

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08908

研究課題名（和文）関節リウマチ患者由来抗シトルリン化ペプチド抗体を用いた破骨細胞分化抑制剤の開発

研究課題名（英文）Development of inhibitors of osteoclast differentiation with an anti-citrullinated protein monoclonal antibody

研究代表者

杉山 英二（SUGIYAMA, EIJI）

広島大学・病院（医）・名誉教授

研究者番号：70179167

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）：関節リウマチ患者より得られた抗シトルリン化蛋白モノクローナル抗体(CCP-Ab1)の機能について検討し、対応抗原はシトルリン化フィブリノーゲンであることを明らかにした。また、関節炎発症マウスモデルマウス（SKGマウス）においてCCP-Ab1を静脈投与すると関節炎の悪化、関節破壊の進行、骨吸収の亢進、骨と滑膜の境界部における破骨細胞の増加を認めた。一方、胚型CCP-Ab1では関節炎の悪化は見られないことから、CCP-Ab1は体細胞変異を繰り返すことにより、その病原性を獲得することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ診療では抗シトルリン化蛋白抗体（ACPA）は診断マーカー、関節破壊予測マーカーとして広く、使用しているが、その病原性に関しては不明である。今回の研究では関節リウマチから得られたACPAが強い病原性を有すること、その対応抗原はシトルリン化フィブリノーゲンであることを明らかにした。この実験結果はACPAそのものを治療ターゲットとして応用できることを示唆しており、新たなリウマチ治療の開発に貢献するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the function of an anti-citrullinated protein monoclonal antibody (CCP-Ab1) obtained from rheumatoid arthritis patients, and found that the corresponding antigen is citrullinated fibrinogen. In addition, intravenous administration of CCP-Ab1 in arthritis-prone mouse model mice (SKG mice) resulted in worsening arthritis, progressive joint destruction, increased bone resorption, and increased osteoclasts at the boundary between bone and synovium. On the other hand, embryonic CCP-Ab1 did not show worsening of arthritis, suggesting that CCP-Ab1 acquires its virulence through repeated somatic mutations.

研究分野：リウマチ・膠原病学

キーワード：関節リウマチ 抗シトルリン化蛋白抗体 SKGマウス モノクローナル抗体 シトルリン化フィブリノーゲン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は滑膜関節の炎症を主徴とする慢性の自己免疫疾患である。RA 患者血清中にはシトルリン化蛋白に対する自己抗体 (ACPA) が特異的に認められ、診断に重要である。また、ACPA は RA 発症以前から陽性になること、高力価の ACPA 陽性 RA 患者では関節破壊が高度に認められることが知られている。このように RA の病態に ACPA 自己抗体の関与が強く示唆されるが、ACPA およびその自己抗原がどのように RA の発症、進展に関わるかは不明である。これまで、我々は、RA 患者の B 細胞より ACPA モノクローナル抗体 (CCP-Ab1) の取得に成功し、その対応抗原について報告した。すなわち、CCP-Ab1 のエピトープマッピングを行い、そのエピトープ領域ヒトタンパク質に対して相同性検索を行ったところ、38種類のヒトタンパク質を見いだした。また、相同性検索を外来抗原に範囲を広げると、合計2000種類以上の蛋白を見いだした。しかし、これまで報告されていた ACPA 自己抗原に対しては交差反応性を見いだすことができなかった。そこで、今回 CCP-Ab1 の更なる自己抗原の同定を行い、その病原性を明らかにするために研究を企画した。

2. 研究の目的

RA における ACPA の病原性を明らかにするために、CCP-Ab1 の真の自己抗原の同定を行う。また、自己免疫性関節炎マウスに、CCP-Ab1 を静脈投与し、関節炎、関節破壊、病理学的所見を評価し、その病原性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CCP-Ab1 が結合する血漿中のネイティブな蛋白を検索するために、血漿蛋白を BN-PAGE (native condition) でプロットング、抗体と反応したバンドを LC-MS/MS 解析し、最終的に ELISA 法を用いて、対応抗原 (シトルリン化フィブリノーゲン: cit-Fb) を同定した。また、CCP-Ab1 は高度の体細胞変異が起こって病原性を示して可能性がある。そこで、CDR3 の部分以外の変異を変異が起こる前の生殖細胞系配列に人為的に戻した抗体 (GL-rev CCP-Ab1) を作成し、自己抗原との結合能 (ELISA) について検討した。

