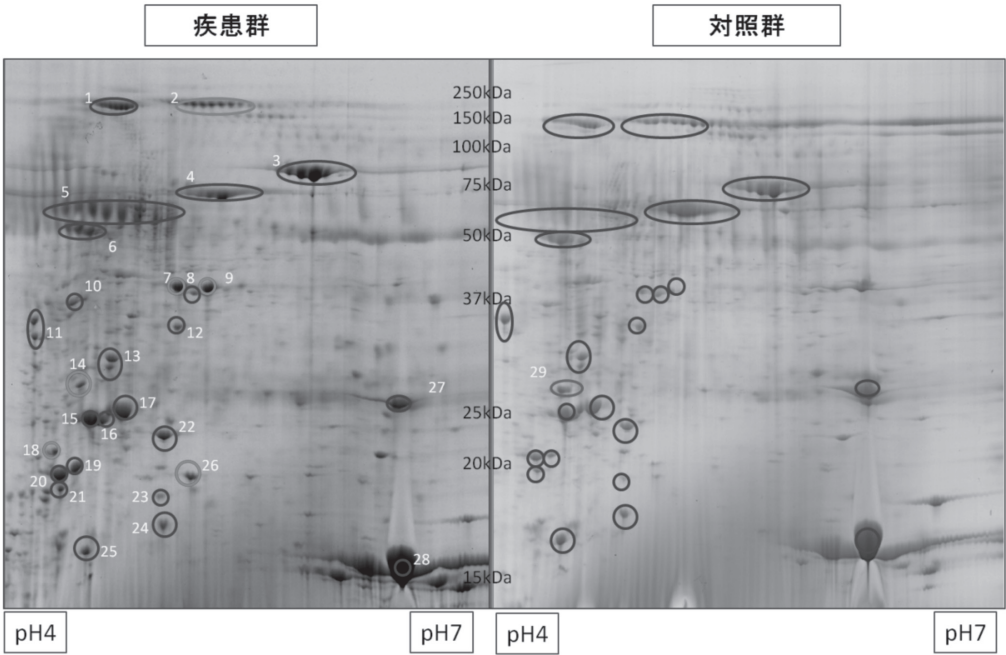


図 1.

表 1.

		MW	pI	score	coverage
1	liprin- α	1326265	5.91	65	6
2	collagen alpha-2(VI) chain	109709	5.85	58	6
3	serotransferrin	79280	6.97	146	23
4	serum albumin	58513	5.92	92	17
5	nestin	177788	4.35	65	4
6	alpha-1-antitrypsin	44280	5.37	98	16
7	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	36331	5.84	72	15
8	actin prepeptide	37125	5.19	83	20
9	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	36331	5.84	88	22
10	actin,alpha cardiac muscle,isoform CRA_c	30498	5.23	77	17
11	tropomyosin beta chain isoform 1	32945	4.66	75	18
12	actin alpha skeletal muscle	42366	5.23	76	18
13	actin alpha skeletal muscle	42334	5.23	67	14
14	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	38081	5.84	67	14
15	myosin light chain 1/3,skeltal muscle isoform 1f	21189	4.97	92	33
16	myosin light chain 3	22089	5.03	93	34
17	apolipoprotein A-1preprotein	30759	5.56	81	26
18	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	38081	5.84	78	18
19	myosin regulatory light chain 2,venticular/cardiac muscle isoform	18777	4.92	82	27
20	myosin regulatory light chain 2,venticular/cardiac muscle isoform	18777	4.92	79	27
21	myosin regulatory light chain 2,skeltal muscle isoform	19116	4.89	80	33
22	TSA	18486	5.66	82	23
23	TSA	18486	5.66	71	21
24	transthyretin	13455	5.5	103	58
25	galectin	14917	5.34	80	33
26	beta-crystallin A4	22645	5.83	82	29
27	hemoglobin beta chain	11073	6.03	93	66
28	hemoglobin subunit beta	16102	6.76	81	37
29	myosin light chain 4	21665	4.97	131	31

てmyosin IIは活性される⁸⁾. 腱細胞(線維芽細胞)における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, 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⁹⁾. 今回の実験でmyosin light chain4が減少したことはmyosin IIの不活化を意味し, 腱のコラーゲン線維の異常ならびに収縮機能や機械的

性質の低下が起きていることが考えられた.

collagen VIは非線維性コラーゲンであり, $\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI), $\alpha 3$ (VI) の3つの鎖からなる3量体である. 細胞外基質の異なる成分同士や細胞との結合に関与し, 組織特異的な構造や機能を生成し, collagen VIの欠損はコラーゲン線維の異常や機械的性質の低下を引き起こす¹⁰⁾. このことから, collagen $\alpha 2$ (VI) の減少

