

Title	関節リウマチに見出される新しい自己抗体の対応抗原分析および臨床的・病因的意義の解明
Sub Title	
Author	野島, 崇樹(Nojima, Takaki) 池田, 康夫(Ikeda, Yasuo)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.T101- T113
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040601-0101

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

関節リウマチに見出される新しい自己抗体の対応抗原分析
および臨床的・病因的意義の解明

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：池田康夫教授)

の じま たか き
野 島 崇 樹

(平成15年12月16日受付)

Key Word : autoantibody, rheumatoid arthritis, cytokeratin-18, FUSE-binding protein, γ synergin

全身性炎症性疾患である膠原病は多種類の自己抗体の産生を特徴とする。これらの自己抗体は特定の疾患または臨床像と密接な関係を持つことが示され、疾患のマーカーとして診断・病型分類や予後の推定・治療効果判定など臨床的に有用とされる。さらに自己抗体が認識する対応抗原(自己抗原)は、遺伝子の複製、転写、RNAプロセッシング、翻訳などの生命現象に不可欠な酵素や調節因子であることが明らかとなり、自己抗原の分析は自己抗体産生機序の解明、自己免疫疾患の病因・病態の追究のために重要と考えられる¹⁾。

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)は、多発関節炎を主症状とする全身性炎症性疾患で²⁾、リウマトイド因子(RF)などの存在により全身性自己免疫疾患として位置づけられているにもかかわらず、他の膠原病のような疾患特異的自己抗体の報告は少なく、自己免疫現象とRAの病因・病態との関与も明らかになってはいない³⁾。

本研究では、第一に検出感度の高いHeLa細胞を抗原に用いた免疫ブロット法によりRA特異自己抗体の検出を行った^{4,5)}。さらに、新たな自己抗体が対応する自己抗原遺伝子cDNAのクローニングを進め、その臨床的・病因的意義を追求した。

対象ならびに方法

1. 対象

対象は教室の膠原病患者136例、(アメリカリウマチ協会(ARA)のRA改訂分類基準⁶⁾を満たすRA患者64例、RA以外の膠原病72例(ARAの改訂分類基準⁷⁾を満たす全身性エリテマトーデス(SLE)36例、ARAの分類予備基準⁸⁾を満たす強皮症(SSc)18例、Bohanらの診断基準⁹⁾を満たす多発性筋炎および皮膚筋炎(PM/DM)18例、健常人9例の保存血清を用いた。

2. HeLa細胞を抗原に用いた免疫ブロット法

HeLa細胞(1検体当たり 1×10^6 個)をTris-Buffered Saline (TBS, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.5)で1回洗浄後、sodium dodecylsulphate (SDS) sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.005% bromophenol blue, pH 6.8)を加え、超音波破碎器で破碎した。このHeLa細胞抽出物を5分間100°Cで加熱し、SDS-10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、Towbinらの方法¹⁰⁾に従い、ニトロセルロース膜(BA-85, Schleicher & Schuell社, Dassel, Germany)に転写し、2% (W/V) スキムミルク(森永乳業, 東京, 日本)/TBS溶液でブロックした。このニトロセルロース膜を5 mm幅の短冊型に切り、TBS-

本論文は、Nojima T, Kamata M, Matsunobu T, Kimura M, Mimori T, Matsumura M, Fujii T and Akizuki M : Detection of autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis. Jpn J Rheumatol 6 : 189-200, 1996の一部を含む。

NP40 (TBS, 0.05% Nonidet P-40) で希釈した被験血清 (1:50) と 4°C で一晩反応させた。これを TBS-NP40 で 4 回洗浄した後、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG ヤギ血清 (Promega 社, Madison, WI, USA, 1:7500 希釈) と室温で 1 時間反応させた。TBS-NP40 で 3 回洗浄後、これにアルカリホスファターゼ用緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH9.5) 50 ml, nitro blue tetrazolium (NBT) 330 μl (Promega 社), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) 165 μl (Promega 社) を加えて発色させ、抗体と反応する蛋白を検出した。

3. RA 自己抗体が認識する自己抗原 cDNA のクローニング

HeLa 細胞由来の λgt11 cDNA ライブラリー (Clontech 社, Franklin Lakes, NJ, USA) を Young と Davis の方法¹¹⁾ に準じてスクリーニングした。2 種類の RA 特異的自己抗体 (抗 75 kD 蛋白, 抗 45 kD 蛋白抗体) 陽性の 3 例の RA 患者等量混合血清を TBS で 1:100 に希釈し、大腸菌 Y1090 菌体成分と反応させ抗大腸菌抗体を吸収した。λgt11 cDNA ライブラリーファージ (1×10⁴ plaque forming unit: pfu) を 50 mM 硫酸マグネシウム中に浮遊させた大腸菌 Y1090 株 (1×10⁹/ml) 0.3 ml と 37°C で 15 分間保温して感染させ、50°C に融解したトップアガー (0.7% バクトアガー (GIBCO-BRL 社, Rockville, MD, USA) 添加 Luria-Bertani's (LB) 培地 (バクトトリプトン (GIBCO-BRL 社) 10 g, イーストエクストラクト (GIBCO-BRL 社) 5 g, NaCl 10 g/H₂O 1000 ml)) 3 ml を加えて、アンピシリン (ABPC 50 μg/ml) 添加寒天プレート (90 mm 径) 上に散布した。42°C で 3 時間培養して溶菌斑を形成後、プレート表面に 10 mM イソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG, Roche Diagnostics 社, Basel, Switzerland) を浸したニトロセルロースフィルター (BA-85, 82 mm 径, Schleicher & Schuell 社) をのせ、さらに 37°C で 2 時間培養を続け、融合蛋白を発現させると同時にフィルターに転写した。このフィルターをスキムミルク/TBS 溶液で 1 時間ブロックした後、上記の大腸菌吸収 RA 混合血清中で室温 3 時間反応させた。これを TBS-NP40 で 4 回洗浄した後、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG と室温で 1 時間反応させた。TBS-NP40 で 3 回洗浄後、これにアルカリホスファターゼ用緩衝液 50 ml, NBT 330 μl, BCIP 165 μl を加え、抗体が反応するプラークを発色させて検出した。得られた陽性クローンは希釈して同様のスクリーニング

を行い、プラークが 100% 陽性になるまで繰り返して精製した。

4. DNA の精製

陽性クローンを含む λファージ 1×10⁵ pfu を大腸菌 Y1090 株に感染後、トップアガーを加えて ABPC 添加アガロースプレート上に散布し 37°C で 12 時間培養して増殖させた。SM 緩衝液 (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-Cl, 2% gelatin, pH 7.5) を加えて室温で 5 時間浸透して溶出したファージを、10% ポリエチレングリコール, 1M NaCl を等量加えて沈殿させ、さらにフェノール・クロロホルムで λファージ DNA を回収した。精製したファージ DNA は制限酵素 EcoRI (宝酒造社, 東京, 日本) で切断し、1% アガロースゲル電気泳動で分画、インサート DNA を含むゲルを切り出し、ガラス粒子吸着法 (GeneClean kit, Bio101 社, Vista, CA, USA) で cDNA を精製した。

5. DNA サザンブロット法

精製ファージ DNA を制限酵素 EcoRI で切断し、1% アガロース電気泳動で分画した。0.4N NaOH を転写バッファーとして、このゲルを 2 時間ナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham Bioscience 社, Piscataway, NJ, USA) にアルカリプロットングを行い、ペルオキシダーゼで標識したカルバスタチン部分 cDNA (京都大学三森経世教授より供与) と 42°C 10 時間ハイブリダイズさせ、ルミノール反応を用いた化学発光により検出した (ECL キット, Amersham Bioscience 社)。

6. βガラクトシダーゼ (βGal)-融合蛋白の誘導

上記により精製した組み換え λgt11 ファージを大腸菌 Y1089 に感染させ、ライソゲン化した。これを 32°C で振とう培養し、OD_{600nm}=0.5 まで増菌した時に 15 分 42°C に温度を上げ、IPTG (終濃度: 1 mM) を添加してさらに 37°C で 2 時間培養し、βGal-融合蛋白を発現させた。

