

抗シトルリン化ペプチド抗体陰性関節リウマチ患者における新規自己抗体に関する研究

分担研究者： 三森 経世 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 教授
協力研究者： 大村 浩一郎 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 講師

研究要旨

抗 CCP 抗体陰性関節リウマチ(RA)はしばしば診断に苦慮し、治療開始が遅延し関節破壊が進行する。我々は抗 CCP 抗体陰性 RA の診断に有用な自己抗体の検索をビオチン化蛋白ライブラリーと AlphaScreen 法を用いてスクリーニングした。抗 CCP 抗体陰性 RA 血清には未知のシトルリン化蛋白に対する抗体が含まれており、今回は未知の抗シトルリン化蛋白抗体をスクリーニングした。まず抗 CCP 抗体陽性 RA 血清と反応する新規シトルリン化蛋白抗体を 186 個発見した。抗 CCP 抗体陰性 RA 血清と反応するシトルリン化蛋白は 14 個。うち 3 個を Western Blot および ELISA にて反応性、陽性率を検討した。シトルリン化蛋白①は 33 例の抗 CCP 抗体(-)RA 血清中 2 例に陽性となり、20 名の健常人では陰性であり診断の補助に用いられる可能性がある。

A.研究目的

抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗 CCP 抗体)は関節リウマチ(RA)の特異的自己抗体であるが、早期 RA での陽性率は 50%程度にすぎず、診断・治療の遅れから関節破壊の進行もまねく。今回我々は関節破壊を認める抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清中に抗 CCP 抗体 detection kit に含まれていない抗シトルリン化タンパク抗体(ACPA)が存在するという仮説のもとに、AlphaScreen 法を用いて ACPA を網羅的にスクリーニングし、抗 CCP 抗体陰性 RA の診断に役立つ抗体を検索する。

B.研究方法

AlphaScreen 法は2つのビーズが近接したときのみレザーを当てると化学発光するシステムで、本研究では Strepto-Avidin をコートした donor beads と血清と反応させた protein A-coated acceptor beads を用いる。ビオチン化蛋白ライブラリーに前記 beads を加え、その蛋白と反応する自己抗体が血清に含まれていればビーズが近接し発光す

るという方法である。2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーを一斉に PAD もちいて、シトルリン化し ACPA をスクリーニングする。

比較的関節破壊の強い 3 例の抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清と、対照として 4 例の抗 CCP 抗体陽性 RA および 3 例の健常人血清を用いて、非シトルリン化およびシトルリン化タンパクライブラリーに対して AlphaScreen を行った。

検証に用いた3つの蛋白(①、②、③)は市販のものを購入し、Western Blotting および ELISA に用いた。Western Blot ではスクリーニングで高い OD 値を示した 2 例の抗 CCP 抗体(+)RA と 1 例の膠原病患者、1 例の健常人を用いた。ELISA ではスクリーニングに用いた血清を除いて 30 例の抗 CCP 抗体(+)RA、30 例の抗 CCP 抗体(-)RA、22 例の膠原病、20 例の健常人の血清を用いた。

(倫理面への配慮)

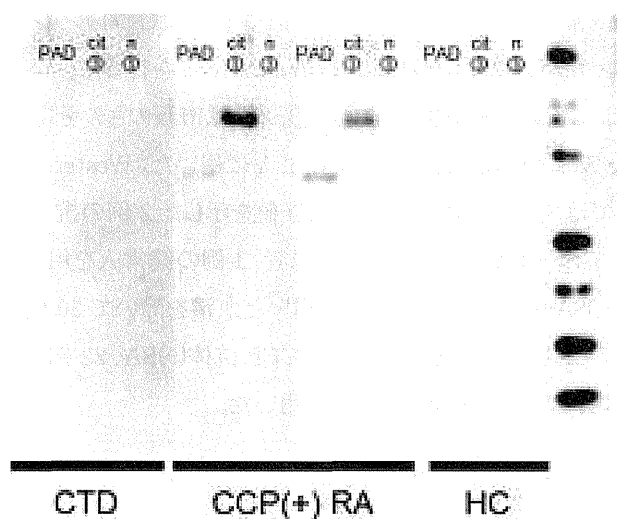
患者血清を用いる場合、個人情報かわからないようにするため、匿名符号を用いて実験および解析をした。

