

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659274

研究課題名(和文) 蛋白アレイを用いた関節リウマチの新たな抗シトルリン化蛋白抗体の網羅的検索

研究課題名(英文) Screening of novel anti-citrullinated protein antibodies for rheumatoid arthritis by protein array

研究代表者

大村 浩一郎 (Ohmura, Koichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40432372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗CCP抗体)は関節リウマチ(RA)の特異的自身抗体であるが、早期RAの約半数は抗CCP抗体陰性であり、診断がしばしば困難であるため抗CCP抗体陰性RAの特異的な診断マーカーが求められている。今回我々はAlphaScreen法と呼ばれる自身抗体の網羅的スクリーニング法を用いて抗CCP抗体陰性RA血清中にみられる未知のシトルリン化蛋白抗体のスクリーニングを行った。2000種類あまりのシトルリン化蛋白のうち、14個の未知のシトルリン化蛋白に対する反応がみられ、そのうち2個が頻度は少ないながら新規自身抗体であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody is a specific autoantibody against rheumatoid arthritis (RA). However, it becomes positive in only about 50% of early RA patients, and sometimes it is difficult to correctly diagnose RA in the early phase. Therefore, the diagnostic biomarkers for anti-CCP antibody-negative RA have been required. We screened the anti-CCP antibody-negative RA sera for novel anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) using AlphaScreen method. We found 14 novel anti-citrullinated protein antibodies from over 2,000 citrullinated proteins, out of which 2 were assured by Western blotting and ELISA.

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：免疫血清学 抗CCP抗体 ACPA 関節リウマチ バイオマーカー 抗CCP抗体陰性RA AlphaScreen法 蛋白アレイ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は 30-40 歳台に発症のピークをもつ慢性の破壊性関節炎を特徴とし、治療の遅れが関節の破壊・変形につながるため、早期診断・早期治療が重要であり、その観点から 2010 年に RA の診断基準が 23 年ぶりに改訂された。この診断基準においても、リウマトイド因子 (RF) とならんで近年みつかった新たな特異性の高い自己抗体、抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) が重視されているが、その半面、RF 陰性、抗 CCP 抗体陰性の RA は診断に苦慮することになる。抗 CCP 抗体は RA の約 80% にみられるが、発症 1 年以内では感度が 50% 程度である。そのため、抗 CCP 抗体陰性 RA の診断ツールの開発が期待されている。

抗 CCP 抗体の対応抗原はシトルリン化された Fillaggrin, vimentin, fibrinogen, alpha-enolase, type II collagen など多くの蛋白が含まれている。近年我々は RA の感受性遺伝子として myelin basic protein (MBP) を同定し、また RA 患者の約 65% に抗 MBP 抗体が存在すること、対応抗原は主にシトルリン化された MBP であることを報告した (Terao et al. PLoS One. 2011;6:e20457)。同時に抗 CCP 抗体 (-) RA 血清でも約 50% が抗 MBP 抗体陽性であると報告し、抗 CCP 抗体 (-) RA 血清中にも新たなシトルリン化抗体が存在することも明らかにした。

そこで我々は愛媛大学無細胞生命科学工学センターと共同研究を始め、抗 CCP 抗体陰性 RA 血清中の新たな自己抗体のスクリーニングを開始した。愛媛大学無細胞生命科学工学センターは無細胞蛋白合成にコムギ胚芽抽出液を用いることで蛋白合成の効率を飛躍的に上昇させ、様々な蛋白アレイを開発してきた。また、AlphaScreen 法という非常に巧妙な自己抗体のスクリーニング法を開発した。我々も 2000 種類以上の蛋白アレイを用いて抗 CCP 抗体陰性 RA 血清中に少なくとも数種類の新たな自己抗体を発見し、解析中である。

