

変形性関節症の病気進行予測と病態解明を目的としたプロテオーム解析

順天堂大学医学部整形外科
湯浅崇仁、末原義之、牧野祐司、金子和夫

はじめに

超高齢社会となった日本において、関節疾患は要支援の原因の第1位であり、運動器の健康寿命の延伸が喫緊の問題となっている。変形性関節症（以下 OA）は本邦で 800 万人以上の患者数が存在するとされている。関節痛の原因である OA は関節への負担が原因で起こる関節疾患で、軟骨の破壊および軟骨と骨の変形をきたし慢性の関節炎を伴う。変形性関節症が進行し重症になると、関節の変形や運動時痛・可動域制限により起立や歩行に大きな影響を与えるため、生活の質（QOL）を著しく低下させる。OA は加齢や過度の関節運動・遺伝的素因・外傷による関節不安定症・体重の増加によって（あるいは複合的な要因によって）発症すると考えられている。その病態として持続的な荷重、軟骨細胞基質の消失[1]、軟骨細胞のアポトーシスの亢進[2]、軟骨細胞のミトコンドリア変性などが報告されている[3]が、その原因は未だに解明されていない。

OA の進行は個人によって軟骨変性・消失の速度、軟骨下骨硬化の程度、骨棘の程度などが異なり、とくに軟骨下骨変化については軟骨変性に先立って起こるとする報告もあるが、現在は軟骨表面の破綻が先行するという報告もある[4]。さらに OA は軟骨組織に比較的限局した破壊と修復反応の蓄積であると考えられていたが、

OA 関節にはしばしば炎症反応がみられ、局所での炎症や免疫反応が関節破壊に関与する可能性が示唆されている。このように OA の病態は個人差が大きく多様であり、このことが OA の病態理解を一層困難としている。

近年のプロテオーム解析の進歩により、疾患関連タンパク質の解析が可能となり、がん研究においては鑑別診断[5]、疾患予後予測[6, 7, 8]、治療効果判定[9]が可能となった。本研究ではプロテオーム解析により、変形性股関節症に特異的に発現するタンパク質を網羅的に探索し、その機能を解析することで病態解明・病期進行予測診断・治療に役立てることを目的とする。

対象と方法

人工股関節全置換術を行った変形性股関節症患者（OA）10 名および大腿骨頸部骨折で人工骨頭置換術を行った患者（Fx）10 名の大腿骨頭から採取した骨・軟骨を検体とした。ヒト標本の採取については順天堂大学医学研究倫理委員会の承認と被験者の同意を得た。そのうちそれぞれ 8 検体をプロテオーム解析に使用した。残り 2 検体は検証用セットとして使用した。特異抗体を用いたウェスタンブロット解析は 20 例全例で行った。患者データは表 1 に示すとおりである。

凍結検体を破碎し粉末状として lysis buffer で処理し、遠心後の上清をタンパク解析に使用した。定量的なタンパク質発現プロファイルを作成するためにタンパク質は Cy3, Cy5 で蛍光色素標識し、二次元電気泳動 (2D-DIGE: fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis, GE Healthcare 社) を行った。蛍光二次元電気泳動で獲得したイメージは、DeCyder (GE Healthcare 社) の画像解析ソフトを使用し、各タンパク質スポットを発現量としてテキストファイルに変換する。そのデータを cDNA マイクロアレイのデータ解析と同様に、多変量解析、機械学習法の手法でテータマイニングを行った。2 群間で統計学的に有意差を認める (Wilcoxon test, $p < 0.01$) タンパク質スポットを確認し、検討項目ごとに重要と判断されたタンパク質スポットについては、Finnigan ORBITRAP XL 質量分析計 (Thermo Electron 社) にて対応するタンパク質の同定を行った。統計学的解析は Fisher's exact test、カイ 2 乗検定を使用した。

結果

32 のタンパク質スポットが 2 群間で統計学的に有意差 ($p < 0.01$) を認めた。図 1 は 2D ゲルイメージでの 32 個のスポットです。質量分析計のタンパク分析では、15 の別個の遺伝子産物に 32 のタンパク質スポットが相当したことを確認できた (図 2)。32 のタンパク質スポットのうち 2 つが PRDX2 に相当し、PRDX2 の発現レベルは 2 群間での差が最も大きかった ($p = 0.00016$, fold difference = 6.22) を認めた。さらにウェスタンブロット解析

