

國立臺灣大學臨床醫學研究所

博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

doctoral dissertation

抗瓜氨酸化胜肽抗體在類風濕性關節炎

免疫病理致病機轉上所扮演的角色

Study on the Molecular Basis of
Anti-Citrullinated Peptide Antibodies in the
Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis

研究生： 呂明錡

Ming-Chi Lu

臨床指導教授： 余家利 博士

Chia-Li Yu, M.D., Ph. D.

基礎指導教授： 蔡嘉哲 博士

Gregory J Tsay, M.D., Ph. D.

中華民國 九十九 年 六 月

June 2010

口試委員審定書

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

抗瓜氨酸化胜肽抗體在類風濕性關節炎免疫病理致病機轉上所扮演的角色

Study on the Molecular Basis of Anti-Citrullinated Peptide Antibodies in the Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis

本論文係呂明錡君（學號 Q93421008）在國立臺灣大學臨床醫學研究所完成之博士學位論文，於民國九十九年五月二十八日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

余義利

（簽名）

（指導教授）

賴振宏

蔡嘉哲

蔡昌祐

孫光榮

柯偉勳

鄭文昇

高嘉宏

（簽名）

系主任、所長

誌謝

進入風濕免疫科已經有七年，感謝余教授多年來的指導，讓我熟悉臨床上如何治療為風濕病所困擾的患者，進一步在余教授的啟發下，從事有關風濕病的研究，最佩服老師對於學生實驗結果嚴格的要求，論文仔細的修改及凡事都以學生的研究為重，在實驗上遭到困難時，可以一一跟我討論，並克服重重困難。感謝蔡嘉哲教授，蔡長祐教授，孫光蕙教授，賴振宏教授，楊偉勛教授及鄭文芳教授，不辭辛苦在論文指導委員會給予學生的指導。

感謝在台大醫院受到謝松洲醫師、政翰、克仁及劉大哥等人的指導，讓我逐步熟悉實驗的步驟及精神。到大林慈濟醫院之後，感謝賴副院長的大力支持及風濕免疫實驗室的劉姐及龔大哥的幫助，研究上的經費，人力，設備等等問題得以一一克服。而科內的光永，建學，寶寶，美綺，靜尼等科內同事的幫忙，讓我得以專注於研究。而實驗中有關一些蛋白質純化的問題則要感謝中正大學的黃憲斌教授的協助。而小游在實驗操作中，扮演不可或缺的角色。

謝謝父母及岳父岳母常替我照顧小孩，為我們張羅食糧、整頓環境，讓我得以花心思完成研究論文，謝謝老婆幫我修改論文的中英文，並讓我無後顧之憂，還要謝謝上天賜予的兩個可愛男孩，孩子們純真的笑顏是我讀書、工作與生活的最大動力。

中文摘要及關鍵詞

關鍵詞: 類風濕性關節炎，抗瓜氨酸化胜肽抗體，抗腫瘤壞死因子，單核性白血球，葡萄糖調節蛋白質 78。

類風濕性關節炎是免疫風濕科領域相當重要的疾病，主要以慢性對稱性多關節炎為其表現，約佔總人口的1%。關節持續的發炎腫脹，常常會造成患者關節變型，甚至導致患者的死亡率上升。雖然之前已經有相當多的研究來探討其致病機轉，但是對於真正引起關節慢性發炎的分子機轉仍然不清楚。近年來，抗瓜氨酸化胜肽抗體(anti-citrullinated peptide antibodies; ACPAs)的發現為新的里程碑。它可以非常專一的出現在類風濕性關節炎的血清中，尤其是在疾病表徵尚未產生之前就已經出現了。而且患者血清中抗瓜氨酸化胜肽抗體的效價和其疾病活動性密切相關。直到目前學界的研究結論認為，抗瓜氨酸化胜肽抗體在類風濕關節炎的致病機轉中，扮演重要的角色。然而確切的分子機轉仍然沒有合理的解釋。在本研究中分為臨床及基礎研究兩部分，首先在臨床方面，我們比較抗瓜氨酸化胜肽抗體，類風濕因子及抗無乳酸免疫球蛋白抗體在台灣臨床上鑑別診斷類風濕性關節炎及其相仿者的優劣。在基礎方面，我們假設單核白血球細胞表面上有自體抗原可以被抗瓜氨酸化胜肽抗體所認識。而抗瓜氨酸化胜肽抗體可以藉由結合這些細胞表面分子直接引起發炎反應。

在實驗方法上，首先收集類風濕性關節炎，原發性修格連氏症，慢性 B 型肝炎，慢性 C 型肝炎及健康志願者的血清，以濁度分析法偵測類風濕因子，以酵素免疫分析法偵測無乳酸免疫球蛋白抗體和抗瓜氨酸化胜肽抗體，並比較其在鑑別診斷類風濕性關節炎及其相仿者的敏感度及特異度。之後取 ACPAs(+)類風濕性關節炎患者的血清利用親合性管柱結合環狀瓜氨酸化胜肽，純化出抗瓜氨酸化胜肽抗體。接著和健康人的單核性白血球或細胞株 U937 一起培養。以酵素免

疫分析法偵測 TNF- α 的釋放及轉錄因子 NF- κ B 的活化。再來以 ACPAs 當偵測抗體，利用西方點墨法找出作用的自體抗原，最後取出並送蛋白質鑑定。

在臨床上的研究結果顯示，在抗瓜氨酸化胜肽抗體、類風濕因子及抗無乳酸免疫球蛋白抗體之中，抗瓜氨酸化胜肽抗體對於鑑別診斷類風濕性關節炎及其相仿者的敏感度及特異度最高。在基礎研究方面，以親合性管柱純化出的抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞共同培養，可以促進 TNF- α 的釋放及轉錄因子 NF- κ B 的活化。相對的，以去除掉抗瓜氨酸化胜肽抗體的類風濕關節炎患者血清，則無此作用。我們分離出 U937 細胞膜上的蛋白質，以抗瓜氨酸化胜肽抗體為第一抗體，用西方點墨法發現抗瓜氨酸化胜肽抗體可以和膜上的蛋白質結合，最後以蛋白質體學的方法，證實 glucose-regulated protein of 78 kDa (GRP78) 為其對應抗原。我們並發現，以基因合成的 GRP78 並不會跟抗瓜氨酸化胜肽抗體結合，但是從 U937 細胞所分離出來的膜蛋白，再以免疫沉澱法純化的 GRP78 則可以，乃因 U937 細胞膜上 GRP78 的有瓜氨酸化的現象，而基因合成的 GRP78 則沒有。將基因合成的 GRP78 給予瓜氨酸化後，可以和抗瓜氨酸化胜肽抗體結合，並且抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體引起的 U937 細胞 TNF- α 釋放。最後我們驗證，健康人血液中的單核性白血球上有 GRP78 的表現，而且抗瓜氨酸化胜肽抗體也可以促進其 TNF- α 釋放。

本研究的結論是，抗瓜氨酸化胜肽抗體不單只是一個相當有用的類風濕性關節炎診斷上的血清學指標，其更可以藉由直接結合在細胞膜上瓜氨酸化的 GRP78，促進單核性白血球轉錄因子 NF- κ B 的活化及 TNF- α 的釋放，引起發炎反應。我們的實驗證實了 ACPAs 直接參與了類風濕性關節炎的免疫病理機轉。

英文摘要及關鍵詞

Keywords: rheumatoid arthritis, anti-citrullinated peptide antibodies, tumor necrosis factor- α , monocytes, glucose-regulated protein 78

Rheumatoid arthritis (RA) is an important disease in rheumatology and its prevalence rate is around 1%. It is characterized by chronic symmetric polyarticular synovitis. Persistent joint swelling and inflammation not only caused the deformity of joints but also increased the mortality in RA patients. Although there were many studies investigating the pathogenesis of RA, the definite molecular mechanism of chronic synovitis remained to be elucidated. In recent years, the discovery of anti-citrullinated peptide antibodies (ACPAs) was a milestone in RA. Currently ACPAs was the most specific marker autoantibody in RA patients correlating with its disease activity. In addition, the most unique nature of ACPAs is that the autoantibody may appear even before the onset of arthritis. It is conceivable that ACPAs were involved in the pathogenesis of RA; however the definite molecular pathogenesis has not been elucidated. My thesis contains both clinical and basic dimension about ACPAs in the pathogenesis of RA. In clinical setting, we evaluated the usefulness of anti-agalactosyl IgG antibodies [anti-Gal(0) IgG], rheumatoid factors (RF) and ACPAs in the differential diagnosis of different rheumatic disorders mimicking RA. In basic research, we hypothesized that ACPAs may directly bind to cell surface citrullinated proteins to stimulate mononuclear cells to elicit inflammatory reaction.

ACPAs were purified from pooled ACPAs (+) RA sera by cyclic citrullinated peptide (CCP)-conjugated affinity column. After co-culture of U937 cells with ACPAs,

the tumor necrosis factor (TNF)- α production and nuclear factor (NF)- κ B DNA binding activity of the cells were measured by ELISA. The cognate antigen(s) of ACPAs on the U937 cell surface was probed by ACPAs, and the reactive bands were identified by proteomic analysis.

In clinical setting, ACPAs was the most specific and sensitive biomarker for diagnosis of RA from its mimic. In basic research, ACPAs specifically enhanced TNF- α production and increased DNA binding activity of NF- κ B in U937 cells. In contrast, ACPA-depleted RA sera failed to activate U937 cells. Proteomic analysis revealed that glucose-regulated protein 78 (GRP78, 72 kDa) was one of the cognate antigens for ACPAs. GST-tagged recombinant GRP78 could not recognize by ACPAs due to lack of citrullination. In addition, we found that GRP78 was citrullinated on U937 cell surface that rendered its binding activity with ACPAs. The citrullinated GRP78 inhibited ACPA-induced TNF- α production by U937. ACPAs also bound to human monocytes to promote TNF- α production.

In conclusion, the presence of ACPAs was a very useful biomarker for diagnosis of RA. Furthermore, we clearly demonstrated that ACPAs enhanced the NF- κ B activity and TNF- α production in monocytes/macrophages via binding to surface-expressed citrullinated GRP78 that involved in rheumatoid pathogenesis.

目 錄

口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	v
博士論文內容	
第一章 緒論	1
第一節 類風濕性關節炎	3
第二節 現有類風濕性關節炎的致病機轉	6
第三節 T細胞在類風濕關節炎所扮演的角色	7
第四節 Cytokine Network 在類風濕關節炎所扮演的角色	9
第五節 B細胞及自體抗體在類風濕關節炎所扮演的角色	11
第六節 抗瓜氨酸化胜肽抗體	13
第七節 胜肽化精氨酸去氨酶	14
第八節 抗瓜氨酸化胜肽抗體之於類風濕性關節炎	18
第九節 葡萄糖調節蛋白質 78 之於類風濕性關節炎	24
第十節 研究的假說及特定目的	26
第二章 研究方法與材料	27
第三章 結果	
第一部份 抗瓜氨酸化胜肽抗體專一的存在類風濕性關節炎血清中	40
第二部分 抗瓜氨酸化胜肽抗體促進人類單核球產生發炎反應	41
第三部分 尋找抗瓜氨酸化胜肽抗體促進發炎反應的作用分子	43
第四部分 GRP78是抗瓜氨酸化胜肽抗體產生發炎反應的關鍵分子	46

第四章 討論

第一部分 抗瓜氨酸化胜肽抗體專一的存在類風濕性關節炎血清中	50
第二部分 抗瓜氨酸化胜肽抗體促進人類單核球產生發炎反應	51
第三部分 尋找抗瓜氨酸化胜肽抗體促進發炎反應的作用分子	58
第四部分 GRP78是抗瓜氨酸化胜肽抗體產生發炎反應的關鍵分子	64

第五章 展望

第一節 類風濕性關節炎目前治療的困境	73
第二節 本研究對於類風濕性關節炎臨床診斷及治療的影響	75
第三節 本研究對類風濕性關節炎基礎研究的影響.....	77
第四節 未來的研究規劃	81
第五節 結論	83
第六章 論文英文簡述	84
第七章 參考文獻	108



圖目錄

圖一	ACPAs 專一的存在類風濕性關節炎患者血清中.....	134
圖二	ACPAs 依劑量促進正常周邊單核性白血球分泌 TNF- α	135
圖三	ACPAs 促進正常周邊單核性白血球 TNF- α 分泌的時序性.....	136
圖四	ACPAs 促進正常周邊單核性白血球的 NF- κ B 活性.....	137
圖五	ACPAs 可以結合在周邊單核性白血球的的細胞膜上.....	138
圖六	正常周邊單核性白血球可分為淋巴球及單核球.....	139
圖七	ACPAs 可以結合在單核球細胞膜上.....	140
圖八	ACPAs 可以結合在淋巴球細胞膜上.....	141
圖九	ACPAs 可以結合在 U937 細胞的細胞膜上.....	142
圖十	ACPAs 依劑量促進 U937 細胞的 TNF- α 分泌.....	143
圖十一	APCAs 專一性的促進 U937 細胞 TNF- α 分泌.....	144
圖十二	ACPAs 促進 U937 細胞的 NF- κ B 活性.....	145
圖十三	以 Western blot 方法找到 ACPAs 作用在 U937 細胞膜上的蛋白質..	146
圖十四	ACPAs 阻斷 anti-GRP78 Abs 和 U937 細胞的表面結合.....	147
圖十五	Anti-GRP 78 Abs 輕微阻斷 ACPAs 和 U937 細胞的表面結合.....	148
圖十六	合成的GRP78不會阻斷ACPAs和U937細胞的表面結合.....	149
圖十七	瓜氨酸化的GRP78輕微阻斷ACPAs和U937細胞表面的結合.....	150
圖十八	APCAs 無法和合成的 GRP78 做結合.....	151
圖十九	ACPAs 和從 U937 細胞膜以免疫沉澱法所得的 GRP78 做結合.....	152
圖二十	U937 細胞膜上的 GRP78 有瓜氨酸化而合成的 GRP78 則無.....	153
圖二十一	ACPAs 可以與瓜氨酸化GRP78作用.....	154
圖二十二	Anti-GRP78 結合在從 U937 細胞表面所得的瓜氨酸化蛋白質.....	155
圖二十三	瓜氨酸化 GRP78 抑制 ACPAs 所造成的 U937 細胞 TNF- α 釋放.....	156
圖二十四	MAPK pathway 的抑制劑抑制 ACPAs 所引起 TNF- α 釋放.....	157
圖二十五	ACPAs 促進 ERK-1/2 的磷酸化.....	158
圖二十六	ACPAs 促進發炎反應的示意圖.....	159

一 緒論 (Introduction)

類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)是一種自體免疫性疾病，以慢性對稱性多關節炎為主要的表現，約佔總人口的 1%，關節持續的發炎腫脹，常常會造成患者關節變型，然而類風濕性關節炎也可以侵犯到關節外的組織，最後可以導致患者死亡率的上升(Lee et al., 2001)。因此類風濕性關節炎在臺灣的健保局列入重大傷病的範圍，更是免疫風濕科醫師門診治療的主要族群。

關於類風濕性關節炎致病機轉，雖然過去有許多研究及學說，仍然有許多不明瞭的地方。依據 Firestein 的整理(Firestein, 2003)，最早的理論從二十世紀中發現類風濕因子開始，有八成類風濕性關節炎患者的血清中有此因子存在。類風濕因子主要是針對免疫球蛋白的 Fc 部分所產生的抗體，會引起免疫複合體(Immune complex)的形成，造成發炎反應。然而類風濕因子的專一性低，在其他免疫疾病，感染，腫瘤甚至於健康的老年人均可以測出，而免疫複合體在許多其他疾病均有角色(Dorner et al., 2004)。之後學者發現類風濕性關節炎的患者與特定的 HLA-DR 基因有相關(Karr et al., 1980)，因此其對應的 T 細胞，也成了類風濕性關節炎的研究重點。近年來生物醫學的進步，發現關節腔內有許多發炎性的細胞激素，尤其是由巨噬細胞所分泌的 TNF- α ，IL-1 及 IL-6。而據此研究基礎所設計出來的選擇性抑制 TNF- α 生物製劑，在治療類風濕關節炎方面，取得了劃時代的突破(Weinblatt ME, 1999)。然而 TNF- α 不僅在類風濕性關節炎致病機轉上扮演重要的角色，在乾癆及乾癆性關節炎或僵直性脊椎炎也同樣有其關鍵性的地位，因而被認為是負責執行破壞的最終共同途徑(common final pathway)，另一方面，細胞激素如何能持續地產生也是目前無法回答的問題。最近抗瓜氨酸化胜肽抗體(ACPAs)的發現(Schellekens et al., 1998; Girbal-Neuhauser et al., 1999)，其非常專

一的出現在類風濕性關節炎的血清中，而且在疾病尚未產生之前就以經出現了。在臨床上發現，類風濕性關節炎患者若血清中帶有抗瓜氨酸化胜肽抗體其關節發炎及破壞的程度比沒有帶有此抗體的患者更為嚴重，但是若給予有效的藥物治療，如抗 TNF- α 的藥物，可以降低血清中抗瓜氨酸化胜肽抗體的效價(Niewold et al., 2007)。因此學者們也推測抗瓜氨酸化胜肽抗體在類風濕關節炎的致病機轉中，應該扮演重要的角色(Klareskog et al., 2008)，另外 B 細胞標靶治療(anti-CD20 antibody)也可以成功的治療類風濕關節炎的事實(Edwards et al., 2004)，更進一步說明，自體抗體應該在類風濕性關節炎的致病機轉中扮演著重要的角色。

抗瓜氨酸化胜肽抗體如何造成類風濕性關節炎，目前的研究主要都放在蛋白質瓜氨酸化會造成蛋白質免疫耐受性消失(break immune tolerance) (Lundberg et al., 2005)，然而有些研究顯示抗瓜氨酸化胜肽抗體可以造成單核白血球(monocytes)的TNF- α 釋放(Clavel et al., 2008)，因此可能尚有其他的致病機轉存在。事實上，在醫學上不乏有例子，如在重症肌無力的患者中，其血液中就存在有對抗acetylcholine receptor的自體抗體，可以直接的造成疾病的表現。因此我們首先進行臨床的研究，抗瓜氨酸化胜肽抗體是否在台灣診斷類風濕性關節炎及其相仿者是否仍然保有高專一性。接著在探討其分子機轉上，我們假設單核白血球細胞表面上有自體抗原可以被抗瓜氨酸化抗體所認識，而抗瓜氨酸化胜肽抗體可以藉由這些細胞表面的分子，直接引起發炎反應。我們也希望藉由更清楚的了解抗瓜氨酸化胜肽抗體如何參與類風濕性關節炎的疾病病程，進而找到關鍵的分子機轉，以後針對這個特定的分子機轉來設計治療的方式，以改善類風濕關節炎患者的預後。關於更進一步的文獻回顧及假說形成的過程，以下會分節一一作詳細的說明。

第一節 類風濕性關節炎

類風濕性關節炎是一種自體免疫疾病，以慢性對稱性多關節炎為主要的表現。類風濕性關節炎約佔總人口的 1%，患者以女性居多，患者的女男比約為 2.5/1，類風濕性關節炎在任何年齡均可發病，但是大多數的患者發病年齡約於 40-70 歲之間，而且盛行率隨著年齡增加而增加(Lee et al., 2001)。在臨床上，患者會有關節腫脹及疼痛的情形，類風濕性關節炎好發的關節為可動的小關節，集中在手腕部及足部有時候會合併倦怠感及微燒，隨著疾病的進展，全身的關節均有可能會發生發炎的變化。關節炎一開始會造成關節腫脹，疼痛及關節活動度減少，因此在疾病早期就會因為關節的發炎反應及疼痛造成患者功能上的障礙，甚至於影響日常生活。在關節炎的後期，關節和關節四周的構造，逐漸被慢性增生性發炎組織所破壞，而以肉芽組織(pannus)更替。被牽涉到的構造組織，長期關節內部的破壞，和肌腱縮短，肌肉不平衡，會引起關節變形。目前類風濕性關節炎的診斷乃依據美國風濕病學院 1987 年所訂的標準(Arnett et al., 1988):1. 每天至少一個小時以上的晨僵持續超過六星期以上; 2. 超過三個關節區以上的關節腫脹持續六個星期以上; 3. 至少六個星期以上的掌指關節、近端指間關節及腕關節腫脹; 4. 對稱性的關節腫脹至少六個星期以上; 5. 手部的 X 光檢查有骨關節的蛀蝕，即可確認的疏鬆去鈣化等典型的類風濕性關節炎的變化; 6. 皮下的類風濕結節 (rheumatoid nodules); 7. 類風濕因子的存在(rheumatoid factors)。以上的症狀有四點符合，就可以確定診斷是類風濕關節炎。

類風濕性關節炎的發生跟遺傳基因有關，早期的雙胞胎的研究顯示，同卵雙胞胎約有 12-15%的同時罹病率，高於異卵雙胞胎的 4%，因此遺傳肯定扮演一定的角色，更進一步的分析顯示，有高達 60%的類風濕性關節炎患者所以會得病，

跟遺傳因子有關。接下來以基因指標來尋找類風濕性關節炎的易感受基因 (susceptibility genes)，首先是在 MHC class II 基因群中找到 DRB1*0401 及*0404 兩個區域，而且帶有這些基因的類風濕性關節炎患者預後較差，也容易有類風濕因子，類風濕結節及關節破壞的情況(Wordsworth et al., 1989; Ronningen et al., 1990)。現在生物技術的進步，許多大規模全基因譜的研究進行，也找到許多新的基因如 STAT4, TRAF1/C5 等等，有待以後進一步探討其在致病機轉上所扮演的角色(Barton et al., 2008)。而在病理學上，發炎的滑液膜是類風濕性關節炎的中心變化。在組織切片下，正常人的關節中，滑液膜是一層疏鬆的結締組織，並且沒有甚麼細胞在裡面；在類風濕性關節炎的患者中，則有明顯的血管新生 (angiogenesis)，細胞增生，發炎白血球的浸潤及蛋白質表現的變化，包括細胞表面黏著分子(cell-surface adhesion molecules), 蛋白酶(proteinases), 蛋白酶抑制劑 (proteinase inhibitors)及許多不同的細胞激素(cytokines)。滑液膜浸潤的細胞包括 CD4 陽性 T 淋巴球、B 淋巴球、巨噬細胞(macrophage)等。這些浸潤在滑液膜有時甚至形成特殊的淋巴結構並且含有孕育中心(germinal centers)。滑液膜內層增生後，造成似巨噬細胞的滑液膜細胞(macrophage-like synoviocytes)及似纖維母細胞的滑液膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes)在關節局部分泌分解性酵素 (degradative enzymes)如金屬蛋白酶(metalloproteinases)，絲氨酸蛋白酶(serine proteases)及 aggrecanases 等來破壞細胞外基質因而導致關節的破壞(Firestein, 2003)。

有關類風濕性關節炎的治療也隨著對疾病致病機轉的了解而出現重大的改變，傳統上是以病程修飾抗風濕藥物(disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs)，包括 methotrexate, hydroxychloroquine, sulfasalazine, cyclosporine 及 leflunomide。然而有不少病患其關節炎在使用上述的藥物治療後，仍然無法得到

