

# 論文概要

○ 論文題目

5   **Specific increase of citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 in sera with experimental and rheumatoid arthritis**

（関節炎モデルマウスと関節リウマチにおける血清中シトルリン化 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 の特異的な増加とその意義の解析）

10

○ 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

住田 孝之教授

15

（所属） 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

20   （氏名） 川口 星美

## 1. 目的

関節リウマチ（RA）の発症や進行において、自己抗原となるシトルリン化タンパク質は重要な役割を果たしていると考えられるが、その産生機序や病因的関与はまだ明らかでない。本研究では、関節炎モデルマウスを用いて、シトルリン化タンパク質の局在や病因的役割について探究した。また RA においても、シトルリン化タンパク質の発現や疾患活動性との関与について検討し、新規の血清マーカーとしての役割について検討した。

## 2. 対象と方法

- 1) ペプチド GPI (pGPI) を DBA/1 マウスに免疫し、関節炎を誘導した (pGPI 誘導関節炎; pGIA)。pGIA 血清中の抗 pGPI 抗体価、抗シトルリン化タンパク質抗体 (ACPA) 価を ELISA で測定した。
- 2) pGIA の関節、皮膚 (pGPI 免疫部位) の免疫組織化学染色で、シトルリン化タンパク質の検出を行った。
- 3) pGIA および RA 患者の血清を用いて、ウェスタンブロットでシトルリン化タンパク質の検出を行った。
- 4) pGIA および RA 患者の血清中に共通して認めたシトルリン化タンパク質を同定するため、血清の二次元電気泳動を行い、ゲルを切り出して質量分析で解析した。
- 5) 同定されたシトルリン化タンパク質について、RA の疾患活動性との関連や治療反応性について検討した。
- 6) pGIA に Cl-amidine (PAD inhibitor) を投与し、関節炎や ACPA、シトルリン化タンパク質の発現、サイトカイン産生、抗原特異的 T 細胞応答について検討した。

### 3. 結果

1) pGIA 血清中の抗 pGPI 抗体価、ACPA は免疫後 day14 から増加し、コントロールと比較して有意に上昇した。

2 関節では、day14（関節炎ピーク期）において関節内の滑膜過形成の部位にシトルリン化タンパク質の発現を認めた。皮膚では、day7（前関節炎期）において、皮  
50 内免疫部位周辺に浸潤する炎症細胞にシトルリン化タンパク質の発現を認めた。

3) pGIA 血清のウェスタンブロットでは、120kD の位置に共通してシトルリン化タンパク質のバンドを認めた。バンドは day7 から検出され、day14 で有意に増加し、その後減少しており、関節炎の臨床経過と相関する経過であった。RA 血清においても、同様に 120kD のシトルリン化タンパク質のバンドを特異的に認めたが、健常者  
55 やシェーグレン症候群患者（疾患コントロール群）では認めなかった。

4) 120kD のシトルリン化タンパク質の質量分析を行ったところ、inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) が同定され、数か所のシトルリン化修飾部位が同定された。そのうち、アミノ酸配列の 438 番目 (R438) のシトルリン化は、pGIA と RA に共通して認められた。

60 5) RA 患者において、ウェスタンブロットでのシトルリン化 ITIH4 のバンド陽性群は、陰性群に比較して C-reactive protein (CRP)、rheumatoid factor (RF)、DAS28-CRP が有意に高値であった。また、生物学的製剤治療開始前と開始 6 か月後の比較では、シトルリン化 ITIH4 値は治療後に有意に低下した。

6) Cl-amidine 投与により、関節炎の臨床所見は有意に低下した。ACPA は有意な  
65 差は認めなかったものの、低下傾向にあった。関節、皮膚のシトルリン化タンパク

質発現、血清中のシトルリン化 ITIH4 の発現は有意に抑制された。血清中の IL-6 値は著減し、pGPI 特異的 T 細胞応答には変化は認められなかった。

## 4. 考察

70 ITIH の機能についてはまだ不明な点が多いが、ITIH がヒアルロン酸に結合した serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP)-HA 複合体が RA の血清や滑液中に増加していることや、ITIH が補体経路を阻害すること、抗シトルリン化 ITIH3 抗体が RA の血清中に増加していることなどが報告されている。本研究では、RA と関節炎モデルマウスにおいて、シトルリン化 ITIH4 が血清中に特異的に増加してお  
75 り、これが関節炎に関与していることが示唆される。また、シトルリン化 ITIH4 値は関節炎の活動性に相関し、RA の疾患活動性を表す血清マーカーになりうると考えられる。

CI-amidine 投与実験では、PAD 阻害を介したタンパク質のシトルリン化の抑制が、関節炎の抑制につながった。シトルリン化タンパク質が、関節炎の病因において重要な役割を果たしていることが示唆される。  
80

## 5. 結論

PAD を介したタンパク質のシトルリン化が関節炎の病因に関与していることが示唆された。また、血清中シトルリン化 ITIH4 は RA に特異的に増加し、疾患活動性を表す新規の血清マーカーとなりうる分子であることが示唆された。  
85