

抗 CCP 抗体の出現または増加が RA 発症をもたらすのか

福岡徳洲会病院 人工関節・リウマチ外科センター

長嶺 隆二

(2017 年 第 18 回博多リウマチセミナー)

はじめに

抗シトルリン化蛋白抗体(anti-citrullinated protein antibody: ACPA)は様々なシトルリン化蛋白に対する自己抗体の総称である。一方、cyclic citrullinated peptide(CCP)は人工的に環状化した分子である。1998 年 Schellekens らはヒトフィラグリンの合成ペプチドを作製して RA 血清における抗体の検出を試みたが、その陽性率は RF よりも劣っていた。そこで、この合成ペプチドの両端をシステインとし共有結合により環状化したところ、抗体の検出率が飛躍的に向上した¹⁾。現在では抗 CCP 抗体は臨床の場で、RA の診断に用いられており、ACR/EULAR の RA 分類基準にも取り入れられている。抗 CCP 抗体は ACPA のひとつであり、本項では、ACPA との名称で統一している。この ACPA の出現または増加が RA 発症をもたらすのかに関して、文献的考察を行った。

1,免疫異常とは具体的には何か?

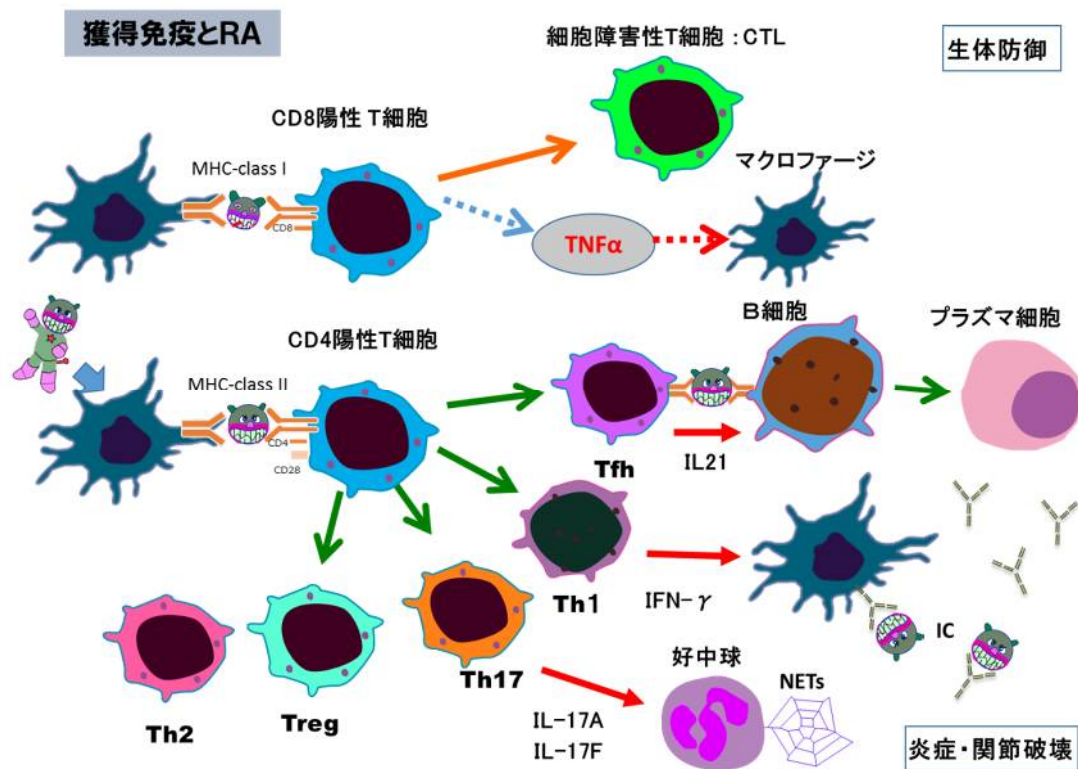


図1  は CP を表す。Tfh により B 細胞は活性化され、ACPA を産生する。

RA 発病には獲得免疫が大きく関与している。図 1、図 2 に示す如く、獲得免疫にはクラス I とクラス II が存在するが、基本的には図 2 に示す如く、クラス I では感染された細胞などが細胞内のタンパクを抗原として提示する。クラス II では食作用などで取り込んだ細胞外のタンパクを分解し、一部を抗原として提示する。

