

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 : Quantitative analysis of peptidylarginine deiminase 4 and citrullinated fibrinogen in blood and synovial fluid samples and their clinical significance in rheumatoid arthritis

(和訳) 血液及び関節液中におけるペプジルアルギニン・デイミナーゼ 4、シトルリン化フィブリノーゲンの定量的解析及びそ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 15 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 瀧澤 泰伸

以下要旨

(緒言)

関節リウマチ(RA)は多発性対称性の慢性滑膜炎及びその結果としての骨関節破壊を特徴とする自己免疫疾患であるが病因は不明であり、診断は関節腫脹等身体所見、骨レントゲン所見及びリウマトイド因子(RF)等血清学的所見により行われる。

近年 RA 患者のゲノム上の一塩基遺伝子多型 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) を調べた研究により、RA 群で有意に高頻度に見られる SNPs として Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)が疾患関連遺伝子の候補として同定された。PADI はアルギニンをシトルリンに変換する酵素であり(図 1)、後述する抗シトルリン化ペプチド抗体(anti citrullinated peptide antibody, ACPA)との関連からも病因・病態に果たす役割が注目されている。PADI4 は主として骨髄、多核球や単球といった免疫・血液系細胞に発現を認め、PADI2 と同様 RA の炎症滑膜でその存在が確認されているが PADI4 が何を基質とし、どのような形で免疫反応の原因をなすシトルリン抗原の産生に関与しているかについては不明である。

一方臨床面でも近年 RA を診断する上で非常に有用な自己抗体が発見された。数十年の間 RA に認められる自己抗体として RF が広く用いられてきたが、RF は他の疾患でもしばしば検出され疾患特異性に乏しい問題があった。RA に特異的な自己抗体として antiperinuclear factor や抗ケラチン抗体が報告されていたが 90 年代に入りこれらの抗体

の標的がヒト表皮或いは頬粘膜・上皮細胞に発現するフィラグリンであることが分かり、その後エピトープにシトルリンが不可欠であることが分かった。現在はアルギニンにシトルリンに置換したペプチドライブラリーから RA 血清に高い抗原性を示す配列を組み合わせ、環状にした抗 CCP(cyclic citrullinated peptide)抗体 ELISA が優れた感度・特異度ゆえに広く利用され、また同抗体は病態形成や重症度とも関連すると報告されている。現在抗 CCP 抗体を含む ACPA が真に認識する抗原の探索が進められておりビメンチン、特にフィブリノーゲン (フィブリン) 等が候補として挙げられている。

2001 年 RA 炎症滑膜に沈着するフィブリ (ノーゲ) ンの (A) α 、(B) β 鎖がシトルリン化していることが報告され、シトルリン化による新規エピトープの獲得により同分子が自己抗原となる可能性が示された。この知見はシトルリン化フィブリノーゲン(cFBG)に対する抗体が抗 CCP 抗体に遜色ないレベルで RA 血清中に見出される事実によっても裏付けられる。

PADI4 の疾患感受性型では mRNA の安定化及び産生量増大が認められ、また通常は核内に存在するもののアポトーシスに伴い細胞質へ移行してくることが報告されており、本研究ではアポトーシスに際し PADI4 が最終的には細胞外に漏出しフィブリ (ノーゲ) ンをシトルリン化すると考えた。

以上をふまえ本研究では RA の病態に深く関与すると考えられる PADI4 と ACPA の標的抗原の有力な候補である cFBG の二者に着目し、PADI4,cFBG の両者を定量できる sandwich ELISA の構築を試み、実際に検体の定量的解析を行ったうえで RA の病態や病勢との関連につき検討した。また cFBG 由来のシトルリン含有ペプチドについて配列の相違により抗原性に差異があるか、RA 滑膜や関節液に過剰発現していると推測される PADI4 が自己抗原性を持ちうるかについて検討した。

(方法)

本研究で使用した検体は RA 血清 42 例 (27 例は血漿も採取)、全身性エリテマトーデス (SLE)血清 19 例、他のリウマチ性疾患血清 23 例、健常人血清 40 例、RA 関節液 15 例、変形性関節症(OA)関節液 5 例であり、全て倫理委員会の承認及び提供者の同意を得て採取した。

PADI4 に関する研究

Recombinant His-PADI4 をマウスに免疫した後脾臓のリンパ球とミエローマ細胞を融合させハイブリドーマを作成、PADI4 に高い親和性を示すモノクローナル抗体を選択し PADI4 を測定する sandwich ELISA を構築、検体を測定した。また PADI4 を固相化した ELISA、同抗原に対するウェスタンブロットにより PADI4 に対する自己抗体が存在するかを検討した。抗 PADI4 抗体の index は(PADI4 に対する検体の A450(450 nm に於ける吸光度)・検体の対照となる A450)/(PADI4 に対する陽性コントロールの A450 - 陽性コントロールの対照となる A450)x100 で表した。