で PRDX2 の発現を検討したところ OA 群と比較して Fx 群において有意に高い ($p < 0.0001$) ことが示された。2D-DIGE によって測定された相対的なタンパク質量とウェスタンブロット解析の結果は変形性関節症の進行と緊密に関連していた (図 3)。検証サンプル 4 検体 (OA2 例、Fx2 例) を用いて SDS-PAGE/ウェスタンブロット分析で PRDX2 の発現を確認したところ、Fx 群では発現が高く、OA 群では発現を認めなかった (図 4)。年齢、性別、KL grade には PRDX2 の発現との間に有意な相関性を認めなかった。

考察

プロテオーム解析はゲノムの機能的な翻訳であるプロテオームが直接細胞表現型を調節していることにより他の研究よりも利点があり、潜在的なバイオマーカーを探索しやすい。本研究ではプロテオーム解析を用いて OA 関連タンパクの検討を行った。その結果、15 遺伝子産物に一致する 32 種のタンパクを同定した。それらには酸素/タンパク質結合、脂肪酸/アポリポ蛋白質結合、表皮/細胞骨格の構造的成分および中間フィラメントに関与するタンパク質、およびペルオキシダーゼ活性に関与するタンパクを認めた。その中で、PRDX2 が最も有意差が高く発現量の差を認めた。PRDX2 は細胞質に豊富に発現し、細胞の酸化還元調節を担っている [10, 11]。PRDX2 は peroxiredoxin ファミリーに属し、過酸化水素を減少させる抗酸化酵素の一つである。そのタンパクは細胞を抗酸化作用から守る役割をしており、CD8 陽性 T 細胞では抗ウイルス活性に関与していると考えられている。

PRDX2 は抗酸化的作用と関連しており、正常な大腿骨頭でより発現が強かった。今回の結果から OA 進行と PRDX2 の関連は明らかとなったが、その役割や病態に関する機序は明らかでない。PRDX2 は OA と関節リウマチ (RA) の滑膜線維細胞に発現していることが報告されている [12] が、OA 進行との関連は検討されていない。PRDX のアイソフォームに関しては、PRDX5 は正常軟骨細胞と比較して OA の軟骨細胞で強く発現していることが報告されている [13]。PRDX4 は OA と比較して RA の滑膜組織で強い発現を認めた [14]。PRDX6 は OA の軟骨細胞で発現が低下していることが報告されている [15]。OA の原因はいまだ不明であるが、酸化ストレスは軟骨細胞の老化を誘導することが報告されており [16]、抗酸化作用に関連する酵素である PRDX が軟骨細胞の老化に関連して OA 発症に関与していることが示唆された。

今回の解析で OA に強い発現をみとめたタンパクは、アポリポrotein A1 (APOA1)、SEC13、脂肪酸結合蛋白質 4 (FABP4) であった。APOA1 は HDL の主要タンパク成分として同定され、OA や RA 患者の血清で発現していることが確認されており [17, 18]、軟骨細胞データベース中のタンパク質の 1 つと報告されている。興味深いことに OA 患者の血清を用いた研究から脂質代謝異常と OA 進行の関連が指摘されている [19]。今後、関節軟骨基質分解や OA 進行過程における PRDX2 の解析と他の PRDX アイソフォーム、APOA1 などの関連について詳細な解析が必要である。

謝辞

本研究は、公益財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成をもとに行いました。心より感謝いたします。

参考文献

1. Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, and Enomoto-Iwamoto M. Wnt/ β -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest.* 88(3): 264-74, 2008.
2. Yuasa T, Kondo N, Yasuhara R, Shimono K, Mackem S, Pacifici M, Iwamoto M, and Enomoto-Iwamoto M. Transient Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Induces Abnormal Growth Plate Closure and Articular Cartilage Thickening in Postnatal Mice. *Am J Pathology.* 175(5): 1993-2003, 2009.
3. Aigner T and Richter W. Age-related OA- a concept emerging from infancy? *Nat Rev Rheumatol* 8: 70-72, 2012.
4. Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Roles of β -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Lab Invest.* 91(12):1739-52, 2011.
5. Suehara Y, Kondo T, Fujii K, Hasegawa T, Kawai A, Seki K, Beppu Y, Nishimura T, Kurosawa H, Hirohashi S. Proteomic signatures corresponding to histological classification and grading of soft-t

