

筑波大学

博士（医学）学位論文

Citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy
chain 4 in arthritic joints and its potential effect in
the neutrophil migration

(炎症関節におけるシトルリン化 Inter-alpha-trypsin inhibitor
heavy chain 4 と好中球遊走におけるその潜在的意義の検討)

2 0 2 0

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

長田 侑

目次

1. 研究背景.....	4
2. 目的.....	7
3. 対象と方法.....	8
3-1. マウス.....	8
3-2. ヒト検体.....	8
3-3. ペプチド GPI 誘導関節炎.....	9
3-4. 免疫組織化学.....	9
3-5. 免疫細胞化学.....	10
3-6. ウェスタンブロット.....	10
3-7. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(qRT PCR).....	12
3-8. 酵素免疫測定法.....	12
3-9. pGIA マウスでの好中球除去.....	12
3-10. リコンビナント蛋白の作製.....	13
3-11. 好中球遊走アッセイ.....	14
3-12. 統計分析.....	14
4. 結果.....	15
4-1. pGIA マウス関節における ITIH4 および cit-ITIH4 の発現.....	15
4-2. pGIA マウスにおける PAD の発現.....	15
4-3. pGIA マウス好中球における PAD4 発現.....	16
4-4. 好中球除去による pGIA マウスのシトルリン化蛋白レベルの変化.....	16
4-5. RA 患者滑液中の ITIH4 および cit-ITIH4 の発現.....	17
4-6. ITIH4 および citITIH4 蛋白の好中球遊走への関与.....	18
5. 考察.....	20
6. 結論.....	24
7. 略語.....	25
8. 謝辞.....	27
9. 参考文献.....	28
10. 図表.....	33

1. 研究背景

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) は、関節の慢性炎症を特徴とする自己免疫疾患であり、その発症には環境要因、遺伝的要因、ホルモンを含む複数の要因が報告されている[1,2]。RA における免疫応答の 1 つの特徴は、抗シトルリン化蛋白抗体 (Anti-citrullinated protein antibody: ACPA) の産生である[3]。ACPA は RA 患者においてその症状の発症に先行して血中に出現する[4]。RA 患者の滑膜組織に存在する多数のシトルリン化蛋白はその自己抗原として作用すると考えられる[5]。

このシトルリン化はペプチジルアルギニンデイミナーゼ (Peptidylarginine deiminase : PAD) によって触媒される。哺乳動物には 5 つのアイソザイムがあり、各アイソザイムの哺乳動物間の相同性は 70~95% であり高度に保存されている[6]。脊椎動物の免疫系細胞系では PAD アイソザイムとして PAD2 と 4 が発現する[6]。PAD4 発現は好中球と単球に限定されているのに対して、PAD2 は免疫細胞以外を含め全身の組織に遍在的に発現している[6]。他のアイソザイムとは異なり、PAD4 は核内に移行するため、転写因子もしくは核内ヒストンのシトルリン化を介して細胞増殖、遺伝子翻訳、および好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NET) の形成を独自に調節する[7-9]。また PAD4 は non MHC 遺伝子の RA の疾患感受性遺伝子としても同定されている[10]。RA 感受性の PAD4 多型では mRNA の安定性が増すことが示されており、

結果として PAD4 蛋白の産生亢進による蛋白の過剰なシトルリン化が示唆されている [10]。

好中球は、RA 患者の滑液中の浸潤細胞のうち 90%以上を占め[11]、パンヌス-軟骨接合部にも豊富に存在する[11]。好中球は RA 患者において TNF- α を放出することにより軟骨の破壊に関与し[12]、滑膜線維芽細胞の増殖を刺激[13]し、また破骨細胞の活性化を刺激する(14)。実際に、抗 Gr-1 抗体を用いた好中球の除去がマウスモデルでの関節炎の発症を抑制することが示されている[15]。一方、関節炎モデルマウスでの好中球除去による関節および血中シトルリン化蛋白の変動についての報告はない。また、関節炎モデルマウスでの関節と他の組織内の好中球 PAD 発現の比較も検討されていない。

グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (Glucose-6-phosphate isomerase; GPI) は、遍在する解糖系酵素であり、K/BxN 関節炎マウスで病原性自己抗原として同定された[16]。GPI の T 細胞エピトープとなる特定のペプチド配列の免疫は、DBA / 1 マウスに関節炎を誘発する (peptide-GPI induced arthritis; pGIA) [17]。GPI 誘導関節炎モデルは免疫後 14 日程度をピークとして消失する一過性関節炎であるが、CD4 陽性 T 細胞が重要な役割を果たし、生物学的製剤の効果も RA 患者と同様に認められる[18,19]。

インターアルファトリプシンインヒビター重鎖 4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4: ITIH4) は当初 120 kD の血漿蛋白 PK-120 としてヒトで発見され、その相同

性から ITIH ファミリーに分類された[20]。後にマウスにおいてもその存在が確認されている[21]。ITIH4 は主に肝細胞内で合成および分泌され、その発現は急性炎症時に亢進する[22,23]。当研究室の先行研究において、ペプチドグルコース 6-リン酸イソメラーゼ誘発関節炎 (peptide glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis: pGIA) マウスと RA 患者の血中でシトルリン化 ITIH4 (Citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4: cit-ITIH4) が特異的に増加することを報告した。興味深いことに、血中の cit-ITIH4 の発現量は、pGIA マウスの関節炎スコアと RA 患者の疾患活動性に応じて変動する。また、RA 患者において、cit-ITIH4 発現量は治療効果に応じて減少し、RA のバイオマーカーとなることが示された。加えて RA 患者血中で cit-ITIH4 エピトープに対する抗体が特異的に検出された[24]。一方、ITIH4 蛋白の機能について、ヒトにおいて好中球の食作用の抑制が報告されているが[25]、その他の詳細な機能は不明である。他の ITIH ファミリー蛋白で補体の阻害作用が報告されているが[26]、ITIH4 での報告はない。また、ITIH4 のシトルリン化の機序、および関節炎における cit-ITIH4 の役割は明らかにされていない。

2. 目的

以上の背景より、本研究は pGIA マウスおよび RA 患者における ITIH4 の発現、そのシトルリン化のメカニズムと、好中球の機能に関連する ITIH4 および cit-ITIH4 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 対象と方法

3-1. マウス

オスの DBA / 1 マウスはチャールズリバー・ジャパン(東京、日本)から購入し、6~10週齢で使用した。すべてのマウスは筑波大学施設内で Specific pathogen free の環境下で飼育された。すべての実験プロトコルは、筑波大学内の動物実験委員会によって承認され(参照番号:19-416)、すべての動物実験は施設内倫理ガイドラインに従って実施され。すべての処置はイソフルラン麻酔下で行われ、苦痛を最小限にするために最大限の注意が払われた。マウスはケージあたり 3~7 匹のマウスで飼育され、水と食物を自由に摂取できるものとした。

3-2. ヒト検体

1987 年米国リウマチ学会分類基準[27]または 2010 年米国/欧州リウマチ学会分類基準[28]を満たしリウマチ専門医により診断された日本人の RA 患者から血漿 (n = 65、平均年齢:52.2 歳、範囲 20-73 歳、女性:81.5%)、および滑液 (n = 7、平均年齢:53.6 歳、範囲 32-72 歳、女性:85.7%) を収集された。変形性関節症(OA)の日本人患者から血漿と滑液の対照サンプルを収集した (n = 6、平均年齢:60.3 歳、範囲 56~79 歳、女性:83.3%)。また健康なボランティア (Healthy volunteer:HV) から血漿を収集した (n = 25、平均年齢:48.7 歳、範囲 34~65 歳、女性:80%)。すべてのサンプルは、

インフォームドコンセントを得た後、筑波大学付属病院で収集された。この研究は、筑波大学の倫理委員会(参照番号:H29-041)によって承認された。

3-3. ペプチド GPI 誘導関節炎

aa325-339 に相当する 15mer のヒトGPIペプチド(peptide GPI: pGPI) (Invitrogen) 25 μ g を Complete Freund's adjuvant (CFA) (Becton Dickinson)と混合し、DBA / 1 マウスの尾根部に皮内注射しペプチド GPI 誘発関節炎を誘導した。PBS を CFA で 1:1 の体積比で乳化したものをコントロールとして免疫した。関節炎を誘発するための免疫当日および 2 日目に 200ng の百日咳毒素(Sigma-Aldrich)を腹腔内注射した。関節炎を一日おきに評価し、各足の腫れと発赤を 0~3 のスケールで評価し、Clinical score として四肢の点数を合計した[17]。

3-4. 免疫組織化学

免疫 0、7、14 および 28 日後の pGIA マウスおよびコントロールのマウスの足関節組織を採取した。サンプルは 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、脱灰後パラフィンに包埋後3 μ m に薄切した。ITIH4 および PAD4 蛋白を検出するために、1:1000 に希釈したウサギ抗 ITIH4 抗体(Abcam)もしくは 1:200 に希釈したウサギ抗マウス PAD4 抗体(Proteintech)で 16 時間もしくは 2 時間室温でインキュベートした。ITIH4 を検出する二次抗体として、rabbit-specific IHC polymer detection kit HRP/DAB (Abcam)を使

用した。PAD4 を検出する二次抗体として 1:1000 に希釈した HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG (H + L) (Bio-Rad) を使用した。

3-5. 免疫細胞化学

免疫 14 日後の pGIA マウスの骨髄、末梢血、および足関節からの細胞を分離し、Smear Gell (Genostaff) によってスライドガラスにマウントした後、10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。足関節については関節腔を解放後に HBSS で洗浄し細胞を回収した。標本を 1:200 希釈のウサギ抗マウス PAD4 (Proteintech) と、1:200 希釈のラット抗マウス Gr-1 抗体 (Biolegend) と室温で 1 時間インキュベートした。標準ウサギ IgG (Invitrogen) およびラットアインタイプ IgG (Biolegend) をコントロール染色として使用した。その後、これらのサンプルを Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG (Invitrogen) または Alexa Fluor 647 抗ラット IgG (Invitrogen) と室温で 1 時間インキュベートした。核は DAPI で対比染色した。画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence) を用いて、対照 IgG 染色が検出されない露光時間で観察・分析された。

3-6. ウェスタンブロット

マウス組織ライセートは、改変 RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 20mM EDTA, およびプロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤カクテル (Cell Signaling Technology) で溶解した。抗

修飾シトルリン (Anti-modified citrullin: AMC) 抗体および抗 ITIH4 抗体のウエスタンブロットで、1ウェルあたりそれぞれ 50 μ g および 10 μ g の蛋白を泳動した。蛋白は SDS-PAGE で分離し、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写した。シトルリン化蛋白検出のためシトルリン残基の化学修飾を施行した [29]。試薬 A (20% H₂SO₄、25% H₃PO₄、および 0.025% FeCl₃) と試薬 B (1% ジアセチルモノキシム、0.5% アンチピリン、1 M 酢酸) を 2:1 の体積比率で混合し、このバッファーで転写後のブロットを遮光容器内で 37°C で 2.5 時間インキュベートしシトルリン残基を化学修飾した。次に、ブロットを 0.05% Tween-20 を含む TBS (tris buffered saline with tween 20: TBST) で洗浄し、5% スキムミルク (TBST で希釈) でブロックし、5% スキムミルクで 1:3200 に希釈した AMC 抗体 (東京都健康長寿医療センター研究所が提供) で 4° C で 16 時間反応した。TBST で洗浄後、5% スキムミルクで 1:5000 に希釈した HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG (H + L) (Bio-Rad) と室温で 1 時間反応した。ITIH4 発現の分析のために、1:3000 に希釈したウサギ抗 ITIH4 抗体 (Abcam) を使用してウエスタンブロッティングを行った。免疫沈降では、マウス関節ライセートおよびヒト滑液を、それぞれウサギ抗 ITIH4 Ab (プロテインテック、マウス用) およびマウス抗 ITIH4 Ab (昭和大学提供、ヒト用) で 4°C で一晩インキュベートし、次にプロテイン G アガロース (Cell Signaling Technology) で 4° C で 4 時間とインキュベートした。撮影は、ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare) を使用し、バンド強度は ImageQuant TL ソフトウェア (GE Healthcare) または Image J ソ