シトルリン化フィブリノーゲンに関する研究

ヒトフィブリノーゲンを recombinant PADI4 あるいはウサギ PADI2 でシトルリン化し cFBG を作成した。また Non-citrulline コントロールとして nFBG(native fibrinogen)を用意した。

cFBG の A α 鎖由来で 16 番、252 番をシトルリンに置換したペプチドを合成し (R16Cit, R252Cit、図 2)、マウスに免疫しハイブリドーマを作成した。各々のペプチドに強く反応する抗体は ELISA のスクリーニングで非シトルリン・コントロールとも反応したため nFBG, cFBG に対するウェスタンブロット(WB)法によるスクリーニングを追加、cFBG に選択性の高い 2 クローンを選択した。(cF16.1, cF252.1)

cFBG を測定する sandwich ELISA として cF16.1, cF252.1 を固相化し、抗 modified citrulline 抗体(AMC)を検出に用いた系と抗ヒトフィブリノーゲン抗体(AFibA)を用いた系の 2 種類を作成し RA 関節液、OA 関節液、RA 血漿を測定した。cFBG が存在すると考えられた検体に関して cF16.1 による免疫沈降を行い WB でさらなる確認を行った。また検体中の cFBG 濃度と RA のマーカーの間に相関があるか検討を行った。

さらに、R16Cit, R252Cit に対する RA 血清の反応を ELISA 法で調べ 16 番、252 番のシトルリン化の程度に相違があるかを検討した。

(結果)

PADI4 sandwich ELISA 及び 抗 PADI4 抗体の有無の検討

PADI4 sandwich ELISA(感度 1.2 ng/ml)を作成し RA 血清、血漿、関節液の測定を 50 倍希釈で行ったが陽性と考えられるシグナルはなかった。

抗 PADI4 抗体の index の中間値(範囲)は RA で 80.1 (15.0-341.0), SLE で 58.5 (6.0-87.5), その他のリウマチ性疾患で 52.5 (1.5-75.0), 健常人で 38.8 (4.5-87.0)であり、RA は他の 3 群と比べ有意に高値であった。(p<0.05) (図 3)

ROC 解析に従い 72.0 をカットオフとすると RA42 人中 21 人(50%), SLE19 人中 2 人(10.5%),他のリウマチ性疾患 23 人中 1 人(4.3%), 健常人 40 人中 1 人(2.5%)が抗 PADI4 抗体陽性であり、RA において有意に陽性率が高かった。(p<0.001)

ELISA で抗 PADI4 陽性であった血清につき WB による評価を行ったが、15 例中 3 例でのみ陽性のバンドを認めた。

cFBG sandwich ELISA の構築、検体の測定及び免疫沈降と WB による cFBG の証明

cF16.1, cF252.1 を固相化し AMC を検出抗体とした系はシトルリンに特異的であり、また 1:50 血漿を加えても cFBG の標準曲線はほとんど影響を受けず (図 4)、高濃度の nFBG が干渉する臨床検体においても cFBG を検出しうると考えられた。

一方 AFibA を用いた系はフィブリノーゲンに対する特異性はあるが高濃度領域で nFBG とも交差反応しシトルリンへの特異性は不十分であった。(図 5)

cF16.1, cF252.1-AMC の感度はそれぞれ 16, 30 ng/ml であり、検体は全て 1:25 に希釈して測定、各々の陽性のカットオフ値を 400, 750 ng/ml とした。

cF16.1-AMC の系で RA 関節液 15 検体中 11 検体に陽性シグナルを認め、OA 関節液、RA 血漿ではシグナルを認めなかった (図 6)。RA 関節液の cFBG 濃度は 500 ng/ml から 15.2 µg/ml の範囲 (総フィブリノーゲン量に対し 0.21-2.5%) にあると推定された。

一方 cF252.1-AMC では RA 関節液 2 検体でのみ陽性シグナルがあり (RAS3,4)、濃度は 1.2, 1.7 µg/ml であった。(同検体は cF16.1-AMC で 8.7, 15.2 µg/ml であった。)

なお関節液の cFBG 濃度とペア血清における CRP、抗 CCP 抗体価との関連を調べたが有意な相関は見られなかった。(図 7)

また AFibA を用い nFBG との交差反応が消失する希釈倍率 1:400 で血漿、関節液を測定、AMC の系で陽性の RA 関節液は本系でも陽性であった。(表 1)

次に RA 関節液 3,4 を cF16.1 で免疫沈降し AFibA (図 8A) と AMC (図 8B) を用いた WB を行った。AFibA にて免疫沈降サンプルでは A α 、B β 、 γ 鎖の 3 位置にのみバンドを認めフィブリノーゲンを選択的に沈降していることが示され、また A α 、B β は AMC でも陽性であり、RA 関節液に cFBG が存在することを確認した。

RA 血清の R16Cit, R252Cit に対する反応

シトルリン残基だけでなく隣接するアミノ酸配列も RA 血清に対する抗原性を決定する上で重要であるが、RA 血清 36 例の R16Cit, R252Cit に対する抗体反応を ELISA で調べたところ反応のパターンに多様性を認めるものの RA 血清は R252Cit に比し R16Cit に有意に強い反応を示した。(p<0.05) (図 9)

(考察) 近年の SNPs 解析により PADI4 と RA には有意な関連性があることが示されている。PADI4 を発現する多核球・単球は RA 滑液中に高度に浸潤しており、また RA 滑膜において細胞がアポトーシスを起こしている部位で PADI4 が強く染色される。このアポトーシスの際遊離した PADI4 が関節液や血中で検出されるとの仮説をたて sandwich ELISA を構築し検体を測定したが明らかなシグナルは得られなかった。