C.研究結果

実験ごとに AlphaScreen の OD 値のベースが多少異なるため、実験毎で各血清に対応する mock (20 well 以上) の OD 値を基に mean + 3SD を cut-off 値として設定した。抗 CCP 抗体陽性 RA 血清では明らかにシトルリン化蛋白に対する反応が強く、抗 CCP 抗体陽性 RA 血清 (4 検体) で陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 186 個、それに対して、抗 CCP 抗体陰性 RA 血清 (3 検体) では陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 14 個のみであり、健康人血清 (3 検体) では陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 9 個であった (表 1)。抗 CCP 抗体陰性 RA 血清で比較的高い OD 値を示し、健康人血清では陰性であった候補タンパクを 3 つ選び validation study を行った。まずは Western blot によりシトルリン化候補タンパクに対する自己抗体であることを確認した (図 1)。

次に、抗 CCP 抗体(-)RA 血清のうち 1 検体でも高い OD 値を示し、健康人では陰性であった蛋白を 3 個選び、ELISA 法にて抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例、抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例、他の膠原病患者 22 例、健康人 20 例を用いて、非シトルリン化蛋白およびシトルリン化蛋白に対する陽性率を検討した。

図1 シトルリン化候補タンパク③に対する自己抗体



候補タンパク③とそのシトルリン化したタンパク、またシトル

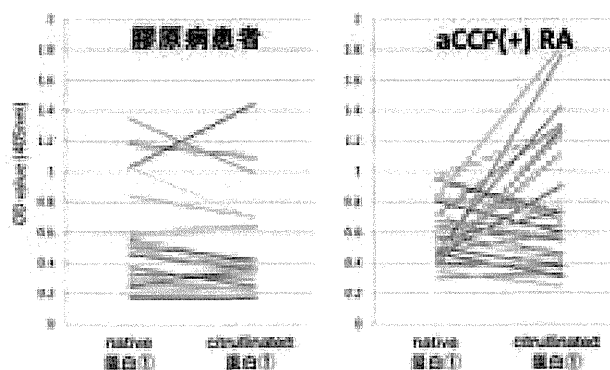
リン化した際に用いた酵素の PAD を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写したのち、抗 CCP 抗体陽性患者血清 2 検体、膠原病患者血清 1 検体 (CTD)、健康人血清 1 検体 (HC) と反応させ、Western Blot を行った。native 蛋白のバンドはないが、シトルリン化蛋白に対するバンドが強く認められる。抗 CCP 抗体(+)RA 患者血清は PAD に対する抗体も弱く認められている。

表 1 2181 個のシトルリン化蛋白中、自己抗体が検出された蛋白数

検体 (血清)	陽性蛋白数
抗 CCP 抗体(+)RA	186
抗 CCP 抗体(-)RA	14
健康人	9

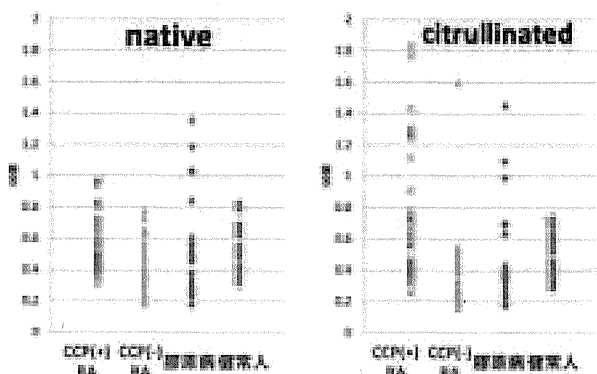
蛋白①に対する結果を図 2 と図 3 に示す。図 2 より膠原病患者の陽性例は主に native 蛋白に対する抗体で、RA 患者陽性例はシトルリン化蛋白に対する抗体であることがわかる。図 3 で抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例中 1 例に抗シトルリン化蛋白①抗体が認められたため、スクリーニングに用いた血清 3 例を加えると 33 例中 2 例で陽性ということになる。

図 2 native およびシトルリン化蛋白①に対する抗体価



膠原病患者 22 例、抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例の native 蛋白①とそのシトルリン化した蛋白①に対する抗体価を OD 値で示し、同じ患者血清を直線で結んだ。

図 3 各疾患、健康人での抗蛋白①抗体価



抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例、抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例、他の膠原病患者 22 例、健常人 20 例の native 蛋白①とそのシトルリン化した蛋白①に対する抗体価を OD 値で示す。

同様に蛋白②、蛋白③とそのシトルリン化した蛋白に対する自己抗体価を ELISA で確認した。シトルリン化蛋白②に対する自己抗体は抗 CCP 抗体陰性 RA30 例中 1 例に認められたが、これは native 蛋白に対する抗体であった。シトルリン化蛋白③に対する抗体は 30 例の抗 CCP 抗体(-)RA 患者血清中には認められなかった。