- issue sarcomas. *Proteomics* 2006; 6:4402-9.
6. Kikuta K, Tochigi N, Shimoda T, Yabe H, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Nucleophosmin as a candidate prognostic biomarker of Ewing's sarcoma revealed by proteomics. *Clin Cancer Res* 2009;15:2885-94.
 7. Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T, Yoko H, Nakanishi K, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Kondo T. Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;48:1851-63.
 8. Suehara Y, Kondo T, Seki K, Shibata T, Fujii K, Gotoh M, Hasegawa T, Shimada Y, Sasako M, Shimoda T, Kurosawa H, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S. Pftin as a prognostic biomarker of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics. *Clin Cancer Res* 2008;14:1707-17.
 9. Okano T, Kondo T, Fujii K, Nishimura T, Takano T, Ohe Y, Tsuta K, Matsuno Y, Gemma A, Kato H, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to the response to gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:799-805.
 10. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000;267:6102-9.
 11. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001;52:35-41.
 12. Bo GP, Zhou LN, He WF, Luo GX, Jia XF, Gan CJ, Chen GX, Fang YF, Larsen PM, Wu J. Analyses of differential proteome of human synovial fibroblasts obtained from arthritis. *Clin Rheumatol* 2009;28:191-9.
 13. Wang MX, Wei A, Yuan J, Trickett A, Knoop B, Murrell GA. Expression and regulation of peroxiredoxin 5 in human osteoarthritis. *FEBS Lett* 2002;531:359-62.
 14. Chang X, Cui Y, Zong M, Zhao Y, Yan X, Chen Y, Han J. Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *J Rheumatol* 2009;36:872-80.
 15. Ikeda D, Ageta H, Tsuchida K, Yamada H. iTRAQ-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis. *Biomarkers* 2013 August 12.
 16. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, Graf B, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res* 2011;29:1114-20.
 17. Wu J, Liu W, Bemis A, Wang E, Qiu Y, Morris EA, Flannery CR, Yang Z. Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3675-84.
 18. Jmeian Y, El Rassi Z. Micro-high-performance liquid chromatography platform for the depletion of

high-abundance proteins and subsequent on-line concentration/capturing of medium and low-abundance proteins from serum. Application to profiling of protein expression in healthy and osteoarthritis sera by 2-D gelelectrophoresis. Electrophoresis 2008;29:2801-11.

Groot J, Lasfeber F, Goshawk J, Yu K, Shockcor JP, Vreeken RJ, Hankemeier T. Comprehensive LC-MS/MS Lipidomic Analysis using a Shotgun Approach and Its Application to Biomarker Detection and Identification in Osteoarthritis Patients. J Proteome Res 2010;9: 2377-89.

19. Castro-Perez JM, Kamphorst J, De

表 1 患者データ

	OA	Fx
年齢	65.5 (52-85)	75.2 (60-98)
性別 男	0	1
女	10	9
X線 KL grade 0	0	10
grade 4	10	0

