

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2008～2010
課題番号：20390280
研究課題名(和文) 関節リウマチの病因としての蛋白のシトルリン化酵素 PADI4 の役割の解明
研究課題名(英文) Pathological roles of a citrullinating enzyme PADI4 in rheumatoid arthritis
研究代表者
山本 一彦 (YAMAMOTO KAZUHIKO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80191394

研究成果の概要(和文)：関節リウマチの疾患関連遺伝子として同定した蛋白のシトルリン化酵素 PADI4 と、最も特異度の高い自己抗体である抗シトルリン化蛋白抗体を結びつけるメカニズムの検討の為、PADI4 ノックアウトマウスを中心とした解析を進めた。C57BL/6 バックグラウンドのノックアウトマウスで、関節炎の軽減化が見られ、関節炎と蛋白のシトルリン化、そしてシトルリン化蛋白に対する自己抗体の関係を検討しつつある。

研究成果の概要(英文)：We have previously identified rheumatoid arthritis susceptibility polymorphisms in PADI4. This enzyme converts arginine residues to citrullines and anti-citrullinated peptide antibodies are the most specific autoantibodies in the disease. In order to understand the pathological mechanisms, we have generated and analyzed arthritis in PADI4 knock out mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：免疫学、ゲノム、内科、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我々は、ゲノムワイドな関連解析により、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の疾患関連遺伝子として蛋白のシトルリン化酵素 PADI4 を報告した (Suzuki A et al. Nature Genet 34:395-402, 2003)。この結果

は、Ikari、Kamatani らの我が国の全く別の大規模サンプルや韓国の Bae らによる追認実験で確かめられており、日本人、韓国人、中国人では確立された事実となっている。欧米での追認試験では、追認が出来ないとの報告も多いが、メタ解析や北米での大規模サン

ルでは、有意な相関を認めており (Iwamoto T et al. *Rheumatology* 45:804-807, 2006, Plenge RM et al. *Am J Hum Genet* 77:1044-1060, 2005)、おそらく民族を超えた RA の疾患関連遺伝子であろうと考えられる。遺伝学的に確かな疾患関連遺伝子は、その疾患の成立や病態形成に一義的に関与するはずであるとされている。

一方、1990年代後半から、欧州の研究者が中心となり、RAにおける抗シトルリン化蛋白抗体の重要性が提唱されている (van Venrooij WL et al. *Autoimmun Rev* 6:37-41, 2006 など)。現在の測定は抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体として測定されているが、RAに対する特異度が90%以上と高く、早期より陽性になり、骨破壊と相関することが示されている。2010年のRAの分類基準にも入れられ、診断の役に立つばかりか、予後予測にも重要であることが明らかになりつつある。この抗体の重要性は欧米だけでなく、我が国を含むアジア人のRA患者でも共通して認められている。抗シトルリン化蛋白抗体の標的自己抗原は、我々の研究からも、複数存在することが明らかになっている (Suzuki A et al. *Biochem Biophys Res Commun* 333:418-426, 2005, Okazaki T et al. *同* 341:94-100, 2006)。

しかし、上述のように RA の疾患関連遺伝子としての蛋白のシトルリン化酵素 PADI4 と、RA に最も特異度の高い抗シトルリン化蛋白抗体の事実はあるが、その両者を結びつける研究がないと、RA の病因・病態の解明と新しい治療法の開発に進展しない。疫学的な事実とヒト肺でのサンプルの解析から、Klareskog らは、喫煙と RA の関係を推定している。すなわち、喫煙者の肺では PADI4 (または PADI2) が発現し、おそらく喫煙により PADI 酵素が活性化され蛋白がシトルリン化し、これに対する免疫応答が惹起される。そして、感染その他で非特異的な関節炎が引き起こされた場合、すでにシトルリン化蛋白に対する免疫応答が成立している個体では、滑膜組織中の炎症によりシトルリン化された自己蛋白に対する免疫応答に変換され、滑膜炎が持続し RA となるのではないか、という可能性である (Klareskog L et al. *Arthritis*