適當的控制。近年來，對於類風濕性關節炎致病機轉的了解，已經有許多生物製劑(biological agents)上市，有效且專一的阻斷造成關節發炎的重要蛋白質，可以有效的治療這些傳統治療失敗的病患。首先最早上市的生物製劑為抗腫瘤壞死因子藥物(anti-TNF agents)，包括 etanercept(TNF type II receptor fused to IgG1)，infliximab(a chimeric mouse/human monoclonal antibody to TNF)，adalimumab (fully humanized antibody to TNF)三種藥物，在之前合併數種 DMARDs 治療失敗的患者，給予抗腫瘤壞死因子藥物可以非常顯著的改善其關節炎，對於剛診斷的患者，也是相當有效，當然也可以大幅度的減緩關節破壞的速度。這些抗腫瘤壞死因子藥物沒有太多的副作用，但是要注意結核菌的再活化(reactivation)(Scott et al., 2006)。大約同時期及之後許多針對類風濕性關節炎發炎反應的重要分子途徑所設計出來的生物製劑也相繼上市，如針對 IL-1 的 Anakinra (IL-1 receptor antagonist)，抑制 T 細胞活化的 abatacept (a fusion protein consisting CTLA-4 and the Fc portion of IgG1)，針對 IL-6 的 Tocilizumab (humanized monoclonal antibody against human interleukin-6 receptor)及去除 B 細胞的 Rituximab (a chimera antibody directed to CD20 that deplete mature B cells) (Finckh et al., 2008)。藉由這些新的專一性高，效果好的生物製劑，大多數類風濕性關節炎的患者病情，在今日均可適當的受到控制。

第二節 現有類風濕性關節炎的致病機轉

關於類風濕性關節炎致病機轉，最早的理論從二十世紀中開始，1939年Kurt Meyer發現類風濕因子，之後在Waller及Rose等學者發現類風濕因子存在於類風濕性關節炎的血清中。然而類風濕因子在其他免疫病，感染，腫瘤甚至於健康的老年人均可以測出，而免疫複合體也在許多疾病均有角色，因此類風濕因子無法專一性的解釋類風濕性關節炎的發生(Dorner et al., 2004)。在1976年，Stastny利用混合淋巴球反應發現類風濕性關節炎的患者有相似的基因(Stastny, 1976)，最後被找到是特定的HLA-DR的基因(Karr et al., 1980)，之後雖然有很多有關類風濕性關節炎的基因被發現，但是其他的基因對類風濕性關節炎的重要性，均比不上HLA-DR (Oliver et al., 2006)。之後T細胞成為類風濕性關節炎的研究重點(Stastny, 1987)。自1980年以降，發現關節腔內的細胞激素，主要是由巨噬細胞所分泌的TNF- α ，IL-1及IL-6為主(Feldmann et al., 1996)。據此研究基礎所設計出來的選擇性抑制TNF- α 及IL-1的生物製劑，在治療類風濕性關節炎方面，取得了劃時代的突破(Olsen et al., 2004)。然而TNF- α 及IL-1被認為是最後負責執行破壞的”最終共同途徑”common final pathway。最近抗瓜氨酸化胾肽抗體也常常被提到在類風濕性關節炎的致病機轉扮演重要的角色(Klareskog et al., 2008)。近來研究顯示B細胞標靶治療(anti-CD20 antibody)也可以成功的治療類風濕性關節炎(Emery et al., 2006)，明白的指出B細胞及自體抗體實質上參與類風濕性關節炎的致病機轉，所以B細胞及自體抗體的研究又重新回到類風濕性關節炎致病機轉研究的主軸上，事實上，從古至今有關類風濕性關節炎可能致病機轉的假說相當多，抽煙，性別或老化都是可能的原因之一(Weyand et al., 2006)。以下我們以T cells，B cells及cytokine network這三大類風濕性關節炎致病機轉研究為主軸，作詳細的討論。

第三節 T細胞在類風濕性關節炎所扮演的角色

類風濕性關節炎固然是個多基因疾病，但是不可否認的數個 MHC 基因包括 (DRB*0401, DRB*0404, DRB*0101, DRB*1402) 又稱 share epitopes，佔有最主要的角色。而之前的研究顯示這些 share epitopes 可能藉由 1. 容易結合 arthritogenic peptides 而呈現給 T 細胞來反應，2. 改變 T 細胞反應，使針對自體抗原的 T 細胞株可以逃脫監督長期存活下來，3. 藉由本身特殊的結構，特別活化造成關節炎的 T 細胞株，4. 本身就是自體抗原，藉由病原菌 (*Escherichia coli* Dna J or Epstein-Barr virus) 蛋白質的 molecular mimicry (分子類似性) 誘導產生自體免疫反應，5. 合併鄰近的其他類風濕性關節炎基因一起作用，6. 對於 arthritogenic pathogen 無法有效清除，使其造成關節炎 (Walser-Kuntz et al., 1995; Gebe et al., 2001; Zanelli et al., 2000; Roudier et al., 1989)。近來抗瓜氨酸化胜肽抗體是類風濕性關節炎專一性相當高的血清學指標，而蛋白質瓜氨酸化 (protein citrullination) 被懷疑是造成免疫容忍 (immune tolerance) 失靈的重要原因。最近的研究顯示出類風濕性關節炎關連的 HLA-DR molecules 比較起其他非關連的 HLA-DR molecules，在和瓜氨酸化蛋白質片段結合後，容易引起 T 細胞增生 (Auger et al., 2005)。而 ACPAs 也只出現在類風濕性關節炎患者帶有 RA 相關連的 associated HLA-DR molecules，因此對於 RA 關連的 associated HLA-DR molecules 何以會引起類風濕關節炎，提供了重要的說明 (Huizinga et al., 2005)。

T 細胞反應傳統上分為 Th1 或 Th2，主要是依據其分泌的細胞激素，尤其是 INF- γ 或 IL-4。雖然在類風濕性關節炎的滑液膜中兩者的表現量並不是特別高，但是 INF- γ 還是比 IL-4 多，因此類風濕性關節炎傳統上仍然被認為是 Th1 疾病 (Skapenko et al., 2005)。但是，近十年來 T 細胞又多了其他族群，其中之一是 Th17，顧名思義就是製造 IL-17 的 T 細胞。IL-17 可以強烈的促進發炎反應，最

早是 Fossiez 等學者發現在類風濕關節炎的 synovial fibroblasts 加入 IL-17 可以促進其表現 IL-6, IL-8, prostaglandin E2 和 granulocyte colony stimulation factor (Fossiez et al., 1996)。之後的研究也發現在類風濕性關節炎的關節液及滑液膜中 T cells 聚集的區域，IL-17 的表現增加(Lubberts et al., 2005; Stamp et al., 2004)，在患者的血清及 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)培養液，IL-17 的表現量也比對照組為高(Kim et al., 2005; Cho et al., 2004)，在動物的關節炎模式中，如果把 IL-17 或其 receptor 去除的話，其關節炎的發生率或嚴重度都可以大幅的下降(Nakae et al., 2003)。因此 Th17 及 IL-17 在類風濕性關節炎的關節液及血清均有增加，可以引發 inflammatory cytokines，並且與細胞本身一起作用造成關節的發炎。

另一方面，調節性 T 細胞也是近年來新增加的 T 細胞族群，其表現高量的 CD25，另外還表現 cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)，programmed cell death-1 (PD-1)及 glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor superfamily member 18(GITR18)，並且部分是以 IL-10 及 TGF- β 來達到免疫抑制的目的，而 FOXP3 是其特殊的轉錄因子(transcription factor)。在類風濕性關節炎患者的關節液及周邊血球均可找到調節性 T 細胞，然而調節性 T 細胞雖然可以有效的抑制 effector T cells 的增生，但是卻不能抑制 CD4+ T cells 或 monocytes 的 TNF- α 及 INF- γ 的製造，可能是因為調節性 T 細胞表現 TNF receptor 2 而 TNF- α 經過此途徑可以抑制 FOXP3 的表現來抑制調節性 T 細胞的功能。類風濕性關節炎患者在給予 Anti-TNF- α 的治療後，其調節性 T 細胞的 FOXP3 表現增加並且伴隨著功能的恢復(Cao et al., 2004; Valencia et al., 2006; Ehrenstein et al., 2004)。

第四節 Cytokine Network 在類風濕性關節炎所扮演的角色

自 1980 年代末期，因為分子生物學的進步，有辦法測量類風濕性關節炎患者關節液及滑液膜內的細胞激素，因此開啟了這個領域。原本預期會以 T 細胞所分泌的細胞激素為主，如 IL-2 及 INF- γ ，但出乎意料之外的，這些 T 細胞所分泌的細胞激素的量相當低(Smeets et al., 1998)，反而是巨噬細胞及纖維母細胞所分泌的居多，包括 IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- α , granulocyte-macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF)及許多 chemokines(Firestein et al., 1990)，這些都是相當重要促進發炎反應的細胞激素，然而還是有些是拮抗發炎反應的細胞激素如 transforming growth factor- β 及 IL-1 ra(Feldmann et al., 1996)，不過其相對的量不足以阻斷發炎反應。

到 1990 年整個 Cytokine Network 在類風濕關節炎所扮演的角色才明朗，主要是滑液膜內 Fibroblast-like synoviocyte 及 Macrophage-like synoviocytes 藉由分泌促發炎反應的細胞激素來維持關節持續的發炎反應，造成周遭的細胞分泌其他的細胞激素，metalloproteinase 及一些小分子的發炎反應媒介物如 prostaglandins 和一氧化氮(NO)。附近血管內皮細胞上也會表現 adhesion molecules，因此有表現正確的 chemokine receptor 及 adhesion molecule receptors 的發炎細胞就會被引導到關節內，加入發炎的反應(Firestein, 2003)。而細胞激素不光只是參與發炎反應，有部分的細胞激素如 RANK/RANKL 甚至於可以造成類風濕性關節炎的骨頭侵蝕，而 Osteoprotegerin 可以藉由阻斷 RANKL 來抑制類風濕性關節炎的骨頭侵蝕。在眾多的細胞激素中，最重要起頭的是 TNF- α 。TNF- α 是在 1975 年從內毒素誘發的 methylcholanthrene-induced sarcoma 壞死的老鼠血清中分離出來 (Carswell et al., 1975)，很快的學者就發現 TNF- α 可以造成休克及多重性器官衰竭。之後在類風濕性關節炎患者的關節液測到 TNF- α 及其他促發炎的細胞激素。

特別的是，TNF- α 在 Cytokine Network 中扮演了主控者的角色，如果阻斷了 TNF- α ，其他促發炎的細胞激素的產生會大幅度的減少，之後陸續的研究指出 TNF- α 在類風濕性關節炎的病理機轉上扮演相當大的角色，包括 proinflammatory cytokines release, PGE2 production, osteoclast activation, chondrocyte activation, angiogenesis, leukocyte accumulation, endothelial cell activation 及 chemokine release (Brennan et al., 2008)。更重要的是，自 1992 年，針對 TNF- α 所設計的阻斷性的生物製劑，在治療類風濕性關節炎的疾病上取得重大的成功，接受了 anti-TNF therapy 的患者其關節炎得到大幅的改善，對於剛診斷的患者，anti-TNF therapy 也是相當有效，當然也可以大幅度的減緩關節破壞的速度。因此也有許多生物製劑針對不同的細胞激素來做阻斷，可以有效的治療類風濕性關節炎。目前已經上市的有針對 IL-1 的 Anakinra 及針對 IL-6 的 Tocilizumab，都可以有效的治療類風濕性關節炎，因此確認了 Cytokine Network 在類風濕性關節炎所扮演的角色。

然而 Cytokine Network 雖然可以成功的說明類風濕性關節炎發炎反應的骨牌反應，但是是甚麼因素起始的，缺乏有力的說明，而類似的 Cytokine Network 在其他的發炎反應均可觀察到。也因此，一般認為 Cytokine Network 主要是扮演著自體免疫反應啟動後，造成發炎反應的角色，甚至於是放大其嚴重度的關鍵機轉。總而言之，仍然需要進一步找到類風濕性關節炎病人何以會產生自體免疫反應，才能解開其致病機轉的全貌。

第五節 B 細胞及自體抗體在類風濕性關節炎所扮演的角色

雖然前面提到相當多重要的類風濕性關節炎致病機轉，但是最早在 20 世紀中，類風濕性關節炎被視為 immune hyper-reactivity，而首先被提出的證據是類風濕因子(Rheumatoid factor)，由此可以看得出 B 細胞及自體抗體在類風濕性關節炎致病機轉上的悠久歷史。類風濕因子是 Waaler 在 1939 年發現，之後 Rose 在 1948 年也觀察到此現象，主要是其可以凝集覆蓋有兔子血清的羊紅血球。之後 Kunkel 的研究找出這個現象是肇因於一種抗體，其可以和 Immunoglobulin 的 Fc portion 做結合(Franklin et al., 1957)。而類風濕因子在約 80%的類風濕性關節炎血清中均可偵測得到，而且血清中有類風濕因子者，其關節炎較嚴重，骨頭侵蝕也更厲害，因此類風濕性關節炎很快就被認定是含有 self-reactive antibodies 的自體免疫疾病。類風濕因子可以和其他自體抗體啟動 immune complex，而 immune complex 形成後可以釋放出 C5a，C5a 是 chemotactic factor 可以吸引發炎細胞到關節內，造成關節的發炎反應及破壞(Zvaifler, 1973)。在類風濕性關節炎患者的關節中可以發現其軟骨附著了 immune complex，而在關節液中的補體也是下降的，代表補體是在關節腔內消耗的(Ruddy et al., 1975; Neumann et al., 2002)。然而類風濕因子學說最大的弱點在於類風濕因子不只是在類風濕性關節炎患者的血清中出現，許多自體免疫疾病如乾燥症，紅斑性狼瘡，或是慢性感染，如 HBV 及 HCV 帶原，甚至於正常上了年紀的人都可能出現，而 immune complex 的變化在許多自體免疫疾病都可發現，因此有一段時間 B 細胞及自體抗體，並不是類風濕性關節炎致病機轉的研究重點。然而近年來，學者在類風濕性關節炎患者的血清中，陸續發現了許多自體抗體包括 ACPAs, anti-type II collage antibodies, anti-RA33, antibodies to calpastatin 及 antibodies to stress proteins，而其中又以 ACPAs，對於類風濕性關節炎的專一性高，在疾病發病前即出現，最受到大家的

重視。另外，在關節的滑液膜有 B 細胞聚集特殊淋巴結構並且含有孕育中心 (germinal centers)，B 細胞也可以分泌促發炎反應的細胞激素。最重要的莫過於去除 B 細胞的生物製劑-Rituximab 已經被證實可以有效治療類風濕關節炎，並且成為常規的治療之一。因此 B 細胞及自體抗體在類風濕關節炎的致病機轉的研究，又成為熱門的焦點(Bugatti et al., 2007; Mewar et al., 2006)。



第六節 抗瓜氨酸化胜肽抗體

在1964年，Nienhuis等學者發現類風濕性關節炎患者的血清中有自體抗體，可以對抗人類的口腔細胞細胞核邊緣的顆粒，這個自體抗體就命名為Anti-perinuclear factor (APF)，約有48%的類風濕性關節炎患者血清可以測到APF，而在健康的對照組幾乎測不到(1%)，可見其專一性相當高(Nienhuis et al., 1964)。而在十五年後，Young等學者在1979年，找到類風濕性關節炎患者的血清會對抗角質化的老鼠食道上皮組織，這時又稱Anti-keratin antibodies (AKA)，也是專一的在類風濕性關節炎患者血清中出現(Young et al., 1979)。一開始這些發現並未獲得很大的重視，直到約二十年後，兩群歐洲的科學家分別發現APF和AKA的抗原，其實是以瓜氨酸做轉錄後修飾(post-translational modification)的filaggrin，而且有瓜氨酸修飾的才可以被類風濕性關節炎患者血清的抗體作用(Schellekens et al., 1998; Girbal-Neuhauser et al., 1999)。其後的研究顯示除了經瓜氨酸修飾後的filaggrin，經瓜氨酸修飾後的vimentin及fibrin也是類風濕性關節炎的重要抗原。瓜氨酸是非轉譯(noncoding)的天然氨基酸，它是精氨酸去氨後的產物。這個步驟就由胜肽化精氨酸去氨酶 (Peptidylarginine deiminase, PAD)所催化。瓜氨酸化被觀察到在細胞分化(differentiation)，發炎反應(inflammation)，細胞凋亡(apoptosis)，基因表現(gene regulation)及老化(aging)上扮演著某種角色，瓜氨酸化會造成蛋白質結構的改變，可能會造成免疫屏障的消失(breakdowns in immunologic tolerance)(Yamada, 2005)。之後Dr. Schellekens合成及修飾cyclic citrullinated peptide (CCP)，成為偵測ACPAs ELISA kit的抗原，並且顯示出ACPAs對於類風濕性關節炎的診斷上的特異度相當高(Schellekens et al., 2000)。後來的學者又針對系統性的含有瓜氨酸胜肽和類風濕性關節炎患者的血清作用，找出專一度及敏感度高的組合，目前偵測ACPAs的ELISA kit已經有第三代的產生。

第七節 胜肽化精氨酸去氨酶

瓜氨酸(citrulline)是非轉譯(noncoding)的天然氨基酸，它是精氨酸去氨後的產物。這個步驟就由胜肽化精氨酸去氨酶 (Peptidylarginine deiminase, PAD)所催化。自1939年時，就已經知道蛋白質內有瓜氨酸的存在(Fearon, 1939)，而之後的氨基酸定序的研究也可以偵測到瓜氨酸的存在(Rogers, 1962)，因為並沒有citrulline tRNA存在，因此學者推斷應該是在蛋白質合成之後才經過post-translational modification而來的，之後在1977年找到第一個PAD(Rogers et al., 1977)，現在已知有五種PAD (PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 and PAD6)，所有的酵素都有鈣離子結合基，並且需要高濃度的鈣離子才能執行其酵素的機能，並且並不能把游離的Arginine轉變成Citrulline。這五種PAD對於要瓜氨酸化的蛋白質並無特別的選擇性，而差別在於不同的組織表現不同的PAD。因此加總在一起，不同的組織表現不同的PAD，加上細胞內subcellular localization，局部鈣離子的濃度及標的蛋白質的特性，被瓜氨酸化的Arginine前後兩個氨基酸序列等條件，決定了何種蛋白質要被瓜氨酸化(Vossenaar et al., 2003; Stensland et al., 2009)。

PAD1 主要表現在上皮組織及子宮，PAD2 主要表現在腦部，子宮，唾液腺，巨噬細胞，脾臟，骨髓，皮膚，滑液膜及關節液，PAD3 主要表現在頭髮毛囊，PAD4 主要表現在嗜伊紅性血球，多型核白血球，顆粒性白血球，骨髓，滑液膜及關節液，PAD6 主要表現在卵巢及胚胎早期。因此人體免疫系統中，主要表現的胜肽化精氨酸去氨酶是 PAD2 及 PAD4(Vossenaar et al., 2004a)。兩者也可以在類風濕性關節炎的滑液膜中偵測到(Chang et al., 2005)。PAD2 在很多組織中均有表現，包括肌肉，腺體，腦部及脾臟等器官，而在巨噬細胞(macrophage)中，使用鈣離子通透劑(Ca ionophore)，造成細胞內鈣離子濃度上升，可以引起細胞本身的凋亡(apoptosis)及細胞骨架瓜氨酸化，而細胞骨架瓜氨酸化會造成細胞的崩解

(collapse)。PAD4 主要分布在白血球，也是唯一會在細胞核出現的胜肽化精氨酸去氨酶。PAD4 可以造成組蛋白的精氨酸去氨反應(deimination)調控基因的表現 (Mastronardi et al., 2006; Wang et al., 2004)，主要是對抗組蛋白的甲基化反應 (methylation)。

其中最重要的發現是在大規模的基因linkage disequilibrium研究上顯示，PAD4的基因型又可細分為兩種，其中有一型會增加類風濕性關節炎的罹病機會，另一型則否。若帶有兩個RA-susceptible haplotypes的PAD4基因，比起都沒有的人，增加了1.97倍得到類風濕性關節炎的機會(Suzuki et al., 2003)。之後許多獨立的研究指出，不同的PAD4基因型增加類風濕性關節炎的機會，這樣的相關性確定存在於亞洲人，但是歐美人士則否。而為何會如此，主要是因為RA-susceptible haplotypes的PAD4基因，在基因表現過程(transcription)中比較穩定，因此可以製造出較多的PAD4(Suzuki et al., 2007)。過度表現PAD4在Jurkat T cells會引發p53基因的表現，引發p21及Bax的活化，而p21藉由抑制CDK2造成cell cycle停止，Bax則會抑制Bcl-2的功能，使得粒腺體的membrane potential喪失，導致其細胞凋亡(Liu et al., 2006)。而RA-susceptible haplotypes的PAD4基因，其表現的PAD4的活性較正常酵素高，也比正常的PAD4基因容易造成細胞的凋亡，從而解釋PAD參與類風濕性關節炎的致病機轉(Hung et al., 2007)。

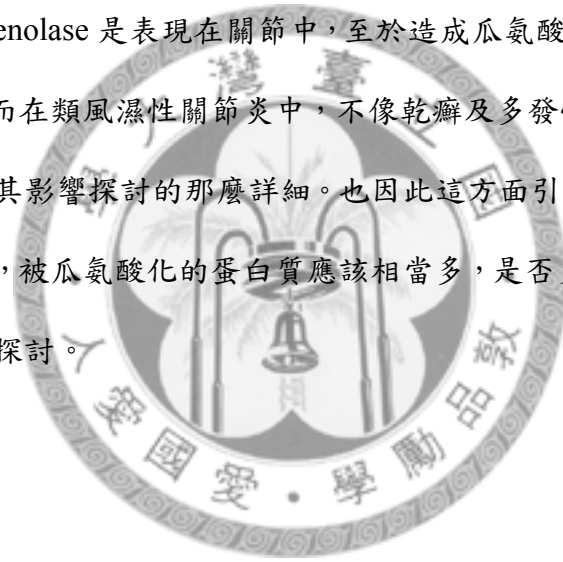
PAD 及蛋白質瓜氨酸化在數種人類疾病上扮演重要的角色，主要的例子有乾癬(psoriasis)，類風濕性關節炎及多發性硬化症(multiple sclerosis)。乾癬是一個慢性的皮膚病，主要的臨床特色是皮膚發炎其中覆蓋著以死掉的皮膚細胞為主的銀白色脫屑。主要的病理變化是 keratinocytes 快速增生，一般其從皮膚的 basal layer 到表面需要一個月以時間，而在乾癬的患者，這個過程只要四天，因此皮膚沒有辦法在短時間內代謝掉這麼多死亡的細胞，就會形成壟起的斑塊。在正常

的情形 keratinocytes 內的 keratin K1 會被 PAD1 所瓜氨酸化，使得 keratin 的分子變得更緊密，完成皮膚最後的分化過程。然而在乾癬的皮膚病灶中，keratin 並未被瓜氨酸化。雖然不曉得是乾癬皮膚中快速增生的 keratinocytes 造成 keratin 來不及被瓜氨酸化，或是因為 PAD1 失去功能才造成皮膚 keratinocytes 的快速增生。但是乾癬皮膚中 keratin 瓜氨酸化的異常是相當確定的事實(Mechin et al., 2007)。