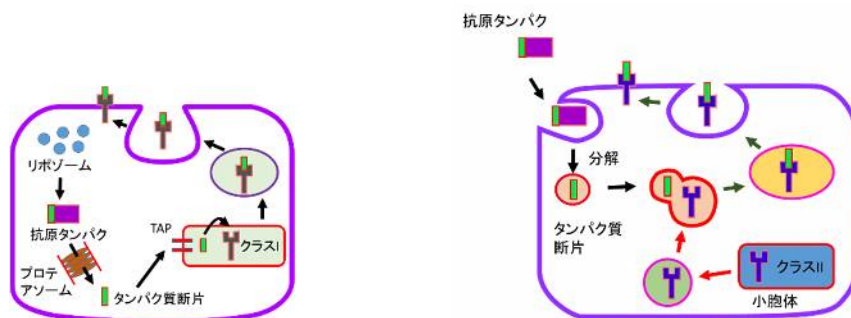


図 2 クラス I

クラス II

獲得免疫は抗原が提示された段階で始まるため、RA は、何らかの原因で変性したタンパクが細胞内で作られるために異常な免疫反応が起こる疾患と定義する事も出来る。クラス II では細胞外の抗原タンパクの処理を行うが、図 1, 2 に示す如く、この抗原タンパクのひとつがシトルリン化タンパク (CP) と考えらる。大阪大学からの報告にあるようにクラス I のように細胞内で異常なプロセスがある場合でも、クラス II にて抗原が提示される可能性もある²³⁾。現代社会において、あらゆる工場で商品が生産されるが、不良品が出てくる事は避けられない。抗原提示細胞内で不良品のタンパクが製造されてしまうと考えると理解がしやすい。別の見方をすると、オートファジー (Autophagy) の異常とも表現できる。オートファジーは細胞が自己成分を分解する機能であり、この働きによって生じた、“autophagy genetic variants”が、RA, クローン病, SLE などの疾患と関係がある事が報告されている⁴⁾。

2, ACPA が RA の発症に関与している証拠

RA の発病にシトルリン化タンパクが関与していることは明らかである。シトルリンは、スイカに多く含まれるアミノ酸であり、それ自体は問題を起こさない。アルギニンが、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (Peptidylarginine deiminase : PAD) という酵素によりシトルリン化される過程が増強した場合に RA 発症の可能性が高まる。各種シトルリン化タンパクが同定されているが、共通点はシトルリンのみである。PAD によるシトルリン化の意義を考えた場合、変性したタンパクが出現する事で RA 発病と結びつける事が可能である。具体的には、塩基性の強いアルギニンが中性のシトルリンに変換されると、疎水性が増大し、折りたたみ構造の展開 (アンフォールド) が起こる。これは、正常な蛋白の 3 次元構造が破綻する事を意味する。破綻して出来た異常な構造のタンパクは、抗原として提示される可能性がある⁵⁶⁾。この無意味なアンフォールドを、ミスアンフォールドと仮称する。この異常な構造のシトルリン化タンパクが、抗原提示細胞にて提示されると、図 1 に示す

