

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461470

研究課題名(和文) ヒト化抗PAD4抗体を用いた関節リウマチ治療へ向けての基礎検討

研究課題名(英文) Therapeutic study of rheumatoid arthritis by humanized anti-PAD4 antibody

研究代表者

金澤 智 (KANAZAWA, Satoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90347401

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)：高齢化社会の進行は、関節リウマチ(RA)患者数の顕著な増加率としても現れている。このため早期治療法を確立することは喫緊の課題の一つである。早期ターゲットタンパク質、PAD4に対するマウスモノクローナル抗体(MoAb)をPAD4の構造解析を基に作成し、関節リウマチモデルマウス、D1CCマウスにおいて、関節炎治療を行い顕著な治療効果が得られた。そこでマウスMoAbを親和度で凌ぐ新たなニワトリMoAb(ヒトMoAb化が可能)を得た。本研究では「ニワトリMoAb抗体がD1CCマウス関節炎に対し治療効果を示す」ことを明らかとした。「RA早期治療法実用化」に向けた基礎データの取得およびその特許化が進んだ。

研究成果の概要(英文)：Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) that catalyzes the conversion of protein arginine residues to citrulline residues in the presence of Ca²⁺ is likely to be involved in rheumatoid arthritis (RA), because anti cyclic citrullinated protein antibodies against its catalytic modified peptides are associated with onset of RA disease. However, it is still not clear whether PAD4, in particular, its catalytic activity directly affects onset of RA symptoms. To reveal this, we created that anti PAD4 monoclonal antibodies recognized catalytic cleft of PAD4. Antibodies were obtained by phage display technique to be combined with immunization in chick. They were introduced by intraperitoneal administration in RA model mouse, called D1CC mouse, resulted in reduction of onset of inflammatory arthritis. Anti PAD4 antibody reduces inflammatory arthritis in D1CC mouse. We therefore concluded that PAD4 played critical role in the pathogenesis of initial phase of RA.

研究分野：免疫学

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

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、抗 PAD4 抗体を用いた 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。現在広く認められた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。PADs の中でも PAD4 は、早期治療ターゲットとなる可能性がある。さらに抗 CCP 抗体産生との関連を考えると PAD4 酵素活性そのものが関与すると考えられる。そこで以下の一連の研究 (2011-13 年度基盤 C, 第一三共との共同研究等) 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 構造解析の結果から PAD4 シトルリン化活性阻害型マウスモノクローナル抗体を作成した (Table 1)。さらにより親和性の高い抗体の取得を目指し、ニワトリを用いた新規抗体の作成を試みている。ニワトリを用いた場合、予想通りマウス抗体と比較してより低い Kd をもつクローンが得られる可能性が示唆された (Table 1)。

Table 1 ニワトリ抗体の特徴

Clone name	peptide 1	peptide 2	Kd (for mPAD4)
L-119 (murine)	○		5.4x10 ⁹
L-207 (murine)		○	1.3x10 ⁹ (*5.4x10 ⁹)
J8 (avian)		○	2.1x10 ⁹

Kd was measured by Biacore.

(2) 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、特許実施権譲渡の交渉を行う可能性あり) 済み) 済みである。

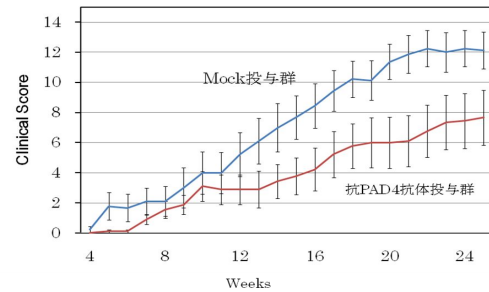


図 1 D1CC マウスを用いた抗 PAD4 2 次免疫後、抗体投与は 3 日間隔で 3 回行った。

(3) より特異度、阻害度の高い MoAb を得る目的でニワトリを用いた MoAb のスクリーニングを行い、10 クローンを得た (table1 参照)。

「既存治療薬との相違点」

生物製剤とし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 等サイトカインを利用した治療薬で炎症中後期を、一方 (3) PAD4 は、(1) (2) に先立つ早期をターゲットとしている。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属する。この為単剤での効果に加え、既存薬との併用効果も期待できる (図 2 参照)。