図 1 Cy3 ラベルされた対象サンプルの 2D ゲル・イメージ

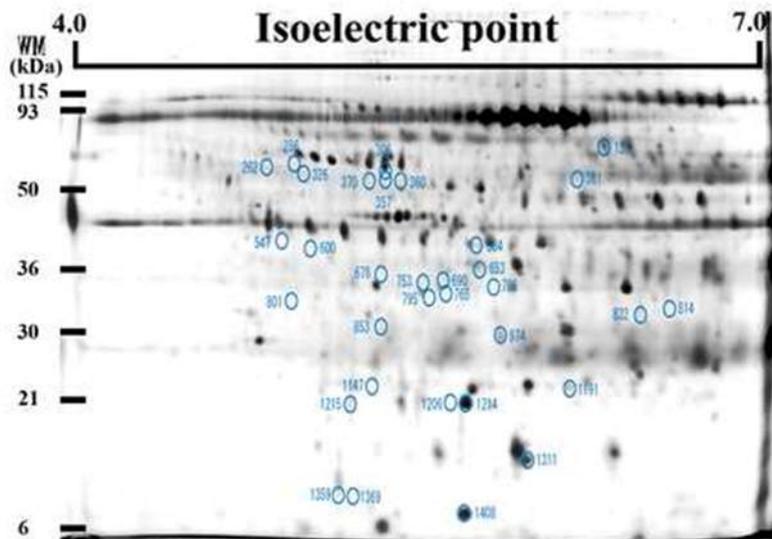


図3 ウェスタンブロット解析による PRDX2 の発現

A OA、Fx 検体における PRDX2 の発現

B 2つのスポットでの PRDX2 発現の解析

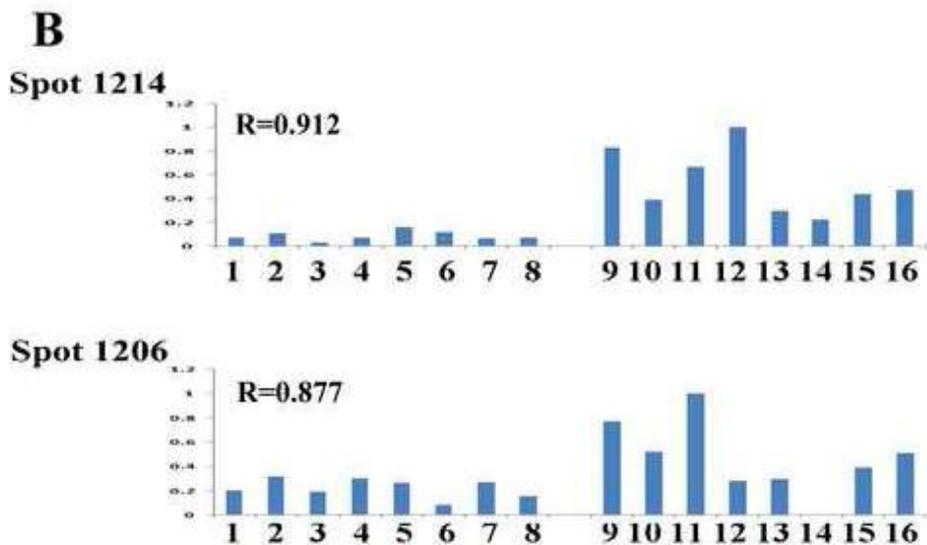
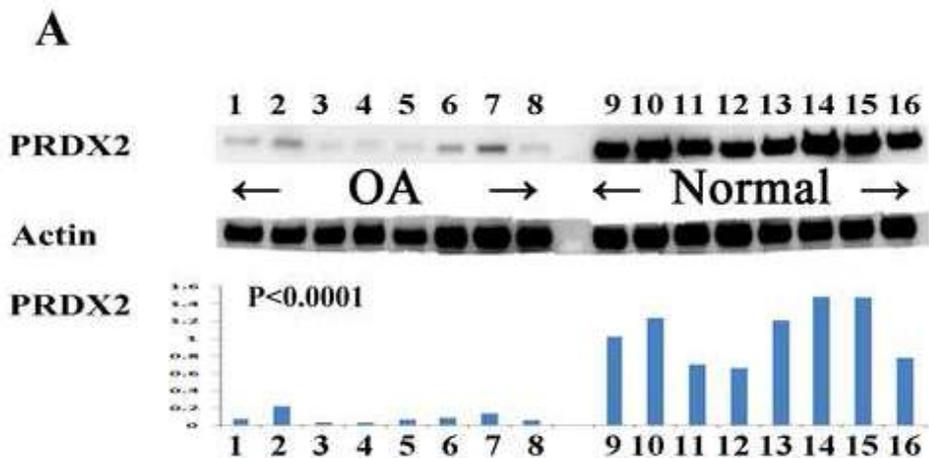


図4 検証検体におけるPRDX2の発現