ソフトウェア (NIH) で解析した。

3-7. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT PCR)

製造元から提供された指示に従い、Isogen (Nippon Gene) を使用して、pGIA またはコントロールマウスの足首関節からトータル RNA を抽出した。抽出された RNA はランダムプライマーで cDNA に逆転写された。TaqMan (Applied Biosystems) および SYBR Green (Takara bio) 遺伝子発現アッセイと Padi2 (Mm01341648_m1)、Padi4 (Mm01341658_m1)、Itih4 (MA115999) および Gapdh (Mm99999915_g1、MA162228) プライマーを使用して、ABI 7500 アナライザー (Applied Biosystems) で解析し、リアルタイム定量 PCR を実施した。Gapdh の発現を対照として使用した。

3-8. 酵素免疫測定法

血漿および滑液中のヒト ITIH4 レベルは、R&D Systems の ELISA キットを使用して測定し、培養血清中のヒト C5a レベルは、Abcam の ELISA キットを使用して、製造元の指示に従って測定した。

3-9. pGIA マウスでの好中球除去

抗 Gr-1mAb による好中球除去のため、関節炎を誘発した DBA/1 マウスに、アインタイプコントロール IgG または抗 Gr-1 mAb (RB6-8C5、Biolegend) を 7 日目 (100 μ g)、9 日目 (250 μ g)、11 日目 (500 μ g)、および 13 日目 (500 μ g) に腹腔内投与した。同様

に、アイソタイプコントロール IgG または抗 Ly6G mAb (1A8, Biolegend) を 9 日目 (1 mg)、10 日目 (2 mg)、12 日目 (2 mg) に腹腔内投与した。それぞれ 4 匹のマウスがランダムに割り当てられた。全血球を自動血球計算盤 (Celltac α MEK6458; 日本光電) でカウントした。好中球画分は FACS Verse (BD) で CD45 + 7-AAD-細胞をゲーティングした後、Gr1^{high} CD11b + の分画として測定した。

3-10. リコンビナント蛋白の作製

富士レビオ社からリコンビナント完全長ヒトフィブリノーゲンおよび ITIH4 は提供された。リコンビナント蛋白の発現には Expi293 Expression System (Gibco) を使用した。端的には、Expi 293F 細胞に、ヒト ITIH およびヒトフィブリノーゲン (α 、 β 、 γ) の Hexa-His タグ付き cDNA クローンを含むプラスミドをそれぞれトランスフェクトした。その後、一過性発現細胞の培養物をリコンビナント蛋白精製に使用した。トランスフェクトされた細胞は、製造者によって提供された指示に従って培養され、培地は 72 時間のインキュベーション後に収集された。蛋白精製は、HisTrap HP (GE ヘルスケア) によって施行され、純度は SDS-PAGE および WB によって分析された。シトルリン化は、0.1 mol / l Tris-HCl (pH 7.4)、3 mmol / l CaCl₂、および 1 mmol / l ジチオトレイトールの条件下で酵素対基質モル比が 1:50 となるようにウサギ骨格筋 PAD (Sigma-Aldrich) を使用して、37° C で 1.5 時間で施行した。バッファーは、Amicon 超遠心フィルター (Merck、MWCO = 50kD) で 0.1M TrisHCl に変更された。

3-11. 好中球遊走アッセイ

好中球は、Polymorphoprep (Abbott Diagnostics Technologies AS)を用いた密度勾配遠心分離により分離された。細胞を Diff-Quick (Sysmex) で染色して、PMN の純度が 90%を超えていることを確認した。好中球遊走アッセイは、96 ウェルトランスウェルプレート(3 μ m 孔径; Corning)で行った。精製したヒト好中球をヘキスト 33342 で 10 分間標識した後、洗浄した。その好中球を HBSS-0.1%BSA で希釈し 8×10^4 cell 相当を上部チャンバーに加えた。6%健常ヒトプール血清(0.1MTrisHCl で希釈)に各蛋白を加え 37°Cで 30 分間インキュベートした。それらを HBSS-0.1%BSA で 25%に希釈し、遊走因子として下部チャンバーに加えた。0.1MTrisHCl のみに各蛋白を加え同様にインキュベートした溶液もコントロールとして使用した。遊走アッセイは、5%CO₂ インキュベーターで 37°C、45 分間行った。遊走した好中球は、蛍光顕微鏡(BZ-X710; Keyence)で計測した。

3-12. 統計分析

すべてのデータは、平均±平均の標準誤差(SEM)として表した。グループ間の差異はマンホイットニーU 検定を使用し、多重比較では事後 Tukey 検定を伴う **one-way ANOVA** を使用して統計的有意性を評価した。P 値は 0.05 未満を有意と見なした。統計分析は、Graph Pad Prism バージョン 8.4.2 を使用して実行した。

4. 結果

4-1. pGIA マウス関節における ITIH4 および cit-ITIH4 の発現

ITIH4 シトルリン化のメカニズムを明らかにするために、DBA / 1 マウスを pGPI で免疫して多発性関節炎を誘発するマウス pGIA 関節炎モデルを使用した。足首関節切片を、pGIA マウスとコントロールマウスの両方で免疫組織化学により抗 ITIH4 抗体で染色した。ITIH4 は、pGIA マウスでのみ免疫 14 日後(関節炎極期)に増加し、28 日後(関節炎後期)に消失した(図1)。免疫 14 日後に pGIA とコントロールマウスの関節の ITIH4 mRNA 発現に有意差は認めなかった(図 2)。一方、pGIA マウスで肝臓での ITIH4mRNA 発現は有意に増加していた(図 3)。次に、関節炎期の pGIA マウスからの関節ライセートを、免疫沈降とそれに続くウエスタンブロットで評価したところ、ITIH4 のシトルリン化が明らかになった(図4)。免疫 14 日後の pGIA マウスからの組織ライセートおよび血漿の比較では、cit-ITIH4 レベルは関節で有意に増加し(図 5)、ITIH4 のシトルリン化が主に炎症関節で起こることが示唆された。

4-2. pGIA マウスにおける PAD の発現

次に、シトルリン化酵素で PAD 発現につき、免疫系に発現する Padi2 および Padi4 mRNA の発現を pGIA マウスの関節で定量的 PCR によって検討した。その結果免疫 14 日後に、Padi4 mRNA が、対照マウスと比較して pGIA 関節で有意に増加していた(図 6)。PAD4 抗体を用いた免疫組織化学により、特に浸潤する好中球において蛋

白レベルでの PAD4 発現が確認された。さらに、PAD4 は好中球周囲の細胞外にも存在し、連続切片の対応する領域に ITIH4 蛋白が存在していた(図 7)。組織学的検討では PAD4 発現細胞の 90.4%が好中球であった(図 8)。次に、免疫 14 日後に pGIA 関節の浸潤細胞を分離し、抗 Gr-1 抗体を使用した免疫細胞化学的検討を実施した。その結果、PAD4 陽性細胞の $90.2 \pm 1.4\%$ が Gr-1 陽性であることが観察された。以上から好中球が pGIA 関節における PAD4 の主な供給源であることが示唆された(図 9)。

4-3. pGIA マウス好中球における PAD4 発現

関節に局在する好中球における PAD4 発現の違いを評価するために、pGIA 関節から単離された細胞を骨髄および末梢血細胞と比較しました。これらの細胞は、抗 PAD4 および Gr-1 抗体を用いた免疫組織化学によって検査されました。注目すべきことに、関節炎の関節に由来する Gr-1 陽性細胞における PAD4 の発現は、陽性率と強度の両方において他のグループよりも有意に高かった(図 10)。

4-4. 好中球除去による pGIA マウスのシトルリン化蛋白レベルの変化

好中球と蛋白のシトルリン化の関連をさらに調査するために、抗 Gr-1 抗体の腹腔内投与により pGIA マウスの好中球を除去させることを試みた。抗 Gr-1 抗体は、アインタイプコントロールと比較して末梢好中球数を減少させ、関節炎の重症度を軽減した(図 11)。また、免疫組織化学的検討により、好中球の除去で PAD の関節局所発現が

著しく低下することが明らかになった(図 12)。さらに、血漿および関節におけるシトルリン化蛋白の発現は、抗 Gr-1 抗体の投与により有意に低下した(図 13)。なお、この効果は ITIH4 蛋白のみに限定されなかった(図 14)。また、抗 Gr-1 抗体と比較して、より好中球を特異的に結合するとされる抗 Ly6G 抗体を用いて好中球の除去を施行したところ、同様にシトルリン化 ITIH4 の発現低下が確認できた(図 15)。これらの結果は、pGIA マウスにおいて好中球が関節炎の発症と蛋白のシトルリン化を媒介することを示すものと考えられた。

4-5. RA 患者滑液中の ITIH4 および cit-ITIH4 の発現

ヒト関節におけるシトルリン化蛋白の関連を評価するために、OA および RA 患者由来の滑液を AMC 抗体を用いたウエスタンブロットで検討した。その結果、ITIH4 の分子量に対応する 120kD バンドを含むいくつかのシトルリン化蛋白を RA 患者滑液でのみ観察した(図 16a)。次に、免疫沈降とウエスタンブロットにより滑液を分析した。ITIH4 は OA グループと RA グループの両方で沈降したが、そのシトルリン化は RA 患者でのみ観察された(図 16b)。次に、ウエスタンブロットにより、各患者の血漿および滑液中の特定の 120kD シトルリン化蛋白の発現を比較した。RA 患者の間では、バンド強度は血漿よりも滑液で有意に高く(図 17)、ITIH4 のシトルリン化が主に炎症を起こした関節で発生したことが示唆された。ELISA では RA 患者の滑液の総 ITIH4 レベルは OA 患者よりも有意に高かった(図 18)。なお血漿中の総 ITIH4 レベルは HV、

OA、およびRA患者間で有意差がなく、RA特異的血漿バイオマーカーとして総ITIH4レベルは与しないと考えられた(図 18)。

4-6. ITIH4 および citITIH4 蛋白の好中球遊走への関与

補体系の活性化は好中球の遊走を惹起する[30]。また、他の ITIH ファミリー蛋白において補体カスケードの阻害作用が報告されており[26]、ITIH4 蛋白と好中球遊走に関して焦点を当て検討を行った。実験には、全長のリコンビナントヒトフィブリノーゲン(コントロール)および全長のリコンビナントヒト ITIH4 を使用した。リコンビナント蛋白はウサギ骨格筋由来の PAD でシトルリン化した。リコンビナント蛋白のシトルリン化を図 19 に示す。

好中球は密度勾配遠心分離により健康なボランティアの末梢血から分離し、 8×10^4 の好中球をトランスウェルプレートの上部チャンバーに加えた。また、健常ヒト血清を各蛋白と 37°C で 30 分インキュベートした後、トランスウェルプレートの下部チャンバーに加えた。図 20 に実験スキームを示す。その結果、ITIH4 の添加は、フィブリノーゲンと比較して好中球の遊走を有意に抑制した。一方で cit-ITIH4 には抑制的な作用は認めず遊走を亢進させた(図 21)。なお、血清を含まない場合には遊走は惹起されず、ITIH4 蛋白単独で走化性作用はないと考えられた(図 21)。次に、蛋白とインキュベートした血清において、補体カスケードの主要産物であり好中球走化性因子として作用する C5a のレベルを測定した。その結果 ITIH4 添加血清では C5a の濃度が有意に低

下しており、ITIH4 の補体カスケード阻害能が示唆されたが、一方 cit-ITIH4 ではその作用は認めず、添加により C5a レベルは上昇した (図 22)。

5. 考察

本研究では、pGIA マウス関節および RA 患者関節の両方で cit-ITIH4 が増加していることが示された。関節内の PAD4 を発現する好中球がこのシトルリン化の一因となる可能性があり、これは、好中球除去による cit-ITIH4 発現低下により確認された。さらに、ITIH4 および cit-ITIH4 蛋白が補体系のカスケードをへの作用を介してヒト好中球の遊走に関与することが示唆された。

