

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08403

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるシトルリン化ITI4蛋白の病因的意義の探索

研究課題名(英文) Exploration of pathogenetic role of citrullinated ITIH4 in rheumatoid arthritis

研究代表者

松本 功 (Matsumoto, Isao)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30343081

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)：ペプチドGPI誘導関節炎(pGIA)マウス及び関節リウマチ(RA)において、関節炎の病勢と同時に変動する特異的血清マーカー、シトルリン化inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (cit-ITI4)を同定した。関節炎滑液中ではcit-ITI4が著明に上昇し、血漿よりさらに濃度が高かった。また、合成蛋白を用いた実験で、cit-ITI4は好中球遊走を促し、補体経路を活性化させ関節炎病態を増悪させる可能性を明らかにした(Osada et al. Clin Exp Immunol 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節炎発症時は局所でITI4濃度及びcit-ITI4が上昇し、その過程で関節局所に流入する好中球がPAD4発現を上昇させ、局所でのシトルリン化を促すことが判明した(Osada et al. Clin. Exp. Immunol. 2021)。これらより、まず血漿cit-ITI4のELISA同定キットの作成を進めている。また、ITI4自体の関節炎への関与をより明らかにするために、欠損マウスを用いて研究を進める。関節炎に特化した制御メカニズムが明らかになり、新たな治療ターゲットの創生が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We found specific disease plasma marker, citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (cit-ITI4) in plasma in pGIA model and rheumatoid arthritis (RA). Cit-ITI4 is highly concentrated in synovial fluid than plasma in RA. Recombinant cit-ITI4 enhanced neutrophil migration and complement activation, suggesting exacerbating role in arthritis.

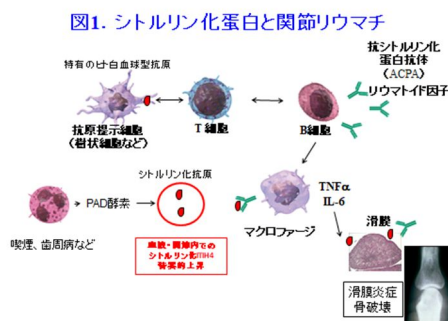
研究分野：膠原病リウマチアレルギー内科

キーワード：関節リウマチ ITIH4 シトルリン化蛋白 好中球

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患である関節リウマチ (RA) では、抗シトルリン化蛋白抗体 (ACPA) が診断に重要な検査であるが、病勢とのリンクや病因的意義の多くは明らかでない。好中球の Neutrophil extracellular trap (NET) などがシトルリン化を媒介する Peptidylarginine deiminase (PAD) 酵素のリリースにつながり、シトルリン化自己抗原をより多く表出させ、特定の HLA-DR を保持する患者群で ACPA が産生されると考えられている。病因論に関しては図 1 を参照されたい。

シトルリン化自己抗原としては様々なものが知られているが、多くは関節局所に存在するシトルリン化蛋白として同定された。しかしながら、RA 患者ではすでに ACPA が診断時点で発現上昇があり、その産生・制御機構の解明には動物モデルが必要不可欠である。GIA モデルでは PAD4 を欠損させると関節炎が減弱するが、ACPA 産生は大きな影響を受けない。我々は GIA 及び RA 患者血清で特異的に発現上昇するシトルリン化 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (cit-ITIH4) を同定した (Kawaguchi et al. Arthritis Res Ther. 2018)。よって、発見された Cit-ITIH4 をツールとして、GIA マウス及び RA におけるシトルリン化蛋白の産生メカニズムや応答を生体内でも同様に検索できると考えられる。



2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が発見した cit-ITIH4 の関節炎の生成メカニズムを詳細に解明し、その病因的機構を探ることである。GIA では特異的に ACPA が産生され、関節炎が終息しても ACPA は上昇を続ける。またさらに、RA 患者では疾患活動性ととも cit-ITIH4 は変動し、抗 CCP 抗体とは直接のリンクは見られなかった。これらの結果を踏まえ、RA 患者における病態マーカーとしての cit-ITIH4 の定量およびその自己抗体の検出に関して、国内及び国際特許を出願している。

