

平成30年6月7日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09522

研究課題名(和文) 関節リウマチの新しい予防・治療法確立への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to establish new preventive and therapeutic methods for rheumatoid arthritis

研究代表者

小澤 龍彦 (Tatsuhiko, Ozawa)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：10432105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ患者由来の自己抗体であるCCP-Ab1が認識する非変性状態のタンパク質を探索した。その結果、CCP-Ab1は非変性状態のフィブリノーゲンと結合することが示された。さらにCCP-Ab1のアミノ酸配列を、変異が起こる前の生殖細胞の配列に戻し結合性を確認した結果、フィブリノーゲンとの結合しなくなることが示された。これらの結果よりCCP-Ab1は、B細胞の成熟が進んで抗体が変異することで、フィブリノーゲンと偶発的に結合する能力を獲得したと示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify for non-denaturing proteins recognized by CCP-Ab1, an autoantibody derived from rheumatoid arthritis patients. Our findings demonstrated that a monoclonal ACPA (CCP-Ab1) bound to fibrinogen under native conditions. Next, we made the amino acid sequences of CCP-Ab1 revert to their germline sequences (CCP-Ab1 GL-rev) and analyzed its binding activity to the fibrinogen. CCP-Ab1 GL-rev did not bound to fibrinogen. These results suggested that CCP-Ab1 was generated by the stimulation of B-cells with citrullinated denatured protein and it acquired the reactivity to fibrinogen during B-cell differentiation by somatic hypermutation.

研究分野：抗体工学

キーワード：モノクローナルACPA 関節リウマチ シトルリン化 ISAAC法 フィブリノーゲン

1. 研究開始当初の背景

天然アミノ酸であるシトルリンを含む環状ペプチド(cyclic citrullinated peptide; CCP)に対する抗体(anti-citrullinated protein antibodies; ACPA)は、関節リウマチ(RA)患者に特異的に出現する自己抗体である。その自己抗原を同定することで ACPA の誘導メカニズムや RA との病態を考察する研究が進められている。しかしながら同定できる自己抗原は用いた患者サンプルなどの中に限られること、またこれまでの研究では患者血清由来のポリクローナル ACPA を用いており、ポリクローナル抗体に起因する特異性が低いことから未だ不明瞭な点が多く、特異性が高いモノクローナル ACPA で解析することが求められている。

2. 研究の目的

ACPA は RA の診断に重要である。また、ACPA は RA 発症前に出現することから、ACPA は RA の発症機序に深く関与すると推定されているが、その分子機序は不明である。我々は、独自に単離したモノクローナル ACPA、CCP-Ab1 を用いて、その抗原を同定し、ACPA がどのように誘導されたのかを考察することを目的とした。

3. 研究の方法

CCP-Ab1 は、そのエピトープである TXGRSRGR (X=シトルリン)に類似したエピトープをもつ様々なヒトタンパク質と、結合することが明らかになっている。そこで、細菌やウイルス、植物などのタンパク質で、TXGRSRGR に類似したエピトープをもつタンパク質を、BLASTにより検索した。このリコンビナントタンパク質を作製し、シトルリン化処理を行った後、SDS-PAGE、ウエスタンブロットを行った。

CCP-Ab1 と結合する生体内のネイティブタンパク質を同定するために、血漿を Blue Native PAGE により分離し、ウエスタンブロットを行った。ウエスタンブロットで結合し

た目的分子量位置のゲルを切り出し、その質量分析を行った。質量分析にて見出された候補抗原が、CCP-Ab1 と確かに結合するかをウエスタンブロットや ELISA により検証した。

