

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16079

研究課題名(和文)パラオキシナーゼ1活性の病態変動指標としての有用性の検討

研究課題名(英文) Investigation of the usefulness of paraoxonase 1 activity as an indicator of pathological changes of knee osteoarthritis

研究代表者

大浦 華代子 (Ohura, Kayoko)

熊本大学・大学教育統括管理運営機構・特任助教

研究者番号：80452879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(OA)の病態進行を評価する新たな因子の探索を目的に関節液内に流入する血漿加水分解酵素活性と病態進行度について比較解析した。関節液中のパラオキシナーゼ(PON)1活性は、遺伝子多型に関係なくグレードIからグレードIIに進行した際に低下した。メタボリック症候群(MS)はOAのリスク因子であり、HDLの表面上に存在するPON1はMSからの重症化疾患で活性が低下する。人間ドック受診者の血清ではPON1の多型別にHDLのコレステロール引き抜き能(CEC)とPON1活性に相関関係がみられた。HDL機能を評価できるPON1活性はOA病態進行度の指標の一つとして応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節液中の血漿成分であるPON1を変形性膝関節症の病態評価のパラメータとして利用できるか検討した報告は、国内外でない。PON1活性は動脈硬化症などの心血管疾患や糖尿病との関係が報告されており、酸化ストレスに關与するミエロペルオキシダーゼとApo A-1、PON1の相互作用によりHDL機能が減弱し、疾患の重症化に關与するとされている。本研究は、関節液に存在する血液由来エステラーゼを病態進行の評価に利用しようという、ユニークな取り組みであり、病態進行の原因解明の糸口にもなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the relationship between the activities of plasma esterases entering the joint fluid and the degree of pathological progression of knee osteoarthritis (OA) in order to search for new factors to evaluate OA disease progression. Paraoxonase (PON) 1 activity in joint fluid decreased with progression from Grade I to Grade II, regardless of genetic polymorphism of PON1. Metabolic syndrome (MS) is a risk factor for OA, and it has been reported that PON1 activity, which is present on the surface of HDL, is reduced in severe disease from MS. A good correlation between cholesterol efflux capacity (CEC) of HDL and PON1 activity was observed in the sera of health checkup examinees when analyzed comparatively for each PON1 polymorphism, suggesting that PON1 activity, which can evaluate HDL function, may be applied as an indicator of OA disease progression.

研究分野：薬剤学

キーワード：パラオキシナーゼ 変形性膝関節症 HDL メタボリック症候群

### 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症の有病者数は 2,500 万人にもものぼり、そのうち日常生活に障害をもたらす疼痛を伴う患者は 800 万人にも及ぶと推計されている。超高齢化社会を迎えた日本では「国民病」とも言える疾患である。自己細胞シートによる軟骨再生治療の臨床研究も進められているが、変形性膝関節症は長期間かけて徐々に進行していくため、保存療法の充実はそれ以上に望まれる。変形性膝関節症は高い罹患率にもかかわらず、客観的病態診断の多くは X 線画像診断によりなされ、関節軟骨の減少程度と骨棘の形成程度を 5 段階で評価する Kellgren-Laurence (KL) 分類が利用される。しかしながら、単純 X 線の感度は高くなく、さらに病態進行は大変緩徐であるため、関節内の現時点での状態の把握や初期段階での事象をとらえるのは難しい。MRI はより現在の状態に近い関節内構造を解析できるが、画像は長期間かけて変形した結果を捉えるものであり、将来的な発症や進行予知の能力は高くない。治療方針を決定し、治療効果を上げるためには、MRI による画像診断に合わせて、より簡便に測定ができ、疾病の初期段階や将来の進行度を反映するバイオマーカーによる病態評価が必要である。変形性膝関節症患者の血清、尿、関節液内におけるバイオマーカーの探索研究がなされており、ヒアルロン酸や骨代謝マーカー (COMP、CTX-II、CPII、C2C)、マトリックスプロテアーゼ (MMP-1、MMP-8、MMP-13) の応用が検討されているが、未だ有効なバイオマーカーがないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では変形性膝関節症の発症と病態進行を正確に評価する新たな診断法の確立を目指す。変形性膝関節症の診断への応用が検討されているバイオマーカーは、変形性膝関節症の発症や進行によって増加する関節内成分の血清中、あるいは尿中濃度を測定するのが主である。本研究では、変形性膝関節症では病態が進行にすにつれ、毛細血管透過性が亢進して滑膜・血液関節門が破綻し、LDL を含む高分子量の血漿成分が関節液にリークすることに着目し、関節液内に流入する血漿成分の病態による変動を解析することにより、病態評価に利用できるパラメータ候補分子の探索を行う。血漿成分のブチリルコリンエステラーゼ (BChE)、パラオキシナーゼ 1 (PON1)、アルブミンは測定が簡便なことから、始めに血漿由来の加水分解酵素活性について予備検討を行った結果、PON1 の Arylesterase (AE) 活性が、初期のグレード I から II に進行した際に活性が低下する傾向を認めた。そこで、検体数を増やし、変形性膝関節症の病態進行と PON1 活性との関係について詳細に検討する。

