

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790702  
 研究課題名（和文）関節リウマチ感受性遺伝子ペプチジルアルギニンデイミナーゼタイプ4に関する研究  
 研究課題名（英文）Study of Peptidylarginine deiminase type 4 as susceptibility gene of rheumatoid arthritis  
 研究代表者 鈴木 亜香里 (Suzuki Akari)  
 独立行政法人理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 自己免疫疾患研究チーム  
 上級研究員  
 研究者番号：00391996

## 研究成果の概要：

RA 関連遺伝子としてペプチジルアルギニンデイミナーゼタイプ4 (PADI4) 遺伝子を得た。PADI 酵素によってシトルリン化タンパクは産生され、さらにシトルリン化タンパクのいくつかは特異的自己抗原として知られている。PADI4 酵素の基質群を免疫スクリーニング法等により行い、タイプ1、タイプ2 コラーゲン、真核生物翻訳開始因子 4G1 (eIF4G1)、 $\alpha$ -エノラーゼなどを同定し、RA 発症と自己抗体産生の関連を調べたところ、RA 患者にはこれらのタンパクのシトルリン化フォームに対する抗体が存在することがわかった。また既知シトルリン化タンパクとして知られるフィブリノーゲンがシトルリン化により生理的機能が変ることなどを突き止めた。更に PADI4 遺伝子の発現が RA の発症、進行にどのように影響しているか調べるために、遺伝子改変動物として、PADI4 ノックアウトマウスを作製した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,200,000	0	2,200,000
20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病アレルギー内科学

キーワード：ペプチジルアルギニンデイミナーゼ、シトルリン化、関節リウマチ、ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

ケースコントロール関連解析法により関節リウマチ関連遺伝子として、PADI4 遺伝子を同定した。PADI4 遺伝子はタンパク質中のアルギニンをシトルリン化する酵素をコードする遺伝子として知られていたが、その機能、活性が関節リウマチにおいてどのように関係しているかははっきりしていなかった。近年、関節リウマチ患者において高率で見られる自己抗体の一つに、抗シトルリン化ペプチド抗体が存在しており、この抗原がシトルリン化されたタンパクに対する抗体であるということが知られるようになってきていた。このことから、

PADI4 はタンパク質のシトルリン化を介して関節リウマチに関与していることが示唆されたが、実際にどのような段階、どのような機序で関節リウマチに PADI4 が関わっているかは不明であった。

## 2. 研究の目的

モデル動物、ノックアウトマウスなど、実験動物を用いて、PADI4 遺伝子の生理的機能とその関節リウマチへの関与を明らかにする。自己免疫疾患に特有の自己抗体の一つとして挙げられる、抗シトルリン化ペプチド抗体はポリクローナルな抗体であり、そのターゲットとなるタンパク質はたく

さん存在していると考えられている。PADI4酵素の修飾ターゲットを免疫スクリーニング法などを用いて同定し、これらのタンパクに対する関節リウマチにおける自己抗体の有無を調べ、疾患への関与を調べる。

### 3. 研究の方法

#### 1. 免疫スクリーニング法による基質同定とその抗原性の確認

##### 1) 培養滑膜細胞、軟骨細胞を始めとするcDNAライブラリーを用いた免疫スクリーニング

培養滑膜細胞、軟骨細胞を始めとするcDNAライブラリーを用いて、免疫スクリーニングを行う(5)。ファージライブラリーを大腸菌に感染させ、タンパク質発現を誘導した後、メンブレンに写し、PADI4酵素で処理し、シトルリン化タンパク検出抗体 (anti-modified citrulline antibody) で陽性コロニーを選別し、基質遺伝子を同定する。得られた遺伝子については、タンパク精製を行い、抗原性を患者血清、健康人血清を用いてELISA法にて確認する。これらの血清抗体価とPADI4の遺伝子型の間に相関を調べる。陽性クローンのうち、抗原性の認められたタンパクに関しては合成ペプチド、精製タンパクを関節炎誘導マウス (CIAやAIA) に接種し、関節炎誘導効率への影響を調べる。

##### 2) 既知シトルリン化タンパクの生理的機能と関節リウマチへの関与

現在までに知られている、シトルリン化修飾を受けるタンパク質の生理的機能について調べ、関節リウマチ患者において、自己抗体が観察されるかどうか、される場合は、疾患の進行、発症に関わるかどうかについてモデル動物を用いて調べる。