PADI4 を中和する抗体が測定に干渉した可能性を検討するため行った実験により血清中に比較的 RA 特異的に PADI4 に対する自己抗体を検出した。細胞核内に局在し免疫系から隔絶されている PADI4 が RA では関節液や血中に流出することで免疫システムに認識されるためと推測される。一方で ELISA の感度不足の可能性も否定できず、今後より高感度な sandwich ELISA の構築が必要である。

現在までシトルリン化の報告がある体内抗原として皮膚のケラチン・フィラグリン、関

節ではフィブリン等が報告されているが、本研究においては初めて体液中に存在するシトルリン化抗原として cFBG の同定に成功した。cFBG は RA の血漿にはなく関節液でのみ検出され、cFBG の生成が ACPA と同様炎症関節で起きていることを確認した。

現在利用できるシトルリン、シトルリン含有ペプチドの検出方法には種々の問題点があり、本研究で作成した抗体も cFBG への強い選択性を示したものの部分的には nFBG にも反応を示した。なお本研究により化学修飾の際抗原抗体間に解離を生じうる強酸性の反応液に検体を晒すにもかかわらずグルタルアルデヒドによる強固な固定のため AMC を sandwich ELISA にも応用できることが分かり、今後シトルリン化抗原の研究を進める上で有用な手段を提示できたと考える。

cF16.1, cF252.1 とも ELISA の感度は同程度であったが cF16.1 に比べ cF252.1 は cFBG をよく検出できなかった。R16R(Cit)と違い R252R(Cit)の配列は FDP 等他のタンパクにも共有されるためシトルリン化 FDP 等が cF252.1 と結合し cFBG の検出に干渉した可能性もある。しかし一方で cF16.1 が高頻度に cFBG を検出し、また R16Cit に RA 血清が有意な反応を示したことはフィブリノーゲンの 16 番アルギニンがシトルリン化されている可能性を示唆している。同部位がトロンビンに認識されることでフィブリンへの重合が進むため、シトルリンへの置換により cFBG の重合は阻止され関節液中にとどまり免疫原性を持つ可能性がある。

本研究では cFBG は RA 関節液にのみ存在し OA では認めなかった。一方滑膜フィブリンのシトルリン化は RA だけでなく OA 等他の関節症でも共通に認められる。RA 炎症関節では凝固系が亢進しておりフィブリノーゲンは速やかにフィブリンへ変換されるため cFBG の生成には高濃度、高活性の PADI4 が必要と考えられる。一方でフィブリンは安定して存在するので細胞浸潤に乏しい OA でも緩徐にシトルリン化されうると考えられる。疾患感受性 SNP の影響もあり RA 滑液中の好中球からは十分に PADI4 が供給されることが考えられる。滑膜シトルリン化フィブリンと異なり仮に滑液の cFBG が RA のみに認められるならば cFBG が ACPA の真の標的抗原である可能性がある。

なお RA 感受性 HLA-DR では shared epitope (SE)と呼ぶモチーフの共有が知られているが、ACPA 陽性 RA では SE 陽性が多くまた SE 陽性 Class II 分子はシトルリン含有ペプチドに高親和性を持つとされており、SE と cFBG が関連しあって病態を形成している可能性がある。cFBG はまた滑液中で ACPA (抗 cFBG 抗体) と免疫複合体を形成し、炎症反応を促し関節破壊のエフェクターとして作用しているとも考えられる。

以上 PADI4 及び cFBG の定量的解析の結果と RA の病態をなす炎症や免疫反応の機構との関連につき考察した。今後は PADI4 がどのような形で抗原、特にフィブリノーゲンと出会いそのシトルリン化を引き起こすかのさらなる検討と、cFBG が RA 特異的な免疫反応に果たす役割の詳細な解析が必要である。

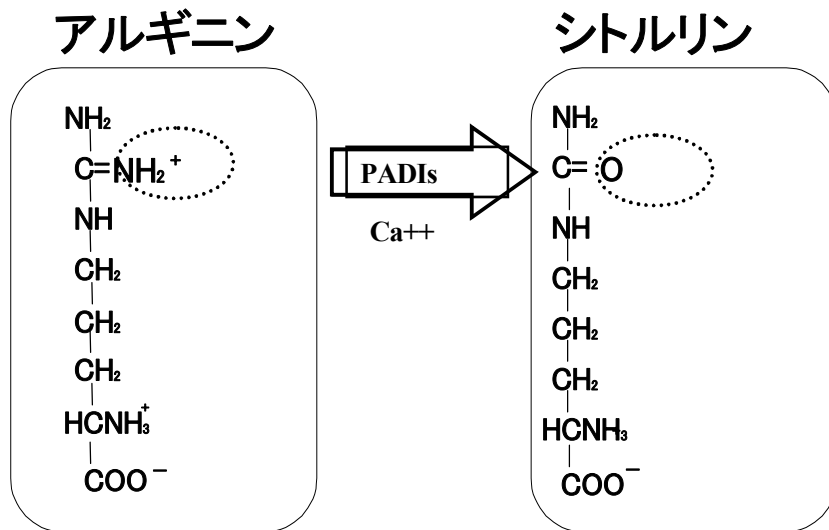


図 1 Peptidylarginine deiminases(PADIs)によるシトルリン化

PADIs は Ca イオンの存在下でペプチドに含まれるアルギニン残基をシトルリン化する。

Fibrinopeptide A

↓

1 MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADSGEGDFLAE***EGGGVR*GPRVV***ERHQ SACKDSDWPFCSDEDW
R16R R*→Cit: R16Cit