4. 研究成果

(1) CCP-Ab1 と結合する細菌、ウイルス、植物由来タンパク質の同定

CCP-Ab1 のエピトープである TXGRSRGR に類似したアミノ酸配列を持つ細菌やウイルス、植物などのタンパク質を BLAST にて検索した結果、3,000 種類以上のタンパク質が同定された。これらタンパク質の幾つかを *in vitro* で合成してウエスタンブロットにより結合性を確認したところ、いずれもシトルリン化処理特異的に CCP-Ab1 と結合することが示された(図 1)。これらの結果より、CCP-Ab1 はヒト由来のタンパク質だけでなく、細菌やウイルス、植物など環境に存在する様々なシトルリン化タンパク質とも結合することが明らかになった。

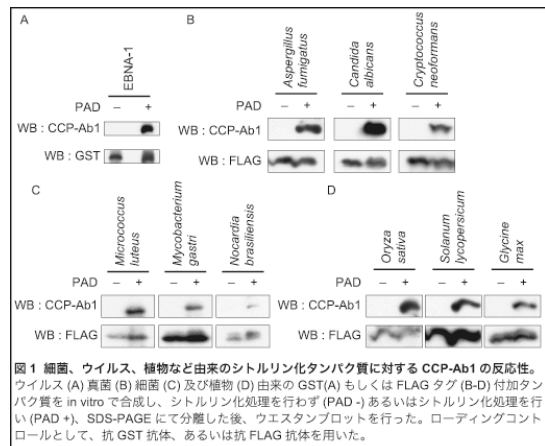


図1 細菌、ウイルス、植物など由来のシトルリン化タンパク質に対する CCP-Ab1 の反応性。ウイルス (A) 真菌 (B) 細菌 (C) 及び植物 (D) 由来の GST (A) もしくは FLAG タグ (B-D) 付加タンパク質を *in vitro* で合成し、シトルリン化処理を行わず (PAD-) あるいはシトルリン化処理を行い (PAD+)、SDS-PAGE にて分離した後、ウエスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして、抗 GST 抗体、あるいは抗 FLAG 抗体を用いた。

(2) CCP-Ab1 と結合する生体内のネイティブなタンパク質の同定

CCP-Ab1 と結合する生体内のネイティブタンパク質を同定するために、健康人、及び RA 患者由来の血漿を Blue Native PAGE により分離し、CCP-Ab1 にてウエスタンブロットを行った。その結果、ネイティブな状態においては、高分子量領域において結合するタンパク質が確認された(図 2A)。一方で、変性状態にして SDS-PAGE により分離した血漿では、CCP-Ab1 と結合するタンパク質は見出されな

かった(図 2B)。これらの結果より、CCP-Ab1 と結合するネイティブな状態のタンパク質が、血漿中に存在することが示された。

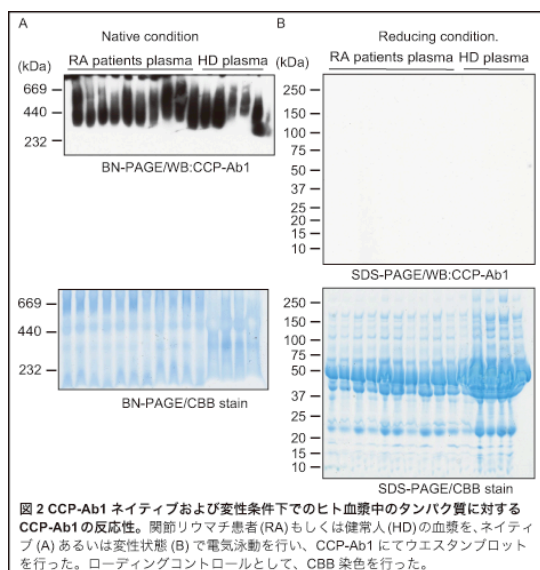


図 2 CCP-Ab1 ネイティブおよび変性条件下でのヒト血漿中のタンパク質に対する CCP-Ab1 の反応性。関節リウマチ患者 (RA) もしくは健康人 (HD) の血漿を、ネイティブ (A) あるいは変性状態 (B) で電気泳動を行い、CCP-Ab1 にてウエスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして、CBB 染色を行った。