多發性硬化症是中樞神經系統慢性發炎性疾病，主要的特色是神經髓鞘(myelin sheath)被破壞。病理上的變化是在大腦的白質中有許多界線分明的去髓鞘區。髓鞘主要是由單一層細胞包覆神經的軸突，在大腦是 oligodendrocytes，在週邊神經是 Schwann cells，可以提供絕緣的效果，以利神經的電氣訊號的傳導。而神經的去髓鞘，會造成神經訊號的消失，實際上就會造成患者的症狀，比如說失明，感覺麻木，肌肉緊縮或是無法行走。組成神經髓鞘的細胞是以 multilayer 的結構圍繞著軸突，主要的成份為 lipid-protein complexes 比率約為 3:1。在蛋白質方面，兩個主要的成員 myelin basic protein (MBP)和 lipophilin 佔了 85%。而其中 MBP 帶有正電性，和帶負電的磷脂質，如 Phosphatidylserine 可以形成很好結合力。正常成年人的 MBP，約有 18%在六個(全部 19 個)精胺酸處有瓜氨酸化的情形(MBP-cit6: R25, R31, R122, R130, R159, R169)，剩下的 MBP 均無瓜氨酸化的現象。而多發性硬化症的患者，MBP-cit6 所佔的比例則高達 45%。而 MBP-cit6 因為部分的精胺酸被瓜氨酸化，所以帶的正電荷數目減少，因此跟磷脂質的結合力下降。MBP 的瓜氨酸化不只是影響其和脂肪組成複合體的能力，還可以造成 MBP 的蛋白質結構解開(unfold)，使得其容易被 Cathepsin D 所分解。事實上 MBP-cit6 比起未瓜氨酸化的 MBP 來說，被 Cathepsin D 所分解的速度快了四倍。在一些罕見多發性硬化症的個案(Marburg type)，其病情來的快速且猛烈，科學家發現，這些患者的 MBP 有高達 80%均高度瓜氨酸化

(MBP-cit18)。高度瓜氨酸化的 MBP 幾乎不會和脂肪組成複合體，也比未瓜氨酸化的 MBP 被 Cathepsin D 所分解的速度快了四十五倍。在動物實驗中也顯示，myelin-associated PAD2，在發病前，其蛋白質量有增加，而近年來，針對抑制 PAD2 功能所給予的藥物，可以減緩多發性硬化症的病情及使得已經破壞的軸突髓鞘再度生長回來(Harauz et al., 2007)。

在類風濕性關節炎中，最重要的是有 ACPAs 的出現，這些自體抗體對於診斷類風濕性關節炎敏感度約 80%，但是特異度高達 99%，類風濕性關節炎的關節中，也有被瓜氨酸化的蛋白質存在，然而現在已知的 ACPAs 抗原中，只有少數的蛋白質，如 α -enolase 是表現在關節中，至於造成瓜氨酸化的酵素是以 PAD2 及 PAD4 為主。然而在類風濕性關節炎中，不像乾癬及多發性硬化症，對於被瓜氨酸化的蛋白質及其影響探討的那麼詳細。也因此這方面引起我們的興趣，而且據前面學者的研究，被瓜氨酸化的蛋白質應該相當多，是否免疫細胞本身也是個可能的對象，值得探討。



第八節 抗瓜氨酸化胜肽抗體之於類風濕性關節炎

抗瓜氨酸化胜肽抗體對類風濕性關節炎的診斷有相當重要的貢獻。不論在各種不同的試劑，不同的標準值，不同的對照組或不同的類風濕性關節炎罹病時間或嚴重度其專一性均相當高，綜合來說，傳統的第一代的ACPA1 assay對於類風濕性關節炎的診斷，其敏感度在44-56%，特異度在90-97%。而第二代的ACPA2 assay於類風濕性關節炎的診斷，其敏感度提高到64-89%，特異度維持在88-99%，明顯優於傳統的類風濕因子(其敏感度尚有59-79%，但是特異度只有80-84%)，雖然有許多人是兩種檢查均呈陽性但是也有不少人是只有一種檢查呈陽性。因此在抗瓜氨酸化胜肽抗體對類風濕性關節炎的診斷提供了相當大的幫助(Niewold et al., 2007)。然而更重要的是對於發作時間小於六個月的早期關節炎中，有部分的患者因時間不夠或是影響關節數目不夠多，而無法作確切診斷，隨著時間的進展，約1-2年後診斷才會明朗，若患者血清抗瓜氨酸化胜肽抗體呈陽性反應，其有39-50%的機會會轉變為類風濕性關節炎，而其特異度約93-98%(van Gaalen et al., 2004a)，而類風濕因子陽性的患者，則有31-54%的機會會轉變為類風濕性關節炎，但特異度只有91-93%。當然合併抗瓜氨酸化胜肽抗體及類風濕因子，可以增加早期類風濕性關節炎的診斷率。

最近有學者提出，把抗瓜氨酸化胜肽抗體納入診斷類風濕性關節炎的診斷標準，去除原本比較少見的類風濕性結節及晚期的X光變化，形成CCP6新的類風濕性關節炎的診斷標準，比照已經用了20年以上美國風濕病學會1987年所訂的標準，CCP6的診斷標準在一般的情況下，其敏感度可以從傳統的51%大幅增加到74%，然而特異度稍微從91%下降到81%，在關節炎發生小於六個月的早期關節炎患者，CCP6的診斷標準其敏感度可以從傳統的25%大幅增加到63%，然而特異度稍微從86%下降到72%，然而是否能取代以前的診斷標準，仍需進一步討論。

從很久以來，風濕科醫師希望可以從健康人，已抽血篩檢的方式找出罹患類風濕性關節炎的高危險群，希望可以因此增加臨床醫師的警覺，並希望能早期診斷，早期治療。許多研究指出，抗瓜氨酸化胜肽抗體在類風濕性關節炎發病前就已經存在患者的血液中。學者收集類風濕性關節炎患者罹病前的血清(從之前捐血的血庫檢體)，研究中顯示在類風濕性關節炎發病前，有40.5%的患者抗瓜氨酸化胜肽抗體已經出現在血清中了，而類風濕因子只有27.8%，平均而言，抗瓜氨酸化胜肽抗體的在得病前4.8年就已經存在了，一般而言，若血液中抗瓜氨酸化胜肽抗體成陽性的人，有5.3%的機會在五年內會得到類風濕性關節炎，然而在一等親有罹患類風濕性關節炎的高危險群，抗瓜氨酸化胜肽抗體呈陽性的人，有高達69.4%的機會在五年內會得到類風濕性關節炎(Nielen et al., 2004)。抗瓜氨酸化胜肽抗體很可能成為未來篩檢類風濕性關節炎的血清指標。

類風濕性關節炎的患者，臨床上的預後差異很大，如何在預後不好的病人給予積極的治療，相反的，在預後好的病人避免過多的藥物，是臨床醫師的一大挑戰。研究指出抗瓜氨酸化胜肽抗體和類風濕性關節炎的疾病活動度有明顯相關，患者抗瓜氨酸化胜肽抗體成陽性的，其發炎的關節數，發炎指標(ESR, CRP)，醫師的整體評估及疾病總指標(DAS28)均比較嚴重(Kastbom et al., 2004)。而在為期十年的類風濕性關節炎病人長期追蹤的研究中，定期追蹤其X光，判讀X光的醫師並不曉得其臨床病情的情況下，學者發現血清中抗瓜氨酸化胜肽抗體陽性的患者，其關節的破壞會比較嚴重(Syversen et al., 2008)。因此我們可以確定，抗瓜氨酸化胜肽抗體和類風濕性關節炎的疾病活動度及臨床預後密切相關。更重要的是，給予有效的治療後(主要是指抗腫瘤壞死因子的藥物) 抗瓜氨酸化胜肽抗體的效價會下降，雖然抗瓜氨酸化胜肽抗體並不會完全消失，且降幅不會太大，但是抗瓜氨酸化胜肽抗體效價下降的患者，臨床中進步比未下降者來得大，(Chen et

al., 2006)。從以上的臨床觀察，抗瓜氨酸化胜肽抗體不單純只是類風濕性關節炎的血清學指標，更可能是其致病機轉的關鍵。

其他免疫疾病也有少數患者其血清中有抗瓜氨酸化胜肽抗體，Atzeni等學者的研究就顯示，乾燥症的患者有9.9%(14/141)血清中有抗瓜氨酸化胜肽抗體，而這些抗瓜氨酸化胜肽抗體呈陽性的患者，都有類似類風濕性關節炎的表現，而不只是乾燥症常合併的關節不適(arthralgia)，由於部分乾燥症的患者事實上有可能轉變為類風濕性關節炎，因此這些患者被高度懷疑隨後會轉變為類風濕性關節炎(Atzeni et al., 2008)。另一方面，紅斑性狼瘡的患者也有8%(8/104)的患者血清中有抗瓜氨酸化胜肽抗體，而這些抗瓜氨酸化胜肽抗體呈陽性的患者也都有侵蝕的關節炎，臨床症狀上類似SLE+RA overlapping syndrome(Chan et al., 2008)。最後乾癱性關節炎也有6.9%(11/160)的患者血清中有抗瓜氨酸化胜肽抗體，而這些抗瓜氨酸化胜肽抗體呈陽性的患者有許多人都符合類風濕性關節炎的診斷(Alenius et al., 2006)。因此在非類風濕性關節炎的關節炎患者中，若血清中有抗瓜氨酸化胜肽抗體，臨床上也都有類似類風濕性關節炎的表現，可以再次說明抗瓜氨酸化胜肽抗體很可能是類風濕性關節炎致病機轉的關鍵。

Baeten等人在類風濕性關節炎的滑液膜找到有citrullinated protein的存在(Baeten et al., 2001)，不過citrullinated protein的存在並不只限制於類風濕性關節炎的滑液膜(Vossenaar et al., 2004b)，因此血清中的抗瓜氨酸化胜肽抗體才是類風濕性關節炎患者所特有的。在小鼠的實驗模式(collagen-induced arthritis)中也顯示瓜氨酸化會導致實驗動物體中正常蛋白質免疫耐受性消失(break down of immune tolerance)，因而造成免疫性關節炎(Lundberg et al., 2005)。另外的研究顯示抗瓜氨酸化胜肽抗體在小鼠產生關節炎之前就已經出現，若誘導小鼠對含瓜氨酸修飾後胜肽，產生免疫容忍(tolerance)，則關節炎的程度可以減緩，若給予抗瓜氨酸

化胜肽抗體，會增加關節炎的嚴重度(Kuhn et al., 2006)。另外，在日本的研究顯示負責把蛋白質轉化成citrullinated protein的酵素PAD4，不同的基因型會影響類風濕性關節炎的罹病機會(Suzuki et al., 2003)。

非常重要的一點是抗瓜氨酸化胜肽抗體和RA associated HLA-DR molecules的密切關連性，之前提到特定的MHC class II容易在類風濕性關節炎患者身上出現，又稱之為shared epitope，抗瓜氨酸化胜肽抗體呈陽性反應的類風濕性關節炎患者，這樣的關係變得更明顯，而在抗瓜氨酸化胜肽抗體呈陰性反應的類風濕性關節炎患者中，這種關係就不存在(Klareskog et al., 2006)。正常人無論是帶有抗瓜氨酸化胜肽抗體或shared epitope，其之後得類風濕性關節炎的機會都比較高，但是若兩者均帶有的話，會大幅度加成其odds ratio到66.8倍(Berglin et al., 2004)。不只如此，類風濕性關節炎患者中，同時帶有抗瓜氨酸化胜肽抗體及shared epitope，比起只帶有ACPA或shared epitope者其一者，關節破壞程度也加劇(van Gaalen et al., 2004b)。在老鼠中轉植入這些類風濕性關節炎患者所特有的shared epitope，可以發現這些shared epitope對於含有瓜氨酸修飾合成的胜肽結合親合度遠較只含精氨酸(未修飾)者來得高(Hill et al., 2003)。

在此基礎上Klareskog等學者的研究發現抽煙會增加類風濕性關節炎的發生，更進一步說明了基因和環境的交互作用。以往固然大家知道抽煙會增加類風濕性關節炎的發生，但是不知道其所以然。經由研究發現，類風濕性關節炎的患者中，抽煙只有在帶有shared epitope者，會增加抗瓜氨酸化胜肽抗體的陽性率(Klareskog et al., 2006)。用另外一個角度觀察，在有抗瓜氨酸化胜肽抗體及帶有shared epitope者的人，抽煙可以增加得類風濕性關節炎的機率，若無抗瓜氨酸化胜肽抗體及無shared epitope，則抽煙並不會增加得類風濕性關節炎的機率(Kallberg et al., 2007)。而其後的研究也顯示，長期抽煙的患者，其肺部的

bronchoalveolar lavage 可以找到 citrullinated proteins，在這些 bronchoalveolar lavage 內的細胞，其 PAD2 的表現量也增加 (Makrygiannakis et al., 2008)。

因此目前的學說是 citrullination and triggering of immunity to citrullinated proteins 先發生，抽煙固然是其中的原因，但是感染也是蛋白質瓜氨酸化的重要原因，比如說常見的 EBV 病毒，類風濕性關節炎的患者，對瓜氨酸化的病毒蛋白質 EBNA-1 有反應；或細菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染，這細菌是造成人類牙周病的原兇，帶有 PAD，可以局部造成蛋白質瓜氨酸化，事實上可能還有其他的環境因素可能會影響蛋白質瓜氨酸化。這些異常或過多的瓜氨酸化蛋白質，在帶有適當基因的患者，如 shared epitope 或 PTPN22，可以有效的把這些經過修飾的蛋白質表現給免疫系統，因此誘發免疫系統產生抗瓜氨酸化胜肽抗體。第二步驟是 development of unspecific arthritis and the possible further progression to RA，抗瓜氨酸化胜肽抗體產生後不一定會致病，在老鼠的模式中也顯示，在其血清中注射 anticitrullinated fibrinogen antibody 並不會導致未發病的老鼠發病，但是會導致有輕度關節炎的老鼠產生嚴重的關節炎。如何造成及開始產生關節炎，依據目前的研究，正常的關節並不會表現 citrullinated proteins，然而受傷，感染之後就可能產生了。而其實過去也有人提到，關節因受傷後，發生類風濕性關節炎的現象，因此需要“第二擊”才可以，當然還有其他的原因，比如說抗瓜氨酸化胜肽抗體所針對的抗原產生變化，可以針對一些產生關節炎的重要途徑起反應或是其他的自體抗體的產生，如 anti-ubiquitous protein glucose phosphate isomerase (GPI)。最後，就是 chronicity of joint inflammation and fulfillment of the diagnostic criteria for RA，這部分就為大家所熟知了，抗瓜氨酸化胜肽抗體及關節內的 citrullinated proteins 產生免疫反應，引起 antigen-presenting cells 的活化，吸引許多發炎細胞浸潤，而這些發炎細胞中，如單核球，也會活化產生 PAD，增加關節內的 citrullinated

proteins，及之前提到的許多細胞激素的分泌，形成cytokine network，滑液膜細胞增加，血管增生，表現細胞表面黏著分子，分泌分解性酵素等等，造成持續性的關節發炎及破壞，最終造成了的類風濕性關節炎(Klareskog et al., 2008)。



第九節 葡萄糖調節蛋白質78之於類風濕性關節炎

葡萄糖調節蛋白質 78(GRP78)是屬於 chaperon protein(護送蛋白質)，這群蛋白質平常時是在內質網內負責協助蛋白質組裝及防止其變性，GRP78 必需依靠和其他分子包括 co-chaperones，nucleotide exchange factors 及 signaling molecules 的交互作用來產生功能(Dudek et al., 2009)。GRP78 本身含有兩個功能基，首先是 substrate binding-domain，主要可以跟胜肽鍊(polypeptide)結合，另外有一個 nucleotide binding-domain，主要是調控 ATPase 的循環，和 ATP 結合的 GRP78，對於胜肽鍊的結合度低，和 ADP 結合的 GRP78 則對於胜肽鍊的結合度高(Jiang et al., 2005)。然而許多研究指出這些蛋白質在細胞遇到壓力或發炎反應時，會被釋放出來當作”危險訊號”。Chaperones 可以依其功能廣義的區分為促發炎群:主要代表性的成員為 HSP60 及 HSP70，是主要傳遞”危險訊號”的主角，而另外一組是為抗發炎群，有抗發炎的效果，包括 HSP27，HSP10 及 GRP78。GRP78 不只是表現在細胞的內質網中，在細胞膜上也有表現(Shin et al., 2003)，目前研究指出，可能 GRP78 是透過 murine tumor cell Dna J-like protein 1 (MTJ-1)而被運送到細胞膜上(Misra UK et al., 2005)。在前人的研究中發現類風濕性關節炎患者的血清存在對抗 GRP78 的自體抗體，而 GRP78 可以專一性的促進類風濕性關節炎患者關節內的 T 細胞增生，反之其他非類風濕性關節炎的發炎性關節炎則無此現象(Corrigall et al., 2001; Blass et al., 1995; Blass et al., 1997)。而 anti-GRP78 Abs 在更大規模的病人族群中也被證實存在類風濕性關節炎患者的血清中，其特異度達 71%而敏感度有 73%，若為早期類風濕性關節炎，其特異度有 65%，敏感度則為 66%，在早於類風濕性關節炎病發前 2.5 年的血清中就已經存在了，其特異度尚有 65%，而敏感度有 45%(Bodman-Smith et al., 2004)，給予有效的對抗類風濕性關節炎的治療後(腫瘤壞死因子阻斷劑)，患者血清中的 anti-GRP78 Abs 的效價會

下降，這些特性都和 ACPAs 類似(Mavropoulos et al., 2005)。GRP78 在類風濕性關節炎的滑液膜上也是大量表現，如果用 anti-HLA-DR antibodies 來阻斷可能的調節性 T cell 的作用，則會有更多的類風濕性關節炎患者血中的 T 細胞對 GRP78 有增生的反應(Blass et al., 2001)。

GRP78 可能的 signaling pathway，在攝護腺癌的研究中有清楚的說明(Misra et al., 2006)，以 alpha2-macroglobulin 當 ligand，透過結合在細胞膜上的 GRP78，活化 MAPK 及 Akt-dependent signaling，抑制 apoptotic signaling 及 啟動 unfolded protein response signaling，而這些訊息傳導和細胞生理的變化，事實上也和發炎反應及細胞激素的釋放息息相關。當然在免疫系統是否也是如此，則沒有研究。在基礎研究方面，老鼠的自體免疫關節炎(Collagen induced arthritis)模式中，從外界給予 GRP78 可以減輕關節炎的嚴重度，可能是藉由 IL-4 來抑制疾病的活動度(Brownlie et al., 2006)。至於在人類方面，GRP78 可以促進健康人的 PBMC 產生抗發炎的細胞激素，雖然一開始，GRP78 會促進健康人的 PBMC 產生 TNF- α ，然而接下來主要產生的是 IL-10 及 soluble TNF receptor II and IL-1 receptor antagonist。在加入 MAPK p38 的抑制劑 SB203580，可以抑制 GRP78 所造成的 PBMC TNF- α 及 IL-10 釋放，而 MAPK ERK-1/2 的抑制劑 PD98059 則無影響。而且單核球和 GRP78 一起培養後，其 CD86 及 HLA-DR 的表達會下降。最近，有學者以二維蛋白質電泳加上精密的質譜儀，以 HL-60 細胞株的蛋白質粹取物做受質，尋找類風濕性關節炎的可能的自體抗原，他們再次證實 GRP78 是其中重要的自體抗原之一(Goeb et al., 2009)。

第十節 研究的假說及特定目的

雖然之前已經有相當多研究探討類風濕性關節炎成因及致病機轉，但是對於如何誘導產生類風濕性關節炎仍然不清楚。近來抗瓜氨酸化胜肽抗體被認為在類風濕性關節炎的致病機轉中，扮演重要的角色。目前的學說主要是關於蛋白質瓜氨酸化，在適當的患者(如帶有 shared epitope)，可能誘導產生 ACPAs，在適當的情況下(比如非特異性的關節炎後)，導致類風濕關節炎的產生。

然而尚有可能其他的機轉一併存在，最近有研究指出，類風濕性關節炎患者其血清中 ACPAs 陽性的患者，血清中的促發炎激素(Proinflammatory cytokines)比如 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-13, IL-15 及 granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 比起無 ACPAs 者來得高(Hitchon et al., 2004; Hueber et al., 2007)。而含有 ACPAs+citrullinated fibrinogen 的免疫複合體可以藉由 Fc γ RIIa 來刺激巨噬細胞產生 TNF- α ，而從類風濕關節炎患者所得到的 ACPAs 可以藉由 classic 及 alternative pathways 來活化補體系統，產生發炎反應(Trouw et al., 2009)。

在本研究中，首先在臨床方面，我們比較抗瓜氨酸化胜肽抗體在台灣鑑別診斷臨床診斷類風濕性關節炎及其相仿者時，是否優於起其他的血清學指標，包括類風濕因子及抗無乳酸免疫球蛋白抗體。在基礎研究方面，我們假設單核白血球細胞表面上有瓜氨酸化的自體抗原可以被抗瓜氨酸化胜肽抗體所認識，而抗瓜氨酸化抗體可以藉由這些細胞表面的分子，直接引起發炎反應。我們預期先從類風濕關節炎患者的血清純化出 ACPAs，先測試其可否引起單核球(monocyte)及其對應的人類細胞株 U937 的發炎反應，進而找到關鍵的分子機轉，希望以後可以針對這個特定的分子機轉來設計治療的方式，以改善類風濕關節炎患者的預後。

二 研究方法與材料 (Material and Methods)

(一) 收集類風濕性關節炎，原發性乾燥症，慢性C型肝炎，慢性B型肝炎病人及健康人的血清

三十九位符合美國風濕病學院1987年所訂分類標準的類風濕性關節炎患者，四十九位符合American-European Consensus Group 分類標準的原發性乾燥症患者，二十一位慢性C型肝炎患者合併風濕症狀，十九位慢性B型肝炎患者合併風濕症狀，四十七位慢性C型肝炎帶有類風濕因子但無任何風濕症狀的患者，四十六位慢性B型肝炎無任何風濕症狀的患者及十九位健康人在說明後取得其同意加入本研究。受試者說明同意書及臨床試驗申請書經大林慈濟醫院及台大倫理委員會審查通過，在徵得病人的同意並簽署同意書後抽血10毫升，離心後取血清保存在-20°C冰箱。

