

関節リウマチ（RA: Rheumatoid Arthritis）と  
変形性膝関節症（OA: Osteoarthritis）患者の  
関節滑液中の炎症性、および抗炎症性  
脂質メディエーターの解析

日本大学大学院 医学研究科 博士課程

外科系 整形外科学専攻

佐野 有隆

修了年 2021年

指導教員 大幸 英至

関節リウマチ（RA: Rheumatoid Arthritis）と  
変形性膝関節症（OA: Osteoarthritis）患者の  
関節滑液中の炎症性、および抗炎症性  
脂質メディエーターの解析

日本大学大学院 医学研究科 博士課程

外科系 整形外科学専攻

佐野 有隆

修了年 2021年

指導教員 大幸 英至

## 目次

|   |       |
|---|-------|
| 略語  | 1-3   |
| 概要  | 4-6   |
| 緒言  |       |
| 1. 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA と変形性膝関節症 (Osteoarthritis:OA)) | 7,8   |
| 脂質メディエーター   | 8,9   |
| 2.  |       |
| ① 炎症性脂質メディエーター  | 9     |
| ② 抗炎症性脂質メディエーター   | 9,10  |
| 3. 脂質メディエーターと関節リウマチ   | 10    |
| 4. リピドミクス   | 10,11 |
| 目的  | 12    |
| 期待される成果   | 12    |
| 対象と方法   | 13    |
| 1. 倫理的考慮  | 13    |
| 2. 対象   | 13    |
| 3. 関節液の処理   | 13    |

|             |       |
|-------------|-------|
| 4. 酸化脂肪酸の抽出 | 14-16 |
| 5. 結果の表し方   | 16,17 |
| 6. 統計学的解析   | 17    |

## 結果

|   |       |
|---|-------|
| 1. 臨床背景   | 18    |
| 2. RA、OA 滑液中の AA 経路の COX-1/2、5 LO 代謝産物の脂質メ<br>ディエーターのプロファイルの比較  | 18    |
| 3. RA、OA 滑液中の AA 経路の 12/15-LO、P450 代謝産物の脂質メ<br>ディエーターのプロファイルの比較   | 19    |
| 4. RA、OA 滑液中の EPA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝<br>産物の脂質メディエーターのプロファイルの比<br>較   | 19,20 |
| 5. RA、OA 滑液中の DHA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝<br>産物の脂質メディエーターのプロファイルの比<br>較   | 20    |
| 6. PGD <sub>2</sub> (A) と PGE <sub>2</sub> (B)の濃度を nonsteroidal anti-inflammatory drugs<br>(NSAIDs) で加療された群(+)と、加療されていない群(-) 間の比<br>較 | 20,21 |

|        |       |
|--------|-------|
| 考察     | 22-27 |
| まとめ    | 28    |
| 謝辞     | 29    |
| 表      | 30-34 |
| 図      | 35-49 |
| 図説     | 50-55 |
| 引用文献   | 56-61 |
| 研究業績目録 | 62-66 |

## 略語

AA, Arachidonic acid

ABT, Abatacept

anti-CCP Ab, anti-cyclic citrullinated peptide antibody

APAP, Acetaminophen

AUC, Area under the curve

BUC, Bucillamine

COX, Cyclooxygenase

CRP, C-reactive protein

DHA, Docosahexaenoic acid

DHETE, dihydroxyeicosatrienoic acid

DiHETE, dihydroxyeicosatrienoic acid

EET, Epoxyeicosatrienoic acids

ESI-MS, Electrospray ionization-tandem mass spectrometry

ETE, Eicosatetraenoic acid

EPA, Eicosapentaenoic acid

ESI-MS, Electrospray ionization-tandem mass spectrometry

EBV, Epstein-Barr virus

GC, Gas chromatography

GPR31, G-protein coupled receptor 31

HDoHE, Hydroxydocosahexaenoic acid

HEPE, Hydroxyeicosapentaenoic acid

HETE, Hydroxyeicosatetraenoic acid  
HHT, Hydroxyheptadecatrienoic acid  
HpDHA, Hydroperoxydocosahexaenoic acid  
HpEPE, Hydroperoxyeicosapentaenoic acid  
HpETE, Hydroperoxyeicosatetraenoic acid  
IGU, Iguratimod  
LO, Lipoxygenase  
LT, Leukotriene  
LTs, Leukotrienes  
LX, Lipoxin  
LM, Lipid mediator  
LXs, Lipoxins  
LC, Liquid chromatography  
LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass  
spectrometry/mass spectrometry  
MaR, Maresin  
MMP3, Matrix metalloproteinase-3  
MTX, Methotrexate  
NSAID, Nonsteroidal anti-inflammatory drug  
ND, not done  
OA, Osteoarthritis  
P, Protectin  
PD, Protectin D  
PG, Prostaglandin

PPAR $\gamma$ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$

PUFA,  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acid

P450, cytochrome P450

PSL, Prednisolone

RA, Rheumatoid arthritis

RANK, Receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL, Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RF, Rheumatoid factor

Rv, Resolvin

SASP, Salazosulfapyridine

SPM, Specialized pro-resolving lipid mediator

TAC, Tacrolimus

TKA, Total knee replacement (total knee arthroplasty)

TLC, Thin-layer chromatography

TX, Thromboxane



## 概要

背景：アラキドン酸 (Arachidonic acid; AA)由来のシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase ; COX)およびリポキシゲナーゼ (Lipoxygenase ; LO)経路は、RA の病態に関与していると考えられている。具体的には、RA 関節滑液中では prostaglandin(PG)D<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、6-keto-PGF<sub>1α</sub>、thromboxane (TX)B<sub>2</sub>、Leukotriene (LT)B<sub>4</sub> などの炎症性脂質メディエーターが検出されることが報告されており RA の病態の増悪に関与していると考えられている。一方、液体クロマトグラフィータンデム質量分析/質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry/mass spectrometry; LC-MS / MS)を使用して、RA 患者の関節滑液中、Maresin (MaR)1、Lipoxin (LX)A<sub>4</sub>、および Resolvin (Rv)D<sub>5</sub> を含む抗炎症性/炎症収束作用を持つ脂質メディエーター (Lipid mediator; LM)である specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs)が検出されたとの報告があるが、重症 RA と重症 OA 患者の関節滑液中の脂質メディエーターを網羅的に比較解析した研究はない。

目的：重症 RA 患者の滑膜における脂質メディエーターの量的および質的变化を定量化し、脂質メディエーターの RA の病態への関与を明らかにするために、重症 RA および重症 OA 患者から得られた関節滑液中の脂質メディエーターのプロファイルを比較した。

方法：18名の RA 患者と26名の OA 患者を登録した。すべての患者は人工膝関節全置換手術を受け、関節滑液は手術中に採取した。これらの患者から

の関節滑液中の脂質プロファイリングを、LC/MS-MS を使用して測定した。定量化として2つの方法で示した。一つは、測定した脂質メディエーターをピーク面積の平均値 (Area Under The Curve; AUC)を用いて解析し、定量化した。代表的な脂質メディエーターの定量化に際しては、各化合物の標準品で得られた検量曲線を作成し、比較解析を行った。

結果：これまでに調べた 150 の酸化脂肪酸のうち、119 の酸化脂肪酸が患者の関節滑液中に曲線下面積/ mL のレベルで実質的に検出された。AA の COX-1/2 と 5 LO 代謝産物においては、PGF<sub>2α</sub>、5-Hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE)、LTB<sub>4</sub> が、OA 患者の関節滑液中よりも RA 患者の関節滑液中の方が有意に高かった。5LO 経路を介した LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、および LTE<sub>4</sub> の濃度は検出限界以下であった。AA の 12/15-LO および cytochrome p450 (P450)代謝に由来する脂質メディエーターでは、LXA<sub>4</sub>、LXB<sub>4</sub>、12-HETE、および 8,9-Epoxyeicosatrienoic acids (EET)の濃度は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方が有意に高かった。エイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid; EPA)から代謝される脂質メディエーターのプロファイルを調べたところ、5、8、12-Hydroxyeicosapentaenoic acid (HEPE)、および LTB<sub>5</sub> の濃度は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液で有意に高かった。ドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid; DHA)由来の脂質メディエーターの濃度 (酵素、非酵素ともに) は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方が有意に高かった。4-, 7-, 10-, 13-, 17-, 20-Hydroxydocosahexaenoic acid (HDoHE)と Protectin D1 (PD1)および RvD2 の絶対量 (pmol/mL)は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液で有意に高値であった。

従って、LTB<sub>4</sub>などの炎症誘発性脂質メディエーターの濃度だけでなく、LXA<sub>4</sub>、LXB<sub>4</sub>、PD1などのSPMsと呼ばれる脂質メディエーターの濃度も、OA患者からよりもRA患者から得られた関節滑液で有意に高値であった。脂質メディエーターの炎症性経路と炎症収束経路の両方の活性化は、重症のRA患者の関節滑液における脂質メディエーターの特徴であると考えられた。

結論：本研究では、新たに重症RA患者の関節滑液中の脂質メディエーターのプロファイルを明らかにした。

## 緒言

1. 関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA)と変形性関節症 (Osteoarthritis: OA)
2. 脂質メディエーター
  - ① 炎症性脂質メディエーター
  - ② 抗炎症性脂質メディエーター
3. 脂質メディエーターと関節リウマチ
4. リピドミクス

### 1. 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA)と変形性関節症 (Osteoarthritis: OA)

関節リウマチ (RA)および変形性関節症 (OA)は、関節の痛みおよび変形など共通した臨床的特徴を有する炎症性疾患であるが、病態発症のメカニズムは異なっている(1)。

RA は、滑膜炎や腫脹、リウマチ因子と抗シトルリン化タンパク抗体等の自己抗体の産生によって、軟骨や骨の破壊 (変形)が引き起こされる。さらに、心臓血管、肺、および骨格障害などを呈し、全身性の合併症状が見られる。早期に死亡する場合もある。RA の素因には、遺伝的要素 (HLA-DRA1 といった遺伝コード)や環境的要素 (喫煙や歯周病等)の関与が挙げられる。RA の診断は、診察所見や血液検査データを基に行い、治療は、Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs)やステロイド、DMARS や生物学的製剤で行なわれる。変形や症状が強い場合では、人工関節置換術療法が行われる(2)。

OA は加齢等で軟骨や骨の摩耗が生じ、骨に変形が生じる疾患である。OA では、機械的刺激などにより軟骨の変性・磨耗を生じ、関節周囲を取り囲む滑膜の炎症が惹起され変性が加速する。同時に関節周囲の骨軟骨形成などの増殖性変化を伴うこともある。これらの変化により血管増生や神経線維の増生をとともなう関節包の線維化が起こり、疼痛が生じる。病態と症状の関連としては、関節炎に伴う疼痛、腫脹および腫脹による関節の可動域制限が生じる。軟骨磨耗が進行すると、関節に炎症を生じる。繰り返す関節炎によって関節包の線維化が進行し、疼痛閾値の低下、関節の可動域がより制限された結果、関節は変形し、変形と症状の悪化の悪循環を起こす。OA の診断方法として、X 線 (レントゲン) 写真による骨棘形成、関節裂隙の狭小化、軟骨下骨の硬化、関節裂隙の消失などを評価し、理学療法や鎮痛剤での対症療法、重症な場合は手術療法が行われる。RA 患者および OA 患者の重症者には機能改善、疼痛改善の目的で、人工膝関節全置換 (人工膝関節全置換術)が行われる (3-5)。

## 2. 脂質メディエーター

脂質は、生体にとって、エネルギー源、細胞膜、シグナル分子、脂溶性ホルモンとしての役割があり、生命に必須の物質である。多価不飽和脂肪酸には、二重結合の位置によって  $\omega$ -6 系および  $\omega$ -3 系不飽和脂肪酸に分類される。 $\omega$ -6 系不飽和脂肪酸の一つである AA、 $\omega$ -3 系不飽和脂肪酸由来の EPA や DHA がある。AA からは  $\text{PGE}_2$  や  $\text{LTB}_4$  が代謝され生合成され (図 1)、EPA や DHA からは、Resolvin (Rv)、Protectin (P)、Maresin (MaR) などが代謝され生合成される (図 2、3)。脂質メディエーターには炎症を惹起する作用を持つものと、炎症を収束する作用を持つものが報告されている (6-9)。

### ① 炎症性脂質メディエーター

$\omega$ -6系不飽和脂肪酸の一つであるAAの代謝産物であるPGE<sub>2</sub>やLTB<sub>4</sub>などの脂質メディエーターが、炎症の惹起・増悪化に寄与していることが報告されている。例えば、AA代謝産物では、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、8,9-EET、EPA代謝産物では、PGE<sub>3</sub>、PGF<sub>3 $\alpha$</sub> 、DHA代謝産物では、13-HDoHEなどが炎症性脂質メディエーターとして知られている(10)(11)。

### ② 抗炎症性脂質メディエーター

一方で、AA由来のlipoxinや $\omega$ -3系不飽和脂肪酸(EPAやDHA)由来のResolvin (Rv)、Protectin (P)、Maresin (MaR)は、抗炎症と炎症収束作用を持ち、SPMsと呼ばれている(12)。敗血症モデルマウスに、RvD2を投与すると炎症局所への好中球浸潤が抑制され、血中の菌量が減少し、死亡率が減少したことや(13)、RvD1あるいはProtectin D1 (PD1)投与によって抗生物質 (Ciprofloxacin)の必要投与量を軽減し得たことが報告された(14)。また、Imaiらは、インフルエンザウイルス感染マウスモデルを用いた実験において、感染細胞からの内因性のPD1分泌が促進され、autocrineで作用し、viral RNAの複製を阻害すること、またPD1とPeramivir (抗インフルエンザ薬)を同時に投与すると、相乗的に作用し、感染モデルマウスの致死率が著明に減少したことを見出した(15)。

## 3. 脂質メディエーターと関節リウマチ

RA関節滑液中ではPGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 、TXB<sub>2</sub>、LTB<sub>4</sub>などが検出されることが報告されており、これらの脂質はRA関節炎に対する炎症性脂質メディエーターである(16)。RAにおいて神経損傷が起こると、LTB<sub>4</sub>の産生が促進され、痛みと骨の損傷の誘発に重要な役割を果たす。さらに、LTB<sub>4</sub>は炎症性サイトカインとROSの放出を増加させ、ニューロンの生存と痛みの閾