Rheum 54:38-46, 2006)。

一方、動物モデルでは、Kuhn らにより、コラーゲン誘導関節炎モデル (CIA) において、関節炎が確認されるより前に抗 II 型コラーゲン抗体だけでなく抗シトルリン化蛋白抗体が出現することが報告された。さらに、シトルリン化フィブリノーゲンに対するモノクローナル抗体を作成し、弱い関節炎に投与すると関節炎が増悪することが示された (Kuhn KA et al. *J Clin Invest* 116:961-973, 2006)。すなわち、抗シトルリン化蛋白抗体の存在自体が関節炎の病態と直接関連する可能性がある。特にフィブリン・フィブリノーゲンの局在を考えると、細胞外のシトルリン化蛋白の対する免疫応答の重要性が示唆されている。

このような報告を背景に、本申請では、マウスの動物モデルに焦点をしばり、我々がゲノム解析で明らかにした蛋白のシトルリン化酵素 PADI4 の役割と関節炎の成立との因果関係をより明確にして、治療の標的としての PADI4 の位置づけを確立することを目的とした。この為に、新たに樹立した PADI4 ノックアウトマウスの解析を中心に研究を推進した。

2. 研究の目的

RA の疾患関連遺伝子として同定した蛋白のシトルリン化酵素 PADI4 (peptidylarginine deiminase type 4) と、RA に最も特異度の高い自己抗体である抗シトルリン化蛋白抗体を結びつけるメカニズムは、RA の病因・病態や今後の治療を考える上で極めて重要と考えられる。そこで、本研究は、樹立した PADI4 ノックアウトマウスを中心としてこれらを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

PADI4 ノックアウトマウスは作成を試みてきたが、幾つかの技術的問題から樹立が遅れようやく完成した。そこで、関節炎が惹起可能でその他の免疫関連分子の解析に好都合な C57BL/6 にバッククロスを開始し、またより関節炎惹起が容易な DBA/1 にもバッククロスをした。

まず、ノックアウトマウスにおける関節炎惹起の程度を検討した。C57BL/6 における関節炎として、II 型コラーゲン誘発関節炎、抗 II 型コラーゲンカクテル抗体誘発関節炎がある。これらを用いて、ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスの関節炎の頻度、関節炎スコア、病理組織を比較した。同時に、免疫的パラメーターとして、抗 II 型コラーゲン抗体、抗シトルリン化蛋白抗体、免疫グロブリン濃度なども測定し比較した。ただし、C57BL/6 に対する関節炎の惹起は強くないので、種々の条件を変えて適切な惹起を試みた。

また当面抗シトルリン化蛋白抗体の測定は、市販の抗 CCP 抗体キットをマウス用に転用して用いるが、これがマウスの抗シトルリン化蛋白抗体を正確に検出できているかは明らかでない。そこで、マウスのリコンビナントのフィブリノーゲン、ビメンチン、フィラグリン、I 型コラーゲンなど標的自己抗原と考えられている抗原蛋白を作成し、リコンビナント PADI4 でシトルリン化した後、固相酵素抗体法 (ELISA) にて、それぞれの抗シトルリン化蛋白抗体を測定する系も樹立を試みた。これらは PADI4 にてシトルリン化しないものをコントロールとしておけることから、正確にシトルリン化蛋白抗体を測定可能な系が樹立できると期待した。

今回樹立した PADI4 ノックアウトマウスは、一般の免疫応答能はワイルドタイプと同様で、PADI4 に対するトレランスが欠如していることから、PADI4 に対する特異性の強い免疫応答が期待できる。そこで、すでに保有しているリコンビナントのマウス PADI4 蛋白や PADI4 高発現マウス細胞などを PADI4 ノックアウトマウスに免疫することで、他の PADI アイソザイムには反応しない PADI4 に対する特異性の高いモノクローナル抗体を作成することが可能と考えた。特に PADI4 の酵素活性を抑制するものと、組織での染色性が強いものを目標にスクリーニングすることで、研究に最適なモノクローナル抗体を複数樹立することを目指した。

4. 研究成果

PADI4 ノックアウトマウスを関節炎が惹起可能な C57BL/6 および DBA/1 にバッククロス

した。C57BL/6 ではバッククロスが進んだが、DBA/1 の方は容易ではなかった。現在ノックアウトマウスにおいて種々の条件下での関節炎惹起の程度を検討している。これらを用いて、ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスの関節炎の頻度、関節炎スコア、病理組織を比較している。現在までの成績では C57BL/6 バックグランドのノックアウトマウスで、関節炎の軽減化が見られた。