(二) 測定患者血清中的抗無乳酸免疫球蛋白抗體

我們以糖基酵素免疫法(lectin enzyme immunoassay)來測定患者血清中的抗無乳酸免疫球蛋白抗體(anti-Gal(0) IgG)，我們用的試劑是Eitest CARF kit，是在日本東京的衛采公司(Eisai Co. Ltd, Tokyo, Japan)所贈與的。其測定方式如下，取九十六孔微量盤置入100微毫升濃度為5 μ g/ml的抗無乳酸免疫球蛋白抗體，於4°C靜置隔夜，以Tris-buffered saline (TBS, 0.01 M, pH7.4)洗滌三次後，用150微毫升的含有0.05%胎牛血清的TBS於4°C靜置隔夜，後以Tris-buffered saline洗滌三次，加入以標準稀釋液(0.25% BSA, 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% polyoxyethylene- octylphenyl ether, 0.02% *p*-hydroxybenzoic acid methyl, 0.5% 2-chloroacetamide, pH7.4)，稀釋201倍的血清100微毫升，於室溫下作用一小時後洗滌三次，再加入100微毫升的biotinylated *Ricinus communis* agglutinin 120 (RCA120)，於室溫下作用一小時後洗滌三次，再加入100微毫升的1:1000倍稀釋

的HRP-conjugated streptavidin，於室溫下作用一小時後，再加入100微毫升的呈色劑ABTS (2'-azino-3-ethyl-benz-thiazoline-6-sulphonic acid)，反應三十分鐘後，加入2 mM sodium azide終止反應，於波長405nm的吸光度測定各樣本中的anti-Gal(0) IgG濃度。

(三) 測定患者血清中的抗瓜氨酸化胜肽抗體及類風濕因子

因為抗瓜氨酸化胜肽抗體及類風濕因子都是醫院常規的檢驗項目，考量成本的關係，這部分的測定我們是請大林慈濟醫院的免疫功能室代為測量，其原理上以濁度分析法(試劑購自Date Behringer, Marburg, Germany)來偵測類風濕因子，以酵素免疫分析法(試劑購自Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden)測量抗瓜氨酸化胜肽抗體，均依照廠商建議的操作方式進行。

(四) 純化類風濕性關節炎病人血清中的抗瓜氨酸化胜肽抗體

收集三十位符合美國風濕病學院1987年所訂的分類標準的類風濕性關節炎的病人血清，並且血清中含有高濃度抗瓜氨酸化胜肽抗體(Pharmacia Diagnostics AB第二代偵測抗瓜氨酸化胜肽抗體大於340IU/ml)，將這些患者的血清混合起來用以製備ACPA (+) RA sera。我們使用親合性管柱(affinity column)的方式來分離抗瓜氨酸化胜肽抗體。環狀瓜氨酸化胜肽購買自Bionovas Biotechnology, Michigan USA，序列為HQCHQESTXGRSRGRCGRSGS(X為citrulline，C-C之間有共價鍵連接)，我們使用CNBr-activated sepharose 4B(購自Pharmacia Biotechnology Uppsala, Sweden)製備親和度管柱。首先，取之前混合好類風濕性關節炎患者含高濃度抗瓜氨酸化胜肽抗體的血清，以0.22μM的濾紙過濾並且以四倍的磷酸鹽緩衝液(phosphate-buffered saline PBS, pH 7.4)稀釋，之後製備CNBr-activated sepharose 4B管柱，先取0.3克CNBr-activated Sepharose 4B以70毫升的1mM HCL混合均勻後洗滌15分鐘後填充至管柱，體積為1毫升。配製coupling

buffer(0.1 M NaHCO₃ +0.5 M NaCl, pH 8.3), 取10毫升先沖洗管柱以平衡酸鹼值後, 取2毫升coupling buffer加入1mg合成的環狀瓜氨酸化胜肽加入管柱, 在4°C下充份混合約24小時, 之後用10毫升coupling buffer洗滌後, 用0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 Blocking兩小時, 之後以10毫升0.1 M acetate buffer, pH 4.0 containing 0.5 M NaCl 和10毫升的0.1 M Tris-HCl, pH 8 containing 0.5 M NaCl交替沖洗管柱三次。之後加入事先準備好含有高濃度的抗瓜氨酸化胜肽抗體的血清於製備的CCP管柱混合4°C約24小時, 以10毫升的0.1 M Tris-HCl, pH 8 (無containing 0.5 M NaCl)清洗至洗出液的OD₂₈₀為零, 洗出液收集下來用來製備無抗瓜氨酸化胜肽抗體類風濕性關節炎的患者血清, 最後以0.1M glycine pH 2.5把所要純化的抗體洗出, 用過的管柱以先以10毫升20% Alcohol清洗, 再以10毫升binding buffer洗滌後封口留下次使用。濾出液以15ml的1M Tris-HCl, pH 8.0中和收集, 之後以0.1xPBS透析, 最後用Vivaspin 20 polyethersulfone 30,000MWCO(購自 Sartorius AG, Goettingen, Germany)離心3000g, 30分鐘後用滴管從concentration pocket取出濃縮的抗瓜氨酸化胜肽抗體溶液, 以OD₂₈₀測定蛋白質濃度, 並以ELISA測定其對環狀瓜氨酸化胜肽的結合活性, 而抗瓜氨酸化胜肽抗體蛋白質濃度1µg/ml相當於16IU/ml的CCP結合活性。另一方面, 製備去除抗瓜氨酸化胜肽抗體類風濕性關節炎的患者血清作為對照組, 使用之前的結合CCP的親和度管柱的洗出液, 在重複過十次親和度管柱, 在依之前的步驟濃縮, 並以ELISA確定其對CCP結合活性無法偵測到(小於7IU/ml), 是為ACPA-depleted RA sera, 供後續研究使用。最後, 我們純化出來的ACPAs 及ACPA-depleted RA sera以limulus amebocyte lysate assay (Lonza, Basel, Switzerland)來偵測, 其內毒素(endotoxin)的濃度均小於0.5 EU/ml。

(五) 周邊單核白血球(PBMC)的製備

從健康志願者在取得其同意後抽取周邊靜脈血，將新鮮抽取的周邊靜脈血與四分之一體積之2% dextran solution (分子量464000; 購自Sigma Chemical company, St Louis, MO, USA)的磷酸鹽緩衝液混合，於室溫中靜置沉澱30分鐘。將富含白血球之上清液加至Ficoll-Hypaque (比重 1.077)(購自Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 溶液之上，離心760g、25分鐘之後，從密度差離心分層的Ficoll-Hypaque上層取出單核白血球。再以含10%胎牛血清的RPMI-1640培養液將單核白血球調成每毫升之 2×10^6 個細胞，單核白血球的純度與存活度經Wright stain與trypan blue dye染色證實皆大於95%。

(六)以酵素免疫吸附法測定單核白血球培養上清液中抗腫瘤壞死因子的含量

取0.5毫升PBMC(2×10^6 /ml)加入0.1毫升不同濃度的抗瓜氨酸化胜肽抗體及 Polyclonal human IgG(購自Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)當對照組和0.4毫升RPMI，ACPAs最後濃度為10IU/ml，20IU/ml，40IU/ml，80IU/ml，Polyclonal human IgG 5 μ g/ml，置於37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的細胞培養箱中24小時後，離心760g 5分鐘後，收集上清液。另外取0.5毫升PBMC(2×10^6 /ml)加入0.1毫升抗瓜氨酸化胜肽抗體及對照組5 μ g/ml的 Polyclonal human IgG和0.4毫升RPMI，ACPAs最後濃度為40IU/ml，置於37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的細胞培養箱中1, 2, 4, 8及24小時後，離心760g 5分鐘後，收集上清液。以測定人類腫瘤壞死因子的酵素免疫吸附法套裝組合 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),測定培養液其中腫瘤壞死因子的含量。首先將對照的標準腫瘤壞死因子分別稀釋成500pg/ml，125pg/ml，31.25pg/ml，7.8pg/ml等濃度以為測定含量的對照標準，取不同濃度的標準腫瘤壞死因子及培養上清液各50微毫升，分別注入被覆有抗腫瘤壞死因子的九十六孔微量盤於室溫下輕微搖盪一小時。經緩衝液洗滌三次後，再加入50微毫升結合有生活素(biotin)的抗腫瘤壞死因子反應溶液，於室溫下輕微搖盪一小時。再以緩衝液洗滌三次，加入100

微毫升結合HRP作用酵素的抗生活素溶液於室溫下作用三十分鐘。再經緩衝液洗滌三次後，加入已經配製好的HRP酵素的作用反應物於室溫避光下作用三十分鐘。最後加入反應終止溶液50微毫升，於波長450nm的吸光度測定各樣本中的腫瘤壞死因子的濃度。

(七) 製備核蛋白

從三位健常人新鮮製備的單核性細胞或U937細胞(2×10^6 個細胞)，加入之前純化的ACPAs 40IU/ml或2.5 μ g/ml的polyclonal human gamma globuline，置於37°C的無菌培養箱24小時，離心後進行以下的實驗。購買NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction Kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)進行核蛋白製備，其步驟詳述於下。經處理後的 2×10^6 細胞離心500g約3分鐘，倒去上清液，打散細胞後，加入0°C的PBS後，再離心500g約3分鐘，重覆兩次，之後加上500 μ l的lysis buffer內含10 mM HEPES (pH 7.9), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl, 10 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium molybdate, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml protease inhibitors (pepstatin, leupeptin, aprotinin), and 0.05% Nonidet P-40。置於冰上20分鐘脹破細胞，加上適量的glycerol使其最後glycerol濃度為5%，在2°C離心16000g達十分鐘，離下的即為細胞核。以之前的lysis buffer(但是NaCl的濃度從50 mM提高到140 mM)清洗細胞一次後，細胞核的部分加入100 μ l的storage buffer內含10 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 5% glycerol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium vanadate, 10 mM sodium molybdate, and 10 μ g/ml protease inhibitors，在冰上間斷的混合約六十分鐘，在4°C離心16000g達十分鐘後，取上清液即為核蛋白，測定蛋白質量為1mg/ml，並馬上冷凍於-80°C。

(八) 測定NF- κ B轉錄因子的DNA結合活性

NF- κ B的DNA binding activity是採用multiwell colorimetric assay，TransAM NF- κ B kit(購自Active Motif, Carlsbad, CA)，其步驟如下，將之前製備的核蛋白10 μ g及提供的含NF- κ B的陽性控制組(包括p50，p52，p65，c-Rel，Rel B)加入預先以覆蓋NF- κ B特異結合的雙股寡核酸序列，5端- GGGACTTTCC-3端的96孔盤靜置於室溫下一小時，以Washing buffer清洗三次之後，加入提供的抗p50，p52，p65，c-Rel，Rel B的抗體(稀釋1000倍)，以Washing buffer清洗三次後，加入已結合過氧化酶的二次抗體(稀釋1000倍)置於室溫下一小時後，以Washing buffer清洗三次後，進行呈色反應，並且以OD₄₅₀測定反應的強弱。

(九) 以流式細胞儀測定抗瓜氨酸化胜肽抗體和 PBMC 的結合能力

依照前述方式製備健康成人單核白血球(PBMC)，先於staining buffer (購自BD Biosciences)內含0.2% BSA and 0.1% sodium azide，在4°C下作用半小時，用以阻斷細胞表面Fc γ 和抗體的結合後。加入已經純化好的抗瓜氨酸化胜肽抗體50IU，在4°C下作用一小時或Isotype control (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)，之後以磷酸緩衝液(PBS)洗滌兩次後，均加入含FITC 螢光之第二抗體goat-anti-human IgG antibody (Rockland, Philadelphia, USA)染色於4°C下作用一小時後，在以磷酸緩衝液(PBS)洗滌兩次，細胞表面結合能力乃利用流式細胞儀(Becton Dickinson FACScan，Lysis II software)加以測定，而加入Isotype control者作為對照組，在所有染色的過程中，細胞均在內含staining buffer的溶液中進行。淋巴球(lymphocyte)及單核球(monocyte)利用forward and side light scatter可以清楚的分辨出來。每個測量皆包括一萬個細胞。所有結果以平均螢光強度呈現(mean fluorescence intensity，MFI)

(十) 以流式細胞儀測定抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞膜結合能力

U937 細胞株是人類血癌單核球淋巴癌細胞株，購自食品工業研究所，依照

前述的方式以純化好的抗瓜氨酸化胜肽抗體 50IU 作為第一抗體，以含 FITC 螢光之 goat-anti-human IgG antibody 作為第二抗體，最後以流式細胞儀測定抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞株細胞膜結合能力，方法如前述。

(十一) 抗瓜氨酸化胜肽抗體促進U937細胞腫瘤壞死因子的分泌

依照前述的方式， 1×10^6 /ml的U937細胞與10, 20, 40, 80IU/ml抗瓜氨酸化胜肽抗體作用，並以Polyclonal human IgG 5 μ g/ml當對照組，或 5×10^5 /ml的U937細胞株與ACPAs (80 IU/ml)作用，ACPAs (80 IU/ml)加上polymyxin B (10 μ g/ml) (Sigma-Aldrich), anti-CCP (80 IU/ml) + 合成的CCP (50 μ g/ml等於 21.4 μ M)，5 μ g/ml 去除ACPAs類風濕性關節炎血清(5 μ g/ml)，ACPAs (80 IU/ml)加上有阻斷功能的anti-Toll like receptor 4 antibodies (10 μ g/ml) (BioLegend, San Diego, CA, USA)或 polyclonal human IgG (5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich)，置於37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的細胞培養箱中24小時後，離心760g 5分鐘後，收集上清液。依照前述方法，測定人類腫瘤壞死因子的酵素免疫吸附法套裝組合(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),測定培養液中腫瘤壞死因子的含量。

(十二) 抗瓜氨酸化胜肽抗體增加NF- κ B轉錄因子的DNA結合活性

U937 細胞 (2×10^6 個細胞)，加入之前純化的 ACPAs 80IU/ml 或 10 μ g/ml 的 polyclonal human gamma globulin，每組做三重複，置於 37 $^{\circ}$ C 的無菌培養箱 24 小時，離心後依照前述的方式取核蛋白質，用 multiwell colorimetric assay，TransAM NF- κ B kit，測定 NF- κ B 轉錄因子的 DNA 結合活性。

(十三) 萃取 U937 細胞株細胞膜蛋白質

我們採用 ProteoExtract 天然膜蛋白質萃取套裝組合(購自 Calbiochem, San Diego, CA)。首先取 5×10^6 個 U937 細胞在 200g，4 $^{\circ}$ C 下離心 10 分鐘後，倒去上清液，接著打散細胞加入套裝組合中所附的清洗液混合後，再以 200g，4 $^{\circ}$ C 下離

心 10 分鐘後重複兩次，加入萃取緩衝液 I 2 毫升及蛋白酶抑制劑 10 微毫升 (aprotinin $1 \mu\text{g/ml}$ 及 PMSF $50 \mu\text{g/ml}$ ，均購自 Sigma, St Louis, MO, USA)來抑制蛋白酶的活性，混合後置於 4°C 下 10 分鐘，在 $16,000\text{g}$ ， 4°C 下離心 15 分鐘後倒去上清液，加入 1 毫升的冰冷的萃取緩衝液 II 及蛋白酶抑制劑，在 4°C 均勻搖盪三十分鐘，在 $16,000\text{g}$ ， 4°C 下離心 15 分鐘後，取出上清液即含有純化好的膜蛋白質，以 OD_{280} 測定蛋白質濃度後置於 -80°C 冰箱供後續實驗使用。

(十四) 以 Western blot 方法找出 ACPAs 與 U937 細胞表面的作用分子

取 $100 \mu\text{g}$ ($0.5\mu\text{l}$) 之前製備的 U937 細胞膜蛋白質加入 $100\mu\text{l}$ 的 sample buffer ($1\text{X} = 125\text{mM}$ Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% glycerol, 0.03% bromophenol blue, 1% β -mercaptoethanol)，伺其充分混合完全溶解之後以沸水煮 7 分鐘後，再以 11800g 離心 15 分鐘，以電泳 (10% SDS-PAGE) 分離蛋白質，再以半乾式轉印到 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上 (購自 Amersham Biosciences, GE, Uppsala, Sweden)。其後 PVDF 膜以 blocking buffer 5% 的脫脂奶粉加入 PBS 與 0.1% Tween-20 作用 1 小時以阻斷非特異性結合。加入純化的 ACPAs 500IU 或無抗瓜氨酸化胜肽抗體類風濕性關節炎的患者血清 (蛋白質總量 $30 \mu\text{g}$) 一起作用隔夜，之後再與 goat anti-human IgG-HRP 作用 2 小時後即可加入 enhanced chemiluminescence (ECL) 呈色，再以 X 光片感應冷光，呈現出來的條紋 (band)，代表 ACPAs 與 MNC 膜蛋白作用的蛋白質。之後依上述方式同時各 $100 \mu\text{g}$ 置備的 U937 細胞株膜蛋白質以電泳 (10% SDS-PAGE) 分離蛋白質，其中一個樣本依照上述方式轉印在 PVDF 膜上，以 ACPAs 呈色 X 光片感應冷光，另一個樣本則直接在電泳膠上，以 Commassion blue (購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 染出蛋白質的位置，之後依據 X 光片呈現出來的條紋的相對位置，切下此分子相對應在電泳膠上的位置，交予蛋白質分析 (Beckman Center, Stanford University, USA) 鑑定其胺基酸序列。

(十五) 以流式細胞儀測定抗瓜氨酸化胜肽抗體和 anti-GRP78 Abs，GRP78 或 citrullinated GRP78 的競爭結合能力

U937 細胞株首先置於 10 µg/ml 人類的 polyclonal IgG 於 staining buffer 中 (購自 BD Biosciences)，在 4°C 下作用半小時，用以阻斷細胞表面 Fcγ 和抗體的結合後。於室溫下 60 分鐘。之後分成三組，每管細胞數為 1×10^6 /ml。在所有染色的過程中，細胞均在內含 staining buffer 的溶液中進行

(1) 細胞先和不同濃度的抗瓜氨酸化胜肽抗體 0, 50IU, 250IU 或 isotype control 於室溫反應一小時後，用 PBS 洗滌，加入 rabbit polyclonal antibody against human GRP78 (H-129) 室溫反應一小時，之後用 PBS 洗滌，再加入 FITC conjugated goat-anti-rabbit IgG antibody。

(2) 細胞先和不同濃度的 rabbit polyclonal antibody against human GRP78 (H-129) 0, 1µg, 10µg 室溫反應一小時後，用 PBS 洗滌，加入 50IU 抗瓜氨酸化胜肽抗體室溫反應一小時或 isotype control，之後用 PBS 洗滌，再加入 FITC conjugated goat-anti-human IgG antibody。

(3) APCAs 先和不同濃度的大腸桿菌合成的 GRP78 蛋白質含有 GST 標記 0, 1µg, 10µg (購自 Novus biologicals, Littleton, CO, USA) 室溫反應一小時後，加入 U937 細胞，另一方面以 isotype control 染另外一組，於室溫反應一小時之後用 PBS 洗滌，再加入 FITC conjugated goat-anti-human IgG antibody。

(4) APCAs 先和不同濃度的 citrullinated GRP78 蛋白質 0, 1µg, 10µg (置備方法如後) 室溫反應一小時後，加入 U937 細胞，另一方面以 isotype control 染另外一組，於室溫反應一小時之後用 PBS 洗滌，再加入 FITC conjugated goat-anti-human IgG antibody。

最後以流式細胞儀分析各樣本中，不同抗體或 GRP78 是否可以和 APCAs 之間有

競爭的反應。

(十六) 以免疫沉澱法純化出 U937 細胞膜上的 GRP78 或 citrullinated proteins

以 Protein G Immunoprecipitation kits (購自 Sigma-Aldrich St. Louis, USA) 進行。首先在管柱中加入 500 μ g 先前置備的 U937 細胞膜蛋白質及 1 μ g 的 goat polyclonal antibody against N-terminal of human GRP78(N-20) (Santa Cruz Biotechnology) 或 200IU ACPAs 於 4°C 充分旋轉混合 90 分鐘後，加入所附上的以免疫沉澱緩衝液清洗過的 Protein G beads，於 4°C 充分旋轉混合約八小時。去除管柱的尖端，以 12,000g 於 4°C 離心 30 秒，加入 700 μ L 的免疫沉澱緩衝液清洗五次。封閉管柱的尖端，加入 50 μ L 一倍的 SDS sample buffer，加溫 95°C 5 分鐘後，去除管柱的尖端，以 12,000g 於 4°C 離心 30 秒，而所得的濾出液進行西方點墨法的分析，即可以 rabbit polyclonal antibodies against human GRP78 Ab (H-129) 及之前純化的 ACPAs 分析。

(十七) 以 Western blot 方法看 ACPAs 是否可與 GRP78 作用

製備的 U937 細胞膜蛋白質，購買的 GRP78 蛋白質 0.5 μ g 及以免疫沉澱法所得的 GRP78 依前述方式跑電泳並且轉漬到膜上，以 rabbit polyclonal antibodies against human GRP78 Ab (H-129) 及之前純化的 ACPAs 作為偵測(第一抗體)，以相對應的結合有 HRP 的第二抗體來呈色

(十八) 製備 Biotinylated 細胞表面膜蛋白質

取 U937 細胞加入含濃度 1mg/ml，pH 8.0 之 Sulfo-NHS-Biotin (購自 Pierce Biotechnology) 於室溫下在緩慢搖勻作用 30 分鐘之後，以 50mM Tris (pH 8.0) 停止反應。超音波樣品處理器(Sonicator)冰浴震碎，再以 11800g 離心 15 分鐘，取其上清液供後續實驗使用。

(十九) 以西方點墨法偵測蛋白質是否有被瓜氨酸化

我們使用商業套組 anti-citrulline (modified) detection kit (購自 Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)來進一步分析蛋白質是否有被瓜氨酸化。首先，首先製備富含瓜氨酸的蛋白質作為陽性對照組，首先以約 10 公分長的透明膠帶黏在上臂的內側並且用手指來回緊壓數次，撕下膠帶，固定在長盤上黏著皮膚細胞面朝上，加入 2 毫升不含 bromphenol blue 的 SDS-PAGE lysis buffer，同時以刮杓盡量刮下附著在膠帶上的皮膚細胞。收集細胞分解液以 95°C 加熱五分鐘，之後以 10000rpm 離心後去除沉澱物，測量蛋白質濃度後，加入 bromphenol blue 至最後濃度為 0.05%。之後將用 anti-GRP78 Abs 以免疫沉澱法純化出 U937 細胞膜上的 GRP78 及事前純化好的富含瓜氨酸的蛋白質，依前述的方法跑電泳膠，轉漬到 PVDF 膜上，加入含有 2, 3-butanedione monoxime, FeCl₃ 及 antipyrine 的強酸溶液作用至隔日，使得蛋白質上的瓜氨酸受到修飾，之後再以套組中所附的抗修飾的瓜氨酸抗體為第一抗體及接有過氧化酶的 second 抗體呈色，程序如同之前的西方點墨法。

(二十) 以 PAD 瓜氨酸化 GRP78

將 25 μ g 的大腸桿菌合成 GRP78 加入 citrullination buffer, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) 含有 10mM CaCl₂, 5 mM dithiothreitol。加入 2.5U rabbit skeletal muscle PAD (購自 Sigma), 在 37°C 反應三小時後，加入 20mM EDTA 終止反應，之後加入適量以二次水製備的 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 含有 2 mM EDTA (pH 7.6)，用 Vivaspin 20 polyethersulfone 30,000MWCO (購自 Sartorius AG) 離心 3000g，30 分鐘後用滴管從 concentration pocket 取出濃縮液，如此反覆三次，以商業套組 anti-citrulline (modified) detection kit 確認其已經被瓜氨酸化了。

