

論文題目 High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis
(和訳) 抗環状シトルリン化ペプチド抗体、及び抗シトルリン化フィラグリン抗体の関節リウマチにおける臨床的意義について
指導教官 山本一彦 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 11 年 4 月入学
医学博士課程
内科学アレルギーリウマチ学専攻
氏名 鈴木健司

以下要旨

(緒言) 関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)は、多関節炎を特徴とする原因不明の自己免疫性疾患であり、その診断は、身体所見、骨レントゲン所見、そして血清リウマトイド因子(rheumatoid factor: RF)などで構成される診断基準に基づいて行われる。RF は RA 以外の疾患でも陽性になりうるが、総合的に RF を上回る血清マーカーはこれまでに報告されていない。

これに対して近年、シトルリン(citrulline)を含むエピトープを認識する抗体の RA 診断的有用性が注目されている。当初この抗体は、上皮細胞中の成分を認識する RA 血清に特異的な抗体、antiperinuclear factor として、1964 年に免疫染色で発見されていた。高い RA の特異性が注目されたが、RA での陽性率が RF よりも低かったことや、組織染色という手法ゆえの操作の煩雑さや再現性などの問題のため、一般の RA 診断に用いられることはなかった。その後、上皮細胞中のフィラグリン(filaggrin)という蛋白質にこの抗体が反応していること、更にフィラグリン内のアルギニン残基が peptidylarginine deiminase (PADI) による翻訳後修飾の結果シトルリン残基に変化(シトルリン化、citrullinated)した部分がエピトープであることが解明されると、recombinant filaggrin をシトルリン化して固相化した antifilaggrin antibody (AFA) ELISA や、合成環状シトルリン化ペプチドを固相化した anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP) ELISA が開発され、再現性のある抗体測定が容易となった。

過去の recombinant filaggrin を用いた AFA ELISA は、rabbit PADI で rat filaggrin をシトルリン化したものであるが、RA 診断性能の RF との直接比較は報告がない。また、2000 年に開発された anti-CCP の RA 診断能は、RF を上回る特異度を示すものの感度は劣ると報告されており、両者の優劣関係は明らかにされていない。2002 年以降の anti-CCP は第 2 世代(CCP2)と呼ばれており、以前と異なるペプチドを固相化して RA 診断能が向上したと開発者は学会報告しているものの、CCP2 と RF の RA 診断能の比較はこれまで医学論文上に報告されていない。更に、日本人を対象とした報告はこれまでにない。そこで本

て AFA ELISA を独自に作成し、anti-CCP の測定に CCP2 を用い、これらの RA 診断能を含めた臨床的有用性について日本人で初めての検討を試みた。

(方法) AFA ELISA は以下のように作成した。human skin cDNA をテンプレートとして RT-PCR によって filaggrin 遺伝子を増幅し、これをベクターに組み込み大腸菌に導入することで recombinant human filaggrin を発現させた。His-tag カラムでこれを精製した後 human PADI でシトルリン化し、これを各ウェルに固相化した。その後、陽性/陰性スタンダード血清またはサンプル血清を反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて発色させた。450nm 波長での吸光度(A450)を測定し、以下の計算式にて抗体価を定量化した。
$$([\text{サンプル血清 A450} - \text{陰性スタンダード血清 A450}] / [\text{陽性スタンダード血清 A450} - \text{陰性スタンダード血清 A450}]) \times 100 \text{ (index)}$$
。anti-CCP ELISA は、Axis-Shield 社(U.K.)の CCP2 を用いた。比較対照として、RF [latex-enhanced immunonephelometric assay] (Dede Behring 社、Germany)と matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) [ELISA] (The Binding Site 社、U.K.)を測定した。

anti-CCP や AFA と RA 疾患活動性との相関関係に関する報告はこれまでに無く、今回検討を試みた。疾患活動性を反映する因子として CRP (mg/dl)と血沈(mm/時)を測定し、これらと各血清マーカーとの相関関係を Spearman 順位相関で検定した。

健常者血清は 320 名から収集した。患者血清は、国内 5 病院から収集した。RA はアメリカリウマチ学会の分類基準を満たす症例 549 名であり、他のリウマチ性疾患(208 名)と共にリウマチ科医師により診断された患者を対象とした。

(結果)

健常者での CCP2、AFA の陽性率 健常者での CCP2、AFA の陽性率はそれぞれ 2.5%、2.2%であり、RF (3.1%)よりも若干低値であった。健常者において性別及び年齢別に関する測定値、陽性率には有意差が認められなかった。なお、カットオフ値は RA と他のリウマチ性疾患についての receiver operating characteristic (ROC)曲線から定まる値を用いた。

各血清マーカー測定値の患者群間の比較 RA と他のリウマチ性疾患の 2 群について、CCP2、AFA、RF、MMP-3 の測定値分布を比較した (図 1)。Mann-Whitney 検定によると全ての血清マーカーで 2 群の分布に有意差が認められたが、CCP2 や AFA は、RF や MMP-3 と比較して 2 群の測定値分布がより明瞭に分離されていた。

