

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19591

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるオートファジーとシトルリン化抗原提示との関連

研究課題名(英文) Autophagy and Presentation of Citrullinated Antigen in Rheumatoid Arthritis

研究代表者

加藤 将 (Kato, Masaru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10755896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、滑膜線維芽細胞がIFN- $\gamma$ の存在下でMHC class IIおよび共刺激分子を発現すること、滑膜線維芽細胞内のシトルリン化ビメンチンが抗シトルリン化ペプチド抗体の対応抗原であること、シトルリン化ビメンチンがMHC class IIと結合していること、シトルリン化ビメンチンがオートファジーの誘導、阻害によりそれぞれ増加、減少することが示された。これらの結果は、滑膜線維芽細胞がオートファジーを介し抗シトルリン化ペプチド抗体の産生に寄与していることを示唆し、関節リウマチの病態、特に自己免疫形成における新たな知見である。

研究成果の概要(英文)：This study has clarified that (1) synovial fibroblasts express MHC class II and costimulatory molecules upon stimulation with IFN-gamma, (2) citrullinated vimentin in synovial fibroblasts is recognized by anti-citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients, (3) citrullinated vimentin binds to MHC class II, and (4) citrullinated vimentin is increased by the induction of autophagy while it is decreased by autophagy inhibition. These results are novel findings in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, particularly in its autoimmunity, and suggest a role of synovial fibroblasts in the production of anti-citrullinated peptide antibodies through autophagy.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ オートファジー シトルリン化 抗原提示 ビメンチン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibody; ACPA) は関節リウマチにおいて特異的に検出される自己抗体で、現在、関節リウマチの診断に応用されている。ACPA は関節リウマチの発症に先立って検出され、ACPA 陽性患者の関節予後は不良である。故に、ACPA は診断応用のみならず、病原性を有する自己抗体として、新たな治療標的として近年注目を集めている。喫煙、および HLA-DRB1 shared epitope が ACPA の陽性率と関連することが示されているものの、ACPA の産生機序は明らかになっていない。

(2) マクロオートファジー (以下、オートファジー) はリソソームを分解の場とする細胞内の主要な分解システムである。オートファジーは細胞内浄化や飢餓適応を主な役割としているが、細胞内タンパクから MHC class II 分子と結合するペプチドを生成し抗原提示にも関与する。近年、オートファジーが細胞内タンパク質のシトルリン化を促進することが示された。すなわち、オートファジーはシトルリン化、抗原提示と2つの機序を介し ACPA の産生に関与している可能性がある。

(3) 滑膜線維芽細胞は関節リウマチの病態において中心的役割を担っている。活性化した滑膜線維芽細胞は大量の炎症性サイトカイン、マトリックス分解酵素を産生し、関節の炎症、破壊に寄与する。近年我々は (Kato M, et al. Arthritis Rheumatol 2014)、関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞において、変形性関節症患者のそれと比較して、オートファジー活性が高いことを報告した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ACPA の産生機序を解明することを目的とした。背景の通り、近年明らかとなった関節リウマチ滑膜線維芽細胞の高いオートファジー活性、オートファジーによるシトルリン化に注目し、活性化した滑膜線維芽細胞がオートファジーを介してシトルリン化ペプチドを抗原提示している可能性を考え、検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 滑膜線維芽細胞の分離、培養

当施設の倫理委員会の承認 (臨床研究番号 008-0103) ならびに対象患者から文書による同意を得た上で、関節リウマチおよび変形性関節症に対する人工膝関節置換術を施行された患者の滑膜を使用した。滑膜から結合組織や脂肪を除去し、細かく切り刻み、type I コラゲナーゼとインキュベートし、メッシュを通し遠心分離を行い、10%FBS、ペニシリン・ストレプトマイシン含有 Iscove 's

modified Dulbecco 's medium を用い培養し、4~8 継代のものを使用した。

### (2) 血清抗シトルリン化ビメンチン抗体価の測定

上記患者の保存血清を用いて、代表的な ACPA である抗シトルリン化ビメンチン抗体の力価を ELISA 法 (Anti-MCV ELISA kit, ORGENTEC, ORG548) で測定し、20 U/mL 以上を陽性とした。