(二十一) 以 Western blot 方法看 ACPAs 是否可與瓜氨酸化 GRP78 作用

將製備的瓜氨酸化 GRP78，依前述方式跑電泳並且轉漬到膜上，以 rabbit

polyclonal antibodies against human GRP78 Ab (H-129)及之前純化的 ACPAs 作為偵測(第一抗體)，以相對應的結合有 HRP 的第二抗體來呈色。

(二十二) 瓜氨酸化 GRP78, Anti-GRP78 或合成的 GRP78 是否可以抑制 ACPAs 所造成的 U937 細胞 TNF- α 釋放

依前述方法， 5×10^5 /ml U937 細胞株在 polyclonal human IgG (5 μ g/ml) ， ACPAs (80 IU/ml) ， ACPAs (80 IU/ml) 加上合成的 GRP78 (10 μ g/ml) ， ACPAs (80 IU/ml) 加上 anti-GRP78 (10 μ g/ml) ， ACPAs (80 IU/ml) 加上瓜氨酸化的 GRP78 (10 μ g/ml) ， GRP78 (10 μ g/ml) 或 anti-GRP78 (10 μ g/ml) ，置於 37°C 含 5% CO₂ 的細胞培養箱中 24 小時後，離心 760g 5 分鐘後，收集上清液。依照前述以測定人類腫瘤壞死因子的酵素免疫吸附法套裝組合 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，測定培養液其中腫瘤壞死因子的含量。

(二十三) Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 抑制劑可以抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體造成 U937 細胞腫瘤壞死因子的分泌

5×10^5 /ml 的 U937 細胞在 ACPAs 80 IU/ml ， ACPAs 80 IU/ml + 10 μ M SB203580 (MAPK p38 pathway 的抑制劑；購自 Sigma) ， ACPAs 80 IU/ml + 10 μ M PD98059 (MAPK Extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2; ERK-1/2; pathway 的抑制劑；購自 Sigma) 或 Polyclonal human IgG 5 μ g/ml 當對照組，置於 37°C 含 5% CO₂ 的細胞培養箱中 24 小時後，離心 760g 5 分鐘後，收集上清液。依照前述以測定人類腫瘤壞死因子的酵素免疫吸附法套裝組合 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，測定培養液中腫瘤壞死因子的含量。

(二十四) 以 Western blot 方法測定 ACPAs 是否會促進 ERK-1/2 的磷酸化

5×10^5 /ml 的 U937 細胞在 ACPAs 80 IU/ml 或 Polyclonal human IgG 5 μ g/ml 當對照組，置於 37°C 含 5% CO₂ 的細胞培養箱中 24 小時後，加入適量的 protein extraction

buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4 , 150mM NaCl , 0.25% deoxycholic acid , 1% NP-40 及1mM EDTA) , 使之與細胞充分混合 , 置於冰上作用30分鐘 , 最後以4°C , 12000rpm高速離心10分鐘 , 上清液即為whole cell lysate的蛋白質萃取物。之後以 Bradford法進行定量 , 取50 μ g , 以電泳(10% SDS-PAGE)分離蛋白質 , 再分別依序以Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) rabbit mAb , Anti-ERK1/2 rabbit mAb 及Anti-Actin Abs(購自Cell signaling technology, Boston, MA, USA)做第一抗體反應 , 後再與goat anti-rabbit IgG-HRP作用2小時後即可呈色。

(二十五)統計分析

實驗結果以平均數 \pm 標準差(mean \pm S.D.)的形式來表示。統計學上的差異性則使用統計軟體STATA中的Student's test或無母數的Mann-Whitney U test來做評估分析 , p值小於0.05以下才算有統計上的差異



三 結果

第一部份 抗瓜氨酸化胜肽抗體專一的存在類風濕性關節炎血清中

(一) 抗瓜氨酸化胜肽抗體專一的存在類風濕性關節炎患者血清中

首先，我們發現在常見的三個類風濕性關節炎的血清指標中，其對於診斷類風濕性關節炎的敏感度為 ACPAs 的 81.0%為最高，接著是 RF 的 74.4%，最後是 anti-Gal(0) IgG 的 68.6%，但是這三者統計上並無差異。在特異度方面，在台灣常見會造成類風濕因子成陽性反應及造成關節疼痛的情形，需要和類風濕性關節炎做鑑別診斷的疾病，包括原發性修格連氏症，慢性 B 型肝炎及慢性 C 型肝炎感染的患者，如圖一，可見這些疾病患者其血清中常可以測得到類風濕因子，而 anti-Gal(0) IgG 雖然比較少測到，但比例上仍然是以 ACPAs 為最低。因此，總和來算其特異度，以 ACPAs 的 97.7%為最高，接著是 anti-Gal(0) IgG 的 85.7%，最後是 RF 的 32.0%，而 ACPAs 的對於診斷類風濕性關節炎的特異度，則在統計上優於 anti-Gal(0) IgG 及 RF，顯示抗瓜氨酸化胜肽抗體是特異性最高的類風濕性關節炎血清指標。

第二部分 抗瓜氨酸化胜肽抗體促進人類單核球產生發炎反應

(一) ACPAs 促進正常人 PBMC 分泌 TNF- α

因為 TNF- α 在類風濕性關節炎的發炎反應中，扮演最主要調控的角色，因此我們首先從類風濕性關節炎的病人血清中純化出來 ACPAs，以不同濃度的 ACPAs (10, 20 40, 80 IU)及對照的人類非特異性免疫球蛋白 5 μ g/ml 和正常人的 PBMC 混合，置於 37°C 含 5%CO₂ 的細胞培養箱中 24 小時後收集上清液。培養的上清液 TNF- α ，依序為(294.5 \pm 177.1 pg/ml, 416.6 \pm 254.7 pg/ml, 529.7 \pm 294.4 pg/ml, 588.2 \pm 377.3 pg/ml) 也隨著 ACPAs 濃度的增加而增加，而對照組加入人類非特異性免疫球蛋白 5 μ g/ml 其 TNF- α 的分泌則只有 23.5 \pm 30.4pg/ml，明顯的小於加有 ACPAs 之組(p<0.05)。可以確定隨著 ACPAs 濃度的增加，其相對地可以刺激正常人 PBMC TNF- α 的分泌(圖二)。另一方面，以 40 IU 的 ACPAs 來刺激正常人的 PBMC，TNF- α 的分泌在四到八小時之間達到最高點(圖三)。

(二) ACPAs 可以促進正常人 PBMC 的 NF- κ B DNA binding activity

因為 NF- κ B 是控制 TNF- α 製造的重要的轉錄因子，既然 ACPAs 可以促進 TNF- α 的分泌，我們推測 ACPAs 可以促進 NF- κ B 的活化。我們從正常人，新鮮製備的 PBMC 後加上 ACPAs 40IU/ml 或對照組 2.5 μ g/ml 的 polyclonal human gamma globuline 培養 24 小時，以商業套裝組合偵測其 NF- κ B family 的 p50, p52, p65, RelB 及 c-Rel 的活性。可見其 NF- κ B family 中的 DNA binding activity 在 p50 (OD_{450nm} 0.68 \pm 0.14 vs. 0.53 \pm 0.09)及 p65(OD_{450nm} 1.66 \pm 0.11 vs. 1.52 \pm 0.06) (p<0.05) 比起對照組有顯著上升(如圖四)，可見 ACPAs 是透過活化 NF- κ B 來促進 TNF- α 製造。

(三) ACPAs 可以和正常人 PBMC 的表面蛋白質結合

我們推測 ACPAs 應該是透過細胞膜上的蛋白質，來產生上述所偵測到的

TNF- α 分泌和 NF- κ B 活化，因此，我們以 ACPAs 作為第一抗體，和新鮮分離出來正常人的 PBMC 作用，之後加入含 FITC 螢光之第二抗體 goat-anti-human IgG antibody，最後以流式細胞儀做分析，可以發現 ACPAs 比起 isotype control 的控制組而言，可以和 PBMC 表面抗原結合的更緊密(15.56% vs. 4.78%)(如圖五)。我們進一步將正常人的 PBMC 依細胞大小(FSC)及顆粒性(SSC)，區分為 lymphocyte 及 monocyte (如圖六)。圈選特定的細胞群作次族群分析，我們發現 ACPAs 主要結合在 monocyte 細胞膜分子(如圖七)而 lymphocyte 也有部分結合(如圖八)，而 ACPAs 和 monocyte 結合比 lymphocyte 強些。



第三部分 尋找抗瓜氨酸化胜肽抗體促進發炎反應的作用分子

(一) ACPAs 作用在 U937 細胞的細胞膜上

因為正常人的單核球量不多，接下來的實驗，我們以單核球的代表細胞株 U937 來進行後續的研究，以純化好的抗瓜氨酸化胜肽抗體為第一抗體，含 FITC 螢光之 goat-anti-human IgG antibody 做第二抗體，最後以流式細胞儀做分析，可以發現 ACPAs 比起以 isotype control 的控制組而言，可以和 U937 細胞表面分子更緊密結合，如圖九所示。

(二) 抗瓜氨酸化胜肽抗體促進 U937 細胞 TNF- α 的分泌

再來，我們以 U937 細胞的模式來驗證 ACPAs 是否可以專一的促進 U937 細胞株 TNF- α 分泌。從類風濕性關節炎的病人血清中純化出來 ACPAs，以不同濃度的 ACPAs (10, 20 40, 80 IU) 及對照的人類非特異性免疫球蛋白 5 μ g/ml 和 1×10^6 的 U937 細胞混合，最後體積為 0.5 毫升，置於 37°C 含 5%CO₂ 的細胞培養箱中 8 小時後收集上清液。培養的上清液的 TNF- α ，依序為 (323.5 \pm 35.0pg/ml, 337.6 \pm 56.1pg/ml, 507.3 \pm 67.6pg/ml, 521.1 \pm 82.0pg/ml) 也隨著 ACPAs 濃度的增加而增加，另外對照組加入人類非特異性免疫球蛋白 5 μ g/ml，其 TNF- α 的分泌則只有 10.6 \pm 3.9pg/ml，明顯的小於加有 ACPAs 之組 ($p < 0.05$)。可以確定隨著 ACPAs 濃度的增加，其相對地可以刺激 U937 細胞 TNF- α 的分泌，如圖十所示。

5×10^5 的 U937 細胞，最後體積為 0.5 毫升在 ACPAs 80IU/ml, 10 μ g/ml 的 polyclonal human gamma globulin, 10 μ g/ml 的 ACPA depleted RA sera, ACPAs 80IU/ml + polymyxin B 10 μ g/ml, ACPAs 80IU/ml + anti-TLR4 Abs 10 μ g/ml 及 ACPAs 80IU/ml + 50 μ g/ml (21.4 μ M) synthetic CCP 置於 37°C 含 5%CO₂ 的細胞培養箱中 24 小時後，測量其培養的上清液的 TNF- α ，ACPs 80IU/ml 組 (295.3 \pm 28.2pg/ml) 比起 Polyclonal human IgG 10 μ g/ml (16.1 \pm 4.8pg/ml)，ACPs

depleted RA sera 10µg/ml (24.0±13.6pg/ml)等對照組，TNF-α有明顯上升的情形 (p<0.05)。而加入 polymyxin B 10µg/ml (281.0±26.1pg/ml)或 anti-TLR4 Abs (255.0±61.9pg/ml)來抑制 LPS 活性，並不影響 U937 細胞 TNF-α 的分泌，顯示純化的 ACPAs 應該沒有受到 LPS 的污染，但是加入 50µg/ml (21.4µM) synthetic CCP，可以抑制 U937 細胞株 TNF-α 的分泌 (218.1±19.1pg/ml, p=0.0253)，但是只有抑制約三成左右的效果，如圖十一所示。

(三) 抗瓜氨酸化胜肽抗體增加 NF-κB 轉錄因子的 DNA 結合活性

U937 細胞加上 ACPAs 80IU/ml 或對照組 5µg/ml 的 polyclonal human gamma globulin 培養 24 小時。可見其 NF-κB family 中的 DNA binding activity 在 p50 (OD_{450nm} 3.31±0.05 vs. 2.79±0.13, p<0.05)，p52 (OD_{450nm} 0.49±0.09 vs. 0.26±0.01, p<0.05)及 p65(OD_{450nm} 1.80±0.18 vs. 0.45±0.05, p<0.05)比起對照組有顯著上升，而 c-Rel 及 RelB 則無差異，如圖十二所示。

(四) 以 Western blot 方法找出 ACPAs 與 U937 細胞間的作用分子

將 U937 細胞膜蛋白質分離出來後，以抗瓜氨酸化胜肽抗體做第一抗體，以 Western blot 方法偵測，發現 ACPAs 可以作用在三處 U937 細胞膜蛋白質萃取物，其分子量大約為 70-75, 50-55 and 40-45 kDa，而如果以無抗瓜氨酸化胜肽抗體類風濕性關節炎的患者血清來做第一抗體，則無法辨識出任何區域(如圖十三)。我們之後以 U937 細胞膜蛋白質跑兩片蛋白質電泳，一片照上述的方式以 ACPAs 做第一抗體，以 Western blot 方法確定這三個區域，另外一片以 Coomassie blue 直接在膠上呈色，找出蛋白質的分布區域，經過比對後，將這三個和 ACPAs 作用的蛋白質區域，在相對電泳膠區域以刀片切下，送到史丹福大學做蛋白質分析。報告顯示：在 70-75kDa protein region 為:78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP78, BiP), Moesin。50-55Da protein region 為:KIAA0115, protein disulfide

isomerase-related protein 5。40-45Da protein region為:fructose-bisphosphate aldolase A, macrophage-capping protein。這些蛋白質當然都可能是ACPAs和U937細胞株膜的作用分子。經過文獻回顧後，我們猜測78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP78, BiP)是最有可能是ACPAs造成U937細胞釋放TNF- α 的關鍵分子，然而其他的分子或許也有其角色，留待後續研究再探討。



第四部分 GRP78是抗瓜氨酸化胜肽抗體促進發炎反應的關鍵分子

(一)以流式細胞儀測定 ACPAs 和 anti-GRP78 Abs 或合成 GRP78 的競爭結合能力

我們設計試驗來看 ACPAs 對於 anti-GRP78 Abs，合成 GRP78 或瓜氨酸化的 GRP78 之間和 U937 細胞競爭結合的情況。首先，U937 細胞先和不同濃度的抗瓜氨酸化胜肽抗體 0, 50 IU, 250 IU 室溫反應一小時後，用 PBS 洗滌，加入 rabbit polyclonal antibody against human GRP78 (H-129)及含 FITC 的適當的第二抗體，可以發現隨 ACPAs 濃度的增加(0, 50, 250 IU)，anti-GRP78 Abs 與細胞膜上 GRP78 的結合比例也逐漸下降(95.24%, 43.02%, 16.95%)(如圖十四)。而反之 U937 細胞先和不同濃度的 anti-GRP78 Abs (H-129) (0, 1, 10 μ g)於室溫反應一小時後，用 PBS 洗滌，加入 ACPAs 及含 FITC 的適當的第二抗體，可以發現雖然 anti-GRP78 Abs 濃度的增加(0, 1, 10 μ g)，ACPs 與細胞膜上蛋白質的結合比例有些許下降(95.30%, 93.48%, 89.72%)(如圖十五)。而 ACPAs 和不同濃度合成的 GRP78 (0, 1, 10 μ g)於室溫反應一小時後，加入 U937 細胞作用一小時，再用 PBS 洗滌，加入含 FITC 的適當的第二抗體染色，可以發現雖然合成的 GRP78 濃度的增加(0, 1, 10 μ g)，ACPs 與細胞膜上蛋白質的結合比例並未減少(95.49%, 95.56%, 96.12%)(如圖十六)，最後 ACPAs 先和不同濃度瓜氨酸化的 GRP78 (0, 1, 10 μ g)於室溫反應一小時後，加入 U937 細胞作用一小時，再用 PBS 洗滌，加入含 FITC 的適當的第二抗體，可以發現隨著瓜氨酸化的 GRP78 濃度的增加(0, 1, 10 μ g)，ACPs 與細胞膜上蛋白質的結合比例有些許的下降(94.51%, 93.11%, 90.35%)(如圖十七)。

(二)合成的GRP78不能和ACPs結合

我們將純化好的U937細胞膜蛋白質以anti-GRP78 Abs(H-129)做為第一抗

體，以西方點墨法呈色，其蛋白質在膜上的相對位置約在72kDa處和之前ACPAs的位置一樣。我們購買合成的GRP78，以anti-GRP78 Abs(H-129)做為第一抗體，以西方點墨法呈色，也可以顯示其位置，但是因為合成的GRP78有GST tag，因此分子量約為97.33 kDa。但是合成的GRP78，以ACPAs做為第一抗體，以西方點墨法呈色，並不會有任何反應，顯示合成的GRP78不能和ACPAs結合(如圖十八)。

(三)以免疫沉澱法純化出U937細胞膜上的GRP78可以和ACPAs結合

雖然合成的GRP78不能跟ACPAs結合，然而U937細胞表面的GRP78很可能需要被瓜氨酸化之後，才可以跟ACPAs結合。我們以goat polyclonal antibody against N-terminal of human GRP78(N-20)做為結合抗體，以之前純化的U937細胞膜蛋白質做受質，以免疫沉澱法純化出U937細胞膜上的GRP78。利用西方點墨法以anti-GRP78 Abs(H-129)和ACPAs分別做為第一抗體，我們可以發現anti-GRP78 Abs(H-129)和ACPAs可以和55kDa的GRP78蛋白質碎片作結合，為了排除第二抗體會和anti-GRP78 Abs (N-20)的heavy chain做非特異性的結合，我們單純以0.5 μ g的anti-GRP78 Abs (N-20)跑電泳，之後再已anti-GRP78 Abs(H-129)及相對的第二抗體做反應，並無Cross reaction的存在(如圖十九)。

(四) U937細胞膜上的GRP78有瓜氨酸化而合成的GRP78則無

為何ACPAs可以和以免疫沉澱法純化出來的U937細胞膜上GRP78作結合，而不能和合成的GRP78作結合。我們猜測是否U937細胞膜上GRP78有瓜氨酸化而合成的GRP78則無。因此我們以Anti-MC Abs利用西方點墨法偵測，我們發現的確U937細胞膜上GRP78有瓜氨酸化而合成的GRP78則無，這可能決定了ACPAs是否與之結合(如圖二十)。

(五)ACPAs可以與人為瓜氨酸化GRP78作用

我們將合成的GRP78，利用已經純化好的PAD，在高濃度的鈣離子下，給予瓜氨酸化，我們以Anti-MC Abs，ACPAs及anti-GRP78 Abs(H-129)利用西方點墨法偵測。我們發現Anti-MC Abs，ACPAs及anti-GRP78 Abs可以共同結合在約72kDa的蛋白質區域，而Anti-MC Abs及anti-GRP78 Abs尚可共同作用在約95kDa的區域。我們猜測也許是有GST-tag的合成GRP78，可能GST-tag會影響到ACPAs和citrullinated GRP78的結合，而citrullinated GRP78的碎片可能已經沒有GST-tag則可以和ACPAs作結合(如圖二十一)。

(六)以ACPAs純化出的U937細胞膜蛋白質含有瓜氨酸化的GRP78

我們以自行純化出來的ACPAs做為結合抗體，以U937細胞膜蛋白質做受質，以免疫沉澱法純化出U937細胞膜上的ACPAs結合抗原。之後利用西方點墨法以anti-GRP78 Abs(H-129)和anti-MC分別做為第一抗體，我們可以發現以ACPAs沉澱下來的是GRP78的55kDa的片斷，並且有瓜氨酸化的情形，(如圖二十二的a及b)。之後我們將完整U937細胞表面給予Biotinylation，之後跟ACPAs作用，最後再把細胞打破，做免疫沉澱，我們也可以發現，anti-GRP78 Abs(H-129)可以跟55kDa的GRP78片斷做結合，而且這個片段也可以被Streptavidin結合HRP所作用(如圖二十二的c及d)，證實ACPAs和GRP78的結合的確是發生在細胞表面。

(七)瓜氨酸化 GRP78 可以抑制 ACPAs 所造成的 U937 細胞 TNF- α 釋放

最後，我們以U937細胞株在polyclonal human IgG (5 μ g/ml)，ACPAs (80 IU/ml)，ACPAs (80 IU/ml)加上合成的GRP78 (10 μ g/ml)，ACPAs (80 IU/ml)加上anti-GRP78 (10 μ g/ml)，ACPAs (80 IU/ml)加上瓜氨酸化的GRP78 (10 μ g/ml)，GRP78 (10 μ g/ml)或anti-GRP78 (10 μ g/ml)，置於37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的細胞培養箱中24小時後，測量上清液的TNF- α 含量。我們發現加入anti-GRP78可以部分抑制ACPAs所造成的U937細胞TNF- α 釋放(269.64 \pm 67.12pg/ml vs. 383.68 \pm 47.05 pg/ml)；

p=0.043)，而瓜氨酸化GRP78則可以充分抑制ACPAs所造成的U937細胞TNF- α 釋放(23.23 \pm 21.27pg/ml vs. 383.68 \pm 47.05 pg/ml; p=0.034)，而polyclonal human IgG，GRP78 (10 μ g/ml)或anti-GRP78 (10 μ g/ml) 則不會增加U937細胞TNF- α 的釋放(如圖二十三)。

(八) ACPAs活化MAPK的訊息傳導路徑

我們將 U937 細胞在 ACPAs，ACPAs + SB203580 (MAPK p38 pathway 的抑制劑；購自 Sigma)，ACPAs + PD98059 (MAPK ERK-1/2 pathway)的抑制劑或對照組 Polyclonal human IgG，我們發現 SB203580 及 PD98059 都可以抑制 ACPAs 所引起的 U937 細胞 TNF- α 的分泌，猜測 MAPK p38 及 ERK1/2 pathway 是其中關鍵的訊息傳導路徑(如圖二十四)。之後，將 U937 細胞在 ACPAs 80 IU/ml 或對照組 Polyclonal human IgG 5 μ g/ml，一起培養 24 小時後。以西方點墨法可以發現 ACPAs 促進 ERK-1/2 的磷酸化，以統計軟體 Image J 分析三重複的樣本並且定量，確認 ACPAs 組的磷酸化 ERK-1/2 之於無磷酸化 ERK-1/2 的比率統計學上高於對照組 Polyclonal human IgG(如圖二十五)。

最後我們以示意圖來作總結，首先以CCP親合性管柱，從類風濕性關節炎的患者血清純化出ACPAs，之後證實ACPAs可以藉由結合在U937細胞膜上瓜氨酸化的GRP78，促進單核性白血球轉錄因子NF- κ B的活化及TNF- α 的釋放，引起發炎反應(如圖二十六)。