ITIH4 のシトルリン化のメカニズムとして、今回の研究から関節内に浸潤する好中球とその PAD4 の寄与が推測された。pGIA マウスと RA 患者いずれでも血漿よりも関節において cit-ITIH4 は豊富に分布しており、循環する cit-ITIH4 が主に炎症を起こした関節に由来すると考えられた。これは以前に報告されたように[24]、citITIH4 が関節炎の程度を反映する特異的血清バイオマーカーとして機能する事実と合致する。また、RA 患者では cit-ITIH4 に対する抗体産生が認められるが[24]、豊富な関節内 cit-ITIH4 は自己抗原の主要な供給源となりうる。今後症例を増やし、滑液中の cit-ITIH4 値と関節リウマチの活動性や関節破壊の程度との相関も検討を加えていく予定である。

関節内好中球における PAD4 の発現亢進に関しては複数の機序が推測される。1 つは NET 形成に関連した PAD4 産生である。NET 形成の過程で PAD4 がマウスとヒトの好中球の両方で過剰発現する[31-33]。実際に複数の報告でマウス関節炎および RA

患者の関節における NET 形成が示されている[34,35]。なお、NET 形成を促す好中球への刺激として TNF α 、IL-17A、リウマトイド因子、および ACPA が報告されている[35]。2 つ目の可能性は好中球への IL-6 刺激である。Yahagi らは好中球への IL-6 刺激が NET 経路とは独立してマウスで PAD4 産生を誘発できることを報告している[36]。また、もう一つの機序として、Romero らは(35)が膜侵襲複合体とパーフォリンが好中球 PAD4 の活性化と RA 患者の関節内での過剰なシトルリン化を惹起することを明らかにしている。したがって、pGIA マウスにおいても、NET 形成、IL6 刺激、およびパーフォリン産生を含めた追加の検討が、関節局在好中球における PAD4 発現の亢進のメカニズムを解明するために必要と推測される。

マウス関節炎モデルにおいて、抗体投与による好中球の除去が関節炎を改善することが複数報告されている[15,37,38]。その主な機序として好中球から脱顆粒もしくは好中球由来の TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの減少であると推測されている[38]。本研究は、関節炎モデルマウスで好中球の除去が、関節炎の改善のみならず血液と関節におけるシトルリン化蛋白の発現を減弱させることを示した初めての報告であり、シトルリン化における好中球の重要性を実証するものと考えられる。しかしながら、関節炎の減弱自体がシトルリン化の減弱に関与している可能性は排除できない。そのため、今後はこのモデルマウスにおいて、マクロファージまたは他のエフェクター細胞を除去し、本研究結果と比較することにより明確な証拠を得られると考える。さらに、こ

の好中球除去のアプローチが、シトルリン化自己抗原を減少させることで、ACPA 産生を抑制もしくは改善できるかどうかについても、検討が必要である。

関節における ITIH4 の増加に関しては pGIA マウス関節での ITIH4-mRNA レベルの上昇は観察されず、関節炎局所での ITIH4 の産生は支持されなかった。別の機序として、ITIH4 が元来豊富に存在する血漿から濃度勾配を介して貯留した滑液内に移行することが推測される。今回の検討でも血漿中の ITIH4 の濃度は滑液よりも高く、局所的産生よりも関節への流入を支持するものと考えられた。また、以前の報告では他のヒト ITIH ファミリー蛋白がヒト好中球の表面に結合することが示されている(38)。したがって、ITIH4 は浸潤する好中球への結合を介して、炎症関節により集積する可能性がある。以上から関節炎発症に追隨して ITIH4 が集積すると推測するが、今後より発症早期の関節を解析し、好中球流入の時期との比較を含めて検討を加える。

本研究では ITIH4 蛋白の補体カスケードの抑制作用が観測された。他のヒト ITIH ファミリー蛋白において補体系の抑制作用が報告されており、それらの作用は複数の補体蛋白 (C1q、C2、C3、C4、C5、プロパージン、D 因子) への結合を介するものと考えら[26]、ITIH4 蛋白について同様の機序が推測される。また、血清への ITIH4 の添加は補体カスケードを抑制し、結果として C5a 産生が抑制され、好中球の遊走が減少したものと推測された。一方、シトルリン化により ITIH4 蛋白のこの作用は消失し、C5a レベルは上昇した。シトルリン化では、アルギニンのグアニジノ基がウレイド基に置換され

る。この修飾により、蛋白質の正味の正電荷が減少し、イオン結合および水素結合が阻害されるため、蛋白質の構造とその本来の機能の変化が起こりうる[39]。シトルリン化により ITIH4 は本来の補体への結合能力を失い、補体蛋白または補体調節蛋白との新たな相互作用を獲得した可能性も推測される。この ITIH4 のシトルリン化が好中球の遊走亢進を介して、関節炎の増悪に寄与する可能性も考慮される。今後は RA 患者の血清および滑液においても ITIH4 および cit-ITIH4 の補体系への影響を検討していく。また、生体内での ITIH4 の正確な機能についての検討のためには、ITIH4 欠損マウスを使用した検討が必要になると考えられる。

6. 結論

pGIA マウスおよびRA 患者の炎症関節において cit-ITIH4 の発現が示された。PAD4 を高発現する好中球がそのシトルリン化に寄与すると考えられた。また、シトルリン化 ITIH4 は補体系への作用を介して好中球の遊走を惹起する可能性が示された。

7. 略語

ACPA: anti-citrullinated protein antibody

AMC antibodies: Anti-modified citrulline antibodies

ANOVA: analysis of variance

CFA: complete Freund's adjuvant

Cit-ITIH4: citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4

DTT: dithiothreitol

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

Fng: fibrinogen

HV: healthy volunteer

IHC: immunohistochemistry

IP: immunoprecipitation

ITIH4: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4

NETs: neutrophil extracellular traps

OA: osteoarthritis

PAD: peptidylarginine deiminase

PBS: phosphate-buffered saline

pGIA: peptide glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis

PVDF: polyvinylidene difluoride

RA: rheumatoid arthritis

SEM: standard error of the mean

SF: synovial fluid

TBST: tris buffered saline with tween 20

WB: Western blotting

8. 謝辞

AMC 抗体を快くご提供頂きました東京都健康長寿医療センター研究所 石神 昭人先生、抗ITIH4抗体を快くご提供頂きました昭和大学富士吉田教育部 佐野 佳弘先生、リコンビナント蛋白を快くご提供頂きました富士レビオ株式会社 荒井 珠貴様、伊勢 伸之様、そして、本研究と論文作成にあたり多くのご指導を賜りました筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 松本 功 先生、住田 孝之先生に心から感謝申し上げます。

9. 参考文献

- 1 Padyukov L, Silva C, Stolt P, *et al.* A gene–environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA–DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004;**50**:3085–92. doi:10.1002/art.20553
- 2 Gaalen FAV, Aken JV, Huizinga TWJ, *et al.* Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004;**50**:2113–21. doi:10.1002/art.20316
- 3 Moore AR, Iwamura H, Larbre JP, *et al.* Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes: in vitro assessment of the pathogenic mechanisms. *Ann Rheum Dis* 1993;**52**:27–31. doi:10.1136/ard.52.1.27
- 4 Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis & Rheumatism* 2004;**50**:380–6. doi:10.1002/art.20018
- 5 van Beers JJBC, Schwarte CM, Stammen–Vogelzangs J, *et al.* The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and β -actin. *Arthritis Rheum* 2013;**65**:69–80. doi:10.1002/art.37720
- 6 Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, *et al.* PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003;**25**:1106–18. doi:10.1002/bies.10357
- 7 Guo Q, Fast W. Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53. *J Biol Chem* 2011;**286**:17069–78. doi:10.1074/jbc.M111.230961
- 8 Zhang X, Gamble MJ, Stadler S, *et al.* Genome–wide analysis reveals PADI4 cooperates with Elk–1 to activate c–Fos expression in breast cancer cells. *PLoS Genet* 2011;**7**:e1002112. doi:10.1371/journal.pgen.1002112
- 9 Li P, Li M, Lindberg MR, *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity

- mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2010;**207**:1853-62. doi:10.1084/jem.20100239
- 10 Suzuki A, Yamada R, Chang X, *et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003;**34**:395-402. doi:10.1038/ng1206
 - 11 Weissmann G, Korchak H. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. *Inflammation* 1984;**8 Suppl**:S3-14.
 - 12 Auer J, Bläss M, Schulze-Koops H, *et al.* Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;**9**:R94. doi:10.1186/ar2294
 - 13 Wang C-H, Dai J-Y, Wang L, *et al.* Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *J Cell Mol Med* 2011;**15**:850-60. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01084.x
 - 14 Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:253-9. doi:10.1002/1529-0131(200102)44:2<253::AID-ANR41>3.0.CO;2-S
 - 15 Tanaka D, Kagari T, Doi H, *et al.* Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology* 2006;**119**:195-202. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02424.x
 - 16 Matsumoto I, Staub A, Benoist C, *et al.* Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 1999;**286**:1732-5. doi:10.1126/science.286.5445.1732
 - 17 Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, *et al.* Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;**10**:R130. doi:10.1186/ar2545
 - 18 Schubert D, Maier B, Morawietz L, *et al.* Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* 2004;**172**:4503-9. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4503

- 19 Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, *et al.* Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:754-63. doi:10.1002/art.23222
- 20 Pu XP, Iwamoto A, Nishimura H, *et al.* Purification and characterization of a novel substrate for plasma kallikrein (PK-120) in human plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1994;**1208**:338-43. doi:10.1016/0167-4838(94)90122-8
- 21 Cai T, Yu P, Monga SP, *et al.* Identification of mouse itih-4 encoding a glycoprotein with two EF-hand motifs from early embryonic liver. *Biochim Biophys Acta* 1998;**1398**:32-7. doi:10.1016/s0167-4781(98)00049-9
- 22 Piñeiro M, Alava MA, González-Ramón N, *et al.* ITIH4 Serum Concentration Increases during Acute-Phase Processes in Human Patients and Is Up-Regulated by Interleukin-6 in Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999;**263**:224-9. doi:10.1006/bbrc.1999.1349
- 23 Sano Y, Tobe T, Saguchi K, *et al.* Mouse Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Family Heavy Chain-Related Protein is an Acute Phase Protein Induced by Inflammation. *J Health Sci* 2006;**52**:368-74. doi:10.1248/jhs.52.368
- 24 Kawaguchi H, Matsumoto I, Osada A, *et al.* Identification of novel biomarker as citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4, specifically increased in sera with experimental and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2018;**20**:66. doi:10.1186/s13075-018-1562-7
- 25 Choi-Miura N-H, Takahashi K, Yoda M, *et al.* The novel acute phase protein, IHRP, inhibits actin polymerization and phagocytosis of polymorphonuclear cells. *Inflamm res* 2000;**49**:305-10. doi:10.1007/PL00000211
- 26 Okroj M, Holmquist E, Sjölander J, *et al.* Heavy Chains of Inter Alpha Inhibitor (I α I) Inhibit the Human Complement System at Early Stages of the Cascade. *J Biol Chem* 2012;**287**:20100-10. doi:10.1074/jbc.M111.324913
- 27 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;**31**:315-24.

