

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460649

研究課題名(和文) 抗CCP抗体陰性関節リウマチの特異抗体の検索 ～抗カルバミル化蛋白抗体を中心に～

研究課題名(英文) Search for specific antibodies of anti-CCP antibody-negative rheumatoid arthritis -focusing on anti-carbamylated protein antibody-

研究代表者

大村 浩一郎(OHMURA, Koichiro)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40432372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗カルバミル化蛋白抗体(抗CarP抗体)の対応抗原のひとつがカルバミル化アルブミンであることを世界で初めて発見した。抗カルバミル化蛋白抗体(抗CarALB抗体)の陽性率は抗CCP抗体陽性関節リウマチ(RA)の44.6%で、陰性RAでは18.3%であった(健常者では3.6%)。抗CarP抗体、抗CarALB抗体ともに、RA以外の膠原病、リウマチ性疾患でも10-30%程度陽性となるため、特異度は高くない。生体内でカルバミル化を引き起こす酵素はミエロペルオキシダーゼ(MPO)の、RA血清中の濃度を測定したところ、抗CarALB抗体陽性RAでは陰性RAよりも血清MPO濃度が有意に高いこともわかった。

研究成果の概要(英文)：We found one of the target antigens of anti-carbamylated protein (CarP) antibody is carbamylated albumin (CarALB). Sensitivities of anti-CarALB antibody for anti-CCP antibody-positive rheumatoid arthritis (RA) and anti-CCP-negative RA are 44.6% and 18.3%, respectively (3.6% for healthy donors). Both Anti-CarP and anti-CarALB antibodies were positive in ~10-30% of other rheumatic diseases or collagen vascular diseases. We measured serum concentration of myeloperoxidase (MPO), which is the key enzyme of carbamylation in vivo, and found that MPO was higher in anti-CarALB-positive RA patients than in anti-CarALB-negative patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗カルバミル化蛋白抗体 関節リウマチ 対応抗原 アルブミン ミエロペルオキシダーゼ 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の診断は特異抗体である抗 CCP 抗体が陽性である場合はさほど難しくないが、抗 CCP 抗体陰性の関節炎は鑑別診断も多く困難を極める。初期の RA での抗 CCP 抗体陽性率は 60%程度とされ、抗 CCP 抗体陰性 RA の特異的なバイオマーカーが望まれていた。

一方、RA の新規自己抗体として抗カルバミル化蛋白(CarP)抗体が近年報告されたが、その対応抗原は不明であった。また抗 CCP 抗体陰性 RA での抗 CarP 抗体陽性率が 16%と報告され、その診断における有用性も示唆されていた。

2. 研究の目的

抗 CCP 抗体陰性 RA 特異的な自己抗体を抗 CarP 抗体中心に検索する。また、抗 CarP 抗体の対応抗原を同定し、その臨床的有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) AlphaScreen 法による自己抗体のスクリーニング。

AlphaScreen 法の原理は別紙 (http://www.perkinelmer.co.jp/Portals/0/resource/tech/tech_ls/protocol_collection/AlphaScreen_guidebook.pdf) にゆずるが、簡単に説明するとストレプトアビジンの coat されたドナービーズと ProteinG が coat されたアクセプタービーズを用い、既知のビオチン化蛋白と患者血清をビーズとともに混ぜ合わせると、血清中にその蛋白に対する自己抗体を持っている場合は両方のビーズが近接することになり、もともとのビーズの性質からレーザーを照射することで近接したビーズが発光するしくみである。これにより自己抗体の有無とその対応抗原が同定できる。AlphaScreen 法をカルバミル化蛋白アレイを用いてスクリーニングを予定していたが、研究成果で述べるように、今回はポジコンとしてカルバミル化アルブミン(CarALB)と抗 CarALB 抗体陽性血清を用いて条件検討を行った。

カルバミル化の方法はシアン酸カリウム(KOCCN)と目的蛋白を 37C で overnight incubation を行った。

(2) Western blot は 7 人の抗 CarP 抗体陽性 RA 患者血清を用いて、牛胎仔血清(FCS)、ウシアルブミン(BSA)、ヒトアルブミンおよびそれぞれのカルバミル化した蛋白を抗原として通常の方法で行った。

抗 CarP 抗体 ELSIA は original report と同様の方法で行った。すなわち、カルバミル化 FCS を ELISA plate に固相化し、患者血清、ウサギ抗ヒト IgG 抗体、ALP 標識抗ウサギ IgG 抗体の順で反応させて DAB を用いて発色させる方法で、抗 CarALB 抗体および抗シトルリン化 ALB (citALB) 抗体 ELISA はほぼ同様であるが、3 次抗体は用いず、ALP 標識ウサギ

