

# 関節リウマチにおける抗シトルリン化ペプチド抗体測定の有用性

Clinical Utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatoid arthritis

おお た とし ゆき  
大 田 俊 行  
Toshiyuki OTA

## 要 旨

関節リウマチ (RA) に極めて特異性の高い自己抗体である抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) の臨床的有用性について概説した。本抗体はその高い特異性に加えてリウマトイド因子とほぼ同程度の感度故に RA の診断補助として有用である。しかし、発症して間もない (3 カ月以内) 超早期 RA での感度はそれほど高くなく、本抗体が陰性であっても RA を否定できないことを認識すべきである。本抗体のもう 1 つの特徴として関節破壊予測因子として有用であることがクローズアップされており、本抗体が当初から高力価である場合関節破壊が急速に進行する可能性を考慮し強力な治療から開始することが必要かもしれない。

## はじめに

関節リウマチは (rheumatoid arthritis : RA) は多発性関節炎を特徴とし、関節破壊と肢体不自由に至る慢性全身性自己免疫疾患である。本邦では約 70 万人の RA 患者がいると推定されている。男女比は 1 : 3 で女性に多く、いずれの年代でも発症するが 30 ~ 40 歳代にピークがある。

近年、RA 医療は 2 つの変革の時代を迎えている。治療に関しては生物学的製剤や新規抗リウマチ薬が登場し、従来の薬物治療で打つ手の無かった難治性 RA 患者に対してもかなり良好な結果をもたらすことが明らかとなった<sup>1,2)</sup>。さらに、現在開発されている薬剤を加えることによって「治癒」がもたらされ

るといった夢物語が夢物語ではなくなる日がくるとの予測も現実味を帯びてきた。しかし、一方においてこれらの新規薬物は高価であり、経済的余裕のない患者では投与できない問題や長期投与患者での悪性腫瘍発生や感染症発生などの副作用に関する問題は未解決である。もう 1 つの変革としては、診断に関してであり、早期診断の重要性が認識されてきたことである。関節破壊をもたらす骨びらんはいくつり進行すると考えられてきたが、発症後 2 年以内に急速に進行することが明らかにされ<sup>3)</sup> 早期からの有効な抗リウマチ薬 (disease modified anti-rheumatic drug : DMARD) を投与することによって、その後関節破壊進行が抑制され、関節変形を防ぐことが明らかとなった<sup>4)</sup>。このような早期診断・早期治療の重要性を反映するかのように颯爽と登場してきたのが「抗 CCP 抗体」である。

## I. 抗 CCP 抗体登場までの歴史

抗 CCP 抗体の CCP とは cyclic citrullinated peptide の略であり、本邦では環状シトルリン化ペプチドと訳されている。その歴史は比較的早く、1964 年にオランダの Nienhuis らによって RA に特異性の高い血清因子 antiperinuclear factor (APF : 抗核周囲因子) として発見された<sup>5)</sup>。ヒト頬粘膜上皮細胞を用いる間接蛍光抗体法によって核周囲に存在するケラトヒアリン顆粒を検出する (図 1) ののであるが、手技が煩雑であり、ヒト口腔粘膜から採取された粘膜上皮細胞の良し悪しに左右されるので再現性に問題があり広く普及するに至らなかった。一方、1979 年 Young らはラットの食道凍結切片を基材とした



図1 間接蛍光抗体法によるAPF陽性ヒト頬粘膜上皮細胞

間接蛍光抗体法によってRA患者血清に特異性の高い自己抗体の存在を報告した<sup>6)</sup>。食道上皮細胞の角化層が特異的に染色されることから含有量の多いケラチンに対する抗体と考えられ、抗ケラチン抗体 (antikeratin antibody : AKA) と命名された。APF および AKA は RA に対する高い特異性を示す自己抗体であるため一部の研究者を中心に注目されていたが、手技の煩雑さなどから RA の診療においてリウマトイド因子 (rheumatoid factor : RF) の存在を脅かすものとはならなかった。

