HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オートファジーは滑膜線維芽細胞においてビメンチンのシトルリン化およびMHC class IIとの相互作用を促進する
Author(s)	菅原, 恵理
Description	配架番号：2461
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13447号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13447
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76130
Type	doctoral thesis
File Information	Eri_Sugawara.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

オートファジーは滑膜線維芽細胞においてビメンチンのシトルリン化およびMHC class II との相互作用を促進する

(**Autophagy Promotes Citrullination of Vimentin and Its Interaction with Major Histocompatibility Complex class II in Synovial Fibroblasts**)

2019 年 3 月

北海道大学

菅原　恵理

Eri Sugawara

学位論文

オートファジーは滑膜線維芽細胞においてビメンチンのシトルリン化およびMHC class II との相互作用を促進する

(**Autophagy Promotes Citrullination of Vimentin and Its Interaction with Major Histocompatibility Complex class II in Synovial Fibroblasts**)

2019 年 3 月

北海道大学

菅原　恵理

Eri Sugawara

目次

発表論文目録および学会発表目録 1
1. 要旨 3
2. 略語表 6
3. 緒言 8
3.1 関節リウマチ 8
3.2 抗シトルリン化ペプチド抗体 14
3.3 オートファジーと抗原提示 17
3.4 滑膜線維芽細胞とオートファジー 20
3.5 本研究の仮説と目的 21
4. 実験方法 22
4.1 対象患者 22
4.2 SFs の分離方法 22
4.3 SFs 表面における MHC class II および B7 共刺激分子の発現の評価 22
4.4 ACPA により認識される SFs 細胞内シトルリン化自己抗原の同定 23
4.5 抗ビメンチン抗体を用いた SFs ライセートの免疫沈降 23
4.6 SFs におけるオートファジーの誘導 24
4.7 免疫細胞染色による SFs 細胞内の HLA-DR、シトルリン、ビメンチンの発現の評価 25
4.8 免疫沈降法を用いた HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合の検討 25
4.9 Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合の検討 26
4.10 統計学的解析 27
5. 実験結果 28
5.1 SFs 表面における MHC class II および B7 共刺激分子の発現 28
5.2 SF における ACPA の対応抗原の同定 31
5.3 抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降法による ACPA の対応抗原の同定 33
5.4 オートファジーが SFs 細胞内のビメンチンのシトルリン化に及ぼす影響 34
5.5 SFs 細胞内の HLA-DR、シトルリン、ビメンチンの免疫細胞染色 38
5.6 免疫沈降法による HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合の評価 44
5.7 Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合 45
6. 考察 49

7. 総括および結論 53
8. 謝辞 55
9. 利益相反 56
10. 引用文献 57

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に投稿した。

1. Eri Sugawara, Masaru Kato, Yuki Kudo, Wenshi Lee, Ryo Hisada, Yuichiro Fujieda, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Kenji Oku, Shinsuke Yasuda, Tomohiro Onodera, Shigetsugu Hatakeyama, Tatsuya Atsumi, Autophagy Promotes Citrullination of Vimentin and Its Interaction with Major Histocompatibility Complex class II in Synovial Fibroblasts. *Journal of Autoimmunity. submitting*

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. Eri Sugawara, Masaru Kato, Ryo Hisada, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Shinsuke Yasuda, Olga Amengual, and Tatsuya Atsumi, Autophagy Promotes Citrullination of Vimentin in Synovial Fibroblasts. The 61st Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 20-22 April,2017, Fukuoka, Japan

2. 菅原恵理、加藤将、久田諒、藤枝雄一郎、奥健志、坊垣暁之、アメングアルオルガ、保田晋助、渥美達也、オートファジーは滑膜線維芽細胞においてビメンチンのシトルリン化を促進する．第 45 回日本臨床免疫学会総会、2017 年 9 月 28-13 日、東京

3. Eri Sugawara, Masaru Kato, Ryo Hisada, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi, Autophagy Promotes Citrullination of Vimentin in Synovial Fibroblasts. The 62nd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 26-29 April 2018, Tokyo, Japan

4. Eri Sugawara, Masaru Kato, Yuki Kudo, WenShi Lee, Yuichiro Fujieda, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Kenji Oku, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi, Autophagy Promotes Citrullination of Vimentin and Its Interaction with Major Histocompatibility Complex class II in Synovial Fibroblasts. American College of Rheumatology Annual Meeting 2018, 19-24 October 2018, Chicago, USA

5. 菅原恵理、加藤将、工藤友喜、リーウエンシー、藤枝雄一郎、坊垣暁之、アメングアルオルガ、奥健志、保田晋助、渥美達也、オートファジーは滑膜線維芽細胞においてビメンチンのシトルリン化および MHC class II との相互作用を促進する. 第 46 回日本臨床免疫学会総会、2018 年 11 月 8-10 日、長野

1. 要旨

【背景と目的】 抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA)は関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)において特異的に検出される自己抗体である。ACPA は RA の発症に先立って検出され、ACPA 陽性患者の関節予後は不良であることから、病原性を有する自己抗体として注目されている。ACPA の陽性率と喫煙、歯周病や human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 shared epitope の存在が ACPA と関連することが知られているが、その産生機序は明らかになっていない。マクロオートファジー（以下、オートファジー）はリソソームを分解の場とする細胞内の主要な分解システムである。オートファジーは細胞内浄化や飢餓適応を主な役割としているが、細胞内タンパクから MHC class II 分子と結合するペプチドを生成し抗原提示にも関与する。近年、オートファジーが細胞内タンパク質のシトルリン化を促進することが報告されており、オートファジーはシトルリン化、抗原提示と 2 つの機序を介し ACPA の産生に関与している可能性がある。滑膜線維芽細胞 (Synovial fibroblasts: SFs)は関節リウマチの病態において中心的役割を担っている。活性化し異常に増殖した SFs は炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinase などを分泌し、関節の炎症、破壊に寄与している。

本研究は ACPA の産生機序を解明することを目的とし、RA における SFs の抗原提示能とオートファジーの役割を検証した。

【対象と方法】 北海道大学病院で人工膝関節置換術を施行された RA 患者の滑膜から SFs を分離・培養し 4-8 継代の細胞を用いた。SFs を interferon-γ (IFN-γ)で刺激し細胞表面における MHC class II の主要なサブタイプである HLA-DR および T 細胞の活性化に必要な共刺激分子である B7 分子の発現をフローサイトメトリ法で確認した。ACPA 陽性の患者血清、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体を一次抗体として SFs のライセートのウエスタンブロットを行い、SF 内の ACPA の対応抗原の存在を確認した。この ACPA の対応抗原がシトルリン化ビメンチンであることを確認するために、抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降を行った。オートファジーが SFs 細胞内のビメンチンのシトルリン化に及ぼす影響を確認するために、SFs を無血清培地による飢餓状態およびプロテアソーム阻害薬の MG132 で刺激しオートファジーを誘導し、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体、抗 LC3 抗体および抗 β-actin 抗体を用いたウエスタンブロットを行い densitometry でタンパク量を定量した。また、オートファジー阻害の影響を評価するため、3-methyladenine (3-MA) を添加した。SFs を IFN-γ 刺激下で飢餓刺激あるいは MG132 で刺激し、細胞内の HLA-DR、シトルリン、ビメンチンの発現

を免疫細胞染色法で評価した。また、SFs のライセートで抗 HLA-DR 抗体を用いた免疫沈降を行い、HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合を確認した。Proximity ligation assay を行い HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの相互作用を評価した。

【結果】 HLA-DR、B7-H1 および B7-DC は IFN-γ 刺激により SFs 表面に誘導され、B7-H3 は IFN-γ 刺激の有無に関わらず発現していた。SFs が抗原提示細胞としての機能を有していることが示唆された。ACPA 陽性患者血清、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体は 54kDa のタンパクを認識したが、ACPA 陰性患者血清はこれを認識しなかった。抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降法でこれがシトルリン化ビメンチンであることを確認した。飢餓刺激および MG132 による刺激により LC3-II/β-actin 比が増加しており、オートファジーが亢進していることを確認した。また、それに伴いシトルリン/ビメンチン比が増加しビメンチンのシトルリン化が亢進した。3-MA によりオートファジー阻害を行うとこの効果は抑制された。免疫細胞染色で、IFN-γ と飢餓刺激あるいは MG132 刺激を併せて行うと、細胞内の HLA-DR およびシトルリンが増加し、これらの局在は一致していた。SFs ライセートでの抗 HLA-DR 抗体を用いた免疫沈降により細胞内で HLA-DR とシトルリン化ビメンチンが結合していることを確認した。Proximity ligation assay でオートファジーが HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの相互作用を増強することを確認した。

【考察】 IFN-γ 刺激により SFs 細胞表面に MHC class II が誘導された。SFs における B7-H3 シグナルは、炎症性サイトカイン存在下で活性化した T 細胞に対しては共刺激シグナルとして作用することが報告されており、SFs が B7-H3 と活性化 T 細胞の相互作用を介して RA の病態に関与している可能性がある。B7-H1 と B7-DC は抑制性の作用を持つとの報告もあり、その詳細な機序についてはさらなる検討が必要である。オートファジー誘導により SFs 細胞内のビメンチンのシトルリン化が亢進することが示された。オートファゴソームはアルギニンをシトルリン化する酵素である peptidylarginine deiminase (PAD)の高い活性を有していることが報告されており、オートファジー誘導により、PAD 活性が亢進し、オートファゴソーム内でのビメンチンのシトルリン化が亢進したものと考えられた。HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの相互作用は IFN-γ 刺激下でオートファジーを誘導した際に増強され、RA の SFs で MHC class II によりシトルリン化ビメンチンが抗原提示されているという仮説を支持する結果であった。

本研究で、SFs 自体が抗原提示細胞として機能し、シトルリン化抗原提示を介して関節での ACPA 産生や維持に関与している可能性が示唆された。今後は細胞表面において MHC class II を介しシトルリン化ビメンチンが抗原提示されて

いることを示すことが研究課題である。

【結論】 SFs は抗原提示細胞としての機能を有し、オートファジーが SFs の細胞内におけるビメンチンのシトルリン化を促進し、細胞内における MHC class II とシトルリン化ビメンチンの結合を促進する。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACPA	anti–citrullinated peptide antibodies
ADL	activities of daily living
Blys	B-lymphocyte stimulator
BSA	bovine serum albumin
CRP	C reactive protein
DAS28	disease activity score 28
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMARDs	disease-modifying anti-rheumatic drugs
ETN	etanercept
ESR	erythrocyte sedimentation rate
FBS	fetal bovine serum
GLM	golimumab
GWAS	genome-wide association study
HAQ-DI	health assessment questionnaire disability index
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HLA	human leukocyte antigen
IFN-γ	interferon-gamma
IFX	infliximab
IGR	igratimod
IL	interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IP	immunoprecipitation
LC-3	microtubule-associated protein light chain-3
MFI	mean fluorescent index
mPSL	methylprednisolone
MHC	major histocompatibility complex
miR	micro ribonucleic aci
MMP	matrix metalloproteinase
MTX	methotrexate
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
OA	osteoarthritis
PAD	peptidylarginine deiminase

PBS	phosphate buffered saline
PIP3	phosphatidylinositol-3 phosphate
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
RA	rheumatoid arthritis
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RF	rheumatoid factor
SE	shared epitope
SFs	synovial fibroblasts
TCZ	tocilizumab
Th1	helper T1 cells
Th17	helper T17 cells
Treg	regulatory T cells
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
3-MA	3-methyladenine

3. 緒言

3.1　関節リウマチ

関節リウマチ(rheumatoid arthritis : RA) は関節滑膜の炎症に始まり、滑膜の肥厚、絨毛組織の増殖により骨軟骨を破壊する慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫疾患である(McInnes and Schett, 2011)。骨破壊、関節破壊が進行すると activities of daily living (ADL)が低下する(Klareskog et al., 2009 ; Maxwell and Singh, 2010 ; McInnes and Schett, 2011 ; Scott et al., 2010 ; Singh et al., 2009 ; Singh et al., 2009 ; Yazici, 2009)。RA の罹患頻度は 0.5~2%、男女比は 1:3 程度で 40 歳代に最も多く(Rasch et al., 2003 ; Scott et al., 2010 ; Symmons et al., 2002)、労働生産性にも影響を及ぼしうる疾患の一つである。
RA の発症率に人種差があることや家族内での発症が報告されており(Silman and Pearson, 2002)、遺伝学的素因が関係していると考えられてきた。近年のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS)により 100 以上の RA 疾患感受性遺伝子座位が同定されている(Okada et al., 2014)。この中でも Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 が特に強い関連を示しており、抗原提示が RA の病態形成に関与することが示唆されている。さらに疾患関連アリルはペプチド結合部位に共通のアミノ酸配列を有しており、shared epitope と呼ばれている(Scally et al., 2013)。その他 CD28 など T 細胞の活性化に必要な共刺激分子、tumor necrosis factor alpha (TNF-α)、interleukin-6 (IL-6)などの炎症性サイトカイン、PTPN22 など T 細胞からのシグナルを制御する分子などが疾患感受性遺伝子座位として同定されている(Okada et al., 2014)。これらの遺伝的素因に加え、環境要因や遺伝子のエピジェネティックな修飾が RA の病態に関与していると考えられている(Klein and Gay, 2015)。環境要因としては喫煙(Silman et al., 1996)、歯周病や腸内細菌叢の異常(Scher et al., 2016)が RA の発症に関連している。ヒストンのアセチル化、DNA のメチル化などの遺伝子のエピジェネティック修飾が滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts: SFs)や好中球を活性化し RA の病態に関与している(Klein and Gay, 2015)ことが報告されている。また、micro RNA (miR)はメッセンジャーRNA を分解しエピジェネティックな制御機能を有することが近年注目されている(Baxter et al., 2012)。miR155 はリンパ球、マクロファージ、滑膜線維芽細胞の機能を活性化し RA の発症に関与している (Bluml et al., 2011) (Figure 1)。

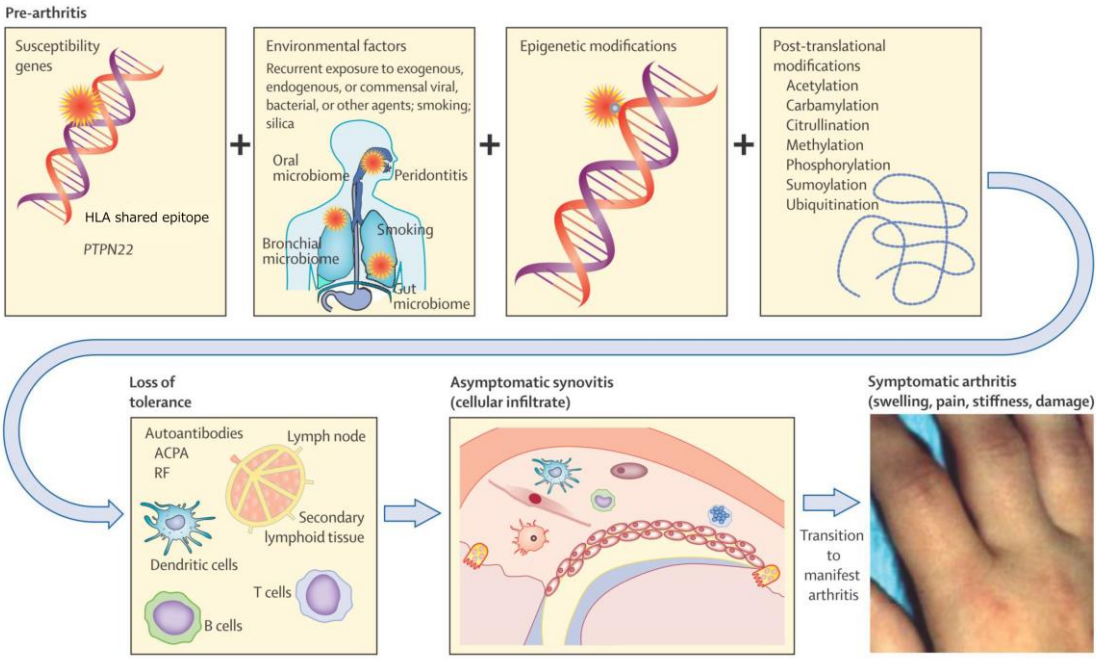


Figure 1. 関節リウマチ発症の機序(Smolen et al., 2016)より一部改変

Human leukocyte antigen (HLA) shared epitope や PTPN22 などの疾患感受性遺伝子を有する宿主に喫煙、歯周病などの環境要因や DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化などのエピジェネティックな遺伝子修飾やタンパクのシトルリン化などの翻訳後修飾がおこる。その結果 anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA)や rheumatoid factor (RF)が産生され、免疫系が活性化され、滑膜炎が生じる。はじめは無症候性であるが、炎症が増強され、やがて有症状の関節炎へと進展する。

RA の関節腫脹は滑膜の炎症性増殖を反映したもので、病理学的には SFs の腫瘍様の増殖と滑膜への炎症細胞浸潤がみられる(Smolen and Steiner, 2003)。単球・マクロファージ(Haringman et al., 2005 ; Liew and McInnes, 2002)、樹状細胞、マスト細胞(Gotis-Graham and McNeil, 1997 ; Gotis-Graham et al., 1998 ; Nigrovic and Lee, 2007)などの自然免疫系や T 細胞、B 細胞(Schroder et al., 1996)、形質細胞などの獲得免疫系が関与している (Figure 2)。

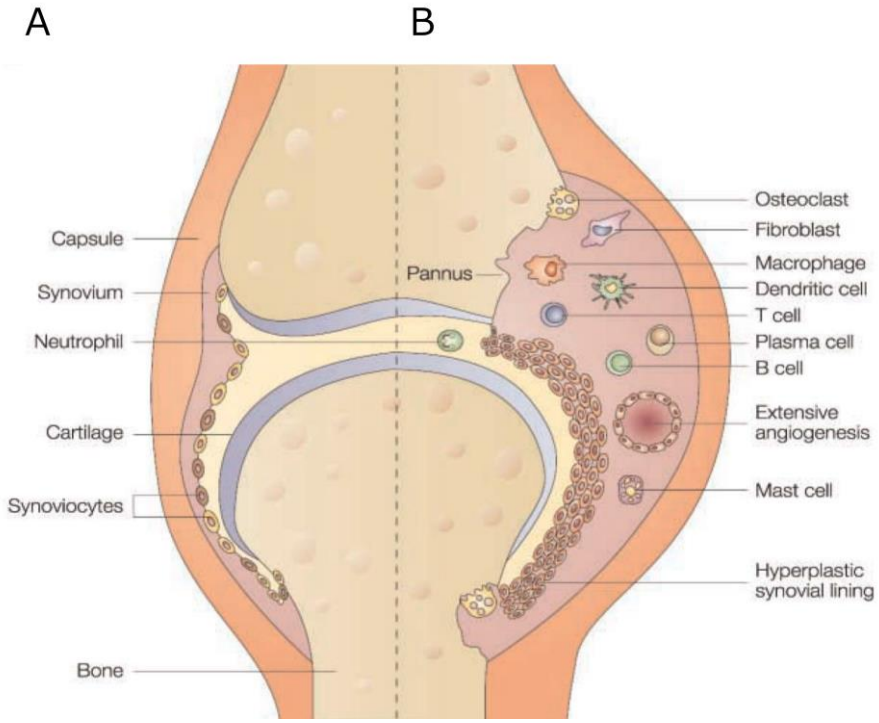


Figure 2. 健常人の関節と関節リウマチの関節(Smolen and Steiner, 2003)

