

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460678

研究課題名(和文) 血漿および関節液中のシトルリン化フィブリノゲンおよびその抗体定量法の確立

研究課題名(英文) Measurement of the plasma and synovia levels of citrullinated fibrinogen and antibodies against it in rheumatoid arthritis patients

研究代表者

寺澤 文子(Terasawa, Fumiko)

北陸大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：40109210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチの病因であるシトルリン化フィブリノゲンとその抗体の血中濃度を、ELISAにより定量した。対象は関節リウマチ患者13例、健常人21例およびSLE患者2例であった。抗原濃度はRA患者204 - 2,881 ng/mL、健常人群47 - 291 ng/mL (平均: 134 ± 60.1 ng/mL)、抗体価は同様に25 - 1,780 U/mLと4.0 - 10.9 U/mL (平均: 5.4 ± 1.54 U/mL)であった。抗原量は感度84.6%、特異度95.7%、抗体量は感度100%、特異度87.0%となった。本研究により血清中シトルリン化フィブリノゲンおよびその抗体の定量法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We measured citrullinated fibrinogen and autoantibody levels in the serum using ELISA based on recombinant citrullinated fibrinogen and a mouse monoclonal antibody against it. The citrullinated fibrinogen levels of the rheumatoid arthritis (RA) patients (n=13), systemic lupus erythematosus (SLE) patients (n=2), and normal controls (n=21) were 204-2881 ng/mL, 92 ng/mL, and 47-291 ng/mL (134 ± 60.1 ng/mL), respectively. The citrullinated fibrinogen antibody levels of the RA patients, SLE patients, and normal controls were 25-1,780 U/mL, 20 U/mL, and 4.0-10.9 U/mL (5.4 ± 1.54 U/mL), respectively. The serum measurements obtained in the RA patients indicated that the assay exhibited 84.6% sensitivity and 95.7% specificity for the citrullinated fibrinogen antigen, and 100% sensitivity and 87.0% specificity for the citrullinated fibrinogen antibody. In this study, we established an ELISA-based method for measuring the serum levels of citrullinated fibrinogen and antibodies against it.

研究分野：病態検査学

キーワード：シトルリン化フィブリノゲン ELISA 関節リウマチ 血中抗原濃度 血中抗体濃度

## 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タンパクに対する自己抗体が存在し、しかも高い疾患特異性を有し、疾患の極初期から検出されることが報告されている。臨床検査では環状シトルリン化ペプチドに対する抗体検査が新規項目として保険適用になっている。シトルリン化タンパクに対する自己抗体の対応抗原の研究は複雑な経緯をたどってきたが、RA 患者関節液中の主要な対応抗原はシトルリン化されたフィブリンの鎖と鎖であることが証明された。さらに関節液については、シトルリン化フィブリノゲンとそれに対する抗体から形成される免疫複合体が Toll-like Receptor 4 と Fc Receptor を介してマクロファージを活性化することが報告された。またシトルリン化タンパクが IgE クラスに属する抗シトルリン化タンパク抗体を結合した Fc Receptor を介してマスト細胞、好塩基球を活性化することが病態形成に関与することが明らかにされた。しかし、RA 患者関節液に多数認められる好中球およびシトルリン化フィブリンの病因・病態形成に対する関与についてはよくわかっていないのが現状である。

一方、血液中については、シトルリン化フィブリノゲンが存在しないという報告と、免疫複合体として存在するという報告とがあり、明らかにされてはいない。

## 2. 研究の目的

関節リウマチ(RA)の関節にはシトルリン化されたフィブリノゲン・フィブリンとそれらに対する抗体が存在し、それが疾病の発症と

活動性に関与することが明らかになっているが、その詳細な機序は明確になっていない。私たちは次のような RA の病態形成モデルを想定した。すなわち、何らかの原因で関節に存在するフィブリノゲンがシトルリン化され、それが血液を介して免疫系組織に運ばれ抗原刺激され、抗シトルリン化フィブリノゲン抗体を産生する。その抗体が関節に循環し、そこに沈着しているシトルリン化フィブリンと結合することにより各種炎症細胞に炎症の場を提供する、というものである。これは血液中にシトルリン化されたフィブリノゲンとその抗体が循環していることを前提としている。そこで我々はまず血液中のシトルリン化フィブリノゲン量とその抗体量の定量法を確立することが必要と考えた。血液中に抗原と抗体が存在し、それらを定量することができれば、RA の診断、治療経過観察、および病態解明に利用できることが期待される。