(2) CCP-Ab1 の病原性を明らかにするために、RA モデルマウスである SKG マウスにラミナリン、CCP-Ab1、GL-rev CCP-Ab1 を静脈投与し、関節炎の程度を関節炎スコアで評価して、関節破壊の程度を X 線マイクロトモグラフィー、病理組織的に検討した。

(3) CCP-Ab1 の対応抗原である cit-Fb の病原性を明らかにするために、RA 滑膜細胞の炎症性サイトカインの発現に対する cit-Fb の効果を遺伝子 (RT-PCR 法) および蛋白レベル (ELISA 法) で検討した。また、toll-like receptor 4 (TLR4) のノックダウンは siRNA 法により行った。

4. 研究成果

(1) CCP-Ab1 はネイティブなシトルリン化フィブリノーゲンと結合する

CCP-Ab1 が結合する生体内のネイティブな蛋白を検索するために、BN-PAGE (native condition) を用いて、いくつかの生体サンプルを検討したところ、血漿中の高分子領域に CCP-Ab1 と結合する蛋白質の存在を見いだした。ゲル濾過を行い、目的蛋白の分離後、LC-MS/MS 解析を行った結果、フィブリノーゲン由来のペプチドが検出された。また、ELISA により、CCP-Ab1 はシトルリン化フィブリノーゲンに対して、結合することを証明した。CCP-Ab1 は高度に体細胞突然変異が生じている。そこで、これらの変異のうち、CDR3 領域を除く CDR 領域の変異を生殖細胞系配列に人為的に戻した抗体 (GL-rev CCP-Ab1) を作成し、シトルリン化フィブリノーゲンに対する結合を検討すると、結合はするものの、CCP-Ab1 と比較して、結合力は極めて弱かった (図1)。これらの結果から、CCP-Ab1 は体細胞変異を繰り返すことにより、その病原性を獲得することが示唆された。

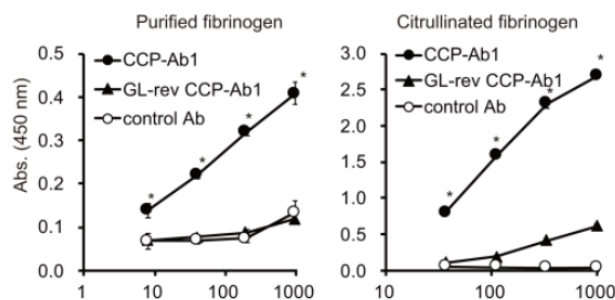


図1 : シトルリン化フィブリノーゲンに対する CCP-Ab1 の結合-X軸:CCPAb1 抗体 (ng/ml)

(2) CCP-Ab1 は自己免疫性関節炎マウスモデル、SKG マウスの関節炎増悪を誘発する

RA における ACPA の病原性を明らかにするために、SKG マウスに CCP-Ab1 を静脈投与して、関節炎、関節破壊に対する作用を検討した。SKG マウスにラミナリンを投与することで実験的関節炎を誘発できるが、さらに CCP-Ab1 を投与することで、関節の炎症の増悪および X 線マイクロとモグラフィ分析により距骨での骨浸食が認められた (図 2A)。また、関節炎の重症度スコアにおいてもラミナリン投与群と比較して高く (図 2B)、関節組織切片ではパンヌスの形成が認められ、軟骨損傷のスコアも高いことが認められた (図 2C)。一方、GL rev CCP-Ab1 投与群はラミナリン投与群と比較して、同程度であった。また、破骨細胞に関しては、CCP-Ab1 投与群における足関節の組織化学的分析の結果、対照群と比較して、破骨細胞数が有意に増加していることが認められた。これらの結果から CCP-Ab1 により破骨細胞が活性化することにより骨吸収が促進されていることが示唆された。

