

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591444

研究課題名(和文) 関節リウマチ早期治療を目的とした抗PAD4抗体医薬の検討

研究課題名(英文) Early therapeutic approaches for Rheumatoid Arthritis by anti-PAD4 antibodies

研究代表者

金澤 智 (Kanazawa, Satoshi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90347401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)早期診断マーカーとして抗CCP抗体がある。この抗CCP抗体産生に關与するPAD4を早期RAの標的タンパク質と考え、モデル動物(D1CCマウス)等を用いた以下の実験を行った。1) 関節炎発症時におけるPAD4発現領域の免疫組織学的な検討、2) 血清抗CCP抗体検出系の樹立、3) 抗PAD4抗体投与による関節炎治療時における抗CCP抗体等RA血清マーカーの変動検討。その結果関節炎発症時PAD4は好中球の核に発現する事が明らかとなった。新たな血清抗CCP抗体測定系を樹立した。抗PAD4抗体は、関節炎発症に対し治療効果を示したが、抗CCP抗体は予後因子としては変動しないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a useful biomarker for early diagnosis in rheumatoid arthritis (RA). Anti-PAD4 monoclonal antibodies were created because of an early therapeutic target of RA. We studied 1) where PAD4 expresses in early inflammatory stages in RA model animal, called D1CC mouse by immunohistochemistry, 2) to establish a new ELISA system to detect anti-CCP antibodies in mouse serum, 3) to analyze serial concentration of anti-CCP antibodies after treatment of anti-PAD4 antibody.

As a result, PAD4 localized in only the nucleus of neutrophils, not in synovial cells. We created a new ELISA to monitor anti-CCP antibody in mouse serum. Finally, anti-PAD4 antibody blocked PAD4 enzymatic activity and showed a therapeutic effect in D1CC mouse, however all serum concentrations of anti-CCP antibodies, rheumatoid factor IgM, and IgG did not response according to clinical scores.

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：間質性肺炎 炎症 トランスレーショナルリサーチ 関節リウマチ モデル動物 PAD4 抗CCP抗体

1. 研究開始当初の背景

「概要」 RA早期関連タンパク質PAD4に着目し、RA早期治療を目指す

RA有病率減少に直結するRA早期診断、早期治療を行うためには、発症早期において特徴的な分子の性質を理解し、RA発症との関連性を見出す必要がある。現在広く認められ、一般的にも使用される早期診断マーカーとして抗cyclic citrullinated peptide (CCP)抗体がある。抗CCP抗体は、RA特異的にシトルリン化された抗原群に反応性を示す抗体である。シトルリン化は、アルギニン残基をシトルリンとする酵素、Peptidyl arginine deiminases (PADs)により行われる。このためPADsは、早期における治療ターゲットとなる可能性がある。PADsとRA発症との関連に関しては、PAD4が特に注目されており、PAD4のDNA多型性とRAとの関係が明らかとされている(Nat.genet 34,2003,395)が、一方これが検証されないケースもある(e.g. Autoimmunity Reviews 4,2005,561)。すなわちRA発症との関係性を考えるとPAD4酵素活性そのものが関与する可能性が残されている。

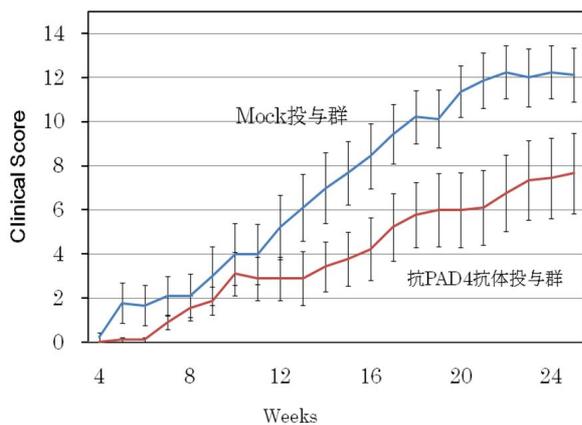


図1 D1CCマウスを用いた抗PAD4

2次免疫後、抗体投与は3日間隔で3回行った。

そこで以下の一連の研究を行い、「PAD4阻害により関節炎治療効果が得られる」との結論を得た。1) PAD4構造解析の結果を利用しPAD4におけるシトルリン化活性部位を特定

し、これを特異的に阻害するマウス MoAb をデザインした。2) PAD4阻害活性を有する抗体を選択した。3) D1CCマウスにおいて関節炎治療効果を検討し、抗体による阻害効果が確認された(図1、縦軸は、外見的所見のスコアを示す。特許申請(特願2010-185734)済みである。