関節は 2 つの骨が連結する部分にあり、骨と骨の摩擦をなくすために関節軟骨が存在する。関節は厚さ約 100 μM の滑膜に覆われており、その中には滑液が満たされている(Figure 2A)。関節リウマチでは滑膜が絨毛状に増殖し、骨や軟骨が破壊される。滑液内には単球・マクロファージ、樹状細胞、マスト細胞、T 細胞、B 細胞などの炎症細胞が多数存在する。増殖した滑膜を栄養するための豊富な新生血管もみられる(Figure 2B)。

発症の機序として RA に関連した抗原が樹状細胞、マクロファージや B 細胞などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC)により Major histocompatibility complex class II (MHC class II)を介し T 細胞に抗原提示され免疫反応が起こると考えられている。T 細胞の活性化には MHC class II と T 細胞レセプターの相互作用に加えて共刺激シグナルが必要であり、APC に発現している CD28 と T 細胞に発現している CD80 や CD86 がこの役割を果たす。T 細胞は制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg)により制御されている。滑膜には主に helper T1 細胞 (Th1)、helper T17 細胞 (Th17)が分布しており、Th1/17 は interleukin-2 (IL-2)や interferon-gamma (IFN-γ) などのサイトカインの刺激により増殖し、マクロファージ、B 細胞、SFs、破骨細胞を活性化する。B 細胞は多彩なレセプターや免疫

グロブリンを発現しており、形質細胞に分化しリウマチ因子 (rheumatoid factor: RF)や抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA)などの自己抗体を含む抗体産生に関与する。自己抗体は免疫複合体を形成し補体や Fc レセプターの活性化を介して tumor necrosis factor alpha (TNF-α)、interleukin-6 (IL-6)や interleukin-1 (IL-1)などの炎症性サイトカインの産生を促進する。B 細胞はマクロファージに存在する B-lymphocyte stimulator (BlyS)や T 細胞により活性化される。炎症性サイトカインにより活性化された SFs は腫瘍様に増殖し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinase (MMP)、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)を産生し軟骨破壊や(Sabeh et al., 2010)、破骨細胞の分化および骨破壊を促進し(Bottini and Firestein, 2013)、RA の病態において中心的役割を担っている (Figure 3)。

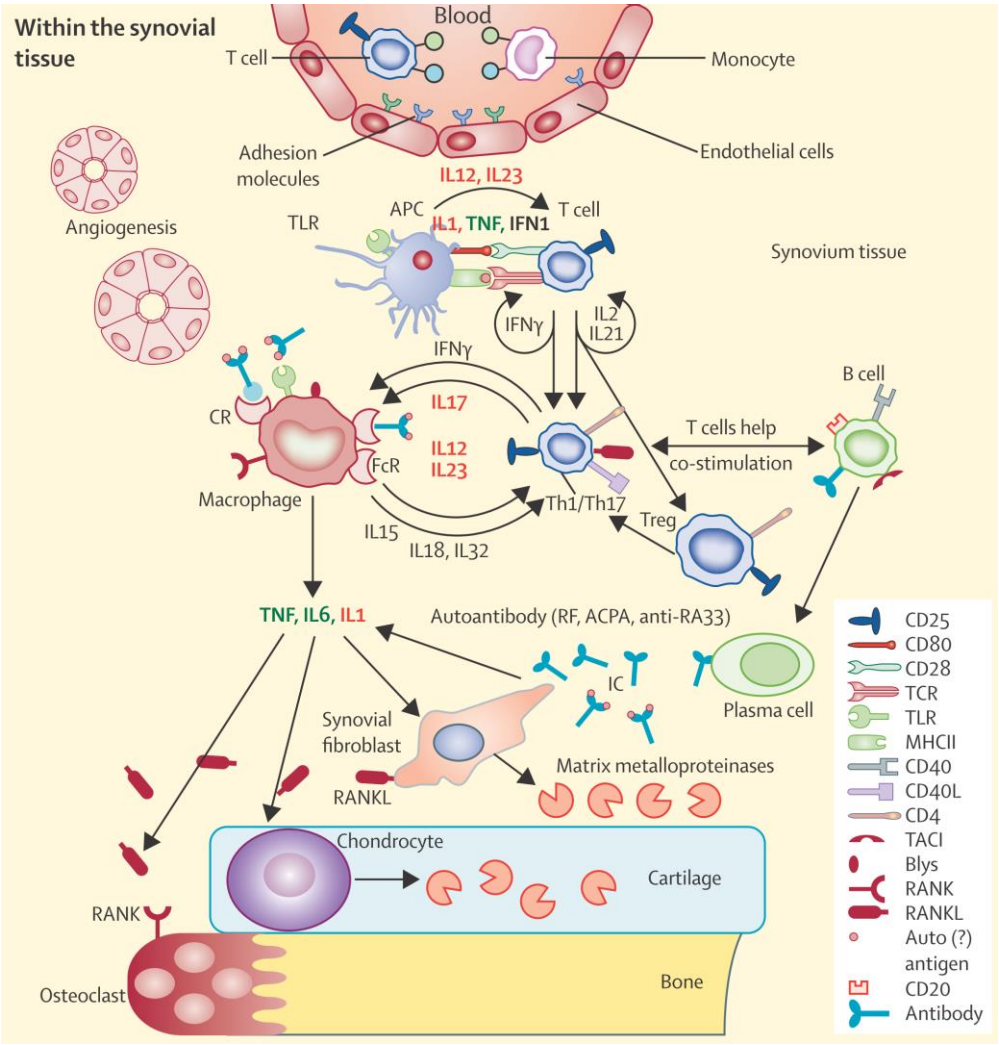


Figure 3. 関節リウマチの病態に関与する細胞およびサイトカインネットワーク (Smolen, 2007)

マクロファージや B 細胞などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC)が Major histocompatibility complex (MHC) class II を介し T 細胞に抗原提示を行い免疫反応が開始される。APC に発現している CD28 と T 細胞に発現している CD80 や CD86 の相互作用による共刺激シグナルが T 細胞の活性化に必須である。T 細胞は制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg)により制御されている。滑膜には主に helper T1 細胞 (Th1)、helper T17 細胞 (Th17)が分布しており、Th1/17 は interleukin-2 (IL-2)や interferon-gamma (IFN-γ) などのサイトカインの刺激により増殖し、マクロファージ、B 細胞、SFs、破骨細胞を活性化する。B 細胞は多彩なレセプターや免疫グロブリンを発現しており、形質細胞に分化しリウマチ因子 (rheumatoid factor: RF)や抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA)などの自己抗体を含む抗体産生に関与する。自己抗体は免疫複合体を形成し補体や Fc レセプターの活性化を介して tumor necrosis factor alpha (TNF-α)、interleukin-6 (IL-6)や interleukin-1 (IL-1)などの炎症性サイトカインの産生を促進する。B 細胞はマクロファージに存在する B-lymphocyte stimulator (BlyS)や T 細胞により活性化される。活性化された SFs は腫瘍様に増殖し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinase (MMP)、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)を産生し軟骨破壊や、破骨細胞の分化および骨破壊を促進する。

APC: antigen presenting cells, Blys: B lymphocyte stimulator, C: complement, ACPA=anti citrullinated peptide antibodies, CR=complement receptor, FcR=receptor for the Fc portion of IgG, IC= immune complex, IFN=interferon, IFN1=type 1 interferons, IL=interleukin, MHC II: major histocompatibility complex class II, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa-B, RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RF: rheumatoid factor, TACI: transmembrane activator and calciummodulator and cyclophilin ligand interactor, TCR: T-cell receptor, Th1=T helper 1 cells, Th17: T helper 17 cells, TLR: Toll-like receptor, Treg=regulatory T cells

メトトレキサートなどの disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) (Donahue et al., 2008 ; Suarez-Almazor et al., 2000 ; Suarez-Almazor et al., 2000)に加え、上述の RA に関連するサイトカインや分子を治療標的とした TNF-α 阻害薬 (Alonso-Ruiz et al., 2008 ; Feldmann et al., 1996 ; Kristensen et al., 2007)、IL-6 阻害薬 (Smolen et al., 2008)、T 細胞選択的共刺激調節剤(Smolen et al., 2007)などの生物学的製剤が次々と開発され、RA の治療は劇的に進歩したが、依然として治療抵抗群が存在し、また、易感染性などの薬剤の副作用(Dixon et al., 2010 ; Hyrich et al., 2008 ; Leombruno et al., 2009 ; Strangfeld et al., 2009)や費用(Finckh et al., 2009 ; Nixon

et al., 2009)などの観点からドラッグフリー寛解のニーズは高く、関節リウマチの病態の究明、さらに新たなアプローチによる治療が求められている。

3.2　抗シトルリン化ペプチド抗体

抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA)は RA の疾患特異的自己抗体であり、RA の分類基準である 2010 年 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) 分類基準 にも含まれている(Aletaha et al., 2010)。ACPA は約 60%の RA 患者で検出されるが(Avouac et al., 2006 ; Schellekens et al., 2000 ; van Gaalen et al., 2004 ; Vincent et al., 2002)、健常人の 2%でしか検出されず(Schellekens et al., 2000)、特異性の高い自己抗体である。ACPA は RA の発症に先立って検出され(Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003 ; van Venrooij et al., 2011)、発症後数年間は抗体価が維持され、抗リウマチ治療によってもその抗体価は変動しない(Kastbom et al., 2004 ; Ronnelid et al., 2005)。ACPA 陽性 RA は疾患活動性が高く関節予後は不良であり(van den Broek et al., 2012)、ACPA 陽性 RA と陰性 RA は治療反応性も異なる(van Dongen et al., 2007)。遺伝学的にも ACPA 陽性 RA のみが human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 shared epitope alleles (Klareskog et al., 2008 ; Scally et al., 2013) や *PTPN22* 遺伝子の一塩基多型と関連している(Plenge et al., 2005)ことから、これらを異なる疾患概念とする考え方もある(Ronnelid et al., 2005)。マウスにおいてシトルリン化フィブリノゲンに対する自己抗体が関節炎を誘発し(Kuhn et al., 2006) (Figure 4)、

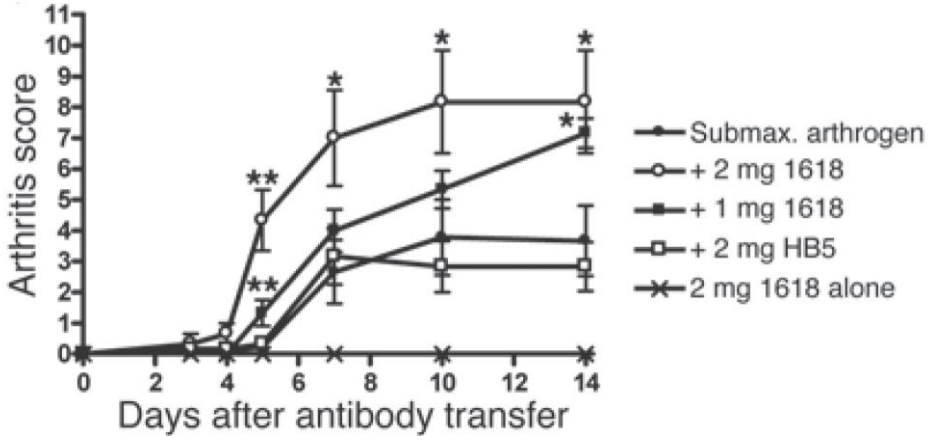


Figure 4. シトルリン化フィブリノゲン特異的 IgG と関節炎スコア (Kuhn et al., 2006)

DBA/1J マウスにおいて抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体(arthrogen)とシトルリン化フィブリノゲン特異的 IgG (1618)を投与すると関節炎スコアが有意に上昇し、シトルリン化フィブリノゲン特異的 IgG がコラーゲン誘発性関節炎を

増強することが示唆された。
Submax: submaximal, arthrogen: a cocktail of monoclonal antibodies against collagen II, 1618: monoclonal antibody to citrullinated fibrinogen, HB5: control monoclonal antibodies

コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスでは、コラーゲンのシトルリン化により関節炎が増強された(Lundberg et al., 2005) (Figure 5) ことから、シトルリン化抗原に対する自己抗体が病原性を有することが示唆されている。

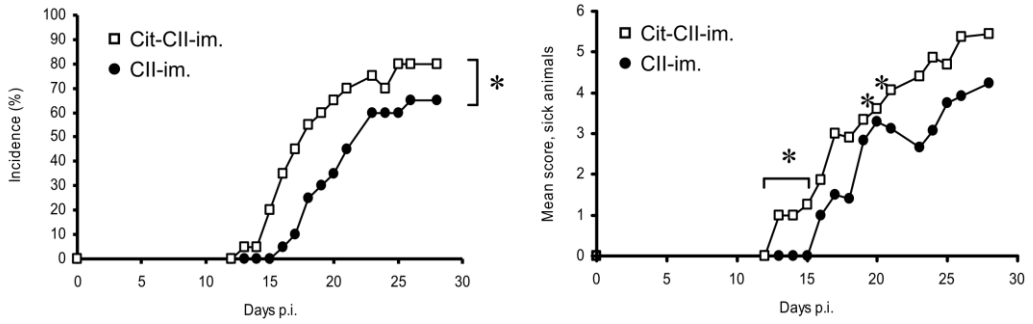


Figure 5. II 型コラーゲンのシトルリン化と関節炎の関係 (Lundberg et al., 2005)

シトルリン化 II 型コラーゲンを投与したマウスは、非シトルリン化 II 型コラーゲンを投与したマウスと比較し有意に関節炎の発症率が上昇し、関節炎発症のまでの期間も有意に短かった。
CII-im: immunized with collagen type II, cit-CII-im: immunized with citrullinated collagen type II, p.i.: post immunization

シトルリン化は peptidylarginine deiminase (PAD)により媒介される翻訳後修飾であり(Fuhrmann and Thompson, 2016 ; Vossenaar et al., 2004)、陽性荷電を有するアルギニンが非荷電のシトルリンに変化し、水素結合や電荷が変化し、タンパク間の相互作用が変化する(Fuhrmann et al., 2015) (Figure 6)。

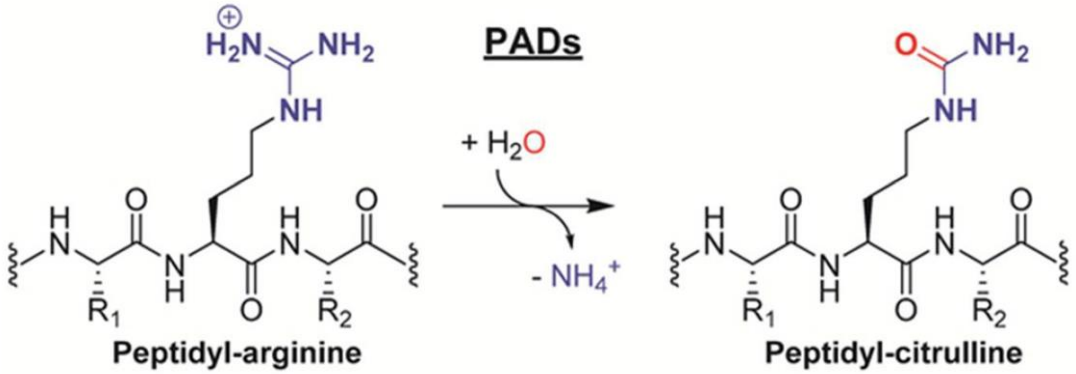


Figure 6. peptidylarginine deiminase (PAD)によるタンパクのシトルリン化 (Fuhrmann et al., 2015)

アルギニンの陽性荷電のアミノ基が非荷電のカルバミル基に変化しシトルリンとなる。

シトルリン化タンパクは表皮の角質層や(György et al., 2006)、中枢神経系(Nicholas et al., 2003)で恒常的に発現しているものの、その詳細な機能については明らかになっていない。抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示を行う際のプロセシングの過程でタンパクがシトルリン化を受けることが報告されている(Ireland and Unanue, 2011)ほか、シトルリン化タンパクは RA (Baeten et al., 2001) や反応性関節炎(Vossenaar et al., 2004)の滑膜、特発性間質性肺炎(Bongartz et al., 2007)、脳(Nicholas et al., 2003)、筋炎やリンパ節(Makrygiannakis et al., 2006)など多彩な炎症組織で確認されている。このことからシトルリン化は疾患特異的な反応ではなく、炎症に関連した反応であると考えられる。また、シトルリン化を受けるタンパクに特異的はなく、フィブリノゲン(Masson-Bessiere et al., 2001)、ビメンチン(Vossenaar et al., 2004)、α-エノラーゼ(Young et al., 1979)などが報告されている。

また、喫煙者の気管支肺胞洗浄液からは高濃度のシトルリン化タンパクが検出され(Catrina et al., 2016)、高い PAD 活性を有することが報告されている(Makrygiannakis et al., 2008)。歯周病では歯周囲の慢性炎症により PAD が活性化されタンパクをシトルリン化することや(Engstrom et al., 2018)、起因菌である *Porphyromonas gingivalis* などの構成成分の α-エノラーゼがシトルリン化され交差反応を起こすことが報告されている(Lundberg et al., 2008)。

上述のように、ACPA の産生には遺伝学的背景や環境要因が関連していることは知られているが、ACPA 産生の詳細なメカニズムや、関節炎を起こす機序についてはいまだ明らかになっていない点も多い。

3.3　オートファジーと抗原提示

マクロオートファジー (以下、オートファジー) は細胞が自らの細胞内のタンパクを分解して再利用する機能であり(Mizushima and Klionsky, 2007)、細胞内の主要な分解システムである(Mizushima and Komatsu, 2011)。オートファジーは複数の分子により制御されているが、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)はオートファゴソーム形成の初期の段階に必要な Atg1-Ulk1 複合体の上流でオートファジーを抑制している(Mizushima, 2010)。飢餓状態になるとこの抑制が外れ、Ulk1 複合体は小胞体膜へ移動し phosphatidylinositol-3 kinase である Vps34 と複合体を活性化し、phosphatidylinositol-3 phosphate（PIP3）が形成される。PIP3 は Atg8 ファミリー分子の microtubule-associated protein light chain-3 (LC3) を lipidation し、オートファゴソーム形成を促進し、細胞質内のタンパクが二重の膜に包まれ、リソソームにより分解される(Dooley et al., 2014) (Figure 7)。