7. βGal-融合蛋白の免疫ブロット法

上記 βGal-融合蛋白を SDS sample buffer に溶解して、5 分間 100°C で加熱し、SDS-10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、スキムミルク/TBS 溶液でブロックした。このニトロセルロース膜を 5 mm 幅の短冊型に切り、TBS-NP40 で希釈した大腸菌吸収被験血清 (1:100) と 4°C で一晩反応させた。これを TBS-NP40 で 4 回洗浄した後、ア

ルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG と室温で 1 時間反応させた。TBS-NP40 で 3 回洗浄後、これにアルカリホスファターゼ用緩衝液 50 ml, NBT 330 μ l, BCIP 165 μ l を加えて発色させ、多数の膠原病患者血清を用いて同様の方法で β Gal-融合蛋白との反応性を検討した。陽性コントロールとして、1 次抗体にマウス抗 β Gal 抗体 (Promega 社, 1 : 5000 希釈), 2 次抗体にアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG ヤギ血清 (Promega 社, 1 : 7500 希釈) を用いた。

8. DNA シーケンス法

陽性クローン RA5, RA9, RA21 の部分 cDNA (EcoRI 切断済) を, M13mp18RF-DNA (宝酒造社) の EcoRI 部位にサブクローニングした。これらの組換え DNA を大腸菌 JM101 株に感染させ得られた 1 本鎖 DNA で Sanger らの dideoxy 法¹²⁾により修飾 T7DNA ポリメラーゼ (Sequenase, Amersham Bioscience 社) を用いて、塩基配列を決定した。得られた塩基配列および推定アミノ酸の相同性の検索は GenBank (NCBI : National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA) の DNA データベースと照合した。

9. 抗サイトケラチン-18 (CK-18) 抗体陽性例の臨床的特徴の検討

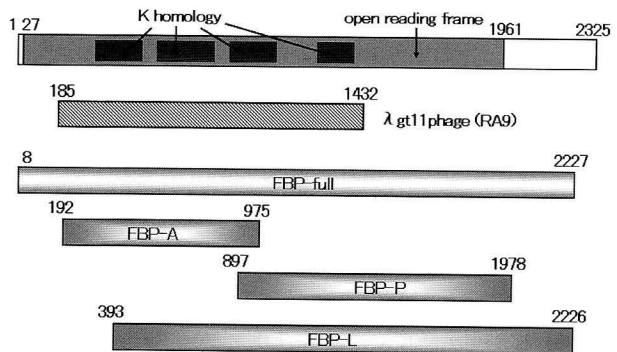
RA における、抗 CK-18 抗体陽性例と陰性例を層別化し、臨床的特徴に統計的有意差があるかどうか、Fisher の完全確率を計算し比較検討した。

10. 健康人末梢血 mRNA 由来 cDNA の合成

健康人協力者より採血した末梢血を、Ficoll-Paque (Amersham Bioscience 社) を用いて有核細胞として回収し、細胞の全 RNA を TRIzol (Life Technologies 社, Gaithersburg, MD, USA) を用いて抽出した。1 μ g の全 RNA をスーパースクリプト II RNAaseH 逆転写酵素 (Gibco-BRL 社) と反応させて、ヒト末梢血 cDNA を合成した。

11. c-myc far upstream element binding protein (FBP) 全長 cDNA の分離ならびに発現ベクター pMAL-C2X へのサブクローニング

FBP 全長 cDNA を得るため、上記 10 のヒト cDNA を template とし、既報の FBP mRNA¹³⁾のオープンリーディングフレームを含む F1 と F2 (第 1 表) をプライマーに用い、Expand TM High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics 社) により、94°C2 分反応後、94°C30 秒 (ディネーター反応)、64°C1 分 (アニーリング)、68°C3 分 (エクステンション)、30 サイクルの PCR 反応を T3 Thermocycler (Biometra, Whatman 社, Goettingen, Germany) で行った。さらに、nested PCR を行うことで (PCR 条件は上記と同様)、FBP-A (192-975), FBP-P (897-1,978), FBP-L (393-2,226) の部分 cDNA を作成した (第 1 図)。なお、それぞれのプライマーセットは、5' 側に XbaI リンカー、3' 側に HindIII リンカーをつけ (第 1 表)、合成された部分



第 1 図 c-myc far upstream element binding protein (FBP) 遺伝子の構造と PCR 産物。FBP 遺伝子は全長 2,325 bp, 27-1,961 が open reading frame で、DNA 結合部位である K Homology を 4 箇所に認める。クローニングで確認した λ gt11 phage (RA9) は FBP 遺伝子の 185-1,432 をコードしていた。FBP-full を PCR 増幅し、さらに 3 種の部分 cDNA (FBP-A, FBP-P, FBP-L) を nested PCR で増幅し、pMAL-C2X へのサブクローニングに使用した。

第 1 表 FBP-cDNA の PCR 増幅に用いたプライマー

position	5'-primer	3'-primer
full (8-2227)	F1 CGGCTCTTATAGTGCAACCA	F2 ATCACAAGCATCAACCACA
FBP-A (192-975)	A1 CCTCTAGAAATGACTATGGTTATGGGGGAC	A2 GGAAGCTTTGCTATCCTTTCGGGTGTTGT
FBP-P (897-1978)	P1 CCTCTAGAATAGGAAGAAATGGAGAGATGAT	P2 GGAAGCTTCACACAATGAAGCAAATACTG
FBP-L (393-2226)	L1 CCTCTAGAATCTCACGCATACAACAGGAA	L2 GGAAGCTTATCACAAGCATCAACCACAT

cDNA が発現ベクター pMAL-C2X (New England BioLabs 社, Beverly, MA, USA) の XbaI/HindIII site にサブクローニングされた場合に reading frame が一致するようデザインした (第1図)。

得られた cDNA と pMAL-C2X を, XbaI/HindIII で制限酵素処理し, T4 DNA ligase (MBI Fermentas 社, Hanover, MD, USA) を用いてライゲートし, 大腸菌 DH5 α コンピテントセル (GIBCO-BRL 社) に加えて, 形質転換させ, 100 μ g/ml ABPC 添加 LB 寒天プレートにまき, 陽性クローンを獲得した。

12. 免疫ブロット法による FBP 融合蛋白の発現の確認

11 で得られた陽性クローンを ABPC 添加 LB 培地 20 ml で 37 $^{\circ}$ C 振盪培養し, OD_{600nm}=0.5 まで増菌した時に, IPTG (終濃度: 1 mM) を添加して, さらに 37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養, マルトース結合蛋白 (MBP) との融合蛋白を発現させた。免疫ブロット法により, MBP-FBP 融合蛋白と RA プローブ血清との反応を検討した。

13. MBP-FBP-A 融合蛋白 (FBP-A) の免疫ブロット法

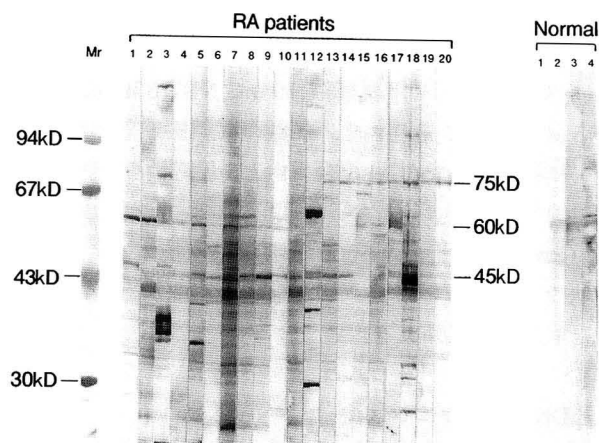
FBP-A を, SDS-10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後, ニトロセルロース膜に転写し, スキムミルク/TBS 溶液でブロックした。このニトロセルロース膜を 5 mm 幅の短冊型に切り, TBS-NP40 で希釈した大腸菌吸収被験血清 (1:100) と 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。これを TBS-NP40 で 4 回洗浄した後, アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG と室温で 1 時間反応させ, TBS-NP40 で 3 回洗浄後, アルカリホスファターゼ用緩衝液 50 ml, NBT 330 μ l, BCIP 165 μ l を加えて発色させ, 多数の膠原病患者血清を用いて同様の方法で融合蛋白との反応性を検討した。陽性コントロールとして, 1 次抗体に抗 MBP 家兎抗体 (New England BioLabs 社, 1:5000 希釈), 2 次抗体にアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Promega 社, 1:7500 希釈) を用いた。