- 28 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;**62**:2569-81. doi:10.1002/art.27584
- 29 Asaga H, Ishigami A. Protein deimination in the rat brain after kainate administration: citrulline-containing proteins as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci Lett* 2001;**299**:5-8.
- 30 Petri B, Sanz M-J. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res* 2018;**371**:425-36. doi:10.1007/s00441-017-2776-8
- 31 Leshner M, Wang S, Lewis C, *et al.* PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol* 2012;**3**:307. doi:10.3389/fimmu.2012.00307
- 32 Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, *et al.* Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther* 2014;**16**:R122. doi:10.1186/ar4579
- 33 Jin L, Batra S, Jeyaseelan S. Diminished neutrophil extracellular trap (NET) formation is a novel innate immune deficiency induced by acute ethanol exposure in polymicrobial sepsis, which can be rescued by CXCL1. *PLoS Pathog* 2017;**13**:e1006637. doi:10.1371/journal.ppat.1006637
- 34 Rohrbach AS, Hemmers S, Arandjelovic S, *et al.* PAD4 is not essential for disease in the K/BxN murine autoantibody-mediated model of arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;**14**:R104. doi:10.1186/ar3829
- 35 Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2013;**5**:178ra40. doi:10.1126/scitranslmed.3005580
- 36 Yahagi A, Saika T, Hirano H, *et al.* IL-6-PAD4 axis in the earliest phase of arthritis in knock-in gp130F759 mice, a model for rheumatoid arthritis. *RMD Open* 2019;**5**:e000853. doi:10.1136/rmdopen-2018-000853

- 37 Eyles JL, Hickey MJ, Norman MU, *et al.* A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood* 2008;**112**:5193-201. doi:10.1182/blood-2008-02-139535
- 38 Wipke BT, Allen PM. Essential Role of Neutrophils in the Initiation and Progression of a Murine Model of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* 2001;**167**:1601-8. doi:10.4049/jimmunol.167.3.1601
- 39 Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, *et al.* Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* 1996;**271**:30709-16. doi:10.1074/jbc.271.48.30709

10. 図表

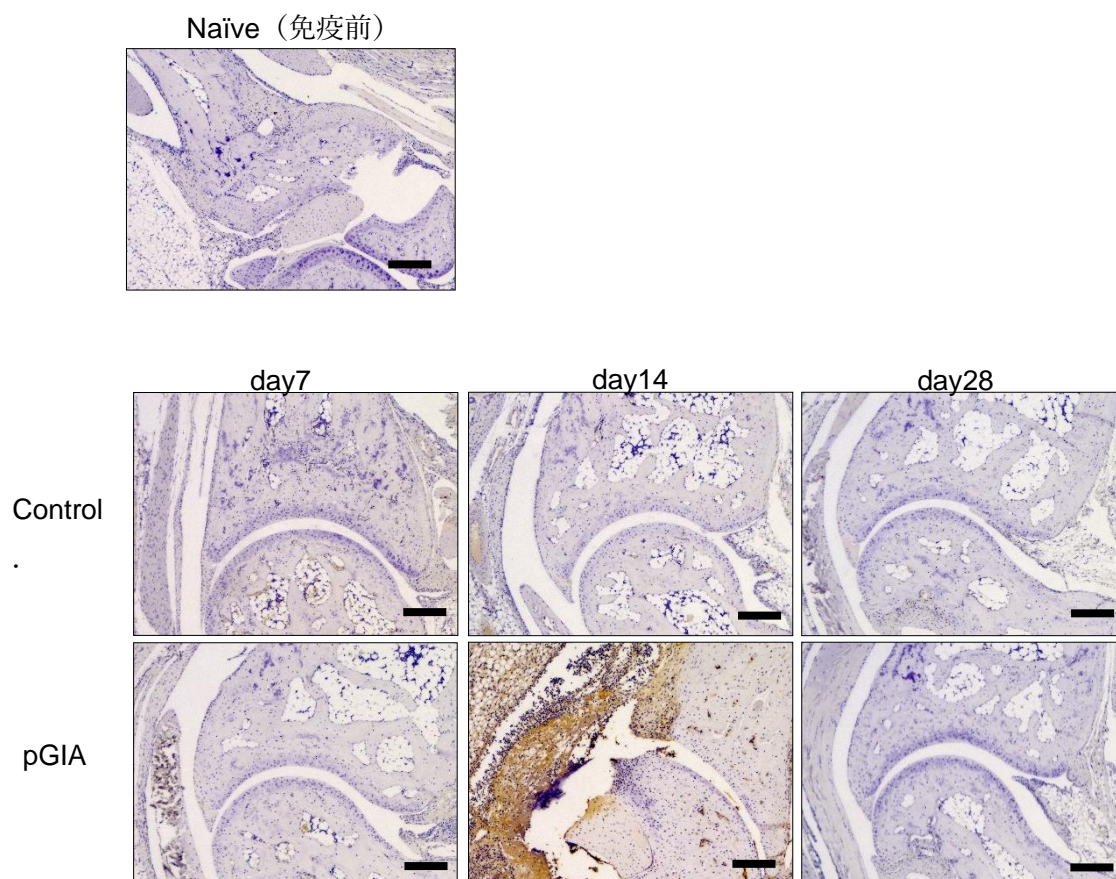


図 1. pGIA マウス関節の抗 ITIH4 抗体による免疫組織化学

pGIA またはコントロールマウスの関節切片を ITIH4 抗体で免疫組織化学的に染色した。ITIH4 は、pGIA マウスでのみ関節炎極期である免疫 14 日後に関節内で増加した。スケールバー:200 μ m。実験はそれぞれ 3 つの異なるサンプルで行われ、同様の結果が得られた。

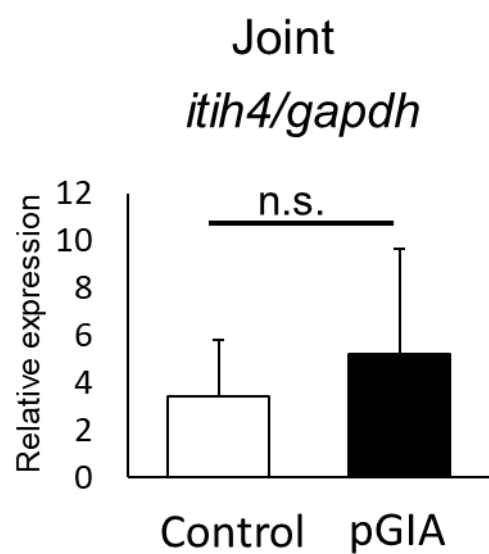


図2. pGIA 関節の *Itih4*-mRNA 発現の検討

免疫 14 日後におけるコントロール (N = 5) と pGIA マウス (N = 6) の関節の *Itih4* mRNA

レベルに有意差は認めなかった。n.s. (Mann-Whitney U test)

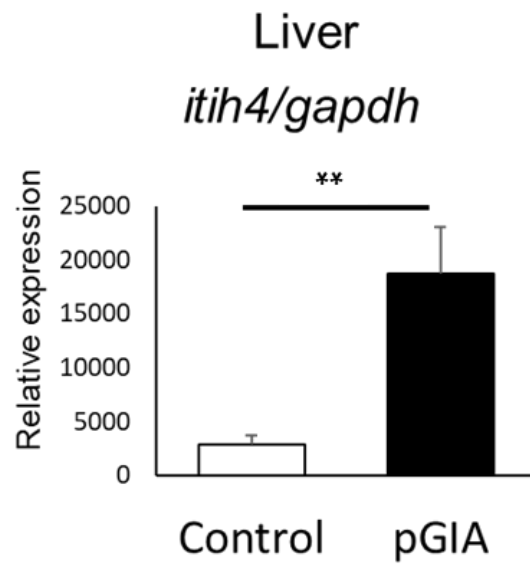


図 3. pGIA 肝臓の *Itih4*-mRNA 発現の検討

免疫 14 日後におけるコントロール (N = 3) と pGIA マウス (N = 5) の肝臓の *Itih4* mRNA

レベルで pGIA 肝臓で有意な増加を認めた。** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test)

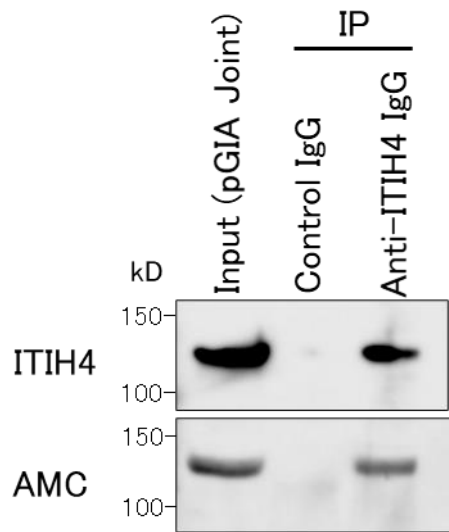


図 4 pGIA マウスからの関節ライセートの免疫沈降

免疫 14 日後の pGIA マウスからの関節ライセートを ITIH4 抗体で免疫沈降後に、抗 ITIH4 抗体および AMC 抗体を使用したウェスタンブロットを施行し関節の ITIH4 のシトルリン化を確認した。

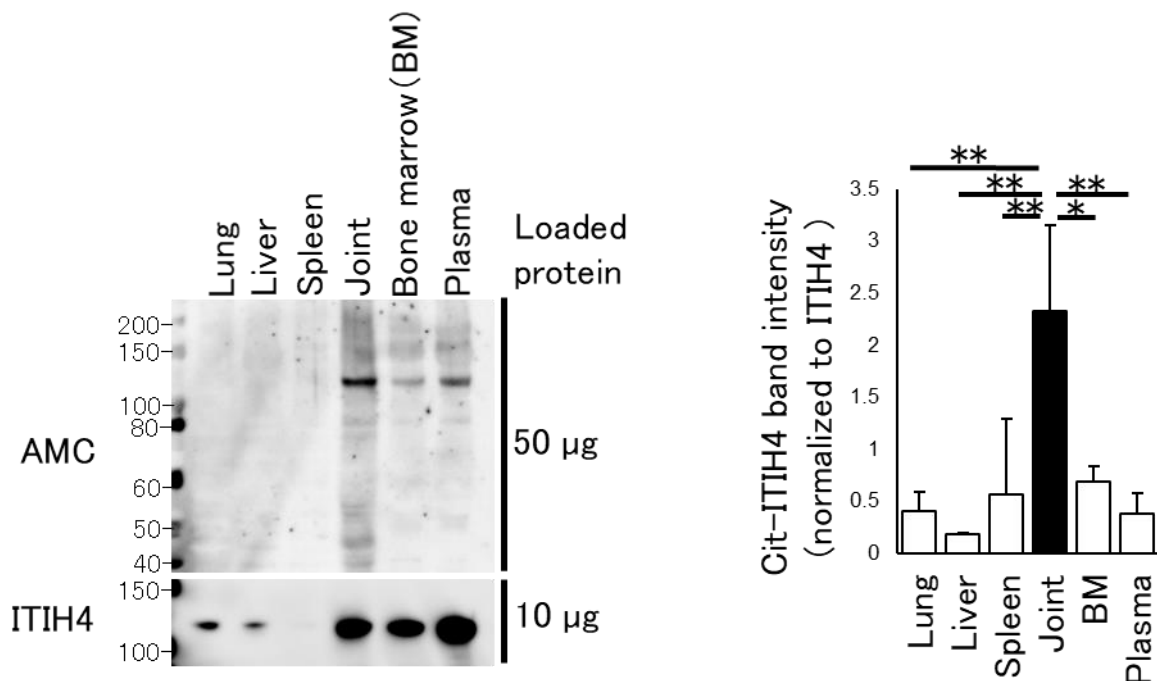


図5 マウス組織での cit-ITIH4 の発現の比較

免疫 14 日後の pGIA マウス (n=3) から組織ライセート (肺、肝臓、脾臓、骨髄、関節) と血漿を AMC 抗体と抗 ITIH4 抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。cit-ITIH4 レベルは関節で有意に増加していた。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (one-way ANOVA with a post hoc Tukey's test for multiple comparisons)