61 NYKCPSGCRMKGLIDEVNQDFTNRINKLKNLSLFEYQKNNKDSHSLTTNIMEILRGDFSSA
121 NNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRKVKIEKVQHIQLLQKNVRAQLVDMKRLEVDIDIKIRSC
181 RGSCSRALAREVDLKDYEDQQKQLEQVIKDLLPSRDRQHLPLIKMKPVPDLVPGNFKSQ
241 LQKVPPEWKALTDMPQMRMELERPG***GNEITR*GGSTS***YGTGSETESPRNPSSAGSWNSGSS
R252R R*→Cit: R252Cit

301 GPGSTGNRNP GSSGTGGTATWKPGSSGPGSTGSWNSGSSGTGSTGNQNP GSPRPGSTGTW
361 NPGSSERGSAGHWTSSESSVSGSTGQWHSESGSFRPDSPGSGNARPNPDWGTFFEEVSGNV
421 SPGTRREYHTEKLVTSKGDKELRTGKEKVTSGSTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVTK
481 EVVTSEDGSDCPEAMD LGT LSGIGTLDGFRHRHPDEAAFFDTASTGKTFPGFFSPMLGEF
541 VSETESRGSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPSRGKSSSYSKQFTSSTSYNRGDSTFESKS
601 YKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPVRGIHTSPLGKPSLSP

図2 フィブリノーゲン A α 鎖及び R16R(Cit), R252R(Cit)の配列

Fibrinopeptide A の開始点を矢印、配列を斜体で示す。R16R, R252R の配列は下線で示してあり、*のついたアルギニン残基(R)をシトルリン(Cit)に置換したものがR16Cit, R252Citである。

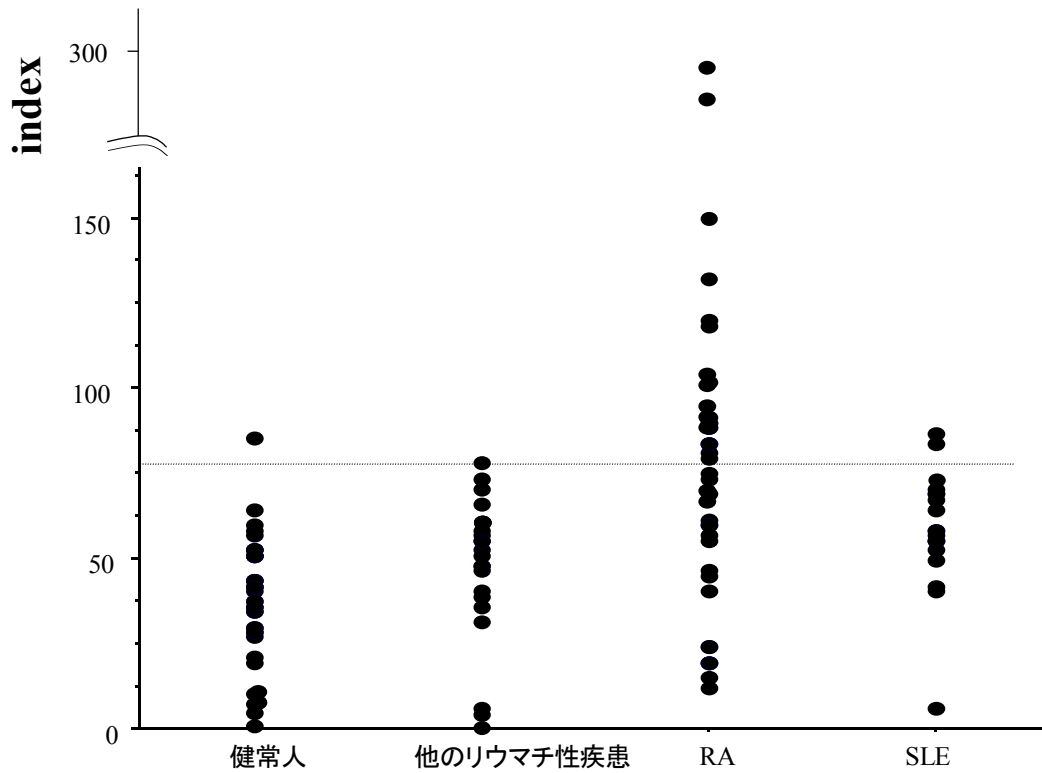


図3 PADI4 に対する抗体価 (ELISA)

縦軸の index は陽性コントロールに対する比 $\times 100$ で表している。ROC 解析によるカットオフ値は 72.0 であり、RA における陽性率は 50 % と SLE (10.5 %), 他のリウマチ性疾患 (4.3 %), 健常人 (2.5 %) 群に比し有意に高かった。(p<0.05)