14. 抗 FBP-A 抗体陽性例の臨床的特徴の検討

RA における, 抗 FBP-A 抗体陽性例と陰性例を層別化し, 臨床的特徴に統計的有意差があるかどうか, Fisher の完全確率を計算し比較検討した。

結 果

1. HeLa 細胞を抗原に用いた免疫ブロット法



第2図. HeLa 細胞を抗原とした免疫ブロット法による自己抗体の検出。RA 血清 20 例の結果を示す。レーン 1-10 は 60 kD 蛋白, レーン 6-14 は 45 kD 蛋白, レーン 13-20 は 75 kD 蛋白と特異的な反応を示した。(Nojima T et al: Jpn J Rheumatol 6: 189-200, 1996 の figure 3 を, 許可を得て転載)。(Mr: 分子量マーカー)

第2表 免疫ブロット法により新たに見出された自己抗体のリウマチ性疾患における頻度

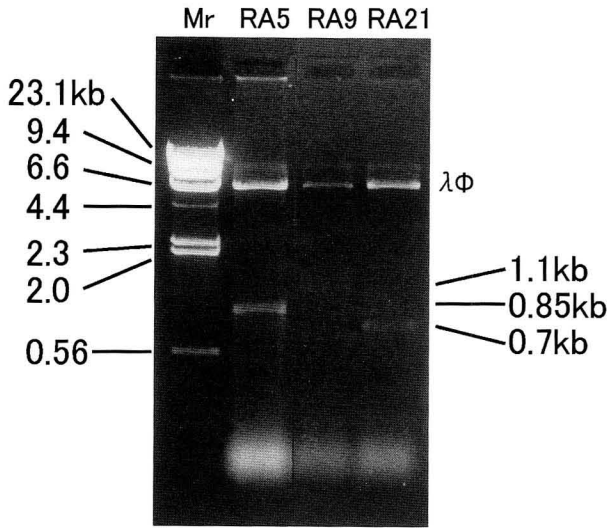
	症例数	抗 60 kD 抗体	抗 45 kD 抗体	抗 75 kD 抗体
RA	(42)	15 (36%)	10 (24%)	8 (19%)
SLE	(32)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)
SSc	(10)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PM/DM	(9)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)
健常人	(9)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

(Nojima T et al: Jpn J Rheumatol 6: 189-200, 1996 の table 1 を許可を得て一部改変転載)

RA 患者血清 42 例中 33 例 (79%) で様々な HeLa 細胞由来の蛋白との反応がみられた。これらのうち未知の抗原である 60 kD 蛋白, 45 kD 蛋白, 75 kD 蛋白が複数の血清によって認識され, それぞれ 15 例 (36%), 10 例 (24%), 8 例 (19%) と高頻度であった (第2図)。しかし, これらの抗原はいずれも非 RA 血清および健常人血清ではほとんど認識されず, わずかに 60 kD 蛋白が SLE 32 例中 1 例, 75 kD 蛋白が皮膚筋炎 9 例中 1 例で認識された (第2表)。

2. cDNA ライブラリーからのクローニング

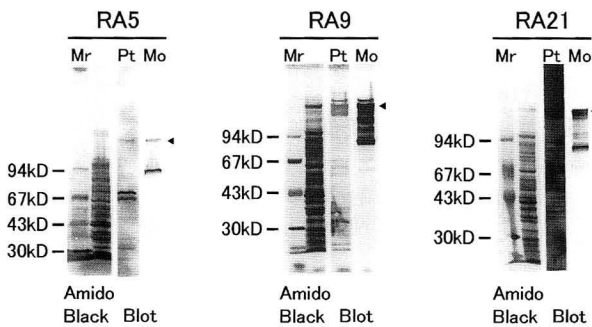
cDNA ライブラリーフェージ 1 \times 10⁶ 個のスクリーニングにより RA 患者混合血清と反応する 24 個のクローンを単離した。スクリーニングで得られたクローンの cDNA を, カルパスタチン cDNA との異同についてハ



第3図 プローブ血清と反応する自己抗原をコードする cDNA. スクリーニングで得られた陽性クローン RA5, RA9, RA21 の DNA を EcoRI 処理後、アガロース電気泳動で分画した. 各クローンのインサート cDNA はそれぞれ 0.85 kb, 1.1kb, 0.7kb であった.

イブリダイゼーションを行い、24 個のクローンのうち 4 個がカルパスタチン cDNA であることが明らかとなった. また、カルパスタチン以外の、cDNA クローンについて異同を確認したところ、3 種の cDNA クローン (RA5, RA9, RA21) が確認され、各クローンのインサートは各々、0.85kb, 1.1 kb, 0.7 kb であった (第 3 図).

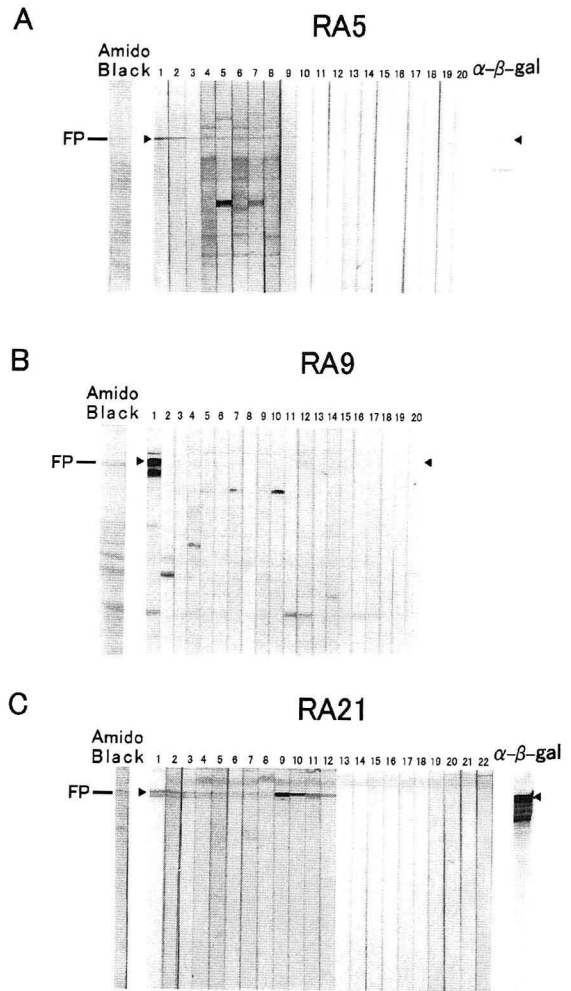
3. RA プローブ血清による βGal-融合蛋白の反応
各陽性クローンによりコードされる cDNA より発現



第4図 免疫ブロット法による βgal-融合蛋白とプローブ血清との反応. 精製した陽性クローン RA5, RA9, RA21 より発現させた βGal-融合蛋白を抗原として、スクリーニングに用いた RA 患者混合プローブ血清と抗 βGal モノクローナル抗体との反応が確認された. (Pt: RA 患者混合プローブ血清, Mo: 抗 β-Gal モノクローナル抗体)

させた βGal-融合蛋白を抗原として、スクリーニングに用いた RA 患者混合プローブ血清と抗 βGal-モノクローナル抗体を用い免疫ブロットを行った. スクリーニングで得られた陽性クローン RA5, RA9, RA21 由来の融合蛋白は、RA 患者混合プローブ血清および抗 βGal モノクローナル抗体と反応することが確認された (第 4 図).