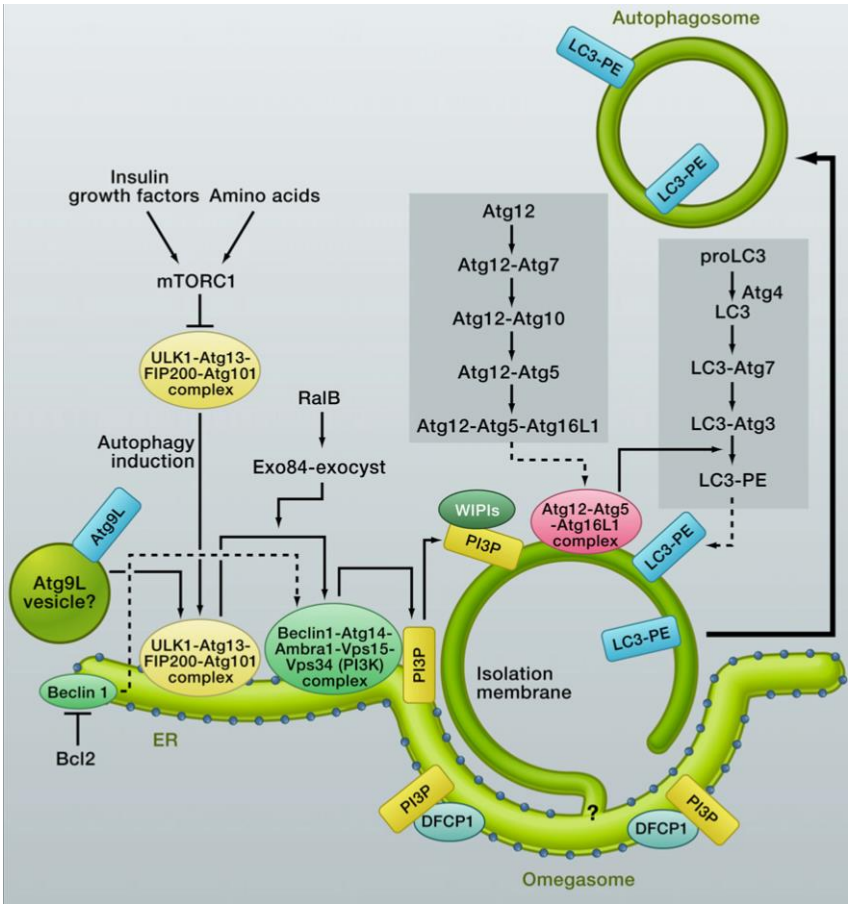


Figure 7. オートファジーに関連する分子 (Mizushima, 2010)

mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)は Atg13-Ulk1-FIP200 複合体の上流でオートファジーを抑制している。飢餓状態によりこの抑制が外れ、Ulk1 複合体は小胞体膜へ移動し phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)である Vps34 と複合体を活性化し、phosphatidylinositol-3 phosphate（PIP3）が形成される。PIP3 は Atg8 ファミリー分子の microtubule-associated protein light chain-3 (LC3)を lipidation し、オートファゴソーム形成を促進し、細胞質内のタンパクが二重の膜に包まれ、リソソームにより分解される。

オートファジーは飢餓以外にも小胞体ストレス、成長、病原体の感染や異常タンパクが蓄積する疾患などへの適応に必要な機能であり(Levine and Yuan, 2005 ; Lum et al., 2005 ; Maiuri et al., 2007 ; Yorimitsu and Klionsky, 2007)、細胞や臓器の多彩な機能の維持にも関与している。オートファジーの障害により引き起こされる疾患として、アルツハイマー病などの神経変性疾患(Menzies et al., 2015)、糖尿病(Kaniuk et al., 2007)、心臓病(Nakai et al., 2007)、全身性エリテマトーデス(Pierdominici et al., 2012)やクローン病(Lees et al., 2011)などの自己免疫疾患などが知られている。悪性腫瘍領域においてオートファジーは非腫瘍細胞や初期の悪性腫瘍においては抑制性に作用する一方で(Takamura et al., 2011 ; Yue et al., 2003)、増殖期の悪性腫瘍においては低酸素状態や飢餓状態への適応を行い、がん細胞の生存に寄与している(White, 2015)。既存の化学療法と抗オートファジー作用を持つヒドロキシクロロキンの併用が新たな抗腫瘍治療として有効である可能性が示唆されている(Amaravadi et al., 2011)。

古典的に抗原提示細胞は Major histocompatibility complex class I (MHC class I)を介して細胞内の抗原を提示し、MHC class II を介して細胞外の抗原を提示すると考えられてきたが(Busch and Mellins, 1996)、近年、オートファジーを介して細胞内タンパクからペプチドが生成され MHC class II により抗原提示する経路があることが報告されている(Dengjel et al., 2005 ; Schmid and Munz, 2005) (Figure 8)。

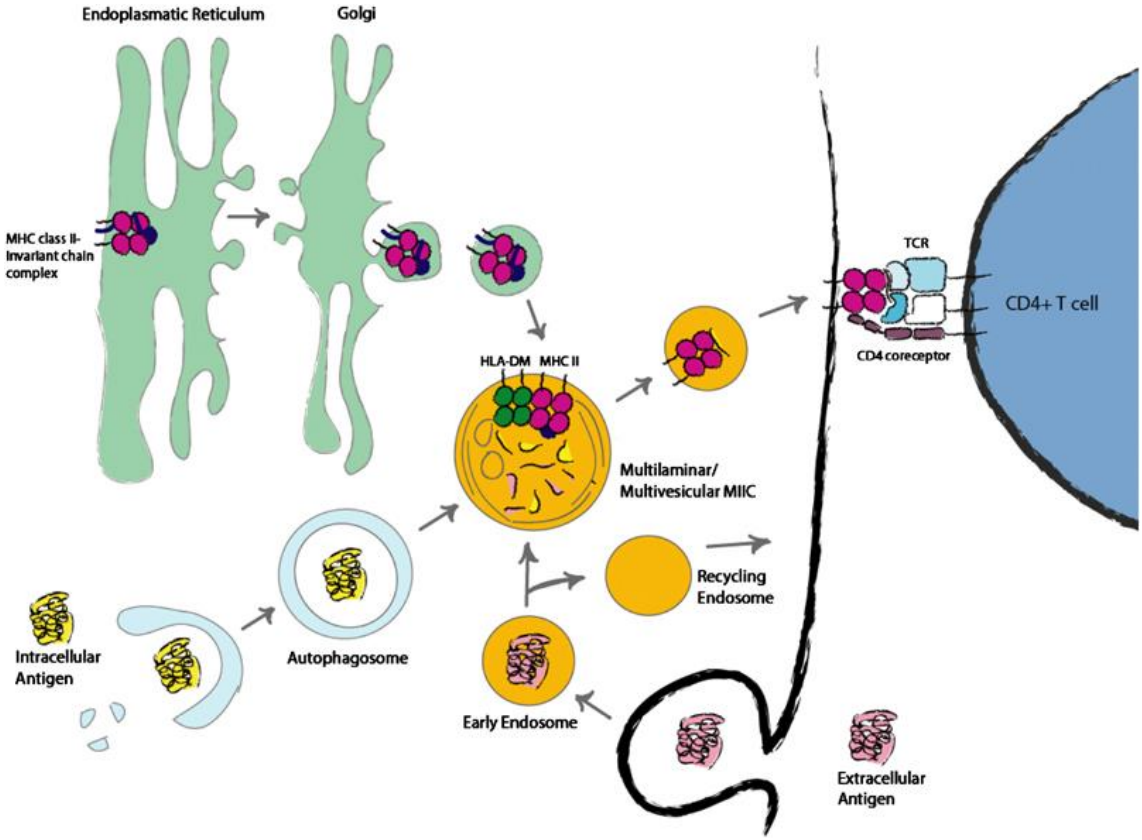


Figure 8. オートファジーと抗原提示の関係 (Schmid and Munz, 2005)

細胞内のタンパクはオートファゴソームにより取り込まれ Major Histocompatibility Complex class II (MHC class II)に load され、CD4 陽性 T 細胞へ抗原提示される。
HLA: Human leukocyte antigen, MHC II: Major Histocompatibility Complex class II, TCR: T-cell receptor

細胞内の抗原を提示するこのオートファジー依存性の抗原提示は胸腺における CD4 陽性 T 細胞のネガティブセレクションに関連しており、自己寛容に必要なプロセスである(Nedjic et al., 2008)。また、多発性硬化症のモデルマウスにおいて、ミエリンに特異的なタンパクの抗原提示にオートファジー関連タンパクの Atg5 が必要であることが明らかになっており(Keller et al., 2017)、オートファジーに依存した抗原提示が自己免疫疾患に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、オートファゴソームは PAD の活性が高く(Ireland and Unanue, 2011)、オートファジーはシトルリン化および抗原提示を介して ACPA 産生に寄与している可能性がある。

3.4　滑膜線維芽細胞とオートファジー

滑膜細胞はマクロファージ様滑膜細胞と滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts: SFs)に分類される(Bartok and Firestein, 2010)。SFs は滑膜の表面に位置し、関節の炎症や骨破壊において中心的な役割を果たしている(Bartok and Firestein, 2010 ; Huber et al., 2006)。関節組織を侵食する腫瘍状に増殖したパンヌスと呼ばれる組織が RA の特徴であり、パンヌスを形成する主要な細胞は SFs であると考えられている(Muller-Ladner et al., 1996 ; Tolboom et al., 2005)。RA では滑膜の局所で活性化した T 細胞、マクロファージから産生された TNF-α、IL-6 などの炎症性サイトカインが産生され、SFs が腫瘍様に増殖する。活性化した SFs は、炎症性サイトカイン、ケモカイン、MMP などを産生することで軟骨破壊を促進し、RANKL の発現を介して破骨細胞の分化を促進し、骨破壊をきたし、RA の病態において中心的役割を担っている(Bottini and Firestein, 2013)。生物学的製剤はこれらのサイトカインシグナルを阻害することで RA の病態を改善していると考えられる。

当研究室では RA の SFs は変形性関節症 (osteoarthritis: OA) のそれと比較して高いオートファジー活性を有し、抗アポトーシス作用を有していることを報告した(Kato et al., 2014). RA の関節内では発症早期から活性化した CD4 陽性 T 細胞がみられ(McInnes and Schett, 2011 ; Prendergast et al., 2018)病態形成に関与していると考えられている。CD4 陽性 T 細胞は MHC class II により提示された抗原を認識し活性化する(Villadangos, 2001)。T 細胞の活性化および免疫寛容には T 細胞受容体と抗原の相互作用に加え、共刺激分子である B7 スーパーファミリーと B7 リガンドの相互作用が必要である(Sharpe and Freeman, 2002)。MHC class II 分子は樹状細胞、マクロファージ、B 細胞などの古典的抗原提示細胞に存在することが知られているが、炎症などにより活性化した状態ではすべての細胞においてその発現がみられる。SFs においても IFN-γ 刺激により活性化した状態では MHC class II 分子の発現がみられ (Navarrete Santos et al., 1997), CD4 陽性 T 細胞を活性化することが報告されている(Boots et al., 1994 ; Tran et al., 2008)。ACPA の主な対応抗原としてシトルリン化ビメンチンが知られているが(Vossenaar et al., 2004)、ビメンチンは SFs などの間葉系細胞に特異的に発現している。

3.5　本研究の仮説と目的

本研究では、RA における ACPA の産生機序を解明することを目的とし、RA の SFs における高いオートファジー活性、オートファジーによるシトルリン化および抗原提示に注目した。活性化した SFs が抗原提示細胞として機能し、オートファジーを介してシトルリン化ペプチドを抗原提示している可能性を考えた。

はじめに SFs の抗原提示能を評価し、次に SFs におけるオートファジーと細胞内のシトルリン化抗原の関係を解析した。最後に RA の SFs における MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用、およびオートファジー活性との関連を評価した。

4. 実験方法

4.1　対象患者

2015 年 4 月から 2018 年 5 月までに北海道大学病院整形外科で人工関節置換術を施行された患者のうち、文書による説明と同意を得られ 9 名の RA 患者を対象とした。すべての RA 患者は 2010 年の ACR/EULAR 分類基準(Aletaha et al., 2010)に基づき診断された。本研究は北海道大学病院の倫理委員会の承認のもとに行った (自主臨床研究番号 008-0103、「関節リウマチの滑膜におけるシグナル分子発現およびバイオロジー解明に関する研究」)。

4.2　SFs の分離方法

滑膜から結合組織や脂肪を除去し、細かく切り刻み、分離し、5 mg/ml の type I コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich)を含んだ Hanks' balanced salt solution (HBSS)に入れ、37 度で 2 時間インキュベートを行った。その後メッシュを通し、遠心分離を行った後、10%非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS)、100 IU/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)含有 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Sigma-Aldrich)で培養した。すべての SFs は 4 から 8 継代のものを使用した。

4.3　SFs 表面における MHC class II および B7 共刺激分子の発現の評価

3 名の RA 患者から分離した 1× 10^6 個の SFs を PBS で洗浄した後、12 well plate に散布し、10 % FBS 含有 IMDM 750 μL で培養を行った。一晩インキュベートした後、100 ng/mL の濃度でヒト IFN-γ (Biolegend)を培養液に加え、72 時間後に Phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した後、細胞を回収し、4℃、500g で 10 分間、遠心した。FACS buffer (2 % FBS および 200 mM EDTA 含有 PBS) で再

懸濁したのち、PE anti-HLA-DR antibody, PE anti-CD80 antibody, PE anti-CD86 antibody, PE anti-B7-H1 antibody, PE anti-B7-H2 antibody, PE anti-B7-H3 antibody, PE anti-B7-DC antibody を加え、氷上で 15 分インキュベートした。コントロールとして同濃度の PE anti-mouse IgG2a antibody, PE anti-mouse IgG1 antibody, PE anti-mouse IgG2b antibody を用いた。洗浄後に BD FACSCalibur™ (BD Biosciences) を用いたフローサイトメトリ法で解析し、データは FlowJo software (Tree Star)を用いて解析した。上記で用いた蛍光標識抗体はすべて Biolegend 社より購入した。

4.4 ACPA により認識される SFs 細胞内シトルリン化自己抗原の同定

2 名の患者から分離した 1×10^6 個の SFs を T-75 フラスコに散布し、一晩インキュベーションしたのち、PBS で洗浄したうえ、Laemmli buffer (62.5 mM Tris HCl, 2% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 5 mM β-mercaptoethanol)で回収した。95℃のヒートブロックで 5 分加熱した。10%アクリルアミドゲルを作製し、サンプル中のタンパク質および recombinant human vimentin (R&D systems)を電気泳動した。その後 polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンにタンパク質を転写し、5%スキムミルクでブロッキングを行った。Solution 1 (Toyobo) で 100 倍希釈した患者血清と 1000 倍希釈した anti-vimentin antibody (Abcam)、anti-citrulline antibody (Merck)、10000 倍希釈した anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich)を 4℃で一晩反応させ、洗浄後 TBS-tween で 5000 倍希釈した peroxidase-conjugated anti-human antibody もしくは anti-rabbit antibody を 1 時間反応させた。検出試薬には enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を用い、撮像には LAS-4000 imaging system (Fujifilm)を用いた。

4.5 抗ビメンチン抗体を用いた SFs ライセートの免疫沈降

1×10^6 個の SFs を T-75 フラスコに散布し、一晩インキュベートした後、PBS で洗浄した後、CelLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich)でライセートを作製した。anti-vimentin antibody (R&D systems)を加え 4℃で一晩反応させ、protein G-

sepharose (GE healthcare)を加えて 4℃で 1 時間反応させた。コントロールとして Normal goat IgG (Santa Cruz)を用いた。Lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で洗浄し、Laemmli buffer を加えて 95℃のヒートブロックで 5 分加熱しサンプルを作製した。前述の方法でウエスタンブロットを行い Solution 1 (Toyobo) で 1000 倍希釈した anti-vimentin antibody (Abcam)、anti-citrulline antibody (Merck)を 4℃で一晩反応させ、洗浄後 TBS-tween で 5000 倍希釈した peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody を 1 時間反応させた。

4.6　SFs におけるオートファジーの誘導

1×10^6 個の SFs を PBS で洗浄したのち、12 well plate に散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。一晩インキュベーションした後、培地を Serum-free の IMDM に置換して 0-6 時間培養し、オートファジーを誘導した。PBS で洗浄したうえ、Laemmli buffer で回収した。95℃のヒートブロックで 5 分加熱した。15%アクリルアミドゲルを作製し、上述の方法でウエスタンブロットを行った。1000 倍希釈した anti-LC3B antibody (Abcam)、anti-vimentin antibody (Abcam)、anti-citrulline antibody (Merck)、10000 倍希釈した anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich)を 4℃で一晩反応させ、洗浄後 TBS-tween で 5000 倍希釈した anti-rabbit antibody 二次抗体を 1 時間反応させた。検出試薬には enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を用い、撮像には LAS-4000 imaging system (Fujifilm)を用いた。

別経路でのオートファジー誘導の影響を評価するために 1-10 μM の proteasome inhibitor の MG132 を加え、24 時間インキュベートしオートファジーを誘導し、同様にウエスタンブロットを行った。

オートファジー阻害の影響を評価するために、オートファジー阻害薬の 3-methyladenine (3-MA; Cayman Chemical)を加え培養を行った。シトルリン/ビメンチン比と LC3-II/β-actin 比を計算しシトルリン化ビメンチンとオートファジー活性を評価した。

4.7　免疫細胞染色による SFs 細胞内の HLA-DR、シトルリン、ビメンチンの発現の評価

1×10^6 個の SFs を PBS で洗浄したのち、4 well のチャンバースライドに散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。一晩インキュベーションした後 100 ng/mL の濃度でヒト IFN-γ (Biolegend)を培養液に加え、72 時間インキュベートを行った。最終の 2 時間で培地を Serum-free の IMDM に置換して飢餓刺激を行い、オートファジーを誘導した。PBS で洗浄したのち、4% paraformaldehyde と 15 分インキュベートし、細胞を固定した。次に 0.2% TritonX-100 と 4 分インキュベートし膜の透過処理を行い、洗浄の後に 70%メタノールを添加し、-20℃でインキュベートした。洗浄の後、3% bovine serum albumin (BSA)含有 PBS を添加し 2 時間インキュベートしブロッキングを行った。1% BSA 含有 PBS で 500 倍希釈した anti-HLA-DR antibody、anti-vimentin antibody、anti-citrulline antibody を 4℃で一晩反応させた。洗浄の後、1% BSA 含有 PBS で 1000 倍希釈した Alexa Fluor® 594 anti-rabbit antibody, Alexa Fluor® 488 anti-mouse antibody を常温で 3 時間反応させた。洗浄の後、1% BSA 含有 PBS で 300 nM に希釈した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Biolegend)を常温で 5 分インキュベートし、核を染色した。スライドを fluorescent mounting medium (Diagnostic Biosystems) でカバーし、蛍光顕微鏡 BZ-X800 (Keyence)で観察した。

