

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09982

研究課題名(和文) 活性阻害型抗PAD4抗体を用いた関節リウマチおよび間質性肺炎抑制メカニズムの検討

研究課題名(英文) Study of suppressing effect by PAD4 catalytic cleft blocking antibody to rheumatoid arthritis and interstitial pneumonitis

研究代表者

金澤 智 (Kanazawa, Satoshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：90347401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)、間質性肺炎(IP)において、シトルリン化自己ペプチドに対する抗体産生が発症および病態進行に関与する可能性がある。シトルリン化活性を持つPAD4の構造解析データを基に活性領域阻害抗体を作成した。得られた抗体の塩基配列から組換え技術を用いヒト化抗体化等に成功している。本抗体がモデル動物において関節炎抑制効果を持つことを明らかにした(特許共同出願済み)。1) 関節炎およびIP時、シトルリン化自己ペプチドは両病態に共通性があるのか否か、2) 本抗体により間質性肺炎発症を抑制できるかを明らかにする。RAからIP発症へ至る過程に、シトルリン化がどの様に関与するのかを明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D1CCマウスを用いた研究から、protein arginine deiminase 4 (PAD4)は関節炎時、パンヌスに浸潤する好中球において発現していることが分かった。またD1CC、D1CC/D1BC マウスにおける間質性肺炎(IP、組織学的には肺線維症を伴うNSIP、UIP様肺病変を示す)解析においても組織内へ浸潤する好中球でPAD4が高発現していることが分かった。好中球が発現するPAD4はシトルリン化自己ペプチド産生を促し、関節炎からIP病態発症に強く関与することが疑われているが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。この点を明らかとし、より高い治療法の開発へと結びつける。

研究成果の概要(英文)：Production of antibodies against citrullinated self-peptides, ACPA might involve in the onset of rheumatoid Arthritis and interstitial pneumonia. We developed antibodies against catalytic active cleft of peptidyl deiminase 4, PAD4 based on structural analysis. We have already reconstructed humanized antibodies. The antibodies ameliorated inflammatory arthritis in RA-model mouse (patent pending). 1) What are the common citrullinated peptides between inflammatory arthritis and IP as a complication of RA, 2) Whether antibodies ameliorate IP. We reveal the mechanism of RA-to-IP pathogenesis through the production of citrullinated peptides.

研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：関節リウマチ PAD4 間質性肺炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節部における PAD4 の発現

D1CC マウスを用いた研究から、protein arginine deiminase 4 (PAD4)は関節炎症時、パンスに浸潤する好中球において発現していることが分かった。PAD4 はシトルリン化自己ペプチド産生を促し、関節炎病態発症に強く関与することが疑われているが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。この点を明らかとし、より高い治療法の開発へと結びつける。

抗 PAD4-catalytic cleft 抗体 (抗 PAD4CC 抗体) の特徴

PAD4 構造解析データを基に、シトルリン化活性領域(catalytic cleft)を標的とした抗体をニワトリで作成した。樹立したニワトリ抗 PAD4-catalytic cleft 抗体(抗 PAD4CC 抗体)配列データを基に、マウス実験用抗 PAD4CC 抗体(ニワトリマウスキメラ、以後本申請書内では本抗体を抗 PAD4CC 抗体と表記する)、および治療薬開発を目的としたヒト抗 PAD4CC 抗体を作成した。これらの抗体は、*in vitro* において PAD4 シトルリン化能を阻害するという特徴がある。抗 PAD4CC 抗体は、D1CC マウス (CIITA を軟骨特異的に発現するトランスジェニックマウス) に対し関節炎抑制効果を持つことも確認している(「新規抗 PAD4 抗体」PCT 出願番号 PCT/JP2016/057030)。

関節リウマチモデル利用の利点

1. 関節リウマチモデル: D1CC マウス(慢性、進行性関節炎モデル 図1参照)

D1CC マウスは、関節炎高感受性で、慢性、進行性の関節炎を誘導できる。Collagen-induced arthritis (CIA)と同様 bovine Collagen II (bCII) を用い誘導するが、通常の 1/15 ~ 20 量の bCII で誘導でき、炎症期間が CIA より 2 倍長くなる(図1、CIA:急性炎症、D1CC:慢性炎症)。