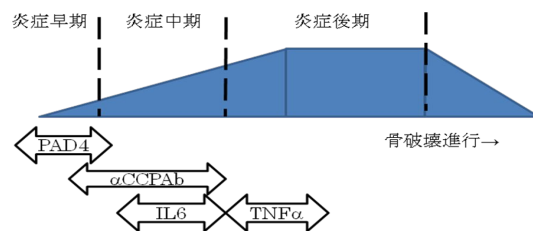


図 2 既存治療薬との相違点

「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 D10C 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、関節リウマチモデル動物(2012年度)および間質性肺炎モデル動物(2013年3月より)としてオリエンタル酵母から販売を開始した。国内特許出願済みである(特許第4857450号管理番号G-58JP、2010米国特許取得特許番号US7745690)。間質性肺炎治療薬 Pirfenidone(塩野義製薬)による治療効果を検討した。良好な治療効果が得られている。

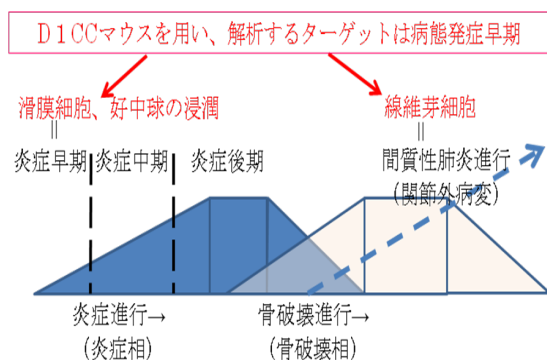


図3 D10C マウスを利用した治療薬解析の特徴

2. 研究の目的

(1) ニワトリ抗 PAD4 抗体による PAD4 活性阻害効果および関節炎抑制効果を明らかにする。

関節炎抑制効果を示す抗 PAD4 抗体は、PAD4 の構造解析データを基盤として得た。マウス PAD 抗体は、動物実験により PAD4 が治療標的となることを明らかにした。一方その阻害活性、治療効果は必ずしも満足ゆくものではなかった。そこでより高い特異度、活性阻害度、動物実験における治療効果を示すクローン取得を目指し、ニワトリからの MoAb 作成を試み、複数のクローンを得た。以下の4点を明らかにする。

ニワトリ抗体による PAD4 特異度、結合度および PAD4 活性阻害度を検討する。

ピアコアを用い各抗体の PAD4 に対する親和度を計測し、動物実験に使用する最適な抗体を選択する。

選ばれたニワトリ抗体(マウス化する)を大量生産する。

ニワトリ抗体を D10C マウスに投与し関節炎抑制効果を検討し、ヒト化するニワトリ抗体を絞り込む。

(2) 抗 PAD4 抗体による関節炎抑制は抗シトルリン化ペプチド抗体(Anti-cyclic citrullinated peptide antibody; anti-CCPAb, ACPA) 値を減少させるのか明らかとする。

関節炎を示すマウスにおいても ACPA が検出される。我々もシトルリン化環状化ペプチドを用いその存在検出が可能となった。一方実際に関節炎進行のモニタリングや病態治療効果の検討に利用されていない。以下の2点を明らかとする。マウス抗 PAD4MoAb(既に炎症抑制効果を確認しているので基準コントロールとなる)および、ニワトリ由来抗 PAD4 抗体(マウス抗体化済み)を D10C マウスに投与し、血清中の ACPA 値の変動をモニタリングする。

3. 研究方法

(1) ニワトリ抗 PAD4 抗体による PAD4 活性阻害効果および関節炎抑制効果を明らかにする。

新規ニワトリ抗 PAD4 抗体は、マウス抗 PAD4 抗体と比較して約1桁低いKd値(table1)を示す。そこでこれらニワトリ抗 PAD4 抗体の PAD4 に対する特異度、結合度、活性阻害度、動物実験における治療効果を検討する。本実験により最終的にヒト化すべきニワトリ抗体を絞り込む。