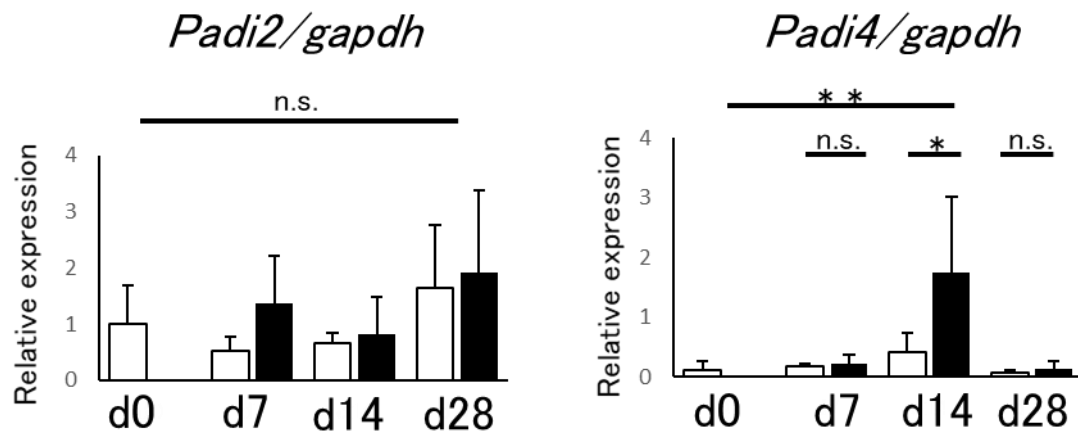


図 6. pGIA マウス関節における PAD 遺伝子の発現

コントロールおよび pGIA マウスの関節における *Padi2* および *Padi4* mRNA レベル。n = 6 (d0)、n = 3 (d7-28)。免疫 14 日後に、*Padi4* mRNA が、対照マウスと比較して pGIA 関節で有意に増加した。* p < 0.05、** p < 0.01 (one-way ANOVA with a post hoc Tukey's test for multiple comparisons)。

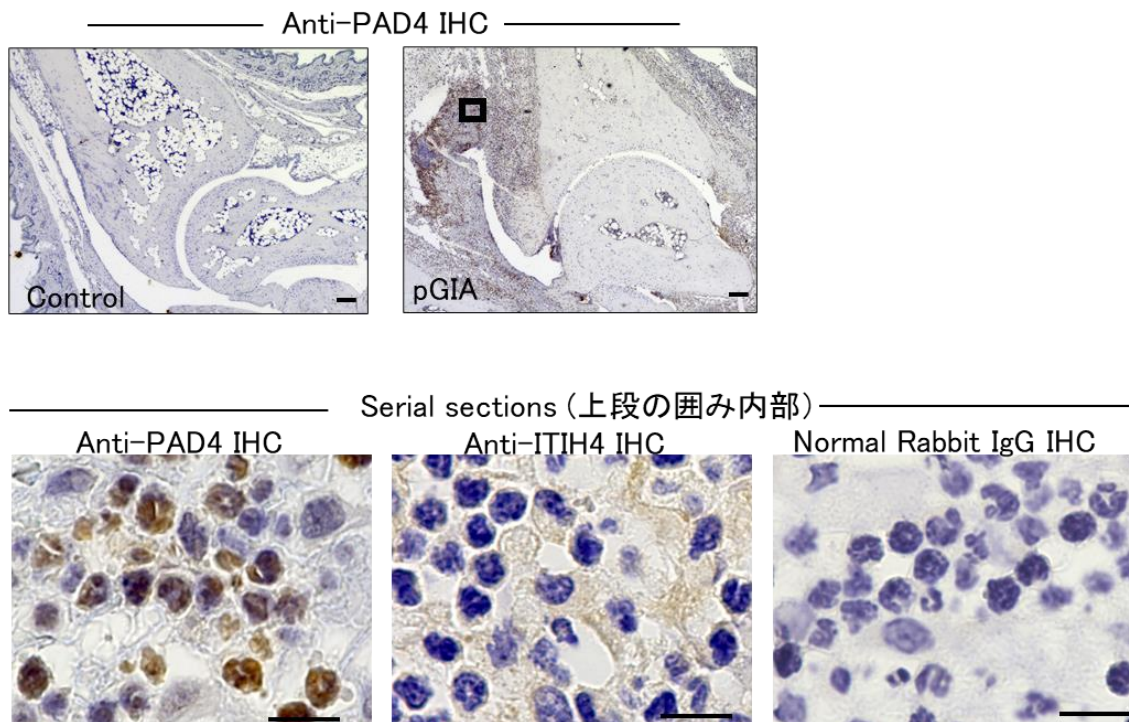


図7 pGIA マウスの足関節の抗 PAD4 抗体による免疫組織化学

PAD4 は好中球周囲の細胞外にも存在し、連続切片の対応する領域に ITIH4 蛋白が存在していた。

(上段)免疫 14 日後のコントロールおよび pGIA マウスの足関節における抗 PAD4 抗体による免疫組織化学。スケールバー:50 μm 。

(下段)上段囲み内の連続関節切片(4 μm)、抗 PAD4、抗 ITIH4、および対照抗体で染色。スケールバー:10 μm 。

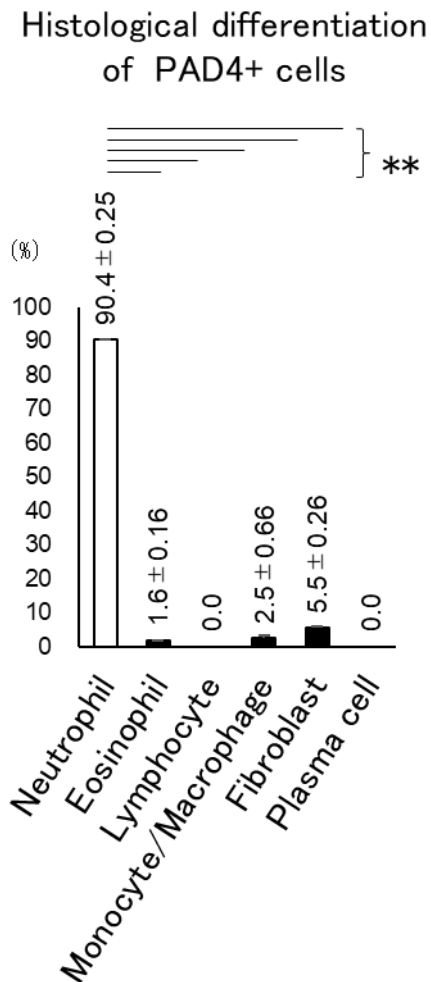


図8 pGIA マウスの足関節の PAD4 発現細胞の組織学的検討

抗 PAD4 抗体による免疫組織化学染色およびギムザ後染色した足関節の標本で PAD4 発現細胞の組織学的検討を行った。発現細胞の 90.4% が好中球であった。独立した二人の観察者で盲検的に施行し、強拡大にて合計 300 細胞をカウントした。**
p < 0.01 (one-way ANOVA with a post hoc Tukey's test for multiple comparisons)

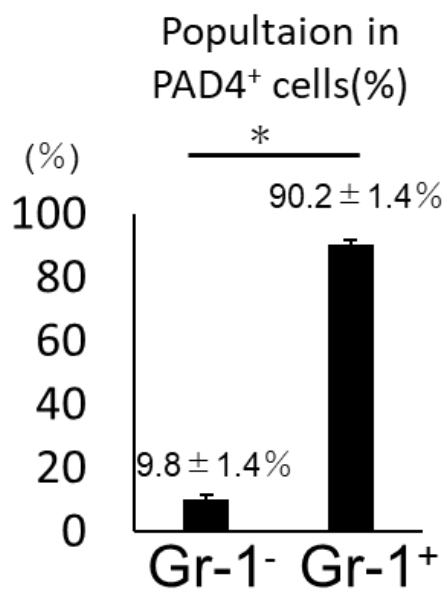
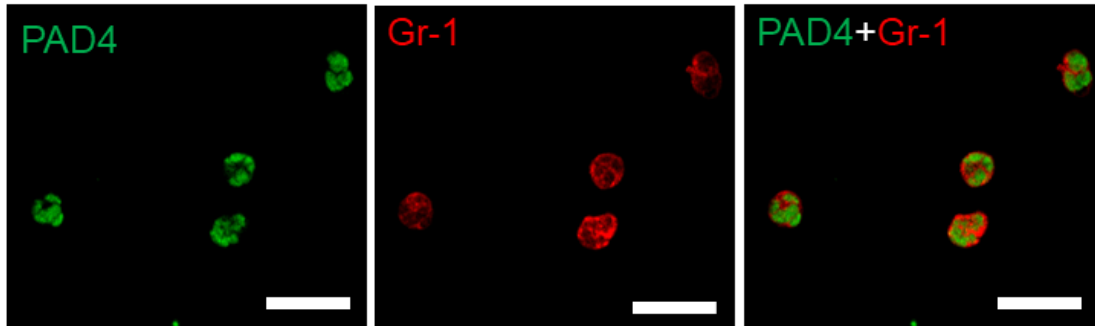


図9 pGIA マウスの足関節細胞の抗 PAD4 抗体および抗 Gr-1 抗体による免疫細胞

化学

免疫 14 日後の pGIA マウスで検討した (n=3)。PAD4 陽性細胞の $90.2 \pm 1.4\%$ が Gr-1 陽性であり、好中球が pGIA 関節における PAD4 の主な供給源であることが示唆され

た。スケールバー: 20 μm 。 * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test)

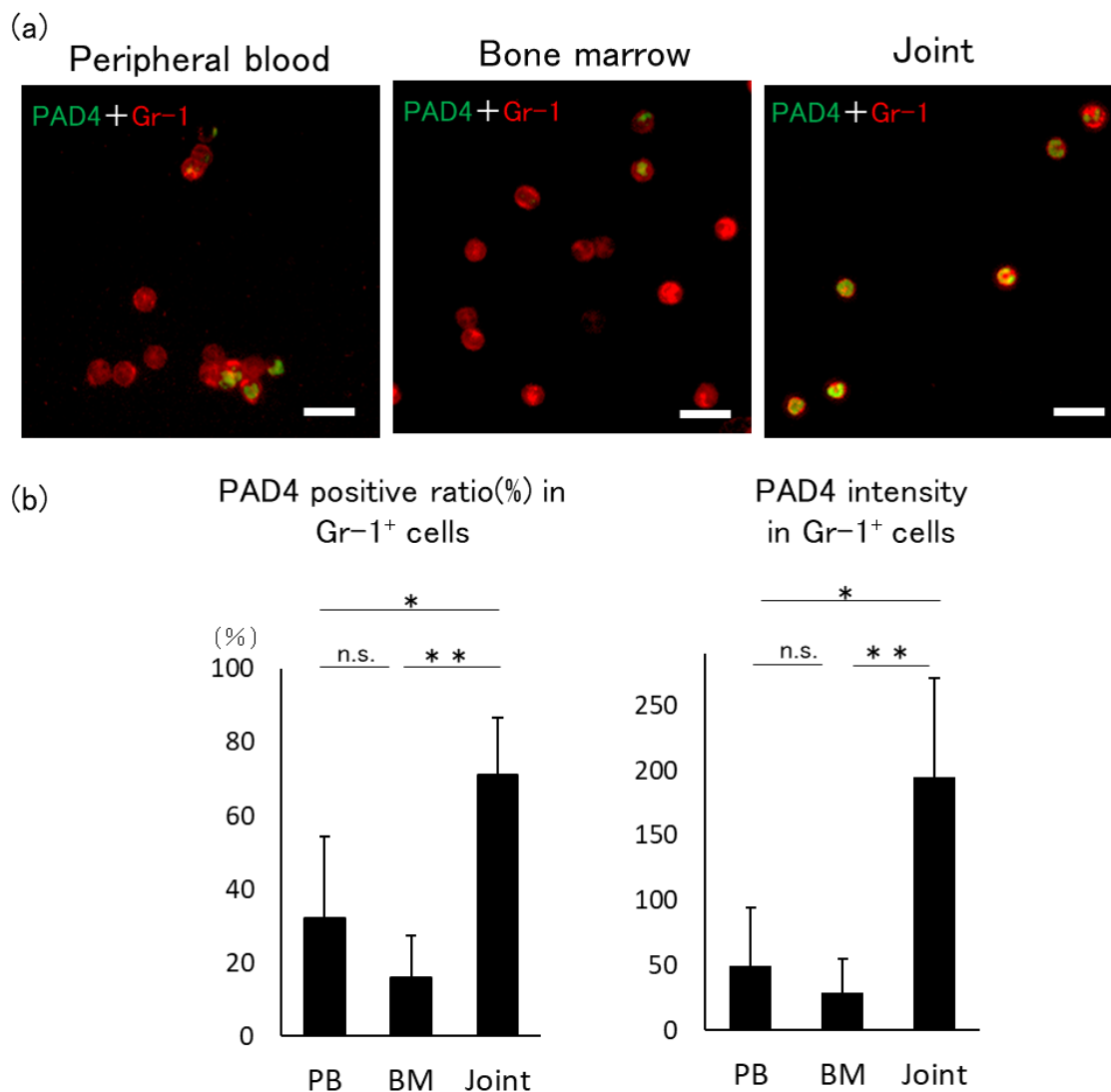


図 10 pGIA マウスの末梢血、骨髄、関節における PAD4 の発現の比較

(a)pGIA マウス(免疫 14 日後)末梢血、骨髄、および関節細胞における 14 日目の抗 PAD4 および Gr-1 抗体を使用した免疫細胞化学。(b)Gr-1 陽性細胞における PAD4 染色の陽性率および強度。Gr-1 陽性細胞における PAD4 の発現は、陽性率と強度の両方において他のグループよりも有意に高かった。n=7。* p <0.05、** p <0.01 (one-way ANOVA with a post hoc Tukey's test for multiple comparisons)