#### 2. ノックアウトマウスを用いたPADI4機能解析

##### 1) 組織学的解析

経時的に解剖し、組織を回収し、組織切片を作製、表現型の異常があるかどうかを確認する。また、血清を回収し、血清抗体価 (抗シトルリン化ペプチド抗体価、リウマトイド因子、抗IgM、抗IgG) を測定し、コントロールマウスと比較する。また、ジーンチップマイクロアレイを用いて、ラージスケールでの遺伝子発現量の差をRNAレベルで調べ、PADI4遺伝子の発現がなくなることで影響を受ける遺伝子群を同定する。

##### 2) 関節炎誘導効率の比較

2型コラーゲンを免疫することでマウスに関節炎を誘導することが可能であるが、本研究ではコントロールとなるPADI4野生型マウスとPADI4ノックアウトマウスで関節炎の発症効率がどのように異なるか、調べる。また、抗シトルリン化ペプチド抗体価を測定し、PADI4をノックアウトすることで抗体価の上昇と関節炎の重症度の間で相関があるかどうかを調べる。

### 4. 研究成果

#### 1. PADI4の基質とシトルリン化タンパクの生理的機能の同定

1) 免疫スクリーニング法により、タイプIコラーゲン、タイプ2コラーゲン、真核生物翻訳開始因子 4G1 (eIF4G1)、 $\alpha$ -エノラーゼを同定した。これらのタンパクはシトルリン化を受け、自己抗原性を示すものであった。これと従来の知見を合わせると、多数のシトルリン化タンパクが存在し、また自己抗原性を示すが、真のターゲットとなる原因タンパクの有無についてははっきりしない。

2) フィブリノーゲンはRA患者の関節部位でシトルリン化されており、RAにおけるシトルリン化自己抗原の可能性が考えられる。そこで、RA関連遺伝子として我々が同定した、PADI4遺伝子と、そのファミリー遺伝子として知られているPADI2の基質としてフィブリノーゲンを確認し、その修飾部位について、LC-MS/MSにより同定した。その結果、フィブリノーゲン $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖にはシトルリン化部位が数多く存在しており、 $\gamma$ 鎖では確認できなかった。また $\alpha$ 鎖にある16番目のアルギニン (R16) はトロンビンにより切断され、フィブリン形成がおこるのに重要である。そこで、R16がシトルリンに変換されることでトロンビンによる切断が見られなくなる可能性を考え、実験を行ったところ、R16のシトルリン化により、トロンビンによる切断は見られなくなることがわかった。さらに、シトルリン化フィブリノーゲンをフィブリノーゲンに一定の比率で混ぜて、阻害実験を行ったところ、特定の比率までシトルリン化フィブリノーゲンを混ぜることでトロンビンによるフィブリン形成が阻害された。今までシトルリン化の存在は明らかであったがその生理的意味は明確ではなかった。今回の研究によりフィブリン形成の阻害を生理的に行っている可能性が示唆された。

#### 2. PADI4遺伝子改変マウスの作製

PADI4遺伝子ノックアウトマウスを作製した。PADI4遺伝子を欠失させ、その代りにネオマイシン遺伝子を導入し、PADI4ノックアウトマウスを作製した。遺伝的背景が129S1とB6の混合であり、今後、コラーゲン誘導関節炎などに用いるため、遺伝的背景をB6に置き換えるため、スピードコンジェニックを行い、B6バックグラウンドに改変した。更に関節炎誘導率のよい、DBA1Jへの改変も行っている。

### 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1件)

Citrullinated fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed fibrin polymerization

Nakayama-Hamada M\*, Akari Suzuki\* et al. (\*equal contributed)

J. Biochem. 144 (2008) 393-397

査読有

[学会発表] (計 1 件)

RA と PADI4 遺伝子

鈴木 亜香里

第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会

2007. 2. 26 横浜

[図書] (計 3 件)

①RA における PADI4 遺伝子

鈴木 亜香里, 山田 亮, 山本 一彦

リウマチ科 37(2007) 251-255

科学評論社

査読無

②Citruination of peptidylarginine deiminase  
in rheumatoid arthritis.

Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K.

Annals of the New York Academy of Sciences.

1108(2007) 323-339

the New York Academy of Sciences

査読無

③関節リウマチ滑膜における PAD-2, PAD-4 発現

鈴木 亜香里, 山田 亮, 山本 一彦

リウマチ科 40(2008) 422-426

科学評論社

査読無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**鈴木 亜香里 (Suzuki Akari)**

独立行政法人理化学研究所・自己免疫疾患

研究チーム・上級研究員

研究者番号：00391996