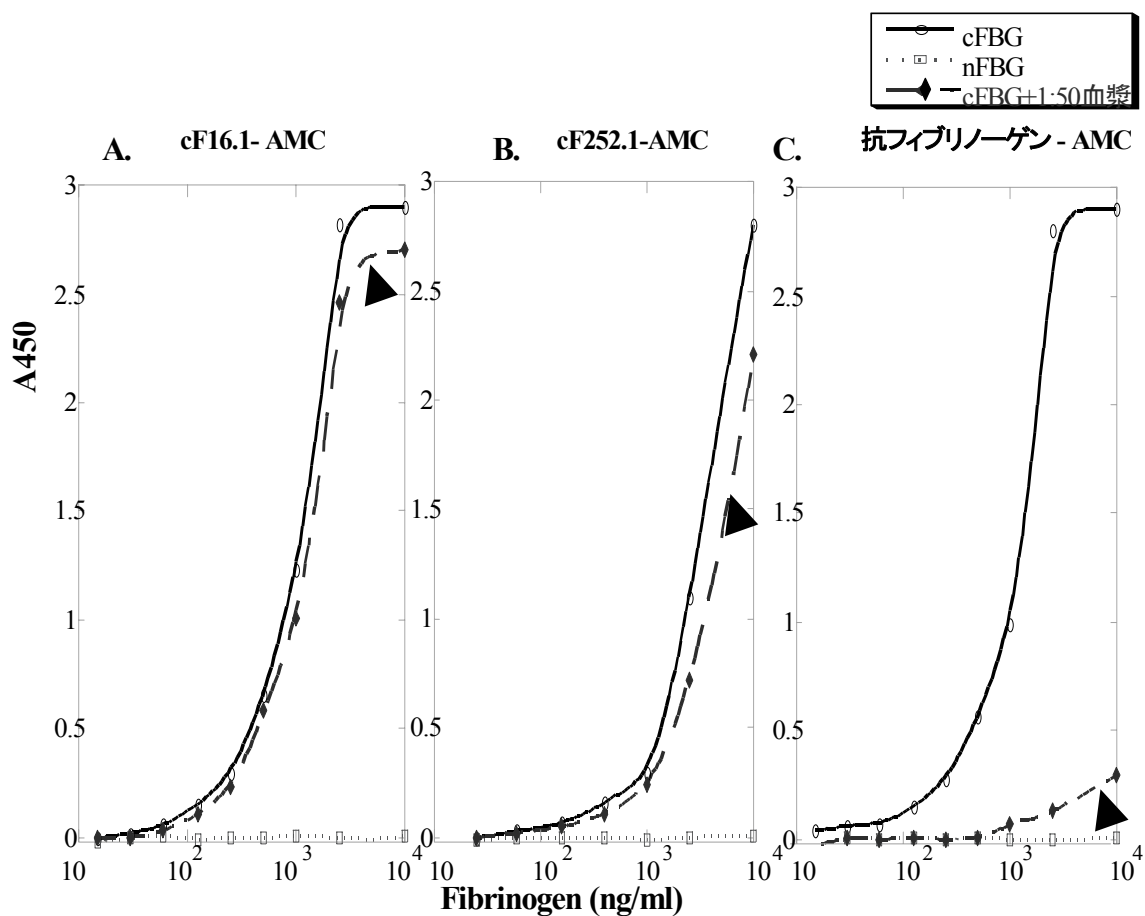


図4 AMCを検出抗体とするcFBG ELISAの標準曲線

AはcF16.1, BはcF252.1, コントロールとしてCは抗フィブリンノーゲン抗体を固相化した。nFBGとは反応せず、cFBGのみと反応することを確認した。高濃度のnFBGを含む1:50血漿を付加したところ▲で示したようにCでは抗フィブリンノーゲン抗体がcFBG, nFBG双方を認識するため血漿中のnFBGの干渉によりcFBGの認識能は大きく低下したがA,Bは血漿付加によっても標準曲線はほとんど影響を受けずcFBGを選択的に認識していた。