4. 膠原病患者血清による βgal-融合蛋白の反応
次にあらかじめ大腸菌抗体を吸収した膠原病患者血清 (RA 64 例, SLE 36 例, SSc 18 例, PM/DM 18 例) および健康人 9 例と各陽性クローンの融合蛋白との反



第5図 免疫ブロット法による RA5, RA9, RA21 融合蛋白と RA 患者血清との反応. 大腸菌で吸収した RA 患者血清と陽性クローンの融合蛋白との反応性を免疫ブロット法で検討した. (A) RA5 融合蛋白は RA 患者 10 例と反応が確認された (lane 1-10). (B) RA9 融合蛋白はプローブ血清 1 例が反応したのみであった (lane 1). (C) RA21 融合蛋白は多くの RA 患者血清との反応が確認された (lane 1-12). (FP: 融合蛋白)

第3表 膠原病患者血清のβgal-融合蛋白との反応性

	症例数	RA5	RA9	RA21
RA	(64)	10 (16%)	1 (2%)	23(36%)
SLE	(36)	0 (0%)	1 (3%)	9(25%)
SSc	(18)	0 (0%)	0 (0%)	2(11%)
PM/DM	(18)	1 (6%)	0 (0%)	4(22%)
健常人	(9)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)

応性を免疫ブロット法で検討した。その結果、RA5融合蛋白はRA64例中10例(16%)で陽性となり(第5図A)、SLE、SSc、PM/DMに比し高頻度であった(第3表)。RA9融合蛋白はプローブに用いたRA1例(2%)と、SLE1例(3%)のみが反応した(第5図B、第3表)。RA21融合蛋白はRA23例(36%)、SLE9例(25%)、SSc2例(11%)、PM/DM4例(22%)が陽性で、広く膠原病患者血清と反応した(第5図C、第3表)

5. RA-5, 9, 21をコードするcDNAのシーケンシング

RA-5, 9, 21のインサートcDNAの塩基配列および推

RA5 : 1	ESKIREHLEKKGQVDRWWSHYFKIIEDLRAQIFANTVDNARIVLQIDNARLAADDFRVKY	60
CK-18: 109	ESKIREHLEKKGQVDRWWSHYFKIIEDLRAQIFANTVDNARIVLQIDNARLAADDFRVKY	168
RA5 : 61	ETELAMRRSVENDIHGLRK	79
CK-18: 169	ETELAMRQSVENDIHGLRKYIDDTNITRLQLETETEALKEELLFMKQNHVEEVKGLQAQI	228
CK-18: 229	ASSGLTVEVDAPKSDLAKIMADIRAQYDELARKVREELDKYWSQQIEESTVTVTQSAE	288
RA5 :	233 YALVMEQLNGILLHLESE	240
CK-18: 289	VGAAETTLTELRRVQSLEIDLDSMRNLKASLENSLREVEARYALQMEQLNGILLHLESE	348
RA5 : 241	LAQT-GRGQCQVQEYALLNIKVKLEAEIATYRRLLEDGEDFSLGDALDSSNSMQTIQKT	300
CK-18: 349	LAQTRAEGRQAQYEYALLNIKVKLEAEIATYRRLLEDGEDFNLGDALDSSNSMQTIQKT	408
RA5 : 301	TT	302
CK-18: 409	TTRRIVDGKVVSETNDTKVLRH	430

第6図 RA5とヒトサイトケラチン-18(CK-18)のアミノ酸配列の相同性。RA5 cDNAより推定されるアミノ酸配列はCK-18と95.6%の相同性を認めた。塩基レベルでも97.0%の相同性を認めた。

第4表 抗CK-18抗体陽性RAの臨床特徴

臨床特徴	抗CK-18抗体		p値
	陽性(10例)	陰性(54例)	
男:女	4:6	12:42	n.s.
発症年齢(歳)	53.3±9.75	44.8±14.6	p=0.09
罹病期間(月)	70±60.9	103±89.6	n.s.
関節症状			
朝のこわばり(>1hr)	6(60%)	30(56%)	n.s.
腫脹関節数	0.63±0.48	0.8±1.42	n.s.
疼痛関節数	3.75±4.24	3.63±3.27	n.s.
レントゲン変化	7(70%)	42(78%)	n.s.
Stage	2.00±1.00	2.57±1.21	p=0.08
(I, II, III, IV)	(4, 3, 2, 1)	(13, 17, 4, 20)	
Class	1.40±0.49	1.70±0.68	n.s.
(I, II, III, IV)	(6, 4, 0, 0)	(23, 24, 7, 0)	
関節外症状			
レイノー現象	1(10%)	8(15%)	n.s.
皮下結節	1(10%)	7(13%)	n.s.
血管炎	1(10%)	5(10%)	n.s.
間質性肺炎	0(0%)	3(6%)	n.s.
シェーグレン症候群	2(20%)	6(11%)	n.s.
検査所見			
赤沈(mm/hr)	44.8±4.24	57.8±36.4	n.s.
CRP(mg/dl)	2.37±1.79	2.25±2.90	n.s.
貧血	2(20%)	8(15%)	n.s.
RF陽性	9(90%)	39(72%)	n.s.
抗核抗体陽性	4(40%)	27(50%)	n.s.

```

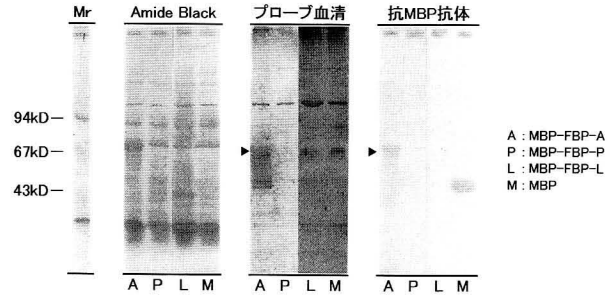
RA9 : 1 NSNDYGGGKRPLEDGDQDAKKVAPQNSFGTQLPPMHQQRSVMTEEYKVPDGMVGF 60
FBP : 54 NSNDYGGGKRPLEDGDQDAKKVAPQNSFGTQLPPMHQQRSVMTEEYKVPDGMVGF 113
RA9 : 61 IIGRGGEISRIQQESGCKIQIAPDSGGLPERSMCLTGTTPESVQSARLLDQIVEKGRPA 120
FBP : 114 IIGRGGEISRIQQESGCKIQIAPDSGGLPERSMCLTGTTPESVQSARLLDQIVEKGRPA 173
RA9 : 121 PGFHHGDGPGNAVQEIIMPASKAGLVIGKGETIKQLQERAGVKVMVIQDGPQNTGADKP 180
FBP : 174 PGFHHGDGPGNAVQEIIMPASKAGLVIGKGETIKQLQERAGVKVMVIQDGPQNTGADKP 233
RA9 : 181 LRITGDPYKQAKEMVLELIRDQGGFREVRNEYGSRIGGNEGIDVPIPRFAVGIVIGRN 240
FBP : 234 LRITGDPYKQAKEMVLELIRDQGGFREVRNEYGSRIGGNEGIDVPIPRFAVGIVIGRN 293
RA9 : 241 GEMIKKIQNDAGVRIQFKPDDGTTPERIAQITGPPDRQCQAAEIIITDLRSVQAGNPGGP 300
FBP : 294 GEMIKKIQNDAGVRIQFKPDDGTTPERIAQITGPPDRQCQAAEIIITDLRSVQAGNPGGP 353
RA9 : 301 GPGGRGRGRGQGNWMPGGLQEFNFIPTKGTGLIIGKGETIKSISQQSGARIELQR 360
FBP : 354 GPGGRGRGRGQGNWMPGGLQEFNFIPTKGTGLIIGKGETIKSISQQSGARIELQR 413
RA9 : 361 NPPPNADPNMCLFTIRGTQQIDYARQLIEEKI 393
FBP : 414 NPPPNADPNMCLFTIRGTQQIDYARQLIEEKI 446
    
```