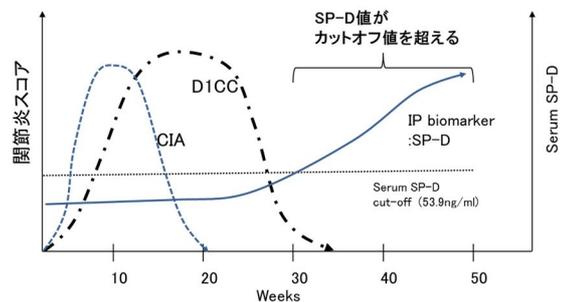


図1 D1CC ヘテロマウスが示す関節炎、IP(リウマチ肺)の推移

このマウスを用い、抗 PAD4CC 抗体投与による関節炎抑制効果が得られた。また抗体投与中止後も持続的な抑制が観察された。

2. 研究の目的

研究計画 1) 抗 PAD4CC 抗体 (シトルリン化活性阻害タイプ) が ACPA (抗 CCP 抗体価) 産生を *in vivo* において抑制するか、また病態発症に関与するシトルリン化自己ペプチドを同定する

関節炎での検討: D1CC ヘテロマウスを用い慢性、進行性関節炎誘導後、抗 PAD4CC 抗体を投与し、血清および関節部組織をサンプリングする。

1. 関節炎期間中における血中 ACPA (抗 CCP 抗体価) 産生が抑制されるかを検討する。

2. 関節炎期間中、関節部におけるシトルリン化ペプチド産生抑制効果検討を行う。

正常関節部と炎症関節部におけるシトルリン化ペプチドの量的、質的な比較をプロテオミクス、western blot 解析等により行う。

3. 研究の方法

本申請で用いるモデルマウスと研究計画内容等を一覧にすると以下ようになる。

病態(特徴)	使用するマウス	期待される効果	病態誘導法
関節炎 (慢性、進行性)	D1CC ヘテロマウス	抗 PAD4CC 抗体投与によるシトルリン化自己ペプチド同定、ACPA 産生抑制	bCII (CIA 法の約 1/15-20 量の低濃度で誘導する)

関節における解析

研究のポイント: プロテオミクス解析では、whole cell lysate を分析するが、シトルリン化自己ペプチドに絞り込み分析する。解析には LC-MS/MS を用いた ショットガン解析 を行う。分離能を上げ検出タンパク質の数を発現量に従い、シトルリン化自己ペプチド上位 200 程度を見出す。

D1CC マウス関節炎誘導および抗 PAD4CC 抗体投与

D1CC マウス関節炎誘導は、低濃度 bCII (0.02 mg/mouse) を、2 回 (1 回目 Freund's complete adjuvant, 2 回目ブーストは Freund's incomplete adjuvant とエマルジョンを形成) 投与する。2 回目投与から抗 PAD4CC 抗体を 2 回/週、4 週間、合計 16 回投与する。

ACPA (anti-citrullinated protein antibodies) 測定群と関節部サンプリング群と大きく 2 群に分け実験を行う。抗 PAD4CC 抗体投与による関節スコアをモニタリングしながら、採血を行う。

ACPA (抗 Anti-cyclic citrullinated peptide、CCP 抗体価) 測定群解析

1. 関節炎の状態を外見的所見としてスコア化しモニタリングする。
2. 週 1 回経時的採血を行う。ACPA (抗 CCP 抗体価、独自設定の unit で評価) 測定を行う。

関節部サンプリング群解析

1. 週 1 回、関節部前後 5mm 切除し、緩衝液にて溶解し、関節部由来 whole cell lysate を得る。タンパク質濃度を BCA 法により決定する。
2. この可溶化サンプルを用い、シトルリン化ペプチドに対するプロテオミクスおよび western blot(WB)解析を行う。

4. 研究成果

関節における解析概要

PAD4 抗体の抗体性能評価、および関節炎に対する効果検討結果の論文作成をすすめる。一方プロテオミクス解析結果から、新たなシトルリン化ペプチドを見出した。今後このペプチド発現の意味を見出すことで、関節リウマチ発症との関係性を明らかとする。

プロテオミクス解析

関節部由来 whole cell lysate を用い、特異的なシトルリン化ペプチド、抗原 A を同定した。非シトルリン化抗原 A に対する抗体により、この抗原が関節局所に発現していることを同定した。抗原 A は、関節部における疾患を伴う遺伝病と同一因子であることから、今後抗原 A が関節リウマチにどのように関わるのかを解析していく。またシトルリン化抗原 A に対する抗体を作成し、関節リウマチ病態との関係性を、まずは D1CC モデルを用い明らか