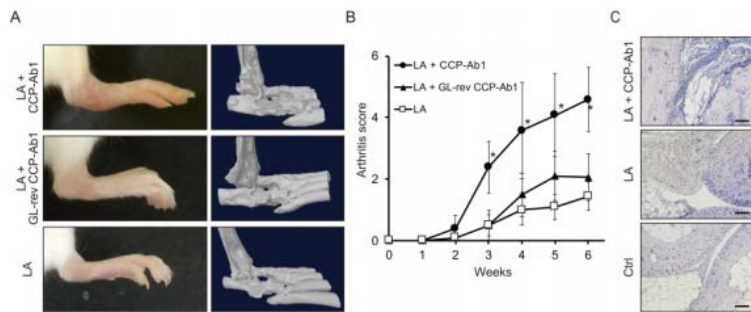


図 2 : SKG マウスの関節炎、関節破壊に対する CCP-Ab1 の効果

(3) RA 滑膜細胞の炎症性サイトカイン産生に対するシトルリン化フィブリノーゲンの効果

CCP-Ab1 の対応抗原はシトルリン化フィブリノーゲン (cit-Fb) であり、CCP-Ab1 は SKG マウスへの投与により、強い病原性を認めた。そこで、cit-Fb の病原性を明らかにする目的で、RA 滑膜細胞培養系に cit-Fb を添加して炎症性サイトカインの産生に対する効果を遺伝子、蛋白レベルで検討した。cit-Fb は toll-like receptor 4 (TLR4) のシグナルの活性化を介して、CXCL10 の発現を強く誘導したが、LPS の中和活性を有するポリミキシン B (PMB) により CXCL10 誘導作用が部分的に抑制されること、熱処理した cit-Fb 試薬においても CXCL10 誘導作用が認められることから、試薬中の LPS の混入が疑われ、最終的にリムルス試験 (LAL assay) で LPS を測定し、cit-Fb 試薬 (1 μ g/ml) から 0.3 ng/ml 相当の LPS 活性を認めた。LPS はリピッド A、コア多糖体、O 抗原多糖で構成されるが、O 抗原多糖が欠失した LPS 変異体 (R-LPS) が存在し、コア多糖の付加の程度により Ra, Rc, Re-LPS に分類され、これらの変異体の LPS 活性はそれぞれ異なる。そこで、Re-LPS を用いて検討したところ、大腸菌由来の LPS (wild-type LPS) のサイトカイン誘導作用を濃度依存性に抑制するとともに、LPS の混入した cit-Fb 試薬による CXCL10 誘導をほぼ完全に抑制した。以上より、cit-Fb の炎症性サイトカイン誘導作用は LPS のコンタミネーションによると考えられ、cit-Fb そのものの作用は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugimoto, T. Mokuda, S. Kohno, H. Ishitoku, M. Araki, K. Watanabe, H. Tokunaga, T. Yoshida, Y. Hirata, S. Sugiyama, E	4. 巻 -
2. 論文標題 Nailfold capillaries and myositis-specific antibodies in anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-positive dermatomyositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keab681	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 -
1. 著者名 Kohno, H. Ouhara, K. Mokuda, S. Tokunaga, T. Sugimoto, T. Watanabe, H. Ishitoku, M. Yoshida, Y. Mizuno, N. Ozawa, T. Kawataka, M. Hirata, S. Kishi, H. Sugiyama, E	4. 巻 89
2. 論文標題 The Lipopolysaccharide Mutant Re-LPS Is a Useful Tool for Detecting LPS Contamination in Rheumatoid Synovial Cell Cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 92-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520022	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 Mokuda S, Tokunaga T, Masumoto J, Sugiyama E.	4. 巻 47
2. 論文標題 Angiotensin-converting Enzyme 2, a SARS-CoV-2 Receptor, Is Upregulated by Interleukin 6 through STAT3 Signaling in Synovial Tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 2553-2558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3899/jrheum.200547.	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 Ozawa T, Ouhara K, Tsuda R, Munenaga S, Kurihara H, Kohno H, Hamana H, Kobayashi E, Taki H, Tobe K, Sugiyama E, Muraguchi A, Kishi H.	4. 巻 72
2. 論文標題 Physiologic Target, Molecular Evolution, and Pathogenic Functions of a Monoclonal Anti-Citrullinated Protein Antibody Obtained From a Patient With Rheumatoid Arthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 2040-2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41426	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 Kuranobu T, Mokuda S, Oi K, Tokunaga T, Yukawa K, Kohno H, Yoshida Y, Hirata S, Sugiyama E	4. 巻 87