変形性膝関節症の発症および進行のリスク因子としてメタボリック症候群が挙げられており、メタボリック症候群と変形性膝関節症の間には共通の病因・病態があることが示唆されている。PON1 は高比重リポ蛋白 (HDL) の主要リポ蛋白である Apo A-1 と結合して HDL の表面上に存在する加水分解酵素であり、LDL や HDL の酸化を抑制していると考えられている。メタボリック症候群から重症化した心血管疾患や糖尿病では、HDL のコレステロール引き抜き能や PON1 活性が発症・進行に関与することが示されているが、悪化する前のメタボリック症候群の段階での HDL 機能との関係性については詳細に検討されていない。そこで、本研究では、メタボリック症候群と HDL 関連タンパク質との関係性についても評価し、PON1 が変形性膝関節症の発症および進行を予防するための客観的指標と成り得るのかを検討する。

### 3. 研究の方法

熊本大学大学院生命科学研究部等「人を対象とする医学系研究疫学・一般部門倫理委員会」の承認 (承認番号: 倫理第 681 号、1638 号) のもと、同大学病院整形外科、寺崎内科胃腸科の協力を得て、変形性膝関節症患者 (女性 44 名、男性 16 名、59-98 歳) の血清および関節液 (各グレード 11-24 名) を提供していただいた。関節液は Hyaluronidase 前処理 (45 U/mL、20 min) により低粘度化した。BChE 活性は Butyrylthiocholine を基質として加水分解生成物の 412 nm における吸光度測定により評価した。BChE の会合状態は Native-PAGE 後の BChE 活性染色により評価した。多数の活性サイトをもつ PON1 活性は、Paraoxon [Paraoxonase (PO) 活性] と Phenyl acetate (AE 活性) を基質として加水分解生成物の 405 nm、275 nm における吸光度測定により評価した。

熊本大学大学院生命科学研究部等「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会」の承認 (承認番号: ゲノム第 169 号) のもと、日本赤十字社熊本健康管理センターの協力を得て、人間ドック受診者の血清検体を提供していただいた。PON1 には Q192R の多型があり、多型は AE 活性に影響しないが、PO 活性に影響する。そこで、PO 低活性群の QQ 型 (男性 24 名、女性 26 名、35-71 歳)、QR 型 (男性 24 名、女性 26 名、46-69 歳)、PO 高活性群の RR 型 (男性 24 名、女性 26 名、47-69 歳) の各 50 名の血清検体を抽出した。HDL-C 値は人間ドックの検査値を利用した。コレステロール引き抜き能は、RI 標識コレステロールで処理したマクロファージ様細胞に血清から分離した HDL 分画を添加し、培地に移行した放射活性を測定した。PON1 の加水分解活性は Phenyl acetate と Paraoxon を基質として測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 変形性膝関節症患者の関節液における血漿由来加水分解酵素の活性と病態進行との関係

BChE 活性を評価した結果、血清(各グレード平均値 6.0-7.5 U/mL)および関節液(1.1-1.4 U/mL)の活性値は病態グレード間で差がなかった。活性染色では、各グレードの関節液における BChE は主に 4 量体で存在しており、病態進行は BChE の会合状態に影響しないことが明らかとなった。血清中の PON1 活性について、PO 活性 (I: 0.24 U/mL; II: 0.20 U/mL; III: 0.21 U/mL; IV: 0.16 U/mL) および AE 活性 (I: 105 U/mL; II: 100 U/mL; III: 89 U/mL; IV: 80 U/mL) は病態進行に従い、低下する傾向を示した。関節液では PO 活性 (I: 0.081 U/mL; II: 0.047 U/mL; III: 0.056 U/mL; IV: 0.047 U/mL) AE 活性 (I: 33 U/mL; II: 23 U/mL; III: 24 U/mL; IV: 19 U/mL) とともに初期のグレード I からグレード II に進行した際に低下した。血清と関節液中の活性の比較においては、AE 活性では相関が認められなかったが、PO 活性には相関が認められた。今回、活性を測定した血清検体には、25 名の RR 型遺伝子、15 名の RQ 型遺伝子、2 名の QQ 型遺伝子をもつ患者がいることが推定された。推定された遺伝子多型を調整因子として、関節液における PO 活性への KL グレードの影響について重回帰分析を行った。グレード II, III, IV では偏回帰係数がマイナスの値を示したことから、遺伝子多型に関係なく関節液中の PO 活性はグレード II 以降で低下することが示された(図 1)。以上の結果より、関節液中の PON1 活性は OA 初期から中期に移行する際に低下し、特に血清と関節液間で相関が認められた PO 活性は病態進行度の指標の一つとして応用できる可能性が示唆された。