ネイティブな状態で見出されたタンパク質を同定するために、健康人由来の血漿を Blue Native PAGE により分離した後、該当部分の位置のゲルを切り出し、質量分析を行った。その結果、フィブリノーゲンなどのペプチドが同定された。これらの結果より、CCP-Ab1 と結合する非変性タンパク質として、フィブリノーゲンが 1 つの候補として同定された。

CCP-Ab1 がフィブリノーゲンと結合するかを検証するために、始めに健康人より血漿と血清を分離し、Blue Native PAGE 後に CCP-Ab1 にてウエスタンブロットを行った。フィブリノーゲンが残っている血漿では、高分子量領域において結合するタンパク質が確認された。一方、フィブリノーゲンが除去された血清では、結合するタンパク質は確認されなかった(図 3A)。これらの結果より、CCP-Ab1 はフィブリノーゲンと結合することが示唆された。次に、精製フィブリノーゲンを用いて、CCP-Ab1 と結合するかを ELISA に

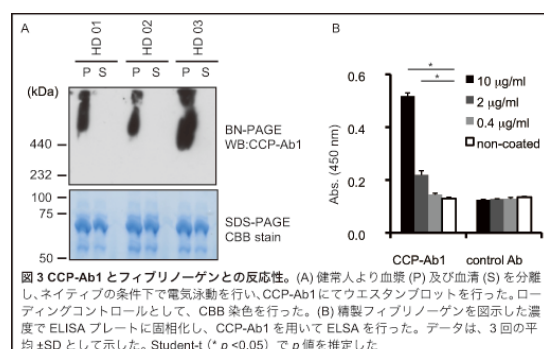


図 3 CCP-Ab1 とフィブリノーゲンとの反応性。(A) 健康人より血漿 (P) 及び血清 (S) を分離し、ネイティブの条件下で電気泳動を行い、CCP-Ab1 にてウエスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして、CBB 染色を行った。(B) 精製フィブリノーゲンを図示した濃度で ELISA プレートに固相化し、CCP-Ab1 を用いて ELISA を行った。データは、3 回の平均 \pm SD として示した。Student-t ($*p < 0.05$) で p 値を推定した。

て検証した結果、確かに結合することが示された(図 3B)。これらの結果より、CCP-Ab1 はフィブリノーゲンと結合することが明らかとなった。

(3) CCP-Ab1 がどのように誘導されたか

最後に CCP-Ab1 のアミノ酸配列を、変異が起こる前の生殖細胞の配列に戻した CCP-Ab1 (CCP-Ab1 GL-rev) を作製し、その結合性を確認した。その結果、CCP-Ab1 GL-rev はフィブリノーゲンと結合しなくなることが示された(図 4)。

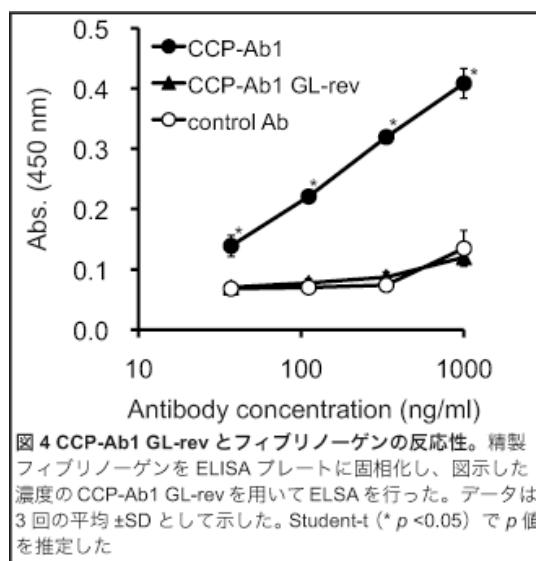


図 4 CCP-Ab1 GL-rev とフィブリノーゲンの反応性。精製フィブリノーゲンを ELISA プレートに固相化し、図示した濃度の CCP-Ab1 GL-rev を用いて ELSA を行った。データは、3 回の平均 \pm SD として示した。Student-t ($*p < 0.05$) で p 値を推定した。