D. 考察

AlphaScreen 法を用いて、シトルリン化蛋白抗体が効率よくスクリーニング可能であることが示された。本方法の利点は翻訳後修飾を容易に行うことができ、それに対する自己抗体を容易に検出できることである。今後、カルバミル化蛋白抗体などの検出にも威力を発揮する可能性がある。

今回の検討で、新たなシトルリン化蛋白抗体を 186 個発見し、そのうち3個に対して Western blot と ELISA にて検証し、2 個が検証された。抗 CCP 抗体(-)RA 患者血清 31 例中 2 例にシトルリン化蛋白①に対する抗体が認められ、抗 CCP 抗体(-)RA 患者血清中にも、未知のシトルリン化蛋白抗体が存在することが示された。今後、残った 183 個の蛋白を検証することで、抗 CCP 抗体(-)RA の診断に役立つ自己抗体の組み合わせが見つかるものと期待する。

E. 結論

AlphaScreen 法が抗シトルリン化蛋白抗体のスクリーニングに優れていることが証明され、抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清中にも未知のシトルリン化蛋白抗体が存在することも示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. PLoS One. 2013, 8: e62231
- 2) Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K, Terao C, Okada Y, Wedrén S, Askling J, Yamanaka H, Momohara S, Taniguchi A, Ohmura K, Matsuda F, Mimori T, Gupta N, Kuchroo M, Morgan AW, Isaacs JD, Wilson AG, Hyrich KL, Herenius M, Doorenspleet ME, Tak PP, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Wolbink GJ, van Riel PL, van de Laar M, Guchelaar HJ, Shadick NA, Allaart CF, Huizinga TW, Toes RE, Kimberly RP, Bridges SL Jr, Criswell LA, Moreland LW, Fonseca JE, de Vries N, Stranger BE, De Jager PL, Raychaudhuri S, Weinblatt ME, Gregersen PK, Mariette X, Barton A, Padyukov L, Coenen MJ, Karlson EW, Plenge RM. Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis. PLoS Genet. 2013, 9: e1003394
- 3) Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M,

Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis – Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. PLoS One 2013, 8: e59341

RA? 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013 年（京都）国際ワークショップ（oral presentation）

4) Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. Arthritis Rheum. 2013, 65: 472-80

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

5) Terao C, Hashimoto M, Furu M, Nakabo S, Ohmura K, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Inverse association between air pressure and rheumatoid arthritis synovitis: an observational study. PLoS One 2014, 9: e85376

2. 学会発表

1) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Only rheumatoid factor-positive subset of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis seroconverts to anti-citrullinated peptide/protein antibody positive. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013 (poster presentation).

2) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Clinical characteristics of rheumatoid factor-positive or -negative subsets of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013 (poster presentation).

3) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Does anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody-negative rheumatoid arthritis (RA) become anti-CCP positive

関節リウマチの骨関節破壊進行関連因子の同定に関する研究

研究分担者	山中 寿	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授
研究協力者	猪狩 勝則	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 准教授
	吉田 進二	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助教

研究要旨

関節リウマチにおける骨関節破壊進行関連因子の同定は、関節リウマチ治療における関節破壊ゼロを目指す治療指針の確立において重要な意義を持つ。近年、欧米で白人を対象として行われたマルチコホート研究によって骨関節破壊進行に関連する遺伝子がいくつか報告されたが、日本人においても同様な関連が認められるかどうかは証明されていない。我々は IORRA コホート内で DNA を収集し得た約 2000 名の内、発症 5 年時の両手正面 X 線写真を Sharp/van der Heijde スコア (SHS) によりスコアリングした 865 名のサブコホートを有している。このデータを用いて候補遺伝子解析を行うことで、日本人関節リウマチ患者における骨関節破壊進行との関連を検討したが、いずれの SNP においても有意な関連を認めなかったことが明らかになった。

A. 研究目的

関節リウマチの治療薬および治療戦略の著しい進歩により、進行性の骨関節破壊の阻止が可能となつてはきているが、現状では治療強化前に骨関節破壊が進行し、不可逆的な変形による高度な身体機能障害を呈する患者も存在する。近年、欧米で白人を対象として行われたマルチコホート研究により骨関節破壊進行に関連する遺伝子がいくつか同定された。本研究の目的は日本人においても同様の関連が認められるかどうかを追認解析することで証明することである。