(2) PAD4 抗体による関節炎抑制は抗シトルリン化ペプチド抗体を減少させるのか明らかとする。

関節炎を示すマウスにおいても ACPA が検

出される。シトルリン化環状化ペプチドを用いた新規検出系により、ニワトリ由来抗 PAD4 抗体投与時の血中 APCA 値の変動をモニタリングする。

4. 研究成果

(1) ニワトリ抗 PAD4 抗体による PAD4 活性阻害効果および関節炎抑制効果を明らかにする。

ニワトリ抗体による PAD4 特異度、結合度および PAD4 活性阻害度を検討する。

これまでマウス MoAb 取得時の解析から、活性阻害が期待できる Peptide 1 および 2 の二つの領域にターゲットを絞り込んだ (Table 2)。

Peptide #	Amino acid sequence
Peptide1	VVFDSPRNRGLKEFPIK
Peptide2	EENMDDQWMQDEMEIGY

Table 2 PAD4 活性領域を構成すると考えられる peptides

この領域は、タンパク質立体構造上、天然変性領域 (intrinsic disorder) を形成するシトルリン化活性領域である。この領域に関しヒト、マウス、ニワトリ間でのホモロジー検索等を行うと、ニワトリにおいて PAD4 そのものが見つかっていない為、より親和性の高い抗体が得られる可能性があることが明らかとなった (Table 3)。そこで本ペプチドに対するニワトリ抗体作成を試みた。

Comparison	whole protein	peptide1	peptide2
cPAD1/hPAD4	57	82	53
cPAD2/hPAD4	50	65	59
cPAD3/hPAD4	56	71	59

Table 3 chicken (c), human (h) and mouse (m) PAD4 間のアミノ酸配列比較

ニワトリ抗体はニワトリへの抗原免疫およびファージディスプレイ法により作成した。スクリーニングの結果得られたニワトリ抗体の性能評価を行った。それぞれの抗体が、hPAD4, mPAD4、hPAD4、mPAD2 等に反応するか

否かを検討した。結果の一例を図 4 に示す。ニワトリ抗体は、これまでに得られていたマウス MoAb と比較して hPAD4 に対しより強い結合を示すことが明らかとなった。またこれらの抗体は mPAD4 に同様に強い結合を示すが、hPAD2, mPAD2 に対しては結合能を示さなかった。

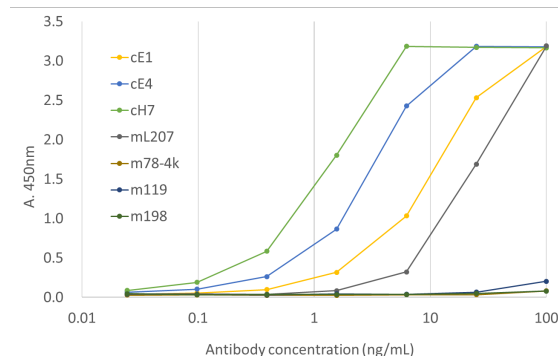


図 4 ニワトリ抗体の hPAD4 への結合 これらの抗体による PAD4 活性阻害度を検討した。結果の一例を図 5 に示す。図 4 において結合が弱い cE1, cE4 と比較して結合能が高い cH7 は、PAD4 阻害活性の程度も高いことが分かった。

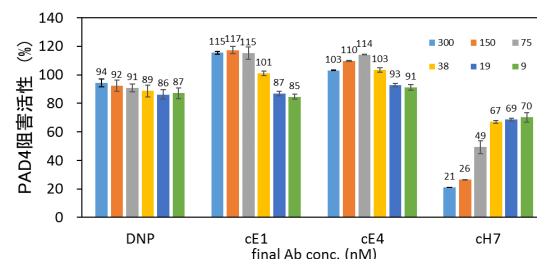


図 5 ニワトリ抗体による PAD4 活性阻害

Clone	Peptide number	Kd
mL78	1	N.D.
mL119	2	(5.4×10^{-8})
mL198	2	N.D.
mL207	2	5.4×10^{-8} (1.3×10^{-8})
cG8	2	2.3×10^{-9}
cH7	2	7.6×10^{-9}

Table 4 ビアコアによる親和性測定

ビアコアを用い各抗体の PAD4 に対する親和度を計測し、動物実験に使用する最適な抗体を選択する。

さらにこれらニワトリ抗体の親和性をビアコアにより解析した (Table 4)。ニワトリ抗体は、マウス抗体と比較し約一桁親和性が高いものが得られた。

選ばれたニワトリ抗体(マウス化する)