### (3) IFN- $\gamma$ による MHC class II 分子、共刺激分子の誘導

滑膜線維芽細胞を IFN- $\gamma$  (100 ng/mL) で 72 時間刺激し、細胞表面における MHC class II 分子および、T 細胞の活性化に必要な共刺激分子 B7 スーパーファミリーの発現を抗 HLA-DR 抗体、抗 B7-H1 抗体、抗 B7-H2 抗体、抗 B7-H3 抗体、抗 B7-DC 抗体、抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体を用いたフローサイトメトリ法により評価した。

### (4) ACPA が認識する細胞内抗原の同定

滑膜線維芽細胞内に ACPA の対応抗原が存在することを確認するために、滑膜線維芽細胞のライセートを抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体、抗シトルリン化ビメンチン抗体陽性患者血清を一次抗体として用いたウエスタンブロット法で評価した。さらに、このタンパク質がシトルリン化ビメンチンであることを確認するために、抗ビメンチン抗体を用いて免疫沈降を行った。

### (5) オートファジーとシトルリン化ビメンチンとの関連

滑膜線維芽細胞をプロテアソーム阻害薬 MG132 (0-10  $\mu$ M) で 24 時間、または無血清培地で 2 時間刺激し、ライセートを抗 LC3 抗体、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体を用いたウエスタンブロット法で評価した。また、オートファジー阻害剤 3-メチルアデニン (3-MA) (5 mM) の添加によりオートファジー阻害の影響を検討した。

### (6) MHC class II とシトルリン化ビメンチンとの結合の評価

滑膜線維芽細胞を IFN- $\gamma$  (100 ng/mL) で 72 時間刺激し、MHC class II の発現を誘導した状態で、抗 HLA-DR 抗体による免疫沈降を行い、抗 HLA-DR 抗体、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体を用いたウエスタンブロット法で MHC class II とシトルリン化ビメンチンの結合を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 8 名の関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞を分離した。滑膜線維芽細胞を分離した患者の患者背景は表 1 に示す。

患者番号	年齢(歳)	性別	罹病期間(年)	RF (U/mL)	抗CCP抗体価 (U/mL)	DAS28-ESR	HAQ-DI
1	78	F	5	51.7	>300	4.35	1.25
2	64	F	9	62.8	202.1	4.34	0.875
3	78	M	48	82.8	196.5	4.44	0.5
4	63	M	16	40.4	66.3	4.53	0
5	74	F	0	8	<4.5	3.83	2
6	69	M	0	34.1	45.9	2.94	0
7	67	F	0	64.8	71.2	1.46	1
8	62	F	0	20.8	9.6	1.13	0

RF: Rheumatoid factor  
 CCP: Cyclic citrullinated peptide  
 DAS28-ESR: Disease activity score 28 joint count- erythrocyte sedimentation rate  
 HAQ-DI: Health assessment questionnaire disability index

表 1. 滑膜線維芽細胞を分離した患者背景抗体が陽性であった (図 1)

(3) MHC class II、B7-H1、B7-DC の発現は IFN- の刺激により滑膜線維芽細胞表面に誘導され (図 2)

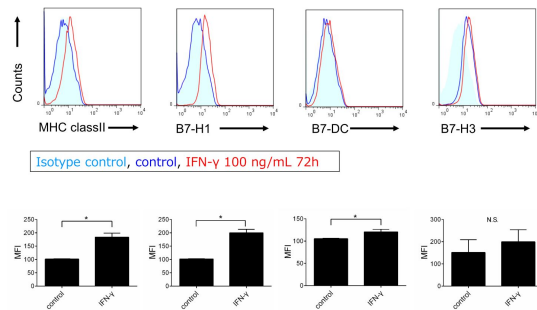


図 2. 滑膜線維芽細胞表面におけるMHC-classIIとT細胞共刺激分子の発現

B7-H3 は IFN- の刺激にかかわらず滑膜線維芽細胞表面に発現していた。滑膜線維芽細胞が MHC class II や共刺激分子を介して T 細胞に対し抗原提示細胞として機能している可能性が示唆された。

(4) 抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体、抗シトルリン化ビメンチン抗体陽性患者血清はいずれも 54 kDa の滑膜線維芽細胞内タンパク質を認識し、滑膜線維芽細胞内に ACPA の対応抗原が存在することが示唆された (図 3)

