

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590551
 研究課題名(和文) シトルリン化フィブリノゲンの凝固・線溶機能異常とその病因との関係
 研究課題名(英文) Studies for coagulation and fibrinolysis of citrullinated fibrinogen and its association with pathophysiology in Rheumatoid Arthritis.
 研究代表者
 奥村 伸生 (OKUMURA NOBUO)
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号：60252110

研究成果の概要：関節リウマチの病因のひとつと考えられているシトルリン化フィブリノゲン(C-Fbg)は、トロンビンの切断部位のArgがシトルリン化されるため、フィブリノペプチドの放出が起こらないために重合反応が起こらないことを明らかにした。また、健常ヒト滑膜培養細胞にC-Fbgを添加する実験では、C-Fbg単独、患者中に存在する抗CCP抗体との同時添加によっても、炎症を惹起するような物質の明らかな増加は観察されなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：臨床検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：シトルリン化フィブリノゲン，シトルリン化フィブリン，フィブリン重合反応，関節リウマチ，TNF α ，IL-6，PAI-1，MMP-3

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は関節破壊を主要病変とする全世界で最も頻度の高い全身性自己免疫疾患である。このRA患者血清の75%程度にシトルリン化蛋白に対する自己抗体が存在し、しかも高い疾患特異性を有することと、疾患の極初期から陽性になることが相次いで報告されており、新規臨床検査項目として注目されおり、一般病院での日常検査への導入も間近と考える。

一方、シトルリン化蛋白に対する自己抗体の対応抗原の研究は複雑な経緯をとってき

たが、エピトープがフィラグリン上のシトルリンであることが報告された。また、抗シトルリン化フィラグリン抗体の患者関節液中の主要な標的は、シトルリン化されたフィブリノゲン(Fbg)の α 鎖と β 鎖であることが証明された。ところが、RA患者血清中には(C-Fbg)が検出されない。また、C-Fbgを皮下あるいは腹腔内に投与したラットでは、抗C-Fbg抗体を産生するものの、関節炎を誘導することはできないことが報告された。Fbgは、血漿中に150-300mg/dl存在する蛋白で、RA患者関節組織にフィブリンとして沈着していることが特徴である。

今回我々は、C-Fbgの凝固・線溶能と、C-Fbgとそれに対する抗体の単球・血管内皮細胞および関節滑膜細胞への炎症惹起性について研究を行うこととした。

2. 研究の目的

RA患者関節液中に存在するC-FbgがRA病態とどのように関連しているか明らかにするために研究を行った。

(1) C-Fbgのトロンビンによる凝固機能：正常のフィブリノゲンと比較してC-Fbgの凝固機能が正常なのか、亢進しているのか、低下しているのかを明らかにする。

(2) C-Fbgの線溶能：正常のFbgと比較してC-Fbgの線溶が正常なのか、亢進しているのか、低下しているのかを明らかにする。

(3) C-Fbgの単球・血管内皮細胞および滑膜細胞からの、各種サイトカイン・接着因子および凝固・線溶系制御因子の発現：正常のFbgと比較してC-Fbgの単球・血管内皮細胞および滑膜細胞からの、各種サイトカインおよび凝固・線溶系制御因子の発現が正常なのか、亢進しているのか、低下しているのかを明らかにする。さらに、滑膜細胞においては、RAの病勢判断(滑膜増殖)の新規臨床検査項目(マーカー)として注目されているマトリクスメタロプロテアーゼ-3(MMP-3)の発現を検討する。

3. 研究の方法

(1) C-Fbgの作成：他の血漿蛋白質の混入を防ぐためリコンビナントFbgを用い、ウサギ筋肉ペプチジルアルギニンデヒミナーゼによりシトルリン化させた。シトルリン化はSDS-PAGE後にAnti-Citrulline (Modified) Detection Kitを用いたウエスタンブロッティングで確認した。

