

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591086

 研究課題名（和文） 新規シトルリン抗原同一—関節リウマチにおける病原性の解明と
バイオマーカーへの展開

 研究課題名（英文） Identification of novel citrullinated antigen of RA, prospects for
the pathogenesis of rheumatoid arthritis and biomarkers

研究代表者

沢田 哲治（SAWADA TETSUJI）

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50235470

研究成果の概要（和文）：シトルリン化ペプチドに対する自己抗体（ACPA）は関節リウマチ（RA）に特異的であるが、ACPA の認識する自己抗原の詳細は不明である。今回 RA 関節液中にシトルリン化 cellular fibronectin (Cit-cFn) が特異的に存在することを明らかにした。Cit-cFn は ACPA と関節内で複合体を形成する可能性があり、RA の病態形成に寄与する可能性がある。また、ACPA の意義について検討を行い、抗 MCV（変異ビメンチン）抗体は、抗 CCP 抗体や抗 RA-CP 抗体と異なり、罹患関節数との相関が示され、RA の活動性評価における有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although anti-citrullinated peptide (ACPA) is specific for rheumatoid arthritis (RA), the pathogenic citrullinated autoantigen relevant for RA remains to be elucidated. In the present study, we have demonstrated the specific presence of citrullinated cellular fibronectin in RA synovial fluids, which could be involved in the pathogenesis of RA thorough formation of immune complexes within the affected joints. Additionally, we demonstrated the correlation of anti-MCV (mutated citrullinated vimentin) antibody with the number of tender/swollen joints, suggesting that anti-MCV antibody might be useful for monitoring RA disease activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：リウマチ学・関節リウマチ、シトルリン化ペプチド、自己抗原、自己抗体

1. 研究開始当初の背景
シトルリン化ペプチドに対する自己抗体（ACPA）は関節リウマチ（RA）に特異的であり、RA の関節破壊と相関することが報告されている。本邦でも ACPA のひとつである抗 CCP 抗体が実地臨床で用いられている。抗 CCP 抗

体は RA 診断や関節予後予測因子として有用であるが、RA の疾患活動性との関連は低いと報告されており、本邦でも RA の疾患活動性のモニタリングとしての保険適応はない。RA の病因・病態形成における ACPA の役割に関して、ACPA は関節内でシトルリン化抗原と

免疫複合体を形成して滑膜炎の惹起とその遷延化に関与すると想定されている。しかし、ACPA の認識する自己抗原として、シトルリン化フィブリノーゲンなどの報告はあるが、研究報告に必ずしも再現性はなく、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は RA に特異的なシトルリン化ペプチドを同定し、そのバイオマーカーとしての臨床的意義を検討するとともに、抗シトルリン化ペプチド抗体 (ACPA) やシトルリン化ペプチドが RA の病因・病態形成に果たす役割について明らかにすることである。

(2) 抗 MCV 抗体の臨床的意義

ACPA は関節リウマチ (RA) に特異的な自己抗体であり、本邦では 2007 年より抗 CCP 抗体が実地臨床で用いられている。RA 関節液中に含まれるビメンチンには体細胞突然変異によるアミノ酸置換やアルギニン (Arginine) 残基のシトルリン化が認められることが報告されている。抗 MCV 抗体は *in vitro* でシトルリン化されたリコンビナント変異ビメンチン (16 番と 59 番の Glycine を Arginine に置換) を用いて測定される。一方、抗 RA-CP 抗体は、ヒト IgG の Arginine rich な部位のアミノ酸配列に基づく合成シトルリン化ペプチドを用いて測定される。本項では新規 ACPA である抗 MCV 抗体、抗 RA-CP 抗体を RA 血清で測定し、その臨床的意義を検討した。

(3) 抗シトルリン化フィブリノーゲン (Cit-Fib) モノクローナル抗体 (mAb) の反応性の検討

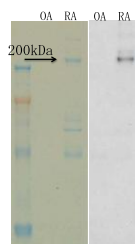
フィブリノーゲンは RA のシトルリン化自己抗原の有力候補である。本項では抗シトルリン化フィブリノーゲン・モノクローナル抗体が RA 血清に含まれるシトルリン化ペプチドと交差反応し、血清シトルリン化ペプチド検出に有用か否か検討した。