Fibrinogen fragment D

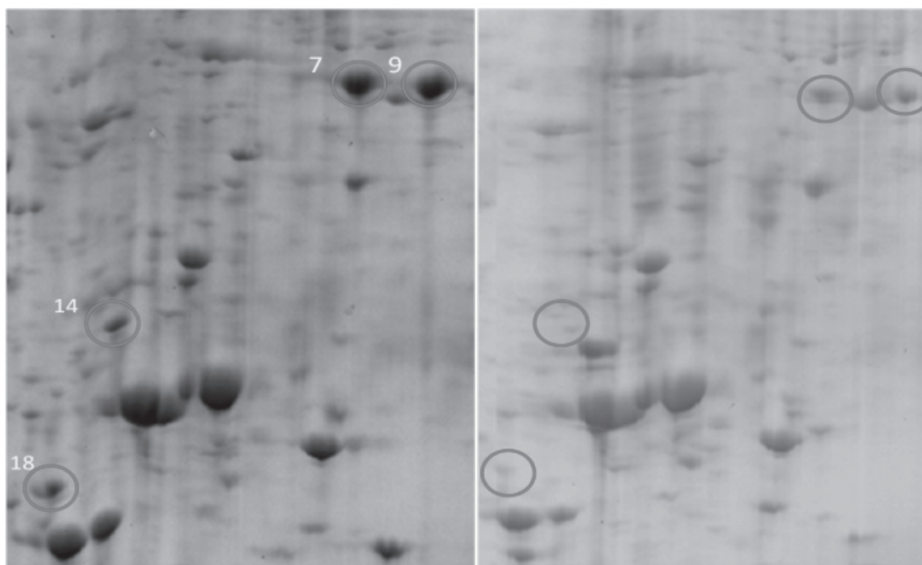


図 2.

beta-crystallin A4

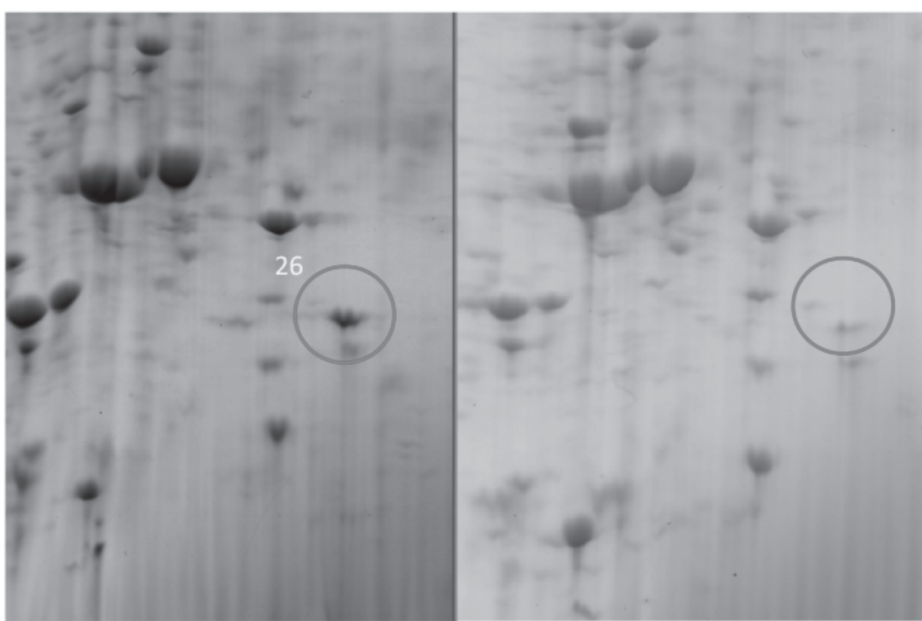


図 3.

により腱の構造と機能に異常を生じていることが考えられた。ββcrytsallin 群は主に水晶体で発現し、酸化や加齢などのストレスのより凝集・不溶化し白内障の原因となる。β-crytsallin A4は網膜色素上皮の光照射の際に増加し、酸化ストレスに対して保護的に働くという報告はあるが¹¹⁾、腱組織での発現や働きに関しては明らかになっていない。しかし、β-crytsallin B2の腎間質の線維化との関係を示唆する報告がある

など¹²⁾、クリスタリンは水晶体のみでなく、他の多くの臓器において重要な役割を果たしていると考えられており^{13,14)}、今後の本疾患との関連の検討が望まれる。