値を低下させる(17)。Maresin1 が RA において、miR-21 を介して Treg/Th17 のインバランスを是正したという報告もある(18)。また、RA 患者の関節滑液中の PGE<sub>2</sub> の濃度は、OA 患者の関節滑液中の PGE<sub>2</sub> の濃度より有意に高く、NSAIDs を服用している OA 患者ではステロイド服用患者よりも PGE<sub>2</sub> 濃度は低いことが報告されている(19)。これらの報告のように、脂質メディエーターは RA の病態発症・増悪化に関与している。

#### 4. リピドミクス

脂質の解析には、薄層クロマトグラフィー (Thin-layer chromatography: TLC) や液体クロマトグラフィー (Liquid chromatography: LC)、ガスクロマトグラフィー (Gas chromatography: GC) などの種々のクロマトグラフィー法が汎用されてきた。しかし、これらの分析法はある分子群にターゲットを絞った場合には有効であるが、微細な構造の違いを解析するのは難しく、何より分析に nmol オーダーの試料が必要であった。しかし、近年の高感度かつ定量性に優れた質量分析法の開発により、リン脂質の極性基や脂肪酸側鎖の組合せを含めた分子種レベルでの網羅的解析、さらに微量な脂質代謝産物の分析も可能となってきた。この脂質代謝物を網羅的に解析する研究は、リピドミクスという総称で呼ばれる(20)。生体内の脂質代謝物を網羅的かつ特異的に捉えることができる。これまでに、Jonasdottir らは、OA 患者の関節滑液中の脂質メディエーターを RA 患者の関節滑液と LC-MS/MS で比較している。RA 患者および OA 患者において検出された脂質メディエーター37種類であるが、検出された脂質のほとんどで、有意な差は見られていなかった(21)。しかし、この報告における LC-MS/MS の測定系では SPM は測定することができていなく炎症性および抗炎症性の脂質メディエーターの両方を網羅できていない。Giera ら

は LC-MS / MS を使用して、RA 患者の関節滑液で 70 種類の脂質メディエーターを検出し、その中に MaR1、LXA<sub>4</sub>、および RvD5 を含むいくつかの SPM が含まれていることを報告した(22)。しかしながら、疾患コントロールでの測定は行われておらず、RA の特異性は検証されていない。



## 目的

重症 RA 患者の関節滑膜における脂質メディエーターの量的および質的变化を定量化し、脂質メディエーターの RA の病態への関与を明らかにするために、重症 RA および重症 OA の患者から得られた関節滑液中の脂質メディエーターのプロファイルを比較した。

## 期待される成果

重症 RA 関節滑液中の脂質メディエーターのプロファイルを解明し、重症 RA の成因解明の一助になること。また、重症 RA の病態解明の切り口となるような脂質メディエーターを探求すること。

## 対象と方法

### 1. 倫理的考慮

関節滑液の使用に際して、臨床研究倫理審査委員会の承認 (RK-160112-2)を受け、ヘルシンキ宣言に従い、インフォームドコンセントを得た。

### 2. 対象

当院で重症 RA 患者、重症 OA 患者の人工膝関節置換術 (Total knee arthroplasty; TKA)を行った時 (2017年2月から2019年10月まで)にそれぞれ18例および26例の患者から関節滑液を採取した。RA、OAの平均年齢は、それぞれ75.5歳 (53-88)、71.5歳 (54-84)、女性比はそれぞれRAで94.4%、OAで53.8%、BMIはそれぞれRAで22.5 (16.7-28.3)、OAで25.65 (18.1-30.8)であった (表1)。

### 3. 関節液の処理

採取した関節滑液を20 µg/mLのヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich, STL, U.S.A)で37°C、30分処理した後、860×gで10分間遠心分離した。上清を回収し、脂質の酸化を防ぐためにチューブをN<sub>2</sub>ガスで満たした。脂質の解析まで、サンプルを-80°Cで凍保存した。サンプルを解析に使用するときは、氷上で解凍した。

### 4. 酸化脂肪酸の抽出

ヒアルロニダーゼ処理した関節滑液から固相抽出法 (溶媒 ; 0.1%酢酸水溶液、アセトニトリル/メタノール=4/1 混合溶液、カラム ; Kinetex C18) で酸化

脂肪酸を抽出した。Electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS) を用いて 150 の酸化脂肪酸を測定した。4000 Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, U.S.A)、LC (NexeraX2 system; Shimadzu, Kyoto, Japan)を使用した。ヒアルロニダーゼで処理した関節滑液の ESI-MS 用の処理は、Murase らの方法に準じて行った(23)。具体的には、解凍した関節滑液を 10 容量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) とメタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)で 10% (v / v) メタノール溶液になるように調整した。その後、溶液を 0.1% HCL で pH4.0 に調整した。H<sub>2</sub>O、メタノール、H<sub>2</sub>O の順に、Oasis HLB カートリッジ (Waters, Milford, MA, USA) にアプライしカートリッジを平衡化した。平衡化したカートリッジにサンプル溶液をアプライした。その後、10 mL のヘキサン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)で夾雑物を除き、3 mL のギ酸メチル (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)で脂質メディエーターを溶出した。溶出したサンプルから N<sub>2</sub> ガスを用いて、ギ酸メチルを除去し、60%メタノールに再溶解した。次に、調整したサンプルを 4000 Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) に接続された Kinetex C18 カラム (内径 1×150 mm、1.7- $\mu$ m 粒子) (Phenomenex) にアプライした。オートサンプラー (10  $\mu$ L) で注入されたサンプルは、45°C で 0.2 mL/min の流量で、移動相 A (0.1%酢酸を含む水) と移動相 B (アセトニトリル/メタノール= 4 : 1; v / v) のステップグラジエントによって分離された。脂質メディエーターの同定は、複数の反応モニタリング (MRM) トランジションとリテンションタイムで行われた。内部標準として、Eicosapentanoic Acid-d5 (d5-EPA, Cayman Chemical Company)および d7-labeled 17:0 lysophosphatidylcholine (1 nmol; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) を各サ

サンプルに追加した。脂質メディエーターの絶対量の定量に選択した脂質メディエーターは、機能が比較的明らかになっている脂質メディエーターおよび検量曲線を作成するため購入可能かつ、LC/MS-MSにおいてピーク面積が安定して測定可能な脂質メディエーターを選択した。脂質メディエーターの定量は、ピーク面積の平均値 (Area Under The Curve; AUC)を測定し、濃度既知の脂質メディエーターの AUC を測定し、測定した AUC と脂質メディエーターの濃度から、検量曲線を作成した。得られた検量曲線から、各サンプルの脂質メディエーターの AUC の値から濃度 (pmol/mL)を算出し、RA 患者と OA 患者の脂質メディエーターの濃度の比較解析を行なった。具体的な算出方法は、図 4 に示した。検量線を作成する際に、濃度既知の脂質メディエーターを用いており、LC-MS 上で、脂質メディエーターのピークが検出できる濃度を検証した。したがって、実際のサンプルの AUC が、作成した検量線内であれば定量可能である。なお、以下の 150 の酸化脂肪酸を測定した。20-carboxy-LTB<sub>4</sub>, 20-hydroxy-LTB<sub>4</sub>, 20-carboxy-AA, 18-carboxy-dinor-LTB<sub>4</sub>, 2-3-dinor-6-keto-PGF<sub>1a</sub>, 6ketoPGF<sub>1a</sub>\_1, 6ketoPGF<sub>1a</sub>\_2, 2-3-dinor-8-iso-PGF<sub>2a</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>\_1, LTC<sub>4</sub>\_2, LTD<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>\_1, LTD<sub>4</sub>\_2, LTE<sub>4</sub>, N-acetyl-LTE<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>\_1, LTE<sub>4</sub>\_2, LXA<sub>4</sub>, LXB<sub>4</sub>, 12-oxo-LTB<sub>4</sub>, TXB<sub>2</sub>, TXB<sub>3</sub>, LXB<sub>4</sub>\_2, PGD<sub>2</sub>\_1, PGD<sub>2</sub>\_2, 13-14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2a</sub>, 13-14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub>\_13-14-dihydro-15-keto-PGJ<sub>2</sub>, 13-14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF<sub>1b</sub>\_PGF<sub>1a</sub>, PGD<sub>2</sub>\_3, PGE<sub>1</sub>\_PGD<sub>1</sub>\_8-iso-PGE<sub>1</sub>\_8-iso-PGA<sub>1</sub>, PGE<sub>1</sub>-EA, PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>\_13-14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>\_PGD<sub>2</sub>\_8-iso-PGA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>-EA\_PGD<sub>2</sub>-EA, 20-hydroxy-PGE<sub>2</sub>, 20-hydroxy-PGF<sub>2a</sub>, 13-14-dihydro-15-keto-tetranor-PGD<sub>2</sub>\_PGE<sub>2</sub>, Tetranor-PGEM\_Tetranor-PGDM, Tetranor-PGFM, d4\_PGE<sub>2</sub>\_PGD<sub>2</sub>, 14-15-EET, 14-15-DHET, 14-15-DiHETE, PGE<sub>2</sub>\_PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>\_PGD<sub>3</sub>, PGF<sub>2a</sub>, PGF<sub>2a</sub>-EA, PGF<sub>3a</sub>, 15deoxyPGJ<sub>2</sub>, 6ketoPGF<sub>1a</sub>, TXB<sub>2</sub>, 5-HETE, 5-HpEPE, 5-HpETE, 5-oxo-ETE\_5-KETE,

5(6)-EET, 8-HETE\_8,9-EET, 8-9-DHET, 12-HETE, 12-oxo-ETE(12-KETE), 12-HpETE, PGA<sub>2</sub>\_PGJ<sub>2</sub>\_12-HpEPE, 15-HETE\_14,15-EET, 15-HETE, 15-HETrE, 15-HpEPE, 15-HpETE, 15-keto-PGE<sub>2</sub>, 15-keto-PGF<sub>2a</sub>\_8-iso-15-keto-PGF<sub>2a</sub>, 8-iso-15-keto-PGF<sub>2b</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, 8-iso-PGF<sub>1a</sub>\_8-iso-PGF<sub>1b</sub>, 8-iso-PGF<sub>3a</sub>, 8-15-DiHETE, 15deoxyPGJ<sub>2</sub>, 16-HETE, 16(17)EpDPE\_16-HDoHE, 17-HETE, 18-HETE, 18-HEPE\_17,18-EpETE, 17-18-DiHETE, 5-oxo-ETE, 12-HHT, 15-oxo-ETE, 12-HHTrE\_1, 12-HHTrE\_3, 6-15-diketo-1314-dihydro-PGF<sub>1a</sub>, 11-b-13-14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2a</sub>\_8-iso-1314-dihydro, 15-keto-PGF<sub>2a</sub>, 11-dehydro-TXB<sub>2</sub>, 11-HDoHE, 11-HETE\_11(12)-EET, 11-12-DHET, 20-HETE, LTB<sub>4</sub>, LTB<sub>5</sub>, LXA<sub>5</sub>-1, LXA<sub>5</sub>\_2, 5S6R-LXA, d5-EPA, 5-HEPE, 8-HEPE, 12-HEPE, 15-HEPE, 15-HEPE\_15-oxo-ETE, 18-HEPE/17,18-EpETE, RvD1, RvD2, RvD2\_RVD1, RvE1\_1, RvE1\_2, RvE2\_3, 4-HDoHE, 5-6-DHET, 5-6-DiHETE, 7-HDoHE, 8-HDoHE, 7,17-diHDoHE, 9-HODE, 9-HOTrE, 9-KODE, 10-HDoHE, 11-HDoHE, 13-HDoHE, 13-HODE, 13-HOTrE, 13-KODE, 14-HDoHE, 17-HDoHE, 7,17-diHDoHE, 20-HDoHE, 20-HDoHE\_19,20-EpDPE, PD1, RvD1, RvD2, RvD2\_RVD1, iPF2a-IV, 7(S)Maresin1\_1, 7(S)Maresin1\_2, 5-15-DiHETE, 7(S)Maresin, 7(S)Maresin1\_3, 15-HEDE, 9-HODE, 13-HODE, 9-KODE, 13-KODE+13-HOTrE, 9-HOTrE

## 5. 結果の表し方

結果は、LC/MS-MS で測定した脂質メディエーターで、AUC を出し、OA と RA の比率を計算した。OA を 1 として RA の比率に応じて、色をつけた。赤いもの程 RA において高値で、OA と比較し、最大 30 倍程度の違いがあり、赤色で示した。白色は 1 倍、黄色は 10 倍程度、オレンジ色は 20 倍程度 RA で高値であることを示している。

## 6. 統計学的解析

Mann-Whitney U 検定を使用して、2つのグループを比較した。カテゴリ変数を比較するために、2-side Fisher exact test を使用した。The receiver operator characteristic curve (ROC 曲線)を使用して、特異性と感度の合計が最大となる値をカットオフ値とした。Spearman の順位相関係数を計算して、連続変数間の相関の強さを決定した。3群比較は、One-way ANOVA と Tukey's multiple comparison test で行なった。  $p$  値 $<0.05$  を統計学的に有意であるとした。データ分析は、GraphPad Prism ver. 7 (GraphPad software; San Diego, CA, USA) で行なった。

# 結果

## 1. 臨床背景

RA、OA の平均年齢は、それぞれ 75.5 歳 (53-88)、71.5 歳 (54-84)、女性比はそれぞれ RA で 94.4%、OA で 53.8%、BMI はそれぞれ RA で 22.5 (16.7-28.3)、OA で 25.65 (18.1-30.8)であった (表 1)。患者の背景 (臨床情報; 血清 WBC、CRP 値、抗 CCP 抗体濃度、MMP3 濃度、RF 濃度の血液検査データや、NSAIDs の使用歴) は表 2, 3 に示した通りである。また、NSAIDs 使用は、それぞれ RA で 28% (表 2)、OA で 70%であった (表 3)。