(2) C-Fbgのトロンビンによる凝固機能：A) トロンビンによるフィブリノペプチド(FPA, FPB)の放出、B) トロンビンによるフィブリン重合反応、C) トロンビンによるフィブリンゲル構造の走査電子顕微鏡による観察、D) 凝固XII因子によるフィブリン α 鎖と γ 鎖のクロスリンクの4項目である。

(3) C-Fbgの線溶能：A) プラスミンによるフィブリノゲルの溶解、B) フィブリン上へのプラスミノゲンの結合、C) フィブリン上へのtPAの結合、D) フィブリン上でのtPAによるプラスミノゲンの活性化である。

(4) C-Fbgの単球・血管内皮細胞および滑膜細胞からの、各種サイトカイン・接着因子および凝固・線溶系制御因子の発現：A) サイトカインはTNF- α 、IL-6、IL-8、B) 接着因子はsICAM-1、C) 線溶系凝固因子はPAI-1、D) 組織

破壊に関与するMMP-3である。

(5) 健常ヒト滑膜細胞の培養：DSファーマバイオメディカル社から購入したACBI479細胞をI型コラゲンをコートしたプラスチック培養フラスコで専用培地(CSC基礎培地にヒト成長因子とリポプロテイン添加；DSファーマバイオメディカル社)で4日間培養しconfluentになったら1:2に継代する。I型コラゲンをコートした24wellプレートの1wellに5~10 \times 10³個の細胞を播種し、80% confluentとなる3日後に、C-Fbgあるいは非シトルリン化フィブリノゲン(NC-Fbg) 0.1mg/ml、RA患者由来の免疫グロブリン分画(抗CCP抗体:1.0U/ml、IgG量として79 μ g/ml)あるいは健常人由来の免疫グロブリン分画(IgG量として79 μ g/ml)を添加して、1~3日間血清フリーで培養し、上清を回収した。

4. 研究成果

(1) C-Fbgの作成とトロンビンによる凝固機能
リコンビナントFbgをウサギ筋肉ペプチジルアルギニンデヒミナーゼによりシトルリン化させた。その結果はSDS-PAGE後にAnti-Citrulline (Modified) Detection Kitを用いたウエスタンブロッティングで確認した(図1)。

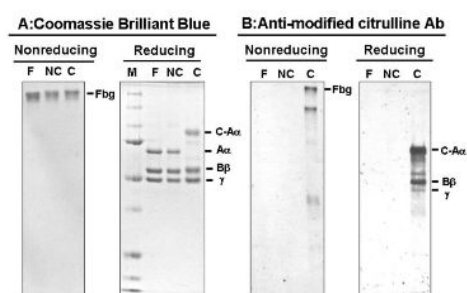


図1 : SDS-PAGEとAnti-Citrulline (Modified) Detection KitによるC-Fbgの確認

C-Fbgのトロンビンによるフィブリン重合反応を行ったところ、まったく重合を観察できなかった。そこでトロンビンによるフィブリノペプチド放出試験を実施した。その結果、FPAおよびFPB放出とともにトロンビン濃度を通常条件の83倍として3時間反応してもまったく観察できなかった(図2)。しかし、血液凝固第XIII因子によるFbg γ 鎖架橋反応の開始時間は、対照の正常Fbgの2分に対し、遅延しているものの5分であった。さらに、プラスミンによるFbg分解反応の阻害試験を行った結果では、C-FbgにおいてもFPA放出後

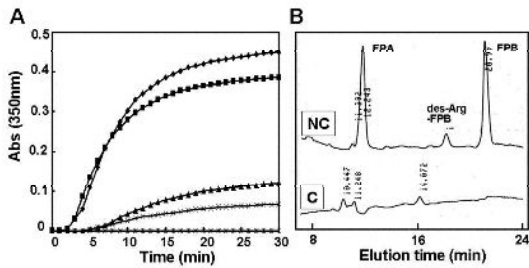


図2：フィブリン重合反応とフィブリノペプチド放出試験

の α 鎖のN末端であるいわゆる”A” knobの結合部位であるいわゆる”a” holeと低親和性Caイオン結合部位の機能は、正常対照と大きな差がないことが明らかになった。