抗ヒト IgG 抗体を用いる。

抗 CCP 抗体およびミエロペルオキシダーゼ(MPO)の定量は市販の ELISA キットを用いた。

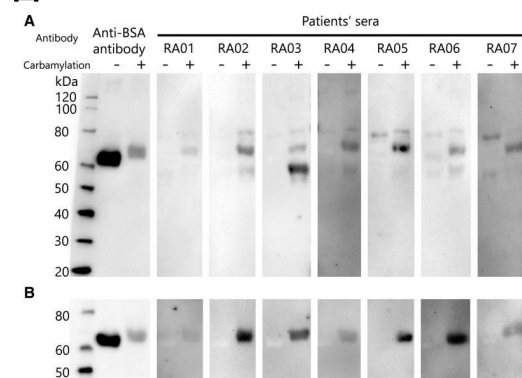
抗 CarALB 抗体陽性、陰性 RA の臨床指標との関連は Mann-Whitney U 検定および二乗検定で行い、多変量解析はロジスティック回帰分析で検定した。

4. 研究成果

(1) AlphaScreen を用いた assay については、数回実験を行ったが、KCCN による蛋白のカルバミル化を行うと、KCCN 濃度が濃くなると biotin の変性が起こるのか、陽性コントロールでもシグナルが出なくなり、比較的薄い濃度でも蛋白の変化により biotin の巻き込み等が起こっているのか、シグナルが得られにくくなる傾向が認められた。至適条件検討を行ったが、少なくともスクリーニングで多くの蛋白を用いて検討することはコストベネフィットのリスクが高いと考え、実験は pending とした。

(2) 一方、抗 CarP 抗体の対応抗原に関しては FCS を抗原として Western blot した際にみられるバンドがアルブミンの分子量と似ていることから、CarALB が対応抗原であると予想した(図 1A)。カルバミル化ヒトアルブミンを抗原として Western blot したところ(図 1B)同様のバンドがで見られることから少なくとも抗 CarP 抗体陽性 RA 患者血清中に CarALB に反応する抗体をもつことが確認された。

図 1

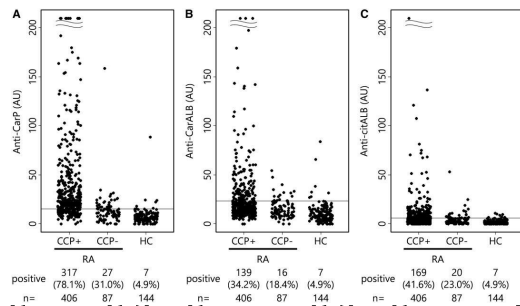


7人の抗CarP抗体陽性RA患者血清を用いて、FCSおよびカルバミル化FCSに対するWestern blot (A)、およびヒトアルブミンおよびカルバミル化アルブミンに対するWestern blotを行った。それぞれカルバミル化アルブミンに相当するバンドがみられる。

抗 CarALB 抗体を検出する ELISA の系を確立し、健常者の抗体価平均+2SD を cut off 値としたときの抗 CCP 抗体陽性 RA、陰性 RA の陽性率はそれぞれ 44.6%、18.3%となった(図 2B)。カルバミル化蛋白とシトルリン化蛋白とは構造的に非常に似通っているため、抗

citALB 抗体の陽性率を確認したところ、抗 CCP 抗体陽性 RA の 19.7% と明らかに抗 CarP 抗体よりも低かったことから、citALB に対する交差反応をみているわけではないことが示された。

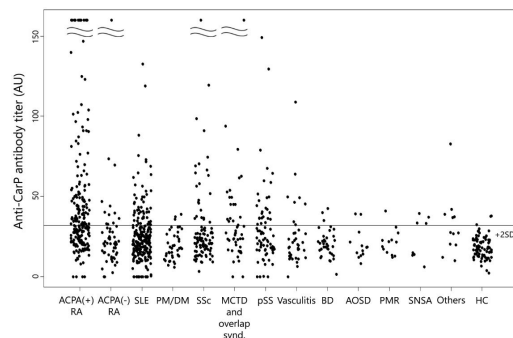
図 2



抗 CarP 抗体、抗 CarALB 抗体、抗 CitALB 抗体の抗 CCP 抗体陽性 RA、抗 CCP 抗体陰性 RA、健常者(HC)における抗体値の分布と陽性率。