この蛋白を介して、RA のシトルリン化蛋白及びその自己抗体の産生メカニズムがより明らかになる可能性があり、また、現在までの“抗炎症”とは全く違うシステムによる、シトルリン化蛋白の産生制御による疾患修飾が考えられる。

3. 研究の方法

- (1) GIA マウスの関節、肝、肺、脾臓、骨髄および血漿における cit-ITIH4 発現を Western blot (WB) 法で比較検討した。
- (2) GIA マウス関節における PAD 発現を定量 PCR 法と IHC 法で検討した。
- (3) GIA マウスに抗 Ly6G 抗体、抗 Gr1 抗体あるいはコントロール抗体を投与し、好中球除去による血中および関節での cit-ITIH4 発現を検討した。
- (4) native-Fibrinogen (Fng), cit-Fng, native-ITIH4, cit-ITIH4 蛋白をそれぞれ健康人血清に添加し、各々に対する好中球の遊走と C5a 濃度を Boyden chamber 法と ELISA 法で検討した。

4. 研究成果

- (1) 検討した組織および血漿において、cit-ITIH4 の発現量は関節炎極期 (day14) の関節において最多であった ($p < 0.01$)。
- (2) day14 の関節において PAD4 mRNA の有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。また、その発現細胞の 90.4% が好中球であった。

(3)好中球除去により血中および関節内の cit-ITIH4 の有意な発現低下を認めた($p<0.05$)。

(4)Cit-ITIH4 の添加で、C5a 濃度が有意に増加し、好中球の遊走が有意に増強した ($p<0.05$)。

これらより関節の好中球 PAD4 を介した ITIH4 のシトルリン化が推測された。また cit-ITIH4 が補体活性化を介し、好中球を遊走させる可能性が示唆された。

(Osada et al. Clin Exp Immunol 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ebe H, *Matsumoto I, Osada A, Kurata I, Kawaguchi H, Kondo Y, Tsuboi H, Sumida T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Splice variant of STEAP4 localizes in the nucleus, making it a possible transcriptional regulator of IL-6 production.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 714-716
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 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 Kawaguchi H, *Matsumoto I, Osada A, Kurata I, Ebe H, Tanaka Y, Inoue A, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Ishigami A, Sumida T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Peptidyl arginine deiminase inhibition suppresses arthritis via decreased protein citrullination in joints and serum with the downregulation of interleukin-6.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 964-969
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 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 Kurata I, *Matsumoto I, Ohyama A, Osada A, Ebe H, Kawaguchi H, Kaneko S, Kondo Y, Tsuboi H, Tomioka A, Kaji H, Sumida T	4. 巻 78
2. 論文標題 Potential involvement of OX40 in the regulation of autoantibody sialylation in arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis.	6. 最初と最後の頁 1488-1496
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 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 Kawaguchi H, *Matsumoto I, Osada A, Kurata I, Ebe H, Tanaka Y, Inoue A, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Shinkai Y, Kumagai Y, Ishigami A, Sumida T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of novel biomarker as citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4, specifically increased in sera with experimental and rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 66
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 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 Osada A, Matsumoto I, Mikami N, Ohyama A, Kurata I, Kondo Y, Tsuboi H, Ishigami A, Sano Y, Arai T, Ise N, Sumida T.	4. 巻 203
2. 論文標題 Citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 in arthritic joints and its potential effect in the neutrophil migration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Immunol	6. 最初と最後の頁 385-399
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 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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本 功
2. 発表標題 関節リウマチにおけるT細胞と抗シトルリン化蛋白抗体のトピックス
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会(徳島) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 功
2. 発表標題 TNFとその阻害メカニズムupdate-関節リウマチを中心に-
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 功
2. 発表標題 関節リウマチの寛解導入・維持療法を再考する
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会 (京都) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 功
2. 発表標題 Reconsidering IL-6 receptor inhibition in autoimmune and inflammatory conditions.
3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 関節リウマチ診断薬	発明者 松本功	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、16/625972	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

筑波大学医学医療系 膠原病リウマチアレルギー内科 http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/rheumatology/

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
---------	---------