

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 の約半数は抗 CCP 抗体陰性であり、診断がしばしば困難である。診断の遅れが関節破壊につながるため、抗 CCP 抗体陰性 RA の特異的な診断マーカーが求められている。今回我々は AlphaScreen 法と呼ばれる自己抗体の網羅的スクリーニング法を用いて抗 CCP 抗体陰性 RA の自己抗体のスクリーニングを行った。native 蛋白に対する抗体と未知のシトルリン化蛋白に対する抗体の両方をスクリーニングした。多くの native 蛋白に対する抗体は健常人でも認められることが判明。健常人コントロールにおいて再検索し、14個の未知のシトルリン化蛋白が候補対応抗原としてあがり、そのうち2個が頻度は少ないながら新規自己抗体として明らかになった。

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をまねく。本研究では抗 CCP 抗体陰性 RA の診断に有用な新規自己抗体を検索する。

B. 研究方法

まず、一般に抗 CCP 抗体陰性 RA は骨破壊が少ないと考えられがちであることから、最重症型 RA である全身性ムチランス型 RA 患者における抗 CCP 抗体の陽性率を調査した。

自己抗体のスクリーニングには AlphaScreen 法を用いた。AlphaScreen 法は愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターにて開発された無細胞合成蛋白質アレイによる自己抗体検索スクリーニング法であり、2つのビーズが近接したときのみレー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 protein

A をコートした acceptor beads を用いる。患者血清をあらかじめ Protein A コートした acceptor beads と反応させておき、準備しておいたビオチン化蛋白と donor 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。

最初は抗 CCP 抗体陰性かつ RF 陰性で X 線上典型的な骨破壊像を認める RA 患者血清 8 検体を用いて小規模の native 蛋白(243 蛋白)に対する自己抗体のスクリーニングを行った。次に 2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーにて、3例の抗 CCP 陰性 RA、4例の抗 CCP 抗体陽性 RA、3例の健常人の血清を用いて、native 蛋白、シトルリン化蛋白に対する自己抗体をスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

患者血清を用いる場合、個人情報が出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

表1. 全身性ムチラン型 RA 38 例の抗 CCP 抗体価

抗 CCP 抗体価	患者数 (%)
陰性(4.5 U/ml 未満)	3 例 (7.9%)
弱陽性(4.5-10 U/ml)	2 例 (5.3%)
陽性(10 U/ml 以上)	33 例 (86.8%)

まず、全身性ムチラン型 RA 患者の抗 CCP 抗体価を測定したところ、38 例中 3 例 (7.9%) は陰性、2 例は弱陽性 (5.3%) であった。抗 CCP 抗体陰性 RA でも severe な骨破壊をきたすことを示している。

次に、243 種の native 蛋白(予備実験において RA 血清に反応することがわかっている)を用いて AlphaScreen にて 8 人の抗 CCP 抗体陰性 RA 血清中の自己抗体を検索し 6 蛋白が候補として上がった。しかしながら、ELISA の系を組み、健常人、SLE 患者、抗 CCP 抗体陽性 RA で反応性を確認すると、いずれも健常人にも反応する抗体であることが判明した。ABCF1、RPL29 の結果を図 1 に示す。

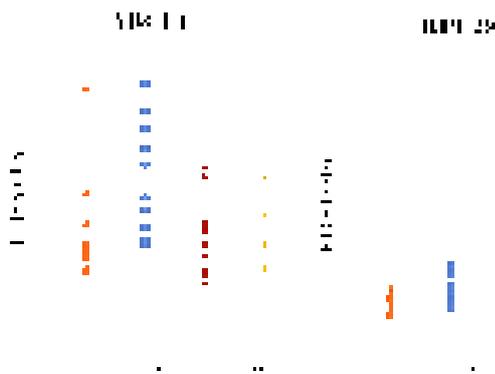


図1. RA, SLE, 健常人における ABCF1, RPL29 に対する抗体価。抗 CCP 抗体陰性 RA (CCP(-)), 抗 CCP 抗体陽性 RA (CCP(+)), SLE, 健常人(HC)各 10 名の血清中の抗 ABCF1 抗体、抗 RPL29 抗体価を ELISA 法にて測定した。

このことは、逆に健常人の自己抗体を detect できるほど AlphaScreen 法の感度が非常に高いことを示すと同時に、コントロールとして健常人血清をおくことの重要性を表している。

そこで、次の実験では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、2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーにて AlphaScreen を行った。この際、native 蛋白に対する反応をみるのと同時に、未知のシトルリン化蛋白に対する自己抗体のスクリーニングを行った。シトルリン化蛋白のライブラリーは 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、シトルリン化することで得られた。ここでは未知のシトルリン化蛋白に対する抗体の結果を示す。

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、健常人血清(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 2)。

表2 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
健常人	9

抗 CCP 抗体陰性 RA 血清で比較的高い OD 値を示し、健常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。蛋白 に対する反応を図 2 に示す。

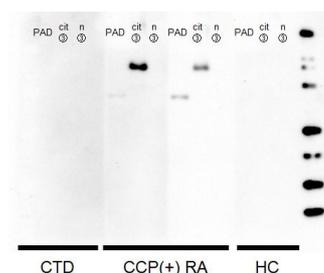


図2 シトルリン化候補タンパク に対する自己抗体

候補タンパク 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)、健常人血清 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。

さらに、抗 CCP 抗体(-)RA 血清のうち 1 検体でも高い OD 値を示し、健常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、健常人 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。蛋白 に対する結果を図 3 と図 4 に示す。