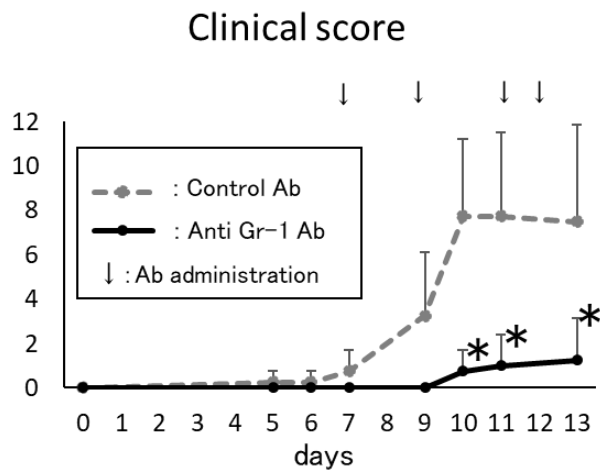
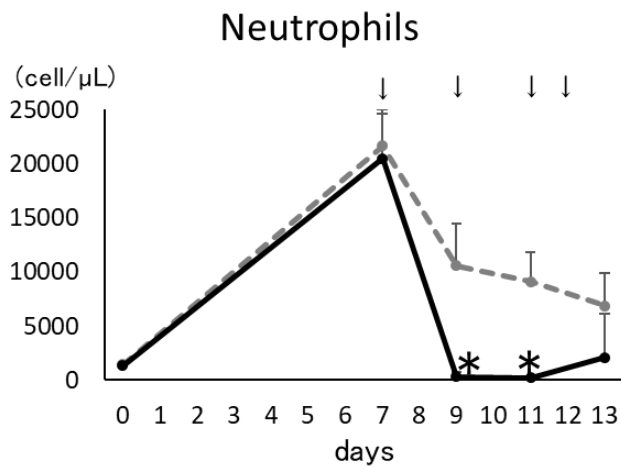


図 11 pGIA マウスにおける抗 Gr-1 抗体による好中球除去

コントロール抗体 (n = 4、破線) と抗 Gr1 抗体 (n = 4、実線) を投与した pGIA マウスの末梢血中の好中球数および関節炎スコア。抗 Gr-1 抗体は、アイソタイプコントロールと比較して末梢好中球数を減少させ、関節炎の重症度を有意に軽減した。* p < 0.05

(Mann-Whitney U test)

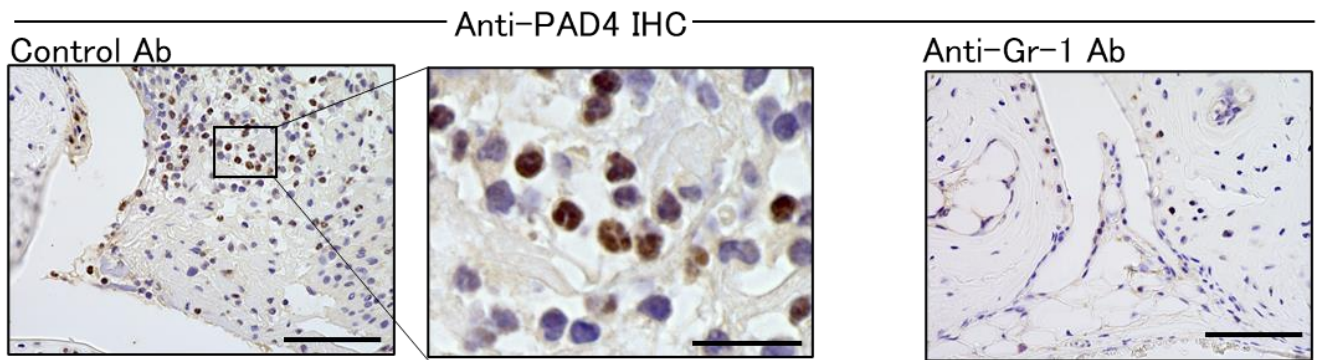


図 12 抗 Gr-1 抗体による好中球除去を行った pGIA マウスでの PAD4 発現の比較
 免疫 13 日目の足関節切片における抗 PAD4 抗体を用いた免疫組織化学。好中球の
 除去で PAD の関節局所発現が著しく低下した。2 列目の画像は、1 番目の画像の四
 角で囲んだ領域の拡大図。スケールバーは 1 番目と 3 番目の画像:50 μm 、2 番目の
 画像:20 μm 。

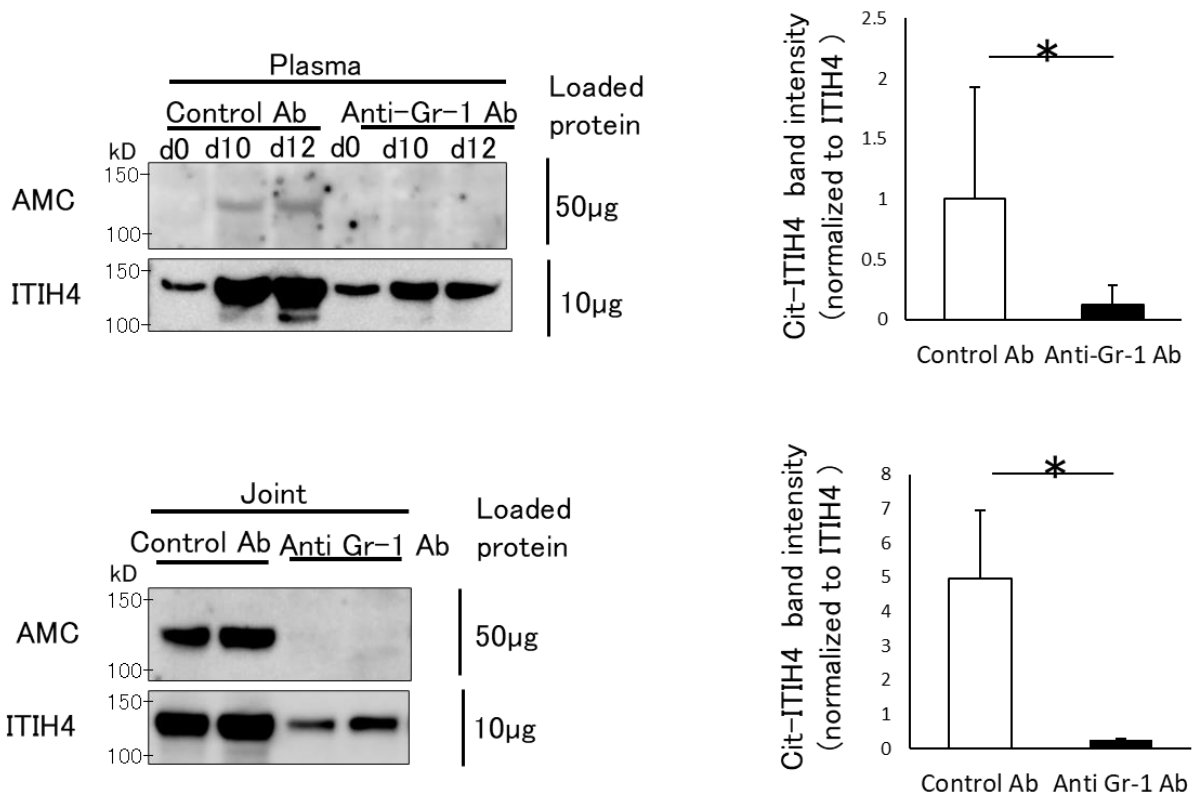


図 13 抗 Gr-1 抗体による好中球除去を行った pGIA マウスでのcit-ITIH4 の発現の比較

血漿(上段)と関節(下段,免疫 13 日後)におけるシトルリン化蛋白の発現を、AMC 抗体と抗 ITIH4 抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。免疫 12 日後(血漿)または 13 日後(関節)のバンド強度を各グループで比較した。血漿および関節におけるシトルリン化蛋白の発現は、抗 Gr-1 抗体の投与により有意に低下した。* p <0.05 (Mann-Whitney U test)