第7図 RA9 と c-myc far upstream element binding protein (FBP) のアミノ酸配列の相同性. RA9 cDNA より推定されるアミノ酸配列は FBP のアミノ酸配列と 100%の相同性を認めた. 塩基レベルでも 100%の相同性を認めた.

```

RA21 : 1 SSISSSEKPKDDKDALKEEASPVPLTNSVNGSTVYKGGQNSTAASTKYDVFRLQSLGSGGLG 60
γ synergin : 700 SSISSSEKPKDDKDALKEEASPVPLTNSVNGSTVYKGGQNSTAASTKYDVFRLQSLGSGGLG 759
RA21 : 61 VEDLKDNTPSGKSDDDFADFSSKPFSSINSKSLGEKAVAFRHTKEDSASVKSLDLPLSIG 120
γ synergin : 760 VEDLKDNTPSGKSDDDFADFSSKPFSSINSKSLGEKAVAFRHTKEDSASVKSLDLPLSIG 819
RA21 : 121 GSSVKGKDESDALSVQFDMKLDVGGDLKHVMSDSSLDLPTVSGQHPPAA 170
γ synergin : 820 GSSVKGKDESDALSVQFDMKLDVGGDLKHVMSDSSLDLPTVSGQHPPAA 869
RA21 : 171 GSGSPSATSILQKKETSFGSSENI TMTLSKVTTFFVSEDALPETTFPALASFKDITIPQTS 230
γ synergin : 916 GSGSPSATSILQKKETSFGSSENI TMTLSKVTTFFVSEDALPETTFPALASFKDITIPQTS 975
RA21 : 231 EQKEYENRDYKDFTKQDL 248
γ synergin : 976 EQKEYENRDYKDFTKQDL 993
    
```

第8図 RA21 と γ synergin (AP1 γ 結合蛋白) のアミノ酸配列の相同性. RA21 cDNA より推定されるアミノ酸配列は γ synergin のアミノ酸配列と 100%の相同性を認めた (但し, 配列の一部が欠失していた).



第9図 免疫プロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応. 免疫プロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応では, DNA 結合部位である K homology を 2 個含む FBP の N 末側をコードする MBP-FBP-A 蛋白 (A) と強い反応が確認されたが, C 末側の MBP-FBP-P 蛋白 (P), 全長の約 8 割をカバーする MBP-FBP-L 蛋白 (L) はプローブ血清との反応が弱かった.

定アミノ酸配列を, 第 6, 7, 8 図に示した (第 6, 7, 8 図). これらの配列について GenBank データベースとのホモロジーサーチを行い, RA5, 9, 21 蛋白はそれぞれサイトケラチン-18 (CK-18)¹⁴⁾, FBP, γ synergin (AP1 γ 結合蛋白)¹⁵⁾と考えられた.

6. 抗 CK-18 抗体陽性 RA の臨床特徴

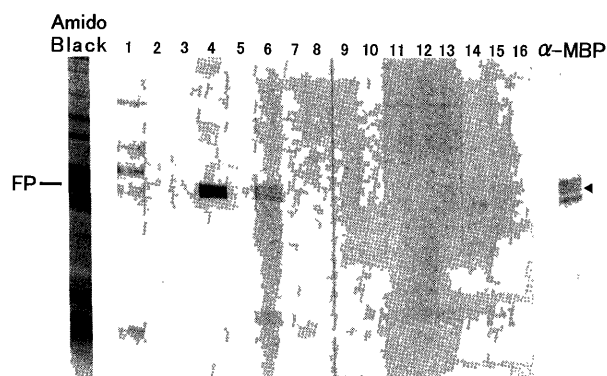
抗 CK-18 抗体陽性 RA 10 例について, 臨床的特徴を同抗体陰性 RA 54 例と比較検討した. 有意差こそ無いものの, 陽性例の発症年齢が平均 53.3 歳と, 陰性例 44.8 歳よりやや高齢で, 陽性例の Stage¹⁶⁾ が 2.00 ± 1.00 (陰性例 2.57 ± 1.21) と骨破壊が進行していないことが確認された. 関節外症状および検査所見については, 抗 CK-18 抗体陽性例に明らかな特徴は認められなかった (第 4 表).

7. 免疫プロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応性

免疫プロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応では, DNA 結合部位である K homology を 2 個含む FBP の N 末側をコードする FBP-A に強い反応が確認されたが, C 末側の FBP-P, 全長の約 8 割をカバーする FBP-L はプローブ血清との反応が弱かった (第 9 図).

8. 膠原病患者血清と MBP-FBP-A 融合蛋白 (FBP-A) との反応性

大腸菌抗体を吸収した膠原病患者血清 (RA64 例,



第10図 RA患者血清とMBP-FBP-A融合蛋白 (FBP-A) との反応. 免疫ブロット法により, 大腸菌抗体を吸収したRA患者血清においてFBP-Aとの反応性が確認された (lane 1-6). (FP: 融合蛋白)

SLE27例) および健常人9例とFBP-Aとの反応性を免疫ブロット法で検討した. その結果, FBP-AはRA64例中9例 (14.1%) が反応し, SLE1例 (3.7%) に比し高頻度であった (第10図).

9. 抗FBP-A抗体陽性RAの臨床特徴

抗FBP-A抗体陽性9例について, 臨床的特徴を同抗体陰性55例と比較検討したところ, 有意な検査所見として赤沈値が低いことが判明した. また, 有意差は明らかでないものの, 罹病期間が短く, Stageが進行しておらず, CRP値が低い傾向が認められた (第5表).

考 察

膠原病は血清中に自己のさまざまな細胞成分に対する自己抗体を持っている. RAもSLE, SSc, PM/DMなど他の膠原病と同様に自己免疫現象をともなう自己免疫疾患であり, 従来RAではRFを除くと自己抗体検出率が低く, 再現性にも問題があったが, 近年RAにおいても種々の自己抗体が報告されている.

1. HeLa細胞を抗原に用いた免疫ブロット法によるRA特異自己抗体の検索

今回の研究でヒト由来のHeLa細胞を抗原とし, 免疫ブロット法という高感度検出法を用いて自己抗体を検

第5表 抗FBP-A抗体陽性RAの臨床特徴

臨床特徴	抗FBP抗体		p値
	陽性 (9例)	陰性 (55例)	
男:女	4:5	12:43	n.s.
発症年齢 (歳)	49.7±15.4	45.6±14.0	n.s.
罹病期間 (月)	60.1±43.9	104.2±90.2	p=0.08
関節症状			
朝のこわばり (>1hr)	6 (67%)	30 (55%)	n.s.
腫脹関節数	0.55±0.68	0.81±1.41	n.s.
疼痛関節数	3.56±1.89	3.66±3.60	n.s.
レントゲン変化	6 (67%)	43 (78%)	n.s.
Stage	1.89±0.99	2.58±1.20	p=0.06
(I, II, III, IV)	(4, 3, 1, 1)	(13, 17, 5, 20)	
Class	1.55±0.49	1.67±0.69	n.s.
(I, II, III, IV)	(4, 5, 0, 0)	(25, 23, 7, 0)	
関節外症状			
レイノー現象	0 (0%)	9 (16%)	n.s.
皮下結節	1 (11%)	7 (13%)	n.s.
血管炎	0 (0%)	6 (11%)	n.s.
間質性肺炎	0 (0%)	3 (6%)	n.s.
シェーグレン症候群	1 (11%)	7 (13%)	n.s.
検査所見			
赤沈 (mm/hr)	18.6±7.54	62.6±34.1	p<0.001
CRP (mg/dl)	1.11±0.90	2.47±2.94	p=0.09
貧血	2 (22%)	8 (15%)	n.s.
RF陽性	6 (67%)	41 (75%)	n.s.
抗核抗体陽性	5 (56%)	26 (47%)	n.s.