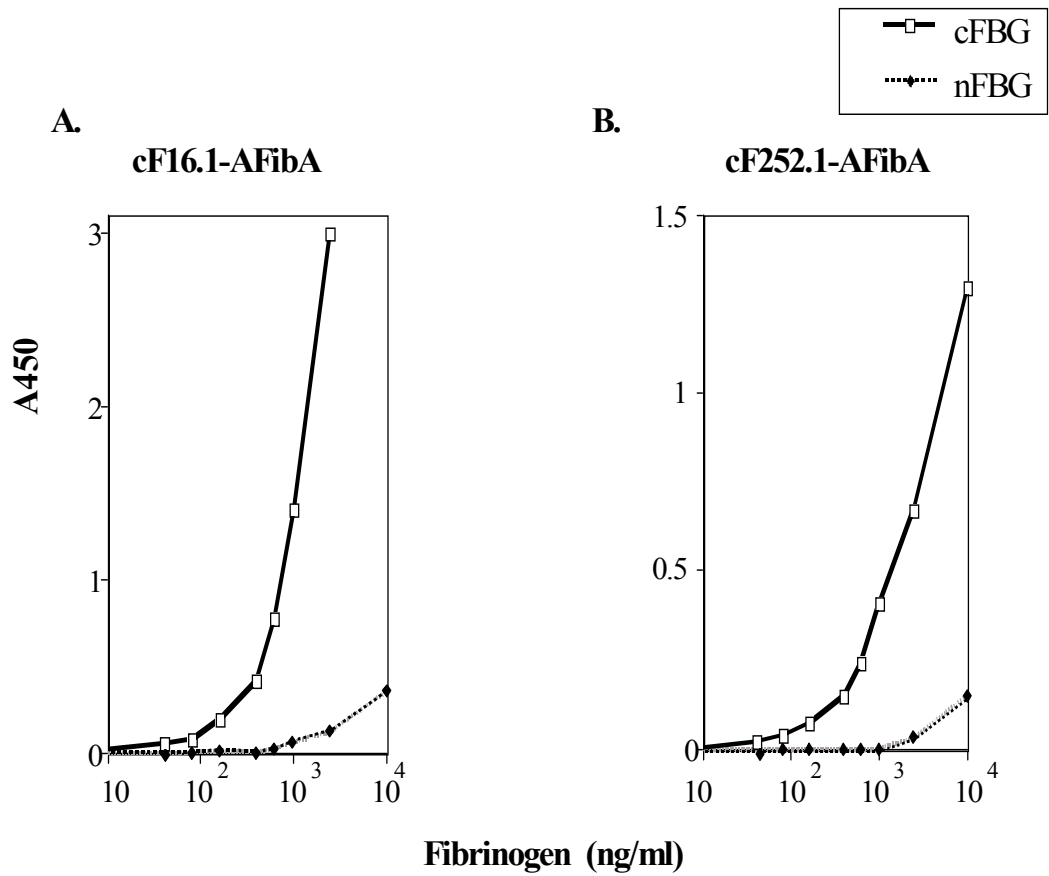


図5 抗フィブリノーゲン抗体(AFibA)を検出抗体とする cFibG ELISA の標準曲線
 cF16.1, cF252.1 とも cFibG をより選択的に認識しているが、高濃度領域においては nFibG とも交差反応を示した。

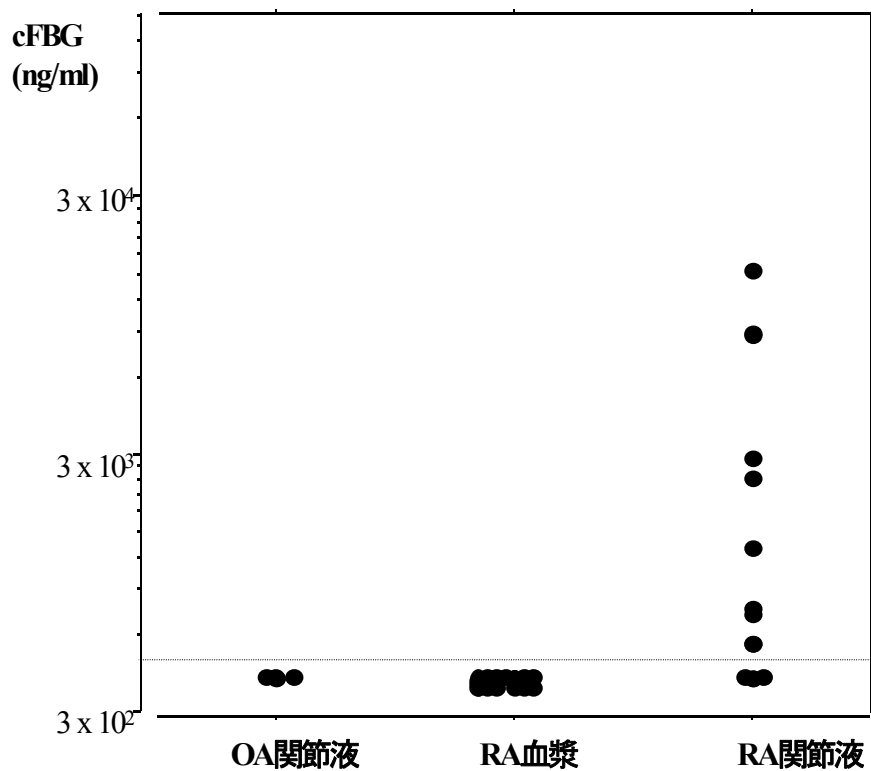


図 6 RA 血漿、関節液、OA 関節液の cFBG 濃度 (cF16.1-AMC ELISA)

RA 関節液 15 例中 11 例で cFBG 陽性と判断され、濃度は 500 ng/ml- 15.2 μ g/ml の範囲であった。RA 血漿、OA 関節液中には cFBG は認めなかった。