今回我々は同じ蛋白アレイをシトルリン化しスクリーニングすることで、未同定の抗シトルリン化抗体を同定することをめざした。

2. 研究の目的

抗 CCP 抗体 (-) RA 患者血清中の新規抗シトルリン化蛋白抗体を同定し、特異性を明らかにし、RA の診断に有用な自己抗体を発見する。

3. 研究の方法

自己抗体のスクリーニングには AlphaScreen 法を用いた。AlphaScreen 法は愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターにて開発された無細胞合成蛋白質アレイによる自己抗体検索スクリーニング法であり、2 つのビーズが近接したときのみレーザーを

当てると化学発光するシステムで、本研究では Strepto-Avidin をコートした donor beads と protein A をコートした acceptor beads を用いる。患者血清をあらかじめ Protein A コートした acceptor beads と反応させておき、準備しておいたビオチン化蛋白と donor beads を加え、その蛋白と反応する自己抗体が血清に含まれていればビーズが近接し発光するという方法である。

最初は抗 CCP 抗体陰性かつ RF 陰性で X 線典型的な骨破壊像を認める RA 患者血清 8 検体を用いて小規模の native 蛋白 (243 蛋白) に対する自己抗体のスクリーニングを行った。次に 2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーにて、3 例の抗 CCP 陰性 RA、4 例の抗 CCP 抗体陽性 RA、3 例の健常人の血清を用いて、native 蛋白、シトルリン化蛋白に対する自己抗体をスクリーニングした。

4. 研究成果

243 種の native 蛋白 (予備実験において RA 血清に反応することがわかっている) を用いて AlphaScreen 法にて 8 人の抗 CCP 抗体陰性 RA 血清中の自己抗体を検索し 6 蛋白が候補として上がった。しかしながら、ELISA の系を組み、健常人、SLE 患者、抗 CCP 抗体陽性 RA で反応性を確認すると、いずれも健常人にも反応する抗体であることが判明した。ABCF1、RPL29 の結果を図 1 に示す。

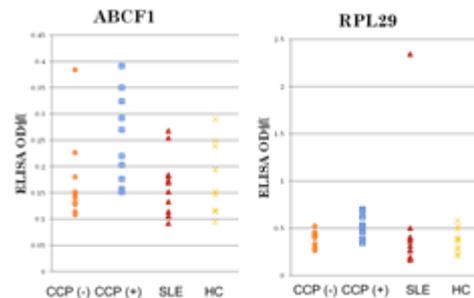


図 1 . RA, SLE, 健常人における ABCF1, RPL29 に対する抗体価。抗 CCP 抗体陰性 RA (CCP (-)), 抗 CCP 抗体陽性 RA (CCP (+)), SLE、健常人 (HC) 各 10 名の血清中の抗 ABCF1 抗体、抗 RPL29 抗体価を ELISA 法にて測定した。

このことは、逆に健常人の自己抗体を detect できるほど AlphaScreen 法の感度が非常に高いことを示すと同時に、コントロールとして健常人血清をおくことの重要性を表している。

そこで、次の実験では比較的関節破壊の強い 3 例の抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清と、対照として 4 例の抗 CCP 抗体陽性 RA および 3 例の健常人血清を用いて、2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーにて AlphaScreen を行った。この際、native 蛋白に対する反応をみるのと同時に、未知のシトルリン化蛋白に対する自己抗体のスクリーニングを行った。シ

トルリン化蛋白のライブラリーは 2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーを一斉に PAD もちいて、シトルリン化することで得られた。ここでは未知のシトルリン化蛋白に対する抗体の結果を示す。

実験ごとに AlphaScreen の OD 値のベースが多少異なるため、実験毎で各血清に対応する mock (20 well 以上) の OD 値を基に mean + 3SD を cut-off 値として設定した。抗 CCP 抗体陽性 RA 血清では明らかにシトルリン化蛋白に対する反応が強く、抗 CCP 抗体陽性 RA 血清 (4 検体) で陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 186 個、それに対して、抗 CCP 抗体陰性 RA 血清 (3 検体) では陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 14 個のみであり、健常人血清 (3 検体) では陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 9 個であった (表 2)。