を大量生産する。

得られたニワトリ抗体は、マウスキメラ化を行い、無血清組織培養にて大量生産した。

ニワトリ抗体を D1CC マウスに投与し関節炎抑制性を検討し、ヒト化するニワトリ抗体を絞り込む。

D1CC マウスは、MHC クラス II (MHCII) のマスタースイッチである Class II

transactivator 遺伝子を 2 型コラーゲン

(Col2) プロモーター下に導入し、MHCII を

関節軟骨特異的に発現させた tg マウスである。

この D1CC マウスにニワトリ由来抗体を

投与し、関節炎改善の効果を検討した(図 6)。

投与により関節炎抑制効果が観察された。

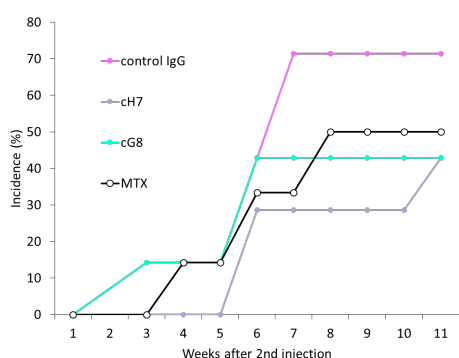


図 6 ニワトリ抗体投与による関節炎改善効果検討

(2) 抗 PAD4 抗体による関節炎抑制は抗シトルリン化ペプチド抗体 (Anti-cyclic citrullinated peptide antibody; anti-CCP Ab, ACPA) 値を減少させるのか明らかとする。

マウス抗 PAD4 MoAb および、ニワトリ由来抗 PAD4 抗体を D1CC マウスに投与し、血清中の ACPA 値の変動をモニタリングする。

組織学的な解析よりニワトリ抗 PAD4 抗体による関節炎抑制効果は、関節部における好中球細胞外トラップ(neutrophil

extracellular traps, NETs) 形成の阻害にあることが明らかとなった。NETs 形成は、血清中 ACPA 形成の主要因と考えられている。現在この抑制効果が実際に抗シトルリン化ペプチド抗体産生量に相関する実験を進めて

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 8 件)

Kato, Y., Oki, K., Suga, N., Ono, S., Ishisaka, A., Miura, Y., Kanazawa, S., Naito, M., Kitamoto, N., Kettle, A. J.. A novel quinone derived from 5-hydroxyindoleacetic acid reacts with protein: Possible participation of oxidation of serotonin and its metabolite in the development of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2016; **101**: 500-510. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.023. 査読あり

Kawaguchi M., Hara N., Vladimir B., Koike H., Suzuki M., K. Tae-Sun K., Nan G., Yu D., Sheng Z., Fujinawa Y.; Yamamoto O., Ito H., Tomita Y., Naruse Y., Sakamaki A., Ishii Y., Tsuneyama K., Inoue M., Itoh J., Yasuda M., Sakata N., Cha-Gyun J., Kanazawa S., Akatsu H., Minato H., Nojima T., Asai K., Miura Y., A diagnostic marker for superficial urothelial bladder carcinoma: lack of nuclear ATBF1 (ZFHX3) by immunohistochemistry suggest malignant progression *BMC Cancer*. *BMC Cancer* 2016; **16**: 805. DOI:10.1186/s12885-016-2845-5. 査読あり

H. Shimojo, A. Kawaguchi, T. Oda, N. Hashiguchi, S. Omori, K. Moritsugu, A. Kidera, K. Hiragami-Hamada, J. Nakayama, M. Sato, Y. Nishimura, Extended string-like binding of the phosphorylated HP1 N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail, *Scientific Reports*, **6**, 22527-22541 (2016) DOI: 10.1038/srep22527. 査読あり

A. Hishiki, K. Hara, Y. Ikegaya, H. Yokoyama, T. Shimizu, M. Sato, H. Hashimoto, Structure of a novel DNA-binding domain of helicase-like transcription factor (HLTF) and its functional implication in DNA damage, *J. Biol. Chem.* **290**, 13215-13223 (2015) DOI: 10.1074/jbc.M115.643643. 査読あり