別経路でオートファジー誘導による影響を確認するために、72 時間 100 ng/mL の IFN-γ の最終の 24 時間で、proteasome inhibitor の MG132 を 10 μM の濃度で加え 24 時間刺激し、上述のごとく免疫細胞染色を行った。

4.8　免疫沈降法を用いた HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合の検討

1 名の RA 患者から分離した 1×10^6 個の SFs を T-75 フラスコに散布し、一晩インキュベートした後、PBS で洗浄した後、CelLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich)でライセートを作製した。anti-HLA-DR antibody (Abcam)を加え 4℃で一晩反応させ、protein G-sepharose (GE healthcare)を加えて 4℃で 1 時間反応させた。コントロールとして Normal mouse IgG (Abcam)を用いた。Lysis buffer (50mM Tris-

HCl, pH8.0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride) で洗浄し、Laemmli buffer を加えて 95℃のヒートブロックで 5 分加熱しサンプルを作製した。前述の方法でウエスタンブロットを行い Solution 1 (Toyobo) で 1000 倍希釈した anti-HLA-DR antibody, anti-vimentin antibody (Abcam)、anti-citrulline antibody (Merck)を 4℃で一晩反応させ、洗浄後 TBS-tween で 5000 倍希釈した peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody を 1 時間反応させた。

4.9 Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合の検討

1×10^6 個の SFs を PBS で洗浄したのち、96 well plate に散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。一晩インキュベーションした後 100 ng/mL の濃度でヒト IFN-γ (Biolegend)を培養液に加え、72 時間インキュベートを行った。最終の 2 時間で培地を Serum-free の IMDM に置換して飢餓刺激を行い、オートファジーを誘導した。オートファジーを阻害するために 3-MA を添加した。PBS で洗浄したのち、4% paraformaldehyde と 15 分インキュベートし、細胞を固定した。次に 0.2% TritonX-100 と 4 分インキュベートし膜の透過処理を行い、洗浄の後に 70%メタノールを添加し、-20℃でインキュベートした。洗浄の後、Duolink® Blocking Solution (Sigma-Aldrich)を添加し 37℃で 30 分インキュベートしブロッキングを行った。Duolink® Antibody Diluent で 500 倍希釈した anti-HLA-DR antibody、anti-vimentin antibody、anti-citrulline antibody を 4℃で一晩反応させた。洗浄の後、Duolink® Ligation buffer で 40 倍希釈した Ligase と 37℃、30 分でインキュベートしライゲーションを行った。洗浄の後 Duolink® Amplification buffer で 80 倍希釈した Polymerase と 37℃で遮光し 100 分間反応させ増幅反応を行った。洗浄の後、1% BSA 含有 PBS で 300 nM に希釈した DAPI と常温で 5 分インキュベートし、核を染色した。スライドを fluorescent mounting medium でカバーし、蛍光顕微鏡 BZ-X800 で観察した。

別経路でオートファジー誘導による影響を確認するために、72 時間 100 ng/mL の IFN-γ の最終の 24 時間で、proteasome inhibitor の MG132 を 10 μM の濃度で加え 24 時間刺激し、上述のごとく Proximity ligation assay を行った。

4.10　統計学的解析

実験 4.3 における統計学的評価は Student’s t-test、実験 4.6 における統計学的評価は ANOVA test with post-hoc Turkey’s test を用い、p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) を用いて行った。

5. 実験結果

5.1　SFs 表面における MHC class II および B7 共刺激分子の発現

SFs を分離した 3 人の RA 患者の患者背景を Table 1 に示す。HLA-DR、B7-H1、B7-DC は IFN-γ の刺激により SFs 細胞表面に誘導され、B7-H3 は IFN-γ の刺激にかかわらず SFs 表面に発現していた (Figure 9)。一方、B7-H2、CD80、CD86 は IFN-γ 刺激後も SFs 表面に発現していなかった (Figure 10)。

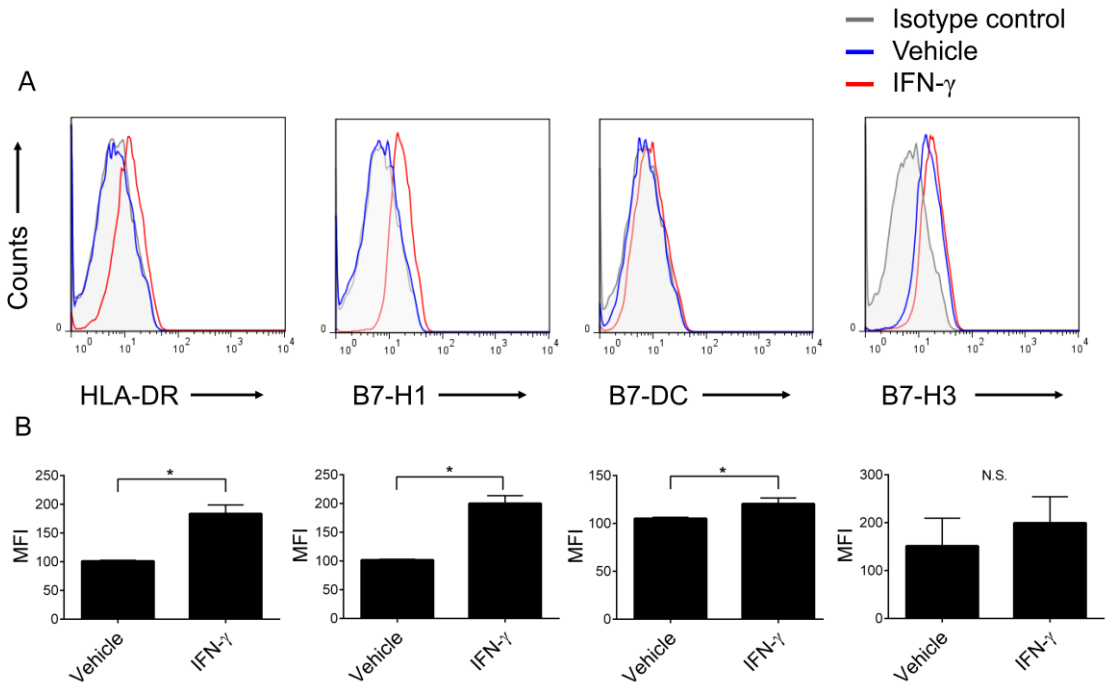


Figure 9. SFs 細胞表面における HLA-DR、B7-H1、B7-DC および B7-H3 分子の発現

SFs を 100 ng/mL の IFN-γ で 72 時間刺激し、HLA-DR、T 細胞共刺激分子の B7-H1, B7-DC および B7-H3 分子の発現をフローサイトメトリ法で評価した。(A) HLA-DR、B7-H1、B7-DC は IFN-γ の刺激により SFs 細胞表面に誘導され、B7-H3 は IFN-γ の刺激にかかわらず SFs 表面に発現していた。(B) A の mean fluorescent index (MFI)。統計学的評価は Student's t-test を用いて行った。
＊: $p < 0.05$。

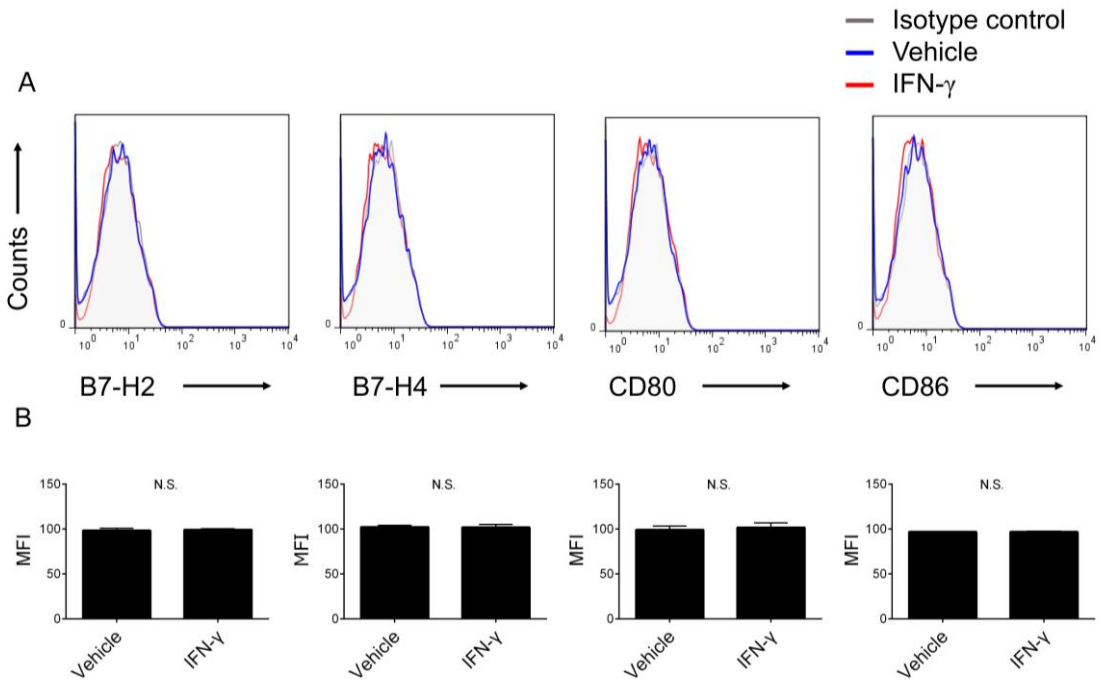


Figure 10. SFs 細胞表面における H7-H2、B7-H4、CD80 および CD86 分子の発現

SFs を 100 ng/mL の IFN-γ で 72 時間刺激し、H7-H2、B7-H4、CD80 および CD86 の発現をフローサイトメトリ法で評価した。
(A) B7-H2、CD80 および CD86 は IFN-γ 刺激後も SFs 表面に発現していなかった。(B) A の mean fluorescent index (MFI)。統計学的評価は Student's t-test を用いて行った。＊: $p < 0.05$。

Table 1. SFs を分離した RA 患者の患者背景

Patient No.	Age (years old)	Sex	Duration of disease (years)	CRP (mg/dL)	RF (IU/mL)	MMP-3 (ng/mL)	ACPA (IU/mL)	Treatment	DAS28-ESR	HAQ-DI
1	74	F	6	1.44	8	264.3	<4.5	MTX6mg+SASP1000mg+PSL4mg	3.83	2
2	69	M	8	1.47	34.1	454.3	45.9	TAC2mg	2.94	0
3	64	F	6	4.09	<7	680.8	<4.5	IGR50mg+mPSL4mg	4.81	12

No: number, M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, RF: rheumatoid factor, MMP-3: matrix metalloproteinase-3, ACPA: anti-citrullinated peptide andibodies, MTX: methtorexate, SASP: salazosulfapyridine, PSL: prednisolone, mPSL: methylprednisolone, TAC: tacrolimus, IGR: igratimod, DAS 28-ESR: disease activity score 28 erythrocyte sedimentation rate, HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index

5.2　SF における ACPA の対応抗原の同定

SFs を分離した 7 人の RA 患者の患者背景を Table 2 に、血清を使用した 3 人の RA 患者の患者背景を Table 3 に示す。ACPA 陽性患者血清、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体は 54 kDa のタンパクを認識し、ACPA 陰性患者血清はこれを認識しなかった (Figure 11)。

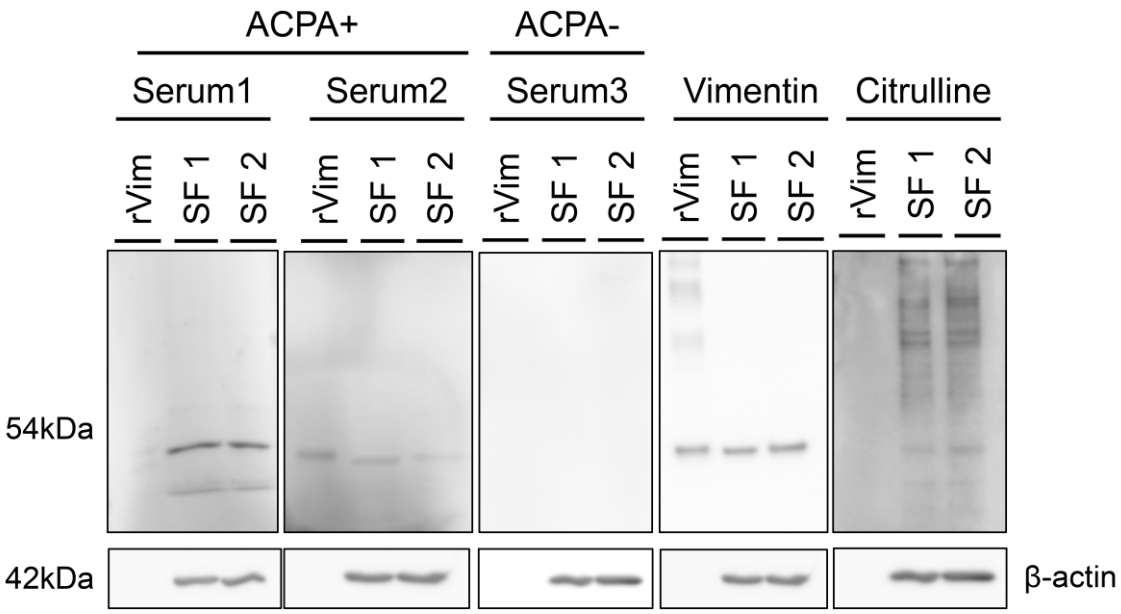


Figure 11. SFs における ACPA の対応抗原

リコンビナントビメンチン、SFs のライセートをウエスタンブロット法で解析した。ACPA 陽性および陰性の患者血清、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体を一次抗体として用いた。ACPA 陽性患者血清、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体は 54 kDa のタンパクを認識し、ACPA 陰性患者血清はこれを認識しなかった。

Table 2. SFs を分離した RA 患者の患者背景

Patient No.	Age (years old)	Sex	Duration of disease (years)	CRP (mg/dL)	RF (IU/mL)	MMP-3 (ng/mL)	ACPA (IU/mL)	Treatment	DAS28-ESR	HAQ-DI
1	74	F	6	1.44	8	264.3	<4.5	MTX6mg+SASP1000mg+PSL4mg	3.83	2
2	69	M	8	1.47	34.1	454.3	45.9	TAC2mg	2.94	0
3	64	F	6	4.09	<7	680.8	<4.5	IGR50mg+mPSL4mg	4.81	12
4	67	F	20	0.02	64.8	31.4	71.2	MTX8mg+TCZ+ PSL2mg	1.46	1
5	62	F	10	0.02	20.8	129.6	9.6	MTX12mg+IGR25mg+mPSL2mg	1.13	0
6	77	F	7	0.35	116.9	59.6	74.8	MTX6mg+PSL1mg	3.17	1
7	66	F	12	2.99	111	1089	177.7	MTX6mg	3.73	2

No: number, M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, RF: rheumatoid factor, MMP-3: matrix metalloproteinase-3, ACPA: anti-citrullinated peptide andibodies, MTX: methtorexate, SASP: salazosulfapyridine, PSL: prednisolone, TAC: tacrolimus, IGR: igratimod, TCZ: tocilizumab, mPSL: methylprednisolone, DAS 28-ESR: disease activity score 28 erythrocyte sedimentation rate, HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index

Table 3. 血清を使用した患者の患者背景

Patient No.	Age (years old)	Sex	Duration of disease (years)	CRP (mg/dL)	RF (IU/mL)	MMP-3 (ng/mL)	ACPA (IU/mL)	Treatment	DAS28-ESR	HAQ-DI
1	78	F	5	5.69	51.7	232.3	>300	PSL5mg	4.35	1.25
2	72	F	11	<0.02	6.2	85.3	136.6	TCZ+PSL2.5mg	4.10	1.50
3	69	F	12	1.12	1.1	449.9	<4.5	MTX6mg	4.99	1.00

No: number, M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, RF: rheumatoid factor, MMP-3: matrix metalloproteinase-3, ACPA: anti-citrullinated peptide andibodies, MTX: methtorexate, PSL: prednisolone, TCZ: tocilizumab, DAS 28-ESR: disease activity score 28 erythrocyte sedimentation rate, HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index

5.3　抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降法による ACPA の対応抗原の同定

抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降法で、免疫沈降の産物はシトルリンと結合していた。このことから ACPA により認識される SFs 中の 54 kDa のタンパク質はシトルリン化ビメンチンであることを確認した (Figure 12)。

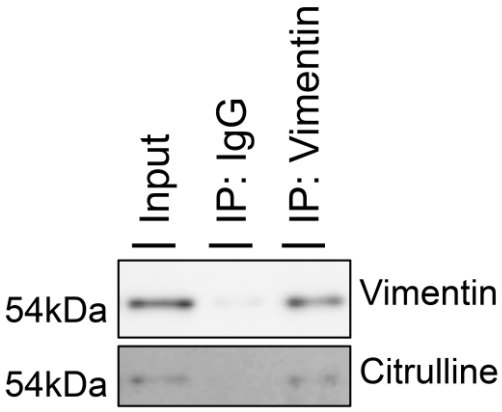


Figure 12. 抗ビメンチン抗体を用いた免疫沈降

SFs ライセートを抗ビメンチン抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロット法で解析した。抗ビメンチン抗体による免疫沈降産物はシトルリンと結合しており、ACPA により認識される SFs 中の 54 kDa のタンパク質がシトルリン化ビメンチンであることを確認した。
IP: immunoprecipitation

5.4　オートファジーが SFs 細胞内のビメンチンのシトルリン化に及ぼす影響

次に、オートファジーが SFs 細胞内のビメンチンのシトルリン化に及ぼす影響を評価した。無血清培地で SFs を培養してオートファジーを誘導し、LC3-II/β-actin 比を計算しオートファジー活性を定量し、54 kDa のシトルリン/ビメンチン比を計算しシトルリン化ビメンチンを定量した。無血清培地による 1-3 時間の飢餓状態によりオートファジーが亢進し、シトルリン化ビメンチンが増加し (Figure 13A)、統計学的に有意であった (Figure 13B)。

