

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590521

研究課題名（和文） シトルリン化フィブリノゲン・フィブリンの溶解性に関する研究

研究課題名（英文） Research on solubilization of citrullinated fibrinogen and fibrin

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（和文）： 関節リウマチ患者の関節あるいは血液中に存在するシトルリン化フィブリノゲン(C-Fbg)とシトルリン化フィブリン(C-Fbn)は抗シトルリン化蛋白抗体の存在下で、正常 Fbg や Fbn と比較して各種プロテアーゼによって分解されにくいために、長期間にわたって免疫原性を発揮し、炎症の場を提供する可能性を推測し、これらを証明するために検討を行った。その結果、C-Fbg と C-Fbn はプラスミン、好中球エラスターゼ、トリプターゼ、キマーゼ、MMP-3 のすべての酵素において正常 Fbg・Fbn と同様に分解され、遅延は認められなかった。

研究成果の概要（英文）： I speculated that citrullinated fibrinogen (C-Fbg) and fibrin (C-Fbn) existed in blood and joint fluid in patients with Rheumatoid Arthritis were avoided the degradation by some of proteases in the presence of anti-citrullinated protein antibody (ACPA), exerted long acting immunogenic property, and provided inflammatory region. To demonstrate my theory, I made a C-Fbg and C-Fbn, and reacted with proteases. In the presence of ACPA, C-Fbg and C-Fbn were digested similar to normal Fbg and normal Fbn, respectively, with plasmin, neutrophil elastase, trypsin, chymase, or MMP-3. In conclusion, elongation of protease digestion period for C-Fbg and C-Fbn were not observed in contrary to my expectation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床血液学

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）患者の関節にはフィブリン（Fbn）をはじめフィラグリンやケラチ

ンなどの蛋白がシトルリン化されたシトルリン化蛋白が存在していることが知られている。このシトルリン化蛋白は、主に好中球

に存在するペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) によって、塩基性アルギニン (R) が中性のシトルリンに変換されることによって生じる蛋白で、RA 以外の関節炎でも認められている。さらに、RA に特徴的なこととして抗シトルリン化蛋白抗体 (anti-citrullinated protein antibody; ACPA) が産生され、シトルリン化蛋白と ACPA が抗原抗体反応することによってさらなる炎症が生じ、関節破壊の発症・進展に重要な働きをしている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

奥村らは、既にシトルリン化フィブリノゲン (C-Fbg) では A α 16R、B β 15R がシトルリン化されているために、トロンビンによる切断が出来ないことから、C-Fbg から Fbn モノマーが形成されず、さらにはシトルリン化フィブリン (C-Fbn) が形成されないことを報告した。これらのことより、RA における C-Fbg と C-Fbn の働きを以下のように推測した。RA 患者関節でシトルリン化された C-Fbg は血流中へ入り、抗原提示細胞によって取り込まれ処理後、class II MHC 抗原とともにヘルパー T 細胞に提示され、分泌されるサイトカインなどによって C-Fbg を認識した B 細胞を形質細胞に分化させ、ACPA を産生させる免疫原性を有する。一方、関節に析出した Fbg はトロンビンの作用によって Fbn に変換し、関節に沈着する。これが PAD の作用により C-Fbn に変化する。この C-Fbn は、血流中から関節に入った ACPA と抗原抗体複合体を形成することで、各種細胞の遊走や接着を促進し、炎症の場を提供するとともに炎症の悪化や病態の進展に関与している。

RA における C-Fbg と C-Fbn の関与の一つとして、C-Fbg と C-Fbn は正常 Fbg や Fbn と比較して ACPA 存在下でプラスミンを始めとする各種プロテアーゼによって分解されに

くいために、C-Fbg は長期間にわたって患者血中に存在し免疫原性を発揮するとともに、C-Fbn は患者関節において吸収除去されず析出したままおり、長期間にわたって炎症の場を提供していると推測した。本研究はこれらの推測を証明するために行った。