索したところ、RA患者血清42例中33例(79%)と高頻度に様々な自己抗体が検出された。このことからRAもSLE, SSc, PM/DMなど他の膠原病と同様に多彩な自己免疫現象をともなう自己免疫疾患であることが確認された。従来RAで自己抗体検出率が低かったのは、感度の低い検出法や主としてヒト以外の動物の臓器抽出物を用いていたことに原因があるものと思われる。

これまでに報告のない抗体として、未知の60 kD, 45 kDおよび75 kD蛋白に対する抗体がRAに検出されたことが注目された。これらの抗体はいずれも非RA血清ではほとんど検出されず、RA特異抗体である可能性が示唆された。抗60 kD蛋白抗体はSLE 32例中1例、抗75 kD蛋白抗体は皮膚筋炎9例中1例に検出されたが、いずれもRAにおける出現頻度よりも有意に低値であった。このうち、抗75 kD蛋白抗体陽性の皮膚筋炎例では、RA様の骨破壊性関節炎を伴っており、抗75 kD抗体はRAに特異的と考えて差し支えないと考えられた。

Mimoriらは、RA特異的自己抗体(抗60 kD蛋白抗体)が陽性とされた血清を用いて、それらの対応自己抗原をコードするcDNAのクローニングを行い、60 kD蛋白がカルシウム依存性中性プロテアーゼ(カルパイン)の特異的内在性阻害蛋白であるカルパスタチンであることを突き止めた¹⁷⁾。さらに、カルパスタチンへの自己抗体の結合がカルパスタチンのカルパイン阻害活性を抑制し、カルパインのプロテアーゼ活性を亢進させることによってRAの病態に関与する可能性を示した^{17,18)}。

2. RAにおける特異自己抗体の対応抗原クローニング

今回プローブとして用いたRA患者血清(抗45 kD蛋白抗体および抗75 kD蛋白抗体陽性)と反応することが確認されたRA5, 9, 21クローンは、それぞれサイトケラチン-18(CK-18), c-myc FUSE-結合蛋白(FBP), γ synergin(AP1 γ 結合蛋白)と考えられた。また、これらのアミノ酸配列から推定される分子量よりCK-18は抗45 kD蛋白抗体の、そしてFBPは抗75 kD蛋白抗体の対応抗原と考えられた。

これまでにRAに特異的に出現する自己抗体として、抗Hat-1抗体¹⁹⁾、抗RA33抗体²⁰⁾、抗Sa抗体²¹⁾、抗カルパスタチン抗体¹⁷⁾、抗フィラグリン/CCP抗体^{22,23)}、抗gp130-RAPS抗体²⁴⁾が報告されている。抗RA33抗体はhnRNPの構成成分であるA2蛋白(33 kD)蛋白を抗原とする自己抗体で、抗Sa抗体はvimentinとの相同性が認められる50 kD蛋白を抗原とする抗体である。抗フィラグリン/CCP抗体はサイトケラチンフィ

ラメントの凝集に関与するフィラグリン(約40 kD)に対する自己抗体で、フィラグリン分子上のシトルリン残基(CCP)が自己抗体のエピトープとされる。抗gp130-RAPS抗体はinterleukin-6のシグナル伝達物質であるgp130のスプライシングバリエントで約50 kD蛋白である。また、抗Hat-1抗体は150 kD蛋白を抗原としており、我々が示した免疫ブロッティングでの分子量ならびにアミノ酸配列から類推される分子量とは一致せず、抗原としては異なるものと考えられた。

3. RA特異的自己抗体の臨床的意義

自己抗体の産生機序は自己免疫疾患の病因および発症の基本的メカニズムと密接に関与していると考えられている。今回検出されたRAの自己抗体が認識する抗原蛋白の機能を理解することは、RAの病因および自己抗体産生機序を理解する上で重要な意義を持つものと思われる。CK-18, FBP, γ synerginについて、生理的意義ならびにそれらに対する自己抗体の、RAにおける病因・病態への関連について考案する。

1) CK-18のRAにおける意義

CK-18は細胞骨格を形成する中間径フィラメントであるケラチンファミリーの一つで、上皮系細胞に広く発現し滑膜組織内の内皮細胞での発現が確認されている²⁵⁾。サイトケラチンは他の細胞骨格線維と密接に関連しながら、細胞形態・細胞運動・細胞分裂を制御すると考えられているが、滑膜組織中でのCK-18の生理的意義についてはこれまで明らかとはなっていない。

抗ケラチン抗体は間接蛍光抗体法によりRA患者血清中に存在することが既に報告されている²⁶⁾。牛の肝臓より抽出したCK-18を用いたELISA法により、RAおよび変形性関節症患者(OA)における抗CK-18抗体が検討され、RA患者ではIgA型抗CK-18抗体が39.6%とOAに比し有意に高頻度であると報告されている²⁷⁾。

我々が免疫プロット法によりヒトCK-18を抗原としたIgG型抗体を検出したところ、RA64例中10例(16%)が陽性で他の膠原病ではほとんど検出されず、RAに特異性が高いと考えられた。

抗CK-18抗体陽性10例について、臨床的特徴を同抗体陰性例と比較検討したところ、陽性例の発症年齢は平均53.3歳と、陰性例44.8歳よりやや高齢で、陽性例の骨破壊のStageが 2.00 ± 1.00 (陰性例 2.57 ± 1.21)と進行していない傾向が見られた。しかし、関節外症状および検査所見については、抗CK-18抗体陽性例に明らかな特徴は認められなかった。

RA では滑膜組織に浸潤した炎症細胞からの炎症性メディエーターやセリンプロテアーゼ産生, そして滑膜組織からのマトリックスメタロプロテアーゼの発現により, 軟骨組織の破壊が進行する. 軟骨細胞の細胞骨格蛋白の分解や軟骨組織破壊の際に, 抗原提示が行なわれている可能性がある. また, CK-18 は RA の病因の一つとも考えられている EB ウイルスの核蛋白 p62 とのアミノ酸相同性を 2 箇所 (アミノ酸残基 13 (62-74), 15 (54-68) それぞれ 53.8%, 53.3%) で認めており, これまでに報告された多くの自己抗原蛋白とウイルス蛋白のアミノ酸相同性の報告と同様に, ウイルス蛋白との交差反応が自己抗体産生のトリガーになる可能性が示唆される^{27,28)}.

RA では従来の抗ケラチン抗体と同時に核周囲因子 (perinuclear factor) と呼ばれる自己抗体が同時に出現しやすいことが知られてきた²⁹⁾. 近年これらの対応抗原としてサイトケラチンフィラメントの凝集に関与するフィラグリン (filaggrin) が報告され²²⁾, アルギニンがシトルリンに変換されたフィラグリン分子上のシトルリン残基 (CCP) が RA の自己抗体 (抗 CCP 抗体) が認識するエピトープとして重要であると示されている²³⁾. CK-18 のシトルリン化の有無はこれまで明らかにされてはならず, 本研究で確認された抗 CK-18 抗体と抗フィラグリン/CCP 抗体との関連性については明らかではない.

2) FBP の RA における意義

c-myc far upstream element binding protein (FBP) は, 前癌遺伝子 c-myc の 1.5kb 上流に結合し, c-myc 蛋白の発現さらには細胞増殖を調節している³⁰⁾. c-myc は RA の関節病態で重要な役割を担っており, c-myc の発現を調節する FBP は, 注目すべき自己抗原であると考えられる.

RA は多発関節炎を主症状とし, 滑膜細胞が腫瘍様に異常増殖することが特徴とされ, この異常増殖した滑膜が軟骨や骨を破壊すると考えられている. 滑膜異常増殖の原因として, Myc, Ras など前癌遺伝子の過剰発現が示唆され³¹⁾, c-myc のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることで, RA の滑膜細胞にアポトーシスを誘導するという報告もあり, RA の滑膜組織での c-myc 発現調節は滑膜増殖を左右する重要な役割を担っていると考えられる³²⁾. また, RA の関節内軟骨細胞のアポトーシスの際に c-myc の発現を認める報告もあり³³⁾, RA の関節局所における c-myc の病態への関与, および自己免疫現象との関連が注目される.