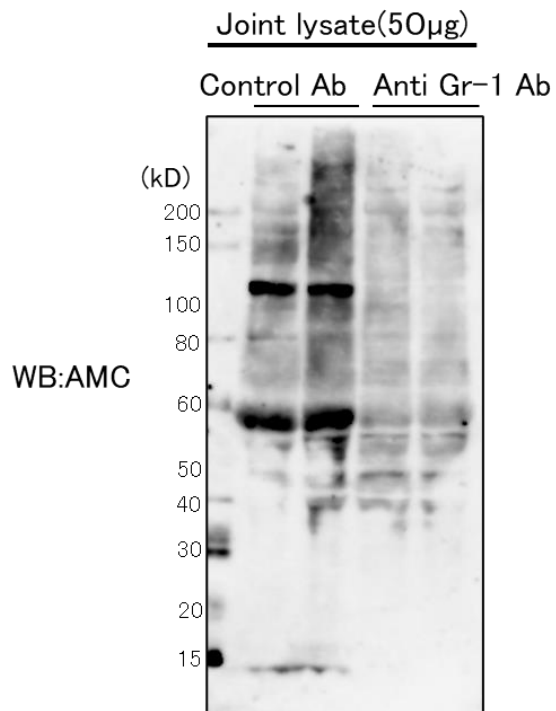


図 14 抗 Gr-1 抗体による好中球除去を行った pGIA マウスの関節におけるシトルリン化蛋白の発現検討

関節のシトルリン化蛋白の発現を、AMC 抗体を使用したウエスタンブロットで分析し、citITI4 以外の蛋白の減少も認められた。

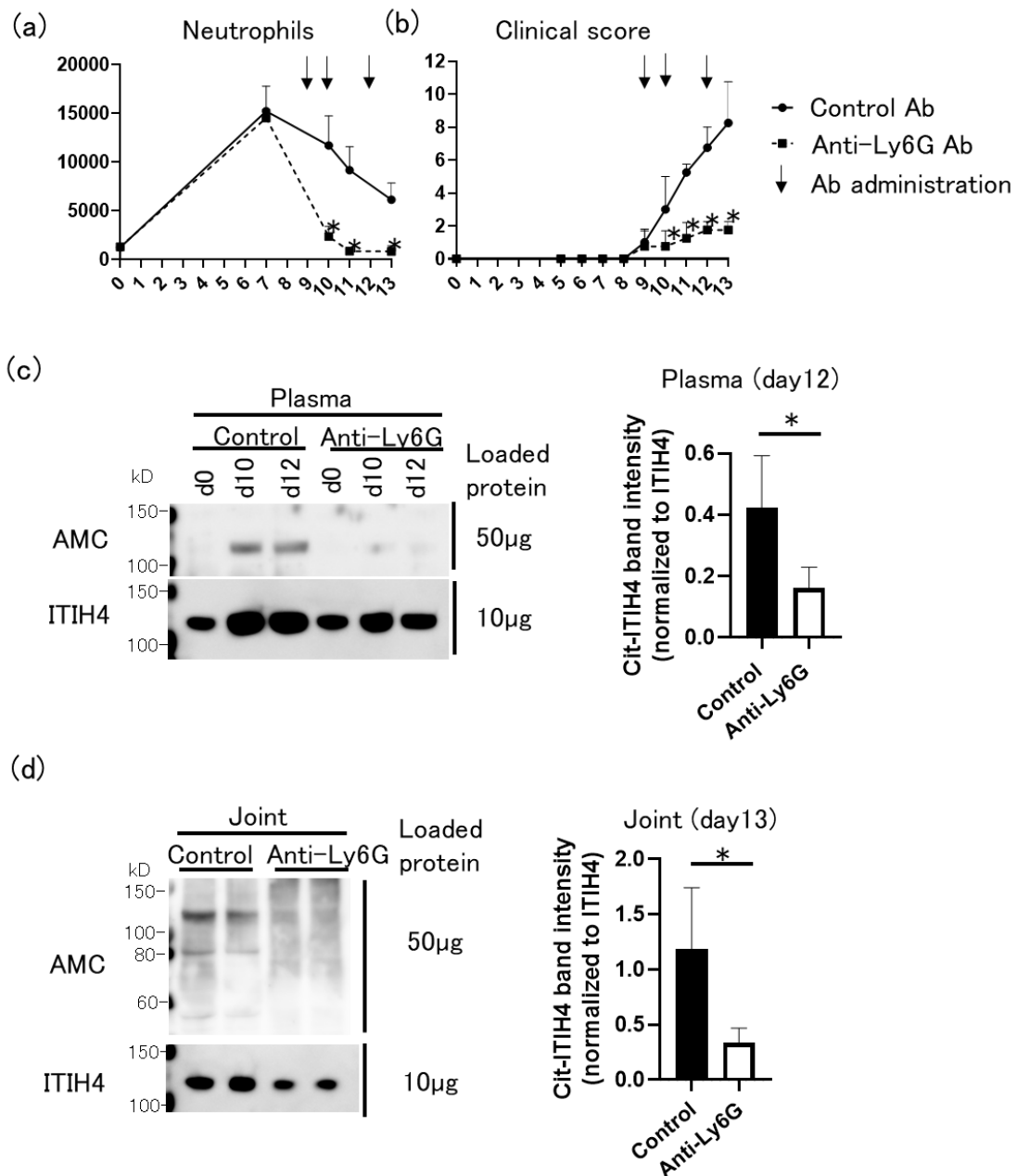


図 15 pGIA マウスにおける抗 Ly6G 抗体による好中球除去

末梢血好中球数(a) および関節炎スコア(b)の推移と、血漿(c) および関節ライセート(d)でのシトルリン化蛋白発現を示す。抗 Ly6G 抗体投与でも血中および関節での cit-ITIH4 発現の有意な減少を認めた。

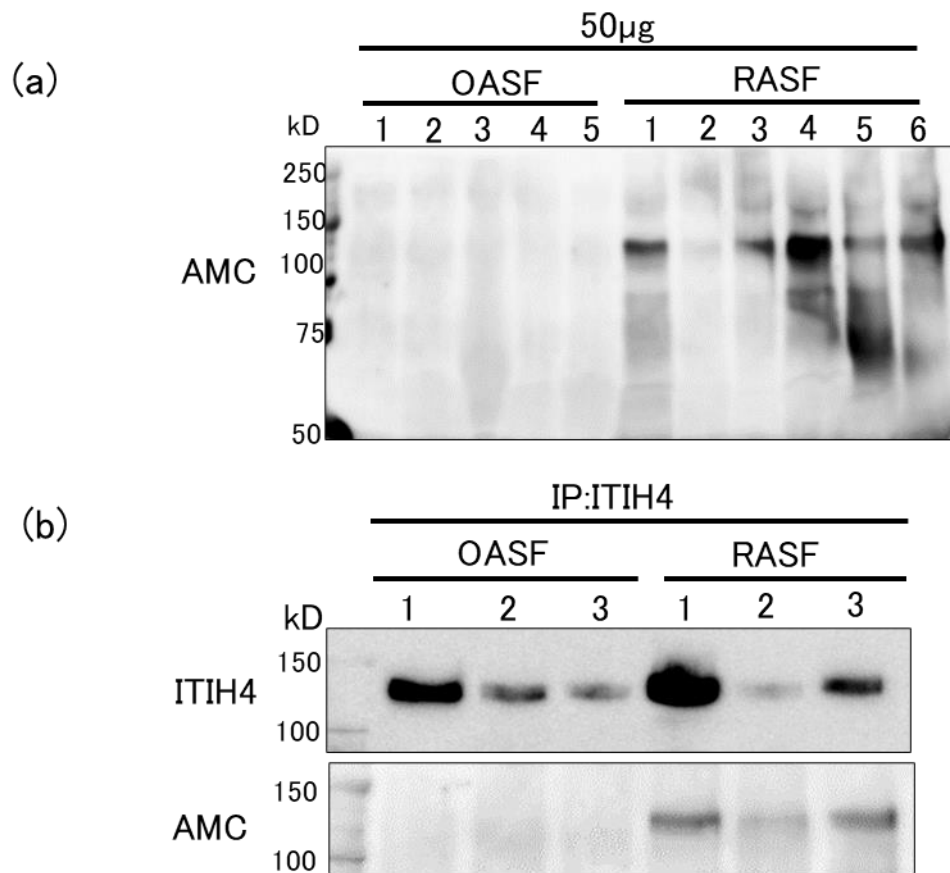


図 16 RA 患者の滑液中のシトルリン化蛋白の検討

(a) RA (n = 6) および OA (n = 5) 患者の滑液 (SF) を、AMC 抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。(b) 抗 ITIH4 抗体による RA (n = 3) および OA (n = 3) 患者の SF の免疫沈降、および AMC 抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。ITIH4 のシトルリン化は RA 患者でのみ観察された。

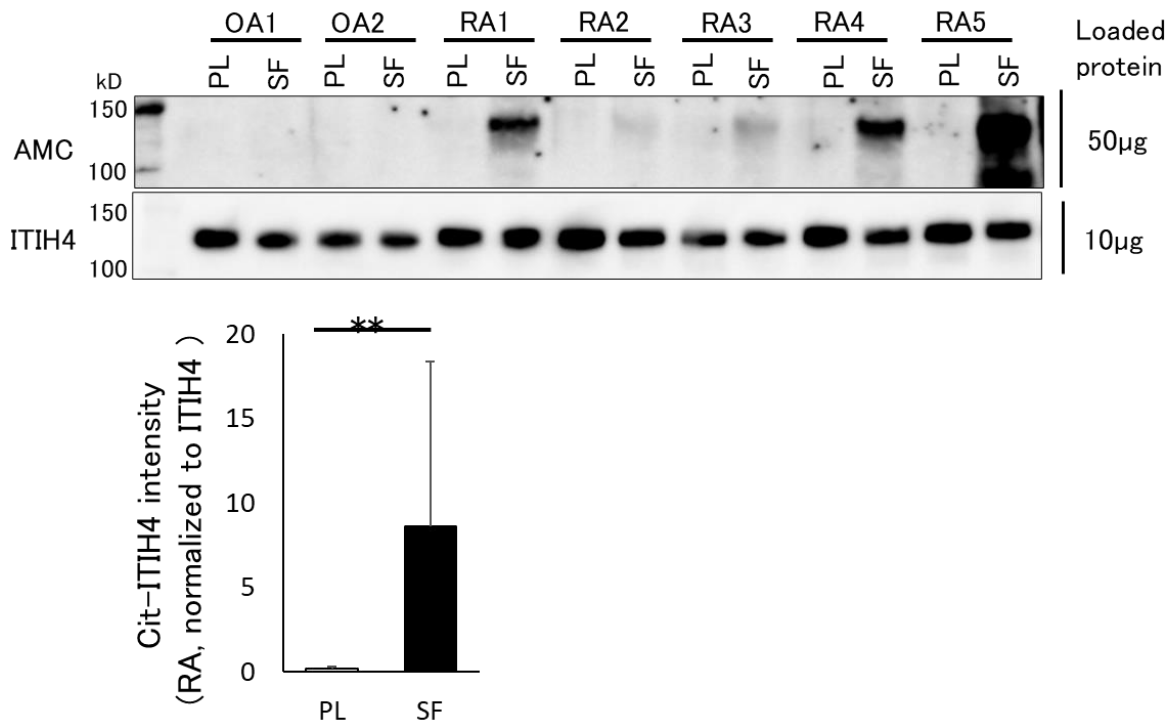


図 17 滑液と血漿の cit-ITIH4 の検討

AMC 抗体および ITIH4 抗体を使用したウエスタンブロットにより滑液 (SF) と血漿 (PL) を比較した。RA 患者 (n=7) について cit-ITIH4 のバンド強度を評価した。RA 患者の間では、バンド強度は血漿よりも滑液で有意に高かった。** p < 0.01、(Mann-Whitney U test)

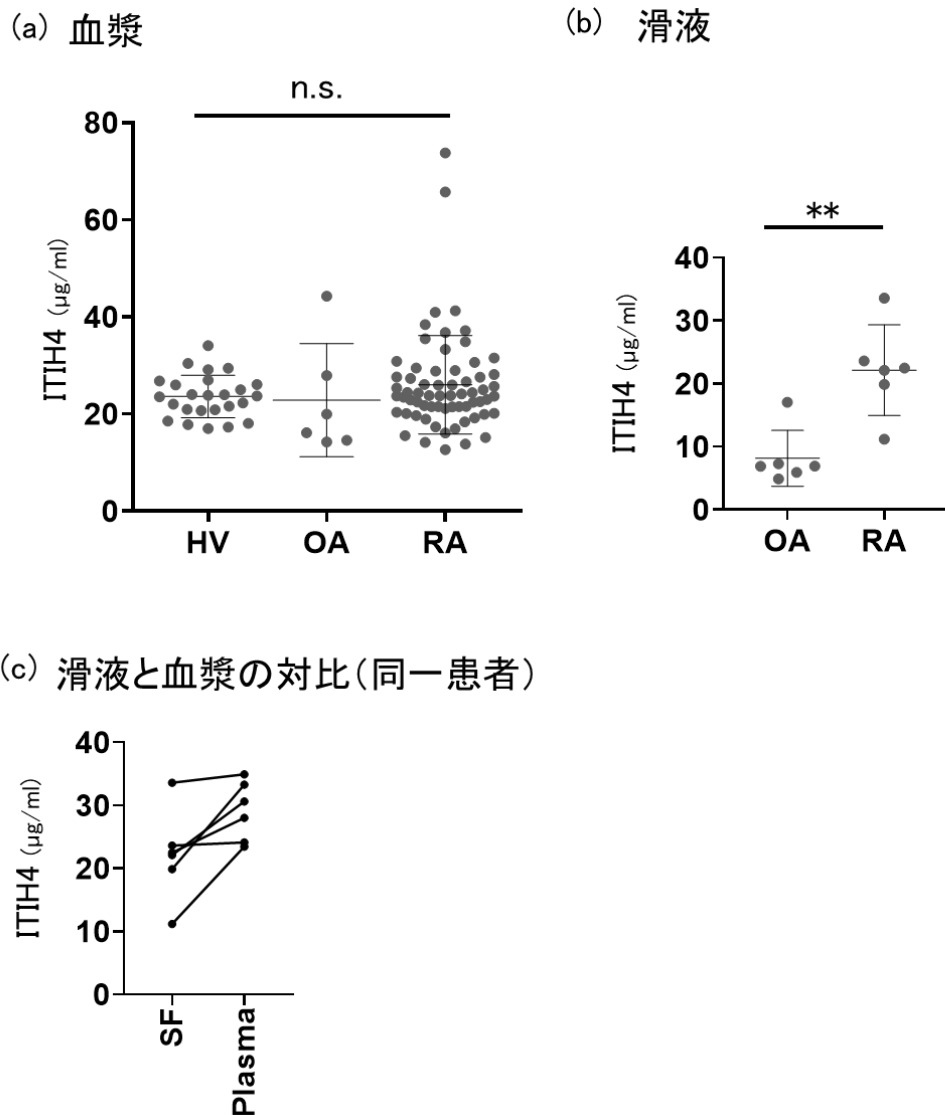


図 18 血漿および滑液中の ITIH4 濃度の ELISA 法による測定

ITIH4 濃度は、ELISA により(a)血漿 (HV; n = 25、OA; n = 6、RA; n = 65) および(b)滑液 (OA; n = 6、RA; n = 6)を分析した。(c)RA 患者で滑液と血漿を比較した(各線は同一患者を示す)。血漿中の総 ITIH4 レベルは HV、OA、および RA 患者間で有意差がなかった。 ** p < 0.01 (それぞれ one-way ANOVA with a post hoc Tukey's test for multiple comparisons、および Mann-Whitney U test)