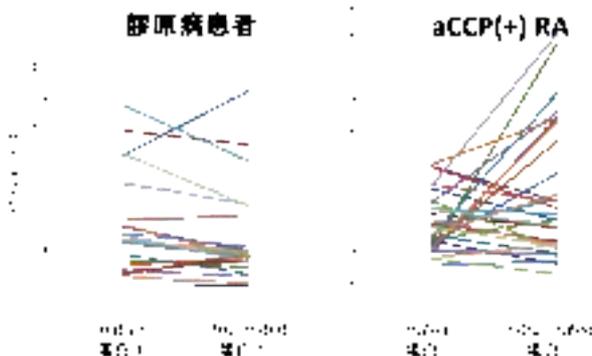


図3 native およびシトルリン化蛋白 に対する抗体価
 膠原病患者 22 例、抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例の native 蛋白 とそのシトルリン化した蛋白 に対する抗体価を OD 値で示し、同じ患者血清を直線で結んだ。

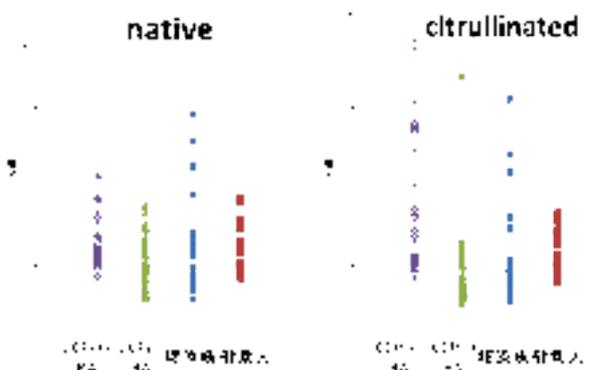


図4 各疾患、健常人での抗蛋白 抗体価

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 とそのシトルリン化した蛋白 に対する抗体価を OD 値で示す。

図 3 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 4 で抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例中 1 例に抗シトルリン化蛋白 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。

同様に蛋白 、蛋白 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 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 法にて抗 CCP 抗体陰性 RA にみられる自己抗体を検索した。健常人にみられた陽性シグナルが Western Blot (data not shown)や ELISA (図 1) にも確認できたことは AlphaScreen 法が高い感度を有していることを表している。AlphaScreen 法の利点を列記すると

1. 同時に多数の自己抗体をスクリーニングできる
2. 他のスクリーニング方法と異なり、陽性シグナルを示す蛋白が既知であるため、蛋白同定の手間が必要ない
3. 同時に蛋白の翻訳後修飾を行うことができる

となるが、特に 3 の特徴を生かして一斉に蛋白シトルリン化をすることで、未知のシトルリン化蛋白抗体をスクリーニングすることができた。この方法の有効性が表 2 に示す通り、抗 CCP 抗体陽性 RA 患者血清で多くのシトルリン化蛋白抗体を検出したことから理解できる。抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清に反応するシトルリン化蛋白は少ないが存在し(図 4)、

蛋白 のように 33 例中 2 例であっても、同様の蛋白を複数見つけ組み合わせることで、抗 CCP 抗体陰性 RA 中の抗シトルリン化蛋白抗体をみつけ、診断能の向上が期待できる。今回はスクリーニング後の validation として 3 蛋白しか検討できていないため、今後さらに確認作業を行うことで、診断に有用な自己抗体を見つけることができると考えらる。

E. 結論

AlphaScreen 法を用いて関節破壊の強い抗 CCP 抗体陰性 RA 患者の自己抗体をスクリーニングし、これまでに 2 つ未知のシトルリン化蛋白抗体を発見した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y, Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20(13):2680-2685, 2011.
- 2) Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis--a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* 6: e20457, 2011.
- 3) Terao C, Ohmura K, Kochi Y, Ikari K, Maruya E, Katayama M, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis.* 70: 2134-2139, 2011.
- 4) Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, Murakami K, Shiomi A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Overexpression of minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- κ B and increased STAT5 signals. *PLoS ONE* 6(10):e27020, 2011.
- 5) Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Res Ther.* 13(6):R213, 2011.
- 6) Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Follistatin-related protein/ follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll- like receptor 4. *FEBS Lett.* 586(4):319-324, 2012.
- 7) Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H, Matsuda F, Mimori T: Quantitative effect of HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1*09:01. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]
- 8) Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K,

- Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012, 44(5): 511-6
- 9) Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E, Katayama M, Yurugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One.* 2012;7(7): e40067
- 10) Nakano M, Fujii T, Hashimoto M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Nakaizumi A, Mimori T. Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2012 Oct;170(1):94-100.
- 11) Ohmura K, Terao C, Mimori T. Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future. *Inflamm Regen* 2012, 32 (3): 90- 98.
- 12) Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi A, Kubo M, Taniguchi A, Matsuda F, Ohmura K, Momohara S, Mimori T, Yamanaka H, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional Variants in NFKBIE and RTKN2 Involved in Activation of the NF- B Pathway Are Associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese. *PLoS Genet.* 2012 Sep;8(9):e1002949
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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

- 17) 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) Terao C, Ohmura K, Yamada R, Kochi Y, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: A haplotype of the human AIRE gene is associated with the risk for Rheumatoid Arthritis in Japanese population. European League Against Rheumatism 2011, London, June 2011.

- 2) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with anti-citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis in Japanese. American College of Rheumatology 2011, Chicago, Nov. 2011.

- 3) 大村浩一郎: 抗 CCP 抗体陰性関節リウマチに関連する遺伝因子。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 東京(品川) シンポジウム(oral presentation)

- 4) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: ACPA-NEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS CONSISTS OF TWO GENETICALLY DISTINCT SUBSETS BASED ON RF POSITIVITY. European League Against Rheumatism 2012, Berlin, June. 2012. (poster presentation)

- 5) 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).

- 6) 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).

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

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