CCP-Ab1 は多数の変性タンパク質と結合することが示されており、さらに非変性タンパク質とも結合することが示された。これらの結果は、変性タンパク質の刺激によって B 細胞の成熟が進み、フィブリノーゲンとも偶発的に結合する能力を獲得したと示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Tanaka T, Zhou Y, Ozawa T, Okizono R, Banba A, Yamamura T, Oga E, Muraguchi A, Sakurai H (2018) Ligand-activated epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling governs endocytic trafficking of unliganded receptor monomers by non-canonical phosphorylation. *J Biol Chem* 293: 2288-2301 (査読あり)

DOI : 10.1074/jbc.M117.811299

2. Shitaoka K, Hamana H, Kishi H, Hayakawa Y, Kobayashi E, Sukegawa K, Piao X, Lyu F, Nagata T, Sugiyama D, Nishikawa H, Tanemura A, Katayama I, Murahashi M, Takamatsu Y, Tani K, [Ozawa T](#), Muraguchi A (2018) Identification of Tumoricidal TCRs from Tumor-Infiltrating Lymphocytes by Single-Cell Analysis. **Cancer Immunol Res** 6: 378-388 (査読あり)
DOI : 10.1158/2326-6066.CIR-17-0489
3. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, [Ozawa T](#), Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S (2017) Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. **Blood** 129: 2908-2916 (査読あり)
DOI : 10.1182/blood-2016-11-752378
4. Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Tamai T, Hamana H, [Ozawa T](#), Kishi H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Muraguchi A, Kaneko S (2017) Association Between High-Avidity T-Cell Receptors, Induced by alpha-Fetoprotein-Derived Peptides, and Anti-Tumor Effects in Patients With Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology** 152: 1395-1406 e1310 (査読あり)
DOI : 10.1053/j.gastro.2017.02.001
5. Lo CY, Strobl SL, Dunham K, Wang W, Stewart L, Mispion JA, Garcia M, Gao J, [Ozawa T](#), Price GE, Navidad J, Gradus S, Bhattacharyya S, Viboud C, Eichelberger MC, Weiss CD, Gorski J, Epstein SL (2017) Surveillance Study of Influenza Occurrence and Immunity in a Wisconsin Cohort During the 2009 Pandemic. **Open Forum Infect Dis** 4: ofx023 (査読あり)
DOI : 10.1093/ofid/ofx023
6. Guo L, Sun X, Hao Z, Huang J, Han X, You Y, Li Y, Shen M, [Ozawa T](#), Kishi H, Muraguchi A, Jin A (2017) Identification of Novel Epitopes with Agonistic Activity for the Development of Tumor Immunotherapy Targeting TRAIL-R1. **J Cancer** 8: 2542-2553 (査読あり)
DOI : 10.7150/jca.19918
7. Piao X, [Ozawa T](#), Hamana H, Shitaoka K, Jin A, Kishi H, Muraguchi A (2016) TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. **Oncoimmunology** 5: e1131380 (査読あり)
DOI : 10.1080/2162402X.2015.1131380
8. Kawasaki Y, Sakimura A, Park CM, Tomaru R, Tanaka T, [Ozawa T](#), Zhou Y, Narita K, Kishi H, Muraguchi A, Sakurai H (2016) Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain. **Sci Rep** 6: 31502 (査読あり)
DOI : 10.1038/srep31502
9. Hao Z, Han X, Sun X, Shen M, Huang J, Li Y, [Ozawa T](#), Pang D, Jin S, Kishi H, Muraguchi A, Jin A (2016) Fully human monoclonal antibodies to TRAIL-R1 enhance TRAIL-induced apoptosis via activation of caspase-8 pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 475: 238-244 (査読あり)
DOI : 10.1016/j.bbrc.2016.05.089
10. Hamana H, Shitaoka K, Kishi H, [Ozawa T](#), Muraguchi A (2016) A novel, rapid and efficient method of cloning functional antigen-specific T-cell receptors from single human and mouse T-cells. **Biochem Biophys Res Commun** 474: 709-714 (査読あり)
DOI : 10.1016/j.bbrc.2016.05.015
11. Tsuda R, [Ozawa T](#), Kobayashi E, Hamana H, Taki H, Tobe K, Sugiyama E, Iwamoto M, Imura J, Kishi H, Muraguchi A (2015) Monoclonal Antibody Against Citrullinated Peptides Obtained From Rheumatoid Arthritis Patients Reacts With Numerous Citrullinated Microbial and Food Proteins. **Arthritis Rheumatol** 67: 2020-2031 (査読あり)
DOI : 10.1002/art.39161
12. Takeda H, Ogasawara T, [Ozawa T](#), Muraguchi A, Jih PJ, Morishita R, Uchigashima M, Watanabe M, Fujimoto T, Iwasaki T, Endo Y,