3. 研究の方法

(1) C-Fbg、NC-Fbg の作製

Fbg は IF-1 モノクローナル抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィー法により正常人血漿から精製した。Fbg 濃度は 280nm で吸光度を測定し、10 mg/ml 溶液の Absorbance が 15.1 となることから算出した。次にシトルリン化緩衝液を 1 mg/ml Fbg となるように添加し、ウサギ筋肉由来の peptidylarginine-deiminase-2 (PAD2) を 7 U/ml 添加した後、37°C 2 時間反応させ C-Fbg を作成した。対照として PAD2 を添加しなかったものを非シトルリン化フィブリノゲン (NC-Fbg) とした。

(2) 抗 CCP 抗体 (ACPA) 含有 IgG の精製

信州大学医学部附属病院整形外科を受診し、臨床検査部に提出された関節リウマチ患者血清のうち抗 CCP 抗体 (ACPA) 陽性のものをプールした。また抗 CCP 抗体陰性の 10 人の正常人血清をプールした。なおこれらの血清の収集は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得た。

プール血清の免疫グロブリンを 50%飽和硫酸で塩析し、プロテイン G セファロースカラムで IgG を精製し、濃縮、透析を行った。以下抗 CCP 抗体 (ACPA) 陽性患者 IgG を P-IgG、正常人 IgG を N-IgG とする。IgG 濃度はそれぞれ 800 mg/dl、400 mg/dl、IgA 濃度は共に 0 mg/dl、IgM 濃度はそれぞれ 8 mg/dl、4 mg/dl、抗 CCP 抗体力価はそれぞれ 101 U/ml、0.6 U/ml 未満、リウマトイド因子はそれぞれ 8 U/ml、0 U/ml であった。

(3) C-Fbg、NC-Fbg と P-IgG、N-IgG の反応

0.6 mg/ml の C-Fbg、NC-Fbg に対して、P-IgG、N-IgG 濃度が共に 40 mg/dl となるように添加し、室温で 1 時間反応させた。

(4) C-Fbg、NC-Fbg のプロテアーゼ処理

使用したプロテアーゼはプラスミン、白血球由来エラスターゼ、リコンビナントキマーゼ、肺由来トリプターゼ、リコンビナント MMP-3 である。HEPES Bf 中に 0.6 mg/ml の C-Fbg または NC-Fbg を添加し、0.02 IU/ml のプロテアーゼを添加する。ただし MMP-3 の場合は、プロテアーゼ濃度 0.0002 IU/ml を添加した。その後 37°C で 4 時間まで反応させる。反応後は等量の 2-mercaptoethanol (2-ME) (+) SDS sample buffer または 2ME (-) SDS sample buffer を添加し 100°C で 5 分煮沸し、反応を停止した。

(5) C-Fbn、NC-Fbn の作製

Human Factor XIII (FXIII) を活性化するために、最終濃度が 10 U/ml の FXIII と 0.2 U/ml の α -Thrombin を 2 mM の CaCl₂ 存在下で HEPES Bf 中で 37°C 1 時間反応させた。以下、これを トロンビン・活性化 FXIII の混合液という。次に HEPES Bf 中で Fbg 9 容と トロンビン・活性化 FXIII の混合液 1 容を 37°C 2 時間反応させ、Fbn 形成を行った。生成 Fbn は洗浄後、シトルリン化緩衝液中で PAD2 により 37°C で 2 時間反応させシトルリン化した。これを C-Fbn とした。対照として、Fbn 形成まで行った後、PAD2 を添加しなかったものを非シトルリン化フィブリン (NC-Fbn) とした。

(6) C-Fbn、NC-Fbn と P-IgG、N-IgG の反応

0.55 mg/ml の C-Fbn、NC-Fbn に対して P-IgG、N-IgG を共に 400 mg/dl となるように添加し、室温で 1 時間反応させた後、PBS で洗浄を 3 回行った。

(7) C-Fbn、NC-Fbn のプロテアーゼ処理

使用したプロテアーゼは C-Fbg、NC-Fbg の

処理と同様である。予備実験に基づき、HEPES Bf 中で 0.5 mg/ml の Fbn に対して、プラスミン、白血球エラスターゼとリコンビナントキマーゼは 0.08 IU/ml、リコンビナント MMP-3 は 0.0008 IU/ml となるようにプロテアーゼを添加し、37°C の恒温槽中で 1 分間あたり 130 回程度の往復振盪に設定した shaker で連続混和した。予備実験に基づき、プラスミンは 48 時間、白血球エラスターゼとリコンビナントキマーゼは 72 時間、リコンビナント MMP-3 は 96 時間まで反応させ、任意の時間ごとに 15,000 rpm で 1 分間遠心後上清 20 μ l を回収し、等量の 2-ME (+) SDS sample buffer または 2-ME (-) SDS sample buffer を添加し 100°C 5 分間煮沸して酵素反応を停止させ、それぞれ還元サンプル、非還元サンプルとした。