以上の検討より、C-Fbgはトロンビンの切断部位である α 鎖16Arg-17Glyおよび β 鎖14Arg-15GlyのArgがシトルリン化されたために、フィブリノペプチドの放出が起こらないことにより、重合反応が起こらないことが明らかになった。しかし、それ以外の機能は概ね大きな影響を受けないことが推測された。

C-Fbgのトロンビンによるフィブリン転換能に関する研究は、ほぼ同じ時期にNakayama-Hamada Mらによって報告された。彼らの結果と我々の結果が異なった点は、彼らの実験ではC-Fbgは正常Fbgの重合機能を阻害するというものであった。

我々は以上の結果より、RA患者の関節に存在するシトルリン化フィブリンは α 鎖16Argおよび β 鎖14Argがシトルリン化されてないFbgから生成したものか、あるいはシトルリン化されてないFbgがフィブリンになった後にシトルリン化されたものとする。

(2) C-Fbgの線溶性

C-Fbgはトロンビンによりフィブリン塊を形成できないために、フィブリン塊のプラスミンによる溶解試験は行うことが出来なかった。今後、正常Fbgからトロンビンにより生成させたフィブリン塊をシトルリン化する方法を考案し、シトルリン化フィブリン塊のプラスミンによる溶解試験を実施することを検討したい。このことはRAの関節におけるフィブリン沈着の機序解明に役立つものとする。

(3) 健常ヒト滑膜培養細胞における各種サイトカイン・接着因子および凝固・線溶系制御因子などの発現：

間質細胞で産生されるとされている炎症

性サイトカインであるTNF α (図3), IL-6 (図4), IL-8 (図5)のいずれもC-Fbgの単独添加、あるいはC-Fbgと結合すると考えられる抗環状化シトルリンペプチド(CCP)抗体の同時添加においても、両者無添加の培養上清と比較して、有意な増加は認められなかった。TNF α においては、むしろどちらかの添加により低下する傾向が認められた。

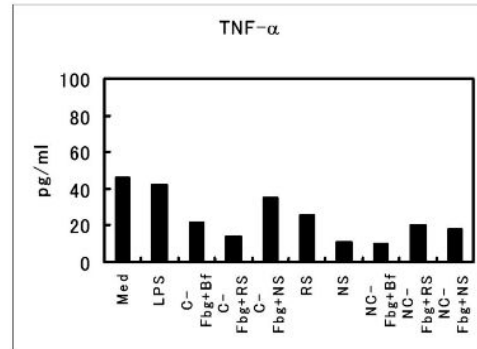


図3：TNF- α の産生

Med:培養液のみ、LPS:10ng/ml、C-Fbg:シトルリン化Fbg、NC-Fbg:非シトルリン化Fbg、RS:RA血清免疫グロブリン分画、NS:健常人血清免疫グロブリン分画【以下の図同じ】

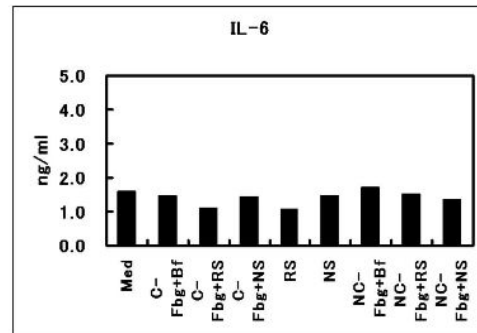


図4：IL-6産生

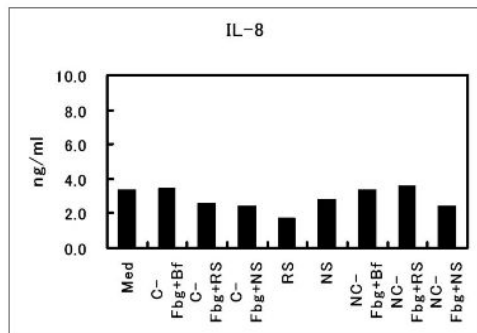


図5：IL-8産生

炎症性サイトカインにより細胞表面に発現が増強すると考えられている接着因子であるICAM-1発現量とよく相関する可溶性ICA

M-1(sICAM-1)は、C-Fbgの単独添加、あるいは抗CCP抗体の同時添加においても、両者無添加の培養上清と比較して、有意な増加は認められなかった(図6)。

