



## Direct detection of crosslinks of collagen and elastin in the hydrolysates of human yellow ligament using single-column high performance liquid chromatography

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 陳, 尽染 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1153">http://hdl.handle.net/10271/1153</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 300号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏 名	陳 尽 染		
論文題目	<p>Direct detection of crosslinks of collagen and elastin in the hydrolysates of human yellow ligament using single – column high performance liquid chromatography  (単独カラム高速液体クロマトグラフィーを用いたヒト黄色靱帯加水分解物中のコラーゲンとエラスチンの架橋物質の同時測定)</p>		

博士(医学) 陳 尽 染

## 論文題目

Direct detection of crosslinks of collagen and elastin in the hydrolysates of human yellow ligament using single-column high performance liquid chromatography

(単独カラム高速液体クロマトグラフィーを用いたヒト黄色靱帯加水分解物中のコラーゲンとエラスチンの架橋物質の同時測定)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

コラーゲンとエラスチンは各種の組織および臓器の強度と弾力性を保つために欠かせない細胞外基質であるが、コラーゲンとエラスチン線維の安定性を維持するためには成熟架橋物質が重要な役割を果たしている。これまでよく研究されているコラーゲンとエラスチンの成熟架橋物質には、ピリジノリン類〔ピリジノリン(Pyr)、デオキシピリジノリン(Dpyr)〕、デスモシン類〔デスモシン(Des)、イソデスモシン(Isodes)〕があり、一方advanced glycation endproduct (AGE)架橋物質としてペントシジン(Pen)がある。これらの架橋物質は組織の成熟、変性、加齢などの変化に関与していることが次第に分かってきた。従来、ピリジノリン類、デスモシン類、そしてAGE架橋物質ペントシジンなどは、自己蛍光をもつものと、もたないものがあるため、それらに対する測定は個別に行われており、全てを同時に測定する方法はなかった。本研究の目的はHPLC法を用いて、コラーゲンとエラスチンの架橋物質およびAGE架橋物質の同時測定法を確立することと、その応用としてコラーゲンとエラスチンが共に豊富に存在しているヒト黄色靱帯中の各架橋物質の加齢による変化を検討することである。

### 〔材料ならびに方法〕

腰椎椎間板ヘルニア患者など(年齢27-53歳) 5例より脊椎手術時に切除した黄色靱帯を材料とした。採取した黄色靱帯を脱脂した後、凍結乾燥した。乾燥重量約20mgに4 ml 6 N HClを加え、110℃、20時間加水分解を行った。加水分解物100  $\mu$  LをSP-Sephadex C-25カラムにて前処理し、蒸発乾固後、400  $\mu$  Lの水の中に溶解して、50  $\mu$  L中のピリジノリン類、デスモシン類、ペントシジン量をHPLC法で測定した。HPLCの条件は、20mMリン酸+0.2% SDS液とアセトニトリル19:1をAバッファーとし、3:2をBバッファーとした。バッファーAとバッファーBを用い、グラジエントをかけた。流速は1 ml/minにした。カラムはWaters ODS C-18カラム(8 mm $\times$ 10cm)を用いた。それぞれの架橋物質のピークの検出は、吸光検出器と蛍光検出器を直列に配置し、UV吸収は波長275nmに、蛍光は励起波長305nm、蛍光波長390nmに設定し、同時測定を行った。測定の精度および有用性はアッセイ内変動係数(Intra%CV)、アッセイ間変動係数(Inter%CV)と回収率を用いて評価した。また、黄色靱帯加水分解物に8個の濃度の異なる標準架橋物質を加えて、架橋物質のピークエリアと架橋物質の濃度の相関、いわゆる検量線を求めた。

黄色靱帯中のPyr、Dpyr、Des、Isodes、Penと年齢との相関を腰椎椎間板ヘルニア患者など32例、年齢18-78歳(mean $\pm$ SD、47.7 $\pm$ 18.歳)の黄色靱帯を用いて検討した。なお、架橋物質の濃度は全てアミノ酸分析法で測定したヒドロキシプロリン量で補正した。

## 〔結果〕

標準物質および検体中の Pyr、Dpyr、Des、Isodes、Pen のクロマトグラフ上の溶出位置はともにそれぞれ 8 min、11min、13min、23min であった。

Pyr、Dpyr、Pen、Des、Isodes の Intra%CV はそれぞれ 3.7%、4.1%、5.4%、4.5%、4.7% で、Inter%CV はそれぞれ 4.4%、5.1%、4.9%、4.6%、4.1% であった。Pyr、Dpyr、Pen、Des、Isodes の回収率はそれぞれ 86.4–98.3%、83.6–96.8%、78.7–95.6%、83.6–97.9%、85.6–99.3% であった。