*(4) Citrullinated cellular fibronectin (Cit-cFn) の同定

当初 RA の病態に Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) のシトルリン化体に関与している可能性を考えて解析を行った。アガロース結合抗 FGF-2 抗体による免疫沈降物を Western blotting し、シトルリン化ペプチドを検索したところ、FGF2 の分子量とは異なる約 200kDa のシトルリン化ペプチドが検出された (図 1)。この 200kDa の蛋白をゲルより切り出し、

質量分析を行ったところ、cellular fibronectin と同定された。

[図 1] 変形性関節症 (OA) と RA の関節液の抗 FGF2 抗体による免疫沈降物の蛋白染色 (左) とシトルリン化ペプチド染色 (右)



シトルリン化された 200kDa ペプチドは FGF-2 と関節液内で複合体を形成していると考えられる。本項では Cit-cFn の同定とその臨床的意義を検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗 MCV 抗体、抗 RA-CP 抗体の測定

RA 患者 43 例の血清抗シトルリン化ペプチド抗体に関して、抗 CCP 抗体 (Inova 社)、抗 MCV 抗体 (Orgentec 社)、抗 RA-CP 抗体 (AESK 社) を ELISA にて測定した。

(2) 抗 Cit-Fib mAb の反応性検討

血清の糖タンパク分画を抽出したところ、多数のシトルリン化ペプチドが検出された。これらのペプチドとマウス抗 Cit-Fib mAb (4.19、23H2、20B2) との反応性を Western blot にて解析した。

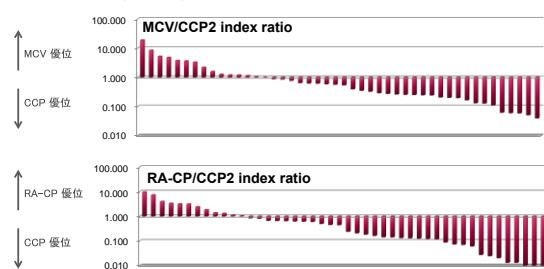
(3) Cit-cFn の同定

対象は RA25 例、コントロール (OA) 7 例の関節液を用いた。ELISA 法による Cit-cFn の測定では ELISA プレート上に固相化した抗 cFn 抗体と Anti-Citrulline (Modified) Detection Kit を組み合わせた sandwich ELISA により測定した。免疫沈降法 (Immuno-precipitation, IP) による測定では、抗 cFn 抗体により免疫沈降した cFn を SDS-PAGE にて展開後、Western blotting を行い、メンブレンを化学処理後に Anti-Citrulline (Modified) Detection Kit (Millipore) を用いてバンドを検出した。

4. 研究成果

(1) 抗 MCV 抗体の臨床的意義

① 抗 CCP 抗体、抗 MCV 抗体、抗 RA-CP 抗体の感度はそれぞれ 85.1%、80.9%、70.2% であり、抗 MCV 抗体と抗 CCP 抗体、抗 RA-CP 抗体との間には有意な相関を認めた (相関係数は 0.70 ($p < 0.0001$), 0.66 ($p < 0.0001$))。一方、個々の症例によりその反応パターンは多様であった (図 2)



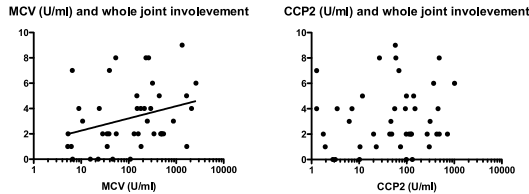
[図 2] ACPA の多様性

各 ACPA 抗体価について、[ACPA 抗体価 (U/ml)]/[カットオフ値 (U/ml)] index を算出し、抗 MCV 抗体と抗 CCP2 抗体の cut-off index 比 (上段) および抗 RA-CP 抗体と抗 CCP2 抗体の cut-off index 比 (下段) を示した