今回クローニングした RA9 は FBP の 185-1432 を

コードする部分 cDNA であり, λ gt11 ライソゲンとして発現した β gal 融合蛋白を抗原に用いた免疫プロットでは, RA 1 例, SLE 1 例にしか反応性が認められなかった. しかし, PCR クローニングを行い, 192-975 をコードする MBP-FBP-A 融合蛋白 (FBP-A) を抗原に用いて免疫プロットに用いたところ, RA64 例中 9 例 (17%) に反応性が確認された. FBP の 185-1432 をコードする RA9 蛋白が RA1 例 (プローブ血清のみ) しか反応していなかったにもかかわらず, RA9 よりも短い 192-975 をコードする FBP-A が RA9 例と反応した理由として, FBP-A の C 末端が, DNA 結合ドメイン (K Homology) を途中までしかコードしておらず, ドメインの構造が変化することで新たなエピトープが出現した可能性が考えられた. このことは, シュエーグレン症候群の特異自己抗原として知られる α フォドリンが, 240 kD テトラマーの骨格蛋白構造からアポトーシスにより限定的に分解処理されることで抗原として認識されることに類似している³⁴⁾. なお, 今回作製した MBP-(FBP-P,FBP-L)-融合蛋白は免疫プロットにおいて標準血清との反応性が弱く, また他の血清との反応性も弱かったため陽性陰性の評価が困難であった.

抗 FBP-A 抗体陽性 9 例, 陰性 55 例で層別化し, 臨床所見を検討したところ, 陽性例では赤沈値が有意に低いことが明らかとなり, さらに罹病期間が短く, Stage が進行しておらず, CRP 値が低い傾向が認められた. RA の骨破壊の病期を表す X 線所見の staging において, stageI 17 例の中で 4 例 (23.5%) が陽性であり, stageII以上の 47 例中では 5 例 (10.6%) と頻度が低く, 抗 FBP-A 抗体陽性例は RA 骨破壊病態の初期, もしくは軽症例において見出される自己抗体である可能性が考えられた. すなわち, 抗 FBP-A 抗体を確認することで骨破壊の進行の遅い RA サブセットを見極められる可能性があり, RA における初期治療を選択する上で有用な情報となる可能性が示唆されたことは興味深い.

FBP は DNA helicase 活性をもち, DNA helicase V と同一蛋白であることが示されている³⁵⁾. これまでに, 膠原病患者にみられる抗 DNA/RNA helicase 抗体として, 重複症候群における抗 Ku (DNA helicase II) 抗体³⁶⁾, 皮膚筋炎における抗 Mi-2 (SNF2/RAD 54 helicase family) 抗体³⁷⁾, 強皮症における抗 RNA helicase II/Gu 抗体³⁸⁾, 自己免疫性肝炎における抗 TIP49 抗体³⁹⁾, ループス腎炎における抗 RNA helicase A 抗体⁴⁰⁾が報告されており, われわれが見出した抗 FBP (DNA helicase V) 抗体が 6 つめの報告となる (第 6 表).

第 6 表 膠原病患者にみられる抗 DNA/RNA helicase 抗体

抗原	膠原病	文献
Ku (DNA helicase II)	重複症候群	Mimori et al, 1981
Mi-2 (SNF2/RAD 54 helicase family)	皮膚筋炎	Seelig et al, 1995
RNA helicase II/Gu	強皮症	Valdez et al, 1996
TIP49 (DNA helicase)	自己免疫性肝炎	Makino et al, 1998
RNA helicase A	ループス腎炎	Suwa et al, 2000
FBP (DNA helicase V)	RA	Nojima et al

FBP は生命現象に重要な役割を持つ DNA helicase であるとともに、関節での滑膜細胞増殖や軟骨細胞アポトーシスの際に発現する c-myc の調節因子である。本抗体の RA における臨床的意義を明らかにするためには、本抗体陽性例の臨床経過を注意深く観察するとともに、早期 RA における陽性頻度・臨床特徴の解析を進め、RA の活動性・臨床経過との関連を検討するために、定量が可能な ELISA の開発が必要と考えられた。

3) γ synergin の RA における意義

γ synergin は、EH ドメインをもつ内在性蛋白質で、細胞質やゴルジ体膜の γ アダプチン (AP-1 を構成するサブユニットの一つ) に結合することから、ゴルジ体からエンドソームへのオルガネラ間のクラスリン/AP-1 小胞輸送において、重要な役割を担っていると考えられている¹⁵⁾。そして、EH ドメインを有することから、クラスリンを介する epidermal growth factor (EGF) 受容体のエンドサイトーシス制御への関与が示唆される⁴¹⁾。

γ synergin はスプライシングバリエントが多数あり分子量は 110-190 kD とされるが、スクリーニング時の免疫ブロット法による RA 血清と HeLa 細胞蛋白との反応では、110-190 kD に相当するバンドは 8 例 (19%) のみであった (data not shown)。RA21 を用いた検討では、 γ synergin に対する自己抗体は RA の 36% と高頻度に検出されているが、他の膠原病においても 11-25% に検出され、RA における特異性は低かった。 γ synergin に対する自己抗体が膠原病の病因・病態にどのように関連するかはいまのところ不明であるが、サイトカイン受容体ファミリーのシグナル伝達を担い、軟骨細胞や血管内皮細胞で強発現している fps/fes チロシンキナーゼが γ アダプチンと発現局在を同じくすることや、小胞輸送がアクチン細胞骨格の再編成や細胞運動に影響することより、 γ synergin が関節炎局所での滑膜・軟骨病変に関与する可能性が示唆され、興味深い自己抗体であると考えられた⁴²⁾。

総 括

HeLa 細胞を抗原に用いた免疫ブロット法により RA 特異自己抗体の検出を行い、新たな自己抗体が対応する自己抗原遺伝子 cDNA のクローニングを進め、その臨床的・病因的意義を追求した。

1. HeLa 細胞抽出物を抗原とした検出感度の高い免疫ブロット法を用いたところ、RA 患者血清 42 例中 33 例 (79%) でさまざまな HeLa 細胞由来の蛋白との反応がみられた。これらのうち、未知の抗原である 60 kD 蛋白は 15 例 (36%)、45 kD 蛋白は 10 例 (24%)、75 kD 蛋白は 8 例 (19%) と高頻度で、いずれも非 RA 膠原病患者血清および健常人血清ではほとんど認識されず新しい RA 特異自己抗原と考えられた。

2. RA 特異自己抗体と考えられる抗 45 kD 蛋白抗体および抗 75 kD 蛋白抗体陽性の RA 患者血清をプローブとして、対応自己抗原遺伝子 cDNA のクローニングを行ったところ、3 種の cDNA クローン (RA5, RA9, RA21) が分離され、RA5, 9, 21 蛋白はそれぞれサイトケラチン-18 (CK-18), c-myc FUSE 結合蛋白 (FBP), γ synergin (AP1 γ 結合蛋白) と同定された。これらのアミノ酸配列から推定される分子量より CK-18 は抗 45 kD 蛋白抗体の、そして FBP は抗 75 kD 蛋白抗体の対応抗原と考えられた。

3. 抗 CK-18 抗体は RA 10 例 (16%) に陽性で、臨床的特徴を同抗体陰性 RA 54 例と比較検討したところ、陽性例の発症年齢平均 53.3 歳は陰性例 44.8 歳より高齢で、陽性例の Stage が平均 2 で比較的骨破壊が進行していない傾向が認められた。

4. 抗 FBP 抗体は RA9 融合蛋白に対しては RA と SLE の各 1 例しか反応が見られなかった。しかし、FBP の 192-975 をコードする MBP-FBP-A 融合蛋白を抗原に用いて免疫ブロット行くと、RA 64 例中 9 例 (14%) に反応性が確認された。この抗 FBP-A 蛋白抗