「既存治療薬との相違点」

生物製剤として既に利用されている主要な既存治療薬は、1) TNF および関連タンパク質、2) IL-6をターゲットとした関節リウマチ治療薬等である。この様に既存治療薬は、主として関節リウマチの炎症に着目し、免疫担当細胞間におけるケモカイン、サイトカインネットワークを阻害すること、すなわち炎症中後期がターゲットとなる(図2)。一方抗CCP抗体産生の原因タンパク質PAD4は、炎症中後期より先立つ早期バイオマーカーと考える事ができる。またPAD4は、ケモカイン、サイトカインネットワークとは異なる分子標的機構に参与する為、単剤での効果が期待されるだけでなく、既存薬との併用により、より広い炎症期間をカバーする相乗的な効果を示す可能性もある。

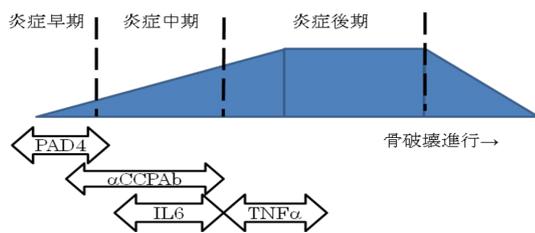


図2 既存治療薬との相違点のまとめ

「D1CCマウスの利点」

D1CCマウスは、図3にあるようにヒトRA発症や病態進行性に極めて類似した段階的な疾病を観察する事ができる(PNAS. 103, 14465-14470, 2006)。炎症の進行が緩やかなため、病態早期も観察する事ができる。すなわち既存のRAモデルマウスでは行い難かった、RA早期をターゲットとし

た抗体治療薬の効果判定を行う事ができる。また D1CC マウスは、発症後期において慢性の間質性肺炎を発症する唯一のモデル動物でもある（図 3、間質性肺炎モデル動物としても特許申請中、特許申請後論文作成）。

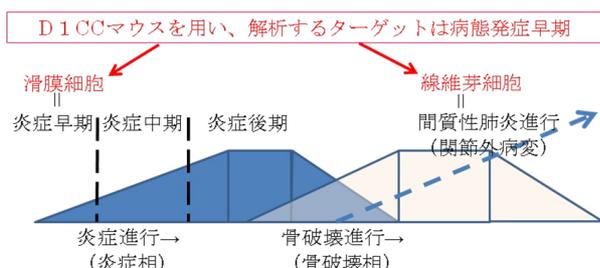


図3 D1CCマウスを利用した治療薬解析の概要

2. 研究の目的

PAD4 と関節リウマチ発症との因果関係を明らかにする

これまでの種々の報告から PAD4 は、関節リウマチにおいてのみ細胞外に存在し、種々の細胞外マトリクスをシトルリン化すると考えると理解しやすい。このシトルリン化により新たな抗原（抗 CCP 抗体の原因抗原）が産生される。先の実験から PAD4 活性を阻害する事で関節炎治療効果が確認できた。この治療効果の検証を行う。

D1CC マウスにおいて抗 CCP 抗体価測定システムを樹立した。そこで抗 PAD4 抗体投与により、抗 CCP 抗体価が減少する事を明らかにする。

② 関節炎周辺部における PAD4 たんぱく質の存在を明らかにする。PAD4 の由来は、炎症時に浸潤してくる好中球由来である事が推定される。そこで抗 PAD4 抗体取得時に得られた種々の抗 PAD4 抗体を利用し、好中球由来の PAD4 が関節部において存在する事を免疫組織化学的に明らかにする。

上記②と同様の現象が異常増殖性を有する滑膜細胞由来の PAD4 である可能性もある。この点も免疫組織化学的に検討する。

3. 研究の方法

早期ターゲットタンパク質の機能（活性）と RA 発症との関連を明らかにする

PAD4 酵素活性阻害を示す抗 PAD4 抗体は、早期関節リウマチにおいて治療効果を持つ可能性を示すデータが得られた。この場合抗 PAD4 抗体は直接的に PAD4 分子の活性阻害を行ったと考えられる。そこでターゲットとなる PAD4 は、炎症時早期に浸潤してくる好中球由来であるのか、それともこの好中球浸潤に先立ち増殖性を示す滑膜細胞由来であるのかを検討する。