APF および AKA に対する真の対応抗原は長い間不明であったが、1990年代に突入するとにわかに研究の進展がもたらされた。上皮細胞の中間径線維を形成するケラチンはフィラメント (微細線維) から成り立っているが、1991年 Hoet らはケラチンフィラメントを凝集させる蛋白 (filament-aggregating protein : filaggrin) に対する単クローン抗体はヒト粘膜上皮細胞を用いた間接蛍光抗体法にて APF と同じ染色パターンを示すことから、APF の対応抗原は filaggrin であろうと推測した<sup>7)</sup>。1995年 Sebbag らは APF および AKA の対応抗原はともに filaggrin 分子上に存在することを証明し<sup>8)</sup>、両抗体を抗 filaggrin 抗体と呼称するよう提唱した。filaggrin は上皮細胞分化の後期にリン酸化前駆蛋白である約 400kDa の pro-filaggrin として産生され、ケラトヒアリン顆粒中に蓄積される。pro-filaggrin は 10 ~ 12 個の filaggrin が 7 つのアミノ酸からなる linker peptide によって分けられた縦配列構造を示すが、分化の進行とともに脱リン酸化および linker peptide の

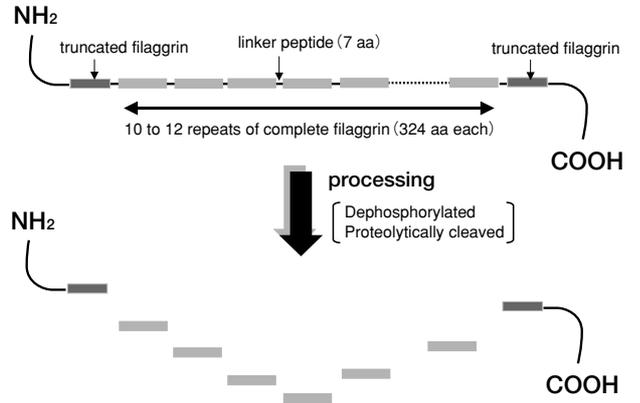
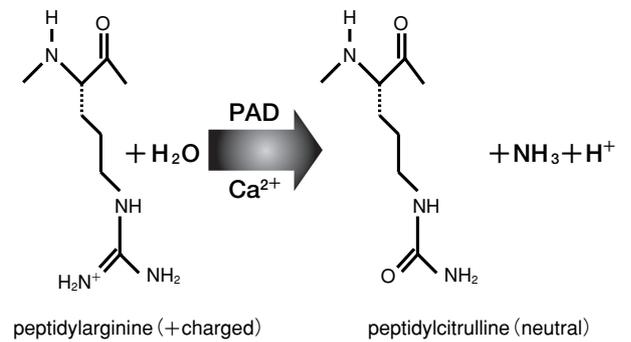


図2 プロフィラグリンからフィラグリンへの進展



\*PAD : peptidylarginine deiminase

図3 PADによるシトルリン化 (脱イミン化)

プロテアーゼによる分解が起こり、filaggrin となる (図2)。重要なこととして、この過程において filaggrin 分子のアルギニンの一部が酵素 (peptidyl arginine deiminase : PAD) とカルシウムによって脱イミノ化を受けシトルリンに変換される<sup>9)</sup> (図3)。

1998年 Schellekens らはヒト filaggrin の cDNA を基に 10 アミノ酸程度の合成ペプチドを作製し、抗 filaggrin 抗体陽性 RA 血清との反応性を検討したところアルギニンをシトルリン化したペプチドのみに RA と反応がみられ、その他の疾患患者血清とは反応しないことを報告した<sup>10)</sup> が、RA 血清の陽性率は 20 ~ 48% であり、RF よりも劣っていた。そこで、彼らはこの合成ペプチドの両端をシステインとし共有結合により環状化したところ、RF 陽性 RA の陽性率が最も良好な環状ペプチドを用いた場合 68% へと上昇する一方で非 RA 血清での反応は僅か 2% であったと報告した<sup>11)</sup>。この時のペプチドによる抗 CCP 抗体測定 ELISA キット (第1世代) が市販され、RA 患者と非 RA 患者を対象とした追試がなされた

が、感度は早期 RA において 40～50%と決して満足のいくものとはならなかった<sup>12, 13)</sup>。

## II. 新たな抗 CCP 抗体測定キットの登場とその臨床的意義

やや低い感度を是正すべく環状化ペプチドが新たに試作され、さまざまな組み合わせ（カクテル化）を検討した結果、新たな測定キットが登場した（第2世代）。第2世代測定キット（抗 CCP2 抗体測定 ELISA キット）は欧米の3つのメーカー（Diastat anti-CCP ; Axis-Schield, Immunoscan RA Mark 2 ; Euro-Diagnostica, Quanta Lite CCP IgG ; Inova）によって作製されたものを用いてほとんどの臨床研究が行われたが、その高い特異度は第1世代抗体キットで得られた結果と大差なく、感度は64～88%と改良されている<sup>14)</sup>。