## 2. RA、OA 滑液中の AA 経路の COX-1/2、5 LO 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

まず、AA から代謝される脂質メディエーターのプロファイルを調べるため、AA の COX-1/2 と 5 LO 代謝産物の RA と OA の AUC の比を算出したところ大部分の脂質代謝物は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方が有意に高かった (図 5、8A)。6-keto-PGF<sub>1α</sub> (PGI<sub>2</sub> の安定な代謝産物) PGF<sub>2α</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、12-hydroxyheptadecatrienoic acid (HETE)、5-HETE、5-oxo-eicosatetraenoic acid (ETE)、LTB<sub>4</sub>、LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、LTE<sub>4</sub> などの代表的なエイコサノイドは、濃度既知の脂質を用いて検量線を作成し定量化した。PGF<sub>2α</sub>、5-HETE、LTB<sub>4</sub> は、OA 患者の関節滑液中よりも RA の関節滑液中の方が有意に高かった (図 5、8A)。5LO 経路を介した LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、および LTE<sub>4</sub> の濃度は検出限界以下であった (図 5、8A)。

### 3. RA、OA 滑液中の AA 経路の 12/15-LO、P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

次に、12/15-LO と P450 を介して代謝される脂質メディエーターのプロファイルを調べた。これらの代謝産物の中で、5-LO と 12/15-LO の複合作用によって生合成される AA 由来の SPM である LXA<sub>4</sub> が、RA 患者の関節滑液で検出された。12/15-LO および P450 代謝に由来する脂質メディエーターの濃度は、12-, 15-, 5-Hp-15-HETEs, 8, 15-, 5, 15-DiHETEs, LXA<sub>4</sub> および 12-oxo-ETE で、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方で高値であった (図 5、8A)。また、抗炎症作用と鎮痛作用を持ついくつかの epoxyeicosatrienoic acids (EETs) とその加水分解代謝物である dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETE) を含む、AA の P450 代謝産物の濃度は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方が高値であった (図 5、8A)。12/15-LO および P450 代謝産物のうち、LXA<sub>4</sub>、LXB<sub>4</sub>、12-HETE、および 8,9-EET といった代表的な脂質メディエーターの検量曲線を作成し、その絶対量 (pmol / mL) を定量した (図 8B)。その結果、LXA<sub>4</sub>、LXB<sub>4</sub>、12-HETE、および 8,9-EET の濃度は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方が有意に高かった (図 8B)。したがって、これらのことから RA では、AA の代謝が OA よりも亢進していることが示唆された。

### 4. RA、OA 滑液中の EPA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

EPA から代謝される脂質メディエーターのプロファイルを調べたところ、TXB<sub>3</sub> や PGE<sub>3</sub> などの COX 代謝産物、また RvE1 や LXA<sub>5</sub> などの SPM の濃度は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方が高かった (図 6、9A)。検量曲線より脂質メディエーターの濃度を定量したところ、5-, 8-, 12-



HEPE、および LTB<sub>5</sub> の濃度は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液で有意に高かった (図 9B)。

## 5. RA、OA 滑液中の DHA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

これまでに、DHA に由来するいくつかの脂質メディエーターが RA および OA 患者から得られた関節滑液で検出されたことが報告されているが (22)、その濃度には RA 患者の関節滑液と OA 患者の関節滑液間で有意差はなかった。本研究では、DHA 由来の脂質メディエーターの濃度 (酵素、非酵素ともに) は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液の方が有意に高かった (図 7、10A)。4-, 7-, 10-, 13-, 17-, 20-hydroxydocosahexaenoic acids (HDoHEs) を含む DHA からの代表的な脂質メディエーターに加え、SPM である PD1 や RvD2 を定量化 (pmol/mL) した (図 10B)。その結果、4-, 7-, 10-, 13-, 17-, 20-HDoHE と PD1 および RvD2 の絶対量 (pmol/mL) は、OA 患者の関節滑液よりも RA 患者の関節滑液で有意に高値であった (図 10B)。

## 6. PGD<sub>2</sub> (A) と PGE<sub>2</sub> (B) の濃度を nonsteroidal anti-inflammatory drugs

### (NSAIDs) で加療された群(+)と、加療されていない群(-) 間の比較

OA 患者 26 例のうち 18 例、RA 患者 18 例のうち 5 例が NSAIDs で治療されていた。なお、使用された NSAIDs は、ロキソプロフェン (180 mg/日、n = 7) またはセレコキシブ (200 mg/日、n = 11) の 2 種類であり、ロキソプロフェンは COX-1、COX2 を両方とも阻害するのに対し、セレコキシブは胃粘膜保護等の観点から COX-2 を選択的に阻害する薬剤である(24)。NSAIDs が COX を阻害することで PG 等の産生を抑制することから、滑液中の PG の濃度に影響する

かを検証するために、OA 患者の関節滑液における PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 濃度をロキソプロフェン使用群、セレコキシブ使用群、NSAIDs 未使用群で比較した。PGD<sub>2</sub> 濃度 (pmol/mL) に関して、3 群間で有意差はなかった (図 11A)。PGE<sub>2</sub> 濃度 (pmol/mL) において、ロキソプロフェン使用群が、NSAIDs 未使用群より高く、その他では有意な差はなかった (図 11B)。

## 考察

検索した限りでは RA における血清中の脂質メディエーター測定の結果は、なく関節滑液で検討されているため本研究においても関節滑液中の脂質メディエーターを測定した。本研究で、重症 RA 患者 18 名および重症 OA 患者 26 名の関節滑液から、脂質メディエーターを抽出しリポドミクスを用いて、初めて脂質メディエーターの網羅的解析を行った。その結果、AA、EPA および DHA から代謝され、炎症と炎症収束性の役割を有する脂質メディエーターが RA で有意に高値であった (図 12)。したがって、RA では脂質の代謝が盛んに行われていることが、重度の RA 患者の関節腔内における脂質メディエーターの特徴であることが示唆された。RA 患者における AA の COX および 5-LO 経路が活性化していることはよく知られている(2)。このことは、本研究結果を支持している。

Hashimoto らは、免疫吸着アッセイ酵素を用いて、LXA<sub>4</sub> および 15-epi-LXA<sub>4</sub> は、OA 患者の関節滑液 (LXA<sub>4</sub> の  $0.66 \pm 0.77$  ng/mL) よりも RA 患者の関節滑液 (LXA<sub>4</sub> の  $10.34 \pm 14.12$  ng/mL) の方が有意に高値であることを報告している(25)。さらにその後、Giera らは LC-MS/MS を使用して、RA 患者の関節滑液で、MaR1、LXA<sub>4</sub>、および RvD5 を含むいくつかの SPM を検出した(22)。

本研究では、LC-MS/MS ベースのリポドミクスアプローチを使用した包括的な脂質メディエーターのプロファイリングの結果として、PGs や LTs などの炎症性脂質メディエーターに加え、RA 患者の関節滑液で LXA<sub>4</sub>、LXB<sub>4</sub>、および PD1 を含む SPM の生産が大幅に増加することを初めて示した。また、LXA<sub>4</sub> は、OA の関節滑液よりも RA の関節滑液で有意に高いという Hashimoto らに

よる報告結果を確認した(25)。したがって、滑膜で継続的に炎症が引き起こされている一方で、抗炎症性および炎症収束性メディエーターによって炎症を収束させる過程として、SPMは産生されたと考えられる。Jonasdottiretらは、RAまたはOA患者から得られたどの関節滑液でもSPMは検出されなかったと報告している(21)。この報告では、methyl-tert-butyl etherを使用して脂質を抽出しているのに対して、本研究では、C18カラムを用いた固相抽出法によって脂質を抽出している。これらのことから、SPMの検出に違いが見られたと考えられる。

RA患者の関節滑液の19脂質メディエーターの濃度は、OA患者の関節滑液の濃度よりも有意に高値であった(図8B、9B、10B)。19の脂質メディエーターの特異度および感度から、陽性尤度比、陰性尤度比を算出したところ、19の脂質メディエーターのうち17の脂質メディエーターは、OAと比較してRAで有意な特異性を示した(表4)。5-HETE、12-HETE、8,9-EETなどの炎症性メディエーターと、LXA<sub>4</sub>、PD1、12-HEPE、4-HDoHE、17-HDoHEなどの抗炎症性および炎症収束性メディエーターは、重症のRAの病態に関与している可能性がある。また、5-HETE、LTB<sub>4</sub>、および12-HETEは、好中球誘引物質、活性化因子である(26–28)。さらに、8,9-EETは、内皮細胞にパラメトキシアンフェタミン誘発性の好中球接着を増強する(29)。一方、LXA<sub>4</sub>とLXB<sub>4</sub>は好中球の遊走と接着を阻害する(30)。PD1は白血球の浸潤を調節し、急性炎症時の食細胞の除去を促進し、アポトーシスした好中球のマクロファージ貪食を増加させる(31)。好中球は、5-HETE、LTB<sub>4</sub>、12-HETE、LXA<sub>4</sub>、およびLXB<sub>4</sub>の細胞供給源の1つである。したがって、これらの脂質メディエーターは、RA患者の関節滑液における好中球活性化レベルを部分的に反映している可能性が考えられ

る。PGF<sub>2α</sub>は、軟骨形成分化と、拡大したヒト関節軟骨細胞による硝子軟骨の基質沈着を増強する(32)。ヒト滑膜線維芽細胞においてLXA<sub>4</sub>は、IL-1βを誘発し、IL-6、IL-8、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ3の産生を阻害し、メタロプロテイナーゼの組織阻害剤の合成を促進する(33)。したがって、これらの脂質メディエーターは、RAの病因におけるさまざまな炎症状態を反映している可能性がある。

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR $\gamma$ )は脂質代謝や骨代謝、血管新生などの様々な生理反応を制御する核内受容体である。RAの滑膜線維芽細胞においてPPAR $\gamma$ をKnock downすると、増殖因子であるc-Mycや細胞周期をS期に移行させるCyclin D1の発現が増加し、滑膜線維芽細胞の増殖が促進されることが報告されている(34)。また、4-HDoHEは、PPAR $\gamma$ のリガンドとして作用し、endothelial cellの増殖と血管新生を抑制する(35)。12-HETEを脳に投与すると、脳内のPPAR $\gamma$ の発現が上昇する(36)。これらの報告から、RAの病態をあわせて考えると、RAでは12-HETEが増加しているためRAの滑膜線維芽細胞に発現するG-protein coupled receptor 31 (GPR31)に12-HETEが結合することで滑膜線維芽細胞のPPAR $\gamma$ の発現が上昇し、RAで増加している4-HDoHEが、発現上昇したPPAR $\gamma$ を介して、c-MycやCyclin D1の発現が抑制され、滑膜線維芽細胞の増殖が抑制されることが考えられる。その結果、関節リウマチによる関節炎を抑制する可能性が考えられる。

本研究にはいくつかの制限がある。まず第一に、この研究で使用したサンプルは、人工膝関節全置換手術を受けた患者から得られたサンプルに限定されている。つまり、サンプルは重篤な臨床疾患を持つ登録者に限定されていたため、結果の外部有効性は、重度の臨床疾患を持つ患者の幅狭いサンプルに限定されている。また、手術を必要とするコントロール不良群のみの検体での評価

で、発症初期や、手術にいたる前のサンプルの評価はできなかったこと、および、健常者の検体は採取できなかったことがこの研究の限界である。健常人の関節液を採取することは量的にも倫理的にも困難であったため、これまでの RA の研究では、歴史的に OA との比較が多く用いられており(37-40)、本研究においても人工膝関節全置換手術を受けた OA 患者から得られた関節液を対象とした。発症初期や、病状の進行に対する経時的変化を追って、脂質メディエーターを評価することが臨床的に意義があると考えられるが、発症初期や局所の炎症がコントロールされている場合、関節滑液の採取が困難であり、発症初期からの経時的変化を見るためには、さらに少量の関節滑液での測定法の開発などの技術的進歩が必要となるだろう。今後の課題である。第二に、RA の疾患特異性として女性の罹患率が高いために RA と OA 患者間で女性比および BMI に有意差を認めた。これらの条件の結果に対する影響を否定することはできない。第三に、本調査結果は他施設でも確認する必要がある。第四に、薬剤の使用による脂質メディエーターの代謝への影響である。NSAIDs の影響に関しては、OA、RA 患者の多数、すなわち 26 名の OA 患者のうち 18 名、18 名の RA 患者のうち 5 名が NSAIDs で治療されていた。OA 患者に対して、NSAIDs 未使用群、ロキソプロフェン使用群、セレコキシブ使用群で、AA から COX で代謝される PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 濃度を比較することで、NSAIDs の EPA や DHA から COX で代謝される脂質メディエーターへの影響を推察することができると考えた。ロキソプロフェン (180 mg/日、n = 7) またはセレコキシブ (200 mg/日、n = 11) で治療された OA 患者の関節滑液における PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 濃度が有意に低値となる結果ではなかった。むしろ、PGE<sub>2</sub> 濃度において、ロキソプロフェン使用患者の方が、NSAIDs で治療されていなかった OA 患者の患者よりも高かった (図 8A、B)。本研究で治療された患者において、EPA、DHA の代謝産物に関し

ても同様に、COX の影響は少ないと考えられる。したがって、RA 患者の治療における NSAIDs の使用の有無は、関節滑液中の脂質メディエーターの濃度に大きな影響を与えない可能性がある。手術症例は、他院からの紹介患者が多く含まれており、術前のステロイド関節内注射の既往や EPA や DHA のサプリの服用、ロイコトルエン阻害剤の服用歴に関しては追跡困難であったが、手術期感染を懸念して、術前 3 ヶ月間はステロイドの関節注射を施行していなかった。また、手術入院時にロイコトルエン阻害剤や服用していない。しかしながら過去のステロイド関節注射が本研究結果にどのような影響を及ぼすかは不明である。第五に、脂質メディエーターは不安定であり、手術時の検体採取から測定までの間に酸化反応が生じている可能性があり、全ての脂質メディエーターが必ずしも採取時の状態を必ずしも保っているわけではないと考えられる。しかし、ヒアルロニダーゼ処理は、全て同じ条件で行い、すぐに N<sub>2</sub> ガスで脂質メディエーターの酸化を防止し、-80°C で保存しているため、少なくとも同条件でサンプルを準備しているためドナー間での検体採取から測定までの状況の差異は少ないと考えられる。