体陽性 RA 9例, 陰性 RA 55例で層別化し, 臨床所見を比較すると, 陽性例では赤沈値が有意に低いことが明らかとなり, 罹病期間が短く, Stage が進行しておらず, CRP 値が低い傾向が認められた。

5. γ synergin に対する自己抗体は RA 23例 (36%) と高頻度に検出されたが, 他の膠原病においても検出され, RA における特異性は低かった。

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室, 池田康夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また, 本研究を直接御指導, 御助言いただきました三森経世教授 (京都大学大学院医学研究科臨床免疫学), さらに御協力いただきました慶應義塾大学医学部分子生物学教室の清水信義教授, 蓑島伸生先生, 内科学教室リウマチ研究室の諸先生に心より深謝いたします。

本論文の要旨は, 第12回ヨーロッパリウマチ学会 (2000年6月), 第43, 44回日本リウマチ学会 (1998年5月, 1999年6月) にて発表した。本研究の一部は, 平成8年, 9年慶應医学部研究奨励費, および平成10年, 11年度文部省科学研究費補助金 (特別研究員奨励費) により行われた。

文 献

- 1) 三森経世: 抗核抗体研究の進歩: 自己抗体が認識する核および細胞質蛋白の構造と機能. *リウマチ* 32: 366-378, 1992
- 2) Harris ED Jr.: Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*. 322 (18): 1277-89, 1990
- 3) Shmerling RH and Delbanco TL: The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *Am J Med*. 91 (5): 528-34, 1991
- 4) 野島崇樹, 鎌田麻衣子, 松延 毅, 木村 充, 三森経世, 松村麻実, 藤井隆夫, 秋月正史: 慢性関節リウマチにおける自己抗体の検索.*リウマチ* 34: 871-878, 1994
- 5) Nojima T, Kamata M, Matsunobu T, Kimura M, Mimori T, Matsumura M, Fujii T and Akizuki M: Detection of autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Jpn J Rheumatol* 6: 189-200, 1996
- 6) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medzger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL and Hunder GG: The 1987 revised ARA criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-324, 1988
- 7) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N and Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277, 1982
- 8) Masi AT, Rodnan G, Medzger TA, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF, LeRoy EC, Kirsner AB, MacKenzie AH, McShane DJ, Myers AR and Sharp GC: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23: 581-590, 1980
- 9) Bohan A and Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 292: 344, 1975
- 10) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979
- 11) Young RA and Davis RW: Efficient isolation of genes by antibody probe. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1194-1198, 1983
- 12) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977
- 13) Duncan R, Bazar L, Michelotti G, Tomonaga T, Krutzsch H, Avigan M and Levens D: A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev* 8 (4): 465-480, 1994
- 14) Leube RE, Bosch FX, Romano V, Zimbelmann R, Hofler H and Franke WW: Cytokeratin expression in simple epithelia. III. Detection of mRNAs encoding human cytokeratins nos. 8 and 18 in normal and tumor cells by hybridization with cDNA sequences *in vitro* and *in situ*. *Differentiation* 33 (1): 69-85, 1986
- 15) Page LJ, Sowerby PJ, Lui WW and Robinson MS: γ -synergin: an EH domain-containing protein that interacts with gamma-adaptin. *J Cell Biol* 146 (5): 993-1004, 1999
- 16) Steinblocker O, Treager G and Batterman: Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA* 140: 659-662, 1949
- 17) Mimori T, Suganuma K, Tanami Y, Nojima T, Matsumura M, Fujii T, Yoshizawa T, Suzuki K and Akizuki M: Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7267-7271, 1995
- 18) Kanazawa Y, Kaneshiro U, Sawa M, Yasuoka H, Nojima T, Ohosone Y and Mimori T: Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases. *Modern Rheumatology* 10: 38-44, 2000
- 19) Abe Y, Inada S and Torikai K: A new autoantibody in patients with rheumatoid arthritis: Characterization of the anti Hat-1 antibody system. *Arthritis Rheum* 31: 135-139, 1988
- 20) Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, Kolarz G,

- Scherak O, Graninger W, Thumb N and Smolen JS : Demonstration of a new antinuclear antibody (Anti RA33) : That is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 32 : 1515-1520, 1989
- 21) Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ and Menard HA : The Sa system : a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 21 (6) : 1027-33, 1994
- 22) Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ and Serre G : The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 95 (6) : 2672-9, 1995
- 23) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB and van Venrooij WJ : Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101 (1) : 273-81, 1998
- 24) Tanaka M, Kishimura M, Ozaki S, Osakada F, Hashimoto H, Okubo M, Murakami M and Nakao K : Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 106 (1) : 137-44, 2000
- 25) Cooper D, Schermer A and Sun TT : Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins : strategies, applications, and limitations. *Lab Invest* 52 (3) : 243-56, 1985
- 26) Kurki P, Aho K, Palosuo T and Heliövaara M : Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. *Arthritis Rheum* 35 (8) : 914-7, 1992
- 27) Borg AA, Dawes PT and Matthey DL : Increased levels of IgA antibodies to cytokeratin-18 and epidermal keratin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36 (2) : 229-33, 1993
- 28) Sulitzeanu D and Anafi M : EBV, molecular mimicry and rheumatoid arthritis : a hypothesis. *Immunol Lett* 20 (2) : 89-92, 1989
- 29) Nienhuis RL and Mandema E : A New serum factor in patients with rheumatoid arthritis ; The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 23 : 302-5, 1964
- 30) He L, Liu J, Collins I, Sanford S, O'Connell B, Benham CJ and Levens D : Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression. *EMBO J* 19 (5) : 1034-44, 2000
- 31) Trabandt A, Gay RE and Gay S : Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 100 (10) : 861-75, 1992
- 32) Hashiramoto A, Sano H, Maekawa T, Kawahito Y, Kimura S, Kusaka Y, Wilder RL, Kato H, Kondo M and Nakajima H : C-myc antisense oligodeoxynucleotides can induce apoptosis and down-regulate Fas expression in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 42 (5) : 954-62, 1999
- 33) Yatsugi N, Tsukazaki T, Osaki M, Koji T, Yamashita S and Shindo H : Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis : correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci* 5 (2) : 150-6, 2000
- 34) Ulbricht KU, Schmidt RE and Witte T : Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2 (2) : 109-13, 2003
- 35) Vindigni A, Ochem A, Triolo G and Falaschi A : Identification of human DNA helicase V with the far upstream element-binding protein. *Nucleic Acids Res* 29 (5) : 1061-7, 2001
- 36) Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S and Homma M : Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 68 (3) : 611-20, 1981
- 37) Seelig HP, Moosbrugger I, Ehrfeld H, Fink T, Renz M and Genth E : The major dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen is a presumed helicase involved in transcriptional activation. *Arthritis Rheum* 38 (10) : 1389-99, 1995
- 38) Valdez BC, Henning D, Busch RK, Woods K, Flores-Rozas H, Hurwitz J, Perlaky L and Busch H : A nucleolar RNA helicase recognized by autoimmune antibodies from a patient with watermelon stomach disease. *Nucleic Acids Res* 24 (7) : 1220-4, 1996
- 39) Makino Y, Mimori T, Koike C, Kanemaki M, Kurokawa Y, Inoue S, Kishimoto T and Tamura T : TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. *Biochem Biophys Res Commun* 245 (3) : 819-23, 1998
- 40) Suwa A, Hirakata M, Nojima T, Satoh S, Nakajima T and Mimori T : Autoantigenic epitopes targeted by autoantibodies to RNA helicase A in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 60 [suppl] : 102, 2001
- 41) Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M, Kishida M, Okawa K, Iwamatsu A, Kishida S and Kikuchi A : Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J* 18 (13) : 3629-3642, 1999
- 42) Haigh J, McVeigh J and Greer P : The fps/fes tyrosine kinase is expressed in myeloid, vascular endothelial, epithelial, and neuronal cells and is localized in the trans-golgi network. *Cell Growth Differ* 7 (7) : 931-44, 1996