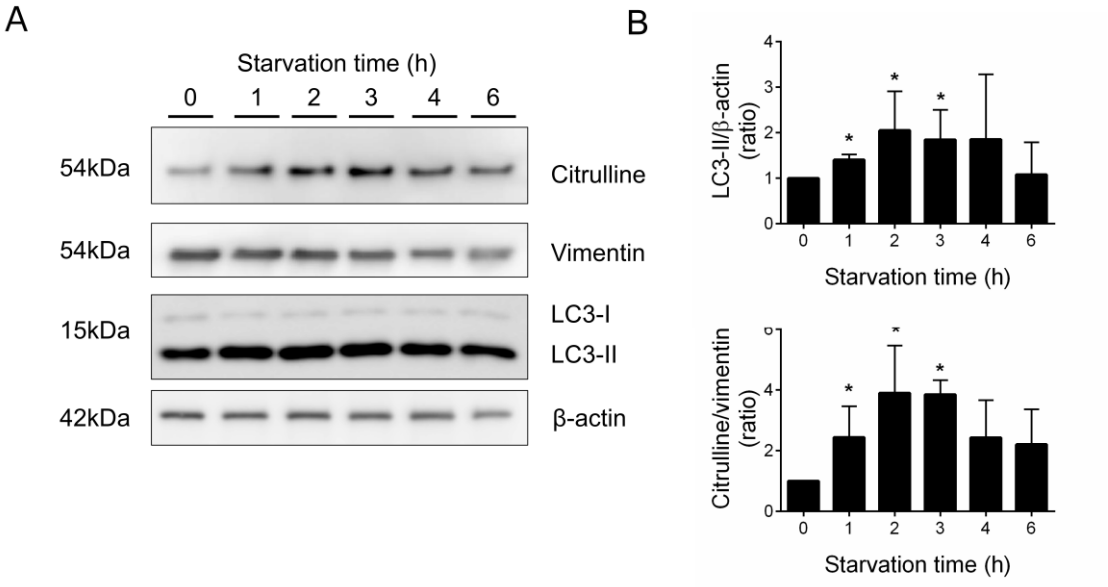


Figure 13. SFs における飢餓刺激によるオートファジー誘導とビメンチンのシトルリン化の関係

SFs を無血清培地による飢餓状態で刺激し、オートファジーを誘導し、ウエスタンブロットで解析した。LC3-II/β-actin 比を計算しオートファジー活性を定量し、54 kDa のシトルリン/ビメンチン比を計算しシトルリン化ビメンチンを定量した。
(A) 無血清培地による 1-3 時間の飢餓状態によりオートファジーが亢進し、シトルリン化ビメンチンが増加した。The data is representative blot of 3 independent experiments. (B) A の densitometric analysis。統計学的解析には ANOVA test, post-hoc Turkey's test を用いた。＊: $p < 0.05$.
LC-3: microtubule-associated protein light chain-3, h: hours

オートファジー阻害薬の 3-MA を添加しオートファジーを阻害すると、ビメンチンのシトルリン化も阻害され (Figure 14A)、統計学的に有意であった (Figure 14B)。

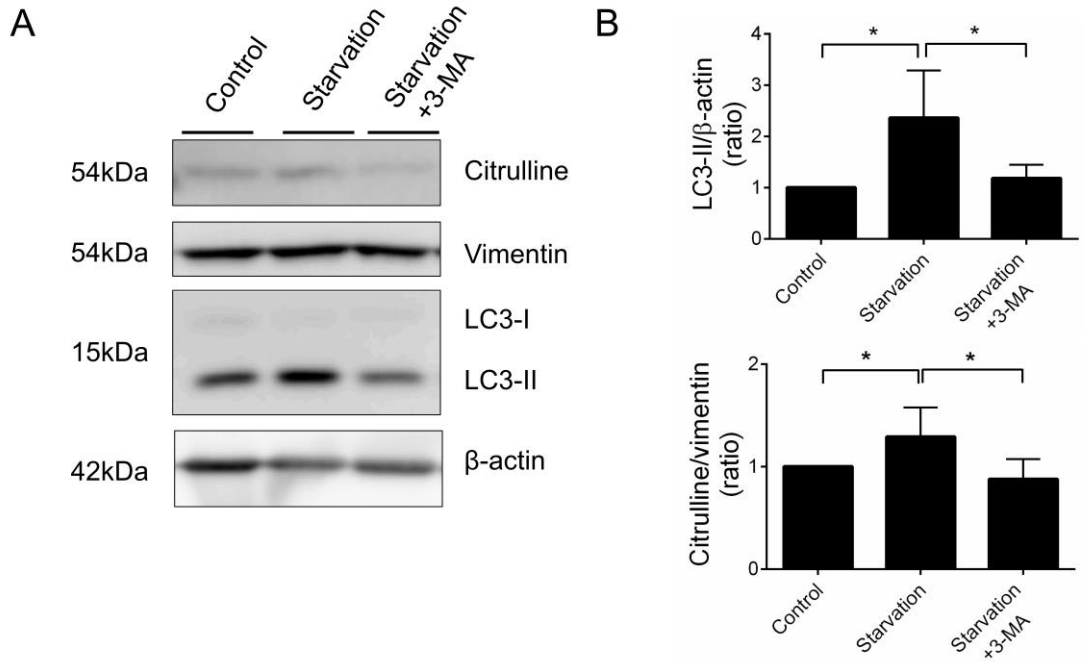


Figure 14. 飢餓刺激により誘導されたオートファジーに対するオートファジー阻害の影響

SFs を無血清培地による飢餓状態で 2 時間刺激してオートファジーを誘導し、5 mM の 3-MA を添加し、オートファジーを阻害し、ライセートをウエスタンブロットで解析した。LC3-II/β-actin 比を計算しオートファジー活性を定量し、54 kDa のシトルリン/ビメンチン比を計算しシトルリン化ビメンチンを定量した。(A) 飢餓刺激により亢進したオートファジーは 3-MA により阻害され、ビメンチンのシトルリン化も抑制された。The data is representative blot of 4 independent experiments. (B) A の densitometric analysis。統計学的解析には ANOVA test, post-hoc Turkey's test を用いた。＊: $p < 0.05$.
LC-3: microtubule-associated protein light chain-3, 3-MA: 3-methyladenine

上記の効果がオートファジー特異的なものであることを確認するために、別経路でオートファジーを誘導した。SFs を proteasome inhibitor の MG132 で 24 時間刺激しシトルリン/ビメンチン比と LC3-II/β-actin 比を計算しシトルリン化ビメンチンとオートファジー活性を評価した。10 μM の MG132 による刺激で有意にオートファジーが亢進し、シトルリン化ビメンチンが増加した (Figure 15)。

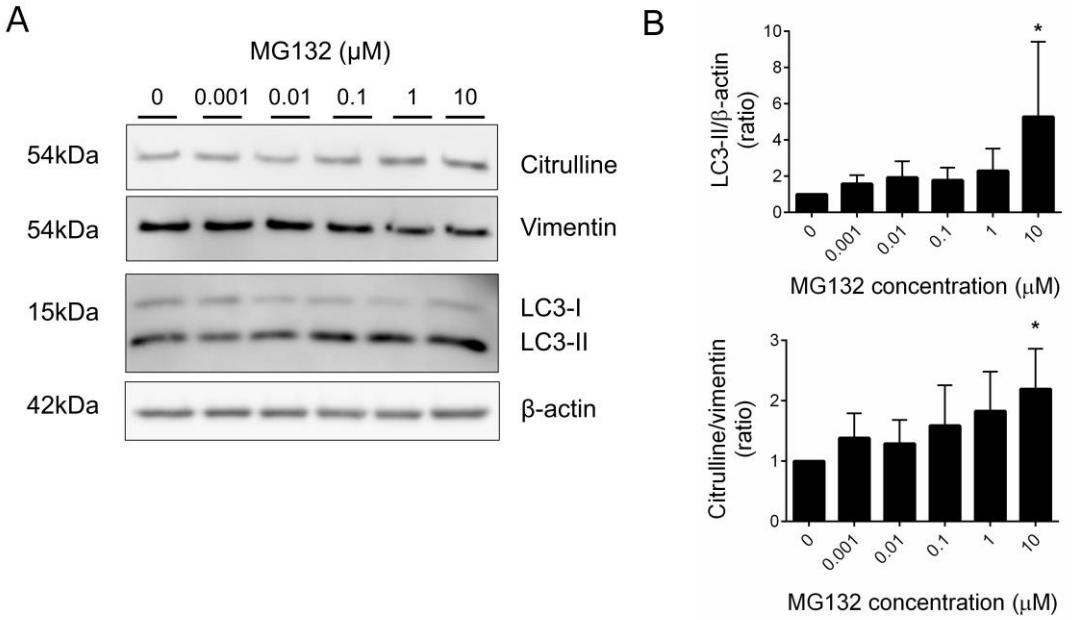


Figure 15. プロテアソーム阻害によるオートファジー誘導とビメンチンのシトルリン化の関係

SFs をプロテアソーム阻害剤の MG132 で 24 時間刺激し、オートファジーを誘導し、ウエスタンブロットで解析した。LC3-II/β-actin 比を計算しオートファジー活性を定量し、54 kDa のシトルリン/ビメンチン比を計算しシトルリン化ビメンチンを定量した。
(A) 10 μM の MG132 による刺激で有意にオートファジーが亢進し、シトルリン化ビメンチンが増加した。The data is representative blot of 6 independent experiments.
(B) A の densitometric analysis。統計学的解析には ANOVA test, post-hoc Turkey's test を用いた。＊: $p < 0.05$.
LC-3: microtubule-associated protein light chain-3, h: hours

3-MA によるオートファジー阻害でこの効果は阻害された (Figure 16)。

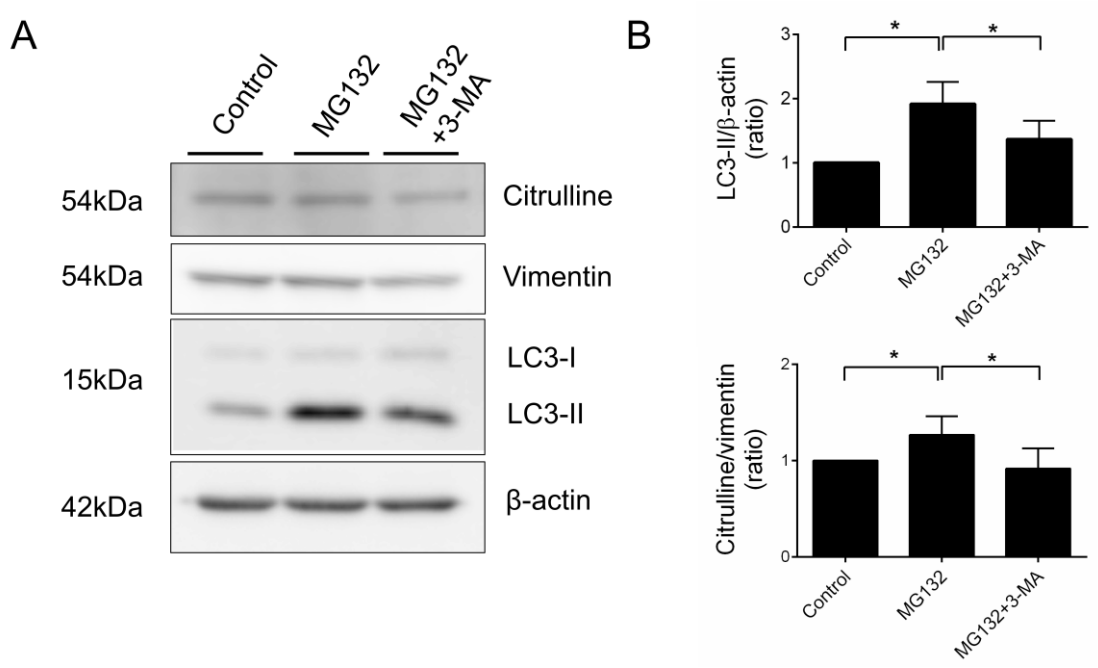


Figure 16. プロテアソーム阻害によるオートファジーに対するオートファジー阻害の影響

SFs を 10 μM の MG132 で 24 時間刺激してオートファジーを誘導し、5 mM の 3-MA を添加しオートファジーを阻害し、ライセートをウエスタンブロットで解析した。LC3-II/β-actin 比を計算しオートファジー活性を定量し、54 kDa のシトルリン/ビメンチン比を計算しシトルリン化ビメンチンを定量した。
(A)の MG132 による刺激でオートファジーが亢進し、シトルリン化ビメンチンが増加したが、この効果は 3-MA により抑制された。The data is representative blot of 3 independent experiments. (B) A の densitometric analysis。統計学的解析には ANOVA test, post-hoc Turkey's test を用いた。＊: $p < 0.05$.
LC-3: microtubule-associated protein light chain-3, 3-MA: 3-methyladenine

5.5　SFs 細胞内の HLA-DR、シトルリン、ビメンチンの免疫細胞染色

SFs を分離した 2 人の RA 患者の患者背景を Table 4 に示す。IFN-γ と飢餓刺激を行った SFs ではコントロールと比較して、細胞内における HLA-DR とシトルリンの発現が増加した (Figure 17)。IFN-γ 刺激に加え、プロテアソーム阻害によるオートファジー誘導を行っても同様の結果が得られた (Figure 18)。さらにマージさせた画像では、HLA-DR とシトルリン、HLA-DR とビメンチンの局在の一致している部分がみられ、MHC class II とシトルリン化ビメンチンが相互作用している可能性が示唆された。そこで、HLA-DR 抗体を用いた免疫沈降を行い、MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用を評価することとした。

Table 4. SF を分離した RA 患者の患者背景

Patient No.	Age (years old)	Sex	Duration of disease (years)	CRP (mg/dL)	RF (IU/mL)	MMP-3 (ng/mL)	ACPA (IU/mL)	Treatment	DAS28-ESR	HAQ-DI
1	59	F	19	1.90	160.8	585.4	39	MTX10+IGR50mg+mPSL4mg	5.18	14
2	59	F	9	0.11	1802	50.2	>300	GLM+PSL7.5mg	3.12	2

No: number, F: female, CRP: C-reactive protein, RF: rheumatoid factor, MMP-3: matrix metalloproteinase-3, ACPA: anti-citrullinated peptide andibodies, MTX: methtorexate, PSL: prednisolone, IGR: igratimod, mPSL: methylprednisolone,GLM: golimumab, DAS 28-ESR: disease activity score 28 erythrocyte sedimentation rate, HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index

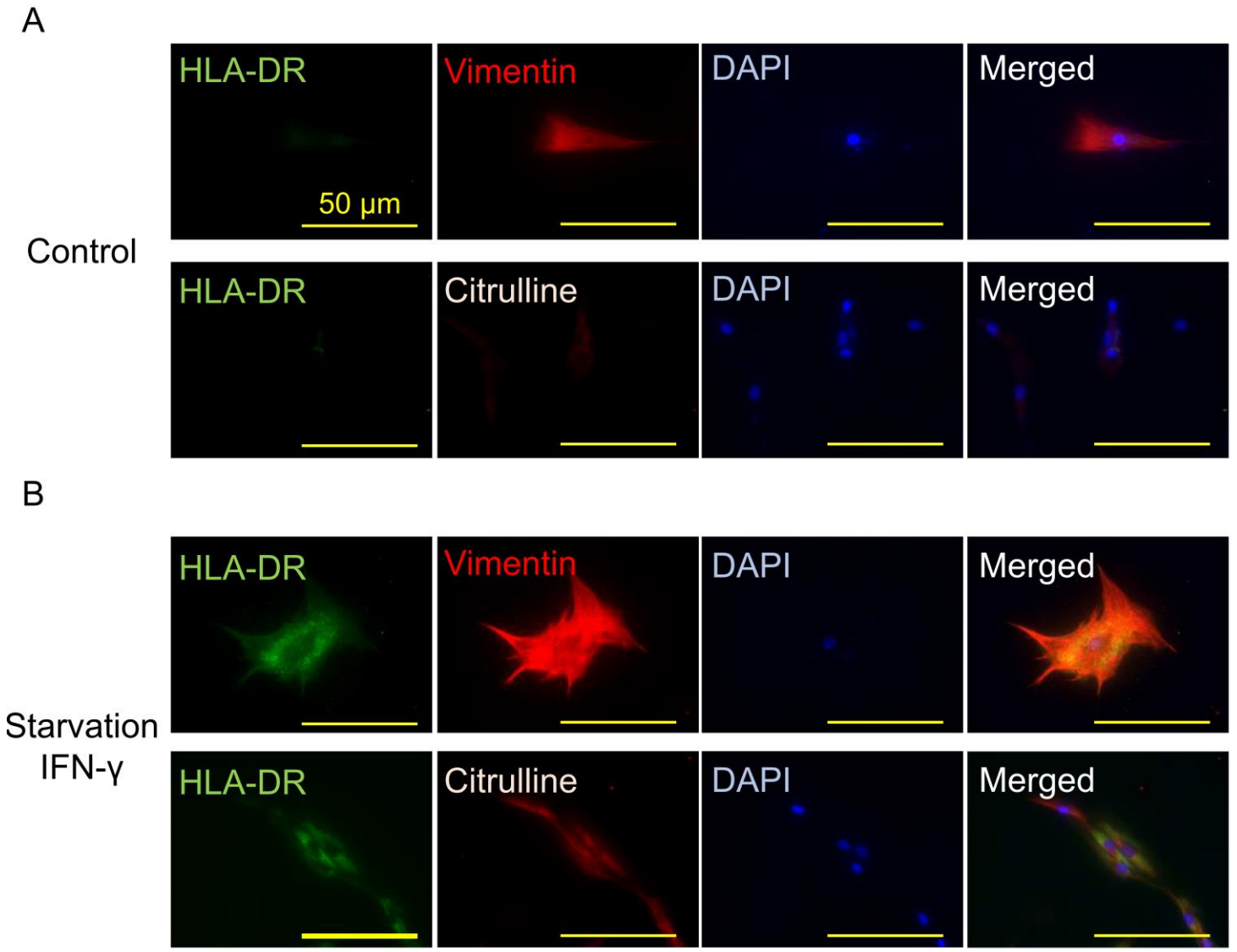

A
HLA-DR
Vimentin
DAPI
Merged
50 µm
Control
HLA-DR
Citrulline
DAPI
Merged
B
HLA-DR
Vimentin
DAPI
Merged
Starvation
IFN-γ
HLA-DR
Citrulline
DAPI
Merged

Figure 17. 免疫細胞染色による滑膜線維芽細胞 (SFs) 内の HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの発現の解析

SFs を 100 ng/mL の IFN-γ で 72 時間刺激し、最終の 2 時間無血清培地で飢餓刺激を加えた。固定透過処理の後、HLA-DR、ビメンチン、シトルリン、核 (DAPI)の発現を免疫細胞染色で評価した。IFN-γ 刺激と飢餓刺激を両方行うと、コントロールと比較して HLA-DR(緑)、シトルリン(赤)の発現が増加した。マージさせた画像では HLA-DR とビメンチン、HLA-DR とシトルリンの局在の一致している部分がみられた。
IFN-γ: interferon-gamma