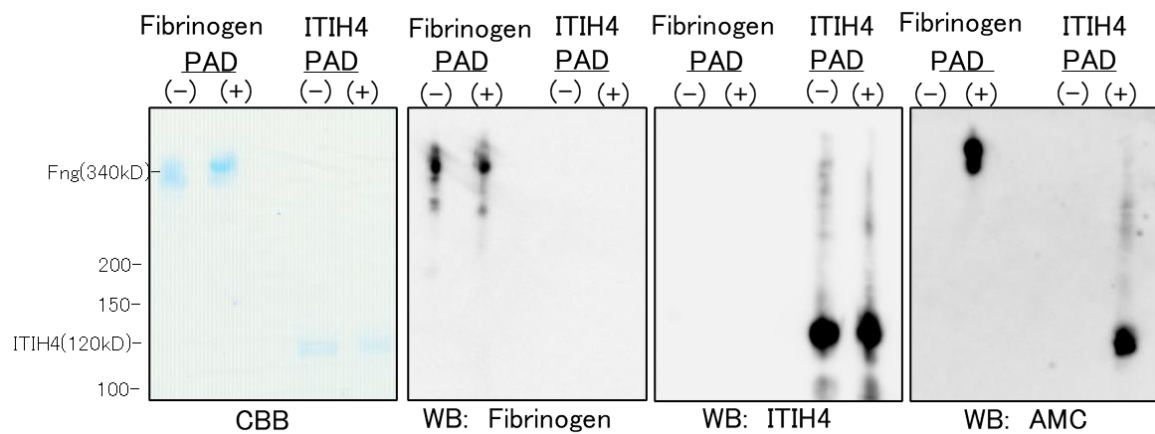


図 19 リコンビナント蛋白のシトルリン化

リコンビナントヒト ITIH4 とフィブリノーゲン(Fng)は、ウサギ PAD を使用してシトルリン化され、AMC アッセイで確認された。

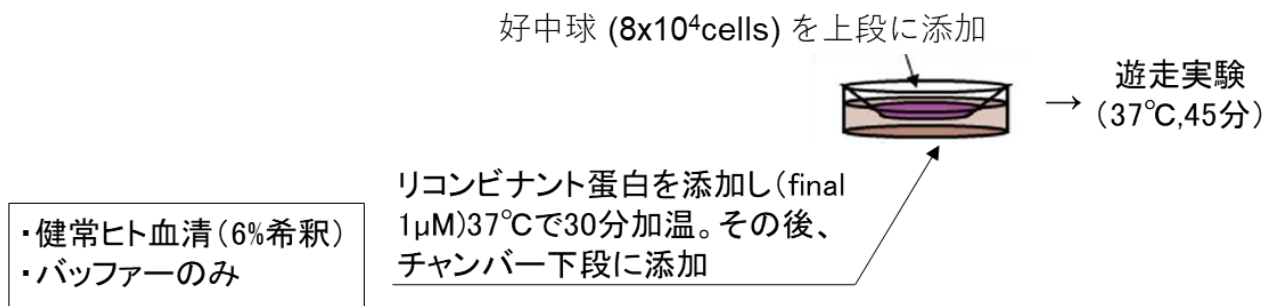


図 20 好中球遊走実験のスキーム

プールした正常なヒト血清 (N = 5) または 0.1M TrisHCl (コントロールバッファー) を各蛋白とインキュベートし、遊走性を検討した。

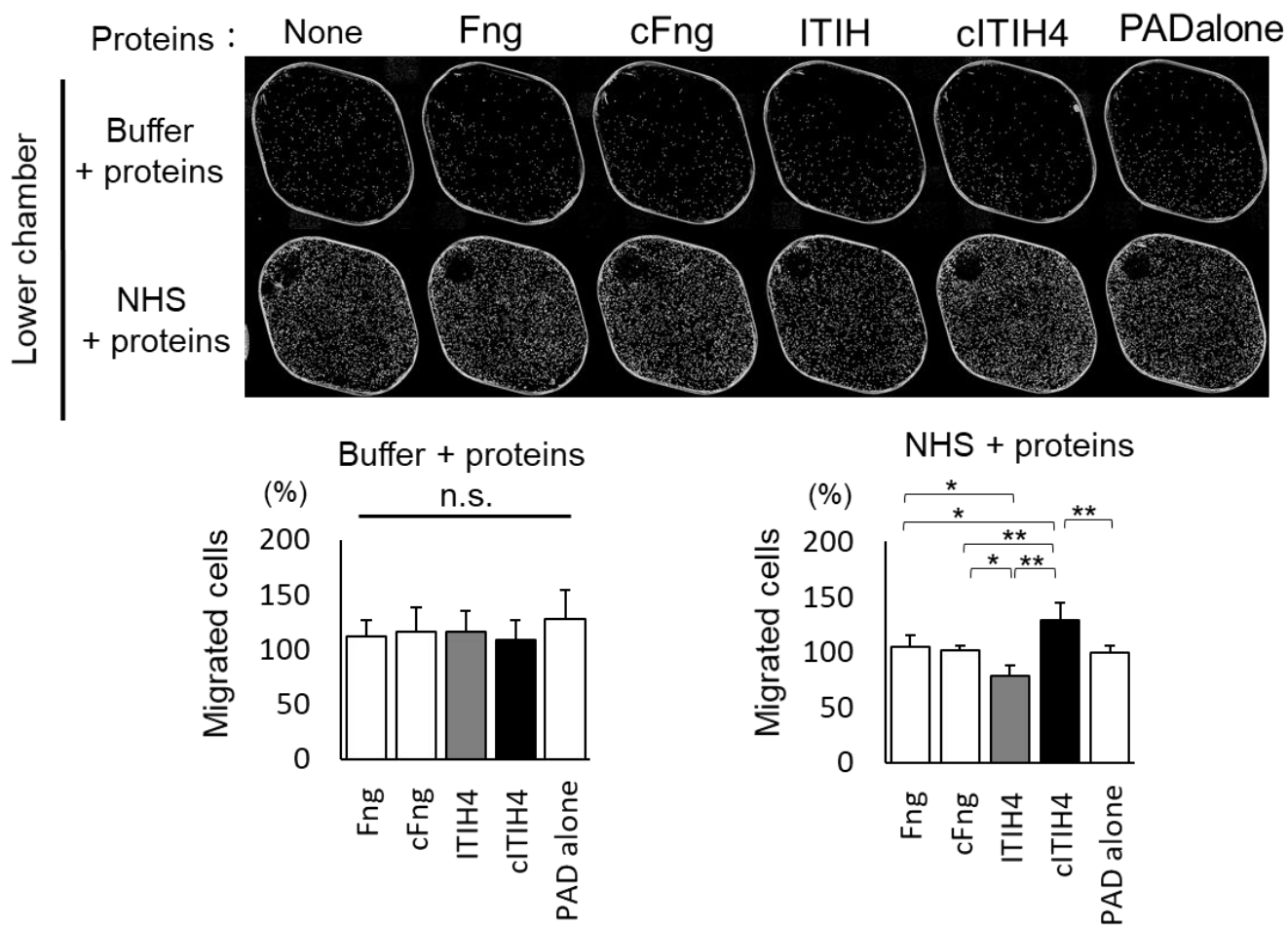


図 21 好中球遊走実験

(上段)遊走実験の代表的な結果。(下段)遊走した細胞数の結果(4回の独立した実験を施行)。遊走した好中球の数は、蛋白を含まないチャンバーへの移動細胞数を基準とし、その相対値で示した。ITIH4の添加は、フィブリンノーゲンと比較して好中球の遊走を有意に抑制した。一方で cit-ITIH4 には抑制的な作用は認めず遊走を亢進させた。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (one-way ANOVA with a post hoc Tukey's test for multiple comparisons)

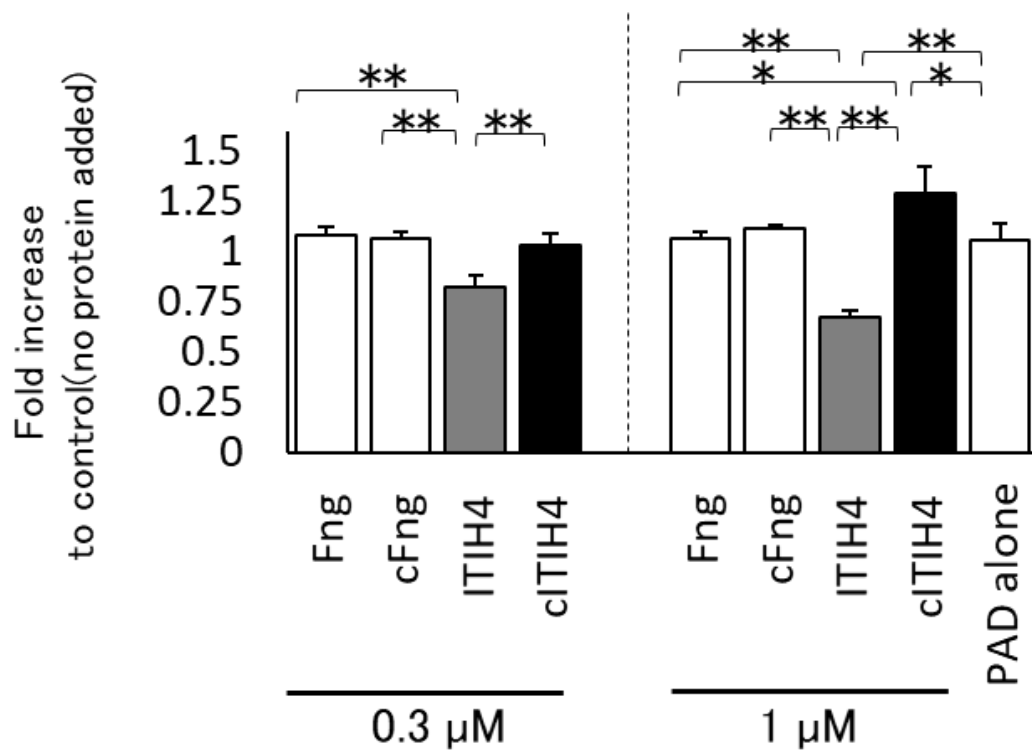


図 22 C5a 濃度の比較

リコンビナント蛋白が添加し、37°C30分インキュベートされた血清でのC5a濃度を分析した。値は、コントロールサンプル(蛋白を添加せずインキュベート)に対する変化倍率として表示した。これらの結果は、3つの独立した実験の結果である。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (one-way ANOVA with a post hoc Tukey's test for multiple comparisons)

ITIH4 添加血清で C5a の濃度が有意に低下したが、一方 cit-ITIH4 ではその作用は認めず、添加により C5a レベルは上昇した。