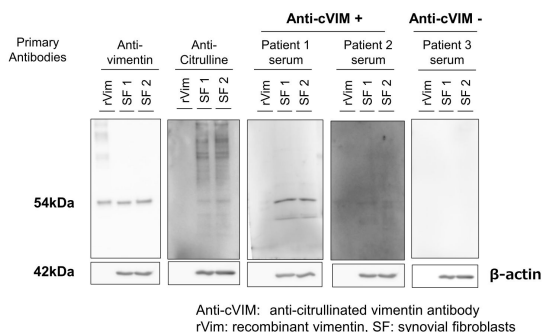


図 3. 滑膜線維芽細胞における抗シトルリン化ビメンチン抗体の対応抗原の評価

(2) (1)における患者番号 1-6 の患者血清の抗シトルリン化ビメンチン抗体価を測定し、患者 1、2、3 では抗シトルリン化ビメンチン

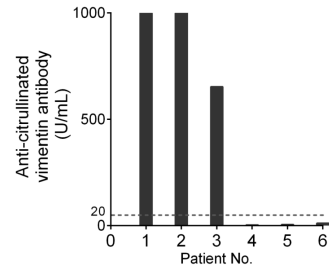


図 1. 患者血清の抗シトルリン化ビメンチン抗体価抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降法により、この 54 kDa のタンパク質がシトルリン化ビメンチンであることを確認した (図 4)

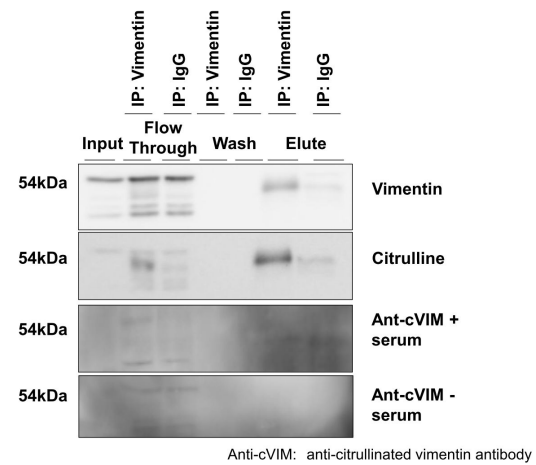


図 4. 抗ビメンチン抗体による免疫沈降法

(5) 10 μM の MG132 による刺激で、シトルリン化ビメンチンおよびオートファジー活性化のマーカである LC3-II が滑膜線維芽細胞において有意に増加した (図 5)。