B. 研究方法

本研究は東京女子医科大学で実施中の IORRA コホート研究の一貫として実施した。骨関節破壊の評価には SHS (Sharp/van der Heijde score) を用い、発症 5 年目の両手正面 X 線写真が得られた 865 名の関節リウマチ患者を対象とした。これまでに欧米で報告された 6 ヶ所の遺伝子座

(IL-15、GZMB、IL2RA、Dkk-1、Sost、MMP-9) より 11 個の一塩基多型 (SNP) を選択し、ゲノタイピングを施行した。遺伝統計学的解析では発症 5 年目の両手 SHS を対数化して従属変数とし、各 SNP におけるリスクアレルの個数を独立変数とした (相互作用が報告されていた Dkk-1 と Sost についてはリスクアレルの合計個数を独立変数とした)。更に我々のコホート研究で過去に骨関節破壊進行との関連が証明された発症年齢、性別、抗 CCP 抗体、発症年度を調節因子として加えて重回帰分析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で想定されている研究内容に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」など関連する指針などに基づいて妥当性を適切に判断している。また、東京女子医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会において承認を得た上で、インフォームドコンセ

ントのもとに書面による同意を得て実施している。

rs4792909 0.40
(0.39)

C. 研究結果

rs10762715 Add 0.22 0.02 0.48

いずれの SNP においても有意な関連を認めなかった
(表 1、2)。

(0.37)

rs6503475 0.45
(0.43)

(表 1) IL-15、GZMB、IL2RA、Dkk-1、MMP-9 における各 SNP の重回帰分析による解析結果

D. 考察

Gene	SNP	Tested model	MAF (CEU)	β	P	
IL-15	rs6821171	Add	0.30	-0.02	0.49	関節リウマチにおいては多くの疾患感受性遺伝子が報告されているが、遺伝子の種類によっては人種差があることも証明されている。骨関節破壊に関連する遺伝子の報告は疾患感受性遺伝子と比べると少なく、未だに解明が十分ではない。今回、我々は白人で同定された遺伝子を候補とした解析を日本人で行ったが、いずれの遺伝子においても有意な関連を認めなかった。本研究の限界として発症 5 年目の両手正面 X 線写真におけるスコアを 5 年間の累積スコアとして代用しており、サンプル数も欧米で行われた研究と比較すると少ないため、検出力には限界があると考えられる。しかしながら遺伝子によっては作用方向も異なり、白人と日本人との間における遺伝的異質性の存在が示唆される。
		Rec	(0.21)	-0.03	0.37	
	rs1521761	Add	0.15	-0.04	0.24	
		Rec	(0.33)	0.02	0.63	
GZMB	rs8192916	Add	0.45	-0.01	0.79	
		Rec	(0.36)	-0.00	0.97	
IL2RA	rs2104286	Add	0.10	0.03	0.35	
		Rec	(0.25)	-0.00	0.99	
Dkk-1	rs1896368	Add	0.42	0.04	0.26	
		Rec	(0.51)	0.04	0.23	
	rs1896367	Add	0.30	-0.06	0.07	
		Rec	(0.37)	-0.04	0.20	
rs1528873	Add	0.22	-0.04	0.22		
	Rec	(0.42)	-0.01	0.74		
MMP-9	rs11908352	Add	0.18	-0.00	0.91	
		Rec	(0.26)	0.01	0.79	

E. 結論

白人で同定された骨関節破壊進行に関連する遺伝子はいずれも日本人では関連を認めなかった。骨関節破壊関連遺伝子については白人と日本人とでは遺伝的異質性が存在する可能性が高い。

(表 2) Dkk-1 と Sost の各 SNP の相互作用における重回帰分析による解析結果

Gene	SNP	Tested model	MAF (CEU)	β	P
Dkk-1 & Sost	rs1528873	Add	0.22	-0.01	0.85
			(0.42)		
	rs6503475		0.45		
	rs10762715	Add	0.22	-0.02	0.55
			(0.37)		

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K,

Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. *Nature*. 2013 Dec 25.

- 2) Lack of association between IL-15 genetic variants and progression of joint destruction in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Yoshida S, Ikari K, Yano K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. *Ann Rheum Dis*. 2013 Nov 22.
- 3) PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. *PLoS One*. 2013;8(4):e61045.

2. 学会発表

- 1) Lack of association between IL-15 genetic variants and progression of joint destruction in Japanese

rheumatoid arthritis patients. Yoshida S, Ikari K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. The 14th Annual European Congress of Rheumatology, The European League Against Rheumatism 2013.