メトトレキサート、経口グルココルチコイド薬、抗 TNF- $\alpha$  製剤、B 細胞に対する生物学的製剤など、さまざまな抗リウマチ薬を使用しているにもかかわらず、COX および 5-LO 経路の AA 代謝産物は炎症を惹起していると報告されている(41–43)。これらの抗リウマチ薬が脂質メディエーターのプロファイルに影響を与える可能性は否定できないが、複数の抗リウマチ薬で患者を治療した重度の RA 患者の関節滑液では、脂質メディエーターの炎症経路と抗炎症経路の両方の活性化が観察された。

以上のことから、重症の RA 患者の関節滑液の脂質メディエーターのプロファイルは、重症の OA 患者の関節滑液のプロファイルとはかなり異なっていた。炎症経路に関与する脂質メディエーターの過剰産生は、脂質メディエーターの上方制御された炎症収束経路によって抑制されず疾患の再発につながる可能性がある。



## まとめ

重症 RA 患者の関節滑液における脂質メディエーターの量的および質的变化を明らかにするために、重症 RA 患者 18 名、および重症 OA の患者 26 名から人工膝関節置換術時に関節滑液を採取した。滑液中の脂質メディエーターのプロファイルを液体クロマトグラフィータンデム質量分析/質量分析を使用して比較した。

本研究の新規性は、

- ① 網羅的に RA の関節滑液のプロファイルを明らかにしたこと。
- ② OA と比較し、RA 関節滑液中で、炎症性脂質メディエーターだけでなく、多くの抗炎症性脂質メディエーターもまた上昇していたこと。
- ③ 150 の酸化脂肪酸のうち、119 の酸化脂肪酸が患者の関節滑液中に曲線下面積/ mL のレベルで実質的に検出された。代表的な脂質を検量したところ、19 種類の脂質 (炎症誘発性脂質メディエーターの濃度だけでなく、SPM と呼ばれる脂質メディエーターの濃度も含め) で変形性関節症患者からよりも関節リウマチ患者から得られた関節滑液で有意に高値であった。その中で 17 の脂質は ROC 曲線を作成した際に有意な特異性を示し、5-HETE、12-HETE、8,9-EET などの炎症性脂質メディエーター、LXA<sub>4</sub>、PD1、12-HEPE、4-HDoHE、17-HDoHE などの抗炎症性、炎症収束作用を持つ脂質メディエーターは、重度の RA の病態に関与することが示唆されたこと

である。

## 謝辞

本研究は日本大学医学部免疫・アレルギー学プロジェクトチーム (岡山吉道准教授)において実施したものです。また、東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター健康環境医工学教室 (村上誠教授)との共同研究です。

本研究に関して、直接研究ならびに学位論文のご指導、ご校閲を直接賜りました岡山吉道准教授に深謝いたします。また、研究のご指導を賜りました豊島翔太博士 (日本大学医学部免疫・アレルギー学プロジェクトチーム)ならびに三木寿美博士 (東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター健康環境医工学教室)に深謝いたします。本研究のために関節滑膜、関節滑液をご提供いただいた日本大学医学部整形外科系整形外科分野、齋藤修元准教授、ご指導賜りました、日本大学医学部整形外科系整形外科分野、中西一義教授、大幸英至准教授に深謝いたします。

## 表

表 1; 患者の臨床情報のまとめ

|                           | RA (n = 18)           | OA (n = 26)           | p value            |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Age, year (median, range) | 75.5 (53 - 88)        | 71.5 (54 - 84)        | 0.059 <sup>†</sup> |
| Female, n (%)             | 17 (94.4)             | 14 (53.8)             | 0.006 <sup>#</sup> |
| BMI (median, range)       | 22.50 (16.70 - 28.30) | 25.65 (18.10 - 30.80) | 0.025 <sup>†</sup> |

† Mann Whitney U test, # Fisher exact test.

表 2; RA 患者の臨床情報

|      | Sex | Age<br>(yr) | Duration<br>of illness<br>(yr) | Peripheral<br>leukocyte<br>counts<br>(/mm <sup>3</sup> ) | Serum<br>CRP<br>level<br>(mg/dL) | Serum<br>anti-CCP<br>Ab level<br>(U/mL) | Serum<br>MMP3<br>level<br>(ng/mL) | Serum<br>RF level<br>(mg/dL) | Medication                   |
|------|-----|-------------|--------------------------------|--|----------------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| RA1  | F   | 64          | 22                             | 10,500   | 2.3                              | 88.4                                    | 396.8                             | 330                          | PSL+SASP                     |
| RA2  | F   | 80          | 4                              | 5,700  | 4.1                              | >1,200                                  | 417.4                             | 258                          | MTX+PSL+SASP+TAC             |
| RA3  | F   | 77          | 5                              | 7,400  | 0.1                              | 0.6                                     | n.d.                              | 5.3                          | NSAID <sup>a)</sup>          |
| RA4  | F   | 69          | 27                             | 5,400  | 1.4                              | 135.6                                   | 166.6                             | 53                           | MTX+PSL                      |
| RA5  | F   | 54          | 21                             | 6,200  | 4.6                              | 47.5                                    | 509.6                             | 35                           | IGU+PSL+SASP                 |
| RA6  | M   | 80          | 1                              | 7,100  | 2.51                             | >500                                    | 711.6                             | 164                          | PSL+TAC                      |
| RA7  | F   | 64          | 1                              | 12,900   | 0.1                              | 0.6                                     | 185.5                             | 21.9                         | MTX+NSAID <sup>b)</sup> +PSL |
| RA8  | F   | 74          | 10                             | 5,300  | 0.31                             | 860                                     | 47.6                              | 240                          | MTX                          |
| RA9  | F   | 69          | 9                              | 4,300  | 0.6                              | 362.5                                   | 87.3                              | 45.7                         | MTX+NSAID <sup>b)</sup> +PSL |
| RA10 | F   | 77          | 14                             | 5,700  | 0.1                              | 85.9                                    | 73.2                              | 28.3                         | BUC+SASP                     |
| RA11 | F   | 84          | 7                              | 4,800  | 0.11                             | 320                                     | 463.1                             | 55.1                         | ABT+MTX                      |
| RA12 | F   | 74          | 3                              | 7,500  | 0.1                              | 32.1                                    | 415.4                             | 3                            | APAP+PSL                     |
| RA13 | F   | 78          | 22                             | 8,000  | 3.78                             | 727                                     | 386.7                             | ND                           | MTX+NSAID <sup>a)</sup>      |
| RA14 | F   | 54          | 3                              | 5,400  | 0.63                             | 491                                     | 225.8                             | 703.1                        | MTX                          |
| RA15 | F   | 63          | 5                              | 6,600  | 0.54                             | 166                                     | 105                               | 115.2                        | MTX                          |
| RA16 | F   | 60          | 9                              | 8,200  | 0.15                             | 358.1                                   | 414.8                             | 186.5                        | MTX+PSL                      |
| RA17 | F   | 60          | 2                              | 8,000  | 0.84                             | 0.6                                     | 132.6                             | 6.7                          | IGU                          |
| RA18 | F   | 77          | 1                              | 7,500  | 0.47                             | 0.6                                     | 108.2                             | 3.7                          | NSAID <sup>b)</sup>          |

ABT, abatacept; anti-CCP Ab, anti-cyclic citrullinated peptide antibody; APAP, acetaminophen; BUC, bucillamine; CRP, C-reactive protein; IGU, iguratimod; MMP3, matrix metalloproteinase-3; MTX, methotrexate; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; ND, not done; PSL, prednisolone; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; SASP, salazosulfapyridine; TAC, tacrolimus.

a) Loxoprofen 180 mg/day. b) Celecoxib 200 mg/day.

表 3; OA 患者の臨床情報

|      | Sex | Age (yr) | Duration of illness (yr) | Peripheral leukocyte counts (/mm <sup>3</sup> ) | Serum CRP level (mg/dL) | Serum anti-CCP Ab level (U/mL) | Serum MMP3 level (ng/mL) | Serum RF level (mg/dL) | Medication          |
|------|-----|----------|--------------------------|---|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|
| OA1  | F   | 88       | 1                        | 3,500   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA2  | F   | 69       | 27                       | 3,200   | 0.11                    | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA3  | M   | 58       | 2                        | 5,000   | 0.23                    | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>a)</sup> |
| OA4  | M   | 53       | 1                        | 4,600   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>a)</sup> |
| OA5  | F   | 85       | 3                        | 5,600   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>a)</sup> |
| OA6  | F   | 80       | 6                        | 7,600   | 0.21                    | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA7  | M   | 75       | 6                        | 6,900   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA8  | M   | 69       | 10                       | 5,200   | 0.15                    | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>a)</sup> |
| OA9  | M   | 77       | 10                       | 6,100   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA10 | M   | 84       | 1                        | 6,500   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA11 | F   | 67       | 10                       | 7,000   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>a)</sup> |
| OA12 | M   | 75       | 6                        | 5,100   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA13 | M   | 65       | 2                        | 4,300   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>a)</sup> |
| OA14 | F   | 67       | 8                        | 4,800   | 0.14                    | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA15 | F   | 85       | 20                       | 3,800   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA16 | F   | 73       | 10                       | 4,900   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA17 | F   | 74       | 2                        | 5,600   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA18 | M   | 88       | 44                       | 7,300   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA19 | F   | 86       | 29                       | 6,100   | 0.14                    | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA20 | M   | 80       | 3                        | 6,200   | 0.89                    | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA21 | F   | 76       | 4                        | 6,600   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA22 | M   | 80       | 2                        | 3,200   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA23 | F   | 83       | 7                        | 7,800   | 0.37                    | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>b)</sup> |
| OA24 | F   | 81       | 31                       | 5,100   | 0.1                     | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA25 | M   | 75       | 8                        | 4,400   | 0.11                    | ND                             | ND                       | ND                     | APAP                |
| OA26 | F   | 72       | 9                        | 7,000   | 2.2                     | ND                             | ND                       | ND                     | NSAID <sup>a)</sup> |

APAP, acetaminophen; anti-CCP Ab, anti-cyclic citrullinated peptide antibody; CRP, C-reactive protein; MMP3, matrix metalloproteinase-3; ND, not done; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; OA, osteoarthritis; RF, rheumatoid factor.  
<sup>a)</sup>Loxoprofen 180 mg/day. <sup>b)</sup>Celecoxib 200 mg/day.

表 4; OA 患者と比較し、RA 患者で高値であった 19 の脂質を ROC(a receiver operator characteristic curve)での分析

| Acid | Major pathway | Mediator          | Cutoff<br>(pmol/mL) | Sensitivity<br>(%) | Specificity<br>(%) | <i>p</i> value | Positive<br>likelihood<br>ratio | Negative<br>likelihood<br>ratio |       |
|------|---------------|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|
| AA   | COX           | PGF <sub>2α</sub> | 1.124               | 55.56              | 92.31              | 0.0357         | 7.225                           | 0.481                           |       |
|      |               | 5-LO              | 5-HETE              | 63.61              | 66.67              | 96.15          | 0.0007                          | 17.317                          | 0.347 |
|      |               |                   | 5-oxo-EETE          | 0.05               | 22.22              | 100            | 0.215                           | Infinity                        | 0.778 |
|      |               |                   | LTB <sub>4</sub>    | 9.065              | 61.11              | 80.77          | 0.015                           | 3.178                           | 0.481 |
|      | 15-LO         | LXA <sub>4</sub>  | 2.474               | 61.11              | 100                | 0.0009         | Infinity                        | 0.389                           |       |
|      |               | LXB <sub>4</sub>  | 2.33                | 61.11              | 92.31              | 0.0033         | 7.947                           | 0.421                           |       |
|      | 12-LO         | 12-HETE           | 4.028               | 66.67              | 100                | <0.0001        | Infinity                        | 0.333                           |       |
|      | P450          | 8,9-EET           | 2.912               | 61.11              | 100                | 0.0011         | Infinity                        | 0.389                           |       |
| EPA  | 5-LO          | 5-HEPE            | 16.24               | 66.67              | 92.31              | 0.0021         | 8.670                           | 0.361                           |       |
|      |               | LTB <sub>5</sub>  | 0.065               | 37.5               | 96.15              | 0.12           | 9.740                           | 0.650                           |       |
|      | 12-LO         | 12-HEPE           | 1.982               | 61.11              | 100                | 0.0045         | Infinity                        | 0.389                           |       |
|      |               | 8-HEPE            | 1.258               | 66.67              | 92.31              | 0.0019         | 8.670                           | 0.361                           |       |
| DHA  | COX           | 4-HDoHE           | 53.38               | 66.67              | 100                | 0.0019         | Infinity                        | 0.333                           |       |
|      |               | 7-HDoHE           | 2.02                | 61.11              | 100                | 0.0017         | Infinity                        | 0.389                           |       |
|      |               | 10-HDoHE          | 1.369               | 66.67              | 96.15              | 0.0016         | 17.317                          | 0.347                           |       |
|      | 5-LO          | 13-HDoHE          | 7.669               | 66.67              | 96.15              | 0.0012         | 17.317                          | 0.347                           |       |
|      | 15-LO         | PD1               | 1.761               | 61.11              | 100                | 0.0005         | Infinity                        | 0.389                           |       |
|      |               | 17-HDoHE          | 4.966               | 66.67              | 96.15              | 0.0002         | 17.317                          | 0.347                           |       |
|      |               | 20-HDoHE          | 53.49               | 66.67              | 100                | 0.0016         | Infinity                        | 0.333                           |       |

AA, arachidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; COX, cyclooxygenase; LO, lipoxygenase; PG, prostaglandin; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acids; ETE, eicosatetraenoic acid; HDoHE, hydroxydocosahexaenoic acid; HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid; LT, leukotriene; LX, lipoxin; PD1, protectin D1; P450, cytochrome p450.