表 2 2181 個のシトルリン化蛋白中、自己抗体が検出された蛋白数

| 検体 (血清) | 陽性蛋白数 |
|-----------------|-------|
| 抗 CCP 抗体 (+) RA | 186 |
| 抗 CCP 抗体 (-) RA | 14 |
| 健常人 | 9 |

抗 CCP 抗体陰性 RA 血清で比較的高い OD 値を示し、健常人血清では陰性であった候補タンパクを 3 つ選び validation study を行った。まずは Western blot によりシトルリン化候補タンパクに対する自己抗体であることを確認した。蛋白 に対する反応を図 2 に示す。

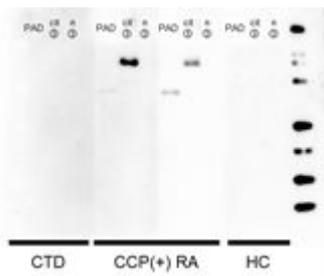


図 2 シトルリン化候補タンパク に対する自己抗体

候補タンパク とそのシトルリン化したタンパク、またシトルリン化した際に用いた酵素の PAD を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写したのち、抗 CCP 抗体陽性患者血清 2 検体、膠原病患者血清 1 検体 (CTD)、健常人血清 1 検体 (HC) と反応させ、Western Blot を行った。native 蛋白のバンドはないが、シトルリン化蛋白に対するバンドが強く認められる。抗 CCP 抗体 (+) RA 患者血清は PAD に対する抗体も弱く認められている。

さらに、抗 CCP 抗体 (-) RA 血清のうち 1 検体でも高い OD 値を示し、健常人では陰性であった蛋白を 3 個選び、ELISA 法にて抗 CCP 抗体 (+) RA 患者 30 例、抗 CCP 抗体 (-) RA 患者

30 例、他の膠原病患者 22 例、健常人 20 例を用いて、非シトルリン化蛋白およびシトルリン化蛋白に対する陽性率を検討した。蛋白 に対する結果を図 3 と図 4 に示す。

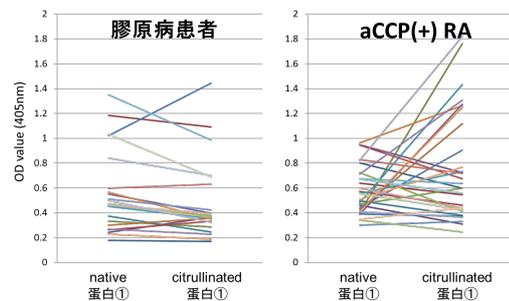


図 3 native およびシトルリン化蛋白 に対する抗体価

膠原病患者 22 例、抗 CCP 抗体 (+) RA 患者 30 例の native 蛋白 とそのシトルリン化した蛋白 に対する抗体価を OD 値で示し、同じ患者血清を直線で結んだ。

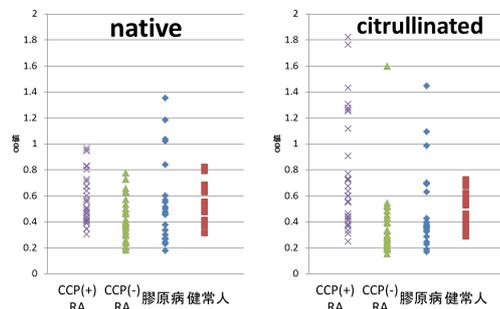


図 4 各疾患、健常人での抗蛋白 抗体価
抗 CCP 抗体 (+) RA 患者 30 例、抗 CCP 抗体 (-) RA 患者 30 例、他の膠原病患者 22 例、健常人 20 例の native 蛋白 とそのシトルリン化した蛋白 に対する抗体価を OD 値で示す。