Sawasaki T (2015) Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. **Sci Rep** 5: 11333 (査読あり)

DOI : 10.1038/srep11333

13. Simhadri VR, Dimitrova M, Mariano JL, Zenarruzabeitia O, Zhong W, Ozawa T, Muraguchi A, Kishi H, Eichelberger MC, Borrego F (2015) A Human Anti-M2 Antibody Mediates Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) and Cytokine Secretion by Resting and Cytokine-Preactivated Natural Killer (NK) Cells. **PLoS one** 10: e0124677 (査読あり)
DOI : 10.1371/journal.pone.0124677

[学会発表] (計 41 件)

1. 小澤龍彦, 津田玲奈, 浜名洋, 小林栄治, 多喜博文, 戸邊一之, 村口篤, 岸裕幸 (2017) 関節リウマチ患者由来自己抗体が認識する非変性状態の抗原の同定と自己抗体誘導仮説. **2017年度生命科学系学会合同年次大会**
2. Ozawa T, Tsuda R, Hamana H, Kobayashi E, Taki H, Muraguchi A, Kishi H (2017) Evolution of anti-citrullinated peptide antibody (ACPA): analysis of autoantigen under native condition using a human monoclonal ACPA. **第46回日本免疫学会学術集会**
3. 小澤龍彦, 岸裕幸, 浜名洋, 田尻和人, 呂福蓮, 村口篤 (2016) ISAAC法を用いた抗原特異的T細胞検出法の開発. **第39回日本分子生物学会年会**
4. Ozawa T, Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Muraguchi A (2016) Single-T-cell manipulation method using microwell array chip (T-ISAAC) allows rapid and efficient cloning of antigen-specific TCRs. **第45回日本免疫学会学術集会**
5. Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. (2016) Rapid generation of monoclonal antibodies using lymphocyte-microarray chip. **第68回日本生物工学会大会国際シンポジウム**

6. Ozawa T, Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Lyu F, Muraguchi A (2016) A rapid and efficient single-cell manipulation method using microwell array chip (ISAAC) technology for screening antigen-specific cytokines-secreting T-cells. **2016 International Congress of Immunology**

7. 小澤龍彦, 津田玲奈, 浜名洋, 多喜博文, 戸邊一之, 杉山英二, 岩本雅弘, 井村穰二, 岸裕幸, 村口篤 (2015) ISAAC法を用いた関節リウマチ患者由来自己抗体の単離とその自己抗体が認識する新しい自己抗原の同定. **第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会**
8. Ozawa T, Tsuda R, Hamana H, Taki H, Kishi H, Muraguchi A (2015) Reactivity of a monoclonal anti-citrullinated protein antibody obtained from RA patient with numerous citrullinated antigens. **第44回日本免疫学会総会・学術集会**

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immuno/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 龍彦 (OZAWA, Tatsuhiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教

研究者番号 : 1 0 4 3 2 1 0 5

(2) 連携研究者

加藤 龍一 (KATO, Ryuichi)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器
研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号 : 5 0 2 4 0 8 3 3