

## 関節リウマチの診断と治療経過の把握を可能にし得るバイオマーカーを発見

### 研究成果のポイント

1. 関節リウマチ患者に特異的に出現するシトルリン化蛋白を同定しました。
2. このシトルリン化蛋白は病状に応じて出現量が変動し、関節リウマチの診断だけでなく、治療経過を追うことのできるバイオマーカーになり得ることを見出しました。
3. このバイオマーカーの発見は、関節リウマチの新たな治療薬開発にもつながることが期待されます。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 松本功准教授、住田孝之教授らの研究グループは関節リウマチ (RA) 患者における特異的な新規バイオマーカー、シトルリン化 inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain 4 (cit-ITIH4) 蛋白を発見しました。

RAは免疫の異常によって起こる疾患です(図)。RA患者では、シトルリン化蛋白(注1)に対する免疫応答が存在するといわれ、血清中の抗シトルリン化蛋白抗体(ACPA)の有無を検査することはRA診断の大きな一助となります。しかしながら、ACPAはRAの活動性(病状の程度)の指標とはならず、陰性であっても罹患している場合もあります。また、活動性指標となる炎症マーカーのCRP(C反応性蛋白)は、RA以外の感染症などにも反応するため、RAの診断と活動性両者の判定に有効な特異的バイオマーカーの探索が重要となっています。

本研究グループは、シトルリン化蛋白がRAの病状にどのように関与しているかを調べました。その結果、シトルリン化蛋白がRAで疾患特異的に出現することを見出し、質量分析により、この蛋白がITIH4 (cit-ITIH4) であること、またITIH4蛋白の438番目のアルギニンが共通にシトルリン化していることを、RA患者および関節炎モデルマウスで同定しました。また臨床的な解析において、cit-ITIH4陽性RA群では有意にDAS-CRP(注2)などの総合疾患活動性指標が高く、生物学的製剤などの治療を施すと、活動性低下とともにcit-ITIH4発現の減弱が見られ、ACPA陰性群でも陽性率が高いことから、cit-ITIH4が診断及び活動性のバイオマーカーともなり得ることがわかりました。

これらのことから、cit-ITIH4蛋白はRA診断、及び疾患活動性の経過を追う上でも重要なバイオマーカーであり、有効な生物学的製剤などでの治療後の変動や、その治療薬を中止するためのバイオマーカーになりうることが明らかとなりました。

本研究の成果は、2018年4月11日付「Arthritis Research & Therapy」誌でオンライン公開されました。

\* 本研究は、AMEDが助成する橋渡し研究戦略的推進プログラム補助事業・開発課題(研究期間:平成29~30年度)によって実施されました。

## 研究の背景

関節リウマチ(RA)は、国内に70万人以上の患者がいると言われているものの、病因については未だ不明な点が多い自己免疫性炎症性疾患です。RA患者では、血清中に抗シトルリン化蛋白抗体(ACPA)が特異的に出現することから、診断にはこの検査が行われますが、ACPAと病勢とのリンクや病因的意義は明らかにされていません。また、ACPAの対応抗原には様々なものが知られていますが、血中に存在する明らかなものは現在まで同定されていません。RA患者では、診断時点ですでにACPAの発現上昇が見られることから、その産生・制御機構の解明は、RAの病態を理解する上で重要です。

本研究では、独自のモデル、ペプチドGPI誘導関節炎(pGIA)(注3)マウス、およびRA患者検体を用いて、RAにおけるシトルリン化蛋白質の関与を探索しました。

## 研究内容と成果

pGIAでは関節炎発現時に、血清中で質量120キログダルトンのシトルリン化蛋白が関節炎マウス特異的に出現し、関節でもシトルリン化蛋白が局在していました。両者とも病勢の減弱に応じて、血清及び関節からシトルリン化蛋白が消退しました。また、液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS)により、血液中のシトルリン化蛋白はinter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain4 (ITI4)であることが判明しました。このITI4において、483番目のアミノ酸がシトルリン化(R438cit)しており、関節炎マウス特異的にシトルリン化していることもわかりました。

そこで、RA患者血清を用いて、シトルリン化蛋白の存在を検討し、その同定を試みるとともに、疾患とのリンクを検討しました。その結果、患者の82%でシトルリン化蛋白が特異的に同定され、他の自己免疫疾患や変形性関節症患者ではこの蛋白は認められませんでした。RA患者血清でもマウスと同様にITI4がシトルリン化されており、その主なシトルリン化部位はR438 citでした。この部分はマウスとヒトで共通しており、関節炎の病態メカニズムと強く関連していることが想定されます。

さらに、RA患者検体を用いて臨床データとの検討を進め、cit-ITI4が陽性のRA患者群では陰性群に比べてCRPおよびリウマトイド因子が高く、関節炎の総合疾患活動性指標であるDAS-28 CRPも有意に高い値を示しました。また、有効な生物学的製剤などの治療を施すと、活動性減少とともにcit-ITI4発現が減弱し、その減弱の強弱は発現強度と比例しました。興味深いことに、cit-ITI4の発現強度は、すべての総合疾患活動性指標と相関しており、cit-ITI4は活動性のバイオマーカーであると考えられます。

RAにおいて、ACPA、リウマトイド因子などの自己抗体はRA診断に重要な検査ですが、両抗体陰性群はRA診断を難しくしています。検討したRA患者のうち、この両抗体陰性群でも8名中7名がcit-ITI4蛋白陽性であり、本研究で見出したcit-ITI4は、より確実なRA診断の一助にもなると考えられます。更に、R438をシトルリン化したペプチドへの反応をRA患者血清で検討すると、強い反応が認められ、自己免疫応答が起きている可能性が示唆されました。