ように免疫反応が起こり、RA の発病へと繋がっていく。

これまでの文献的なエビデンスを以下に示す。

シトルリン化タンパクは B 細胞に取り込まれると、ACPA が産生される。RF は変性した IgG の Fc 領域に対する自己抗体である。RA 症例において、ACPA および RF は、RA 発症以前から発現する⁷⁾。ACPA の抗体価が高い RA 症例ほど関節破壊が進行する⁸⁾。ACPA 陽性症例では、RF 値が高いほど骨びらん数・体積が増大する⁹⁾。RA 患者の滑膜組織では、シトルリン化タンパクが発現している¹⁰⁾。ACPA 含有免疫複合体(IC)はマクロファージからの TNF- α の産生を誘導する¹¹⁾。ACPA 陽性 RA 患者の滑膜組織では、T 細胞の浸潤が認められる¹²⁾。主要組織適合遺伝子複合体(MHC)において、一部のペプチドでは、シトルリンが shared epitope (SE)を含んだポケットにはまっており、SE のアミノ酸を変化させると結合しなくなる¹³⁾¹⁴⁾。

3. エビデンスを基にした RA 発病のメカニズム

前述した如く、シトルリン化にて変性したタンパクは抗原提示細胞に取り込まれ、細胞内で分解され、その一部がシトルリン化タンパクとなり、MHC によって提示される。この過程は MHC クラス II の細胞にて起こるが、細胞内で異常に合成されたタンパク（ミスフォールドタンパク）が MHC にて提示される可能性もある²⁾³⁾⁴⁾。

MHC クラス II 分子は α 鎖と β 鎖からなり、それぞれ 2 つの細胞外領域および膜貫通領域、細胞内領域からなる (図 3)。シトルリン化タンパクと MHC の関係において、先天的要因が関与する事が判明している。以前より、ヒトの MHC である HLA の β 鎖をコードする HLA-DRB1 の対立遺伝子 *0101、0401、0404、0405 等は、RA に関して強い関連を示すことは判明している。これらの遺伝子の超可変領域に相当する第 70~74 残基、Q/KRRAA という共通のアミノ酸配列(shared epitope: SE)は MHC のポケット形成に関与しており、同部位にシトルリン化タンパクが結合しやすいと考えられている。細胞内で MHC はシトルリン化タンパクと結合し、抗原として細胞外へ提示する(図 1, 2)。

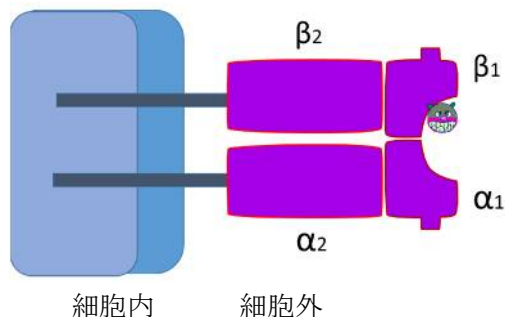


図 3 MHC の構造

特有のSEによるβ鎖にはシトルリン化タンパクが結合しやすい。

RA の先天的要因となる。

シトルリン化タンパクの提示を受けた **naïve T 細胞**は活性化され、一部は濾胞性ヘルパー T細胞(**Tfh**)へと分化する¹⁵⁾。シトルリン化タンパクを取り込んだ **B 細胞**はこれを抗原提示し、**Tfh**と反応すると(図 1.4)、活性化し形質細胞となり、**ACPA**を産生する。これらの

反応は異所性リンパ濾胞の中で、滑膜内でも起こる事が確認されている。リンパ濾胞内では、その胚中心に B 細胞、周囲に T 細胞が集合し、B 細胞が活性化していく。ACPA は、シトルリン化タンパクと免疫複合体(IC)を形成する。マクロファージは免疫複合体の Fc を認識して貪食し、TNF を放出する (図 1)。