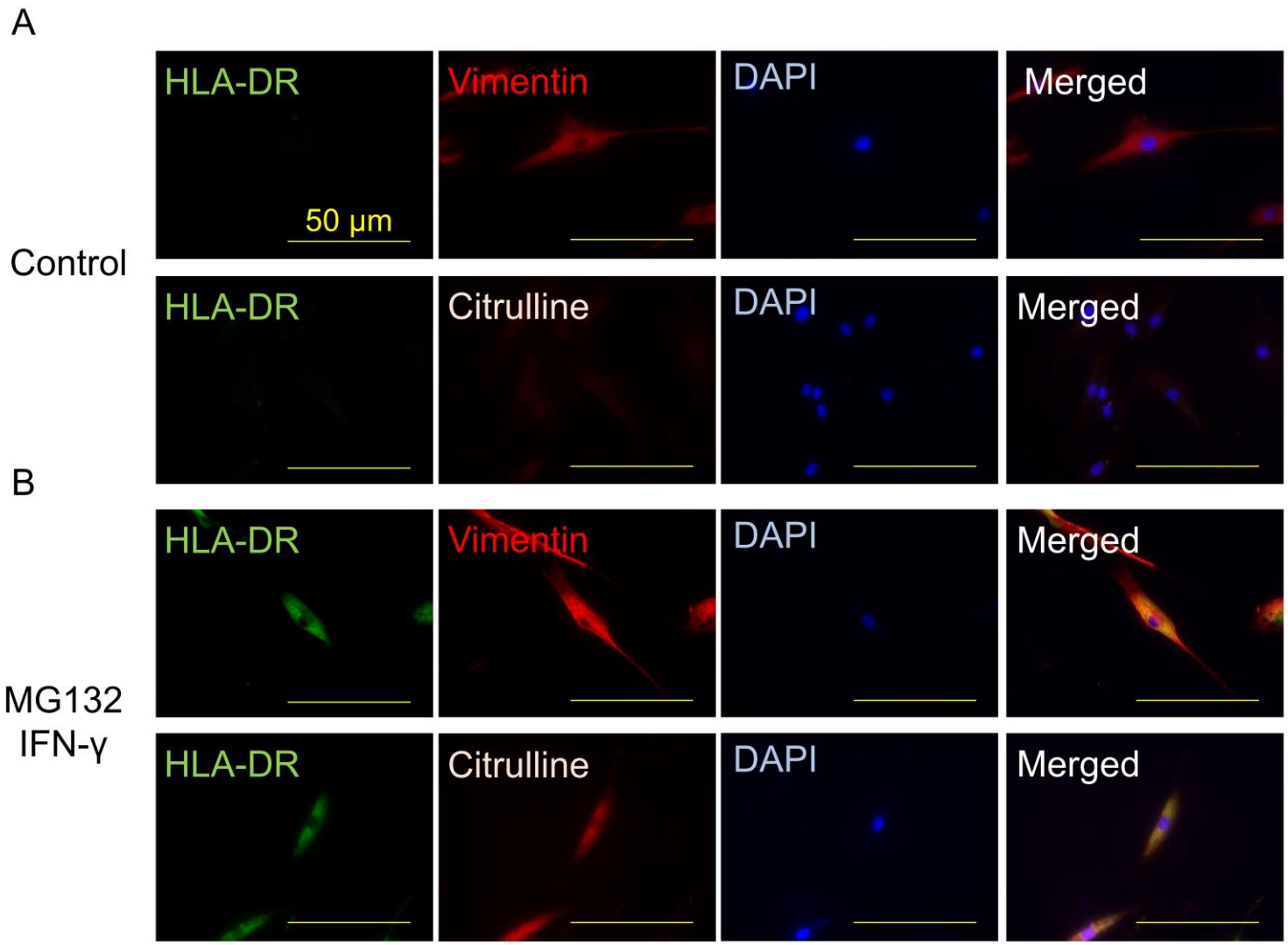

A
HLA-DR
Vimentin
DAPI
Merged
50 μm
Control
HLA-DR
Citrulline
DAPI
Merged
B
HLA-DR
Vimentin
DAPI
Merged
MG132
IFN-γ
HLA-DR
Citrulline
DAPI
Merged

Figure 18. 免疫細胞染色による滑膜線維芽細胞 (SFs) 内の HLA-DR/シトルリン、HLA-DR/ビメンチンの発現の解析

SFs を 100 ng/mL の IFN-γ で 72 時間刺激し、最終の 24 時間 10 μM の MG132 でプロテアソーム阻害刺激を加えた。固定透過処理の後、HLA-DR、ビメンチン、シトルリン、核 (DAPI)の発現を免疫細胞染色で評価した。IFN-γ 刺激と MG132 による刺激を両方行うと、コントロールと比較して HLA-DR(緑)、シトルリン(赤)の発現が増加した。マージさせた画像では HLA-DR とビメンチン、HLA-DR とシトルリンの局在の一致している部分がみられた
IFN-γ: interferon-gamma

5.6　免疫沈降法による HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合の評価

SFs のライセートで抗 HLA-DR 抗体を用いた免疫沈降法を行った。HLA-DR による免疫沈降産物はシトルリン、ビメンチンと結合しており、HLA-DR とシトルリン化ビメンチンは結合していると考えられた (Figure 18)。さらにタンパクの結合や相互作用を視覚化可能な Proximity Ligation Assay を用いて HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの相互作用を視覚化し評価を行うこととした。

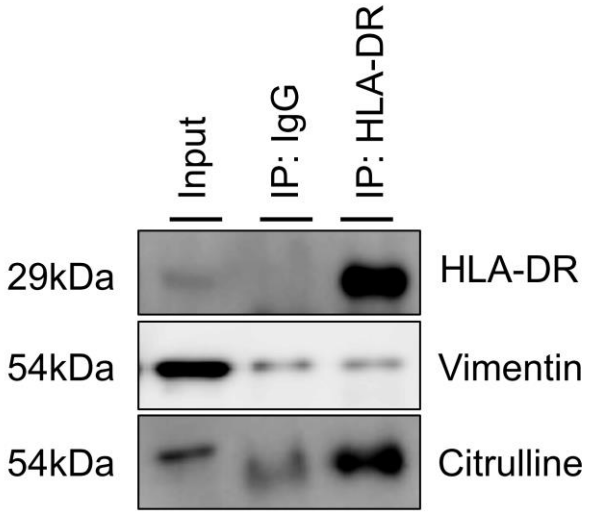


Figure 18. HLA-DR を用いた免疫沈降法による MHC class II とシトルリン化ビメンチンの結合の評価

HLA-DR で SFs ライセートの免疫沈降を行い、ウエスタンブロット法で解析した。HLA-DR の免疫沈降産物はシトルリン、ビメンチンと結合しており、HLA-DR とシトルリン化ビメンチンは結合していると考えられた。
IP: immunoprecipitation

5.7　Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR とシトルリン化ビメンチンの結合

Proximity ligation Assay で MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用を評価した。SFs を IFN-γ で刺激し、無血清培養による飢餓刺激によりオートファジーを誘導し、抗 HLA-DR 抗体、抗ビメンチン抗体、抗シトルリン抗体を用いて Proximity ligation Assay を行い HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用を評価した。無刺激、飢餓刺激のみ、IFN-γ 刺激のみでは HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用は観察されなかったが、IFN-γ 刺激下で飢餓刺激を行うと、HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用が増強された。また、この効果はオートファジー阻害剤の 3-MA により抑制された (Figure 19)。同様にプロテアソーム阻害薬の MG132 により異なった経路でオートファジー誘導でも同様に、MG132 刺激のみでは HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用は確認されず、IFN-γ 刺激下で MG132 刺激を行うと HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用が増強され、この効果は 3-MA により抑制された (Figure 20)。

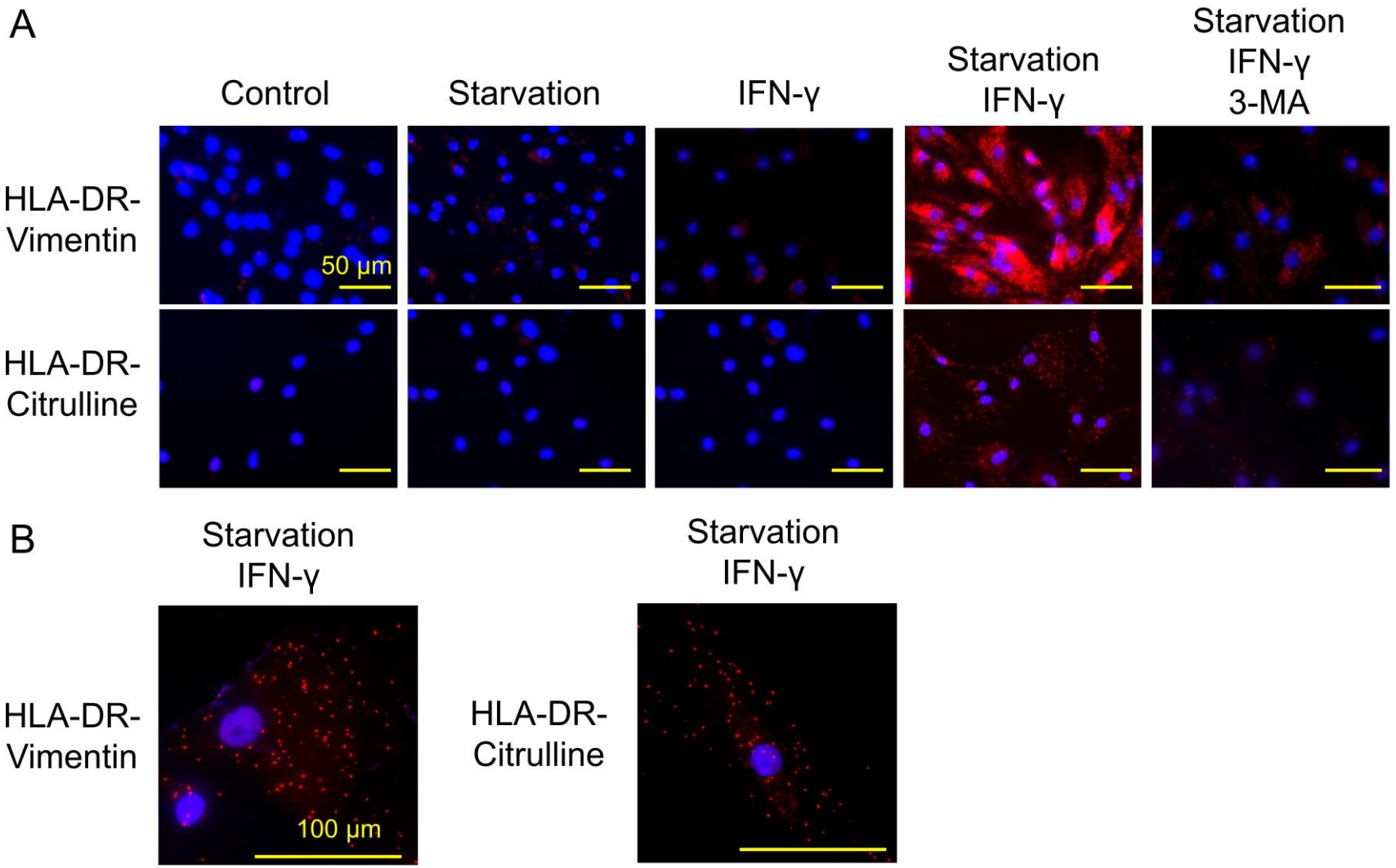

A
Control
Starvation
IFN-γ
Starvation IFN-γ
Starvation IFN-γ 3-MA
HLA-DR-Vimentin
HLA-DR-Citrulline
50 μm
B
Starvation IFN-γ
Starvation IFN-γ
HLA-DR-Vimentin
HLA-DR-Citrulline
100 μm

Figure 19. Proximity ligation assay による HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの複合体の評価

SFs を 100 ng/mL の IFN-γ で 72 時間刺激し、最終の 2 時間無血清培地で飢餓刺激を加えた。固定透過処理の後、HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用を Proximity ligation assay で評価した。(A) IFN-γ 刺激下で無血清培地による飢餓刺激を行うと、HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用が増強された。この効果は 3-MA により阻害された。(B) Figure15 の代表的な細胞の強拡大像。HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの複合体が赤色のドットとして観察された。
IFN-γ: interferon-gamma, 3-MA: 3-methyladenine

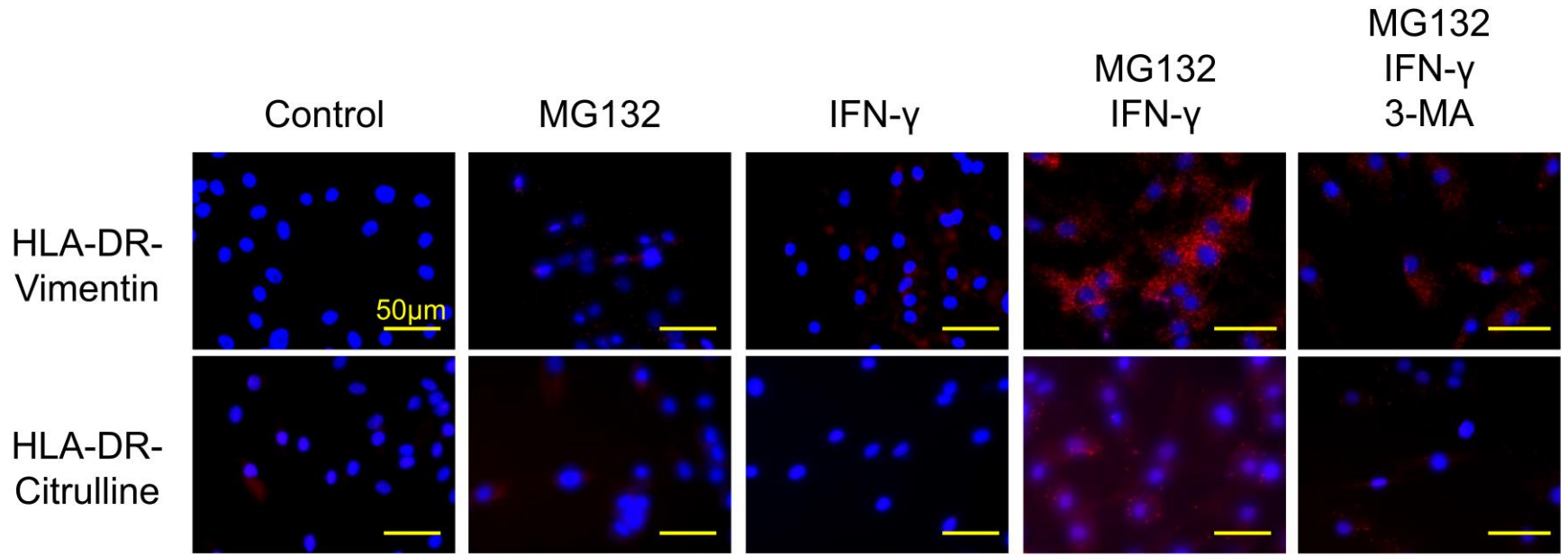


Figure 20. Proximity ligation assay による HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの複合体の評価

SFs を 100 ng/mL の IFN-γ で 72 時間刺激し、最終の 24 時間 10 μM の MG132 でプロテアソーム阻害刺激を加えた。固定透過処理の後、HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用を Proximity ligation assay で評価した。IFN-γ 刺激下で MG132 によるプロテアソーム阻害を行うと、HLA-DR/ビメンチン、HLA-DR/シトルリンの相互作用が増強された。この効果は 3-MA により阻害された。
IFN-γ: interferon-gamma, 3-MA: 3-methyladenine

6. 考察

本研究では RA の SFs の細胞表面における B7-H3 の発現、IFN-γ 刺激による HLA-DR、B7-H1 および B7-DC の誘導を確認し、SFs が抗原提示能を有することが示唆された。ACPA の主要な対応抗原がシトルリン化ビメンチンであることを確認し、オートファジーが SFs の細胞内ビメンチンのシトルリン化を促進することを示した。また、RA の SFs の細胞内において、MHC class II とシトルリン化ビメンチンが結合していることを明らかにし、この相互作用が IFN-γ 刺激下でオートファジー誘導を行うことにより増強されることを示した。

これまでに、IFN-γ 刺激により SFs において MHC class II の発現が誘導されることが報告されている。また、T 細胞の共刺激分子である B7 スーパーファミリー分子の B7-H3、B7-H1 や B7-DC は SFs に発現していることが報告されている。B7-H3 は 2002 年に B7 スーパーファミリー分子の一つとして同定され、T 細胞の増殖や細胞毒性、IFN-γ 産生に関与している(Chapoval et al., 2001)一方で、抑制性の効果も報告されている(Castriconi et al., 2004)。SFs における B7-H3 シグナルは、炎症性サイトカイン存在下で活性化した T 細胞に対しては共刺激シグナルとして作用し、サイトカイン未刺激 T 細胞に対しては抑制性に作用することが報告されており(Tran et al., 2008)、SFs が B7-H3 と活性化 T 細胞の相互作用を介して RA の滑膜炎の病態に関与していることが示唆されている。B7-H1 と B7-DC は programmed death-1 (PD-1)のリガンドとして同定された B7 スーパーファミリー分子である(Bardhan et al., 2016)。滑膜由来の B7-H1 は活性化した T 細胞に対して抑制的に作用すると報告されている(Raptopoulou et al., 2010)。RA の滑膜において B7-DC の発現がみられ(Guo et al., 2012)、RA の病態形成に何らかの関与をしていることが示唆されているが、その詳細な機序についてはまだ明らかになっておらず、今後の検討が必要である。これらの複数の共刺激分子が作用し、T 細胞との相互作用を制御しているものと考えられた。本研究により、SFs が IFN-γ 刺激下で抗原提示細胞として機能し T 細胞と相互作用する可能性が示唆された。

オートファジーは飢餓状態での細胞の生存に関与し、プログラムされた細胞死であるアポトーシスと対照的な機能である。オートファジーはミトコンドリアの傷害に際し活性酸素や損傷した DNA を除去し、アポトーシスを抑制する。生体内ではこの両者がバランスをとり恒常性が維持されている(Meijer and Codogno, 2006)。両者を制御する分子は相互に関連しており、アポトーシス制御分子の Bcl-2 は Beclin-1 を制御することでオートファジーを抑制している(Levine

et al., 2008)。また、caspase 依存性に Beclin-1 が分解され、オートファジーが抑制されプロアポトーシス因子の発現が誘導される(Wirawan et al., 2010)。免疫細胞の生存と細胞死のバランスが、RA の病態形成に強く関与しており、RA においてアポトーシスは免疫細胞の活性化やサイトカイン産生を抑制し、抗炎症作用を持つ。RA の滑膜線維芽細胞は TNF-α などの炎症性サイトカインによりオートファジーとアポトーシス抵抗性が誘導され(Keller et al., 2011)、高い増殖活性を有している。活動性の RA の滑膜ではアポトーシス活性が低下していることが報告されている(Korb et al., 2009 ; Liu and Pope, 2003)。RA の滑膜線維芽細胞は OA と比較して小胞体ストレスによりオートファジーが強く誘導され、高いアポトーシス抵抗性を有している(Shin et al., 2010)。RA の滑膜においてはオートファジー活性とアポトーシス活性は負の相関を示しており、オートファジーがアポトーシス抵抗性に作用することが示唆されている(Kato et al., 2014 ; Xu et al., 2013)。免疫組織学的および分子的アプローチにより RA の滑膜において Beclin-1 や Atg5、LC3-II などのオートファジー関連分子の発現が OA の滑膜と比較して亢進していることが報告されている(Zhu et al., 2017)。また、コラーゲン誘発性関節炎マウスにおいてオートファジー阻害により関節炎が抑制され、PI3K/AKT 経路を介し滑膜線維芽細胞でアポトーシスが促進されることが報告され(Li et al., 2017)、オートファジーをターゲットにした治療の可能性も示唆されている。