4. 研究成果

(1) PAD4 酵素活性阻害測定

マウス抗 PAD4 抗体による PAD4 酵素活性阻害度の検討の目的で阻害活性測定法の確立をめざした。当初は、非特異的な結合を抑制する目的で添加されるアルブミンを加えた実験系で PAD4 活性測定を行っていたが、アルブミン添加により逆に安定した活性測定値が得られないことが明らかとなった。そこで最終的には、アルブミンを除いた活性測定系を用い、抗 PAD4 抗体による PAD4 酵素阻害活性を測定した。

結果：マウス抗 PAD4 抗体は、PAD4 酵素活性を濃度依存的に阻害することが分かった。

(2) 抗 PAD4 抗体による関節炎組織像の免疫染色

上記測定法が確立されたことで、マウス抗体の阻害の程度を明らかとできた。加えて生化学的な解析を行い、各抗体の特異度、親和度などを合わせて検討した。これらの情報を基に、マウス抗 PAD4 抗体を用いた、マウス関節炎組織を用いた免疫染色を行った。使用するマウスは、本申請者が開発したもので慢性、進行性の関節炎を示す D1CC マウスである。早期関節炎の状態を長期間維持する利点を生かし、この時期の組織をサンプリングし実験に用いた。

結果：関節炎発症時、関節局所には、いわ

ゆる Pannus と呼ばれる増殖性の繊維芽細胞を主体とする領域に多くのリンパ球の浸潤が観察される (Hematoxylin- Eosin 染色等により確認)。この様な組織サンプルを抗 PAD4 抗体により免疫染色すると pannus に対する染色性は見られない、一方浸潤性のリンパ球のうち好中球の核に対し強い染色性が観察された。

(3) マウス血清を用いた抗 CCP 抗体価測定系の樹立

本研究を進めるにあたり中核となる技術である。これまでマウス血清中の抗 CCP 抗体価はヒト抗 CCP 抗体価測定キットをマウス抗体用に改変し使用してきた。問題点としてキットそのものが高価であるため、頻りに測定できない。またキット内容が明かされていないため、容易に非特異的な吸着などをより低減させるための試みを行いにくかった。そこで新たにマウス専用のキットを構築し、マウス血清における抗 CCP 抗体価の変動をモニタリングする測定系を構築した。

結果：抗血清添加による非特異的な吸着を抑制できる緩衝液の条件を整え、蛍光を用いた高感度測定系を樹立した。マウス正常抗血清では、基準値以下(独自に設定した Unit 換算で 1.83Unit)、一方関節炎誘導時に cut-off 値 (正常値+2SD、2.11Unit) を超える事が明らかとなった。

(4) 抗 PAD4 抗体による治療効果の再現実験

D1CC マウスにおいて関節炎を誘導し、マウス抗 PAD4 抗体 (4 種類、各抗体 100 µg/マウス/2 回/週) コントロールとして MTX および PBS(プラセボ)を投与し、抗 PAD4 抗体治療効果の検討に関する再現実験を行った。

結果：抗 PAD4 抗体、MTX 投与群では、PBS 投与群と比較して治療効果が観察された (現在論文投稿準備中)。

(5) 抗 PAD4 抗体投与時における抗 CCP 抗体価の変動

抗 PAD4 抗体投与時における抗 CCP 抗体価および RFlgG、RFlgM 価の変動をモニタリングする目的で、(4)と同様な実験を行った (コントロールは PBS のみ)。

結果：関節炎誘導後、抗 CCP 抗体、RFlgG、RFlgM は Cut-off 値 (本申請者が正常マウスを基準に設定) を超えた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 14 件)(全て査読有)

K. Saikusa, N. Kuwabara, Y. Kokabu, Y. Inoue, M. Sato, H. Iwasaki, T. Shimizu, M. Ikeguchia and S. Akashi, Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering, *Analyst* 138, 1441-1449 (2013) doi: 10.1039/c2an35878f.

K. Nozawa, R. Ishitani, T. Yoshihisa, M. Sato, F. Arisaka, S. Kanamaru, N. Dohmae, D. Mangroo, B. Senger, H. D. Becker and O. Nureki, Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm, *Nucleic Acids Research*, 41, 3901-3914 (2013) doi: 10.1093/nar/gkt010

J. Trehwella, W. A. Hendrickson, G. J. Kleywegt, A. Sali, M. Sato, T. Schwede, D. I. Svergun, J. A. Tainer, J. Westbrook, and H. M. Berman, Report of the wwPDB Small-Angle Scattering Task Force: Data Requirements for Biomolecular Modeling and the PDB, *Structure*, 21, 875-881 (2013) doi: 10.1016/j.str.2013.04.020.