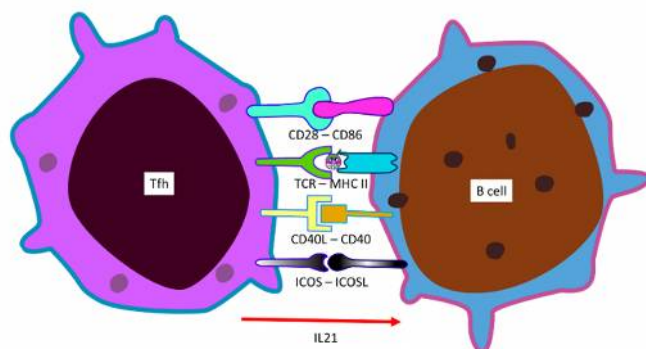


図 4 B 細胞がシトルリン化タンパクを Tfh に提示、共刺激にて B 細胞は活性化する。

もうひとつの先天的要因として最近注目を集めているのが、PADI4 である。PADI4 は RA の genome-wide association study によって non-MHC 遺伝子の RA 感受性遺伝子として本邦より初めて報告された。前述したごとく、PADI4 にコードされた PAD4 はシトルリン化タンパクを生成し、RA 発病の要因となる。抗 PAD4 抗体は新しい自己抗体で、RA における陽性率は約 26% であり、18% は RA 発症前から陽性となっている。抗 PAD3/4 抗体陽性の患者は関節破壊が進行しやすい¹⁶⁾¹⁷⁾。

一方、RA 発病の後天的要因としては、喫煙・歯周病・腸内細菌叢の乱れが確認されている。喫煙により肺内にて炎症がおこると PAD が産生される。喫煙以外で、他の微粒子なども、肺で炎症を引き起こし PAD が発現される可能性も報告されている。歯周病菌が PAD を産生するとも報告されているが、PAD 産生には炎症における好中球の働きがポイントとなる。

4, Neutrophil extracellular traps (好中球細胞外トラップ ; NETs)

体内に菌が侵入すると、好中球が貪食する。貪食しただけでは菌は死滅しない。菌を死滅させる方法として好中球が持つ 3 つの機能が判明している。

- 1, 酸素依存性の機構 : NADPH 酸化酵素系の働きで活性酸素や過酸化水素を発生させ食胞内にて殺菌する。
- 2, 非酸素依存性の機構 : 顆粒から放出される殺菌性酵素 (ラクトフェリン、リゾチーム、エラスターゼなど) などで殺菌・分解する。
- 3, Neutrophil extracellular traps: 抗菌性高分子が組み込まれたクモの巣状のクロマチン構造で、バクテリアや菌類、原生動物病原体を捕捉し殺傷する。抗菌成分やミエロペルオキシダーゼ (MPO)、ヒストン、好中球エラスターゼ (NE)、ラクトフェリン (LF)、その他 20 種類のタンパク質が含まれる。特にヒストンは、クロマチン (染色体) を構成する主

要なタンパク質である。長い DNA 分子を折り畳んで核内に収納する役割をもつ。ヒストンは DNA に結合するタンパク質の大部分を占め、ヒストンと DNA の重量比はほぼ 1:1 である。殺菌目的で、好中球は核内のクロマチンを細胞外に放出する(図 1)。このクロマチン網を neutrophil extracellular traps (NETs) と呼ぶ。NETs による細胞死は、ネクローシスやアポトーシスとは異なるタイプである為、NETosis と名付けられている。NETs は網状となり局所に留まって細菌を捉える。捉えられた細菌は好中球やマクロファージに貪食されやすくなり、また、NETs そのものにも殺菌作用がある。この NETs 形成に PAD4 が関与している。核膜崩壊時には PAD4 の作用によって、ヒストンのアルギニンがシトルリンに変化し、ヒストンと DNA との結合性が弱まることによってクロマチンは糸状となる。

したがって、感染や炎症部位において、好中球存在下で PAD が産生される¹⁸⁾¹⁹⁾。どの程度 NETs が RA 発病に関与しているかは依然不明であるが、少なくとも、NETs における PAD の産生はさらなるシトルリン化タンパクの出現に繋がっていく。