### 1. 診断

抗 CCP2 抗体は RA 以外の関節炎疾患での陽性率が10%未満であり、感度の改善も図られたことから RA の診断に有用とされる<sup>15～17)</sup>。このように感度の上昇が図られたにもかかわらず高い特異度が維持されたことによりその陽性尤度比は5以上を示し、極めて有用な RA 検査と思われる。RA では抗 CCP2 抗体と RF は同時に陽性であることが多いが、RF 陰性である RA の3割程度に抗 CCP 抗体が陽性であるとされ、seronegative RA の臨床研究にも有用と考えられている<sup>18)</sup>。

これまで述べてきたように、RA 医療の最重要課題は如何に早く、正確に RA と診断できるかである。特に発症3カ月以内の超早期 RA に DMARD を投与すると関節破壊の阻止効果が高いとされ<sup>19)</sup>、超早期診断の重要性が認識され始めてきている。そこで抗 CCP2 抗体に期待が高まったが、発症2年以内の早期 RA での感度は70%程度で RF と変わりなく良好であるが、超早期例での抗 CCP2 抗体の感度はそれ程高くなくやや期待はずれであった。実際、発症後平均3カ月未満の超早期 RA の各種血中自己抗体陽性率を検討した自験例（16例）での抗 CCP2 抗体陽性率は36.8%であり、感度は不十分であった<sup>20)</sup>。Nellらも発症3カ月未満の超早期 RA 102例の自己抗体を検討し、抗 CCP2 抗体の感度は41%であった

としている<sup>21)</sup>。このように超早期 RA での感度は十分でないことより、さらなる感度上昇を目指した第3.1世代（Quanta Lite CCP-3.1 IgG/IgA : Inova）が登場する予定である。今後、本キットによる超早期例の陽性率向上が図られることを期待したい。

### 2. 関節破壊予測因子としての役割

RA の関節破壊進行およびその重症度は個々の患者毎に異なっているが、極めて速やかに関節破壊が進行するハイリスク患者には免疫抑制薬や生物学的製剤などの強力治療の早期開始が必要であると考えられている。しかし、初診時にどのような特徴をもった患者がハイリスクであるのか十分に解明されていない。このような背景から関節破壊予測因子に関する研究が盛んに行われている。これまでに①初診時にすでに関節破壊を認める、②初診時の多発関節炎（疼痛・腫脹）が強い、③炎症マーカー（CRP、ESR）高値、④HLA-DR4のshared epitope陽性例、⑤RF陽性例、⑥血清MMP-3高値などが因子として報告されている。これらの因子に加えて抗 CCP 抗体陽性 RA は陰性 RA に比し関節破壊が強いとの報告が相次いでおり注目されている<sup>22～24)</sup>。また、抗 CCP 抗体の力価が高いほど骨破壊進行が強いとする報告もみられる<sup>25)</sup>。

### 3. 治療反応マーカー

抗 CCP 抗体の生物学的製剤を含めた抗リウマチ薬の治療反応性のモニタリングに関しての検討がなされているが、生物学的製剤投与後に抗 CCP 抗体価が低下したとする報告<sup>26, 27)</sup>と低下しないとする報告<sup>28, 29)</sup>があり一定した見解は得られていない。

## III. シトルリン化蛋白は RA の病因とどの様に係わっているのか？

シトルリン化フィラグリンは関節内には存在しないため、関節内の抗シトルリン化蛋白抗体の対応抗原の検索が進められてきた。現在までにフィブリン（フィブリノゲン）<sup>30)</sup>、ビメンチン<sup>31)</sup>、コラーゲン<sup>32, 33)</sup>、 $\alpha$ -エノラーゼ、真核生物翻訳開始因子4G1 (eIF4G1)<sup>34)</sup>、フィブロネクチン<sup>35)</sup>、アンチトロンビンⅢ<sup>36)</sup>などが報告されている。しかし、蛋白のシトルリン化は RA のみに認められるものではなく RA

特異的ではないが、抗シトルリン化蛋白抗体産生はRAに特異的である。何故この抗体産生がRAで生じるのか極めて興味深い、今のところ明確な答えは出ていない。また、病因との係わりに関しても未だ明確にはなっていない。しかし、RA特異的な抗シトルリン化蛋白抗体産生はRAの病因と密接に係わっていると推測されるのでその解明は極めて重要である。