四 討論

第一部份 抗瓜氨酸化胜肽抗體特異的存在類風濕性關節炎血清中

固然在以前的研究中，已經有相當多的文獻指出，抗瓜氨酸化胜肽抗體對於診斷類風濕性關節炎的特異度相當高，然而在包括台灣在內的東南亞地方，還有些特殊的情況需要考量，主要是這些地方是慢性B型及C型肝炎的盛行地區。在臨床上，慢性B型及C型肝炎感染患者的血清容易出現類風濕因子，而這些患者又常常有對稱性的關節疼痛，有時候會被誤診為類風濕性關節炎。而之前雖然有文獻提到抗瓜氨酸化胜肽抗體可以鑑別出慢性C型肝炎和類風濕性關節炎 (Bombardieri et al. 2004)，但是慢性B型肝炎感染患者則無資料。並且我們不只是將抗瓜氨酸化胜肽抗體和類風濕因子互比，而且還加入anti-Gal(0) IgG。我們的結果顯示抗瓜氨酸化胜肽抗體，幾乎不會在慢性B型及C型肝炎及乾燥症等需要和類風濕性關節炎做區別的疾病中測到，對於在台灣地區鑑別診斷類風濕性關節炎及其相仿者，有相當好的鑑別度，當然也間接支持抗瓜氨酸化胜肽抗體參與了類風濕性關節炎的致病機轉。

第二部分 抗瓜氨酸化胜肽抗體促進人類單核球產生發炎反應

類風濕性關節炎的發炎反應雖然有很多的細胞激素參與，但其中以TNF- α 居關鍵性的角色。在細胞實驗中，這些細胞激素並不是隨機產生的，而是有先後次序，而TNF- α 就是在裡面扮演控制的角色，若我們把TNF- α 的生物活性阻斷，IL-1, IL6, IL-8的產生就會明顯減少。在實際類風濕性關節炎的組織中，TNF- α 及其受器均大量表現，而臨床上使用TNF- α 的阻斷藥物，對於類風濕性關節炎的關節發炎及破壞，均有非常突出的效果(Brennan et al., 2008)。因此在第一部分的實驗中，我們發現ACPAs可以促進健康人的單核球產生TNF- α ，可見得ACPAs本身是有功能性的抗體，而且可以促使細胞產生重要而可促進類風濕性關節炎發生的細胞激素TNF- α 。

首先我們以親合性管柱，利用第一代的環狀瓜氨酸化胜肽來純化出ACPAs，當然環狀瓜氨酸化胜肽現在已經進展到第三代了，主要的變化是增加新的不同的環狀瓜氨酸化胜肽以增加敏感度，我們之前詢問過廠商，但是牽涉到商業上的機密，無法取得其詳細序列，加上第一代的環狀瓜氨酸化胜肽對於類風濕性關節炎患者血清的診斷率也有68%的敏感度及98%的特異度，也很足夠了，因此我們採用第一代已知序列的環狀瓜氨酸化胜肽來純化ACPAs，而我們選用的環狀瓜氨酸化胜肽只有含21個氨基酸，是相當小的分子，因此我們使用的coupling gel為NHS-activated Sepharose 4 fast flow gel，其特色主要是設計有一個spacer，來降低配體的立體障礙。純化出來的ACPAs蛋白質濃度1 μ g/ml相當於16IU/ml的CCP結合活性，我們使用CCP的結合活性來做之後的實驗分析而非蛋白質濃度，主要是基於我們相信純化出的ACPAs，其造成的分子反應的結果和CCP的結合活性相關性可能比單純以ACPAs蛋白質濃度為佳，我們實驗的結果也發現，以相同的CCP結合活性的單位來做實驗，所得的細胞TNF- α 的釋放一致性比較高，我們雖然一

次收集了三十位含有高濃度ACPAs的類風濕性關節炎患者的血清，事先混合好後純化APCAs，以減少個別的誤差，我們實際上還是會發現，不同批純化出來的ACPAs其促進細胞TNF- α 釋放的能力還是有差異，可能是不同的患者，其APCAs對cit-GRP78或是其他citrullinated protein的結合力仍然不同，也不能排除少數特殊的患者，具有這個特殊和cit-GRP78結合的抗體，影響了整個實驗的結果，我們未來的研究預計會以自行製造的cit-GRP78當抗原，看看個別患者其血清中是否有其相對應的抗體，如此決定了ACPAs促進U937細胞及PBMC TNF- α 釋放的多寡。

現在我們是用自行製備的管柱，以手動的方式加入血清，沖洗液及最後的濾出液，此方式相當耗時，操作者需要隨時注意加入適當的溶液，避免管柱乾掉，其間無法做其他的實驗，耗費一整天純化下來的抗體，只可以做一兩次的實驗，再者管柱並非密封，雖然小心操作，使用一段時間後仍然要丟棄，以免細菌污染，因此之後我們預計以快速液態層析儀(Fast performance liquid chromatography; FPLC)來製備 ACPAs，其實原理跟 High performance liquid chromatography; HPLC 類似，在層析系統的兩個主要的組成是固定相(stationary phase)及流動相(mobile phase)，兩者各有不同的極性或非極性強度，而樣本分子因其自身極性的強弱，與此兩相的親合力不同。與固定相親合力大者，易滯留原地；與流動相親合力大者，易隨流動相而移動，因而達到分離的目的地，加上以幫浦給予高壓及緻密的管柱，可以使樣品在管柱內的滯留時間延長，增加分析或分離能力。分離 ACPAs 的方式是採用親和層析法的原理，首先我們購入空的純化管柱 XK16/20，同樣是以 NHS-activated Sepharose 4 fast flow gel 和合成的 CCP 做結合，之後調整適當的設定，希望以後以 FPLC 來製備 ACPAs，可以減少人力的耗費及增加純化出來的 ACPAs 的品質。當然我們最終的目的是找到 ACPAs 所針對的特定的蛋白

質，藉此產生發炎反應的關鍵分子，已 hybridoma 的方式，製造出有功能性的專一的抗體株，以後做研究就會相當方便且清楚，但是我想這可能有很長的一段路要走。

在實驗中，我們發現ACPAs可以促進健康人PBMC產生TNF- α ，並且細胞培養液的TNF- α 濃度隨著ACPAs增加而增加，而其作用時間的高峰約在4-8小時。我們初步是以相對濃度的 polyclonal immunoglobulin 當控制組，主要是要排除PBMC是藉由immunoglobulin和細胞表面的Fc receptor作結合，來促使健康人PBMC產生TNF- α 的可能性。當然結果是 polyclonal immunoglobulin 對健康人PBMC並未有促進產生TNF- α 的效果，也因此我們可以排除ACPAs是以非特異性的immunoglobulin constant region和細胞表面的Fc receptor作結合，來促使健康人PBMC產生TNF- α 。初步顯示ACPAs可以藉促進健康人PBMC產生TNF- α ，在類風濕性關節炎的致病機轉扮演重要的角色。我們進一步分析表現TNF- α 所需要的轉錄因子NF- κ B。

NF- κ B除了調節TNF- α 的表現外，NF- κ B是控制許多免疫及發炎反應的關鍵轉錄因子，其控制表現的蛋白質分子如細胞激素，生長因子(growth factors)，細胞激素受器，壓力蛋白質(stress proteins)，白血球沾黏分子 (leukocyte adhesion molecules)及免疫調節分子(immunoregulatory molecules)等(May and Ghosh, 1998)。NF- κ B可以調控組織remodeling並且在局部受傷後，透過增加 metalloproteinases, inducible nitric oxide synthase及cyclooxygenase 2來增加血管通透性。甚至於抗體的產生及T cell - dependent delayed-type hypersensitivity均需要藉由NF- κ B的途徑。在類風濕性關節炎取出的滑液膜細胞培養及關節滑液膜細胞免疫染色，均可看到NF- κ B的表現增加(Simmonds et al., 2008)。NF- κ B家族包括下列五種蛋白質NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB及

c-Rel。這些分子平時在細胞質中和I κ B 結合，維持在不活化的狀態，而在不同的細胞組織中NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100)及RelA (p65)是最常見的。在細胞受到適當的訊息後，比如說是細胞激素的刺激，Toll-like receptors (TLRs)被其所相對應的危險訊息所活化或是壓力等等事件，引起宿主防衛反應的訊息傳導路徑被活化。其主要是透過I κ B被I κ B kinase (由三個次單位所組成包括IKK α , IKK β , and IKK γ /NEMO)所磷酸化，之後I κ B會被ubiquitination 並且被 26S proteasome所分解，而被釋放出來的NF- κ B就會進入細胞核內，和其對應的DNA 序列作結合，進一步引起許多促進發炎的基因包括cytokines, chemokines, adhesion molecules, growth factor, immune receptors及prosurvival proteins的表現。而在類風濕性關節炎臨床治療上，針對TNF- α , IL-6及IL-1所設計出來的生物製劑，對於類風濕性關節炎的治療均證實有效，並且對於傳統治療失敗者，效果相當好。而這些細胞激素均由NF- κ B所調控的。因此，有許多科學家正在研究如何抑制NF- κ B的訊息傳導途徑，來達到控制類風濕性關節炎的發炎反應，可以一次減少這些眾多發炎因子的製造。

而本實驗發現ACPAs可以促進健康人PBMC p50及p65的DNA結合活性，也進一步說明ACPAs促進發炎反應的能力是經過NF- κ B所媒介的，我們注意到，在NF- κ B的DNA結合活性中，固然p50及p65的DNA結合活性在給予ACPAs一同培養後，統計上雖然其DNA結合活性有上升，但是幅度不大。猜測因為PBMC是一群細胞的組合包括T細胞，B細胞及單核球(monocyte)，而NF- κ B的DNA結合活性增加或許只出現在某群細胞中，以單核球為最可能，但在其他不反應的細胞中，其影響很可能會被稀釋掉。事實上，我們後續以U937細胞所進行的實驗，發現其NF- κ B family中的DNA binding activity 不只在p50及p65有明顯的增加，其數據差距更大，而另外新增一個p52的DNA binding activity也明顯增加，符合我們的猜

測，在ACPAs促進PBMC的NF- κ B的DNA結合活性增加，其差距數值偏低是被其中有一大部分對ACPAs刺激不反應的淋巴球所稀釋甚至於遮掩著了。

我們發現ACPAs可以一致性的在PBMC及U937細胞中活化p50及p65。事實上，在單核白血球及巨噬細胞中，p50及p65所組成的heterodimer是在這些細胞被活化後，扮演主要的訊息傳導的角色(Li et al., 2005; Ciesielski., et al., 2002)。在類風濕性關節炎中，p50及p65所組成的heterodimer可以在大量表現的發炎關節內巨噬細胞或synovial fibroblast大幅度的增加活性(Yamasaki et al., 2001; Handel et al., 1995)。當然我們的實驗中發現p65的DNA binding activity增加最多，很可能是因在p50及p65所組成的heterodimer，p65才有DNA binding domain，而我們測量NF- κ B主要是偵測其DNA binding activity，所以其差異看起來最明顯。另一方面，我們以ELISA的方式得到NF- κ B家族中，p50及p65的DNA結合活性有增加，但是我們並不清楚這樣的變化是否是因為I κ B被I κ B kinase所增加磷酸化，導致之後I κ B會被ubiquitination增加，或是p50及p65本身製造的量增加所致，這需要等待未來我們以西方點墨法去證實。

接下來，我們直接以純化出來的ACPAs來做為第一抗體，以流式細胞儀偵測，發現ACPAs只會作用在部分的PBMC身上，我們進一步區分出淋巴球及單核球，ACPAs主要是和單核球作結合，而血液中的單核球之後會分化成組織中的巨噬細胞，也是發炎反應中產生大量TNF- α 的主要來源，而淋巴球比較不會有如此反應，也符合我們的預期，並且也印證我們之前的想法，即ACPAs促進PBMC的NF- κ B的DNA結合活性增加幅度不大，是被其中一大部分的淋巴球所干擾了。然而，ACPAs還是可以和淋巴球作結合，而我們之後所找到的其作用分子GRP78，也在淋巴球上有表現，因此，並不能排除ACPAs在某方面，也許透過GRP78或其他蛋白質，影響了淋巴球的功能，從而參與了風濕性關節炎的致病機轉的可能

性，但是這需要進一步的研究才能明朗。

因為單核球細胞表面會有很多受器(receptors)可以跟抗體的Fc region (Fragement, crystallizable)結合，Fc receptors主要的功能是和已經結合在受感染細胞或入侵微生物上的抗體結合，之後活化細胞進行antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity or phagocytosis，Fc receptors的種類有許多，在單核球表現主要是以Fc γ R為主。然而，在進行流式細胞儀的分析中，很可能我們在染色的過程中，ACPAs會藉由Fc receptors結合在單核球的細胞表面，而不是真正的結合在我們所假設的特殊膜蛋白質上。因此，我們盡可能的要排除Fc receptor的干擾，參考了文獻後，我們使用0.1% sodium azide 及non-specific human IgG事先予以阻斷Fc receptor，在細胞染色的過程中，也一直存在有0.1% sodium azide，並且依照雜誌社編輯的看法，在染色時加入isotype control，而且我們之後只要是進行流式細胞儀的分析，都是採這個方式，應該可以充分排除Fc receptor的干擾。最後找到GRP78是ACPAs的自體抗原，我們將其瓜氨酸化後，可以完全抑制掉ACPAs所造成的U937細胞的TNF- α 的釋放，也可以證明ACPAs所造成的U937細胞或PBMC的TNF- α 的釋放，並不是透過Fc receptors。

因為人體血液中，單核白血球佔所有白血球數目只有3-10%，再加上處理上的損失，需要大量的血液，臨床上執行有困難，加上因個體的不同，會增加研究上的干擾因子，我們下一步就選擇單核球的代表細胞株U937來進行以後的研究。U937是人類血癌單核球淋巴癌細胞株，是文獻中常常用來當單核白血球的代表。本實驗顯示了純化出來的ACPAs和健康人單核白血球一起培養可以促進單核白血球TNF- α 產生及NF- κ B活化。雖然我們排除了immunoglobulin和Fc receptor的可能干擾，然而尚存在其他可能的干擾因子，如:是否在純化抗體過程中有LPS的污染，類風濕性關節炎血清中有其他促進TNF- α 產生的物質，(比如說是其他的

細胞激素或是自體抗體均可能導致純化出來的ACPAs促進健康人單核白血球產生TNF- α 的現象)。因此之後我們利用U937細胞來進一步找出ACPAs作用在細胞膜上的關鍵分子，來促進單核白血球TNF- α 產生及NF- κ B活化。



第三部分 尋找抗瓜氨酸化胜肽抗體促進發炎反應的作用分子

根據前述的研究，我們發現到抗瓜氨酸化胜肽抗體會促進單核球產生 TNF- α 及增加 NF- κ B 的 DNA 結合活性並且可以和細胞膜上的分子作用，然而尋找文獻未能找到相關的研究。因此我們以 U937 細胞為其細胞模式，進一步研究探討其分子機轉。實驗上，我們首先確定了抗瓜氨酸化胜肽抗體同樣可以促進 U937 細胞株腫瘤壞死因子的分泌，增加 NF- κ B 轉錄因子的 DNA 結合活性，最重要的 ACPAs 可以和 U937 細胞膜上的分子作用，而 U937 細胞在文獻上也被廣為接受可以代表人類的單核白血球，因此，之後的實驗就以 U937 細胞進行。我們有注意到在一樣的細胞數 1×10^6 下，抗瓜氨酸化胜肽抗體似乎對於健康人的 PBMC，比較會促進其 TNF- α 釋放，而對於 U937 細胞株，就比較差一點。若考慮健康人的 PBMC 尚包括許多細胞，如淋巴球，不會產生 TNF- α ，兩邊的差距就顯得更大了。有可能是 U937 細胞株是癌細胞，多少會影響其細胞的性質，使得其對抗瓜氨酸化胜肽抗體造成的 TNF- α 釋放，比起正常的單核球少得多。也有可能是健康人的 PBMC 含有淋巴球及其他細胞，或許也有表現 citrullinated GRP78 或其他未知的瓜氨酸化蛋白質，可以和 ACPAs 結合，提供單核球輔助的訊號，使得抗瓜氨酸化胜肽抗體造成的 TNF- α 釋放，在健康人的 PBMC 比較增加，當然這需要進一步研究才能釐清。

我們進一步釐清先前的實驗所未排除的其他可能干擾因素，主要是在純化抗體過程中可能會被細菌的內毒素 LPS 所污染及類風濕性關節炎血清中有其他促進 TNF- α 產生的物質。我們發現在 U937 細胞上加入抗瓜氨酸化胜肽抗體及 polymyxin B 或 anti-TLR4 Abs，並不會減少抗瓜氨酸化胜肽抗體所增加的 TNF- α 的分泌，而 polymyxin B 是傳統上用來阻斷 LPS 的活性，而近來發現 anti-TLR4 Abs 可以更專一的阻斷 LPS 和 TLR4 的結合。加上製備抗瓜氨酸化胜肽抗體的過程中，

我們都有定期更換溶液及小心操作，我們純化出來的ACPAs及使用同樣的親合性管柱 (affinity column) 的方式來製備去除 ACPAs 的類風濕性關節炎血清 (ACPA-depleted RA sera) 以最敏感的 limulus amoebocyte lysate assay 來偵測，其內毒素 (endotoxin) 的濃度均小於 0.5 EU/ml，約略等於 50pg/ml，遠低於刺激 U937 細胞所需的濃度，而且最重要的是 ACPAs 及 ACPA-depleted RA sera 兩者的內毒素值類似，而 ACPA-depleted RA sera 並不會引起 U937 細胞株的 TNF- α 釋放，因此可以排除 LPS 的污染的可能性，同時也可以排除類風濕性關節炎血清中有其他促進 TNF- α 產生的物質。LPS 是環境中常見的污染物，當然是測不到最好，但是以一般的實驗室操作，事實上很困難達到此地步，參考其他的文獻，許多研究均以小於 0.5 EU/ml 為參考值 (Clavel et al., 2008)，我們也有嘗試以商業套裝組合 EndoTrap 來試圖再降低 LPS 的濃度，但是並未有效，這有待後來的研究方法的突破，才可能解決。

我們注意到，CCP 本身雖然可以減少抗瓜氨酸化胜肽體所促進 TNF- α 的分泌，但是並不能完全阻斷之，我們合理推論是因為 CCP 是 21 個氨基酸，分子量不大，所能提供和 ACPAs 的結合處只有單一個瓜氨酸，並不能和 ACPAs 形成穩定的結合。然而在純化時 ACPAs 還有跟 NHS-activated Sepharose 的大分子多處結合，可以增加 ACPAs 的結合力。而相反的 U937 細胞株細胞膜上的瓜氨酸化的蛋白質可能有多處瓜氨酸化而且是大分子，ACPAs 可以與其形成穩定的結合，因此可以合理解釋 CCP 不能完全抑制掉 ACPAs 和 U937 細胞株細胞膜的結合。當我們找到和 ACPAs 結合的膜蛋白質 GRP78，我們可以把它瓜氨酸化，這 citrullinated GRP78 可以來完全阻斷 ACPAs 所促進 TNF- α 的分泌，如此也可以間接說明我們的想法是對的。

我們在利用以 Western blot 方法找出 ACPAs 與 U937 細胞膜上可能的作用分

子，發現至少有三群以上(事實上的作用分子更多)的蛋白質分子均可和 ACPAs 作用，而 ACPA-depleted RA sera 並不會跟 U937 細胞膜上的蛋白質作用，顯示我們純化的 ACPAs 並未參雜其他類風濕性關節炎自體抗體，也顯示 ACPAs 和抗原的結合很可能是依賴 citrullinated epitope 而不是某特定的蛋白質結構，而且 U937 細胞株細胞膜上有許多 citrullinated 的蛋白質。我們重複此實驗步驟三次，其在 Western blot 呈色的位置均一致，最後我們在同一個電泳槽同時跑兩片膠，一片照上述的方式以 ACPAs 或 ACPA-depleted RA sera 做第一抗體，以 Western blot 方法確定這三個區域，另外一片以 Coomassie blue 直接在膠上呈色，找出蛋白質的分布區域。因此我們直接把呈色的片墊在染 Coomassie blue 後的膠下，經過比對後，將這三個和 ACPAs 作用的蛋白質區域，在相對電泳膠區域以刀片切下，送蛋白質鑑別，如此一來，可以避免不同次的實驗，蛋白質在電泳膠上的相對位置的變動，可以更精確的找到我們想要的蛋白質。

史丹福大學的蛋白質分析鑑定報告顯示在 40-45Da protein region 為 fructose-bisphosphate aldolase A, macrophage-capping protein。而 fructose-bisphosphate aldolase A 是醣水解酵素，依據前人的研究報告，和數個相關酵素組成複合物位於細胞膜的 inner surface(Campanella et al., 2008)，跟我們之前的流式細胞儀的分析在細胞膜 outer surface 不符合，macrophage-capping protein 也是位於細胞膜的 inner surface，可以罩在巨噬細胞細胞膜尖突處 actin filaments 的末端，也不是可能的目標(Young et al., 1994)。而 50-55Da protein region 為:KIAA0115 及 protein disulfide isomerase-related protein 5，KIAA0115 是 protein glycosyltransferase 48 kDa subunit precursor，而其所組成的蛋白質 dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase，主要是在內質網中進行蛋白質糖化修飾反應，在細胞膜外側是否表現並不知道，跟發炎反應的關係

亦無資料可查，而 protein disulfide isomerase-related protein 5 猜測可能也是位於內質網內的蛋白質，可能幫助蛋白質組裝，但有關的研究相當少。70-75kDa protein region 為: Moesin，78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP78, BiP), Moesin 也是位於細胞膜的 inner surface，負責傳遞外界的刺激，進一步影響細胞骨架的變化。而最後是 GRP78，文獻查詢中顯示其和發炎反應及類風濕性關節炎有密切相關，且可以表現在細胞膜。所以我們猜測 ACPAs 很可能是透過影響 GRP78 的功能來達到促進 U937 細胞株腫瘤壞死因子的分泌，增加 NF- κ B 轉錄因子的 DNA 結合活性，然而其他上述的分子是否有參與其中並不能完全排除，或是其他 U937 細胞膜蛋白和 ACPAs 反應的量更少的，因此並未被送去鑑定出來的區域，但很可能有其重要性，留待之後研究再探討。我們比較訝異的是，在進行蛋白質鑑定之前，我們預測其中有些區域是 Fc receptors，但是結果卻不是，也許是在其他較不明顯的區域，也可以說明，ACPs 和其抗原的結合親合度是很強的。

在前人的研究中發現類風濕性關節炎患者的血清存在對抗 GRP78 的自體抗體，而 GRP78 可以專一性的促進類風濕性關節炎患者關節內的 T 細胞增生，而反之，其他非類風濕性關節炎的發炎性關節炎則無此現象(Corrigall et al., 2001; Blass et al., 1995; Blass et al., 1997)。而 anti-GRP78 Abs 在更大規模的病人族群中也被證實存在類風濕性關節炎患者的血清中，其特異度達 71%而敏感度有 73%，若為早期類風濕性關節炎，其特異度有 65%，敏感度則為 66%。anti-GRP78 Abs 在類風濕性關節炎病發前 2.5 年的血清中就已經存在了，其特異度尚有 65%，而敏感度有 45%(Bodman-Smith et al., 2004)，給予有效的對抗類風濕性關節炎的治療後(腫瘤壞死因子阻斷劑)，患者血清中的 anti-GRP78 Abs 的效價會下降，這些特性都和 ACPAs 類似(Mavropoulos et al., 2005)。GRP78 在類風濕性關節炎的滑