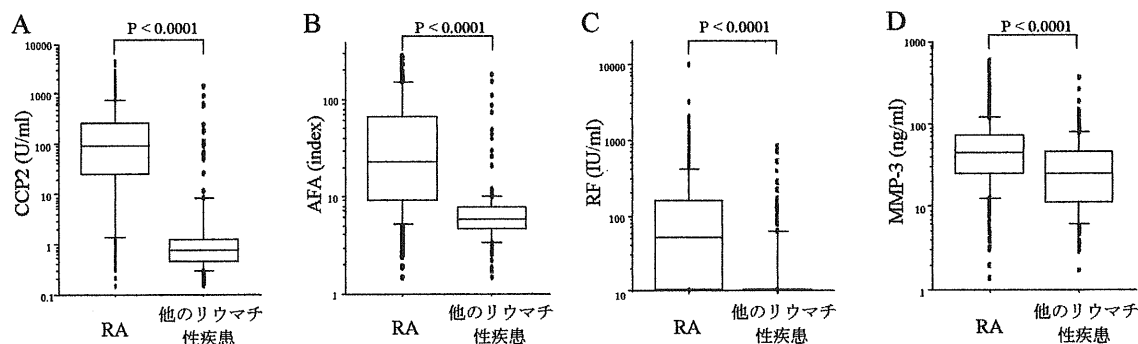


図 1) RA と他のリウマチ性疾患の CCP2(A)、AFA(B)、RF(C)、MMP-3(D)の測定値分布の比較。箱の中の線は中間値。箱の上下の線は上位 25%と下位 25%。ヒゲの部分は上位 10%と下位 10%。それより外側の実測値は点で示した。

各血清マーカーの感度・特異度の比較 RA と他のリウマチ性疾患についての感度・特異度を図2に示した。CCP2 と AFA のカットオフ値は RA と他のリウマチ性疾患の ROC 曲線から定まる値を用い、RF と MMP-3 については推奨値を使用した。CCP2 は感度・特異度ともに RF や MMP-3 を有意に上回っており、これらを上回る RA 診断性能を持つことが明らかになった。AFA の特異度は RF、MMP-3 を有意に上回るものの感度は逆に劣っており、感度・特異度の比較では AFA と RF や MMP-3 との優劣関係の判断は困難であった。CCP2 と AFA 間の比較では、感度は CCP2 が有意に優れるものの特異度は AFA が有意に優れており、両者の優劣関係は明らかにならなかった。なお、発症1年以内の早期 RA 患者に限定して検討した場合にも同様の結果が得られた。

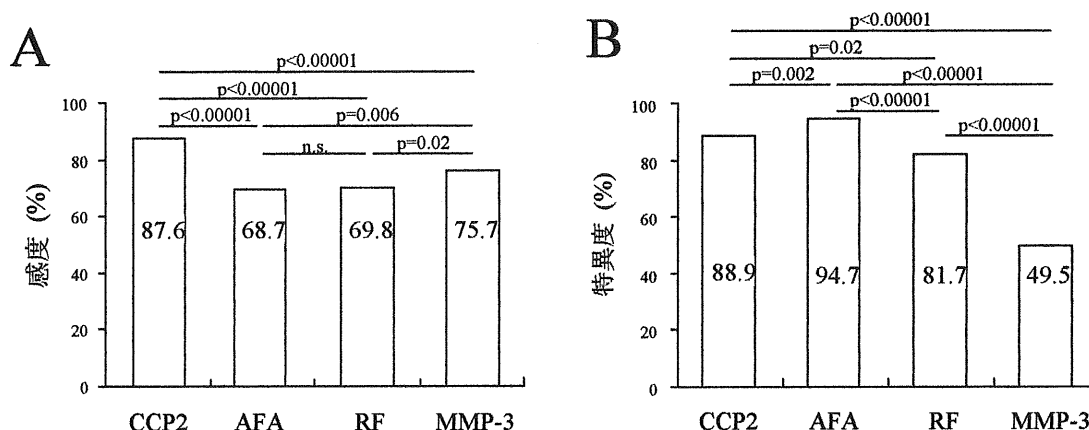


図2) 各血清マーカーの RA 診断に於ける、感度(A)と特異度(B)の比較 (McNemar's test). n.s.: not significant

ROC 曲線の比較 感度・特異度の比較で明らかにされなかった血清マーカー間の RA 診断性能の優劣関係を更に検討するために、RA と他のリウマチ性疾患についての ROC 曲線を作成した (図3)。MMP-3 については、男女で基準値が異なるために別々に曲線を作成し、女性の曲線のみを示した。一般的に、X 軸: 1 - 特異度、Y 軸: 感度として ROC 曲線を描いた場合には、左上の頂点(感度・特異度とも 100%の点)のより近くを通過するほど優れた検査と解釈できる。ROC 曲線の比較からは、CCP2 のみならず AFA も、RF や MMP-3 を凌ぐ RA 診断能を持つことが明らかとなった。また、CCP2 と AFA の比較では CCP2 が優れることが明らかとなった。