② 今回の RA 血清 (n=46) では、抗 CCP 抗体、

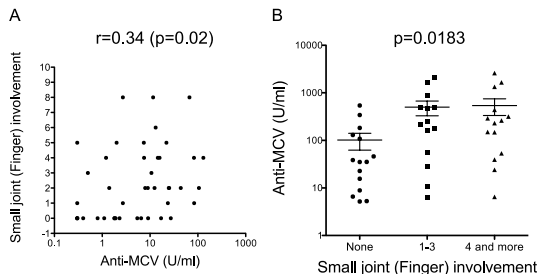
抗 MCV 抗体、抗 RA-CP 抗体レベルと CRP 値との間に有意な相関関係は認められなかった。

一方、罹患関節数は抗 MCV 抗体価と有意な相関を示したが ($r=0.34$, $p=0.03$)、抗 CCP2 抗体、抗 RA-CP 抗体レベルとは有意な相関関係は認めなかった (図 3)。



【図 3】ACPA と罹患関節数

さらに、罹患関節については、抗 MCV 抗体価と小関節 (手指) 罹患数との間に有意な相関を認め、手指小関節罹患数が多いほど抗 MCV 抗体価は高値であった (図 4)。



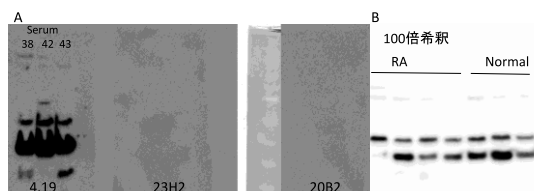
【図 4】抗 MCV 抗体と小関節罹患

一方、抗 CCP2 抗体や抗 RA-CP 抗体と小関節罹患数との間に、有意な相関関係は認められなかった (data not shown)。ACPA 抗体価は RA 疾患活動性と弱い正の相関があると報告されており、抗 MCV 抗体は活動性と関連していた。今回、炎症マーカーや圧痛関節数、腫脹関節数との間に有意な相関が得られなかったのは n 数が少ないことも一つの要因であると考えられる。

抗 CCP 抗体と RA 活動性との相関は低いと報告されているが、抗 MCV 抗体は活動性マーカーとして有用である可能性が示唆された。

(2) 抗 Cit-Fib mAb の反応性検討

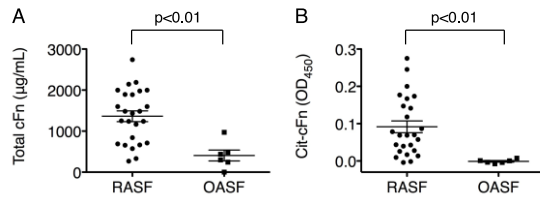
これらの抗体は他のシトルリン化ペプチドと交差反応することが報告されている。今回、RA 血清 (100 倍希釈、1 μ L/レーン) との反応性を検討したが、20B2、23H2 との反応性はなく (図 5A)、4.19 は健康人血清とも反応し (B)、抗原検索上の有用性は低いと考えられた。



【図 5】抗 CitFib 抗体と血清の反応性

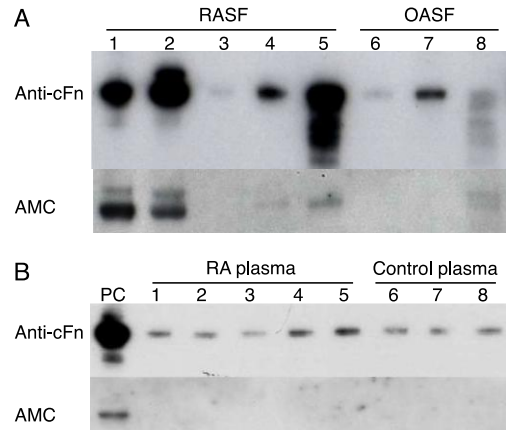
(3) Cit-cFn の同定

① RA 関節液 (RASf) の全 cFn (濃度) および Cit-cFn (吸光度) は Control 群 (OASF) と比較して、有意に高値であった (図 6)。