次に他の膠原病・リウマチ性疾患における抗 CarP 抗体の陽性率を検討した(図 3)。膠原病、リウマチ性疾患の中でも、全身性エリテマトーデス(SLE)、強皮症(SSc)、混合性結合組織病(MCTD)、シェーグレン症候群(pSS)、血管炎(vasculitis)などでは陽性率が高く、それぞれ 22%、23%、38%、36%、22%であった。一方、ベーチェット病(BD)やリウマチ性多発筋痛症(PMR)ではそれぞれ 8.3%、7.7%と陽性率は比較的低く、自己抗体が陽性になる免疫性疾患で高くなる傾向がみられた

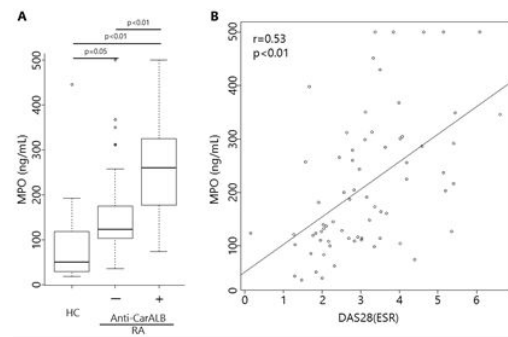
図 3



抗 CarP 抗体の各種膠原病、リウマチ性疾患での抗体値の分布

一方、カルバミル化蛋白は MPO によって触媒され生成されるため、血清 MPO 濃度と抗 CarALB 抗体、RA の活動性(DAS28)の関連を検討した。抗 CarALB 抗体陽性 RA では陰性 RA よりも有意に血清 MPO の濃度が高く(図 4A)、また血清 MPO 血中濃度と DAS28 であらわした RA の疾患活動性との間にきれいな相関がみられた($p < 0.01$, $r = 0.53$)(図 4B)。

図 4 抗 CarALB 抗体陽性、陰性 RA における血清中



MPO 濃度分布(A)と血清中 MPO 濃度と RA 疾患活動性(DAS28-ESR)の相関(B)

さらに抗 CarALB 抗体の臨床的意義を検索する目的で抗 CarALB 抗体陽性 RA と陰性 RA におけるさまざまな臨床指標との関連を多変量解析で検討した(表 1)。その結果、喫煙歴との強い関連がみられ($p < 0.01$)、心血管系 event との関連も認められた($p = 0.02$)。これらの結果はカルバミル化 LDL の生成と喫煙が関連するという報告ともつながり、またその結果動脈硬化が進行することから、心血管系イベントとの関連ももうなずける。また、DAS28 との関連も認められる($p = 0.03$)ことから、抗 CarALB 抗体が原因となっているかどうかはこれらの結果から断定できないが、少なくとも抗 CarALB 抗体陽性 RA 患者は喫煙者も多く、心血管系イベントも多く、また RA の活動性の高い患者に多い傾向があることは明らかとなった。

表 1 抗 CarALB 抗体と臨床指標の関連

| Covariate | Anti-CarALB | | Univariate P-value | Multivariate OR (95% CI) | P-value |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------------|---------|
| | Positive, n=155 | Negative, n=338 | | | |
| Age, mean (s.d.), years | 62.8 (12.6) | 62.2 (13.6) | 0.85 | 1.00 (0.97, 1.02) | 0.75 |
| Disease duration, mean (s.d.), years | 17.5 (19.7) | 15.6 (18.3) | 0.12 | 0.99 (0.97, 1.01) | 0.48 |
| Women, % | 81.9 | 85.2 | 0.36 | 0.78 (0.55, 2.94) | 0.57 |
| Stenocard stage | | | | | |
| Low stage | | | 0.01 | 1.49 (0.78, 2.93) | 0.23 |
| I | 21 | 63 | | | |
| II | 29 | 82 | | | |
| High stage | | | | | |
| III | 30 | 50 | | | |
| IV | 66 | 114 | | | |
| DAS28 (ESR), mean (s.d.) | 3.24 (1.28)* | 2.85 (1.12)* | -0.01 | 1.29 (1.02, 1.62) | 0.03 |
| Smoking | | | 0.14 | 1.75 (0.94, 3.28) | -0.08 |
| Current + former | 18 + 34 | 26 + 62 | | | |
| Never | 80 | 187 | | | |
| Cardiovascular disease, % | 4.9* | 2.3* | 0.15 | 5.85 (1.27, 26.82) | 0.02 |
| BUN, mean (s.d.), mg/dl | 15.9 (5.2) | 16.2 (6.1) | 0.94 | 0.94 (0.89, 0.99) | 0.02 |
| Anti-CCP antibody-positive, % | 88.7 | 79.0 | -0.01 | 1.21 (0.35, 1.94) | 0.55 |
| Anti-CarP antibody-positive, % | 92.3 | 59.5 | -0.01 | 9.12 (3.83, 21.7) | <0.01 |
| MTX use, % | 61.6* | 70.1* | 0.07 | 0.50 (0.28, 0.88) | 0.02 |
| Biologic use, % | 41.1* | 28.6* | -0.01 | 1.75 (1.01, 3.02) | 0.05 |