検量線は全て相関係数が 0.98 以上、p 値は 0.0001 の直線関係であった。

黄色靱帯中の Pyr、Dpyr は年齢と有意に相関しなかったが、ペントシジンは年齢と有意な相関が認められた。デスモシンとイソデスモシンは加齢とともに減少する傾向が見られた。

## 〔考察〕

コラーゲンとエラスチンの架橋物質はこれら細胞外マトリクスの機能発現に重要な役割をしている。これらの架橋物質を測定することはコラーゲンとエラスチンの病態を知るうえで重要な情報を提供するが、これまではそれぞれの架橋物質は個別の方法で測定されていた。今回、同時測定が可能になった理由の一つはピリジノリン類、AGE 架橋物質ペントシジンは自己の蛍光をもつため蛍光検出器で、デスモシン類は自己の蛍光をもたないため吸光検出器を用い、この二つの検出器を直列に HPLC に配置した点にある。さらに種々の溶出条件を検討し、結果に示したごとく、良好な測定結果が得られた。なおデスモシン類とピリジノリンはアミノ酸分析法を用いて同時に測定することが可能であるが、この方法では架橋物質とニンヒドリンなどの発色反応が必要であるため、それが精度に影響する。しかし、今回の方法ではこの発色反応を必要としないため、精度も向上した。本法はコラーゲンとエラスチンの架橋物質、AGE 架橋物質を同時に、かつ高精度に測定可能であり、細胞外マトリクスの病態を研究するうえで有用な方法と考える。

今回の結果から、黄色靱帯の弾力性を維持するデスモシンとイソデスモシンは加齢とともに減少する傾向があったこと、組織の stiffness を増加させるペントシジンが加齢により増加したことが明かとなり、これらの架橋物質の加齢による変化が細胞外基質の弾力性の低下、変性などの一因となると考えられる。

## 〔結論〕

組織中のコラーゲンとエラスチンの架橋物質であるピリジノリン、デオキシピリジノリン、デスモシン、イソデスモシンおよび AGE 架橋物質ペントシジンの同時測定法を確立した。黄色靱帯中のデスモシンとイソデスモシンは加齢とともに減少する傾向あり、ペントシジンは加齢により有意に増加した。

## 論文審査の結果の要旨

コラーゲンとエラスチンは各種の組織および臓器の強度と弾力性を保つために欠かせない細胞外基質であるが、コラーゲンとエラスチン線維の安定性を維持するためには成熟架橋物質が重要な役割を果たしている。これまでよく研究されているコラーゲンとエラスチンの成熟架橋物質には、ピリジノリン類 [ピリジノリン (Pyr)、デオキシピリジノリン (Dpyr)]、デスモシン類 [デスモシン (Des)、イソデスモシン (Isodes)] があり、一方 advanced glycation endproduct (AGE) 架橋物質としてペントシジン (Pen) がある。これらの架橋物質は組織の成熟、変性、加齢などの変化に関与していることが次第に分かってきた。従来、

ピリジノリン類、デスモシン類、そしてAGE架橋物質ペントシジンなどは、自己蛍光をもつものと、もたないものがあるため、それらに対する測定は個別に行われており、全てを同時に測定する方法はなかった。本研究の目的はHPLC法を用いて、コラーゲンとエラスチンの架橋物質およびAGE架橋物質の同時測定法を確立することと、その応用としてコラーゲンとエラスチンが共に豊富に存在しているヒト黄色靱帯中の各架橋物質の加齢による変化を検討することである。

腰椎椎間板ヘルニア患者など(年齢27-53歳) 5例より脊椎手術時に切除した黄色靱帯を材料とした。採取した黄色靱帯を脱脂した後、凍結乾燥した。乾燥重量約20mgに4 ml 6 N HClを加え、110℃、20時間加水分解を行った。加水分解物の100  $\mu$ LをSP-Sephadex C-25カラムにて前処理し、蒸発乾固後、400  $\mu$ L水の中に溶解して、50  $\mu$ L中のピリジノリン類、デスモシン類、ペントシジン量をHPLC法で測定した。HPLCの条件は、20mMリン酸+0.2% SDS液とアセトニトリル19:1をAバッファーとし、3:2をBバッファーとした。バッファーAとバッファーBを用い、グラジエントをかけた。流速は1 ml/minにした。カラムはWaters ODS C-18カラム(8 mm $\times$ 10cm)を用いた。それぞれの架橋物質のピークの検出は、吸光検出器と蛍光検出器を直列に配置し、UV吸収は波長275nmに、蛍光は励起波長305nm、蛍光波長390nmに設定し、同時測定を行った。測定の精度および有用性はアッセイ内変動係数(Intra%CV)、アッセイ間変動係数(Inter%CV)と回収率を用いて評価した。また、黄色靱帯加水分解物に8個の濃度の異なる標準架橋物質を加えて、架橋物質のピークエリアと架橋物質の濃度の相関、いわゆる検量線を求めた。黄色靱帯中のPyr、Dpyr、Des、Isodes、Penと年齢との相関を腰椎椎間板ヘルニア患者など32例、年齢18-78歳(mean $\pm$ SD、47.7 $\pm$ 18.歳)の黄色靱帯を用いて検討した。なお、架橋物質の濃度は全てアミノ酸分析法で測定したヒドロキシプロリン量で補正した。