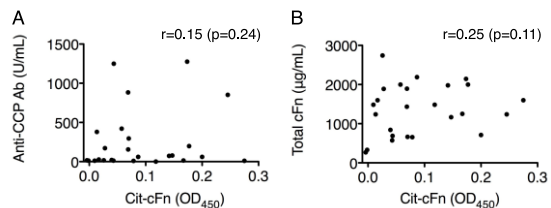
【図 6】RASf 中の全 cFn と Cit-cFn

② RASf における Cit-cFn の存在は IP/Western blot でも確認された (図 7A: 上段は cFn 染色、下段はシトルリン化ペプチド染色 (AMC))。一方、血漿からは Cit-cFn は検出されなかった (図 7B)。



【図 7】IP/Western による Cit-cFn の同定

③ RASf において、Cit-cFn と抗 CCP 抗体には有意な相関関係は認めなかった。一方、有意差には届かなかったものの Cit-cFn と全 cFn との間には正の相関傾向が認められた (図 8)。



【図 8】Cit-cFn と抗 CCP 抗体・全 cFn との相関関係

④ 考察 シトルリン化ペプチドは RA の病因・病態形成において、重要な役割を果たすと考えられている。ACPA が認識する自己抗原として、シトルリン化フィブリノーゲン、フィブリン、ビメンチン、フィブロネクチン等が報告されているが、その病因的意義は確立されていない。今回、ELISA と IP-Western により、RA 関節液中にシトルリン化 cellular

fibronectin を同定した。シトルリン化 cellular fibronectin は血漿からは検出されず、その産生部位は関節局所であると考えられる。フィブロネクチンは軟骨基質分解酵素である ADAMTS4 に結合し、その活性を抑制するが、シトルリン化されたフィブロネクチンではその抑制効果が減弱することが報告されており、Cit-cFn 生成が RA の軟骨破壊に関与している可能性がある。あるいは、RA 関節液中にシトルリン化抗原を含む免疫複合体が存在することから、関節液内で Cit-cFn と ACPA が免疫複合体を形成して、関節炎の惹起およびその遷延化に寄与している可能性も考えられる。今回の ELISA は感度が低く、血漿中の Cit-cFn は検出できず、バイオマーカーとしての有用性は限定的であり、今後感度を向上させることが望まれる。

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 2 件)

- (1) Shoda H, Fujio K, Shibuya M, Okamura T, Sumitomo S, Okamoto A, Sawada T, Yamamoto K. Detection of autoantibody to citrullinated BiP in rheumatoid arthritis patients and pro-inflammatory roles of citrullinated BiP in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011 22:13(6):R191. doi: 10.1186/ar3520. 査読有り
- (2) Shoji A, Tahara K, Hayashi H, Tsuji S, Kimura E, Yamamoto K, Odawara M, Sawada T. Severe headache complicated by vertical atlantoaxial subluxation in diffuse systemic sclerosis with crowned dens pattern calcification. *Rheumatol Int* 31(9):1247-50, 2011. doi: 10.1007/s00296-010-1703-z. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

- ① 木村英里、神崎健仁、関 雅之、庄司亜樹、森 浩章、林 映、大塚麻由、太原恒一郎、山本一彦、沢田哲治：関節リウマチ関節液中のシトルリン化 Cellular Fibronectin の同定 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (平成 25 年 4 月 18 日 京都国際会館)

[図書] (計 3 件)

- ① 大塚麻由、沢田哲治、橋本しをり：抗 CCP 抗体による治療反応性および関節予後の予測 リウマチ科 47(6)：587-593, 2012. (科学評論社)

- ② 関雅之、大塚麻由、沢田哲治、橋本しをり：関節リウマチにおけるシトルリン化抗原と歯周病 リウマチ科 46(3)：282-287, 2011. (科学評論社)
- ③ 沢田哲治：早期診断のためにどの血液学的マーカーを測定し活用するか *Bone Joint Nerve* 1(1), 10-15, 2011. (アークメディア社)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢田 哲治 (SAWADA TETSUJI)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：5 0 2 3 5 4 7 0

(3) 連携研究者

林 映 (HAYASHI HAERU)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：9 0 4 2 4 4 1 5

橋本しをり (HASHIMOTO SHIORI)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：6 0 1 8 0 8 2 4