- 2) Genetic association on disease severity in rheumatoid arthritis: a validation study in Japanese patients. Yoshida S, Ikari K, Yano K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. The 77th American College of Rheumatology/Associations of Rheumatology Health Professionals Annual Meeting 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

関節リウマチの PADI4 を標的とする治療法の開発

研究分担者 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授 山本 一彦

研究協力者 庄田 宏文 同 助教
瀬理 裕 同 大学院生
藤尾 圭志 同 講師
鈴木 亜香里 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター
自己免疫疾患研究チーム 上級研究員

研究要旨

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis:RA)は多因子疾患であり、その疾患感受性遺伝子として Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)が同定されているが、関節炎における意義は明らかとなっていない。今回 PADI4 の関節炎病態・骨破壊における役割を明らかとするため、PADI4 knockout (KO)マウスを作成した。Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)免疫による関節炎モデルでは、PADI4 KO マウスにおいて関節炎の重症度の低下がみられた。更に、顆粒球系細胞、単球系細胞の減少、抗 GPI 抗体価の低下、Th17 細胞の減少を認め、PADI4 が免疫系細胞に対して多様な影響を有していることが判明した。特に、PADI4 は顆粒球系細胞、単球系細胞での発現が強い遺伝子であり、PADI4 KO マウスではこれらの細胞群のアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。このことより、PADI4 は免疫系細胞のアポトーシスを制御するとともに、自然免疫・獲得免疫系に影響を与え、RA の病態に重要な役割を果たすことが明らかとなった、新たな創薬標的となりうると考えられた。

A.研究目的

RA は全身の関節に持続的な炎症をきたす疾患であり、炎症の持続により骨破壊、機能障害に至ることが知られている。RA は多因子疾患として知られているが、疾患感受性遺伝子として 2004 年に Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)が同定され、疾患感受性アレルでは mRNA 分解の低下が起こることにより PADI4 の発現亢進が起きることが分かっている。PADI4 は蛋白をシトルリン化する翻訳後修飾に関わる酵素であるが、シトルリン化抗原は RA の有力な自己抗原であり、また PADI4 発現は炎症関節局所で亢進していることから PADI4 が RA の病態に深く関与している可能性があると考えられている。一方で、PADI4 の生理学的機能研究では PADI4 はヒストンのシトルリン化などを介した転写調節により、細胞生存に関与

しているとの報告もある。PADI4 は免疫系においては好中球、単球やマクロファージに発現することが知られている。しかし、PADI4 の免疫系における機能については未知の部分が多く、PADI4 を標的とした治療法開発の為には PADI4 の関節炎における機能解析が必要である。

B.研究方法

PADI4 KO マウスを作成し、DBA/1J にバッククロスした。Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)を CFA と免疫することで炎症性関節炎を誘導し、関節炎スコア、病理スコアを経時的に測定した。免疫前、day7, day14 における骨髄、脾臓、関節における免疫系細胞の数、表現型を FACS Vantage を用いて解析した。一部の細胞は cell sorting により回収し、RNeasy Micro kit(Qiagen)を用いて

mRNA を合成したうえで、逆転写酵素(super script III (Invitrogen)) により cDNA 合成を行い、SYBR Green(Qiagen)を用いて定量的 PCR を行った。免疫後経時的に回収した血清を用いて、ELISA 法により抗 GPI 抗体価、IL-6 濃度を測定した。また、脾臓 CD4 陽性 T 細胞を MACS により単離したうえで、GPI で再刺激し、Th1, Th17 細胞への分化を FACS で測定した。また免疫前のマウス脾臓より CD4 陽性 T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、各種サイトカインによる Th1, Th17 condition で培養を行い、Th1, Th17 細胞への分化を FACS で測定した。

マウス骨髄細胞より Percoll を用いて単離した好中球を、TNF- α , LPS, GM-CSF, G-CSF をそれぞれ添加して培養し、24 時間後の細胞死(Annexin V+PI)を FACS で解析した。