### おわりに

長らく待ち望んでいたが、2007年4月1日から抗CCP抗体精密測定が保険点数210点として保険収載された。ELISA法による抗CCP2抗体測定として認可されたのであるが、測定にあたっていくつかの注意点が列記されている。測定の目的はRAの診断に限定され、関節破壊の予後予測や治療薬の反応性のモニタリングには許されていない。しかし、上記のごとく抗CCP抗体は関節破壊と密接に関係し、さらにRFと抗CCP抗体は互いに独立したRAの自己抗体であるので<sup>29)</sup>、診断のみの限定は本検査がもつ本来の能力を引き出すことにはならないのではないだろうか。

### 文 献

- 1) Olsen NJ, Stein M : New drugs for rheumatoid arthritis. *New Engl J Med.* **350** : 2167-2179, 2004.
- 2) 亀田秀人 : 関節リウマチ治療における生物学的製剤の役割. 日内会誌. **94** : 2084-2091, 2005.
- 3) Fuchs HA, Kaye JJ, Callahan LF, *et al* : Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first 2 years of disease. *J Rheumatol.* **16** : 585-591, 1989.
- 4) Breedveld FC, Kalden JR : Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **63** : 627-633, 2004.
- 5) Nienhuis R, Mandema E : A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis.* **23** : 302-305, 1964.
- 6) Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, *et al* : Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J.* **2** : 97-99, 1979.
- 7) Hoet RM, Boerbooms AMT, Arends M, *et al* : Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis : colocalisation of the perinuclear factor and proflaggrin. *Ann Rheum Dis.* **50** : 611-618, 1991.
- 8) Sebbag M, Simon M, Vincent C, *et al* : The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* **95** : 2672-2679, 1995.
- 9) Harding CR, Scott IR : Histidine-rich proteins (filaggrins) : Structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *J Mol Biol.* **170** : 651-673, 1983.
- 10) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, *et al* : Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* **101** : 273-281, 1998.
- 11) Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, *et al* : The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* **43** : 155-163, 2000.
- 12) Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, *et al* : Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* **47** : 1089-1093, 2001.
- 13) Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, *et al* : Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res.* **2** : 236-243, 2000.
- 14) Dubucquoi S, Solau-Gervais E, Lefranc D, *et al* : Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* **63** : 415-419, 2004.
- 15) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, *et al* : High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* **32** : 197-204, 2003.
- 16) Lee DM, Schur PH : Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* **62** : 870-874, 2003.
- 17) Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M, *et al* : Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **63** : 1079-1084, 2004.
- 18) Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenberg D, *et al* : Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis.* **64** : 1199-1204, 2005.
- 19) Nell VP, Machold KP, Eberl G, *et al* : Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* **43** : 906-914, 2004.
- 20) Ota T, Shono E, Ikeda K : Investigation of useful autoantibodies for detecting very early rheumatoid arthritis (VERA) and for discriminating VERA from non-RA. *Mod Rheumatol.* **16 (Suppl)** : 134-135, 2006.
- 21) Nell VP, Machold KP, Stamm TA, *et al* : Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **64** : 1731-1736, 2005.
- 22) Meyer O, Labarre C, Dougados M, *et al* : Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis.* **62** : 120-126, 2003.
- 23) Kroot EJ, de Jong BAW, van Leeuwen MA, *et al* : The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide anti-

- body in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43** : 1831-1835, 2000.
- 24) Berglin E, Johansson T, Sundin U, *et al* : Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Ann Rheum Dis.* **65** : 453-8, 2006.
  - 25) Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, *et al* : High anti-CCP levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis.* doi : 10.1136/ard.2006.068247, May 2007
  - 26) Alessandri C, Bombardieri M, Papa N, *et al* : Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann Rheum Dis.* **63** : 1218-1221, 2004.
  - 27) Chen HA, Lin KC, Chen CH, *et al* : The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **65** : 35-39, 2006
  - 28) Caramaschi P, Biasi D, Tonolli E, *et al* : Antibodies against cyclic citrullinated peptides in patients affected by rheumatoid arthritis before and after infliximab treatment. *Rheumatol Int.* **26** : 58-62, 2005.
  - 29) De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, *et al* : Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **64** : 299-302, 2005.
  - 30) Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, *et al* : The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol.* **166** : 4177-4184, 2001.
  - 31) Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, *et al* : Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* **6** : R142-R150, 2004.
  - 32) Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, *et al* : Anti-citrullinated collagen type-I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* **333** : 418-426, 2005.
  - 33) Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, *et al* : Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* **35** : 1643-1652, 2005.
  - 34) Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, *et al* : Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* **341** : 94-100, 2006.
  - 35) Chang X, Yamada R, Suzuki A, *et al* : Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* **44** : 1374-1382, 2005.
  - 36) Chang X, Yamada R, Sawada T, *et al* : The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **44** : 293-298, 2005.