5, RF の役割

RA 症例において、ACPA や RF は、RA 発症以前から発現し⁷⁾、ACPA 陽性症例では、RF 値が高いほど骨びらん数・体積が増大する⁹⁾。したがって、RA 発病や関節炎増悪に RF が関与しているのは、状況証拠を見ると明らかである。しかし、その機序に関しては依然不明な点が多い。RF は変性した IgG の Fc 領域に対する自己抗体である。問題は、なぜ、変性した IgG が産生されるかである。前述したごとく、RA では抗原提示細胞内で異常な構造のタンパクが産生されるが、形質細胞から不良品の IgG が産生されるとも考えられる。さらに、RF は他の膠原病でも健常人でも認められるが、変性抗体/主要組織適合抗原複合体は RA に特異的であると報告されている²⁾。これらの産生過程の解析は今後に期待するとし、少なくとも、これらの抗体は免疫複合体を形成することで、RA の発病、増悪に関与していく。

6, 抗 CCP 抗体の出現または増加が RA 発症をもたらすのか

これまでの知見をまとめると、ACPA の出現および増加が RA 発病・発症をもたらすことは状況証拠で十分に説明がつく。さらに、免疫学的にもある程度の説明が可能となった。すなわち、抗原提示細胞の MHC の構造はシトルリン化タンパクと結合しやすく、シトルリン化タンパクが提示されると、Tfh 細胞が活性化、さらに B 細胞の活性化と繋がり、ACPA が産生される。ACPA は、免疫複合体を形成する事により、マクロファージから TNF を産生させる。また、ACPA は PAD とともに単球を活性化させて破骨細胞を生産させる。破骨細胞は骨破壊をもたらすが、この経路は炎症とは別に起こると報告されている²⁰⁾。また、IL-8 の autocrine も関与している²⁰⁾。さらに、分泌された IL-8 は侵害受容器に作用し、疼痛を発生させる²⁰⁾²¹⁾。したがって、ACPA は、骨破壊・疼痛・炎症の 3 つの局面において RA の発病・発症に関与している。

7, ACPA と RA の治療

ACPA 存在下に、マクロファージ、T細胞（特に Tfh）、B細胞、好中球と、免疫に関与する様々な細胞が関係する反応が起こり、サイトカイン産生へと繋がっていく（図5）。したがって、ACPA,RF 陽性の症例では、MTX や bDMARD を含めた、強力な治療を速やかに開始すべきである。また、シトルリン化タンパクが抗原提示細胞によって提示され続けるのであれば、RA の完治は困難であると考えられる。

一方、ACPA 陰性の症例では、シトルリン化タンパク以外のタンパクが細胞内で産生されるとも考えられる。抗カルバミル化蛋白抗体が近年注目されている。RA の病態形成におけるカルバミル化蛋白の役割はまだ明らかになっていないが、シトルリン化タンパクと同様の役割を果たしている可能性がある²²⁾。

8, おわりに

前述した如く、いくらサイトカインを抑えても、シトルリン化タンパクが抗原提示細胞から提示されるのが持続すれば、RA の完治は困難である。したがって、生物学的製剤も DMARD と称される。今後、研究が進み、抗原提示細胞内でのタンパクの autophagy や合成のプロセスが明確になり、異常な構造のタンパク産生を抑制可能となれば、RA を含めた自己免疫疾患の完治も可能と考える。