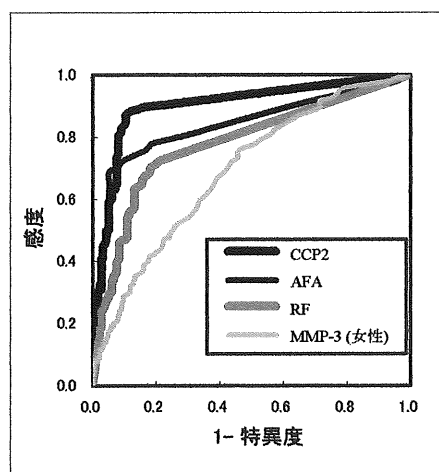


図3) RA と他のリウマチ性疾患についての ROC 曲線の比較

RA 疾患活動性との相関関係 何れの血清マーカーも RA 疾患活動性(CRP、血沈)との間に有意な正の相関関係が認められた。MMP-3 と疾患活動性との相関係数は 0.48~0.61 であり、最も強い相関関係を示した。CCP2 や AFA は、疾患活動性との相関係数が 0.21~0.27 と小さく、RF と疾患活動性との相関係数(0.27~0.28)と同程度であり、これら MMP-3 以外

の血清マーカーは疾患活動性との相関関係が弱いと考えられた。この結果、CCP2 や AFA は疾患活動性の指標には適さない可能性が示唆された。

(考察) recombinant human filaggrin を human PADI でシトルリン化して独自に作成した AFA ELISA、及び anti-CCP の測定に CCP2 を用いた、日本人を対象とする今回の研究では、これらが RF などの既存の血清マーカーを凌ぐ RA 診断能を持つことを、世界で初めて、それも大規模な多施設研究で明らかにできた。今回、RF を凌ぐ RA 診断性能が示された理由として、まず非常に RA 特異的であったことが挙げられる。健常者での陽性率は RF よりも更に低値であった。また、RA 以外のリウマチ性疾患に関しても、RF でのシェーグレン症候群(陽性率 43%)や、MMP-3 での全身性エリテマトーデス(陽性率 73%)のような、陽性率の高い特定の疾患がこの抗体では認められなかった。今回、anti-CCP や AFA の卓越性を示すことのできた 2 つ目の理由としては、異なる母集団であり単純な比較は出来ないものの、過去の報告に比べてこれらの RA での陽性率が RF と同等かそれ以上の値を示すほどに高かったことが挙げられる。独自に作成した AFA ELISA については、human 由来の filaggrin 及び PADI を用いたことが RA での陽性率向上に寄与した可能性が考えられる。一方 anti-CCP ELISA については、開発者の主張どおりに、今回使用した CCP2 が第 1 世代よりも RA 診断性能が向上しているものと考えられる。このように、固相化するペプチド/蛋白質の改良によって、anti-CCP や AFA は既存の血清マーカーよりも優れた RA 診断性能を獲得したものと考えられる。

シトルリンを含むエピトープを認識する抗体は上皮細胞のフィラグリンへの反応を契機に発見された自己抗体であるが、RA 患者における実際の対応抗原はフィラグリンではないことを支持する以下のような報告がある。RA の滑膜抽出液中の総免疫グロブリンに占める AFA の比率は血清中のそれよりも大きく、この抗体の滑膜での産生が推測されるものの、フィラグリンは滑膜では発現していない。その代わりに、RA 以外での滑膜には存在しないシトルリン化蛋白質が RA 滑膜には存在し、シトルリン化に必須な PADI も発現している。特に、RA 滑膜での存在が既に同定されているシトルリン化フィブリンについては、AFA 陽性 RA 患者の血清中の抗体がこれに反応するという。これらの報告は、RA の滑膜に出現したフィラグリン以外のシトルリン化蛋白質がこの抗体の真の抗原であり、RA ではこれに対する自己免疫反応が何らかの機序で惹起されているという可能性を示唆するものとして注目される。

CCP2 や AFA のエピトープで重要なシトルリン残基は、アルギニン残基の PADI によるシトルリン化によって出現することから、PADI はシトルリン化抗原の出現に、そしてこの抗体の産生に重要である可能性がある。4 種類の PADI のうち、type4 の遺伝子は RA の発症を規定することが近年明らかにされており、PADI type4 が RA の病因に何らかの形で関与する可能性を示唆するものとして注目されている。

今回の研究はシトルリンを含むエピトープを認識する抗体、CCP2、AFA の RA における臨床的有用性についての検討を国内で初めて行い、その RF を凌ぐ RA 診断的有用性を初めて明らかにした。この抗体と、その産生に関与すると考えられる PADI やシトルリン化蛋白質などの RA の病因・病態形成への関与を更に解明することが今後の課題であろう。