

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 瀧澤 泰伸

本研究は関節リウマチ(RA)の関連遺伝子である peptidylarginine deiminase 4 (PADI4), 及び RA に高い感度・特異度を持ちまた関節予後とも相関する自己抗体、抗シトルリン化ペプチド抗体(ACPA)の標的抗原と目されているシトルリン化フィブリノーゲン(cFBG)に着目し、sandwich ELISA の手法による RA 患者血液・関節液中の PADI4, cFBG の定量的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト血球由来 PADI4 cDNA より recombinant PADI4 の作成、また同抗原に対するマウスモノクローナル抗体の作成を行い、モノクローナル抗体同士の組み合わせにより sandwich ELISA を構築し、同系が recombinant PADI4 を 1.2 ng/ml と高感度で認識しまた標準曲線を描出できることを示した。
2. 1.で作成した sandwich ELISA では RA 血液・関節液中に PADI4 は認識されなかった。PADI4 の検出を阻害する因子として健常人、全身性エリテマトーデス等他のリウマチ性疾患群と比較する形で自己抗体の有無を検索したところ RA 血清 42 例中 21 例 (50%) で PADI4 に対する自己抗体を認めた。また特異度も 93 % と良好であり、RA 血清中に良好な感度・特異度をもって PADI4 に対する自己抗体が存在することを示した。
3. フィブリノーゲン A α 鎖の 16 番或いは 252 番アルギニンをシトルリンに置換し、同アミノ酸残基を中心となるように作成したペプチド(R16Cit, R252Cit)に対するマウスモノクローナル抗体(cF16.1 及び cF252.1)を作成した。作成したモノクローナル抗体は非シトルリン化フィブリノーゲン(nFBG)に比べ cFBG をより選択的に認識した。cF16.1, cF252.1 を固相化抗体、抗フィブリノーゲン抗体或いは抗 modified citrulline 抗体 (AMC)を検出抗体とする sandwich ELISA を構築し、抗フィブリノーゲン抗体を検出抗体とする系が nFBG に比べ cFBG を選択的に認識することを示し、また AMC を検出抗体とする系において nFBG は認識せず、また高濃度の nFBG の混入下でも nFBG の干渉をほぼ受けることなく cFBG を選択的に認識することを示した。

4. cF16.1 を固相化抗体、AMC を検出抗体とした cFBG sandwich ELISA にて RA 関節液に陽性シグナルを検出し、また抗フィブリノーゲン抗体を検出抗体に用いた系でも陽性となることを示した。他の RA の臨床マーカーである C 反応性蛋白(CRP)、抗環状シトルリン化ペプチド(CCP)抗体と sandwich ELISA の定量の結果につき関連の有無の検討を行ったが RA 関節液中の cFBG 濃度とペア血清中の CRP, 抗 CCP 抗体価との間に相関はなかった。cF16.1 とほぼ同感度であるにも関わらず cF252.1-AMC の系では cF16.1 と比べ陽性シグナルを呈した RA 関節液の例数は少なかった。また cF16.1 を用いた RA 関節液からの免疫沈降により sandwich ELISA で認識している抗原が cFBG であることを確認し、cFBG を体液中に存在する新規シトルリン化抗原として同定した。

以上、本論文は RA の関連遺伝子である PADI4 に対して RA 患者血清中に高い感度・特異度を持って自己抗体が検出されること、また RA 関節液中にシトルリン化フィブリノーゲンが存在することを明らかにした。本研究成果は未だ難治性疾患である RA の病因に深く関わると考えられ最近注目されている PADI4、シトルリン化抗原に関する新しい知見であり、今後の関節リウマチの研究の進歩に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。