マウス実験を行うに当たり、所属機関の承認を受けた動物実験計画書に従い、実験動物に対する倫理的配慮を最大限に行ったうえで、実験を施行した。

C. 研究結果

PADI4 KO マウスにおいて GPI 関節炎は有意に軽減された(平均スコア 10 vs 4: $p < 0.05$)。関節炎の発症については PADI4 KO マウスでやや遅れる傾向があったが最終的に有意差はみられなかった。病理学的検討では炎症細胞浸潤、骨破壊は PADI4 KO マウスで有意に軽度であった。PADI4 KO マウスにおいては、day14 における血清抗 GPI 抗体価(IgG, IgM)の減少、day7 以降の血清 IL-6 濃度の低下が観察された。また、GPI 関節炎では IL-6-IL-17 pathway の重要性が報告されているが(Iwanami K, et al. Arthritis Rheum, 2008)、PADI4 KO マウスでは day7 における脾臓 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化が抑制されていた。一方で、免疫前の細胞を in vitro で Th17 へ分化させた場合、WT, PADI4 KO CD4 陽性 T 細胞で Th17 分化の程度は不変であったため、PADI4 KO GPI 関節炎における Th17 細胞減少に関しては、T 細胞への extrinsic な影響が示唆された。

脾臓、所属リンパ節の総細胞数は GPI 免疫後に増加するが、PADI4 KO マウスでは有意に増加が低下していた。細胞別の解析では、CD3+T 細胞数、B 細胞数に差を認めなかったが、CD11b+Ly6G+の顆粒球系細胞、Ly6C+の単球系細胞の PADI4 KO マウスにおける有意な減少が認められた。骨髄における検討では、GPI 免疫前、免疫後でも WT, PADI4 KO で顆粒球系細胞、単球系細胞の細胞数に差を認めなかった。Day14 の炎症関節では、顆粒球系細胞の有意な減少を認めた。これらの細胞群のアポトーシス関連遺伝子の発現を定量的 PCR で検討したところ、PADI4 KO マウスにおいて Bcl-2, Bim, Bax, Bid などのアポトーシス関連遺伝子の発現が亢進していた。また骨髄好中球の in vitro におけるアポトーシスの検討では、いずれの条件においても PADI4 KO 好中球のアポトーシスが WT と比較して有意に亢進していた。

D. 考察

従来、PADI4 は自己抗原のシトルリン化による抗原性的変化と、それに引き続いて起こるシトルリン化抗原自己免疫応答の誘導に関与することで RA の病態に重要であると考えられてきた。一方で、PADI4 には neutrophil extracellular traps (NET)の形成に関与する(Li P, et al. J Exp Med, 2010)、骨髄幹細胞の分化に影響する(Nakashima K, et al. Nat Communication. 2013)といった免疫系へ影響を与えることが推定される生理的な作用があることが相次いで報告されている。

PADI4 KO マウスにおける関節炎モデル研究により、PADI4 が顆粒球系細胞・単球系細胞の生存、Th17 細胞の分化、抗体産生といった自然免疫・獲得免疫の幅広いシステムを制御していることが判明した。今回使用した GPI 関節炎モデルは IL-6-IL-17 pathway の重要性が証明されているモデルであり、PADI4 KO マウスの関節炎軽症化の機序としては in vivo における Th17 細胞分化の減少が関与している可能性がある。また GPI 関節炎における IL-6 の産生細胞としては CD11b 陽性細胞と報告されており、今回我々が細胞数の減少を証明した顆粒球系

細胞・単球系細胞が IL-6 産生を担っている可能性を考慮している。

以上のような PADI4 KO マウスでの知見より、PADI4 阻害薬は RA 治療薬となりうると考えられる。実際、腫瘍研究において PADI4 阻害作用のある小分子化合物の報告がなされつつあり、ヒトにおける副作用を見極めたうえで、の RA 治療への応用も期待される。

E. 結論

PADI4 KO マウスを作成し、GPI 関節炎モデルを用いて、PADI4 の炎症性関節炎における機能解析を行った。PADI4 欠損により自然免疫系・獲得免疫系に幅広い影響が観察され、関節炎が軽症化された。PADI4 阻害療法は RA 治療の新たな戦略となることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de

Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature. 2013. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

瀬理 祐, 山本 一彦ら. 関節リウマチの疾患感受性遺伝子である PADI4 の関節炎モデルマウスを用いた機能解析. 第 41 回日本臨床免疫学会総会(平成 25 年 11 月 27 日、下関)