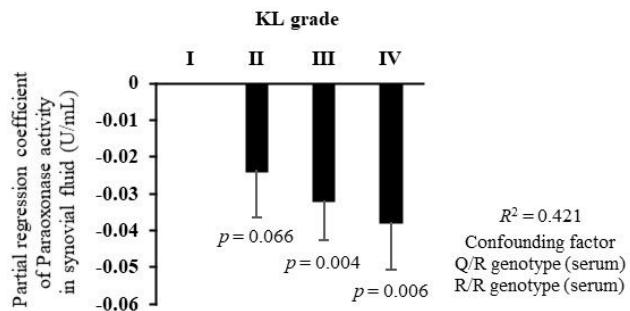


図 1. Multiple linear regression analysis of Paraoxonase activity in the synovial fluid of OA patients

Dependent variable: Paraoxonase activity in the synovial fluid of OA patients

##### 2) 人間ドック受診者における血清 PON1 活性とコレステロール引き抜き能の関連

PON1 の多型について関係なく、人間ドック受診者の全検体 ( $n=150$ ) の HDL-C 値、コレステロール引き抜き能および PON1 活性を比較解析した結果、HDL-C 値とコレステロール引き抜き能の相関 ( $r=0.53$ ) に比べて、AE 活性とコレステロール引き抜き能の相関 ( $r=0.44$ ) は弱く、PO 活性では相関関係が見られなかった ( $r=0.06$ )。PON1 の多型別の比較検討では、PO 低活性群の QQ 型ではコレステロール引き抜き能に対して PO 活性 ( $r=0.57$ )、AE 活性 ( $r=0.49$ ) とともに相関がみられ、PO 活性に HDL-C 値を加えた 2 変量回帰分析でさらに強い関係性 ( $r=0.63$ ) が示された。QR 型、PO 高活性群の RR 型においても PO 活性 ( $r=0.42$ 、 $r=0.48$ ) に相関がみられた。全対象者 ( $n=150$ ) のコレステロール引き抜き能に対して、多型の影響を多変量解析により評価した結果、QQ 型に比べて QR 型と RR 型はコレステロール引き抜き能が低いことが示された(図 2)。興味深いことに、AE/PO 活性比をとると、QQ 型は 1.0 以上 (PO 活性平均値 96 nmol/ml/min、AE 活性平均値 137  $\mu$ mol/ml/min) QR 型は 0.5 以上 1.0 未満 (PO 活性平均値 221 nmol/ml/min、AE 活性平均値 135  $\mu$ mol/ml/min) RR 型は 0.5 未満 (PO 活性平均値 352 nmol/ml/min、AE 活性平均値 128  $\mu$ mol/ml/min) の 3 つの群に分けられることが明らかになった。以上のことより、遺伝子解析することなしに AE/PO 活性比から PON1 の多型が推測でき、さらに、多型別に PO 活性値と HDL-C 値を指標にすることにより心血管疾患発症リスクについて予測できると示唆された。

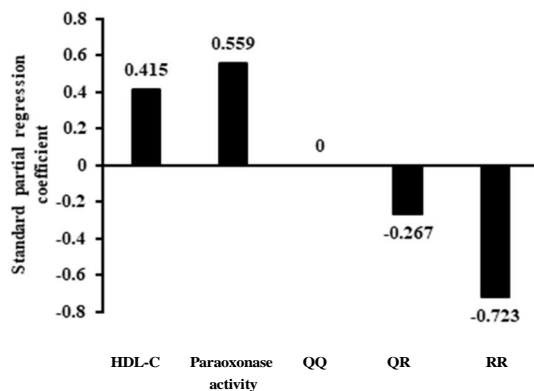


図 2. Multiple linear regression analysis of Cholesterol efflux Capacity of Health checkup recipients

本研究の検討により、関節液中の PON1 活性は変形性膝関節症発症の初期から中期に移行する際に低下し、特に血清と関節液間で相関が認められた PO 活性は病態進行度の指標の一つとして応用できる可能性が示唆された。PON1 の多型は遺伝子解析することなしに AE/PO 活性比から推測できることが明らかとなった。また、健常人においても、PO 活性と HDL のコレステロール引き抜き能が相関することが示され、PON1 の多型別に PO 活性と HDL-C 値を指標にすることによりメタボリック症候群から心血管疾患発症するリスクについて予測できると示唆された。本研究で得られた結果を検体数を増やしてさらに検証することにより、PON1 活性が変形性膝関節症の病態進行だけでなく HDL 機能が関係する疾患の発症を予測する因子の一つと成り得ると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>倉田誠子、遠藤恵、アカツイジュカ ダニエル、大浦華代子、寺崎久泰、今井輝子   |
| 2. 発表標題<br>変形性膝関節症患者の関節液における血漿由来加水分解酵素の活性と病態進行との関係 |
| 3. 学会等名<br>日本薬剤学会第35年会                             |
| 4. 発表年<br>2020年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|