申請者は RA の SFs には ACPA の対応抗原が存在し、それがシトルリン化ビメンチンであることを確認した。また、飢餓刺激やプロテアソーム阻害によるオートファジーの誘導に伴い SFs の細胞内のビメンチンのシトルリン化が亢進し、オートファジー阻害によりこの効果は抑制された。

シトルリン化はシトルリン化酵素である PAD により媒介される翻訳後修飾で(Fuhrmann and Thompson, 2016 ; Vossenaar et al., 2004)ある。PAD のアイソタイプである PAD4 をコードする遺伝子の *PADI4* は RA の疾患感受性遺伝子の一つとして同定されており(Suzuki et al., 2003)、過剰なシトルリン化が RA の病態形成に関与していることが示唆されている。また、PAD4 はシトルリン化抗原に対する自己抗体産生に関与しており、炎症性関節炎を誘発する(Shelef et al., 2014)。オートファゴソームは高い PAD 活性を有していることが報告されているが(Ireland and Unanue, 2011)、その詳細な機序については未だ明らかになっていない。本研究におけるオートファジー誘導に伴うビメンチンのシトルリン化にも PAD の活性化が関与した可能性が高いと考えられ、今後 PAD 活性に関する検討も併せて行う必要がある。

ACPA はビメンチンを含むフィブリンやエノラーゼなど様々なタンパクのシトルリン化されたエピトープを認識するが(Vossenaar et al., 2004 ; Wegner et al., 2010)、ACPA の中でも抗シトルリン化ビメンチン抗体は関節破壊と強い相関が

あることが知られている(Bang et al., 2007 ; Mathsson et al., 2008 ; Syversen et al., 2010)。シトルリン化ビメンチンは RA 感受性の HLA-DRB alleles である Shared Epitope を有する患者の T cell のエピトープとなり得ることが報告されており(Feitsma et al., 2010 ; Scally et al., 2013 ; Snir et al., 2011)、シトルリン化ビメンチンが RA の主要な自己抗原であることが示唆されている。

また、本研究において RA の SFs の細胞内において、MHC class II とシトルリン化ビメンチンが結合していることが明らかにされた。また、MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用は IFN-γ 刺激下でオートファジー誘導を行うことにより増強された。

オートファジーは MHC class II を介した細胞内抗原提示に関与することが報告されており(Dengjel et al., 2005)、近年オートファジー依存性の MHC class II を介した細胞内抗原提示を定義した“Type 2 cross-presentation”という概念が提唱されており(Valecka et al., 2018) (Figure 21) 、オートファジーの活性化と抗原提示の関連が注目されている。本研究ではオートファジー誘導により MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用が増強され、オートファジー誘導により細胞内抗原提示が促進されるという仮説を支持する結果であった。

本研究では MHC class II の誘導に IFN-γ を用いたが、単一のサイトカイン刺激では生体内の炎症環境を十分に再現できていない可能性も考えられる。前述のごとく、RA の発症には複雑なサイトカインネットワークが関与していることを考慮し、複数のサイトカイン刺激を行い MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用におよぼす影響を今後評価すべきであると考える。また、本研究ではシトルリン化ビメンチンが MHC class II に load され実際に抗原提示されているかは確認できていない。今後はシトルリン化ビメンチン、MHC class II の強制発現系を作成し、シトルリン化ビメンチンが MHC class II に load され抗原提示されていることを示し、T 細胞と相互作用していることを確認することが研究課題である。

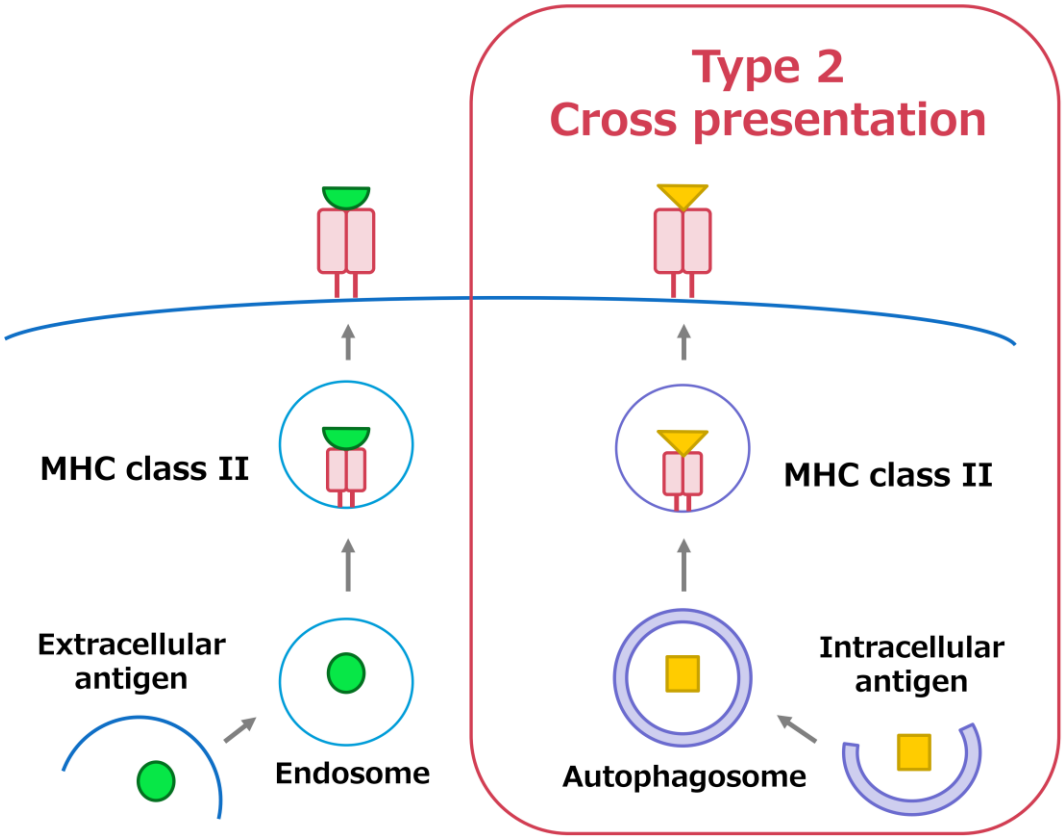


Figure 21. Type 2 cross-presentation (Valecka et al. 2018 より引用改変)

MHC class II は細胞外の抗原提示に関与しているが、オートファジー依存的に細胞内の抗原提示にも関与している。
MHC class II: Major histocompatibility complex class II

7. 総括および結論

本研究では RA の SFs の細胞表面における MHC class II や T 細胞の共刺激分子の発現を評価し SFs が抗原提示細胞として機能しうることを示した。また、SFs における ACPA の主要な対応抗原がシトルリン化ビメンチンであることを示し、オートファジーが細胞内のビメンチンのシトルリン化を促進することを示した。最後に、SFs 細胞内において MHC class II とシトルリン化ビメンチンが結合していることを示し、この相互作用が IFN-γ 刺激下でオートファジー誘導を行うことにより増強されることを示した（Figure 22)。

これまでにシトルリン化抗原に対する自己免疫は喫煙(Klareskog et al., 2008)や歯周病(Lundberg et al., 2008)などによる PAD の活性化が誘因となることが報告されているが、シトルリン化自己抗原に対する自己抗体の産生の機序や自己抗体がどのようにして関節炎をおこすのかについてはいまだ明らかになってはいない。

関節局所における自己免疫の機序を考える際に、脊椎関節炎の病態生理が手掛かりとなりうる。脊椎関節炎は関節リウマチと同様に滑膜炎をきたす疾患であるが、脊椎関節炎における滑膜炎は付着部炎から分泌された炎症性サイトカインや成長因子による二次性の滑膜炎である(McGonagle et al., 1998)。脊椎関節炎の一つのサブタイプである乾癬性関節炎では関節内において ACPA が産生されることが報告されており(Spadaro et al., 2007)、滑膜炎により活性化された SFs がその産生に関与している可能性がある。乾癬性関節炎においても RA と同様に ACPA と関節破壊や疾患活動性には相関がみられ(Dalmády et al., 2013 ; Korendowych et al., 2005)、病原性を有していることが示された。RA においても滑膜炎に伴って関節内で ACPA が産生されている可能性があり、本研究で示された SFs におけるシトルリン化ビメンチンと MHC class II の相互作用が関与している可能性があると考えられる。

今後は SFs においてシトルリン化ビメンチンが MHC class II を介して抗原提示されていることや、T 細胞と相互作用すること証明することが研究課題である。SFs においてオートファジーがシトルリン化ビメンチンの抗原提示に及ぼす影響を評価し、ACPA の産生機序の解明や新たな治療ターゲットの同定を目標としたい。

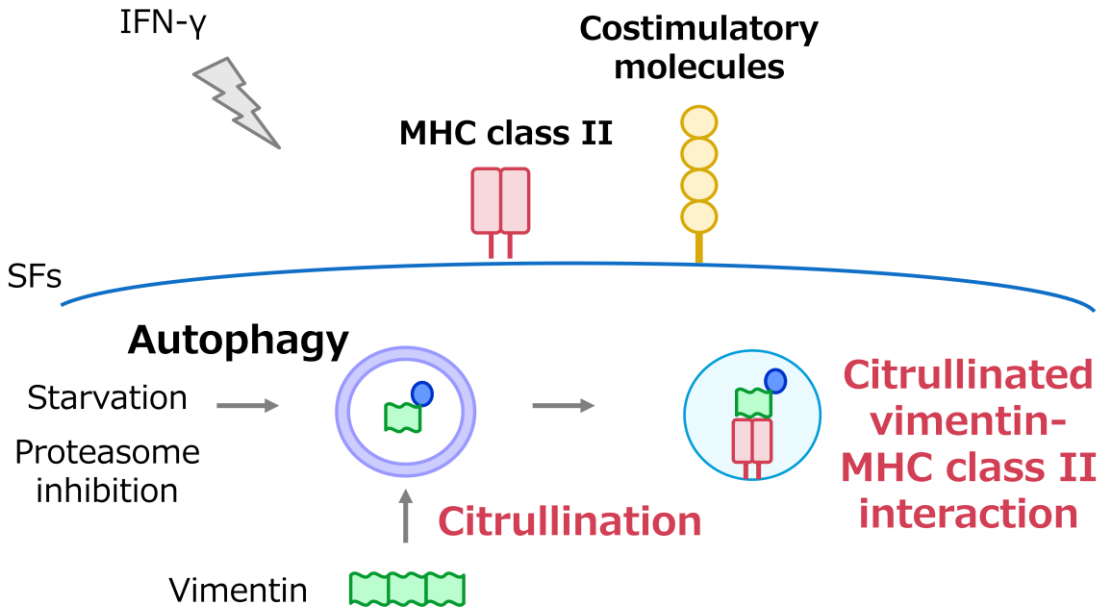


Figure 22. 本研究の結果のまとめ

飢餓刺激および、プロテアソーム阻害によりオートファジーが誘導され、細胞内のビメンチンのシトルリン化が亢進した。SFs 細胞表面には B7-H3 が発現しており、IFN-γ 刺激により MHC class II および B7-H1、B7-DC が誘導された。IFN-γ 刺激下でオートファジー誘導をすることで MHC class II とシトルリン化ビメンチンの相互作用が増強された。

MHC class II: Major histocompatibility complex class II, SF: synovial fibroblasts, IFN-γ: interferon-gamma

8. 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費 16K19591 の助成を受けたものである。

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同分野教授 渥美達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本分野膠原病グループ助教 加藤将先生には本研究の遂行にあたり、終始熱心な御指導、適切な御助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。北海道大学大学院医学研究院生化学分野教授 畠山鎮次先生には本研究の遂行にあたり、御助言、御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。北海道大学大学院医学研究院整形外科分野講師 小野寺智洋先生には本研究の遂行にあたり、滑膜の提供ならびに本研究の御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本分野膠原病グループ准教授 保田晋助先生、講師 奥健志先生、助教 Olga Amengual 先生、坊垣暁之先生、藤枝雄一郎先生、河野通仁先生には研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言をいただきました。同期の大学院生の久田諒先生には後期研修、病棟医時代からお世話になり一緒に研究ができたことを誇りに思います。工藤友喜大学院生は自身の研究の傍ら筆者の実験を大変手厚くサポートしてくださいました。工藤大学院生の協力なくしてこの研究の成功はなしえず、大変感謝しております。また大学院生の、嶋村抄苗先生、河野通大先生、柴田悠平先生、谷村瞬先生、Lee Wenshi 先生、大西直樹先生、阿部靖矢先生、狩野晧平先生、下山修平先生、また大学院を修了された清水裕香先生、渡邊俊之先生、野口淳史先生、中川育磨先生、大村一将先生、神田真聡先生、中村浩之先生は共に学び、励ましあい、大学院生活の支えとなってくださいました。心より感謝を申し上げます。当科実験助手の下道真由美さん、櫻井美和さん、金子由美子さん、山田あや香さん、石倉唯さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、御協力、御助言、ご支援をいただきました多くの諸先輩方、同僚、後輩の皆様に対しまして、心より感謝を申し上げます。

そして公私ともに研究遂行をサポートしてくれた夫の志田玄貴先生、いつも笑顔で応援してくれた息子に感謝いたします。最後に、この道を進むことを応援し、温かく見守り、励まし、サポートしてくれた両親に心から感謝いたします。

9. 利益相反

本研究に際し、開示すべき利益相反状態はない。

10. 引用文献

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., 3rd, Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis and Rheumatism. 62, 2569-2581

Alonso-Ruiz, A., Pijoan, J.I., Ansuategui, E., Urkaregi, A., Calabozo, M. and Quintana, A. (2008). Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. BMC Musculoskelet Disord. 9, 52

Amaravadi, R.K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X.M., Weiss, W.A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R.S., Lotze, M.T. and White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. Clinical Cancer Research. 17, 654-666

Avouac, J., Gossec, L. and Dougados, M. (2006). Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. Annals of the Rheumatic Diseases. 65, 845-851

Baeten, D., Peene, I., Union, A., Meheus, L., Sebbag, M., Serre, G., Veys, E.M. and De Keyser, F. (2001). Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. Arthritis and Rheumatism. 44, 2255-2262

Bang, H., Egerer, K., Gauliard, A., Luthke, K., Rudolph, P.E., Fredenhagen, G., Berg, W., Feist, E. and Burmester, G.R. (2007). Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism. 56, 2503-2511

Bardhan, K., Anagnostou, T. and Boussiotis, V.A. (2016). The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. Frontiers in Immunology. 7,

Bartok, B. and Firestein, G.S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. Immunological Reviews. 233, 233-255

Baxter, D., McInnes, I.B. and Kurowska-Stolarska, M. (2012). Novel regulatory mechanisms in inflammatory arthritis: a role for microRNA. Immunology and Cell Biology. 90, 288-292

Bluml, S., Bonelli, M., Niederreiter, B., Puchner, A., Mayr, G., Hayer, S., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., Smolen, J. and Redlich, K. (2011). Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. Arthritis and Rheumatism. 63, 1281-1288

Bongartz, T., Cantaert, T., Atkins, S.R., Harle, P., Myers, J.L., Turesson, C., Ryu, J.H., Baeten, D. and Matteson, E.L. (2007). Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford, England). 46, 70-75

Boots, A.M., Wimmers-Bertens, A.J. and Rijnders, A.W. (1994). Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. Immunology. 82, 268-274

Bottini, N. and Firestein, G.S. (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. Nature Reviews: Rheumatology. 9, 24-33

Busch, R. and Mellins, E.D. (1996). Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. Current Opinion in Immunology. 8, 51-58

Castriconi, R., Dondero, A., Augugliaro, R., Cantoni, C., Carnemolla, B., Sementa, A.R., Negri, F., Conte, R., Corrias, M.V., Moretta, L., et al. (2004). Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101, 12640-12645

Catrina, A.I., Svensson, C.I., Malmstrom, V., Schett, G. and Klareskog, L. (2016). Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. Nature Reviews: Rheumatology.