Seri Y, Yamamoto K, et al. Peptidyl arginine deiminase type 4 deficiency suppresses the development of rhGPI induced arthritis. 第 42 回日本免疫学会総会(平成 25 年 12 月 12 日、千葉幕張)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【IV】 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, <u>Tanaka Y.</u>	The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells.	Ann Rheum Dis		in press	
<u>Tanaka Y.</u> , Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K.	Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study.	Ann Rheum Dis		in press	
<u>Tanaka Y.</u>	Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal ?	Ann Rheum Dis	72	ii124-ii127	2013
<u>Tanaka Y.</u> , Maeshima Y, Yamaoaka K.	In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis.	Ann Rheum Dis	71	i70-i74	2012
Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, <u>Tanaka Y.</u>	Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation.	J Allergy Clin Immunol	129	1594-1601	2012
Koike T.	IgG4-related disease: why high IgG4 and fibrosis.	Arthritis Res Ther	15(1)	103	2013
Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Hartmut K, Vipin A, and <u>Tanaka Y.</u>	Adalimumab, a Human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early RA; the HOPEFUL 1 study.	Ann Rheum Dis		in press	
Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T	Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis.	PLos One	8(5)	e62231	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T	Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database.	PLoS One	8(3)	e59341	2013
Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K.	Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- β 1 expression and the regulatory activity of CD4- positive T cells in vivo.	J Immunol	191(5)	2351-9	2013
Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K	Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1- mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4+ T cells.	Eur J Immunol	43(4)	1063-73	2013
Kawashiri SY, Arima K, Suzuki T, Nakashima Y, Horai Y, Okada A, Tamai M, Nakamura H, Kawakami A.	Presence of ultrasound subclinical synovitis and increment of serum vascular endothelial growth factor in a patient with rheumatoid arthritis achieved in sustained clinical remission by treatment with adalimumab and methotrexate	Mod Rheumatol	in press		
Kawashiri SY, Fujikawa K, Nishino A, Suzuki T, Okada A, Nakamura H, Kawakami A.	Usefulness of ultrasonography-proven tenosynovitis to monitor disease activity of a patient with very early rheumatoid arthritis treated by abatacept.	Mod Rheumatol	23(3)	582-586	2013

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kita J, Tamai M, Arima K, Kawashiri SY, Horai Y, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Nakashima Y, Suzuki T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, <u>Kawakami A.</u>	Significant improvement in MRI-proven bone edema is associated with protection from structural damage in very early RA patients managed using the tight control approach.	Mod Rheumatol	23(2)	254-259	2013
Satomura K, Torigoshi T, Koga T, Maeda Y, Izumi Y, Jiuchi Y, Miyashita T, Yamasaki S, <u>Kawakami A</u> , Aiba Y, Nakamura M, Komori A, Sato J, Ishibashi H, Motokawa S, Migita K.	Serum amyloid A (SAA) induces pentraxin 3 (PTX3) production in rheumatoid synoviocytes.	Mod Rheumatol	23(1)	28-35	2013
玉井慎美, <u>川上 純.</u>	MRI画像の特徴と早期診断・治療評価.	Mebio	30(2)	16-20	2013
Ikeda K, Seto Y, Narita A, kawakami A, Kawahito Y, Ito H, Matsushita I, Ohno S, Nishida K, Suzuki T, Kaneko A, Ogasawara M, Fukae J, Henmi M, Sumida T, Kamishima T, <u>Koike T.</u>	Ultrasound assessment of synovial pathologic features in rheumatoid arthritis using comprehensive multi-plane images of the 2nd metacarpophalangeal joint - Identification of the components which are reliable and influential on the global assessment of the whole joint.	Arthritis Rheum	in press		
Takamura A, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Seto Y, Atsumi T, Dohi M, <u>Koike T</u> , Miyasaka N, Harigai M.	A retrospective study of serum KL-6 levels during treatment with biological disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis patients: a report from the Ad Hoc Committee for Safety of Biological DMARDs of the Japan College of Rheumatology.	Mod Rheumatol	23(2)	297-303	2013
<u>上阪 等</u>	関節リウマチ制圧に向けた新しい抗リウマチ薬の発見	お茶の水医学雑誌	61	385-393	2013