## 3. 研究の方法

### 1) モノクローナル抗シトルリン化フィブリノゲン抗体の作製

自家製のリコンビナントフィブリノゲンをウサギ筋肉由来のペプチジルアルギニンディイミナーゼ 2 によりシトルリン化させた。そのシトルリン化フィブリノゲンを抗原とし、それに対するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを業者委託にて作製した。抗体を良好に産生するハイブリドーマを選択し、Hybridoma-SFM(GIBCO)で培養した。上清に分泌された抗体はプロテイン-Gを用いて回収し、精製した。得られた抗体とシトルリン化フィブリノゲンとの反応性は、還元したシトルリン化フィブリノゲンをポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、作製した抗

体を一次抗体として用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

## 2) 検体

検体は13名のRA患者の日常検査に使用した後の残余血清を用いた。2名のSLE患者血清を疾患対照、21名の健常人の血清を正常対照群として用いた。我々はすでにシトルリン化フィブリノゲンはフィブリンにならないことを証明していることから、本研究の測定には血清を用いることとした。これらの検体はいずれもインフォームドコンセントを得た上で採取し、使用した。関節液については、近年の治療方法により関節液貯留の認められる患者はきわめて少ないことから、今回は検体を得ることはできなかった。

## 3) ELISAによるシトルリン化フィブリノゲンの測定

固相化濃度、血清希釈倍数、二次抗体濃度、三次抗体濃度、同時再現性、日差再現性、希釈直線性などの測定条件を検討し、それらの結果から以下の方法で測定した。

作製したモノクローナルシトルリン化フィブリノゲン抗体を10 $\mu$ g/mLの濃度にして120 $\mu$ Lずつマイクロプレートに固相化した。標準液はシトルリン化フィブリノゲンの0-2,000ng/mLを用いた。標準液と検体は100 $\mu$ L、2次抗体にはビオチン化抗ヒトフィブリノゲン抗体の8,000倍希釈液を120 $\mu$ L、次いでストレプトアビジン結合HRPの10,000倍希釈液を120 $\mu$ L反応させた。発色はTMB基質システム(KPL)により行ない、吸光度は主波長450nm、副波長650nmで検出した。検体は基本的にRA患者血清を10倍希釈、SLE患者と健常対照群血清を5倍希釈して用いた。

## 4) ELISAによる抗シトルリン化フィブリノゲン抗体の測定

上記と同様に測定条件の検討した結果から、以下の方法で測定した。

シトルリン化フィブリノゲンを10 $\mu$ g/mL濃度にして120 $\mu$ Lずつマイクロプレートに固相化した。標準液として抗体シトルリン化フィブリノゲン抗体の0-3,000ng/mLを用いた。標準液と検体は100 $\mu$ L、2次抗体にはビオチン化抗ヒトIgG抗体の4,000倍希釈液を120 $\mu$ L、次いでストレプトアビジン結合HRPの10,000倍希釈液120 $\mu$ Lを反応させた。発色はTMB基質システムにより行ない、吸光度は主波長450nm、副波長650nmで検出した。検体は、基本的にRA患者血清は200倍希釈、高濃度のもは800-2,000倍希釈、SLE患者と健常対照群血清は50倍希釈して用いた。

使用したモノクローナル抗体のタンパク濃度は、280nmにおける吸光度1.00を1mg/mLとして求めたとき0.35mg/mLであった。これを標準物質として検体中の濃度を測定し、得られたタンパク濃度の1 $\mu$ g/mLを抗体価1U/mLとして表した。

## 5) RA関連検査項目との比較

RA患者群の抗原量と抗体量のそれぞれについて、経過観察として日常検査で測定されたCRP、Matrix metalloproteinase (MMP)-3、血沈(1時間値)、リウマトイドファクター(RF)、抗CCP抗体の測定値と比較し、相関について検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 抗シトルリン化フィブリノゲン抗体の作製

得られたモノクローナル抗体を一次抗体としたウェスタンブロッティングにより観察したところ、シトルリン化フィブリノゲンのA $\alpha$ とB $\beta$ 鎖に特異的に反応した(図1)。

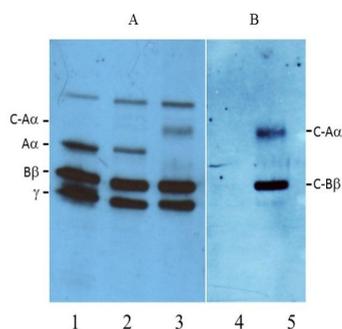


図1. シトルリン化フィブリノゲンと抗体の反応性

1<sup>st</sup> Ab: A. Polyclonal fibrinogen antibody

B. monoclonal citrullinated fibrinogen antibody

1, 4. Plasma fibrinogen, 2. Recombinant fibrinogen, 3, 5. Citrullinated recombinant fibrinogen