液膜上也是大量表現，如果用 anti-HLA-DR antibodies 來阻斷可能的調節性 T cell 的作用，則會有更多的類風濕性關節炎患者血中的 T 細胞對 GRP78 有增生的反應(Blass et al., 2001)。GRP78 的可能 signaling pathway，在攝護腺癌的研究中有清楚的說明(Misra et al., 2006)，當然在免疫系統是否也是如此，則沒有研究。主要是 $\alpha 2M^*$ 可以透過和細胞膜上的 GRP78 引發攝護腺癌細胞株的增生，其分子機轉是透過活化 MAPK and Akt-dependent signaling，抑制 apoptotic signaling 及啟動 unfolded protein response signaling 而來的，而這些訊息傳導和細胞生理的變化，事實上也和發炎反應及細胞激素的釋放息息相關。

在機轉方面，老鼠的類風濕性關節炎(Collagen induced arthritis)模式中，從外界給予GRP78可以減輕關節炎的嚴重度，可能是藉由IL-4來抑制疾病的活動度(Brownlie et al., 2006)。至於在人類方面，GRP78可以促進健康人的PBMC產生抗發炎的細胞激素，雖然一開始，GRP78會促進健康人的PBMC產生TNF- α ，然而接下來主要產生的是IL-10及soluble TNF receptor II and IL-1 receptor antagonist。加入MAPK p38的抑制劑SB203580後，可以抑制GRP78所造成的PBMC TNF- α 及IL-10釋放，而MAPK ERK-1/2的抑制劑PD98059則無影響。而且單核球和GRP78一起培養後，其CD86及HLA-DR的表達會下降。最近，有學者以二維蛋白質電泳加上精密的質譜儀，以HL-60細胞株的蛋白質粹取物做受質，尋找類風濕性關節炎的可能的自體抗原，他們再次證實GRP78是其中重要的自體抗原之一(Goeb et al., 2009)。因此在經過仔細的文獻回顧之後，GRP78是廣泛被提到和類風濕性關節炎高度相關的分子，而且可以影響免疫系統。至於其他我們找到的蛋白質如fructose-bisphosphate aldolase A, macrophage-capping protein, KIAA0115, protein disulfide isomerase-related protein及Moesin等，並未有相關的研究。前人的研究已經發現 $\alpha 2M^*$ 經由細胞膜上的GRP78可以引發攝護腺癌細胞株NF- κ B

activation，跟我們觀察到的ACPAs可以引發PBMC及U937細胞株的NF- κ B activation雷同，雖然我們的細胞株並不相同，但由於NF- κ B是引發發炎反應的關鍵轉錄因子，此發現仍然是很重要的參考資訊，因此我們高度懷疑GRP78應該是ACPAs結合並造成發炎反應的關鍵分子，雖然其他的分子仍然有其潛在的可能性。我們之後會以西方點墨法去驗證，是否GRP78可以和ACPAs結合，其GRP78是否有瓜氨酸化，最後看其GRP78是否可以抑制ACPAs所造成的U937細胞的TNF- α 釋放。



第四部分 GRP78 是抗瓜氨酸化胜肽抗體產生發炎反應的關鍵分子

在先前的研究中，我們發現 GRP78 很可能是與 ACPAs 結合並造成 U937 細胞產生發炎反應的關鍵分子。固然前人的研究顯示 GRP78 是類風濕性關節炎可能的自體抗原而且 anti-GRP78 Abs 在類風濕性關節炎發病前的血清中就存在了，GRP78 在調控發炎反應上也扮演重要的角色，然而是否真是如此，需要進一步去確認。另外，為什麼 ACPAs 會結合在 GRP78，是否 GRP78 有瓜氨酸化的可能也需要澄清。因此我們購入合成的 GRP78，並以西方點墨法看看是否可以和 ACPAs 結合，另一方面，我們也試圖去證明 GRP78 是否有瓜氨酸化的可能。

我們以流式細胞儀的方法，來觀察不同的抗體及抗體或抗體及抗原的競爭反應。我們首先發現不同濃度的抗瓜氨酸化胜肽抗體(0, 50IU, 250IU)可以依據 dose-responsive 的規律來抑制 anti-GRP78 (H-129)和 U937 細胞膜的結合(結合度 95.24%, 43.02%, 16.95%)。因此我們合理推測 ACPAs 和 anti-GRP78(H-129) Abs 有重疊的抗體辨認區域(shared epitopes)。反之不同濃度的 anti-GRP78 (H-129) 0, 1, 10 μ g 卻只能些許抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞膜的結合(結合度 95.30%, 93.48%, 89.72%)，事實上，除了 GRP78 外，抗瓜氨酸化胜肽抗體至少還可以跟 fructose-bisphosphate aldolase A, macrophage-capping protein, KIAA0115, protein disulfide isomerase-related protein 及 Moesin 作用，而這些蛋白質都不是 anti-GRP78 (H-129)所能結合的，因此 anti-GRP78 (H-129)只能些許抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞膜的結合，因此 U937 細胞膜上其他的瓜氨酸化蛋白質，有待我們之後進一步探討其功能。

我們購入細菌合成的 GRP78，其並不能抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞膜的結合，此結果有點出乎我們的意料。但是經過推敲，固然首先考慮的解釋是 GRP78 根本不是 ACPAs 和其結合的蛋白質，不過這個推測並不能解釋先前的

結果，即抗瓜氨酸化胜肽抗體可以成 dose-responsive 的抑制 anti-GRP78 (H-129) 和 U937 細胞膜的結合。第二個可能性是合成的 GRP78 本身並未有瓜氨酸化，因此無法和抗瓜氨酸化胜肽抗體結合，而 U937 細胞膜的 GRP78 有瓜氨酸化，可以和抗瓜氨酸化胜肽抗體結合。為了證明此點，我們將購入的 GRP78 在加入 PAD 後予以瓜氨酸化，並以瓜氨酸化的 GRP78 先和抗瓜氨酸化胜肽抗體來作用，可以發現瓜氨酸化的 GRP78 可以些許抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞膜的結合(結合度 94.51%, 93.11%, 90.35%)，這種情況和 anti-GRP78 (H-129) 只能些許抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體和 U937 細胞膜的結合相似，主要也是抗瓜氨酸化胜肽抗體是 polyclonal antibodies 各自針對不同的瓜氨酸化的蛋白質結合，而抗瓜氨酸化 GRP78 抗體只是其中的一部分。另外還有一種可能性，我們以購買的 PAD 來作 GRP78 的瓜氨酸化的反應，事實上我們所用的 1 μ g 及 10 μ g 的瓜氨酸化的 GRP78，是指反應前我們所加入的 GRP78 的量，我們假設是 GRP78 可以 100%被瓜氨酸化，但是事實上是否如此，我們並無法得知，這也許也會影響和抗瓜氨酸化胜肽抗體中和的效果。然而這樣的想法需要進一步的實驗來確認。

我們將先前純化的U937細胞膜蛋白質以anti-GRP78 Abs(H-129)做為第一抗體，以西方點墨法呈色，其蛋白質在膜上的相對位置約在72kDa處和之前ACPAs的位置一樣，我們初步確定GRP78在電泳膠上位於72kDa的位置。我們購買合成的GRP78，以anti-GRP78 Abs(H-129)做為第一抗體，以西方點墨法呈色，也可以顯示其位置，但是因為合成的GRP78有GST tag，因此分子量約為97.33 kDa。但是合成的GRP78，以ACPAs做為第一抗體，以西方點墨法呈色，並不會有任何反應，顯示合成的GRP78不能和ACPAs結合，這也符合我們之前實驗的結果，合成GRP78本身，沒有被瓜氨酸化，所以並不能抑制抗瓜氨酸化胜肽抗體和U937細胞膜的結合。

我們以不同的抗體goat polyclonal antibody against N-terminal of human GRP78(N-20)做為結合抗體，以之前純化的U937細胞膜蛋白質做受質，以免疫沉澱法純化出U937細胞膜上的GRP78。主要使用不同的抗體來純化是因為，如果我們用同樣的抗體做免疫沉澱，所得的產物是anti-GRP78 Abs(H-129)及GRP78，在之後的西方點墨法呈色分析時，若以anti-GRP78 Abs(H-129)(來自兔子)做第一抗體，再用anti-rabbit-HRP為第二抗體分析，其膜上和GRP78反應的anti-GRP78 Abs(H-129)及膜上原有的anti-GRP78 Abs(H-129)及碎片，都會被anti-rabbit-HRP所認到，最後呈色時，不曉得有反應的區域是GRP78或是anti-GRP78 Abs(H-129)及其碎片。而用不同物種的抗體純化，固然之後跑電泳膠及轉漬到PVDF膜上仍然有許多anti-GRP78 Abs(N-20)及其碎片，但是因為第二抗體可以區分不同物種的抗體，所以第二抗體只會認識和GRP78結合anti-GRP78 Abs(H-129)(rabbit)，而anti-GRP78 Abs(N-20)及其碎片因為是goat antibody，所以不會被認到，可以專一的認識所要的目標。雖然如此，不可否認的是，第二抗體的專一性低，我們再以單純電泳膠只跑anti-GRP78 Abs(N-20)抗體本身，再用第二抗體Anti-rabbit-HRP呈色，我們確定所用的第二抗體(Anti-rabbit-HRP)並不會去結合anti-GRP78 Abs(N-20)(goat)(如圖十九)。

我們有注意到anti-GRP78 Abs(H-129)可用以anti-GRP78 Abs(N-20)為抗體並以免疫沉澱法取出的GRP78染出其72kDa及55kDa的區域，而ACPAs只能跟55kDa的區域作用。我們推測這55kDa的區域應該是GRP78的斷裂蛋白質，因為被瓜氨酸化後，結構上變得比較脆弱，在實驗的過程中產生斷裂，而72kDa為未被瓜氨酸化的GRP78，這在之後的實驗中被證實(如圖二十)。我們並尋找文獻，發現在其他的實驗中，GRP78也會有斷裂蛋白質的產生，因此也支持我們的想法(Hu et al., 2004; Person et al., 2006)。另外，依據Tarcsa的研究指出，蛋白質被瓜氨酸化

會導致其喪失原本的精氨酸所帶有的正電荷，因此會導致蛋白質內電荷的變化，喪失一些離子之間的結合力，甚至連氫鍵也會受到影響，最終會造成蛋白質結構的改變，加速其分解。因此，我們推測是瓜氨酸化的GRP78結構上變得比較脆弱，在進行免疫沉澱法的過程中容易產生斷裂，而未被瓜氨酸化的GRP78則否。事實上，我們把合成的GRP78給予瓜氨酸化，其他並未在作任何處置，果然在西方點墨法的分析中，發現其瓜氨酸化的GRP78也有分解的現象，這可以充分說明我們的看法是正確的。

我們之後同樣以 anti-GRP78 Abs(N-20) 為抗體，用免疫沉澱法取出的 GRP78，並以商業購買的 anti-modified citrullination Abs 來偵測是否 GRP78 有被瓜氨酸化，此方法主要是由 Senshu T 所提出的，其原理是瓜氨酸化的蛋白經轉漬到 PVDF 膜上後，以含有 2, 3-butanedione monoxime, FeCl₃ 及 antipyrine 的強酸溶液使其瓜氨酸產生化學修飾，並以製備好的抗修飾過的瓜氨酸的抗體作用，偵測蛋白質上是否有瓜氨酸化的情況 (Senshu et al., 1992)。結果如我們所預測的，55kDa 區域的確有瓜氨酸化的情況而 72kDa 的區域則否。另一方面，我們使用 ACPAs 來做免疫沉澱，也發現 anti-GRP78 及 anti-MC 均可以和 55kDa 的區域做結合。雖然我們有嘗試把這 55kDa 的區域切下來送蛋白質鑑定，但是結果主要是有許多抗體的片段，因為都是屬於羊的，我們可以確定這些抗體的片段是來自 anti-GRP78 Abs (N-20)，但我們之前的研究已經排除其可能性了，結果中雖然有數條分子量符合以電腦預估的可能 GRP78 片段 (在 GRP78 的蛋白質序列中找出 trypsin 的切開處，再算出其數個氨基酸所組成的蛋白質片段的分子量)，但是因為量太少，或是跟抗體的片段靠近，無法作更進一步氨基酸定序，甚為可惜。

根據之前流式細胞儀抗體競爭試驗的結果，我們推測 ACPAs 和 anti-GRP78 (H-129) Abs 有重疊的抗體辨認區域 (shared epitopes)。anti-GRP78 (H-129) Abs 是免

子的多株抗體(rabbit polyclonal antibody)，係針對GRP78蛋白質C端第525-653個氨基酸所產生的，經過查蛋白質序列，這區域含有四個精氨酸，可能是轉變為瓜氨酸的位置，當然其他的地方也不能完全排除。

因為我們所使用的膜蛋白質套裝組合，主要是以不同的density gradient來萃取膜蛋白質，並不只取出細胞膜outer surface的蛋白質，而inner surface的蛋白質也會一併被分離出來。事實上，之前以西方點墨法所找到和ACPAs結合的U937膜蛋白質，也有數個是表現在細胞膜的inner surface。是否瓜氨酸化的GRP78蛋白質和ACPAs真的是在U937的細胞”表面”結合，而不是在細胞膜的內面(inner surface)或是甚至於在準備膜蛋白質中，附帶被離下來的一些細胞內含膜的胞器(主要是富含GRP78的內質網)，而在細胞外的實驗被人為的方式碰在一起，而產生反應的。為了排除此種可能，我們把完整的U937細胞的細胞膜，使用 Sulfo-NHS-Biotin 予以標示，而 Sulfo-NHS-Biotin 主要是標示在細胞外面蛋白質的 Lysine 上，之後再將完整的細胞跟 ACPAs 作用後，打破細胞，使用 Protein G 把和 ACPAs 作用的蛋白質抓下來，以 Comassie Blue 來染 SDS gel，我們發現當然可以跟 ACPAs 作用的蛋白質並不只有一個，但是我們以 anti-GRP78 (H-129) 當第一抗體，可以發現仍然是在 55kDa 有呈色反應，是 GRP78 的片段，使用 streptavidine conjugated with HRP 可以顯示 55kDa 的 GRP78 片段的確有 Biotin 的標示，證明 ACPAs 和 GRP78 的作用是發生在細胞表面。

最後我們將購買合成的 GRP78，參考之前的文獻，加入 PAD 及高濃度的鈣離子後三小時，使得其上的精氨酸轉變為瓜氨酸，我們發現在 97kDa 處(因為 GRP78 尚有加 GST tag)，可以被 anti-GRP78 及 anti-MC 所認得。而在約 72kDa 處的 GRP78 的斷裂蛋白質則可以被 anti-GRP78，ACPAs 及 anti-MC 所認識，而原本的 97kDa 處則可以被 anti-GRP78 及 anti-MC 所認識。我們猜測可能是因為合成的 GRP78 的

GST-tag會有可能形成立體的結構，影響ACPAs的結合。而在之前及目前實驗中，GRP78被瓜氨酸化似乎容易損失17-25kDa的蛋白鏈(分別為72kDa減少到55kDa；97kDa減少到72kDa)，是否GRP78被瓜氨酸化後，結構發生改變，變得容易斷裂，只是猜測而已，需要更多的研究去證實。最後，這個人為瓜氨酸化的GRP78可以大幅到幾乎完全地抑制ACPAs所造成的U937細胞的TNF- α 製造，也證明了ACPAs所促成的U937細胞的TNF- α 製造是經過瓜氨酸化的GRP78。進一步的訊息傳導的研究，顯示ACPAs所促成的U937細胞的TNF- α 製造是經由MAPK pathway，至少是Erk1/2。然而我們尚未完全評估其他的重要的MAPK pathway，如JNK及p38，也缺乏一些重要的控制組，如ACPA-depleted RA sera，ACPAs+anti-TLR4及ACPAs+cit-GRP78等，須要進一步實驗才能證明。

本研究找到細胞膜上瓜氨酸化的GRP78是ACPAs重要的自體抗原。之前的研究雖然發現了GRP78是類風濕性關節炎重要的自體抗原，但是並未能合理的解釋anti-GRP78 antibodies/GRP78如何在類風濕性關節炎扮演角色，anti-GRP78 antibodies的特性跟ACPAs有點類似，在類風濕性關節炎病發前的血清就已經存在了，在給予有效的對抗類風濕性關節炎的治療後(腫瘤壞死因子阻斷劑)，類風濕性關節炎患者血清中的anti-GRP78 Abs的效價會下降。因此很可能anti-GRP78 Abs也是透過monocytes細胞膜上的GRP78來影響類風濕性關節炎的產生。當然本研究並非著眼於此，但是值得進一步探討此假說的可能性。然而雖然本研究提出了ACPAs藉由直接結合在細胞膜上瓜氨酸化的GRP78，促進單核白血球TNF- α 的釋放及轉錄因子NF- κ B的活化。也藉由此分子機轉直接引起發炎反應，從而參與了類風濕性關節炎的致病機轉。但是下游的分子生物學的機轉仍然不清楚，而了解整個瓜氨酸化的GRP78如何以特定的分子機轉促進單核白血球TNF- α 的釋放及轉錄因子NF- κ B的活化，有助於在下一步針對適當的蛋白質目標，設計適當的

標靶治療，來進行之後的治療，從而改善類風濕性關節炎病人的預後。

在文獻中有學者發現 $\alpha 2M^*$ 透過和細胞膜上的GRP78引發攝護腺癌細胞株的增生(Misra et al., 2006)，其下游的分子生物學的機轉詳細如下， $\alpha 2M^*$ 引起phosphatidylinositol 3-kinase-dependent Akt活化，藉由phosphorylation Akt的Thr-308 and Ser-473，增加其kinase的酵素活性約60 - 80%，ERK1/2及p38 MAPK也有被活化的現象，但是JNK的活化就不明顯。另外細胞凋亡的情況會減少，NF- κ B 的活化會增加，而許多抗細胞凋亡及其他的分子如Bcl-2, p-Bad^{Ser-136}, p-FOXO1^{Ser-253}, p-GSK3^{Ser-9}, XIAP, NF- κ B, cyclin D1, GADD45 β , p-ASK1^{Ser-83}, and TRAF2也隨著攝護腺癌細胞株和 $\alpha 2M^*$ 共同培養的時間增加而增加。而促細胞凋亡的分子如 caspase-3, -9, or -12, 則如預期無表現增加的狀況，另外，參與unfolded protein response signaling的蛋白質如 GRP78, IRE1 α , XBP-1, ATF4, ATF6, p-PERK, p-eIF2 α 及GADD34表現均有增加，而GADD153表現減少，而以RNAi的技術來抑制GRP78的表達，可以抑制 $\alpha 2M^*$ 引起的攝護腺癌細胞株造成的Akt^{Thr-308}, Akt^{Ser-473}和I κ B kinase α kinase活化。

雖然我們用的細胞株並不一樣，U937細胞上的GRP78另有被瓜氨酸化的情形，然而跟我們發現ACPAs是透過瓜氨酸化的GRP78來引起U937及健康人PBMC的NF- κ B activation有些雷同，而MAPK and Akt-dependent signaling，apoptotic signaling及unfolded protein response signaling也跟免疫系統、淋巴球活化及發炎反應密切相關，而這些反應也常在類風濕性關節炎的致病機轉中被提到。根據前人的研究結果，我們下一步預定先探討MAPK及Akt-dependent signaling是否會被ACPAs所誘發，U937及健康人PBMC細胞凋亡是否會受影響，最後希望測定unfolded protein response signaling是否也被活化，目前已經初步發現MAPK pathway中的Erk1/2，很可能是主要的途徑，我們希望藉由對ACPAs是透過瓜氨酸

酸化的GRP78來引起U937及健康人PBMC的發炎反應更進一步的了解，能幫忙找到可能的分子目標，以利之後設計治療的方向。

在許多自體免疫疾病的致病機轉中，自體抗體扮演了相當重要的角色。本研究的發現，說明ACPAs之於類風濕性關節炎也如同anti-acetylcholine receptor antibodies之於myasthenia gravis，anti-TSH receptor antibodies之於Graves' disease，可以直接結合到目標的細胞或器官，直接參與疾病的產生，而不是只是單純的疾病指標。不過要注意的是，在研究中，我們發現ACPAs可以和許多單核白血球的細胞膜蛋白質作反應，我們並未一一去作分析，有些比較弱的結合蛋白質更沒有去作蛋白質鑑定，因此ACPAs也許可以透過其他不同的機轉來參與類風濕性關節炎的致病機轉。

本研究雖然找出ACPAs藉由直接結合在細胞膜上瓜氨酸化的GRP78，促進單核白血球TNF- α 的釋放及轉錄因子NF- κ B的活化。也藉由此分子機轉直接引起發炎反應，從而參與了類風濕性關節炎的致病機轉，我們也進一步想探討之後的訊息傳導路徑。然而就大方向而言，事實上還有許多疑問尚未釐清，整理如下

1. 之前有許多研究顯示類風濕性關節炎患者其血清中有 anti-GRP78 antibodies 的存在，這些抗體是否如同 ACPAs 一樣，可以引起 monocytes 釋放 TNF- α ?
2. 這些 anti-GRP78 antibodies 是否可以和瓜氨酸化的 GRP78 結合，並引起單核球及 U937 細胞 TNF- α 的釋放?
3. Anti-GRP78 antibodies 是否先產生，之後因為結構類似才產生對瓜氨酸化的 GRP78 有反應的 ACPAs；還是 ACPAs 先產生，之後因為結構類似才產生 anti-GRP78 Abs?
4. GRP78 可以在細胞膜上表現，其正常的生理功能為何?
5. GRP78 在何處被瓜氨酸化，是否在細胞內和 Peptidylarginine deiminase 有結合

而被瓜氨酸化，還是表現在細胞膜上，被 monocytes 所釋放的 Peptidylarginine deiminase 作用而被瓜氨酸化？

6. GRP78 被瓜氨酸化的確定氨基酸序號為何？
7. GRP78 被瓜氨酸化是否結構上變得比較容易斷裂，甚至於會引發其他的酵素反應如 Ubiquitination？
8. 瓜氨酸化對 GRP78 的功能是否有影響，是促進其功能或是抑制，或是甚至於產生不同的功能？
9. 其他 monocytes 的細胞激素如 IL-1beta, IL-6, IL-8, GM-CSF 是否也會受影響？
10. ACPAs 對於其他在類風濕性關節炎上扮演重要角色的細胞如 synovial fibroblast, T cells 及 osteoclast 的功能是否也有影響？
11. ACPAs 結合在細胞膜上瓜氨酸化的 GRP78 後，除了增加 NF- κ B 轉錄因子的 DNA 結合活性，還有透過何種 signaling pathway 來引起 monocytes 釋放 TNF- α ？
12. 是否瓜氨酸化的 GRP78 可以阻斷類風濕性關節炎患者的發炎反應及 cytokines network