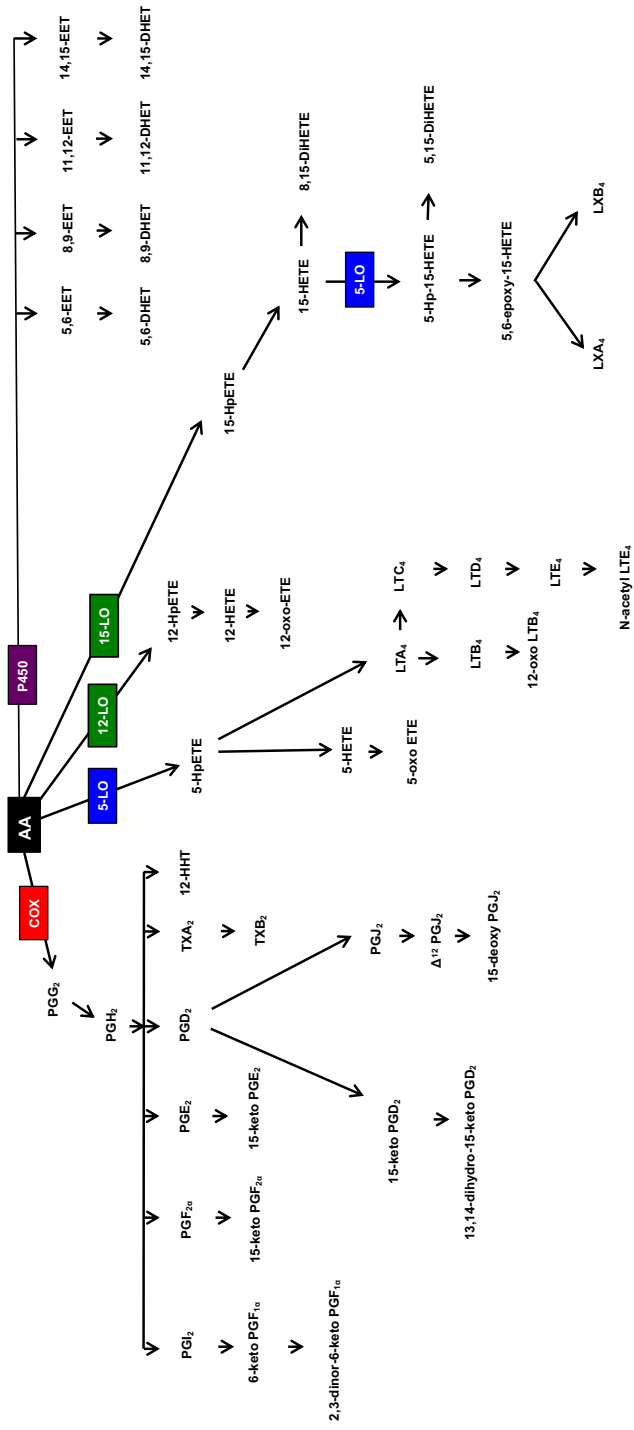




図 1; AA から代謝される脂質メディエーターの代謝経路

AA, Arachidonic acid; COX, Cyclooxygenase; DHET, dihydroxyeicosatrienoic acid;  
DiHETE, dihydroxyeicosatrienoic acid; EET, Epoxyeicosatrienoic acids; ETE,  
Eicosatetraenoic acid; HETE, Hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT,  
Hydroxyheptadecatrienoic acid; HpETE, Hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LO,  
Lipoxygenase; LT, Leukotriene; LX, Lipoxin; PG, Prostaglandin; P450, cytochrome  
P450; TX, Thromboxane

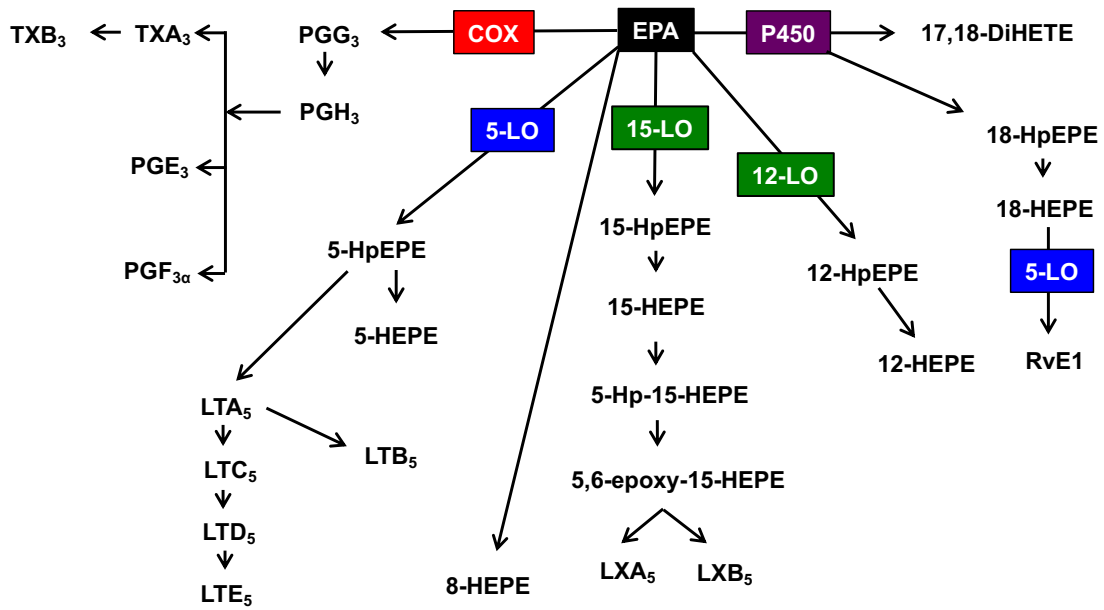


図 2; EPA から代謝される脂質メディエーターの代謝経路

COX, Cyclooxygenase; EPA, Eicosapentaenoic acid; HEPE, Hydroxyeicosapentaenoic acid; HpEPE, Hydroperoxyeicosapentaenoic acid; LO, Lipoxygenase; LT, Leukotriene LX, Lipoxin; PG, Prostaglandin; P450, cytochrome P450; Rv, Resolvin; TX, Thromboxane

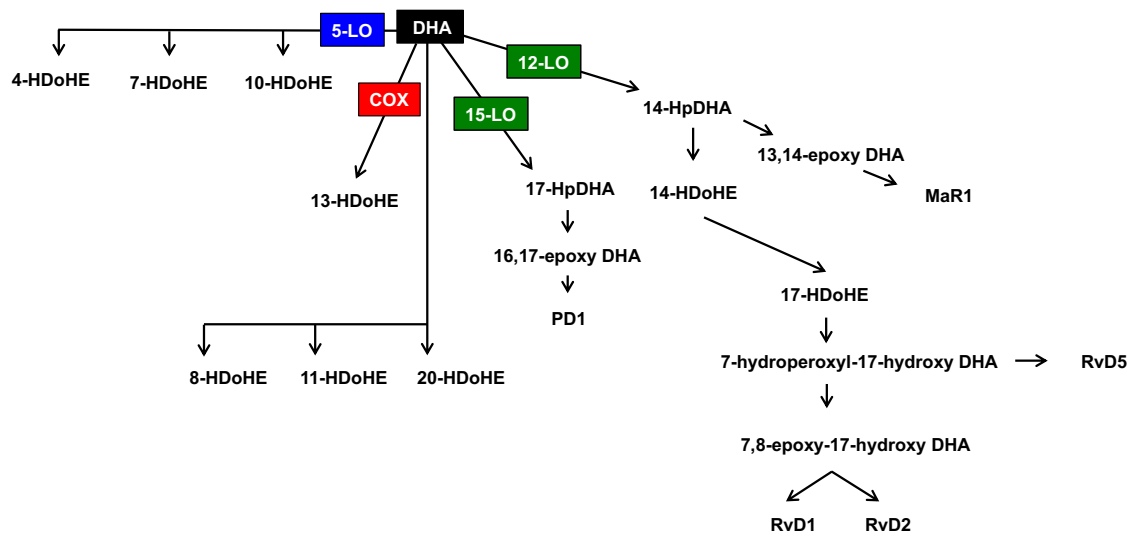


図 3; DHA から代謝される脂質メディエーターの代謝経路

COX, Cyclooxygenase; DHA, Docosahexaenoic acid; HDoHE,

Hydroxydocosahexaenoic acid ; HpDHA, Hydroperoxydocosahexaenoic acid; LO,

Lipoxygenase; MaR, Maresin ; PD, Protectin D; Rv, Resolvin

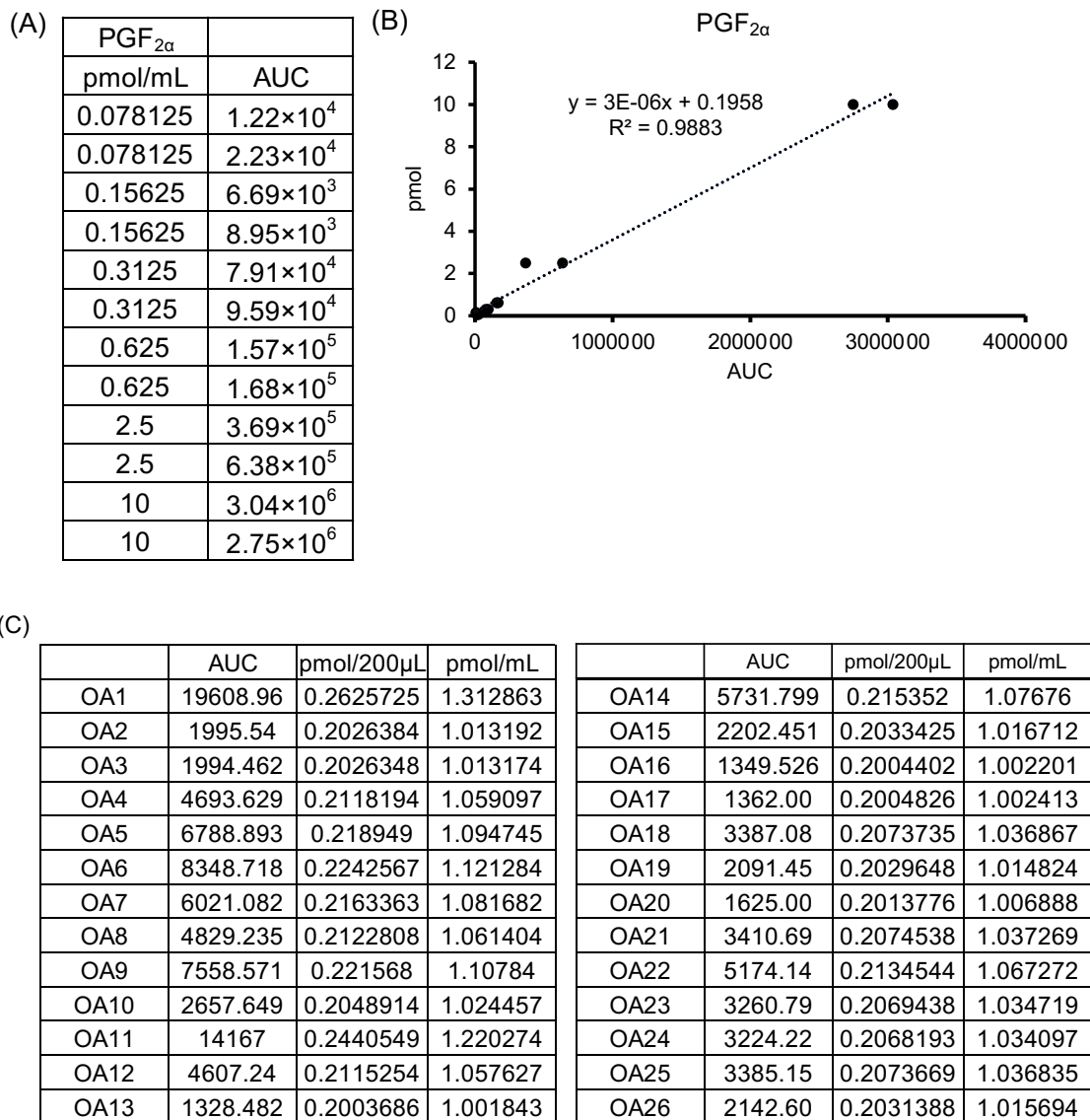
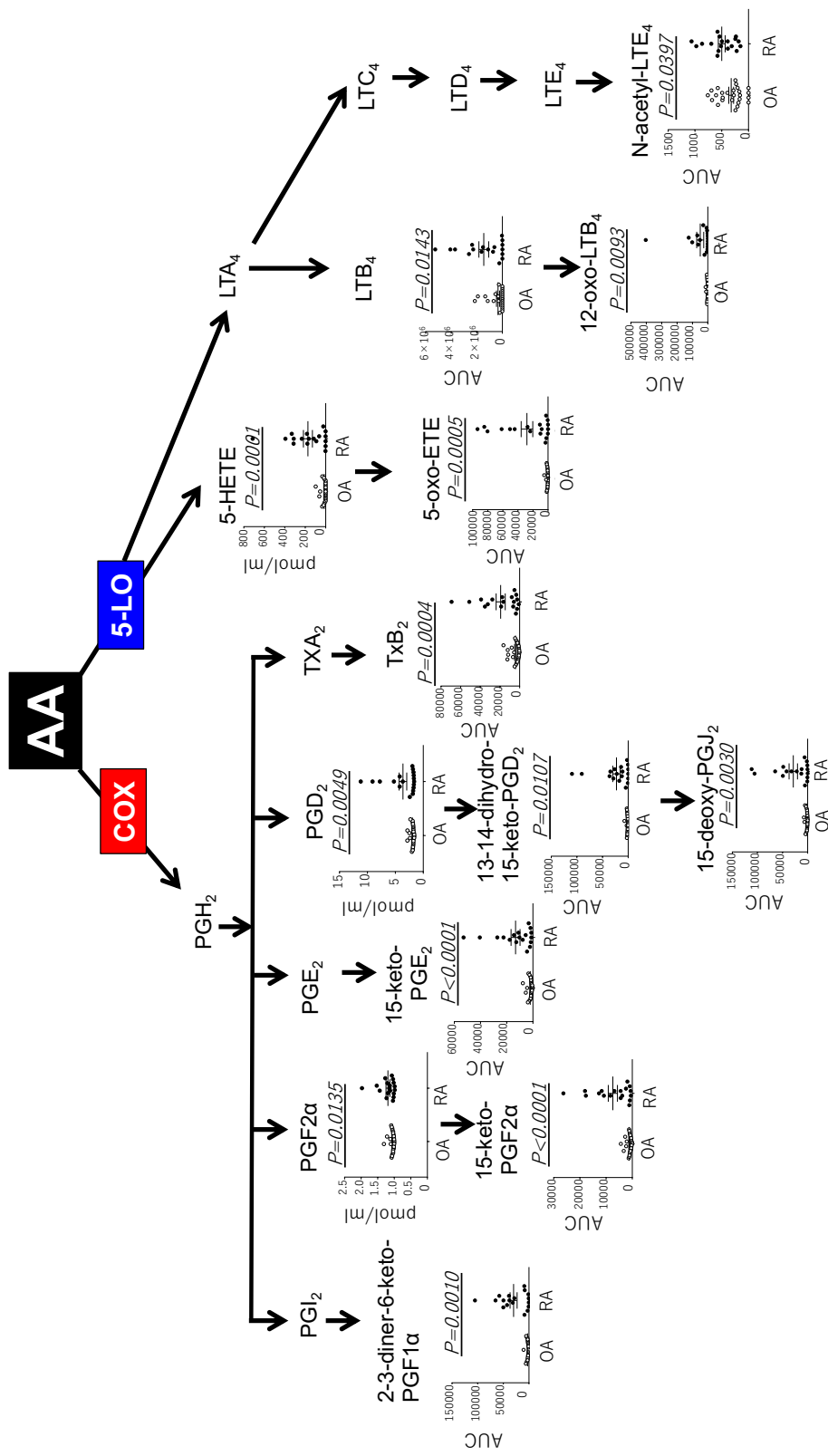