## 今後の展開

今後、RA患者の血清中のcit-ITI4が測定できるキットの開発を始め、他の関節炎(分類不能関節炎を含む)や早期RA患者でのcit-ITI4関与の検討、血清中抗シトルリン化環状ITI4抗体の測定キットの開発(新しいACPAキット)、Cit-ITI4反応性T細胞の検索などへの展開が考えられます。また、cit-ITI4はRAの病勢とともに変動する蛋白であり、バイオマーカーとして頻回に測定される可能性があります。

さらに、血中になぜcit-ITI4が特異的に出現するのかが解明されれば、RA病態のメカニズムの一端が明らかになると期待されます。

参考図

## シトルリン化蛋白と関節リウマチ

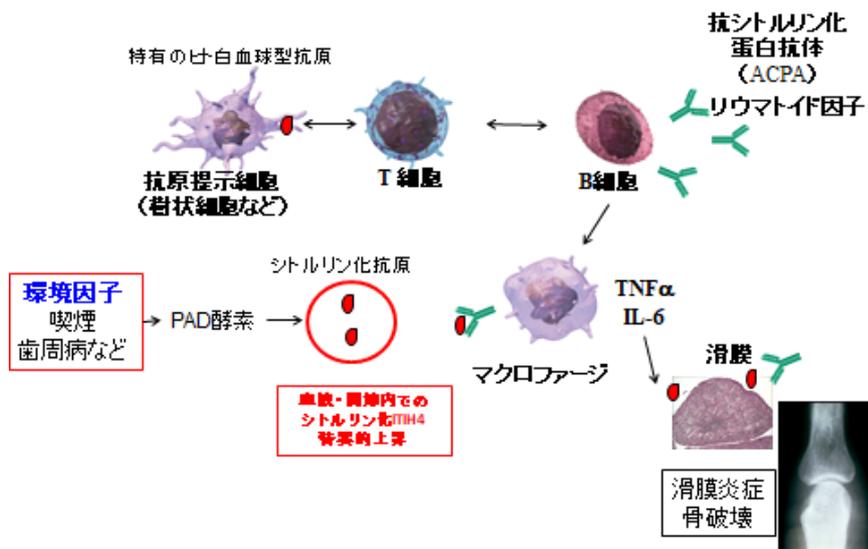


図 関節リウマチ(RA)が起こるしくみ

喫煙や歯周病などの環境因子は、PAD 酵素を介して体内でのシトルリン化蛋白の産生を促進する。RA の病因においては、特有のヒト白血球型抗原を持つ患者群で、このシトルリン化蛋白を樹状細胞などが取りこみ、特異的に T 細胞に抗原提示し、それに基づいて B 細胞が ACPA を産生すると考えられている。ACPA やリウマトイド因子はシトルリン化蛋白と免疫複合体を作り、マクロファージを活性化し、炎症性サイトカイン(TNF  $\alpha$  や IL-6)が放出される。これらが滑膜細胞の増殖を促し、また、局所でも ACPA 免疫複合体が関節炎症を起こすため、慢性的滑膜炎、しいては骨破壊を起こす。

用語解説

注1) シトルリン化蛋白

アルギニンが PAD 酵素によりシトルリンに変換された蛋白の総称。関節リウマチの特異的自己抗体である抗シトルリン化蛋白抗体(ACPA)に対する自己抗原と考えられている。

注2) DAS28

RA の総合疾患活動性スコア。28 ヶ所関節の圧痛、腫れ、炎症の程度(赤沈あるいは CRP)、患者体調全般評価を元に算出される。

注3) ペプチド GPI 誘導関節炎

GPI(glucose-6-phosphate isomerase)は、ヒト RA に似た症状を示す K/BxN 関節炎マウスの自己抗原(蛋白質)であり(参考文献 1)、GPI を DBA/1 マウス皮内に免疫することで関節炎を惹起できる。筑波大学では、GPI 誘導関節炎の T 細胞エピトープ(抗体と抗原の結合部分ペプチド)のみを免疫することでも関節炎を惹起できるモデルを開発した(参考文献2)。

参考文献

- 1) Matsumoto I, Staub A, Benoist C and Mathis D : Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. Science. 286, 1732-1735, 1999
- 2) Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A and Sumida T : Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 10, R130, 2008

### 掲載論文

【題名】 Identification of novel biomarker as citrullinated inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain 4, specifically increased in sera with experimental and rheumatoid arthritis

新規バイオマーカー、シトルリン化 ITIH4 蛋白の関節リウマチ及び動物モデルでの特異的上昇

【著者名】 Hoshimi Kawaguchi<sup>1</sup>, Isao Matsumoto<sup>1</sup>, Atsumu Osada<sup>1</sup>, Izumi Kurata<sup>1</sup>, Hiroshi Ebe<sup>1</sup>, Yuki Tanaka<sup>1</sup>, Asuka Inoue<sup>1</sup>, Naoto Umeda<sup>1</sup>, Yuya Kondo<sup>1</sup>, Hiroto Tsuboi<sup>1</sup>, Yasuhiro Shinkai<sup>2</sup>, Yoshito Kumagai<sup>2</sup>, Akihito Ishigami<sup>3</sup>, Takayuki Sumida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

<sup>2</sup> Environmental Biology Laboratory, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

<sup>3</sup> Molecular Regulation of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan

【掲載誌】 Arthritis Research & Therapy (DOI: 10.1186/s13075-018-1562-7)

### 問合わせ先

松本 功(まつもと いさお)

筑波大学 医学医療系内科 (膠原病・リウマチ・アレルギー) 准教授