とする。データにより、抗原 A について特許化を図る。

D1CC マウス関節炎誘導および抗 PAD4CC 抗体投与

ACPA (anti-citrullinated protein antibodies)測定群と関節部サンプリング群と大きく 2 群に分け実験を行った。

ACPA (抗 Anti-cyclic citrullinated peptide、CCP 抗体価) 測定群解析

1. 関節炎の状態を外見的所見としてスコア化しモニタリングしたところ、関節炎の改善効果が得られた。
2. ACPA (抗 CCP 抗体価、独自設定の unit で評価) 測定を行ったところ、ACPA 測定 (ELISA) でのデータの個体間における変動のため、関節炎改善の所見同様改善が見込まれるものの、現時点では ACPA が減少すると結論づけることはできない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miura Y, Ota S, Peterlin M, McDevitt G, Kanazawa S.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A subpopulation of synovial fibroblasts in a mouse model of chronic inflammatory rheumatoid arthritis toward osteochondrogenic lineage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JBMPlus	6. 最初と最後の頁 陰圧中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10132	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 該当する

1. 著者名 Miura Y, Kanazawa S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Osteochondrogenesis Derived From Synovial Fibroblasts in Inflammatory Arthritis Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00115-w	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 -

1. 著者名 Yasuhiro Terasaki, Mika Terasaki, Satoshi Kanazawa, Nariaki Kokuho, Hirokazu Urushiyama, Yusuke Kajimoto, Shinobu Kunugi, Motoyo Maruyama, Toshio Akimoto, Yoko Miura, Tsutomu Igarashi, Ikuroh Ohsawa, Akira Shimizu	4. 巻 23
2. 論文標題 Effect of H ₂ Treatment in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 7043-7053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.14603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三浦 陽子、金澤 智	4. 巻 24
2. 論文標題 間質性肺炎モデルマウスの構築	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分子呼吸器病	6. 最初と最後の頁 16-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa
2. 発表標題 The fate of synovial fibroblasts in a mouse model of chronic inflammatory rheumatoid arthritis
3. 学会等名 JCR international school 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金澤智 三浦陽子
2. 発表標題 急性期における自己免疫、慢性期における増殖性上皮細胞以上を特徴とする2相性間質性肺炎
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa, Hirotsugu Ohkubo, and Akio Niimi
2. 発表標題 Nintedanib attenuates histopathology of interstitial pneumonia in a transgenic mouse model of arthritis.
3. 学会等名 ATS conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智 大久保仁嗣 新実彰男
2. 発表標題 慢性間質性肺炎を呈する関節リウマチモデルにおけるニンテダニブの治療効果の検討
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 間質性肺炎モデルマウスにおける急性期、慢性期炎症における線維芽細胞の解析およびDNA障害関連マーカーの検討
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金澤智 三浦陽子
2. 発表標題 The fate of synovial fibroblasts in chronic joint inflammation of a rheumatoid arthritis model, D1BC mouse.
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kanazawa, Yoko Miura
2. 発表標題 A novel Interstitial pneumonitis mouse model, D1CC x D1BC mouse shows chronic inflammation with severe fibrosis in lung
3. 学会等名 Keystone Symposia, The Resolution of Inflammation in Health and Disease (C6) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 陽子、金澤 智
2. 発表標題 慢性関節炎時における滑膜繊維芽細胞は、前肥大軟骨細胞の表現型を有する
3. 学会等名 第4回 JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金澤 智
2. 発表標題 PAD4シトルリン化酵素活性阻害型抗PAD4抗体による関節リウマチモデルマウス、D1CCマウスを用いた治療効果検討
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金澤 智
2. 発表標題 間質性肺炎モデルマウスから単離した繊維芽細胞の解析
3. 学会等名 第19回間質性肺炎細胞分子病態研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金澤 智
2. 発表標題 関節リウマチマウスモデル (D1CC, D1BCマウス) における関節炎発症重篤化のメカニズムについて
3. 学会等名 第37回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa
2. 発表標題 Ectopic expression of B7.1 (CD80) in chondrocytes leads to chronic inflammatory arthritis in mice
3. 学会等名 第19回武田科学振興財団生命科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦 陽子、金澤 智
2. 発表標題 慢性関節炎時における滑膜繊維芽細胞は、前肥大化軟骨細胞の表現型を有し異所性骨分化する
3. 学会等名 第68回名古屋市立大学医学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規抗PAD4抗体	発明者 金澤 智 他	権利者 名古屋市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-249589	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分担者	三浦 陽子 (Miura Yoko) (60563517)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	
連携 研究者	佐藤 衛 (Sato Mamoru) (60170784)	横浜市立大学・その他の研究科・教授 (22701)	