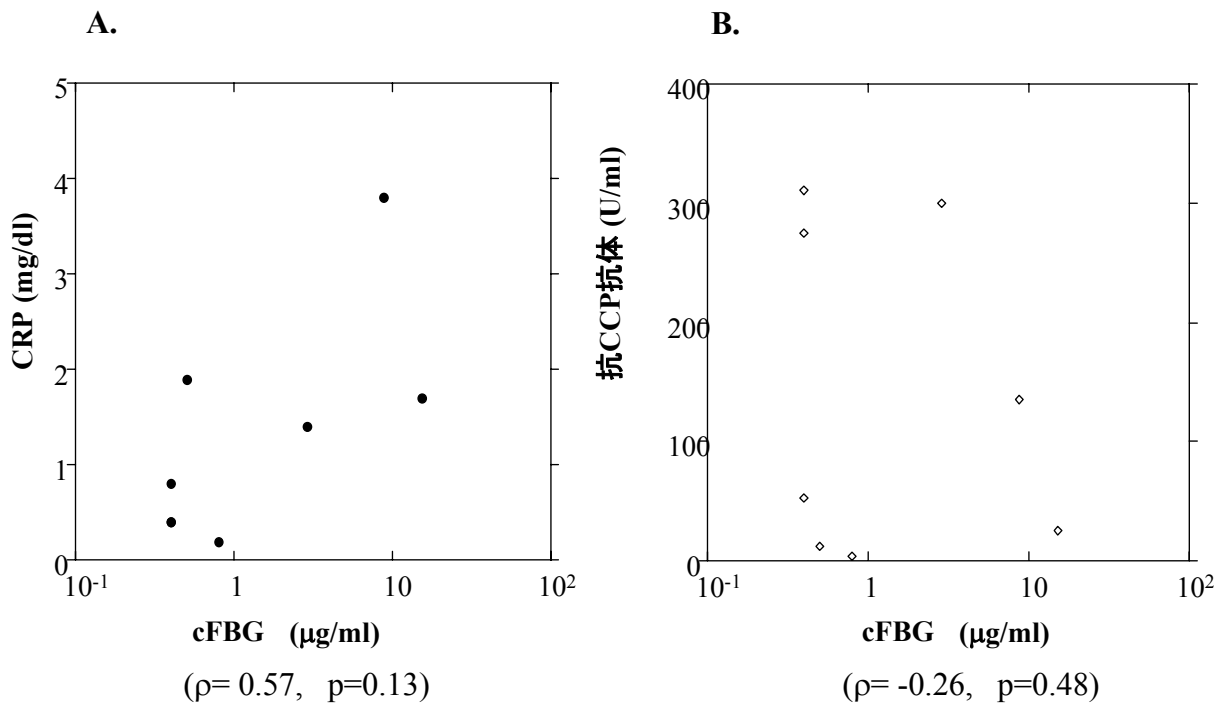


図7 関節液 cFBG 濃度とペア血清における CRP, 抗 CCP 抗体価の相関

計 8 例につき検討した。 ρ は Spearman の相関係数を表す。A, B いずれも有意な相関は認めなかった。

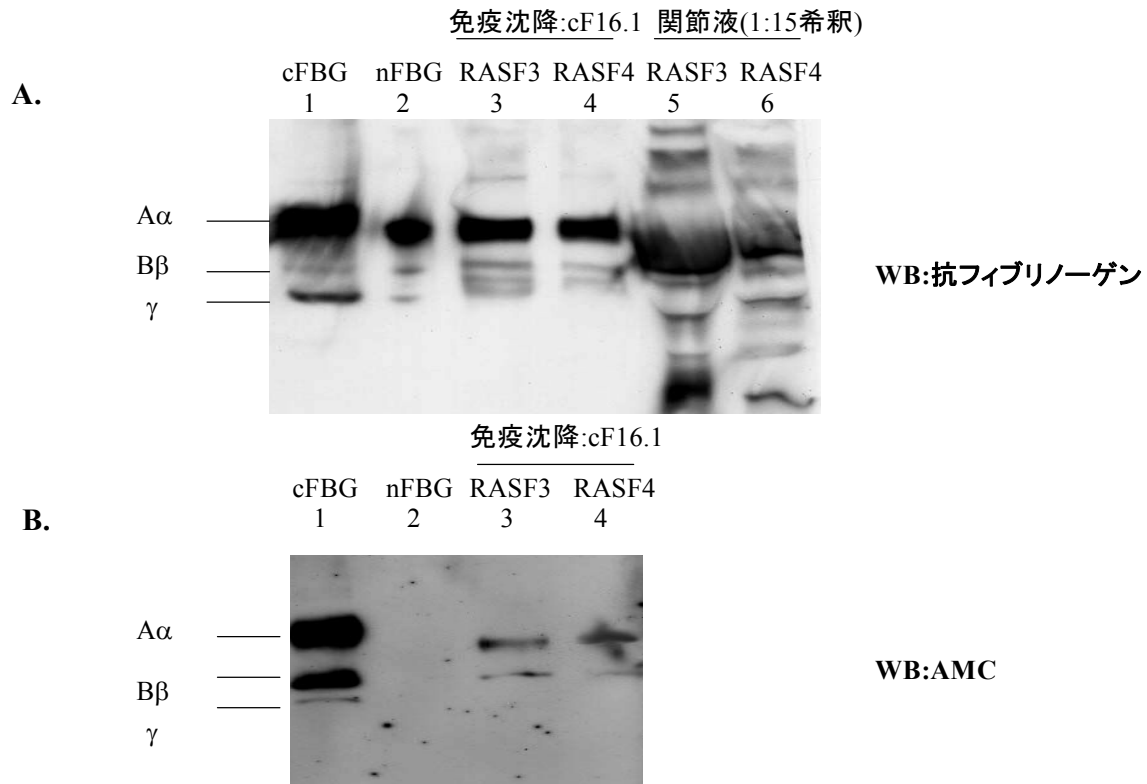


図 8 cF16.1 を用いた免疫沈降による RA 関節液中の cFBG の証明

cF16.1-AMC ELISA で cFBG 高値(8.7, 15.2 $\mu\text{g/ml}$)であった 2 検体 RASF3,4 を選択した。希釈した関節液では (図 A, レーン 5,6) フィブリノーゲン関連の多くのバンドを認めたが cF16.1 はフィブリノーゲンの A α , B β , γ 鎖を選択的に沈降していた (図 A, レーン 3,4)。また同じ免疫沈降サンプルにて AMC で A α , B β 鎖のシトルリン化を確認した(図 B)。これにより cF16.1 が RA 関節液で cFBG を認識していることが示された。

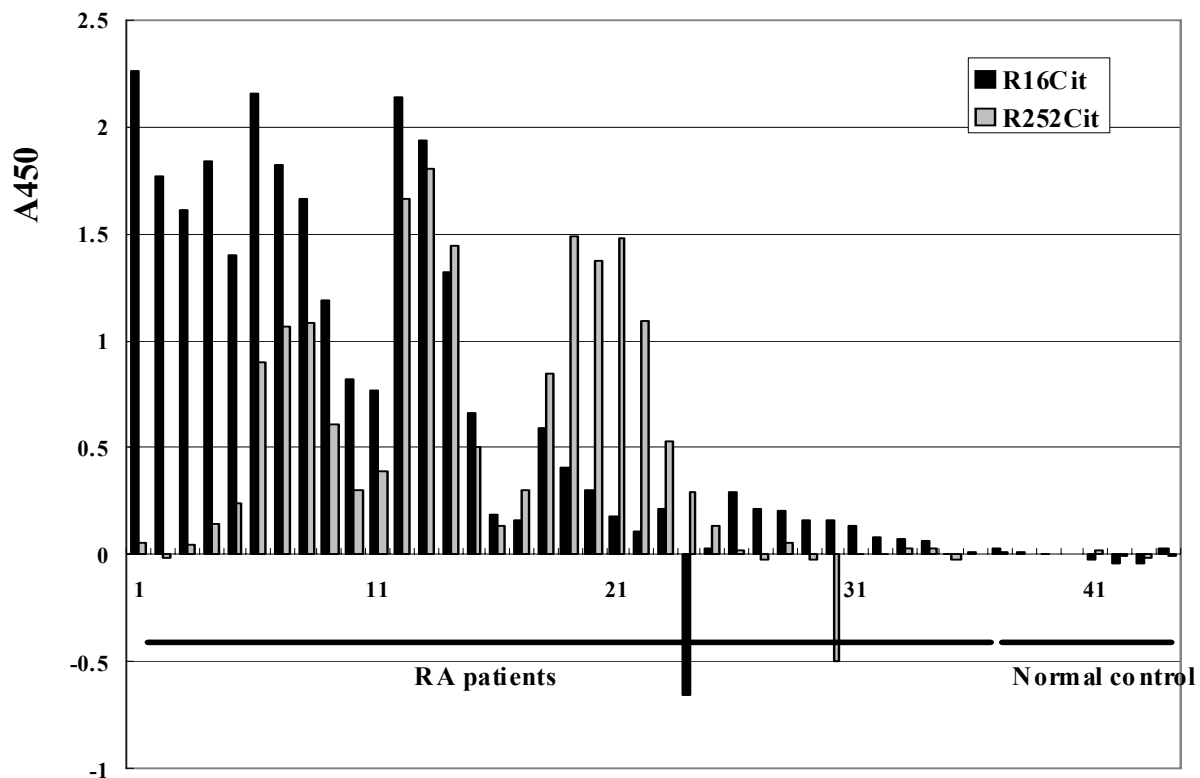


図 9 ELISA で検討した R16Cit, R252Cit に対する RA 血清の反応