## 2) 測定条件の検討

### 抗原量の測定

同時再現性は平均 1,810ng/mL のとき 7.9%、500ng/mL のとき 10.3%、10 回の測定による日差再現性は平均 2,881ng/mL のとき 4.1%、204ng/mL のとき 23%であった。検量線を両対数グラフに描いたところ、標準物質の 8 - 1,000ng/mL の間で直線性を示した。

### 抗体量の測定

同時再現性は平均 303U/mL のとき 7.2%、181U/mL のとき 4.3%、10 回の測定による日差再現性は平均 1,780U/mL のとき 5.9%、25U/mL のとき 17.1%であった。検量線を両対数グラフに描いたところ、標準物質の 10 - 2,000ng/mL の間で直線性を示した。

## 3) シトルリン化フィブリノゲンの定量

RA 患者の血清中抗原濃度は 204 - 2,881ng/mL であった。それに対して SLE 患者では 87 と 97ng/mL、健常人群では 47 - 291ng/mL(平均:134 ± 60.1ng/mL)であった(表1、図2)。

## 4) 抗シトルリン化フィブリノゲン抗体の定量

RA 患者血清中の抗体価は 25 - 1,780U/mL であった。それに対して SLE 患者では 13 と 27U/mL、健常人群では 4.0 - 10.9U/mL(平均:5.4 ± 1.54U/mL)であった(表1、図3)。

表1. シトルリン化フィブリノゲンとその抗体、および RA 関連項目検査結果

		C-Fbg (ng/mL)	Anti-C-Fbg (U/mL)	CRP (mg/dL)	MMP-3 (ng/mL)	ESR (1h) (mm/hr)	RF (IU/mL)	Anti-CCP (U/mL)
RA	Pt-1 f	592	56	0.10	288.0	4.0	291	139
	2 f	461	25	2.16	93.5	14.0	119	1.5
	3 f	367	181	0.77	38.7	>140.0	60	18.3
	4 f	820	303	1.18	114.4	43.0	240	179.0
	5 m	268	40	1.35	202.4	55.0	31	93.4
	6 f	1533	126	8.69	98.3	39.0	2080	>500
	7 m	708	53	0.82	445	30.0	145	202
	8 m	1008	1780	0.87	517.0	30.0	1340	485
	9 m	350	730	3.05	215.6	62.0	10	>500
	10 f	236	68	1.9	109.3	27.0	62	>300
	11 f	204	28	3.99	712.7	10.0	6	0.6
	12 m	507	524	0.00	481.7	1.0	138	>500
	13 f	2881	45	12.68	288.1	117.0	1160	121.0
SLE-1		87	13					1.7
	2	97	27					<0.6
NC(n=21)		134 ± 60.1	5.4 ± 1.54					<0.6
Reference value				<0.1	m: 36.9-121 f: 17.3-59.7	3.0-15.0	<15	<4.5

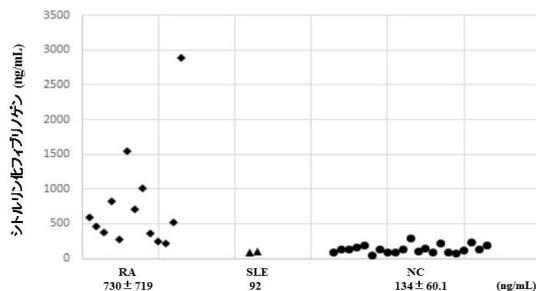


図2. 抗原量の分布

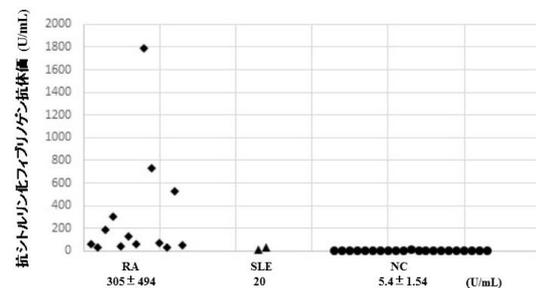


図3. 抗体量の分布

### 5) RA 関連検査項目との比較

抗原量、抗体量とそれぞれの検査項目との相関をみたところ、抗原量と CRP ( $r=0.84$ ) (図 4)、抗原量と RF ( $r=0.72$ ) (図 5) に高い相関が認められた。抗 CCP 抗体濃度測定は業者に委託したが測定限界濃度が 500 または 300U/mL であり、抗原量、抗体量との正確な相関は求められなかった。しかし上限値をそのまま測定値とした場合、抗体量との相関係数は  $r=0.63$  となった(図 6)。一方それ以外の項目と抗原量および抗体量、また抗原量と抗体量の両者間には良好な相関は認められなかった。