H. Yoshida, S. -Y. Park, T. Oda, T. Akiyoshi, M. Sato, M. Shirouzu, K. Tsuda, K. Kuwasako, S. Unzai, Y. Muto, T. Urano, and E. Obayashi, A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit, *Gene Dev.* **29**, 1-12 (2015) DOI: 10.1101/gad.267104. 査読あり

K. Saikusa, S. Shimoyama, Y. Asano, A. Nagadoi, M. Sato, H. Kurumizaka, Y. Nishimura, and Akashi S.,

Charge-neutralization effect of the tail regions on the histone H2A/H2B dimer structure, *Protein Sci*, 24, 1224-1231 (2015) DOI: 10.1002/pro.2673. 査読あり

H. Eguchi, M. Umemura, R. Kurotani, H. Fukumura, I. Sato, J. H. Kim, Y. Hoshino, J. Lee, N. Amemiya, M. Sato, K. Hirata, D. J. Singh, T. Masuda, M. Yamamoto, T. Urano, K. Yoshida, K. Tanigaki, M. Yamamoto, M. Sato, S. Inoue, I. Aoki, and Y. Ishikawa, A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging, *Scientific Reports*, 5, 9194-9207 (2015) DOI: 10.1038/srep09194. 査読あり

Y. Soh, F. Bürmann, H. Shin, T. Oda, K. S. Jin, C. P. Toseland, C. Kim, H. Lee, S. J. Kim, M. Kong, M. Durand-Diebold, Y. Kim, H. M. Kim, N. K. Lee, M. Sato, B. Oh, S. Gruber, Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding, *Mol. Cell*, 57, 290-303 (2015) DOI: 10.1016/j.molcel.2014.11.023. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

金澤 智 関節リウマチマウスモデル

(D1CCxD1BC マウス)における間質性肺炎誘導
第60回日本リウマチ学会総会 ワークショップ
2016.4.21-23、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

金澤 智 間質性肺炎モデルマウスから
単離した繊維芽細胞の解析、第19回間質性
肺炎細胞分子病態研究会 2016.8.20、砂防
会館別館(東京都・千代田区)

関節リウマチモデル(D1CC マウス)を用
い“炎症～骨破壊～合併症”の連鎖を探る、
金澤 智 免疫セミナー(中外製薬主催)口
頭発表(特別講演)、2015.5.22、ホテル日
航プリンス京都(京都府・京都市)

特発性間質性肺炎モデルマウスを用いた
薬剤スクリーニングシステム、金澤 智 科
学技術振興機構 新技術説明会、2014.9.30、
JST 東京別館(東京都・千代田区)

Bleomycin 肺繊維症モデルにおける血清
Surfactant Protein D による病態変動解析、
第17回間質性肺炎細胞分子病態研究会、金

澤 智、2015.8.23、砂防会館別館(東京都・
千代田区)

PAD4 天然変性領域をターゲットとした抗
PAD4 抗体による関節リウマチモデルマウス、
D1CC マウスを用いた治療検討、金澤 智、第
58回日本リウマチ学会総会・学術集会、
2014.4.24-26、グランドプリンスホテル新高
輪(東京都・港区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：間質性肺炎モデル動物及びその用途
発明者：金澤 智
権利者：名古屋市立大学
種類：特許
番号：特願 2015-49568
出願年月日：平成 27 年 3 月 12 日
国内外の別：国内

名称：新規抗 PAD4 抗体
発明者：金澤 智 他
権利者：横浜市立大学、名古屋市立大学、フ
ァーマフーズ
種類：特許
番号：特願 2015-044518
出願年月日：平成 27 年 3 月 6 日
国内外の別：国外

取得状況(計1件)

名称：間質性肺炎モデル及びその用途
発明者：金澤 智
権利者：名古屋市立大学
種類：特許
番号：特許 5888693 号
取得年月日：平成 28 年 2 月 26 日
国内外の別：国内

〔その他〕ホームページ

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/molgene.dir/staff.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 智 (KANAZAWA, Satoshi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・学内講
師

研究者番号：90347401

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者

佐藤 衛 (SATO, Mamoru)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・
教授

研究者番号：60170784

(4) 研究協力者：なし