図 4; 検量方法に関して (PGF<sub>2α</sub> の場合)

既知の濃度の PGF<sub>2α</sub> を 10 pmol/mL から 4 倍希釈し、10 から 0.078125 pmol/mL までの 6 つの濃度のサンプルを作成し、この調整した濃度のサンプルの AUC を LC/MS-MS で測定した(A)。得られた AUC と絶対量 (pmol/mL) を用いて検量曲線を作成した(B)。LC/MS-MS の調整で 200 μL を使用したため、得られた絶対量 (pmol/mL) から濃度を算出した(C)。



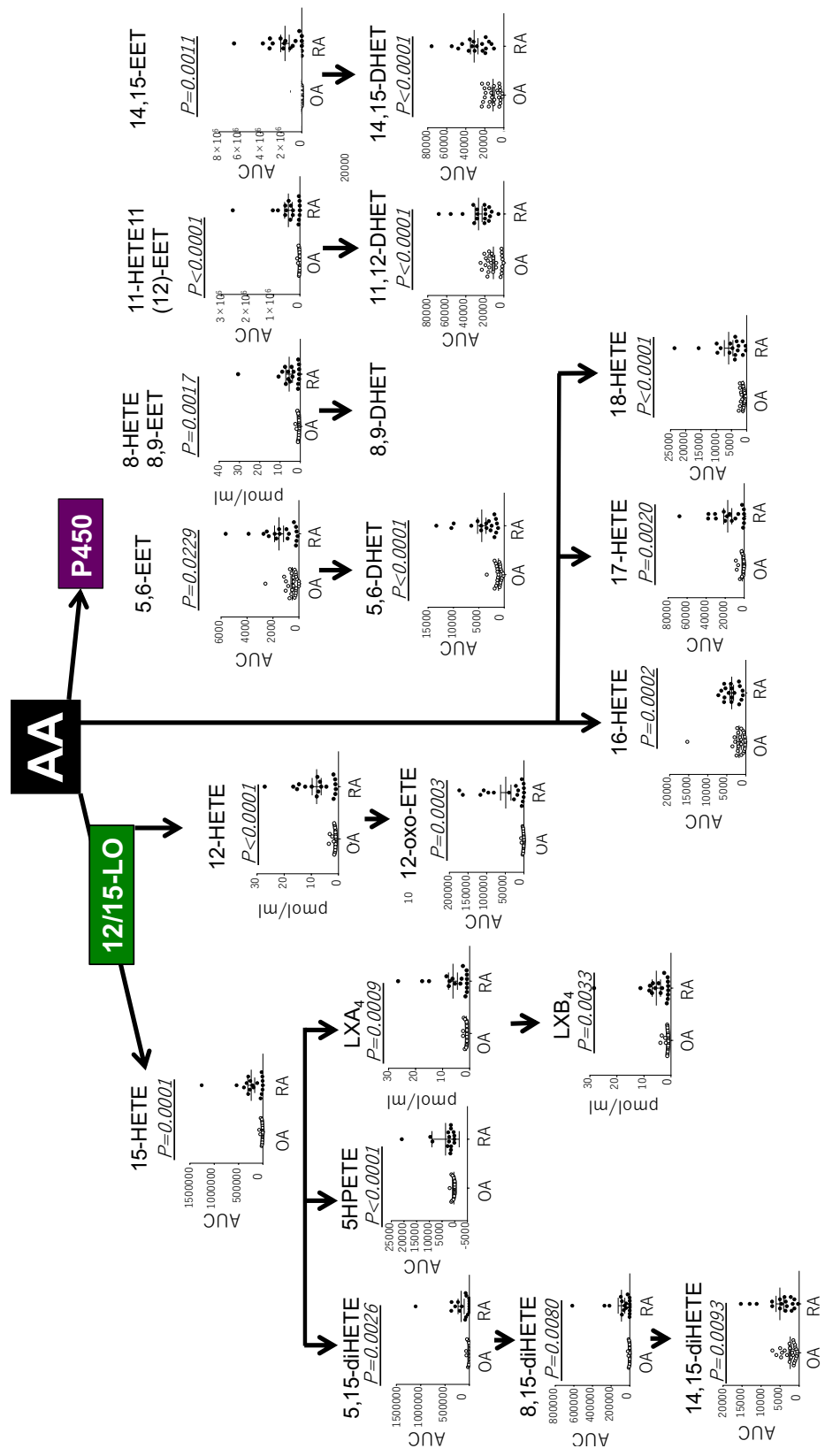


図 5; AA から代謝される脂質メディエーターを RA と OA で比較した AUC での結果

AA, Arachidonic acid; COX, Cyclooxygenase; DHET, dihydroxyeicosatrienoic acid; DiHETE, dihydroxyeicosatrienoic acid; EET, Epoxyeicosatrienoic acids; ETE, Eicosatetraenoic acid; HETE, Hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT, Hydroxyheptadecatrienoic acid; HpETE, Hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LO, Lipoxygenase; LT, Leukotriene; LX, Lipoxin; PG, Prostaglandin; P450, cytochrome P450; TX, Thromboxane  
Mann-Whitney U 検定を使用。

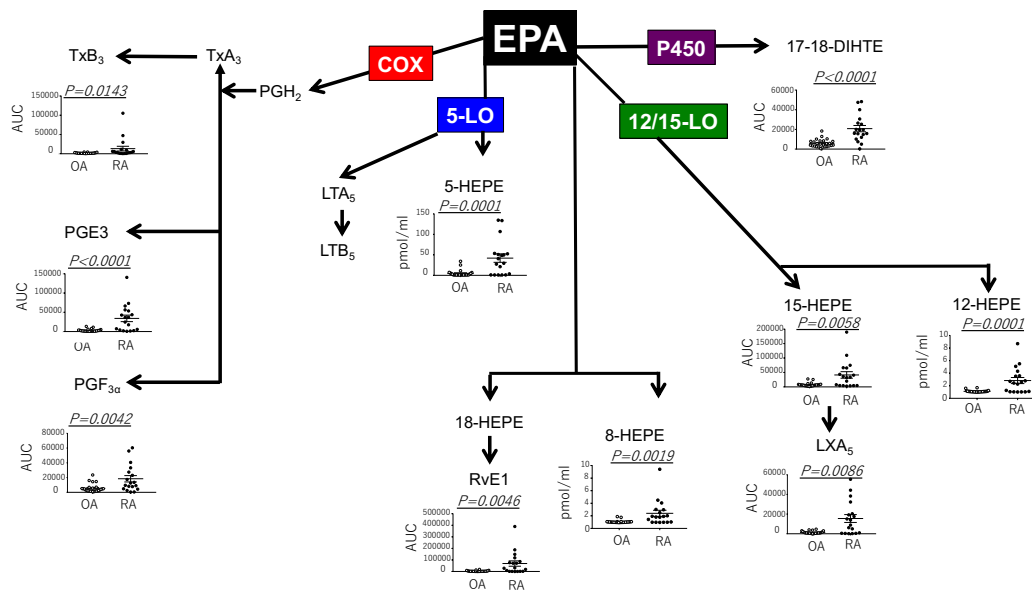


図 6; EPA から代謝される脂質メディエーターを RA と OA で比較した AUC の結果

COX, Cyclooxygenase; EPA, Eicosapentaenoic acid; HEPE, Hydroxyeicosapentaenoic acid; HpEPE, Hydroperoxyeicosapentaenoic acid; LO, Lipoxygenase; LT, Leukotriene LX, Lipoxin; PG, Prostaglandin; P450, cytochrome P450; Rv, Resolvin; TX, Thromboxane

Mann-Whitney U 検定を使用。



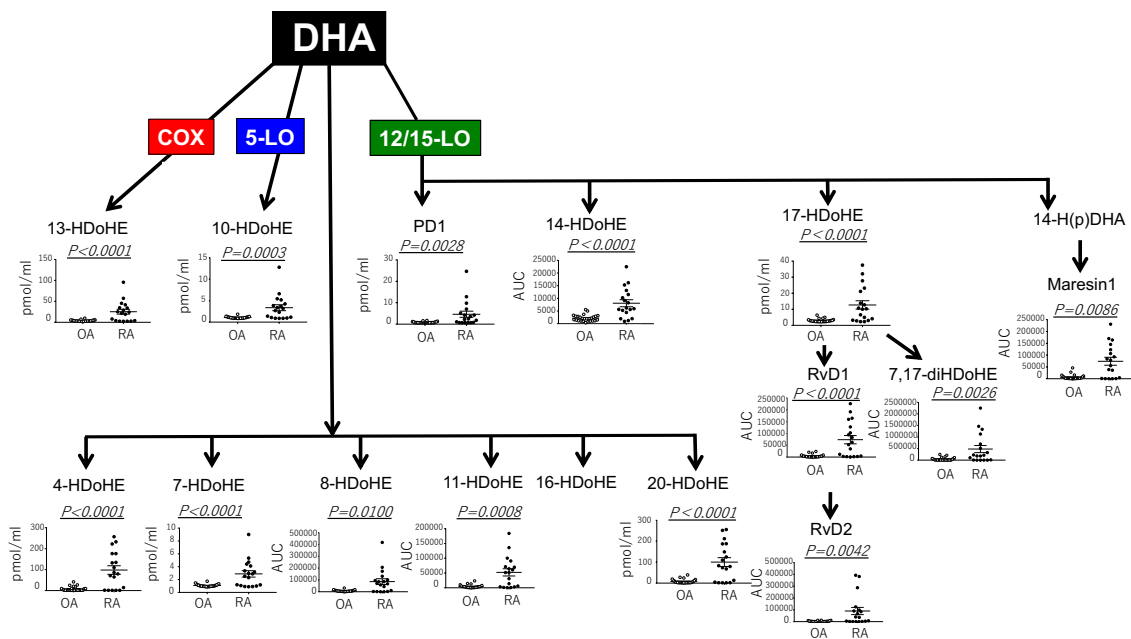


図 7; DHA から代謝される脂質メディエーターを RA と OA で比較した AUC の結果

COX, Cyclooxygenase; DHA, Docosahexaenoic acid; HDoHE, Hydroxydocosahexaenoic acid ; HpDHA, Hydroperoxydocosahexaenoic acid; LO, Lipoxygenase; MaR, Maresin ; PD, Protectin D; Rv, Resolvin  
Mann-Whitney U 検定を使用。