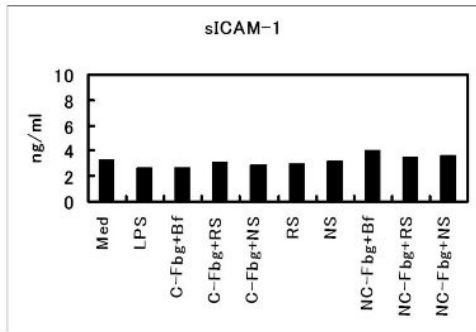


図6 : sICAM-I産生

RA患者の関節腔において線溶低下を来たし組織内フィブリン沈着に関与すると考えられているプラスミノゲンアクチベーターインヒビター(PAI-1)はRA患者および健常者血清免疫グロブリン分画の単独添加で1.5倍程度の産生増加が認められた(図7)。このため、免疫グロブリン分画の濃度を変更して実験を行ったところ濃度依存性が認められたが、患者血清と健常人血清で差は認められなかった。

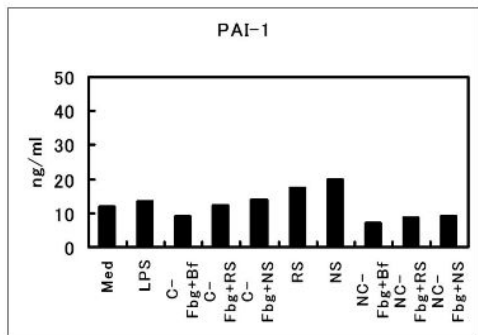


図7 : PAI-I産生

関節リウマチの関節組織破壊に関与すると考えられているMMP-3の発現は、C-Fbg単独添加で2倍程度の産生増加が認められた(図8)。このため、C-Fbg濃度を変更して実験を行ったところ濃度依存性が認められたが、正常Fbgでも同様の傾向であった。

以上、今回の検討では、C-Fbgあるいは抗CCP抗体の正常滑膜細胞への明らかな影響は観察されなかった。このことは、今後健常者滑膜細胞と関節リウマチ患者単球・リンパ球、患者滑膜細胞と患者単球・リンパ球、患者滑

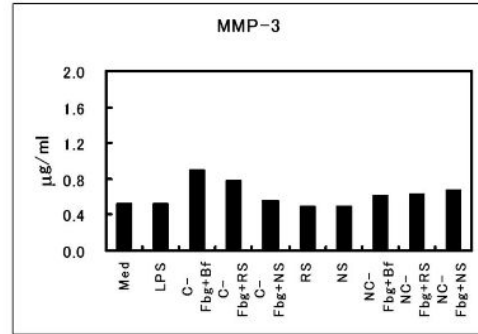


図8 : MMP-3産生

膜細胞と健常者単球・リンパ球の組み合わせ培養において、C-Fbgあるいは抗CCP抗体の影響を調べる実験を行う重要性を認識させられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

① Nobuo Okumura, Ayumi Haneishi, Fumiko Terasawa. Citrullinated fibrinogen shows defects in FPA and FPB release and fibrin polymerization catalyzed by thrombin. Clinica Chimica Acta 401: 119-123, 2009, 査読有

[学会発表](計 1件)

① Nobuo Okumura, Ayumi Haneishi, Fumiko Terasawa. Functional analysis for citrullinated recombinant fibrinogen. The XXth International Fibrinogen Workshop, 2008. 7. 11, イタリア・ベニス.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村伸生 (NOBUO OKUMURA)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 6 0 2 5 2 1 1 0

(2) 研究分担者

寺澤文子 (FUMIKO TERASAWA)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 4 0 1 0 9 2 1 0

(3) 連携研究者

なし