

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07195

研究課題名（和文）関節液に存在するエステラーゼを利用した変形性膝関節症の病態解析

研究課題名（英文）Association of osteoarthritis progression with the esterase activity in synovial fluid

研究代表者

今井 輝子（Imai, Teruko）

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70176478

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症（OA）の病態進行の診断は、関節のX線画像が利用され、グレードからに分類される。これまでバイオマーカーの探索研究がなされているが、滑膜の炎症に伴って貯留する関節液に注目されたことはない。本研究では、関節液の構成成分である血漿に由来するブチリルコリンエステラーゼ（BChE）とパラオキシナーゼ1（PON1）の活性及び会合状態と病態グレードとの相関を調べた。その結果、関節液中のPON1活性がグレードからへの進行で約25%低下することが明らかとなり、OA初期段階の診断補助としての関節液中のPON1活性測定の有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症（OA）は国内では、2000万人以上の患者がいると推定され、その病態進行は主にX-線画像診断による。OAの進行は極めて緩徐であり、初期段階の診断は予後を左右するが、OA初期は骨形態変化が乏しくX-画像診断が難しい。本研究で得られた初期段階での関節液中のパラオキシナーゼ1の活性低下は、新しい診断基準として期待できるとともに、治療目的で関節液を採取した際に測定するため、新たな患者への負担なく測定の頻度が増やせる特徴もある。

研究成果の概要（英文）：Osteoarthritis (OA) of knee is a slowly progressing disease and it commonly diagnosed with the Kellgren-Lawrence (KL) classification (stage 1-4) by X-ray. The blood biomarker tests are developing, but the synovial fluid removed from knee as a treatment has not been focused. The synovial fluid contains plasma proteins such as butyrylcholinesterase (BChE) and paraoxonase 1 (PON1). In the present study, we studied the relation of KL classification with the activity and structure of these proteins. The tetrameric structure and activity of BChE was maintained in all stage of OA patients. On the other hand, the activity of PON1 was decreased from stage 1 to stage 2, and then maintained up to stage 4. The change of PON1 activity in synovial fluid in initial stage of OA progress might be useful as an additional diagnostic criteria.

研究分野：薬物動態学

キーワード：変形性膝関節症 関節液 パラオキシナーゼ ブチリルコリンエステラーゼ 加水分解活性 病態診断

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (OA) は 65 歳以上の日本人において 55% にも達する疾患であり、その病態の進行は個人差が大きく、数年から数十年をかけて進行する。一般に X 線と MRI により診断され、病態進行度の指標には X 線画像の所見による Kellgren-Lawrence 分類 (KL 分類、グレード から に分類) が用いられる。KL 分類によるグレード 以上で OA と診断される。初期段階の診断が予後を左右するが、OA 初期は骨形態変化に乏しいため X 線検査では病理学的変化の判別が難しい。OA 患者の血清や尿における有効なバイオマーカーの探索が行われているが、未だ、有効な方法はない。

本研究では OA の診断補助となる新たな因子として、関節液成分に着目した。関節液は滑膜細胞から分泌されるヒアルロン酸 (HA) と血漿成分から成り、滑膜細胞の炎症による HA の産生増大と関節内への血漿の流入増大により、関節液が過剰に貯留する。過剰な関節液は、炎症を悪化させることから、治療目的で関節液は採取除去される。抜き取られた関節液を診断の補助に利用することが出来れば、患者の負担はない。本研究では、関節液に貯留しやすく、タンパク質の変化を活性で評価できる血漿成分として、加水分解活性を有するタンパク質を選択して、診断への応用の可能性を検討した。

2. 研究の目的

(1) OA では初期の段階から、関節液が貯留する。血漿由来の加水分解活性をもつタンパク質として、分子サイズが大きく関節腔に貯留しやすい 2 種のタンパク質、Butyrylcholinesterase (BChE) および Paraoxonase 1 (PON1) を選択した。BChE は血漿中に 4 量体(340kDa)として存在する。また、PON1 は HDL に結合して存在し、リポタンパク質の酸化保護作用を有し、アテローム性動脈硬化症や糖尿病など様々な疾患との関連性が報告されている。本研究では、OA 患者の関節液中の BChE 活性と会合状態、また、PON1 活性を評価し、KL グレードとの関係を検討した。さらに、血清中の活性との比較も行った。