K. Saikusa, N. Kuwabara, Y. Kokabu, Y. Inoue, M. Sato, H. Iwasaki, T. Shimizu, M. Ikeguchia and S. Akashi, Characterisation of an intrinsically

disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering, *Analyst* 138, 1441-1449 (2013) doi: 10.1039/c2an35878f.

K. Nozawa, R. Ishitani, T. Yoshihisa, M. Sato, F. Arisaka, S. Kanamaru, N. Dohmae, D. Mangroo, B. Senger, H. D. Becker and O. Nureki, Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm, *Nucleic Acids Research*, 41, 3901-3914 (2013) doi: 10.1093/nar/gkt010.

Zhang S, Kim TS, Dong Y, Kanazawa S., Kawaguchi M, Gao N, Minato H, Takegami T, Nojima T, Miura Y. AT motif binding factor 1 (ATBF1) is highly phosphorylated in embryonic brain and protected from cleavage by calpain-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 427, 537-541 (2012) doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.092.

N. Kuwabara, Y. Murayama, H. Hashimoto, Y. Kokabu, M. Ikeguchi, M. Sato, K. Mayanagi, Y. Tsutsui, H. Iwasaki, and T. Shimizu, Mechanistic insights into the activation of Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex, *Structure* 20, 440-449 (2012) doi: 10.1016/j.str.2012.01.005.

Y. Arimura, H. Tachiwana, T. Oda, M. Sato, H. Kurumizaka, Structural Analysis of the Hexasome, Lacking One Histone H2A/H2B Dimer from the Conventional Nucleosome. *Biochem.* 51, 3302-3309 (2012) doi: 10.1021/bi300129b.

T. Yoshizawa, T. Shimizu, H. Hirano, M. Sato, H. Hashimoto, Structural basis for the inhibition of xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor, *J. Biol. Chem.* 287, 18710-18716 (2012) doi: 10.1074/jbc.M112.350520.

S. Kikuchi, K. Hara, T. Shimizu, M. Sato, H. Hashimoto, Crystallization and X-ray diffraction analysis of the ternary complex of the C-terminal domain of human REV1 in complex with REV7 bound to a REV3 fragment involved in translesion DNA synthesis, *Acta Crystallogr. F* 68, 962-964 (2012) doi: 10.1107/S1744309112032435.

S. Kikuchi, K. Hara, T. Shimizu, M. Sato, H. Hashimoto, Structural basis of recruitment of DNA polymerase by interaction between REV1 and REV7 proteins, *J. Biol. Chem.* 287, 33847-33852 (2012)

〔学会発表〕（計 6 件）

関節リウマチモデル（D1CC マウス）における間質性肺炎発症のメカニズム Pirfenidone 投与による間質性肺炎抑制効果の解析、金澤 智、第 16 回間質性肺炎細胞分子病態研究会、2013.8.24 口頭発表 東京

関節リウマチモデル（D1CC マウス）における間質性肺炎発症と pirfenidone 投与による間質性肺炎抑制性について、金澤 智、第 15 回間質性肺炎細胞分子病態研究会、2012.8.18、口頭発表 東京

関節リウマチモデルマウス(D1CC マウス)における pirfenidone 投与による間質性肺炎抑制効果について、金澤 智、岡本 尚、第 5 6 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012、リウマチ性疾患の

動物モデル2、口頭発表 東京
D1CC マウスは特発性間質性肺炎モデル動物として有用である、金澤 智
2011 イノベーション・ジャパン 東京
関節リウマチモデルを用い“炎症～骨破壊～合併症”の連鎖を探る、金澤 智
日本超音波骨軟組織学会 第22回 中部分科会、2011、教育セミナー(基調講演)
愛知

〔図書〕(計 0件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)
名称：肺線維症モデル動物の作製(仮称)
発明者：金澤 智
権利者：名古屋市立大学
種類：国内特許
番号：
出願年月日：平成 26 年度予定(大学出願準備中)
国内外の別：国内 PCT(予定)

取得状況(計 1件)
名称：ヒト関節リウマチの病態を再現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物
発明者：金澤 智、岡本尚
権利者：名古屋市立大学
種類：国内特許
番号：特許第 5099550 号
取得年月日：平成 24 年 10 月 5 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/molgene.dir/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
名古屋市立大学 大学院医学研究科
細胞分子生物学 助教
金澤 智(KANAOKA, Satoshi)
研究者番号： 90347401
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
横浜市立大学
大学院生命医科学研究科
生命医科学専攻 構造生物学研究室

教授
佐藤 衛(Sato, Mamoru)
研究者番号： 60170784