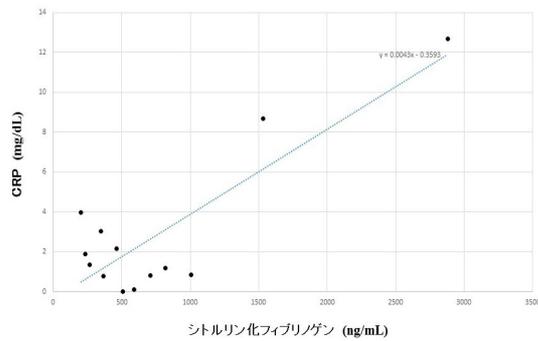


図 4 . 抗原量と CRP ( $r=0.84$ )

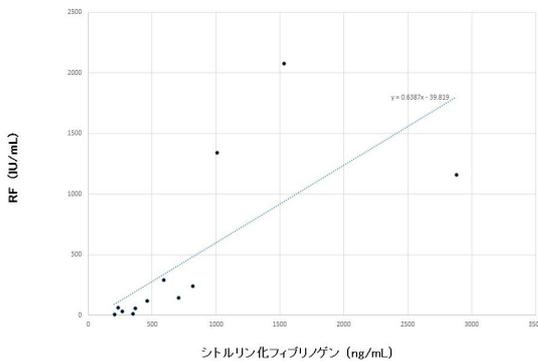


図 5 . 抗原量と RF ( $r=0.72$ )

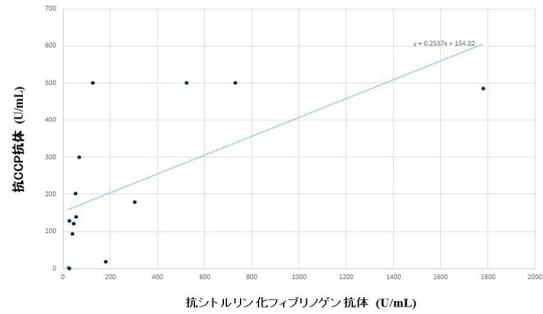


図 6 . 抗体量と抗 CCP 抗体 ( $r=0.63$ )

### 6) RA におけるシトルリン化フィブリノゲンと抗体価の感度、特異度

抗原量は健常対照群 21 例では 47 - 291ng/ml (平均:  $134 \pm 60.1$ ng/mL)であったが、サンプル数は少なく、正規分布していないことからノンパラメトリック法により高値の 2.5%を除いた値を正常上限とすると 254 ng/mL となった。これをカットオフ値とすると、RA 患者では 13 例中 204 と 236ng/mL の 2 例を除く 11 例が陽性、SLE 患者 2 例は 87 と 97ng/mL で陰性、健常対照群では 21 例中 291ng/mL の 1 例を除く 20 例が陰性となり、感度は 84.6% (11/13)、SLE 患者と健常者を合わせた非 RA 群 23 例から求めた特異度は 95.7% (22/23) となった。

抗体価は健常対照群では 4.0 - 10.9U/mL (平均:  $5.4 \pm 1.54$ U/mL)であった。抗原量と同様に正常上限値を求めると 8.5U/mL となった。これをカットオフ値とすると、RA 患者では 13 例中 13 例が陽性、SLE 患者 2 例は 13 と 27U/mL で陽性、正常対照群では 21 例中 10.9U/mL を除く 20 例が陰性となり、感度は 100%(13/13)、SLE 患者と健常者を合わせた非 RA 群 23 例から求めた特異度は 87.0%(20/23)となった。

### 7) まとめ

以上、本研究では RA 患者血清中のシトルリン化フィブリノゲンおよび抗シトルリン化フィブリノゲン抗体定量ための高感度 ELISA を確立した。

しかしこの 3 年間では得られた RA の症例数が 13 例と少ないことから、今後さらに症例数を増やしてデータを積み重ね、正確度、精度を高めていく必要がある。RA の早期診断は治療方針の選択や患者の予後にとって重要である。シトルリン化フィブリノゲンおよび抗シトルリン化フィブリノゲン抗体と病態との関連は今後引き続き検討する課題であるが、抗原、抗体ともに発症早期から血中に出現することが考えられ、RA 関連検査項目に追加することにより早期診断に有用であることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

本研究成果は H27 年度の研究で得られたため、今の時点での発表はない。  
今年度中に日本国内での学会発表と論文投稿をするために現在、準備を進めている。

## 6 . 研究組織

### ( 1 ) 研究代表者

寺澤文子 (Terasawa Fumiko)

北陸大学教授

研究者番号: 40109210

### ( 2 ) 研究分担者

奥村伸生

信州大学医学部教授

研究者番号: 60252110

石井 亘

信州大学医学部講師

研究者番号: 80452142