以上のことから、本疾患における腱組織には、腱の損傷とその治癒異常、腱細胞の機能低下、コラーゲン線維の変化による変性、機械的性質の低下が起きており、正常な腱の機能を果たせない状態にあることが考えられた。

myosin light chain 4

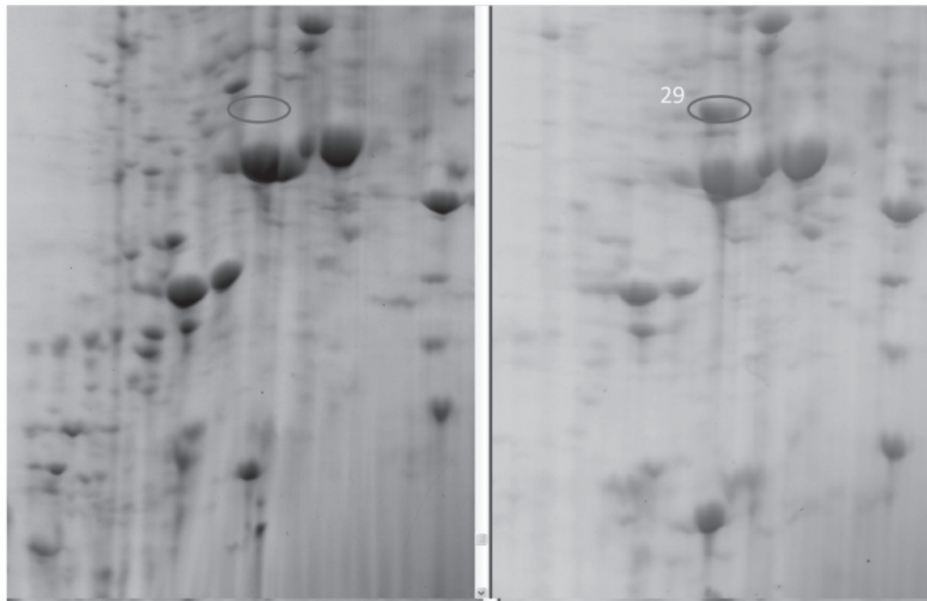


図 4.

collagen(α2) VI

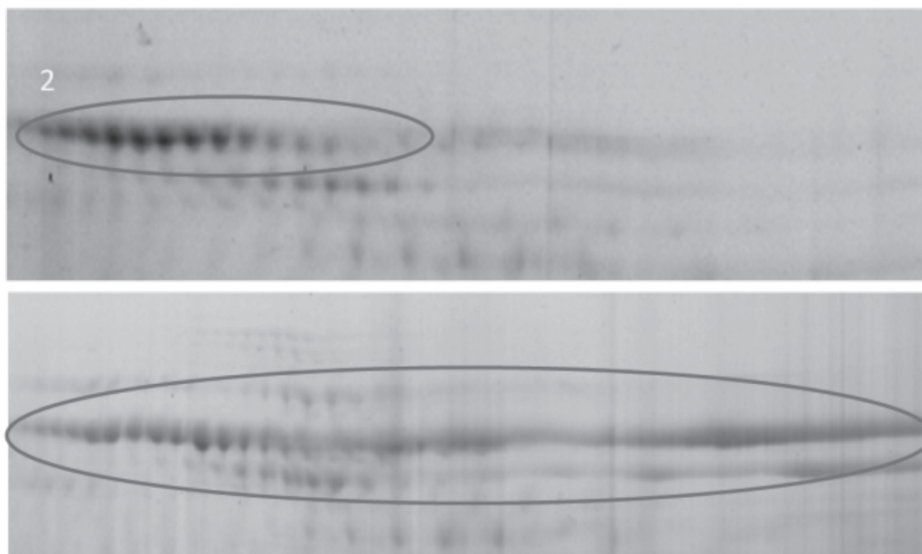


図 5.

参考文献

- 1) 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;38:1143-7.
- 2) Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005;8:1894-904.
- 3) Bini A, Fenoglio JJ Jr, Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* 1989;9(1):109-21.
- 4) Sörensen 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.
- 5) 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.
- 6) Kvist MH, Lehto MU, Jozsa L, Järvinen M, Kvist HT. Chronic achilles paratenonitis. An immunohistologic study of fibronectin and fibrinogen. *Am J Sports Med* 1988;6:616-23.
- 7) Aström M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res* 1995;316:151-64.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Kang JH, Cho HJ, Lee IS, Kim M, Lee IK, Chang YC. Comparative proteome analysis of TGF-beta1-induced fibrosis processes in normal rat kidney interstitial fibroblast cells in response to ascorbic acid. *Proteomics* 2009;9(19):4445-56.
- 13) 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.
- 14) Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp Eye Res* 2009;88(2):173-89.

研究成果リスト

なし