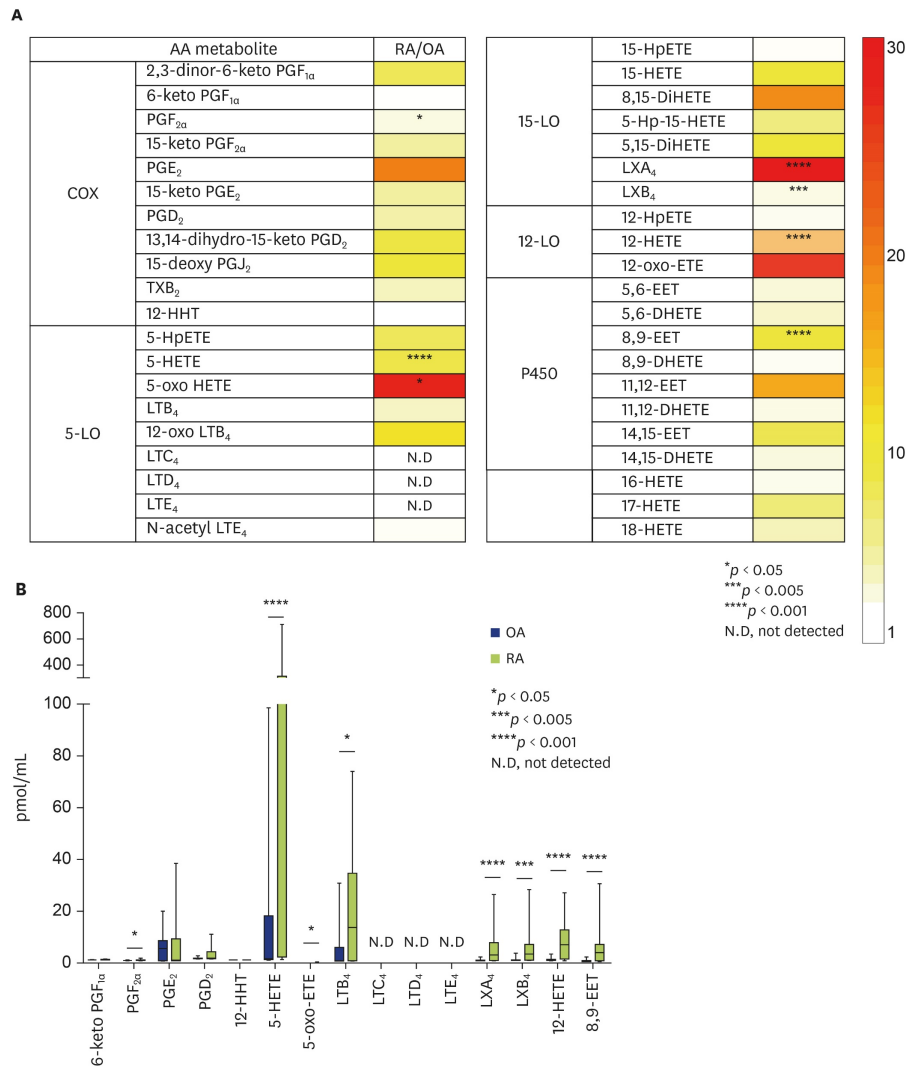


図 8; RA, OA 滑液中の AA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

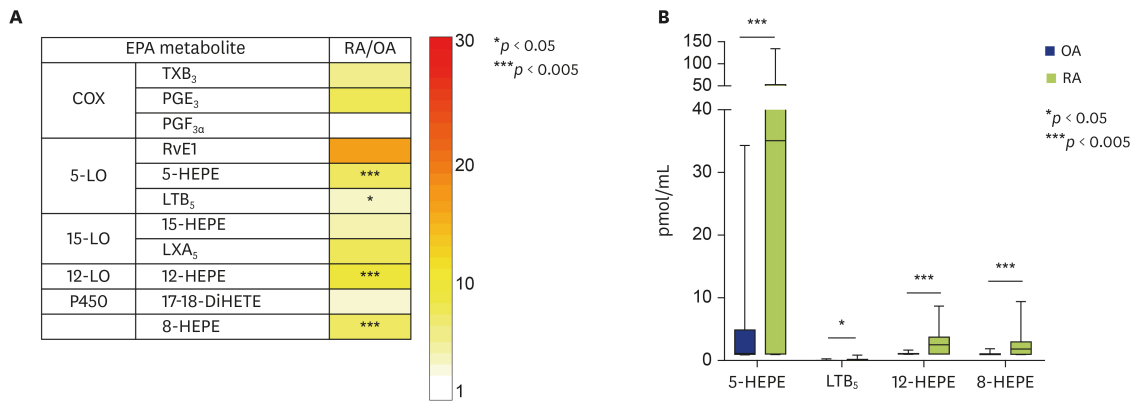


図 9; RA, OA 滑液中の EPA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

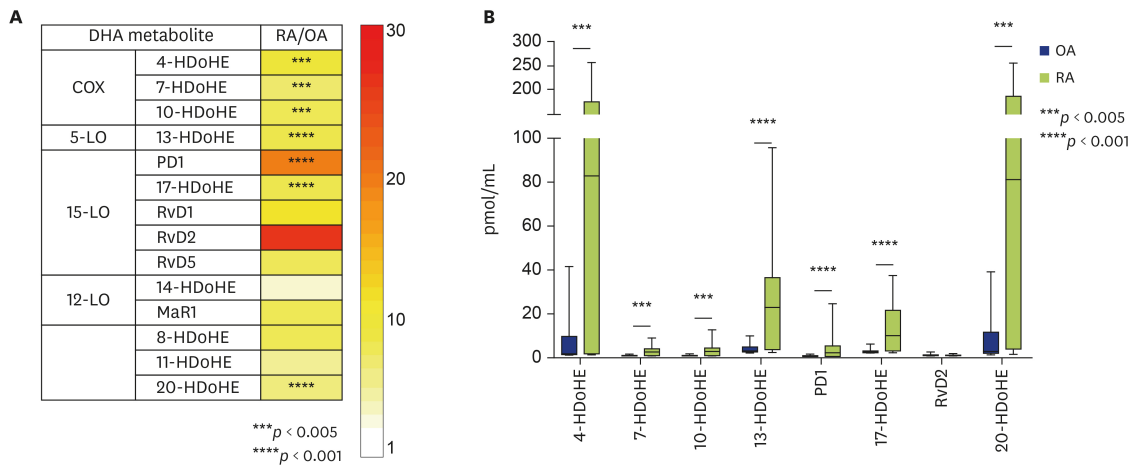


図 10; RA, OA 滑液中の DHA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

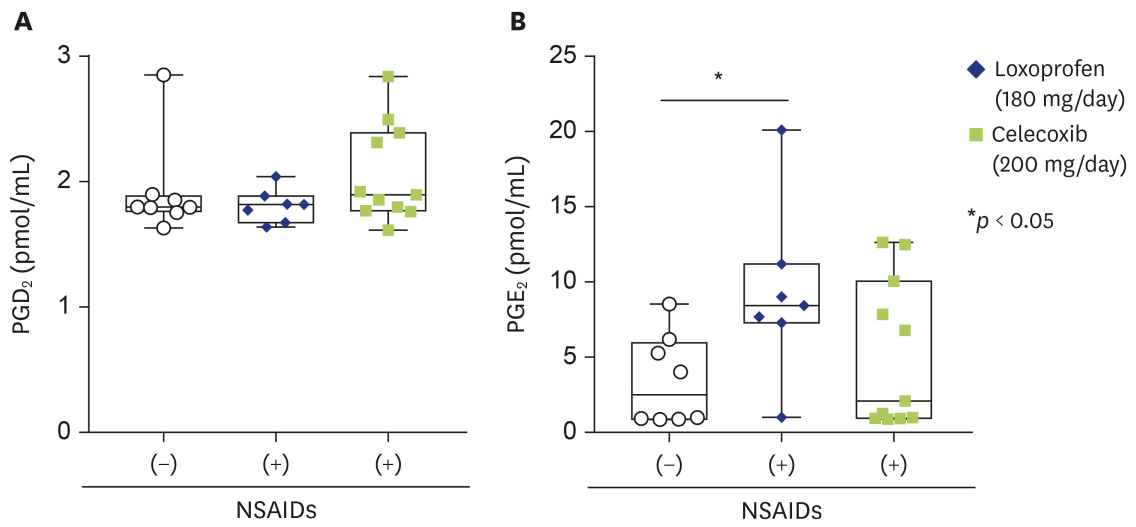


図 11; PGD<sub>2</sub> (A) と PGE<sub>2</sub> (B)の濃度を nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) で加療された群(+)と、加療されていない群(-) 間の比較

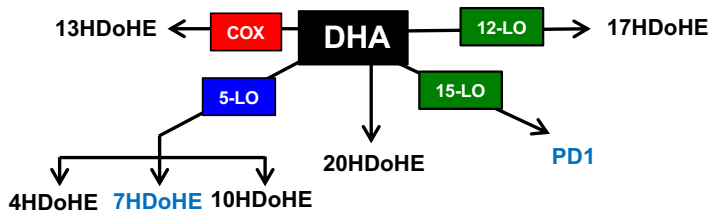
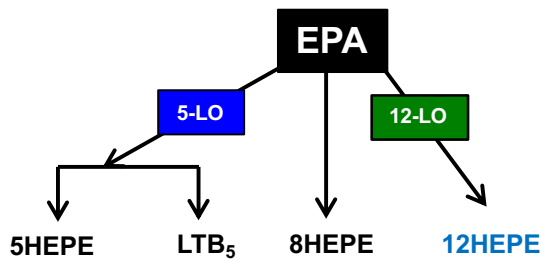
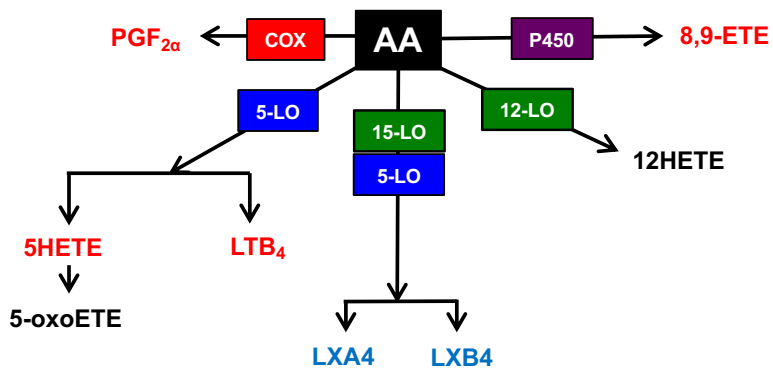


図 12; 検量した代表的な脂質メディエーター

## 図説

図 1; AA から代謝される脂質メディエーターの代謝経路

AA は、COX によって PGG<sub>2</sub>、PGH<sub>2</sub> と代謝され、PGH<sub>2</sub> は、PGI<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>、12-HHT に代謝される。PGI<sub>2</sub> は、6-keto PGF<sub>1α</sub> となり、さらに 2,3-dinor-6-keto PGF<sub>1α</sub> に代謝される。PGE<sub>2</sub> は 15-keto PGE<sub>2</sub> となり、PGD<sub>2</sub> は 15-keto PGD<sub>2</sub>、13,14-dihydro-15-keto PGD<sub>2</sub> となる。また、PGD<sub>2</sub> は別の経路として、PGJ<sub>2</sub>、15-deoxy PGJ<sub>2</sub> になる。同様に TXA<sub>2</sub> は TXB<sub>2</sub> に代謝される。また、5-LO によって 5-HpETE に代謝され、さらに 5-HETE、LTA<sub>4</sub> に代謝される。これらは最終的に 12-oxo-LTB<sub>4</sub>、N-acetyl LTE<sub>4</sub> に代謝される。また、12-LO によって 12-HpETE に代謝され、さらに 12-HETE に代謝される。15-LO によって、15HETE に代謝され、さらに 5-LO によって、LXA<sub>4</sub> や LXB<sub>4</sub> に代謝される。P450 によって、5,6-EET 等に代謝される。また、AA から直接、16-HETE や 17-HETE や 18-HETE が代謝される。

AA, Arachidonic acid; COX, Cyclooxygenase; DHET, dihydroxyeicosatrienoic acid; DiHETE, dihydroxyeicosatrienoic acid; EET, Epoxyeicosatrienoic acids; ETE, Eicosatetraenoic acid; HETE, Hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT, Hydroxyheptadecatrienoic acid; HpETE, Hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LO, Lipoxygenase; LT, Leukotriene; LX, Lipoxin; PG, Prostaglandin; P450, cytochrome P450; TX, Thromboxane

図 2; EPA から代謝される脂質メディエーターの代謝経路

EPA は、COX によって PGH<sub>3</sub> に代謝され、さらに TXA<sub>3</sub>、PGE<sub>3</sub>、PGF<sub>3α</sub> に代謝される。また TXA<sub>3</sub> は、TXB<sub>3</sub> に代謝される。5-LO によって、5-HEPE や LTE<sub>5</sub> 等に代謝され、12-LO によって 12-HEPE 等に代謝される。15-LO によって、15-HEPE に代謝され、LXA<sub>5</sub> や LXB<sub>5</sub> 等に代謝される。P450 によって、18-HEPE が代謝され、さらに 5-LO によって RvE1 等に代謝される。

COX, Cyclooxygenase; EPA, Eicosapentaenoic acid; HEPE, Hydroxyeicosapentaenoic acid; HpEPE, Hydroperoxyeicosapentaenoic acid; LO, Lipoxygenase; LT, Leukotriene LX, Lipoxin; PG, Prostaglandin; P450, cytochrome P450; Rv, Resolvin; TX, Thromboxane

図 3; DHA から代謝される脂質メディエーターの代謝経路

DHA は、COX によって 13-HDoHE に代謝される。5-LO によって、4-HDoHE 等に代謝される。12-LO によって、MaR1 や 14-HDoHE 等に代謝され、さらに 14-HDoHE は 17-HDoHE に代謝された後、RvD1 や RvD2 に代謝される。

COX, Cyclooxygenase; DHA, Docosahexaenoic acid; HDoHE, Hydroxydocosahexaenoic acid ; HpDHA, Hydroperoxydocosahexaenoic acid; LO, Lipoxygenase; MaR, Maresin ; PD, Protectin D; Rv, Resolvin

図 4; 検量方法に関して (PGF<sub>2α</sub> の場合)

既知の濃度の PGF<sub>2α</sub> を 10 pmol/mL から 4 倍希釈し、10 から 0.078125 pmol/mL までの 6 つの濃度のサンプルを作成し、この調整した濃度のサンプルの AUC を LC/MS-MS で測定した(A)。得られた AUC と絶対量 (pmol/mL) を用いて検量



曲線を作成した (B)。LC/MS-MS の調整で 200  $\mu$ L を使用したため、得られた絶対量 (pmol/mL) から濃度を算出した (C)。

図 5; AA から代謝される脂質メディエーターを RA と OA で比較した AUC での結果

データは、RA、OA 患者からの AA の COX-1/2、5-LO (A) および 12/15-LO、P450 (B) に由来する脂質メディエーターの濃度 (AUC/mL) で表した。それぞれのグラフは横軸に OA と RA を示し、各ドットは 1 人の患者を表し、中央値を示した。Mann-Whitney U 検定を使用してグループを比較した。p 値を示した。AA, arachidonic acid; AUC, area under the curve; COX, cyclooxygenase; DHETE, dihydroxyeicosatrienoic acid; DiHETE, dihydroxyeicosatetraenoic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acids; ETE, eicosatetraenoic acid; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT, hydroxyheptadecatrienoic acid; HpETE, hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LO, lipoxygenase; LT, leukotriene; LX, lipoxin; P450, cytochrome p450; PG, prostaglandin; Tx, thromboxane.

図 6; EPA から代謝される脂質メディエーターを RA と OA で比較した AUC での結果

データは、RA、OA 患者からの EPA に由来する脂質メディエーターの濃度 (AUC/mL) で表した。各ドットは 1 人の患者を表し、中央値を示した。Mann-Whitney U 検定を使用してグループを比較した。p 値を示した。AUC, area under the curve; COX, cyclooxygenase; EPA, eicosapentaenoic acid; DiHETE, dihydroxyeicosatetraenoic acid; HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid;

HpEPE, hydroperoxyeicosapentaenoic acid, LO, lipoxygenase; LT, leukotriene; LX, lipoxin; P450, cytochrome p450; PG, prostaglandin; Rv, resolvin; TX, thromboxane.