2. 論文標題 Activin A Expressed in Rheumatoid Synovial Cells Downregulates TNFalpha-Induced CXCL10 Expression and Osteoclastogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 198-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000506260	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 Hamamoto Y, Ouhara K, Munenaga S, Shoji M, Ozawa T, Hisatsune J, Kado I, Kajiya M, Matsuda S, Kawai T, Mizuno N, Fujita T, Hirata S, Tanimoto K, Nakayama K, Kishi H, Sugiyama E, Kurihara H	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Porphyromonas gingivalis infection on gut dysbiosis and resultant arthritis exacerbation in mouse model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-020-02348-z.	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 Tokunaga T, Mokuda S, Kohno H, Yukawa K, Kuranobu T, Oi K, Yoshida Y, Hirata S, Sugiyama E.	4. 巻 21
2. 論文標題 TGFbeta1 Regulates Human RANKL-Induced Osteoclastogenesis via Suppression of NFATc1 Expression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21030800	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 Yukawa K, Mokuda S, Kohno H, Oi K, Kuranobu T, Tokunaga T, Yoshida Y, Yamana J, Iwahashi M, Hirata S, Yamana S, Sugiyama E.	4. 巻 38
2. 論文標題 Serum CXCL10 levels are associated with better responses to abatacept treatment of rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 956-963
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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉信達臣, 大本卓司, 河野紘輝, 大井勝博, 徳永忠浩, 湯川和俊, 渡辺裕文, 吉田雄介, 杉本智裕, 茂久田翔, 平田信太郎, 野島崇樹, 杉山英二
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜細胞におけるActivin Aの発現調節機構とその機能的役割.
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯川和俊, 大本卓司, 河野紘輝, 大井勝博, 倉信達臣, 徳永忠浩, 渡辺裕文, 吉田雄介, 杉本智裕, 平田信太郎, 杉山英二
2. 発表標題 関節リウマチ (RA) 患者のアバタセプト (ABT) 治療反応性と関連する血清マーカーの検討.
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadahiro Tokunaga, Sho Mokuda, Hirofumi Watanabe, Hiroki Kohno, Kazutoshi Yukawa, Tatuomi Kuranobu, Katsuhiko Oi, Yusuke Yoshida, Tomohiro Sugimoto, Shintaro Hirata, Eiji Sugiyama
2. 発表標題 TGF beta1 suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis via downregulation of NFATc1 by blocking nuclear translocation of NF-kappa B in humans.
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野紘輝, 應原一久, 大本卓司, 渡辺裕文, 湯川和俊, 徳永忠浩, 倉信達臣, 大井勝博, 杉本智裕, 吉田雄介, 茂久田翔, 小田啓介, 野島崇樹, 平田信太郎, 杉山英二
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜細胞におけるシトルリン化フィブリノーゲンのCXCL10誘導作用とその機序の検討
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Mokuda, Tadahiro Tokunaga, Junya Masumoto, Eiji Sugiyama
2. 発表標題 Angiotensin-converting enzyme 2, a SARS-CoV-2 receptor, is upregulated by IL-6 via STAT3 signaling in synovial fibroblasts and lymphocytes
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiro Sugimoto, Hiroki Kobayashi, Harumichi Suma, Yohei Hosokawa, Michinori Ishitoku, Hiroki Kohno, Hirofumi Watanabe, Tadahiro Tokunaga, Shinpei Ohnari, Yusuke Yoshida, Sho Mokuda, Shintaro Hirata, Eiji Sugiyama
2. 発表標題 Usefulness of nailfold video-capillaroscopy for diagnosing patients positive for anti-centromere antibody.
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野紘輝、應原一久、徳永忠浩、茂久田翔、水野智仁、小澤龍彦、川高正聖、平田信太郎、岸裕幸、杉山英二
2. 発表標題 リウマチ滑膜細胞のTLR4活性化研究におけるLPSのコンタミネーションの検出に、変異型LPS・Re-LPSは有用である。
3. 学会等名 第36回日本臨床リウマチ学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	小澤 龍彦 (Ozawa Tatsuhiko) (10432105)	富山大学・学術研究部医学系・准教授 (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	應原 一久 (Ouhara Kazuhisa) (80550425)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	

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