RA 血清 36 例、健常人血清 8 例を 200 倍希釈して検討した。健常人では両ペプチドに対する反応はほとんど認めなかった。RA 血清の反応は検体により多様であったが、全体としては R252Cit に比べ R16Cit に対し有意に強い反応を認めた。(p<0.05)

検体	フィブリノーゲン (mg/dl)	cFBG ($\mu\text{g/ml}$)*	A450
RASF1	50.4	2.9	-0.02
RASF3	95.0	8.7	<u>0.15</u>
RASF4	55.8	15.2	<u>0.23</u>
RASF6	16.2	<0.4	-0.04
OASF4	9.3	<0.4	-0.03
健常人血漿	180.0	<0.4	-0.04
RA血漿18	378.0	<0.4	0.04 #
RA血漿19	320.0	<0.4	0.04 #

表 1 cF16.1-抗フィブリノーゲン抗体の系における血漿・関節液の測定

RASFはRA関節液、OASFはOA関節液。検体は1:400に希釈して測定した。#で示したようにnFBGを最も高濃度で含むRA血漿でシグナルは消失しており、当希釈度でnFBGの干渉は無視できると考えられる。

*cFBG濃度はcF16.1-AMC ELISAで測定したもの。CF16.1-AMC ELISAで陽性の検体は下線で示したように本系でも陽性を示した。