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Gazal S, Sacre K, Allanore Y, Teruel M, Goodall AH, Tohma S, Alfredsson L, Okada Y, Xie G, Constantin A, Balsa A, Kawasaki A, Nicaise P, Amos C, Rodriguez-Rodriguez L, Chioccia G, Boileau C, Zhang J, Vittecoq O, Barnette T, Gonzalez-Gay MA, Furukawa H, Cantagrel A, Le Loet X, Sumida T, Hurtado-Nedelec M, Richez C, Chollet-Martin S, Schaeffer T, Combe B, Khoryati L, Coustet B, El-Benna J, Siminovitch K, Plenge R, Padyukov L, Martin J, Tsuchiya N, Dieud P.	Validation of EULAR primary Sjogren's Syndrome disease activity and patient indexes.	Ann Rheum Dis			in press
Yoon J, Sudo K, Han J, Chae M, Park S, Weinstein M, Nakae S, Yamashita T, Lee, Sumida T, Kuroda M, Mamura M.	Smad2 is the TGF- β receptor-regulated Smad to suppress the immunogenicity of mouse and human dendritic cells.	Eur J Immunol			in press
Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, Mamura M.	Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes.	EMBO Mol Med	5	1720-39	2013
Umeda N, Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, Sumida T.	Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles and disease activity.	Clin Exp Immunol	172	44-53	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki T, Horikoshi M, Sugihara M, Hirota T, Ogishima H, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T.	Therapeutic efficacy of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor inhibitors: One year follow-up by low-field extremity MRI.	Mod Rheumatol	23	782-7	2013
Nishimoto N, Koichi Amano, Tsutomu Takeuchi, Nobuhiro Takagi, et al.	Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence (RESTORE) study.	Mod Rheumatol	24	26-32	2014
Kaneko Y, Kondo H and Takeuchi T.	ACR/EULAR remission criteria maintains strict performance when evaluated in 44 joints.	J Rheumatology	40	1254-8	2013
Nishina N, Kaneko Y, Kameda H, Kuwana M, and Takeuchi T.	Reduction of plasma IL-6, but not TNF- α by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression.	Clinical Rheumatol	32	1661-7	2013
Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, T, Baker D, and the GO-MONO study group. Et al.	Golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-MONO study through 24 weeks.	Ann Rheum Dis	72	1488-95	2013
Nishina N, Kikuchi J, Hashizume M, Yoshimoto K, Kameda H, and Takeuchi T.	Baseline levels of soluble interleukin-6 receptor predict clinical remission in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: implications for molecular targeted therapy.	Ann Rheum Dis	in press		
Nakashima R, Imura Y, Hosono Y, Seto M, Murakami A, Watanabe K, Handa T, Mishima M, Hirakata M, Takeuchi T, Fujio K, Yamamoto K, Kohsaka H, Takasaki Y, Enomoto N, Suda T, Chida K, Hisata S, Nukiwa T, Mimori T.	The Multicenter Study of a New Assay for Simultaneous Detection of Multiple Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetases in Myositis and Interstitial Pneumonia	PLoS One	9	e85062	2014

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K, Terao C, Okada Y, Wedrén S, Askling J, Yamanaka H, Momohara S, Taniguchi A, Ohmura K, Matsuda F, <u>Mimori T</u> , Gupta N, Kuchroo M, Morgan AW, Isaacs JD, Wilson AG, Hyrich KL, Herenius M, Doorenspleet ME, Tak PP, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Wolbink GJ, van Riel PL, van de Laar M, Guchelaar HJ, Shadick NA, Allaart CF, Huizinga TW, Toes RE, Kimberly RP, Bridges SL Jr, Criswell LA, Moreland LW, Fonseca JE, de Vries N, Stranger BE, De Jager PL, Raychaudhuri S, Weinblatt ME, Gregersen PK, Mariette X, Barton A, Padyukov L, Coenen MJ, Karlson EW, Plenge RM.	Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis.	PLoS Genet	9	e1003394	2013
Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, <u>Mimori T</u> .	PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population.	Arthritis Rheum	65	472-80	2013

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, <u>Mimori T</u> , Matsumoto I, Sumida T.	Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjögren's syndrome in Japanese patients.	Mod Rheumatol	23	219-25	2013
Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, <u>Mimori T</u> .	Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database.	PLoS One	8	e59341	2013
Yoshida S, Ikari K, Yano K, Toyama Y, Taniguchi A, <u>Yamanaka H</u> , Momohara S.	Lack of association between IL-15 genetic variants and progression of joint destruction in Japanese patients with rheumatoid arthritis.	Ann Rheum	in press		
Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, <u>Yamanaka H</u> , Momohara S.	PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study.	Plos One	in press		
Seto Y, Inoue E, Shidara K, Hoshi D, Sugimoto N, Sato E, Tanaka E, Nakajima A, Taniguchi A, Momohara S, <u>Yamanaka H</u> .	Functional disability can deteriorate despite suppression of disease activity in patients with rheumatoid arthritis: a large observational cohort study.	Mod Rheumatol	23	1179-85	2013

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamanaka H, Seto Y, Tanaka E, Furuya T, Nakajima A, Ikari K, Yaniguchi A, Momohara S.	Management of rheumatoid arthritis:the 2012 perspective	Mod Rheumatol	23	1-7	2013
Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlgvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM.	Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.	Nature	506	376-381	2013
Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K.	Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1- mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4+ T cells.	Eur J Immunol	43	1063- 73	2013

【V】 班会議プログラム