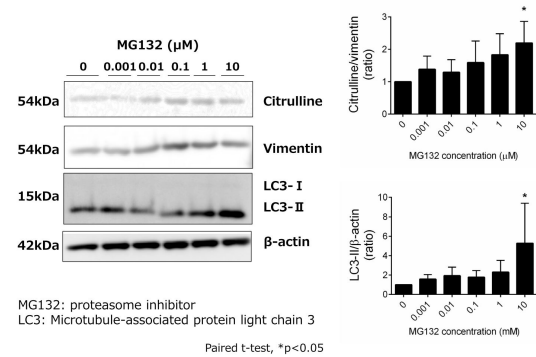


図 5. プロテアソーム阻害によるオートファジーとビメンチンのシトルリン化の関係

3-MA の添加によりオートファジーを阻害すると、ビメンチンのシトルリン化も阻害され

た(図6)。

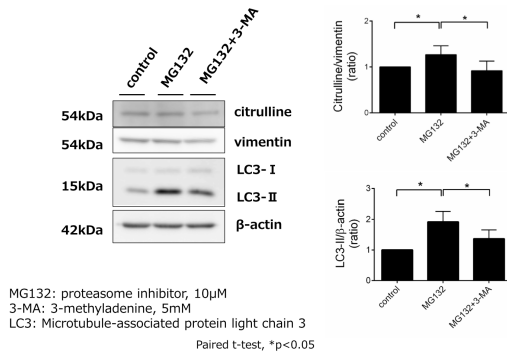


図6. オートファジー阻害とビメンチンのシトルリン化の関係

さらに、2時間の飢餓刺激でも同様に LC3-II およびシトルリン化ビメンチンが増加し(図7)。

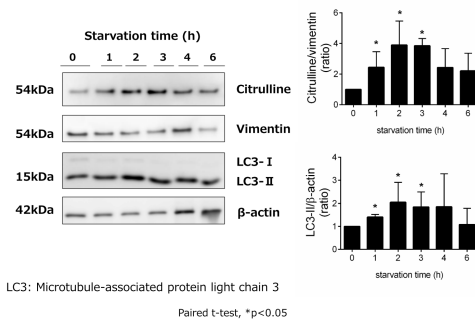


図7. 飢餓刺激によるオートファジーとビメンチンのシトルリン化の関係

3-MAによるオートファジー阻害でこの効果は阻害された(図8)。

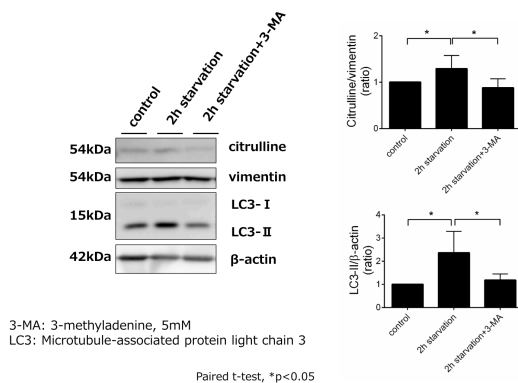


図8. オートファジー阻害とビメンチンのシトルリン化の関係

(6) 抗 HLA-DR 抗体を用いた免疫沈降法により、滑膜線維芽細胞内において HLA-DR がシトルリン化ビメンチンと結合していることを確認した(図9)。

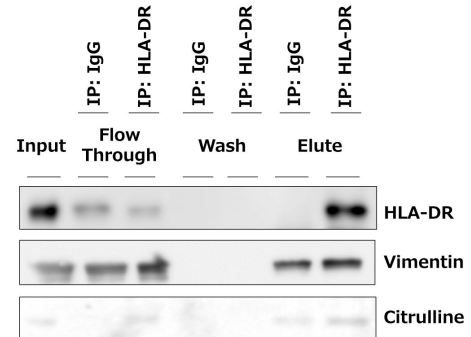


図9. HLA-DRによる免疫沈降法

## 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2件)

Kato M, Yasuda S, Atsumi T. The role of genetics and epigenetics in rheumatic diseases: Are they really a target to be aimed at? *Rheumatology International*. in press. doi: 10.1007/s00296-018-4026-0. 査読有

Kato M, Ospelt C, Kolling C, Shimizu T, Kono M, Yasuda S, Michel BA, Gay RE, Gay S, Klein K, Atsumi T. AAA-ATPase p97 suppresses apoptotic and autophagy-associated cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):64221-64232. doi: 10.18632/oncotarget.11890. 査読有

[学会発表](計4件)

Sugawara E, Kato M, Hisada R, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Yasuda S, Atsumi T. Autophagy promotes citrullination of vimentin in synovial fibroblasts. The 62nd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 26-28 Apr. 2018. Tokyo International Forum (東京) (**Japan College of Rheumatology 2018 International Concurrent Workshop Excellent Abstract Award**)

菅原恵理、加藤将、久田諒、藤枝雄一郎、奥健志、坊垣暁之、アメングアルオルガ、保田晋助、瀧美達也：「オートファジーは滑膜線維芽細胞においてビメンチン

のシトルリン化を促進する」第45回日本臨床免疫学会総会、2017年9月28-30日、京王プラザホテル(東京)

Sugawara E, Kato M, Hisada R, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Yasuda S, Amengual O, Atsumi T. Autophagy promotes citrullination of vimentin in synovial fibroblasts. The 61st Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 20-22 Apr. 2017. Fukuoka Convention Center (福岡県福岡市)

Kato M, Atsumi T. The role of ubiquitin-binding proteins in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. 8th International Forum on Rheumatoid Arthritis, 21-22 Oct. 2016. Shinagawa Prince Hotel (東京) (8th International Forum on Rheumatoid Arthritis 2016 Young Investigator Award)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[https://www.researchgate.net/profile/Masaru\\_Kato2](https://www.researchgate.net/profile/Masaru_Kato2)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

加藤 将 (KATO, Masaru)  
北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号：10755896

(2) 研究分担者  
なし

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし

研究者番号：

(4) 研究協力者  
菅原 恵理 (SUGAWARA, Eri)  
北海道大学・医学院・大学院生