Chapoval, A.I., Ni, J., Lau, J.S., Wilcox, R.A., Flies, D.B., Liu, D., Dong, H., Sica, G.L., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2001). B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. Nature Immunology. 2, 269-274

Dalmády, S., Kiss, M., Képíró, L., Kovács, L., Sonkodi, G., Kemény, L. and Gyulai, R. (2013). Higher Levels of Autoantibodies Targeting Mutated Citrullinated Vimentin in Patients with Psoriatic Arthritis Than in Patients with Psoriasis Vulgaris. Clinical and Developmental Immunology. 2013, 474028

Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., et al. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102, 7922-7927

Dixon, W.G., Hyrich, K.L., Watson, K.D., Lunt, M., Galloway, J., Ustianowski, A. and Symmons, D.P. (2010). Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). Ann Rheum Dis. 69, 522-528

Donahue, K.E., Gartlehner, G., Jonas, D.E., Lux, L.J., Thieda, P., Jonas, B.L., Hansen, R.A., Morgan, L.C. and Lohr, K.N. (2008). Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. Annals of Internal Medicine. 148, 124-134

Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E., Girardin, S.E., Wilson, M.I. and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. Molecular Cell. 55, 238-252

Engstrom, M., Eriksson, K., Lee, L., Hermansson, M., Johansson, A., Nicholas, A.P., Gerasimcik, N., Lundberg, K., Klareskog, L., Catrina, A.I., et al. (2018). Increased citrullination and expression of peptidylarginine deiminases independently of P. gingivalis and A. actinomycetemcomitans in gingival tissue of patients with periodontitis. Journal of Translational Medicine. 16, 214

Feitsma, A.L., van der Voort, E.I., Franken, K.L., el Bannoudi, H., Elferink, B.G., Drijfhout, J.W., Huizinga, T.W., de Vries, R.R., Toes, R.E. and Ioan-Facsinay, A. (2010). Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism. 62, 117-125

Feldmann, M., Brennan, F.M. and Maini, R.N. (1996). Rheumatoid arthritis. Cell. 85, 307-310

Finckh, A., Bansback, N., Marra, C.A., Anis, A.H., Michaud, K., Lubin, S., White, M., Sizto, S. and Liang, M.H. (2009). Treatment of very early rheumatoid arthritis with symptomatic therapy, disease-modifying antirheumatic drugs, or biologic agents: a cost-effectiveness analysis. Annals of Internal Medicine. 151, 612-621

Fuhrmann, J., Clancy, K.W. and Thompson, P.R. (2015). Chemical Biology of Protein Arginine Modifications in Epigenetic Regulation. Chemical Reviews. 115, 5413-5461

Fuhrmann, J. and Thompson, P.R. (2016). Protein Arginine Methylation and Citrullination in Epigenetic Regulation. ACS Chemical Biology. 11, 654-668

Gotis-Graham, I. and McNeil, H.P. (1997). Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. Arthritis and Rheumatism. 40, 479-489

Gotis-Graham, I., Smith, M.D., Parker, A. and McNeil, H.P. (1998). Synovial mast cell responses during clinical improvement in early rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 57, 664-671

Guo, G., Shang, Y., Zhu, G., Bao, X., Xu, S. and Chen, Y. (2012). The expression and distribution of immunomodulatory proteins B7-H1, B7-DC, B7-H3, and B7-H4 in rheumatoid synovium. Clinical Rheumatology. 31, 271-281

György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A. and Buzás, E.I. (2006). Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 38, 1662-1677

Haringman, J.J., Gerlag, D.M., Zwinderman, A.H., Smeets, T.J., Kraan, M.C., Baeten, D., McInnes, I.B., Bresnihan, B. and Tak, P.P. (2005). Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 64, 834-838

Huber, L.C., Distler, O., Tarner, I., Gay, R.E., Gay, S. and Pap, T. (2006). Synovial

fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford, England). 45, 669-675

Hyrich, K.L., Watson, K.D., Isenberg, D.A. and Symmons, D.P. (2008). The British Society for Rheumatology Biologics Register: 6 years on. Rheumatology (Oxford). 47, 1441-1443

Ireland, J.M. and Unanue, E.R. (2011). Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. Journal of Experimental Medicine. 208, 2625-2632

Kaniuk, N.A., Kiraly, M., Bates, H., Vranic, M., Volchuk, A. and Brumell, J.H. (2007). Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. Diabetes. 56, 930-939

Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A. and Skogh, T. (2004). Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). Annals of the Rheumatic Diseases. 63, 1085-1089

Kato, M., Ospelt, C., Gay, R.E., Gay, S. and Klein, K. (2014). Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheumatol. 66, 40-48

Keller, C.W., Fokken, C., Turville, S.G., Lunemann, A., Schmidt, J., Munz, C. and Lunemann, J.D. (2011). TNF-alpha induces macroautophagy and regulates MHC class II expression in human skeletal muscle cells. Journal of Biological Chemistry. 286, 3970-3980

Keller, C.W., Sina, C., Kotur, M.B., Ramelli, G., Mundt, S., Quast, I., Ligeon, L.A., Weber, P., Becher, B., Munz, C., et al. (2017). ATG-dependent phagocytosis in dendritic cells drives myelin-specific CD4(+) T cell pathogenicity during CNS inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 114, E11228-e11237

Klareskog, L., Catrina, A.I. and Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. Lancet. 373, 659-672

Klareskog, L., Ronnelid, J., Lundberg, K., Padyukov, L. and Alfredsson, L. (2008). Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annual Review of Immunology. 26, 651-675

Klein, K. and Gay, S. (2015). Epigenetics in rheumatoid arthritis. Current Opinion in Rheumatology. 27, 76-82

Korb, A., Pavenstadt, H. and Pap, T. (2009). Cell death in rheumatoid arthritis. Apoptosis. 14, 447-454

Korendowych, E., Owen, P., Ravindran, J., Carmichael, C. and McHugh, N. (2005). The clinical and genetic associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in psoriatic arthritis. Rheumatology. 44, 1056-1060

Kristensen, L.E., Christensen, R., Bliddal, H., Geborek, P., Danneskiold-Samsoe, B. and Saxne, T. (2007). The number needed to treat for adalimumab, etanercept, and infliximab based on ACR50 response in three randomized controlled trials on established rheumatoid arthritis: a systematic literature review. Scand J Rheumatol. 36, 411-417

Kuhn, K.A., Kulik, L., Tomooka, B., Braschler, K.J., Arend, W.P., Robinson, W.H. and Holers, V.M. (2006). Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. Journal of Clinical Investigation. 116, 961-973

Lees, C.W., Barrett, J.C., Parkes, M. and Satsangi, J. (2011). New IBD genetics: common pathways with other diseases. Gut. 60, 1739-1753

Leombruno, J.P., Einarson, T.R. and Keystone, E.C. (2009). The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events. Ann Rheum Dis. 68, 1136-1145

Levine, B., Sinha, S.C. and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. Autophagy. 4, 600-606

Levine, B. and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? Journal of

Clinical Investigation. 115, 2679-2688

Li, S., Chen, J.W., Xie, X., Tian, J., Deng, C., Wang, J., Gan, H.N. and Li, F. (2017). Autophagy inhibitor regulates apoptosis and proliferation of synovial fibroblasts through the inhibition of PI3K/AKT pathway in collagen-induced arthritis rat model. Am J Transl Res. 9, 2065-2076

Liew, F.Y. and McInnes, I.B. (2002). The role of innate mediators in inflammatory response. Molecular Immunology. 38, 887-890

Liu, H. and Pope, R.M. (2003). The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. Current Opinion in Pharmacology. 3, 317-322

Lum, J.J., DeBerardinis, R.J. and Thompson, C.B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. Nature Reviews: Molecular Cell Biology. 6, 439-448

Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B.A., Wegner, N., Wait, R., Charles, P., Mikuls, T.R. and Venables, P.J. (2008). Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. Arthritis and Rheumatism. 58, 3009-3019

Lundberg, K., Nijenhuis, S., Vossenaar, E.R., Palmblad, K., van Venrooij, W.J., Klareskog, L., Zendman, A.J. and Harris, H.E. (2005). Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. Arthritis Research & Therapy. 7, R458-467

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nature Reviews: Molecular Cell Biology. 8, 741-752

Makrygiannakis, D., af Klint, E., Lundberg, I.E., Lofberg, R., Ulfgren, A.K., Klareskog, L. and Catrina, A.I. (2006). Citrullination is an inflammation-dependent process. Annals of the Rheumatic Diseases. 65, 1219-1222

Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A.K., Nicholas, A.P., Zendman, A.J., Eklund, A., Grunewald, J., Skold, C.M., Klareskog, L. and Catrina, A.I. (2008).

Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. Annals of the Rheumatic Diseases. 67, 1488-1492

Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T. and Serre, G. (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. Journal of Immunology. 166, 4177-4184

Mathsson, L., Mullazehi, M., Wick, M.C., Sjoberg, O., van Vollenhoven, R., Klareskog, L. and Ronnelid, J. (2008). Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. Arthritis and Rheumatism. 58, 36-45

Maxwell, L.J. and Singh, J.A. (2010). Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. Journal of Rheumatology. 37, 234-245

McGonagle, D., Gibbon, W. and Emery, P. (1998). Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. Lancet. 352, 1137-1140

McInnes, I.B. and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 365, 2205-2219

Meijer, A.J. and Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. Molecular Aspects of Medicine. 27, 411-425

Menzies, F.M., Fleming, A. and Rubinsztein, D.C. (2015). Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. Nature Reviews: Neuroscience. 16, 345-357

Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. Current Opinion in Cell Biology. 22, 132-139

Mizushima, N. and Klionsky, D.J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. Annual Review of Nutrition. 27, 19-40

Mizushima, N. and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues.

Cell. 147, 728-741

Muller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B.N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R.E. and Gay, S. (1996). Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. American Journal of Pathology. 149, 1607-1615

Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., et al. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. Nature Medicine. 13, 619

Navarrete Santos, A., Riemann, D., Thiele, K., Kehlen, A., Navarrete Santos, A. and Langner, J. (1997). Constitutive expression of HLA class II mRNA in synovial fibroblast-like cells from patients with rheumatoid arthritis. Immunology Letters. 58, 53-58

Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. and Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. Nature. 455, 396-400

Nicholas, A.P., King, J.L., Sambandam, T., Echols, J.D., Gupta, K.B., McInnis, C. and Whitaker, J.N. (2003). Immunohistochemical localization of citrullinated proteins in adult rat brain. Journal of Comparative Neurology. 459, 251-266

Nigrovic, P.A. and Lee, D.M. (2007). Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. Immunological Reviews. 217, 19-37

Nixon, R.M., O'Hagan, A., Oakley, J., Madan, J., Stevens, J.W., Bansback, N. and Brennan, A. (2009). The Rheumatoid Arthritis Drug Development Model: a case study in Bayesian clinical trial simulation. Pharm Stat. 8, 371-389

Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., et al. (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature. 506, 376-381

Pierdominici, M., Vomero, M., Barbati, C., Colasanti, T., Maselli, A., Vacirca, D., Giovannetti, A., Malorni, W. and Ortona, E. (2012). Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus. FASEB Journal. 26, 1400-1412

Plenge, R.M., Padyukov, L., Remmers, E.F., Purcell, S., Lee, A.T., Karlson, E.W., Wolfe, F., Kastner, D.L., Alfredsson, L., Altshuler, D., et al. (2005). Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. American Journal of Human Genetics. 77, 1044-1060

Prendergast, C.T., Patakas, A., Al-Khabouri, S., McIntyre, C.L., McInnes, I.B., Brewer, J.M., Garside, P. and Benson, R.A. (2018). Visualising the interaction of CD4 T cells and DCs in the evolution of inflammatory arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 77, 579-588

Rantapaa-Dahlqvist, S., de Jong, B.A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U. and van Venrooij, W.J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism. 48, 2741-2749

Raptopoulou, A.P., Bertsias, G., Makrygiannakis, D., Verginis, P., Kritikos, I., Tzardi, M., Klareskog, L., Catrina, A.I., Sidiropoulos, P. and Boumpas, D.T. (2010). The programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitory pathway is up-regulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis. Arthritis and Rheumatism. 62, 1870-1880

Rasch, E.K., Hirsch, R., Paulose-Ram, R. and Hochberg, M.C. (2003). Prevalence of rheumatoid arthritis in persons 60 years of age and older in the United States: effect of different methods of case classification. Arthritis and Rheumatism. 48, 917-926

Ronnelid, J., Wick, M.C., Lampa, J., Lindblad, S., Nordmark, B., Klareskog, L. and van Vollenhoven, R.F. (2005). Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. Annals of the Rheumatic Diseases. 64, 1744-1749

Sabeh, F., Fox, D. and Weiss, S.J. (2010). Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. Journal of Immunology. 184, 6396-6406

Scally, S.W., Petersen, J., Law, S.C., Dudek, N.L., Nel, H.J., Loh, K.L., Wijeyewickrema, L.C., Eckle, S.B., van Heemst, J., Pike, R.N., et al. (2013). A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. Journal of Experimental Medicine. 210, 2569-2582

Schellekens, G.A., Visser, H., de Jong, B.A., van den Hoogen, F.H., Hazes, J.M., Breedveld, F.C. and van Venrooij, W.J. (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis and Rheumatism. 43, 155-163

Scher, J.U., Littman, D.R. and Abramson, S.B. (2016). Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. Arthritis Rheumatol. 68, 35-45

Schmid, D. and Munz, C. (2005). Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. Cell Death and Differentiation. 12 Suppl 2, 1519-1527

Schroder, A.E., Greiner, A., Seyfert, C. and Berek, C. (1996). Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93, 221-225

Scott, D.L., Wolfe, F. and Huizinga, T.W. (2010). Rheumatoid arthritis. Lancet. 376, 1094-1108

Sharpe, A.H. and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. Nature Reviews: Immunology. 2, 116-126

Shelef, M.A., Sokolove, J., Lahey, L.J., Wagner, C.A., Sackmann, E.K., Warner, T.F., Wang, Y., Beebe, D.J., Robinson, W.H. and Huttenlocher, A. (2014). Peptidylarginine deiminase 4 contributes to tumor necrosis factor alpha-induced inflammatory arthritis. Arthritis Rheumatol. 66, 1482-1491

Shin, Y.J., Han, S.H., Kim, D.S., Lee, G.H., Yoo, W.H., Kang, Y.M., Choi, J.Y., Lee, Y.C., Park, S.J., Jeong, S.K., et al. (2010). Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. Arthritis Research & Therapy. 12, R19

Silman, A.J., Newman, J. and MacGregor, A.J. (1996). Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. Arthritis and Rheumatism. 39, 732-735

Silman, A.J. and Pearson, J.E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. Arthritis Research. 4 Suppl 3, S265-272

Singh, J.A., Christensen, R., Wells, G.A., Suarez-Almazor, M.E., Buchbinder, R., Lopez-Olivo, M.A., Ghogomu, E.T. and Tugwell, P. (2009). A network meta-analysis of randomized controlled trials of biologics for rheumatoid arthritis: a Cochrane overview. CMAJ. 181, 787-796

Singh, J.A., Christensen, R., Wells, G.A., Suarez-Almazor, M.E., Buchbinder, R., Lopez-Olivo, M.A., Tanjong Ghogomu, E. and Tugwell, P. (2009). Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. Cochrane Database Syst Rev. CD007848

Smolen, J.S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M.H. and Emery, P. (2007). New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. Lancet. 370, 1861-1874

Smolen, J.S., Aletaha, D. and McInnes, I.B. (2016). Rheumatoid arthritis. Lancet. 388, 2023-2038

Smolen, J.S., Beaulieu, A., Rubbert-Roth, A., Ramos-Remus, C., Rovensky, J., Alecock, E., Woodworth, T. and Alten, R. (2008). Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. Lancet. 371, 987-997

Smolen, J.S. and Steiner, G. (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. Nat Rev Drug Discov. 2, 473-488

Snir, O., Rieck, M., Gebe, J.A., Yue, B.B., Rawlings, C.A., Nepom, G., Malmstrom, V. and Buckner, J.H. (2011). Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. Arthritis and Rheumatism. 63, 2873-2883

Spadaro, A., Riccieri, V., Scrivo, R., Alessandri, C. and Valesini, G. (2007). Anti-cyclic citrullinated peptide antibody determination in synovial fluid of psoriatic arthritis. Clinical and Experimental Rheumatology. 25, 599-604

Strangfeld, A., Listing, J., Herzer, P., Liebhaber, A., Rockwitz, K., Richter, C. and Zink, A. (2009). Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. JAMA. 301, 737-744

Suarez-Almazor, M.E., Belseck, E., Shea, B., Wells, G. and Tugwell, P. (2000). Methotrexate for rheumatoid arthritis. Cochrane Database Syst Rev. CD000957

Suarez-Almazor, M.E., Belseck, E., Shea, B., Wells, G. and Tugwell, P. (2000). Sulfasalazine for rheumatoid arthritis. Cochrane Database Syst Rev. CD000958

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhiro, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., et al. (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nature Genetics. 34, 395-402

Symmons, D., Turner, G., Webb, R., Asten, P., Barrett, E., Lunt, M., Scott, D. and Silman, A. (2002). The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. Rheumatology (Oxford). 41, 793-800

Syversen, S.W., Goll, G.L., van der Heijde, D., Landewe, R., Lie, B.A., Odegard, S., Uhlig, T., Gaarder, P.I. and Kvien, T.K. (2010). Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study. Annals of the Rheumatic Diseases. 69, 345-351

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y.,

Hino, O., Tanaka, K. and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. Genes and Development. 25, 795-800

Tolboom, T.C., van der Helm-Van Mil, A.H., Nelissen, R.G., Breedveld, F.C., Toes, R.E. and Huizinga, T.W. (2005). Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism. 52, 1999-2002

Tran, C.N., Thacker, S.G., Louie, D.M., Oliver, J., White, P.T., Endres, J.L., Urquhart, A.G., Chung, K.C. and Fox, D.A. (2008). Interactions of T cells with fibroblast-like synoviocytes: role of the B7 family costimulatory ligand B7-H3. Journal of Immunology. 180, 2989-2998

Valecka, J., Almeida, C.R., Su, B., Pierre, P. and Gatti, E. (2018). Autophagy and MHC-restricted antigen presentation. Molecular Immunology. 99, 163-170

van den Broek, M., Dirven, L., Klarenbeek, N.B., Molenaar, T.H., Han, K.H., Kerstens, P.J., Huizinga, T.W., Dijkmans, B.A. and Allaart, C.F. (2012). The association of treatment response and joint damage with ACPA-status in recent-onset RA: a subanalysis of the 8-year follow-up of the BeSt study. Annals of the Rheumatic Diseases. 71, 245-248

van Dongen, H., van Aken, J., Lard, L.R., Visser, K., Ronday, H.K., Hulsmans, H.M., Speyer, I., Westedt, M.L., Peeters, A.J., Allaart, C.F., et al. (2007). Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis and Rheumatism. 56, 1424-1432

van Gaalen, F.A., Linn-Rasker, S.P., van Venrooij, W.J., de Jong, B.A., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., Toes, R.E. and Huizinga, T.W. (2004). Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. Arthritis and Rheumatism. 50, 709-715

van Venrooij, W.J., van Beers, J.J. and Pruijn, G.J. (2011). Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. Nature Reviews: Rheumatology. 7, 391-398

Villadangos, J.A. (2001). Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. Molecular Immunology. 38, 329-346

Vincent, C., Nogueira, L., Sebbag, M., Chapuy-Regaud, S., Arnaud, M., Letourneur, O., Rolland, D., Fournie, B., Cantagrel, A., Jolivet, M., et al. (2002). Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism. 46, 2051-2058

Vossenaar, E.R., Despres, N., Lapointe, E., van der Heijden, A., Lora, M., Senshu, T., van Venrooij, W.J. and Menard, H.A. (2004). Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. Arthritis Research & Therapy. 6, R142-150

Vossenaar, E.R., Radstake, T.R., van der Heijden, A., van Mansum, M.A., Dieteren, C., de Rooij, D.J., Barrera, P., Zendman, A.J. and van Venrooij, W.J. (2004). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. Annals of the Rheumatic Diseases. 63, 373-381

Vossenaar, E.R., Smeets, T.J., Kraan, M.C., Raats, J.M., van Venrooij, W.J. and Tak, P.P. (2004). The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. Arthritis and Rheumatism. 50, 3485-3494

Wegner, N., Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B., Malmstrom, V., Feldmann, M. and Venables, P.J. (2010). Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. Immunological Reviews. 233, 34-54

White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. Journal of Clinical Investigation. 125, 42-46

Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., et al. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. Cell Death & Disease. 1, e18

Xu, K., Xu, P., Yao, J.F., Zhang, Y.G., Hou, W.K. and Lu, S.M. (2013). Reduced

apoptosis correlates with enhanced autophagy in synovial tissues of rheumatoid arthritis. Inflammation Research. 62, 229-237

Yazici, Y. (2009). Treatment of rheumatoid arthritis: we are getting there. Lancet. 374, 178-180

Yorimitsu, T. and Klionsky, D.J. (2007). Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. Trends in Cell Biology. 17, 279-285

Young, B.J., Mallya, R.K., Leslie, R.D., Clark, C.J. and Hamblin, T.J. (1979). Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. British Medical Journal. 2, 97-99

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J. and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100, 15077-15082

Zhu, L., Wang, H., Wu, Y., He, Z., Qin, Y. and Shen, Q. (2017). The Autophagy Level Is Increased in the Synovial Tissues of Patients with Active Rheumatoid Arthritis and Is Correlated with Disease Severity. Mediators of Inflammation. 2017, 7623145