標準物質および検体中のPyr、Dpyr、Des、Isodes、Penのクロマトグラフ上の溶出位置はともにそれぞれ8 min、11min、13min、23minであった。Pyr、Dpyr、Pen、Des、IsodesのIntra%CVはそれぞれ3.7%、4.1%、5.4%、4.5%、4.7%で、Inter%CVはそれぞれ4.4%、5.1%、4.9%、4.6%、4.1%であった。Pyr、Dpyr、Pen、Des、Isodesの回収率はそれぞれ86.4-98.3%、83.6-96.8%、78.7%-95.6%、83.6-97.9%、85.6-99.3%であった。検量線は全て相関係数が0.98以上、p値は0.0001の直線関係であった。黄色靱帯中のPyr、Dpyrは年齢と有意に相関しなかったが、ペントシジンは年齢と有意な相関が認められた。デスモシンとイソデスモシンは加齢とともに減少する傾向が見られた。

コラーゲンとエラスチンの架橋物質はこれら細胞外マトリクスの機能発現に重要な役割をしている。これらの架橋物質を測定することはコラーゲンとエラスチンの病態を知るうえで重要な情報を提供するが、これまではそれぞれの架橋物質は個別の方法で測定されていた。今回、同時測定が可能になった理由の一つはピリジノリン類、AGE架橋物質ペントシジンは自己の蛍光をもつため蛍光検出器で、デスモシン類は自己の蛍光をもたないため吸光検出器を用い、この二つの検出器を直列にHPLCに配置した点にある。さらに種々の溶出条件を検討し、結果に示したごとく、良好な測定結果が得られた。なおデスモシン類とピリジノリンはアミノ酸分析法を用いて同時に測定することが可能であるが、この方法では架橋物質とニンヒドリンなどの発色反応が必要であるため、それが精度に影響する。しかし、今回の方法ではこの発色反応を必要としないため、精度も向上した。本法はコラーゲンとエラスチンの架橋物質、AGE架橋物質を同時に、かつ高精度に測定可能であり、細胞外マトリクスの病態を研究するうえで有用な方法と考える。今回の結果から、黄色靱帯の弾力性を維持するデスモシンとイソデスモシンは加齢とともに減少する傾向があったこと、組織のstiffnessを増加させるペントシジンが加齢により増加したことが明かとなり、これらの架橋物質の加齢による変化が細胞外基質の弾力性の低下、変性などの一因となると考えられる。

本研究に関連して審査過程における以下の質疑応答がなされた。

- 1) ビリジノリン類とデスモシン類は合成経路も構造も似ているが、ビリジノリン類はコラーゲンの、またデスモシン類はエラスチンの架橋物質となる機序はなにか
- 2) ビリジノリン類とデスモシン類の合成系の調節機構はどうなっているか。Lysyl hydroxylaseの細胞内分布、活性調節機序はどうか。活性にCuが必要か
- 3) コラーゲンのタイプによって架橋形成が異なるのはなぜか
- 4) 蛍光測定と吸光測定の差違について、また同時測定するときの問題点はなにか。これまでに報告されているビリジノリン類とデスモシン類の同時測定法の具体的な方法について
- 5) サンプル作成にSP-SephadexC-25カラムを用いた理由はなにか
- 6) HPLCの溶出バッファーを決定するに至った経過について
- 7) ビリジノリン類とデスモシン類の測定結果をhydroxyproline当たりで算出することの意義とその問題点について
- 8) アッセイ間変動係数の求め方とその問題について
- 9) 従来法と比べビリジノリンとデオキシビリジノリンの分離が改善した理由はなにか
- 10) 用いたサンプル作成方法で架橋アミノ酸は100%回収出来ていると考えられるか
- 11) ヒト黄色靱帯中のコラーゲンとエラスチンの構成比はどうか。加齢によってデスモシン類が減少する傾向について、その機序をどう考えるか。またペントシジンはどうか
- 12) ビリジノリン類とデスモシン類が低下し、ペントシジンが増加するとどのような影響が出るのか。弾力性が低下するのはなぜか
- 13) 老化架橋物質にはペントシジン以外にどのようなものがあるか
- 14) ビリジノリン類、デスモシン類、ペントシジンの尿中測定は行ったか
- 15) 本研究の臨床応用についてなにが期待できるか

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、本研究での問題点を十分把握しており、研究内容も博士(医学)の学位論文として十分であると審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 中 村 浩 淑

副査 金 山 尚 裕 副査 上 里 忠 良