蛋白のシトルリン化は細胞外で生じる可能性が示唆されている。そこで、マウスの PADI4 に対するモノクローナル抗体のうち中和抗体活性をもつものは、細胞外での同酵素の作用を阻害することが期待され、関節炎の治療に PADI4 阻害薬が効果あるか否かを検証できる。今回樹立した PADI4 ノックアウトマウスは、PADI4 に対するトレランスが欠如していることから、PADI4 に対する特異性の高い免疫応答が期待できる。そこで、現在 PADI4 ノックアウトマウスにリコンビナントマウス PADI4 蛋白を免疫し、そのマウスからモノクローナル抗体を複数個樹立した。しかし、これらのモノクローナル抗体は、詳細な解析の結果、十分に酵素活性を抑制しないことが判明し、再度マウスに免疫、モノクローナル抗体の再樹立を目指している。

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 17 件)

① Yukinori Okada, Tomomitsu Hirota, Yoichiro Kamatani, Atsushi Takahashi, Koichi Matsuda, Tatsuhiko Tsunoda, Toshihiro Tanaka, Michiaki Kubo, Yusuke Nakamura, Mayumi Tamari, Kazuhiko Yamamoto, Naoyuki Kamatani.

Identification of nine novel loci associated with white blood cell subtypes in a Japanese population. PLoS Genetics. 査読有. 2011. in press

② Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Daha NA, Toes REM, Huizinga TWJ, Myouzen K, Kubo M, Yamada R, Nakamura Y,

Yamamoto K. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 査読有. 70:512-5, 2011.

③ Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10 secreting CD4+ T cells. *Advances in Immunology*. 査読無. 105:99-130, 2010.

④ Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum*. 査読有. 62:574-579, 2010.

⑤ Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 査読有. 6:290-5, 2010.

⑥ Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet*. 査読有. 42:515-9, 2010.

⑦ Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, Suzuki A, Atsumi T, Ito S, Takada K, Mimori A, Ikegawa S, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*. 査読有.

19:2313-20, 2010.

⑧ Okada Y, Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. HLA-DRB1*0901 lowers anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 査読有. 69:1569-70, 2010.

⑨ Okada Y, Kamatani Y, Takahashi A, Matsuda K, Hosono N, Ohmiya H, Daigo Y, Yamamoto K. Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N. Common variations in PSMD3-CSF3 and PLCB4 are associated with neutrophil count. *Hum Mol Genet*. 査読有. 19:2079-2085, 2010.

⑩ Okada Y, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. Contribution of a haplotype in the HLA region to anti-cyclic citrullinated peptide antibody positivity in rheumatoid arthritis, independently of HLA-DRB1. *Arthritis Rheum*. 査読有. 60:3582-3590, 2009.

⑪ Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun*. 査読有. 32:158-62, 2009.

⑫ Kochi Y, Myouzen K, Yamada R, Suzuki A, Kurosaki T, Nakamura Y, Yamamoto K. FCRL3, an autoimmune susceptibility gene, has inhibitory potential on B-cell receptor-mediated signaling. *J Immunol*. 査読有. 183:5502-10, 2009.

⑬ Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis*. 査読有. 68:377-83, 2009.

⑭Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, Yamamoto K. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. Proc Natl Acad Sci USA. 査読有. 106:13974-79, 2009.

⑮Okada Y, Mori M, Yamada R, Suzuki A, Kobayashi K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. SLC22A4 polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a replication study in a Japanese population and a metaanalysis. J Rheumatol. 査読有. 35:1723-8, 2008.

⑯Okamoto A, Fujio K, van Rooijen N, Tsuno NH, Takahashi K, Tsurui H, Hirose S, Elkon KB, Yamamoto K. Splenic phagocytes promote responses to nucleosomes in (NZB x NZW) F1 mice. J Immunol. 査読有. 181:5264-71, 2008.

⑰Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Takahashi A, Tsunoda T, Miyatake A, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional SNPs in CD244 gene increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. Nat Genet. 査読有. 40:1224-9, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO KAZUHIKO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80191394

(2) 研究分担者

岡本 明子 (OKAMOTO AKIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40431861

萩野 昇 (HAGINO NOBORU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40466769

(3) 連携研究者

なし