以上より、抗 CarP 抗体の対応抗原のひとつがカルバミル化アルブミンであることを世界で初めて発見した。抗カルバミル化蛋白抗体(抗 CarALB 抗体)の陽性率は抗 CCP 抗体陽性関節リウマチ(RA)の 44.6%で、陰性 RA では 18.3%であった(健常者では 3.6%)。抗 CarP 抗体、抗 CarALB 抗体ともに、RA 以外の膠原病、リウマチ性疾患でも 10-30%程度陽性となるため、特異度は高くない。生体内でカルバミル化を引き起こす酵素は MPO の、RA 血清中の濃度を測定したところ、抗 CarALB 抗体陽性 RA では陰性 RA よりも血清 MPO 濃度が有意に高いこともわかった。

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 9 件)

1. Nakabo S, Mimori T, Ohmura K et al., Carbamylated albumin is one of the target antigens of anti-carbamylated protein antibodies. Rheumatology (Oxford). 2017 Apr 7. doi: 10.1093/rheumatology/kex088. [Epub ahead of print]
2. Nakabo S, Mimori T, Ohmura K et al., Anti-carbamylated protein antibodies are detectable in various connective tissue diseases. J Rheumatol in press
3. Terao C, Ohmura K, Matsuda F et al., A twin study of rheumatoid arthritis in the Japanese population. Mod Rheumatol 2016; 26: 685
4. Terao C, Ohmura K, Bessho K, et al., Significant association of periodontal disease with anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese healthy population - The Nagahama study. J Autoimmun. 2015; 59: 85.
5. Terao C, Ohmura K, Matsuda F et al., Anti-citrullinated peptide/protein antibody (ACPA)-negative RA shares a large proportion of susceptibility loci with ACPA-positive RA: a meta-analysis of genome-wide association study in a Japanese population. Arthritis Res Ther 2015; 17: 104
6. Terao C, Ohmura K, Matsuda F, et al., Rheumatoid factor is associated with the distribution of hand joint destruction in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatol. 2015; 67: 3113
7. Okada Y, Ohmura K, Mimori T et al., Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature 2014; 506: 376
8. Terao C, Ohmura K, Mimori T et al., Inverse association between air pressure and rheumatoid synovitis: an observational study. PLoS ONE 2014; 9: e85376
9. Yamakawa N, Ohmura K, Mimori T, et al., A clinical, pathological and genetic characterization of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders. J Rheumatol 2014; 41: 293.

[学会発表](計 4 件)

1. 中坊周一郎、大村浩一郎、三森経世。無細胞タンパク質合成系を用いたハイスクリーンタンパク質合成と AlphaScreen を

組み合わせた、関節リウマチにおける新規自己抗体の網羅的検索。第 61 回日本リウマチ学会。2017 年 4 月 22 日。博多。口演。

2. Nakabo S, Ohmura K, Mimori T, et al., Carbamylated human albumin is one of the target antigens of anti-carbamylated protein antibodies. American college of rheumatology annual meeting 2015. 2015 年 11 月 10 日。サンフランシスコ。口演。
3. 橋本求、大村浩一郎、三森経世ほか。歯周病菌 Red complex の存在は関節リウマチの治療抵抗性と関連する。第 58 回日本リウマチ学会総会。2014 年 4 月 24 日。東京。口演。
4. Yoshifuji H, Ohmura K, Mimori T, et al., Association of a single nucleotide polymorphism (SNP) in IL-12B region with clinical features and peripheral T cell profiles of patients with Takayasu arteritis. American college of rheumatology 2014. 2014 年 11 月 15 日。ボストン。口演。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 特記すべきことなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大村 浩一郎 (OHMURA, Koichiro)
京都大学・医学研究科 准教授

研究者番号：40432372

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

中坊 周一郎 (NAKABO, Shuichiro)