(2) PON1 は Paraoxonase (POXase) 活性と Arylesterase (AREase) 活性を示す 2 つの活性サイトが存在し、POXase 活性は Q192R の多型により影響を受けることが知られている。RR 型の POXase 活性は QQ 型の 4~5 倍高いのに対し、AREase 活性は Q192R の多型による影響がない。そのため、POXase 活性 と AREase 活性の比を利用することで、Q192R 多型を遺伝子診断することなく、判断することが出来る。OA 患者の多型判断のために、遺伝子多型が明らかな人間ドック受診者の血清サンプルの PON1 活性を測定して、Q192R 多型の判断基準を推定した。さらに、Q192R の多型と OA の病態進行との関連について考察した。

3. 研究の方法

(1) 寺崎内科・胃腸科クリニックを受診した OA 患者(女性 44 名、男性 16 名、59-98 歳)の検体(各グレード 11-24 名)を用いた。関節液は Hyaluronidase 前処理(45U/mL、20min)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 412nm 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。2 つの活性サイトをもつ PON1 活性は Paraoxon と Phenyl acetate を基質として加水分解生成物の 405nm、275nm における吸光度測定により評価した。

(2) 日本赤十字社熊本健康管理センターの人間ドック受診者の血清 (QQ, QR, RR の遺伝子多型を各 50 名) を用いて、POXase 活性 と AREase 活性を測定した。

4. 研究成果

1) 60 名の OA 患者の関節液および 42 名の血清における BChE 活性を評価した結果、関節液(各グレード平均値 1.1-1.4U/mL)および血清(各グレード平均値 6.0-7.5U/mL)の活性値は病態グレード間で差がなく、血清と関節液間でも相関は認められなかった。活性染色では、各 KL 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。

2) 血清中の PON1 活性について、POXase 活性(:0.24U/mL; :0.20U/mL; :0.21U/mL; :0.16U/mL)および AREase 活性(:105U/mL; :100U/mL; :89U/mL; :80U/mL)は病態進行に従い、低下する傾向を示したが、有意差はなかった。関節液では POXase 活性(:0.081U/mL; :0.047U/mL; :0.056U/mL; :0.047U/mL)、AREase 活性(:33U/mL; :23U/mL; :24U/mL; :19U/mL)とともに初期のグレード I からグレード に進行した際に有意に低下した。血清と関節液中の活性の比較においては、AREase 活性では相関が認められなかったが、POXase 活性には弱い相関 ($r = 0.528$) が認められた。

3) Q192R 多型の血清中の POXase/AREase 活性比は、QQ 型では 0.51-0.87、QR 型では 1.26-2.05、RR では 2.21-3.63 であった。今回、測定した OA 患者の血清検体 (42 名) における遺伝子型は、25 名の R/R、15 名の Q/R、2 名の Q/Q と推測された。

4)グレード I からグレード II の POXase 活性の低下における多型の影響について重回帰分析を行った結果、遺伝子多型と関係なく関節液中の活性が低下することが示された。また、Q192R 多型の頻度に比べて、QQ 型の OA 患者数が少ないことから、抗酸化作用が強い QQ 型では OA 発症のリスクが低い可能性が示唆された。本研究結果により、OA の初期段階の進行に関する指標の一つとして、関節液中の POXase 活性が有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oniki Kentaro, Ohura Kayoko, Endo Megumi, Akatwijuka Daniel, Matsumoto Erika, Nakamura Teruya, Ogata Yasuhiro, Yoshida Minoru, Harada-Shiba Mariko, Saruwatari Junji, Ogura Masatsune, Imai Teruko	4. 巻 31
2. 論文標題 The Association of the Cholesterol Efflux Capacity with the <i>Paraoxonase 1</i> Q192R Genotype and the Paraoxonase Activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.64711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 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 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 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------