

## 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 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( 、 、 )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)

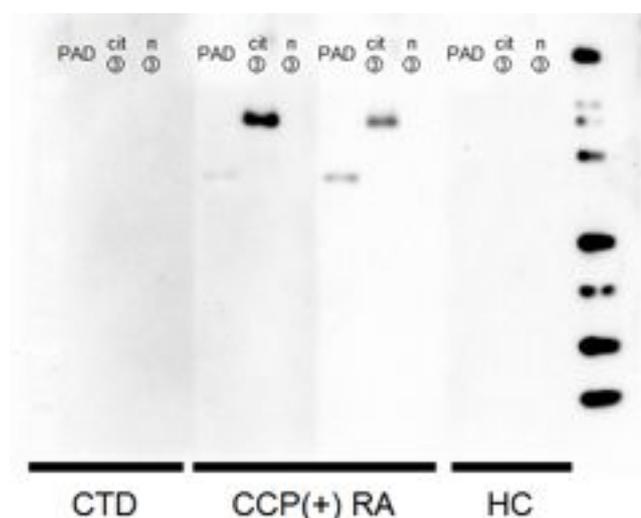
患者血清を用いる場合、個人情報かわからないようにするため、匿名符号を用いて実験および解析をした。

### 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 1)。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(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。

図1 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

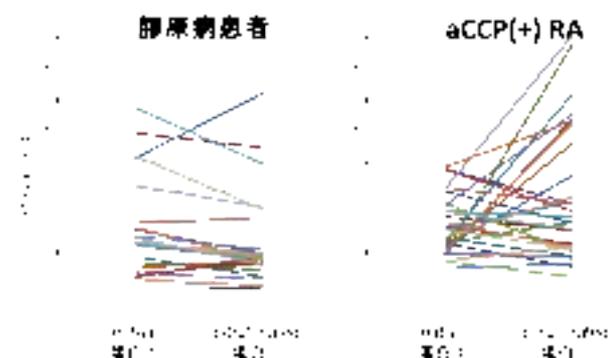
リン化した際に用いた酵素の PAD を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写したのち、抗 CCP 抗体陽性患者血清 2 検体、膠原病患者血清 1 検体(CTD)、健常人血清 1 検体(HC)と反応させ、Western Blot を行った。native 蛋白のバンドはないが、シトルリン化蛋白に対するバンドが強く認められる。抗 CCP 抗体(+)RA 患者血清は PAD に対する抗体も弱く認められている。

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
健常人	9

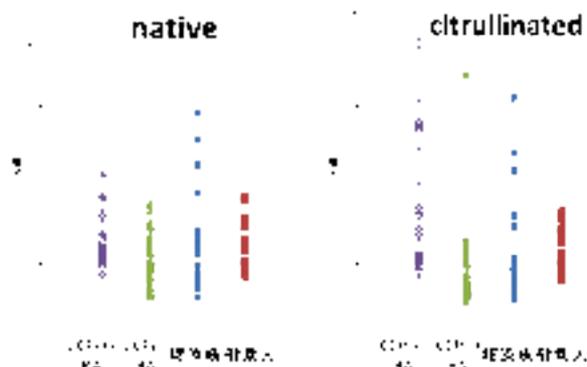
蛋白 に対する結果を図 2 と図 3 に示す。図 2 より膠原病患者の陽性例は主に native 蛋白に対する抗体で、RA 患者陽性例はシトルリン化蛋白に対する抗体であることがわかる。図 3 で抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例中 1 例に抗シトルリン化蛋白 抗体が認められたため、スクリーニングに用いた血清 3 例を加えると 33 例中 2 例で陽性ということになる。

図 2 native およびシトルリン化蛋白 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 3 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。

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 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

- 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
- 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

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