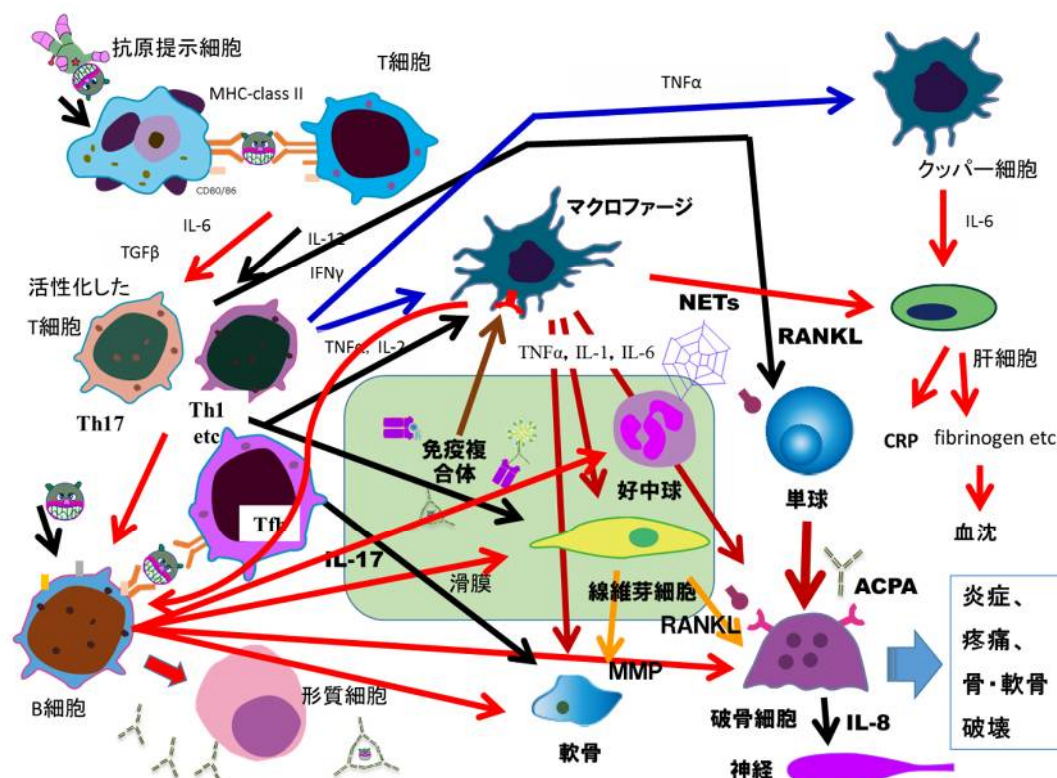


図5 RAにおける、抗原提示から関節破壊までの経路

文献

- 1) 大田俊行 関節リウマチにおける抗シトルリン化ペプチド抗体測定の有用性 モダンメディア 2007;53:208-12.
- 2) <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140225/>
- 3) 大村浩一郎 他. 新規自己抗体産生機序 ミスフォールドタンパクの MHC class II による抗原提示 日本臨床免疫学会会誌 2014;37:462-467.
- 4) Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. Nat Rev Immunol. 2016;16:661-675.
- 5) 船内正憲 研修医のための教育講座 関節リウマチの病態と喫煙 近畿大医誌 2015;40:65-70.
- 6) Tarcsa E, 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.
- 7) Nielen MM, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. Arthritis Rheum. 2004;50:380-386.
- 8) Syversen SW, et al. High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. Ann Rheum Dis. 2008;67:212-217.
- 9) Hecht C, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. Ann Rheum Dis. 2015;74:2151-6.
- 10) Amara K, et al. Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. J Exp Med. 2013;210:445-455.
- 11) Clavel C, et al. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcγ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. Arthritis Rheum. 2008;58:678-688.
- 12) van Oosterhout M, et al. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2008;58:53-60.
- 13) Scally SW et al, A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis J Exp Med, 2013;210:2569-82
- 14) Anderson KM et al, A Molecular Analysis of the Shared Epitope Hypothesis: Binding of Arthritogenic Peptides to DRB1*04 Alleles. Arthritis Rheumatol, 2016;68:1627-36.
- 15) 中山田真吾 他. 自己免疫疾患における濾胞性ヘルパーT(Tfh)細胞 日本臨床免疫学会会誌 2016;39:1-7.
- 16) Suzuki A, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet 2003;34:395-402

- 17) Kolfenbach JR, et al. Autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 precedes clinical onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2633-9
- 18) Pratesi F, et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann rheum Dis* 2014;73:1414-22.
- 19) Khandpur R, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2013;5:178ra40.
- 20) Sokolove J, et al. Bone loss, pain and inflammation: three faces of ACPA in RA Pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:637-9
- 21) Wigerblad G, et al. Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:730–738.
- 22) Shi J, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:17372-7.