図 3 より膠原病患者の陽性例は主に native 蛋白に対する抗体で、RA 患者陽性例はシトルリン化蛋白に対する抗体であることがわかる。図 4 で抗 CCP 抗体 (-) RA 患者 30 例中 1 例に抗シトルリン化蛋白 抗体が認められたため、スクリーニングに用いた血清 3 例を加えると 33 例中 2 例で陽性ということになる。同様に蛋白、蛋白 とそのシトルリン化した蛋白に対する自己抗体価を ELISA で確認した。シトルリン化蛋白 に対する自己抗体は抗 CCP 抗体陰性 RA 30 例中 1 例に認められたが、これは native 蛋白に対する抗体であった。シトルリン化蛋白 に対する抗体は 30 例の抗 CCP 抗体 (-) RA 患者血清中には認められなかった。

AlphaScreen 法にて抗 CCP 抗体陰性 RA にみられる自己抗体を検索した。健常人にみられた陽性シグナルが Western Blot (data not shown) や ELISA (図 1) にても確認できたこ

とは AlphaScreen 法が高い感度を有していることを表している。AlphaScreen 法の利点を列記すると

1. 同時に多数の自己抗体をスクリーニングできる
2. 他のスクリーニング方法と異なり、陽性シグナルを示す蛋白が既知であるため、蛋白同定の手間が必要ない
3. 同時に蛋白の翻訳後修飾を行うことができる

となるが、特に 3 の特徴を生かして一斉に蛋白シトルリン化をすることで、未知のシトルリン化蛋白抗体をスクリーニングすることができた。この方法の有効性が表 2 に示す通り、抗 CCP 抗体陽性 RA 患者血清で多くのシトルリン化蛋白抗体を検出したことから理解できる。抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清に反応するシトルリン化蛋白は少ないが存在し(図 4) 蛋白 のように 33 例中 2 例であっても、同様の蛋白を複数見つけ組み合わせることで、抗 CCP 抗体陰性 RA 中の抗シトルリン化蛋白抗体をみつけ、診断能の向上が期待できる。今回はスクリーニング後の validation として 3 蛋白しか検討できていないため、今後さらに確認作業を行うことで、診断に有用な自己抗体を見つけることができると考えられる。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

- 1) Cui J, Stahl EA, Ohmura K, Plenge R, et al.(56 人中 18 番目) Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis. **PLoS Genet.** 2013, 9: e1003394 査読あり
- 2) Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. **PLoS One.** 2013, 8: e62231 査読あり
- 3) Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Ohmura K et al.(19 人中 12 番目). Functional Variants in NFKB1E and RTKN2 Involved in Activation of the NF- B Pathway Are Associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese. **PLoS Genet.** 2012 Sep;8(9):e1002949 査読あり
- 4) Ohmura K, Terao C, Mimori T. Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future. *Inflamm Regen* 2012, 32 (3): 90-98. 査読あり
- 5) Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, et al. (21 人中 2 番目) ACPA-negative RA

consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. **PLoS One.** 2012;7(7): e40067 査読あり

- 6) Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, et al.(51 人中 5 番目) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. **Nat Genet.** 2012, 44(5): 511-6 査読あり

[学会発表](計 5 件)

- 1) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Does anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody-negative rheumatoid arthritis (RA) become anti-CCP positive RA? 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013 年 (京都) 国際ワークショップ (oral presentation)
- 2) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Clinical characteristics of rheumatoid factor-positive or -negative subsets of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013 (poster presentation).
- 3) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Only rheumatoid factor-positive subset of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis seroconverts to anti-citrullinated peptide/protein antibody positive. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013 (poster presentation).
- 4) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: ACPA-NEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS CONSISTS OF TWO GENETICALLY DISTINCT SUBSETS BASED ON RF POSITIVITY. European League Against Rheumatism 2012, Berlin, June. 2012. (poster presentation)
- 5) 大村浩一郎: 抗 CCP 抗体陰性関節リウマチに関連する遺伝因子。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 東京 (品川) シンポジウム (oral presentation)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 浩一郎 (OHMURA Koichiro)
京都大学大学院医学研究科・講師
研究者番号：40432372

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

澤崎 達也 (SAWASAKI Tatsuya)
愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター・准教授
研究者番号：50314969