(8) SDS-PAGE と蛋白染色

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は、非還元サンプル用には 8% アクリルアミドゲルを使用し、還元サンプル用には 10% ゲルを使用した。それぞれのゲル 1 ウェルに前述したサンプルを 20 μ l ずつアプライし、1 枚のゲルあたり 20 mA の定電流で 90 分間泳動を行った。泳動後は 0.18% Coomassie brilliant blue (CBB) 染色液で 90 分間染色を行った後、3 回脱色を行った。

4. 研究成果

(1) 各種プロテアーゼによる C-Fbg の P-IgG (ACPA) 添加による影響

C-Fbg はトリプターゼ以外のプラスミン・好中球エラスターゼ・キマーゼ・MMP-3 によって 4 時間以内に分解された。この分解性は非 C-Fbg の分解性と比較して遅延することはなかった。さらに、C-Fbg に RA 患者 IgG すなわち ACPA を反応させたときのプロテアーゼにおいても C-Fbg は分解され、その分解性は

C-Fbg に健康人 IgG を反応させた場合と比較して遅延することはなかった。以上の結果より、C-Fbg は ACPA の存在の有無にかかわらず今回検討したプロテアーゼによる分解は対照と比べて遅延しないことが明らかになった。

(2) 各種プロテアーゼによる C-Fbn の P-IgG (ACPA) 添加による影響

ACPA を反応させた C-Fbn はプラスミンによっては 1 時間以内、好中球エラスターゼ・キマーゼ・MMP-3 では 6-12 時間で分解が開始された。これらの分解性は ACPA を反応させた非 C-Fbn の分解性と比較して遅延することはなかった。また、C-Fbn と非 C-Fbn に健康人 IgG を反応させた場合を対照として行ったが、それらの分解性と比較しても、ACPA を反応させた C-Fbn の分解が遅延することはなかった。むしろ、理由は明らかにできなかったが、C-Fbn の分解が対照に比較して促進するものも観察された。

以上、C-Fbg および C-Fbn はともに ACPA が反応した状態であっても、今回検討したプロテアーゼによる分解は対照と比べて遅延しないことが明らかになった。

(3) 国内外の研究報告との比較

今回我々が研究したようなアイデアに基づく関節リウマチの病態解析を行った報告は国内外で認められない。さらに動物を用いた実験でもそのような検討や報告はなされていない。

(4) 今後の展望

今回の研究でポジティブな結果が得られなかった原因を 2 つ疑った。第一に、今回検討したプラスミン、エラスターゼ、キマーゼ、MMP-3 以外のプロテアーゼが病態に関与している可能性である。すなわち、今回 4 時間では Fbg を分解できなかったので行わなかったトリプターゼ、フィラグリンを分解して組織

障害、細胞障害を生じるといわれているカスパーゼのようなプロテアーゼを検討する必要がある。

第二に、今回 IgG 分画に属する ACPA を精製して使用したが、ACPA には IgG 以外に IgA、IgM、IgE に属する抗体が報告されており、特に IgE に属する ACPA が RA の病態発症とその増悪に関与しているという報告もあるので今後は IgE に属する ACPA を精製して実験を行う必要がある。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 奥村伸生, 寺澤文子, 抗シトルリン化蛋白抗体と反応させたシトルリン化フィブリンの各種プロテアーゼによる分解性の検討, 第 52 回日本臨床化学会年次学術集会 2012. 9. 7. 盛岡市

② 南谷真衣, 寺澤文子, 奥村伸生, 関節リウマチ患者関節に認められるシトルリン化フィブリンのプロテアーゼによる分解性の検討, 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 2011. 11. 20. 岡山市

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

寺澤 文子 (TERASAWA FUMIKO)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：40109210