図 7; DHA から代謝される脂質メディエーターを RA と OA で比較した AUC の結果

データは、RA、OA 患者からの DHA に由来する脂質メディエーターの濃度 (AUC/mL) で表した。各ドットは 1 人の患者を表し、中央値を示した。Mann-Whitney U 検定を使用してグループを比較した。p 値を示した。

AUC, area under the curve; DHA, docosahexaenoic acid;

HDoHE, hydroxydocosahexaenoic acid; HpDHA, hydroperoxydocosahexaenoic acid;

LO, lipoxygenase; MaR1, maresin 1; PD1, protectin D1; Rv, resolvin.

図 8; RA, OA 滑液中の AA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

(A) 滑液中の各脂質メディエーターの OA および RA の AUC (Area under the curve) を算出し、OA に対する RA の比率を表し、色付けして比較した。赤いもの程、OA と比較し RA で高値であり、最大 30 倍程度の違いがあり赤色で示した。白色は 1 倍、黄色は 10 倍程度、オレンジ色は 20 倍程度 RA で高値であることを示している。(B) 検量曲線から濃度 (pmol/mL) を算出し、box plot で比較した。有意差のあるものには p 値を示した。

COX, cyclooxygenase; DHETE, dihydroxyeicosatrienoic acid; DiHETE,

dihydroxyeicosatrienoic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acids; ETE, eicosatetraenoic

acid; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT, hydroxyheptadecatrienoic acid;

HpETE, hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LT, leukotriene; LO, lipoxygenase; LX, lipoxin; P450, cytochrome p450; PG, prostaglandin; TX, thromboxane.

図 9; RA, OA 滑液中の EPA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

(A)滑液中の各脂質メディエーターの OA および RA の AUC (Area under the curve)を算出し、OA に対する RA の比率を表し、色付けして比較した。赤いもの程、OA と比較し RA で高値であり、最大 30 倍程度の違いがあり赤色で示した。白色は 1 倍、黄色は 10 倍程度、オレンジ色は 20 倍程度 RA で高値であることを示している。(B)検量曲線から濃度 (pmol/mL)を算出し、box plot で比較した。有意差のあるものには *p* 値を示した。

COX, cyclooxygenase; DiHETE, dihydroxyeicosatetraenoic acid; HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid; LT, leukotriene; LO, lipoxygenase; LX, lipoxin; PG, prostaglandin; Rv, resolvin; TX, thromboxane.

図 10; RA, OA 滑液中の DHA 経路の COX1/2, 5-LO, 12/15-LO, P450 代謝産物の脂質メディエーターのプロファイルの比較

(A)滑液中の各脂質メディエーターの OA および RA の AUC (Area under the curve)を算出し、OA に対する RA の比率を表し、色付けして比較した。赤いもの程、OA と比較し RA で高値であり、最大 30 倍程度の違いがあり赤色で示した。白色は 1 倍、黄色は 10 倍程度、オレンジ色は 20 倍程度 RA で高値である

ことを示している。(B)検量曲線から濃度 (pmol/mL)を算出し、box plot で比較した。有意差のあるものには  $p$  値を示した。

COX, cyclooxygenase; HDoHE, hydroxydocosaheptaenoic acid; LO, lipoxygenase; MaR1, maresin 1; PD1, protectin D1; Rv, resolvin.

図 11; PGD<sub>2</sub> (A) と PGE<sub>2</sub> (B)の濃度を nonsteroidal anti-inflammatory drugs

(NSAIDs) で加療された群(+)と、加療されていない群(-) 間の比較

○ は NSAIDs (n = 8)で加療されていない群。◆は、oxoprofen (180 mg/day, n = 7)で加療された群、■は celecoxib (200 mg/day, n = 11)で加療された群とした。box-plot で表示し、\* $p < 0.05$  を有意差があるとした。

PG, prostaglandins.

図 12; 検量した代表的な脂質メディエーター

検量した代表的な脂質メディエーターを AA 代謝産物、EPA 代謝産物および DHA 代謝産物にそれぞれわけて図示した。赤色のものが炎症性脂質メディエーターとして報告されており、青色のものが、抗炎症性、炎症収束性脂質メディエーターとして報告されている。

## 引用文献

1. Brouwers H, von Hegedus J, Toes R, Kloppenburg M, Ioan-Facsinay A. Lipid mediators of inflammation in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2015;29(6):741–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S152169421600005X>
2. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205–19.
3. Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, Erhart JC, Chandra PE, Lahey LJ, et al. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2012;14(1):R7. Available from: <http://arthritis-research.com/content/14/1/R7>
4. Dybowski F, Moos F, Saracbası-Zender E, Heldmann F, Braun J. Generalisierte Arthrose im jungen Erwachsenenalter bei Typ-II- Kollagenopathie. *Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 2011;136(42):2147–51.
5. McGrory BJ, Weber KL, Jevsevar DS, Sevarino K. Surgical management of osteoarthritis of the knee: Evidence-based guideline. *J Am Acad Orthop Surg*. 2016;24(8):e87–93.
6. Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, et al. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med*. 2006;203(4):837–42.

7. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. Resolving Lipid Mediators in Resolution. *Semin Immunol.* 2015;27(3):200–15.
8. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24(6):931–41.
9. Jonassdottir HS, Nicolardi S, Jonker W, Derks R, Palmblad M, Ioan-Facsinay A, et al. Detection and structural elucidation of esterified oxylipids in human synovial fluid by electrospray ionization-fourier transform ion-cyclotron mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-MS3: Detection of esterified hydroxylated docosapentaenoic. *Anal Chem.* 2013;85(12):6003–10.
10. Yokomizo T, Nakamura M, Shimizu T, Yokomizo T, Nakamura M, Shimizu T. Leukotriene receptors as potential therapeutic targets Find the latest version : Leukotriene receptors as potential therapeutic targets. 2018;128(7):2691–701.
11. Agas D, Marchetti L, Hurley MM, Sabbieti MG. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ : A bone remodeling mediator. *J Cell Physiol.* 2013;228(1):25–9.
12. Murakami K. Potential of specialized pro-resolving lipid mediators against rheumatic diseases. *Japanese J Clin Immunol.* 2016;39(3):155–63.
13. Spite M, Norling L V., Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature.* 2009;461(7268):1287–91.
14. Chiang N, Fredman G, Bäckhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature.* 2012;484(7395):524–8.

15. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, et al. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell*. 2013;153(1):112–25.
16. Laitinen O, Seppälä E, Nissilä M, Vapaatalo H. Plasma levels and urinary excretion of prostaglandins in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 1983;2(4):401–6.
17. Zheng LX, Li KX, Hong FF, Yang SL. Pain and bone damage in rheumatoid arthritis: role of leukotriene B4. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(5):872–8.
18. Wang F, Wang J, Sun S, Chen M. Maresin1 ameliorates acute lung injury induced by sepsis through regulating Th17 / Treg balance. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(11):1644–52.
19. Zuo W, Wu ZH, Wu N, Duan YH, Wu JT, Wang H, et al. Adiponectin receptor 1 mediates the difference in adiponectin-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(23):3919–24.
20. Ryo Taguchi, Toshiaki Houjou, Hiroki Nakanishi, Toshiyuki Yamazaki, Mayuko Ishida, Masayoshi Imagawa TS. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *J chromatog B*. 2005;823(1):26–36.
21. Jónasdóttir HS, Brouwers H, Kwekkeboom JC, van der Linden HMJ, Huizinga T, Kloppenburg M, et al. Targeted lipidomics reveals activation of resolution pathways in knee osteoarthritis in humans. *Osteoarthr Cartil*. 2017;25(7):1150–60.
22. Giera M, Ioan-Facsinay A, Toes R, Gao F, Dalli J, Deelder AM, et al. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients

- by means of LC-MS/MS. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2012;1821(11):1415–24.
23. Murase R, Taketomi Y, Miki Y, Nishito Y, Saito M, Fukami K, et al. Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
  24. Krasselt M, Baerwald C. Celecoxib for the treatment of musculoskeletal arthritis. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(14):1689–702.
  25. Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, et al. Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2007;34(11):2144–53.
  26. Baker BPE, Gillis S, Smith K a. Brief DeNnitive Report. Society. 1979;149(January):273–8.
  27. Harvath L. Neutrophil chemotactic factors. *EXS*. 1991;59(1976):35–52.
  28. Cunningham FM, Wollard PM. 12(R)-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid is a chemoattractant fo human polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Prostaglandins*. 1987;34(1):71–8.
  29. Pratt PF, Rosolowsky M, Campbell WB. Effects of epoxyeicosatrienoic acids on polymorphonuclear leukocyte function. *Life Sci*. 2002;70(21):2521–33.
  30. Lee TH, Horton CE, Kyan-Aung U, Haskard D, Crea AEG, Spur BW. Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Clin Sci*. 1989;77(2):195–203.



31. Jan M. Schwab, Nan Chiang, Makoto Arita and CNS. Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs. *Nature*. 2007;447(7146):869–74.
32. Jakob M, Démarteau O, Suetterlin R, Heberer M, Martin I. Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins. *Rheumatology*. 2004;43(7):852–7.
33. Sodin-semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Snezna Sodin-Semrl, Brunella Taddeo, Daniel Tseng, John Varga, and Stefano Fiore 2. 2000;4:3–9.
34. Li XF, Sun YY, Bao J, Chen X, Li YH, Yang Y, et al. Functional role of PPAR- $\gamma$  on the proliferation and migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12570-6>
35. Sapiha P, Stahl A, Chen J, Seaward MR, Keirnan L, Krah NM, et al. NIH Public Access. *Sci Transl Med*. 2011;3(69):1–26.
36. Sun L, Xu YW, Han J, Liang H, Wang N, Cheng Y. 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPAR $\gamma$ : A possible neuroprotective effect in ischemic brain. *J Lipid Res*. 2015;3(69):502–14.
37. He D, Liu J, Hai Y, Zhu Q, Shen Y, Guo S, et al. Increased DOT1L in synovial biopsies of patients with OA and RA. *Clin Rheumatol*. 2018;37(5):1327–32.
38. Liu MF, Kohsaka H, Sakurai H, Azuma M, Okumura K, Saito I, et al. The presence of costimulatory molecules CD86 and CD28 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*. 1996;39(1):110–4.

39. Yin F, Luo SL, Yuan F, Peng Z, Zhou W, Fang L, et al. Regulation different network analysis of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(18):2504–11.
40. Miller LE, Grifka J, Schölmerich J, Straub RH. Erratum: Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis (*The Journal of Rheumatology* (2002) 29 (427-435)). *J Rheumatol.* 2003;30(5):1125.
41. Korotkova M, Helmers SB, Loell I, Alexanderson H, Grundtman C, Dorph C, et al. Effects of immunosuppressive treatment on microsomal prostaglandin E synthase 1 and cyclooxygenases expression in muscle tissue of patients with polymyositis or dermatomyositis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(11):1596–602.
42. Korotkova M, Westman M, Gheorghe KR, Af Klint E, Trollmo C, Ulfgren AK, et al. Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3439–47.
43. Gheorghe KR, Thurlings RM, Westman M, Boumans MJ, Malmström V, Trollmo C, et al. Prostaglandin E2 synthesizing enzymes in rheumatoid arthritis B cells and the effects of B cell depleting therapy on enzyme expression. *PLoS One.* 2011;6(1):1–9.

## 研究業績目録

佐野 有隆

I 発表 ①一般発表 3 (共 3)

②特別発表 2 (共 2)

II 論文 ①原著論文 1 (共 1)

②症例報告 なし

③総説 1 (共 1)

III 著書 なし

以上

# I 発表

## ① 一般発表

### 1、佐野有隆、豊泉泰洋、冨塚孔明、長岡正宏、徳橋泰明

伸筋腱引き抜き損傷に対し腱移行術と腱制動術を施行した1例

第685回関東整形災害外科学会月例会 東京都 2017年10月

### 2、Sano Yutaka, Yasuhiro Toyozumi, Yoshiaki Tomizuka, Soya Nagao, Masahiro Nagaoka.

Reconstruction of sagittal band using autograft tendon for the extensor avulsion injury from the elbow : A Case report

Asia Pacific Federation for Societies for Surgery of the Hand (APFSSH) 11<sup>th</sup>  
Cebu, Philippines Nov, 2017

### 3、関雅之、齋藤修、松崎英剛、島谷雅之、矢作善之、伊藤友久、平田一真、佐野有隆、宗田大

Fit&fill型セメントレスステムは高齢者大腿骨の髓腔形態を改変しないが calcar 部での髓腔化を抑制する

第92回日本整形外科学会学術総会 神奈川県 2019年3月

## ② 特別発表

1、関雅之、齋藤修、佐野有隆、平田一真、小田修平、伊藤友久、矢作善之、島谷雅之、松崎英剛、宗田大

強直性股関節症に対する人工股関節置換術

第49回日本人工関節学会 東京都 2019年3月

2、佐野有隆、豊島翔太、三木寿美、武富芳隆、坂本朋美、李賢鎬、齋藤修、徳橋泰明、村上誠、岡山吉道

関節リウマチ（RA）と変形性膝関節症（OA）患者の膝関節滑液中の脂質メディエーターの網羅的比較解析

第33回アレルギー・好酸球研究会 東京都 2019年10月

## II 論文

### ① 原著論文

Yutaka Sano, Shota Toyoshima, Yoshimi Miki, Yoshitaka Taketomi, Mana Ito, Hyunho Lee, Shu Saito, Makoto Murakami, and Yoshimichi Okayama.

Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis

Asia Pac Allergy. 2020 Apr;10(2):e21

<https://doi.org/10.5415/apallergy.2020.10.e21> pISSN 2233-8276·eISSN 2233-8268

### ② 症例報告

なし

③ 総説

1. 岡山吉道、豊島翔太、佐野有隆、都築広、高橋恭子、浅野正岳、李賢鎬、斎藤修、松本健治、村上誠、武富芳隆、三木寿美、伊東真奈、伊崎聡志、西盛信幸、遠藤嵩大、葉山惟大、藤田英樹、坂本朋美、鐘ヶ江佳寿子、羅智靖、岩田幸治、内野慶人、濱田高志、入山規良、高橋宏通、北村登、福田麻佐美、山田志保、丸岡秀一郎、八田善弘、中山智祥、武井正美、徳橋泰明、権寧博、照井正  
難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発. 日本大学医学部総合医学研究所紀要, 7: 43-47. 2019

### Ⅲ 著書

なし