這些問題都是日後的研究方向，目前類風濕性關節炎的治疗因為之前學者對於 cytokines network 的研究，設計出新的生物製劑，在治疗類風濕性關節炎產生重大的成功，但是仍然有部分患者對現在的治疗反应不佳，及昂貴的藥費和感染的副作用，希望藉由對於類風濕性關節炎致病機轉更深入，更專一的了解，我們可以設計出更專一的治疗方式，使類風濕性關節炎的患者得到更好的治療。

五 展望

第一節 類風濕性關節炎目前治療的困境

有關類風濕性關節炎的治療隨著對疾病致病機轉的了解而出現重大的改變，最早類風濕性關節炎的治療是採取金字塔型的療法，患者首先是採復健治療，若疼痛無法控制，則輔助以非類固醇消炎止痛藥，如此通常持續數年，等到關節已經有明顯侵蝕時，才開始加上病程修飾抗風濕藥物(disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs)，而且 DMARDs 藥物的增加是緩慢一次增加一種，然而如此保守的治療，常常會造成病人不可逆的關節變形，造成工作能力的喪失，增加醫療的成本及最重要的，死亡率的上升，因此目前已經被”早期積極使用 DMARDs，並且合併數種 DMARDs 來治療類風濕性關節炎”的作法所取代(van der Heide A et al., 1996; Egsmose et al., 1995)。目前常用的 DMARDs 有 methotrexate, hydroxychloroquine, sulfasalazine, cyclosporine 及 leflunomide。然而有不少病患其關節炎在上述的治療後，仍然無法得到適當的控制。

近年來，對於類風濕性關節炎致病機轉的了解，已經有許多生物製劑(biological agents)上市，有效且專一的阻斷造成關節發炎的重要蛋白質，可以有效控制這些傳統治療失敗的病患。首先最早上市的生物製劑為抗腫瘤壞死因子藥物(anti-TNF agents)，包括 etanercept(TNF type II receptor fused to IgG1)，infliximab(a chimeric mouse/human monoclonal antibody to TNF)，adalimumab (fully humanized antibody to TNF)三種藥物，在之前合併數種 DMARDs 治療失敗的患者，給予抗腫瘤壞死因子藥物可以非常顯著的改善其關節炎，對於剛診斷的患者，也有相當的效果，可以大幅度的減緩關節破壞的速度。與此同時或隨後，許多針對類風濕性關節炎發炎反應的重要分子途徑所設計出來的生物製劑也相

繼上市，如針對 IL-1 的 Anakinra，抑制 T 細胞活化的 abatacept，針對 IL-6 的 Tocilizumab 及去除 B 細胞的 Rituximab。

在這些生物製劑中，抗腫瘤壞死因子藥物(anti-TNF agents)，是最為廣泛使用的。這些生物製劑雖然可以成功治療之前使用 DMARDs 治療失敗的患者，但是仍然約有部分的患者對生物製劑反應不好或產生副作用(Cartlehner et al., 2006)。隨著使用的經驗的增多，學者發現這些生物製劑並未完全無副作用，因為這些生物製劑所針對的細胞激素在人體中還是扮演相當重要的抵抗外來感染的功能，因此使用生物製劑如 anti-TNF agents 的患者比較容易產生嚴重的感染甚至於是敗血症，潛伏期的 TB 菌活化，增加新感染 TB 菌的嚴重度及機會，其他伺機性 (opportunistic infection) 的感染尤其是黴菌如 histoplasmosis 或 coccidioidomycosis，產生 antinuclear antibodies 及 anti-DNA antibodies，產生藥物相關的系統性紅斑性狼瘡，導致心臟衰竭的情況加劇，誘導產生或加劇中樞神經 demyelinating 病變 (如 multiple sclerosis, optic neuritis and Guillain-Barre syndrome)，甚至於可能增加癌症尤其是淋巴癌的機會，再加上常見的過敏反應 (Chang et al., 2007)。因此我們應該尋求更專一性，副作用更小的治療。

第二節 本研究對於類風濕性關節炎臨床診斷及治療的影響

在現在類風濕性關節炎重要的血清學指標中，ACPAs的敏感度不錯，且特異度最高。而且我們是依照台灣風濕科門診實際上會遇到的狀況，要和類風濕性關節炎鑑別診斷的情況來探討。事實上，我們可以說，雖然RF，ACPAs及anti-Gal(0) IgG三者的敏感度雷同，但是單以RF並不能作有效的區分，誠然anti-Gal(0) IgG的特異度並不差(85.7%)，但在統計上仍然比ACPAs差(97.7%)。當然我們進一步需要回頭去檢驗所找到的anti-citGRP78，在類風濕性關節炎及其相仿者這些疾病的敏感度及特異度，是否優於ACPAs，並且跟類風濕性關節炎臨床病情有關。當然，在ACPAs對於類風濕性關節炎的特異度相當高的狀況，anti-citGRP 78未必能超越。然而不是每個類風濕性關節炎的患者，血清都含有ACPAs，實際上，ACPAs只有在約2-4成的類風濕性關節炎患者發病前會呈陽性反應，且ACPAs在類風濕性關節炎患者血清中的陽性率也只約6-8成。之前的研究指出Anti-GRP78 Abs也專一性的存在於類風濕性關節炎患者血清中，在疾病早期甚至於發病前就已經存在，而且ACPAs的出現與否和Anti-GRP78 Abs的出現並不會高度相關，因此能否以瓜氨酸化的GRP78當抗原，來偵測anti-citGRP78 antibodies，以便早期或是更靈敏的偵測出早期的類風濕性關節炎的患者，是我們接下來的研究目標。

另一方面，在臨床上，既然ACPAs可以參與類風濕性關節炎的致病機轉，也有許多人感到有興趣的是，為什麼有些人血液中有ACPAs陽性反應，但是卻沒有任何關節炎的症狀，可能要隔一陣子後，才會產生關節炎。目前有的說法是，這些血液中帶有ACPAs的人，因為關節內正常，沒有太多的citrullinated proteins，所以不會有反應，但是若有'第二擊'(second hit)來引發點燃局部關節炎，才會造成ACPAs去攻擊關節。然而，本研究提供了另外的一種想法，既然ACPAs是針對不同的citrullinated proteins，因此若是產生針對一些並不會參與發炎反應的瓜氨酸

酸化蛋白質的抗體，也許會造成血液中呈ACPAs陽性反應，但是卻沒有任何關節炎的症狀。而要一直到epitope spreading，產生了anti-citrullinated GRP78 Abs，才會促進發炎反應，產生症狀。而既然ACPAs是針對citrullinated proteins，其結構上有相似性，很容易產生molecular mimicry的情況，因此也會造成ACPAs的epitopes改變，從認識不同的citrullinated proteins，進而轉變到認識citrullinated GRP78。

至於對類風濕性關節炎的治療而言，之前GRP78在小鼠關節炎的模式是可以減少關節的發炎。當然我們可以設計瓜氨酸化的GRP78蛋白質片段，以血漿交換的方式來去除掉ACPAs，使其無法與單核白血球結合。也可以用瓜氨酸化的GRP78，以類似減敏治療的方式，從很小量的口服或皮下注射，誘導類風濕性關節炎的患者產生免疫容忍(immune tolerance)。或是知道其下游的訊息傳導的關鍵分子，設計藥品，特異性的阻斷ACPAs透過瓜氨酸化的GRP78所產生的發炎反應。最後，既然citrullinated proteins包括瓜氨酸化的GRP78及其他未知瓜氨酸化的蛋白質，在發炎的關節表現量會大為增加，從而被ACPAs所認識，引起免疫反應，那麼尋找適當的PAD的抑制劑，從上游來抑制GRP78及其他相關蛋白質的瓜氨酸化，也許是治療類風濕性關節炎的另外一個作法。當然這些都需要先經細胞生理及動物實驗測試後才能考慮用在人身上，希望如此一來可以更專一的治療類風濕性關節炎，也更進一步減少治療的副作用。

第三節 本研究對之後類風濕性關節炎基礎研究的影響

類風濕性關節炎致病機轉，雖然過去有許多研究及學說，仍然有許多不明瞭的地方，最早理論從二十世紀中發現類風濕因子開始，有八成類風濕性關節炎患者的血清中有此因子存在。類風濕因子主要是針對免疫球蛋白的Fc部分結合，引起免疫複合體(Immune complex)的形成，造成發炎反應。然而類風濕因子的特異性低，在其他免疫病，感染，腫瘤甚至於健康的老年人均可以測出，而免疫複合體也在許多疾病均有角色。

之後學者發現類風濕性關節炎的患者有特定的HLA-DR的基因，因此其對應的T細胞，也成了類風濕關節炎的研究重點。其後因為分子生物學的進步，發現關節腔內有許多發炎性的細胞激素，尤其是由巨噬細胞所分泌的TNF- α ，IL-1及IL-6。而之後據此研究基礎所設計出來的選擇性抑制TNF- α 及IL-1的生物製劑，在治療類風濕關節炎方面，取得了劃時代的突破。同時，TNF- α 及IL-1在乾癬及乾癬性關節炎或僵直性脊椎炎也同樣有其地位，目前比較被認為是執行者的角色。

最近抗瓜氨酸化胜肽抗體的發現，而且其可以非常專一地出現在類風濕性關節炎的血清中，於疾病尚未產生之前就以經出現了，血清中帶有抗瓜氨酸化胜肽抗體的患者其關節發炎及破壞更嚴重，血清中也同時會表現更多的促發炎反應的細胞激素如TNF- α ，IL-1 β ，IL-6，IL-13，IL-15及GM-CSF，但是若給予有效的藥物治療，如抗TNF- α 的藥物，可以降低血清中抗瓜氨酸化胜肽抗體的效價，而類風濕性關節炎患者的關節腔內也有瓜氨酸化的蛋白質表現，抗瓜氨酸化胜肽抗體應該在類風濕性關節炎的致病機轉中扮演重要的角色。而B細胞標靶治療(anti-CD20 antibody)也可以成功的治療類風濕關節炎，更進一步說明，自體抗體應該在類風濕性關節炎的致病機轉中扮演重要的角色。

在許多自體免疫疾病的致病機轉中，自體抗體扮演了相當重要的角色，常提到的機轉有：抗體直接結合在目標器官或組織上，並且沉積在上面造成發炎反應如anti-dsDNA antibodies之於系統性紅斑性狼瘡，anti-GBM antibodies之於Goodpasture syndrome；抗體作用在特殊的分子上直接刺激或抑制其功能，進而參與了疾病的產生，如anti-acetylcholine receptor antibodies之於myasthenia gravis，anti-TSH receptor antibodies之於Graves' disease；或是可能放大發炎反應，引起免疫複合體產生，如Rheumatoid factor之於許多自體免疫疾病；藉由運輸self-nucleoproteins 並且和 Toll-like receptors結合，促成其他自體抗體產生，如anti-nuclear antibodies之於系統性紅斑性狼瘡。本研究的發現，說明了ACPAs之於類風濕性關節炎也如同anti-acetylcholine receptor antibodies之於myasthenia gravis，anti-TSH receptor antibodies之於Graves' disease，可以直接結合到目標的細胞或器官，直接參與疾病的產生，而不只是單純的疾病指標。不過要注意的是，在研究中，我們發現ACPAs可以和許多單核白血球的細胞膜蛋白質作反應，我們希望以後可以一一去作分析，把所有可能的蛋白質都鑑定出來，希望可以找到更多跟類風濕性關節炎有關的重要因子，也許ACPAs可以透過其他不同的細胞膜上的蛋白質來引起發炎反應，參與在類風濕性關節炎的致病機轉上。另一方面，還有許多其他細胞如synovial fibroblast，osteoblast，osteoclast積極的參與類風濕性關節炎的發炎反應，是否這些細胞上也有可以和ACPAs相結合的蛋白質，而ACPAs可以藉此，促進了類風濕性關節炎的發炎反應，這也是我們未來研究的重點。

抗瓜氨酸化胜肽抗體如何造成類風濕關節炎，目前的研究主要都放在蛋白質瓜氨酸化會造成蛋白質免疫耐受性消失(breakdown immune tolerance)，然而有些研究顯示似乎抗瓜氨酸化胜肽抗體可以藉由和補體受器的結合造成單核白血球

的TNF- α 釋放(Clavel et al., 2008)，除了這些原因，本研究提出另外一個分子機轉是，ACPAs藉由直接結合在細胞膜上瓜氨酸化的GRP78，可以促進單核白血球TNF- α 的釋放及轉錄因子NF- κ B的活化。也藉由此分子機轉合併其他之前的機轉共同引起發炎反應，從而參與了類風濕性關節炎的產生及進行。

更重要的是，本研究也提供了一個關鍵的聯結，藉由ACPAs串聯起”危險訊息”(danger signals)活化Innate immunity，進而參與類風濕性關節炎的發炎反應。單核球是Innate immunity的主要成員，一般而言，Innate immunity扮演了身體的防衛系統的第一道防線，主要是透過Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)來認識各式各樣病原菌並與之對抗，或是透過Damage-associated molecular patterns (DAMPs)來認識組織破壞的相關訊息，之後產生防衛的反應並且進一步把訊息傳達到Adaptive immunity—此為近半世紀來免疫學研究的重點。而體內自行產生的DAMP分子，包括有high mobility group box1 proteins (HMGB-1)，heat shock proteins (HSPs)，uric acid，altered matrix proteins及S-100 protein，其中GRP78正是heat shock proteins之一。而這些物質在細胞被活化甚至於壞死時，被釋放出來，其作用主要是吸引發炎性的細胞來到受傷的部位，從而引起發炎反應。這些DAMP分子通常有兩種不同的角色，在細胞內，通常扮演維持細胞恆定的角色，如calcium-binding proteins，chaperones或chromatin-stablizing molecules，然而在細胞受損，被病原菌感染或發炎反應時，就會從細胞中被釋放出來，這時就轉身成為danger signals，進一步去活化免疫系統及血管內皮(Foell et al., 2007)。

Innate immunity不單純只是當作身體的第一線防衛系統，來抵抗外來的病原菌入侵，然而學界目前的研究也指出，許多自體免疫疾病和發炎有關的疾病，也是藉由Innate immunity的系統來達到快速開啟發炎的反應。而事實上，Innate

immunity不只可以促進發炎的反應，也有類似煞車的機轉，其透過自己本身”清除的功能”或是間接由調控adaptive immunity，來終止發炎反應。在發炎性關節炎，Innate immunity更扮演執行的角色，舉凡之前所提的matrix metalloproteinases，oxygen radical，antimicrobial peptides，complement，chemokines及cytokines，無一不是屬於Innate immunity所釋放出來的。其可以進一步引來淋巴球及突觸細胞活化這些成員，影響了adaptive immunity。

我們所找到ACPAs的抗原GRP78，是屬於heat shock protein HSP70家族之一，在正常情況下，其在細胞內質網扮演協助蛋白質組裝的角色，而在受到刺激時:如微生物感染，特定藥物，toxic effect，cellular stress，fever及hyperthermia，HSP會被釋放出來，其可能藉由CD91，TLRs，CD36，CD40或CD14，活化巨噬細胞釋放TNF- α ，IL-1及IL-12及活化dendritic cells造成innate immunity的活化，另一方面，也可能可以透過MHC及TCR，其成員可以藉由這些PRRs，來促進細胞激素的分泌，活化cytotoxic T cells及NK cells，誘導產生Regulatory T cells，活化cytotoxic T cells 及NK cells，影響了adaptive immune responses (Srivastava, 2002)。因此我們猜測ACPAs也許會藉由影響danger signals 的作用，參與了發炎反應。

第四節 未來的研究規劃

我們雖然初步發現ACPAs和瓜氨酸化的GRP78之間的結合，可以促進單核球產生TNF- α ，因而參與了類風濕性關節炎的致病機轉。然而這結論又引發了更多的問題需要回答。我想其中幾個重要的問題，比如說類風濕性關節炎患者血清中已經被報告出含有ACPAs及anti-GRP78 antibodies，這兩個自體抗體事實上也有些相類似的地方，比如說在疾病產生前就可以偵測得到，治療後效價都可以下降，當然ACPAs是透過瓜氨酸化的GRP78促進單核白血球產生發炎反應，但是anti-GRP78 Abs是否可以針對瓜氨酸化的GRP78促進單核白血球發炎反應，還是透過影響GRP78本身來產生發炎反應需要去釐清，若兩者均是透過瓜氨酸化的GRP78或是阻斷GRP78的訊息傳導來促進單核白血球發炎反應，那合併兩種抗體在類風濕性關節炎血清中的陽性率，我們估計可以解釋到至少80-90%的類風濕性關節炎的患者發炎反應的成因，會是相當重要的貢獻。

我們目前正在積極準備相關材料，包括以大腸桿菌的模式自行製造及純化具有功能GRP78及PADI4，純化ACPAs從目前以自己製備的管柱改成使用FPLC的自動化純化方式，希望可以大量純化ACPAs，以幫助之後進一步探討後續的問題。我們也進一步想探討ACPAs和U937細胞膜上的瓜氨酸化的GRP78結合後之後的訊息傳導路徑包括MAPK and Akt-dependent signaling是否會被ACPAs所誘發，及U937和健康人PBMC是否細胞凋亡的方面會受影響，最後可以測量unfolded protein response signaling是否也被活化，最近我們初步發現MAPK pathway中的Erk1/2，很可能是ACPAs和U937細胞膜上的瓜氨酸化的GRP78結合後主要的訊息途徑。

就大方向而言，還有許多研究值得進行，雖然技術上也許有些超過我們現在的能力，但是還是可以和一些老師合作。首先，既然PADI4是和類風濕性關節炎

關係最密切的瓜氨酸化酵素，我們可以嘗試以yeast two hybrid的方式，尋找其有交互作用的蛋白質，以確定這些蛋白質是否有瓜氨酸化的現象及其是否參與了類風濕性關節炎的致病機轉。再者，現在偵測蛋白質有無瓜氨酸化的方法，主要是靠含有2, 3-butanedione monoxime，FeCl₃及antipyrene的強酸溶液作用，使得蛋白質上的瓜氨酸受到修飾，之後再用特殊的抗體去偵測，事實上，這樣的方式並未經過嚴謹的驗證，而不同蛋白質的氨基酸序列，都很有可能間接影響其結果，而用Mass spectrometry的方式，又面臨到分子量只差1Da，跟同位素是一樣的。近年來有學者合併兩種方式，首先先以3-butanedione monoxime，FeCl₃及antipyrene的強酸溶液修改蛋白質上的瓜氨酸，之後在用Mass spectrometry的方式，可以相當準確的找到瓜氨酸化的蛋白質序列，這也是我們希望未來可以找尋專精Mass spectrometry的學者，一起研究，以便找到GRP78被瓜氨酸化的的特定氨基酸。

另外我們也希望可以找出抑制PADI4的分子，希望藉由抑制PADI4的活性，可以降低單核球的發炎反應，更進一步，以這個抑制PADI4的分子，應用在老鼠的關節炎模式，希望避免關節炎的產生或減輕關節發炎的程度。最後希望可以藉由抑制蛋白質瓜氨酸化的過程和抑制瓜氨酸化GRP78本身或下游的訊息傳導途徑，應用在類風濕性關節炎患者的身上，更進一步改善其病情。

第五節 結論

在本研究中以我們從類風濕性關節炎患者血清中以親合性管柱純化出 ACPAs，先確認其可引起人類PMBC的TNF- α 的釋放及轉錄因子NF- κ B的活化，並且找到其針對血液中的單核球而非淋巴球的細胞膜結合，之後利用細胞株U937作模式，首先確定ACPAs仍然可以在細胞株U937促進發炎反應，主要是TNF- α 的釋放及轉錄因子NF- κ B的活化，而相對的以去除掉ACPAs的類風濕關節炎患者血清或是非特異性的免疫球蛋白，則無此現象，我們也排除的LPS污染的可能。進一步，純化U937細胞膜上的蛋白質，以ACPAs為第一抗體，用西方點墨法發現ACPAs可以和膜上的蛋白質結合，並以蛋白質體學的方法，找到其和U937細胞膜上結合的關鍵分子GRP78，我們並發現，以合成的GRP78並不會跟ACPAs做結合，但是從U937細胞膜上以免疫沉澱法取下的GRP78則可以，接著我們以anti-MC驗證U937細胞膜上的GRP78有瓜氨酸化的現象，而合成的GRP78則沒有，因此決定了ACPAs的結合。最後將合成的GRP78給予瓜氨酸化後，可以和ACPAs作結合，並且抑制ACPAs引起的U937細胞TNF- α 釋放。最後我們驗證，健康人血液中的單核白血球上有GRP78的表現，並不是因為U937本身是癌症的細胞株才特別表達的。

因此ACPAs藉由直接結合在細胞膜上瓜氨酸化的GRP78，可以促進單核白血球TNF- α 的釋放及轉錄因子NF- κ B的活化。也藉由此分子機轉直接引起發炎反應，從而參與了類風濕性關節炎的致病機轉。未來希望能進一步了解其更進一步的分子生物機轉，針對此機轉設計藥物來阻斷之，以提供類風濕性關節炎更專一的治療方式，改善病人的預後。

六 論文英文簡述

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a common and disabling chronic inflammatory disease. Rheumatoid factor (RF) was found in 75-85% of the RA patients and becoming the important biomarkers for diagnosis. However, many other rheumatic diseases such as primary Sjögren's syndrome (pSjS), systemic lupus erythematosus (SLE) or mixed connective tissue disease, may also exhibit polyarticular synovitis with RF production. Asia is an endemic area of chronic HBV and HCV infection that may implicate rheumatic manifestations and elevated RF. Furthermore, RF is also present in the sera of normal aged people. It is conceivable that RF is primarily associated with RA, but does not exhibit high disease specificity. Recently, the anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) is the most specific autoantibody marker for RA diagnosis. ACPAs correlated with RA joint inflammation; however, the significance of this marker is that ACPAs may exist in RA serum even before the development of arthritis. Thus, ACPA is a highly predictive test in the diagnosis of early RA. These observations suggest that ACPAs and their citrullinated cognate antigens play an important role in rheumatoid pathogenesis. Protein citrullination is the post-translational modification of an arginine residue to a non-classical amino acid

citrulline by peptidylarginine deiminase (PAD). Many studies have detected a number of citrullinated proteins including fibrinogen, vimentin, and type II collagen, in the inflamed joint tissues.

Recent reports revealed that protein citrullination was involved in the breakdown of immune tolerance in experimental autoimmune arthritis. In addition, the production of ACPAs was strongly associated with the RA-susceptible HLA-DRB1-shared epitope in MHC class II genes. Immunopathologically, RA patients with sera-positive ACPAs have higher serum levels of proinflammatory cytokines. Clavel et al. found that the formation of ACPAs-citrullinated fibrinogen immune complexes enhanced macrophage tumor necrosis factor (TNF)- α production through Fc γ RIIIa engagement. Other factors or mechanism(s) may also be involved in ACPA-mediated TNF- α production by RA macrophages/monocytes. In the clinical setting, the efficacy of B cell depletion therapy in suppressing rheumatoid activity further supports the crucial role of autoantibodies in rheumatoid pathogenesis.

My thesis contains both clinical and basic dimensions investigating the roles of ACPAs in the immunopathogenesis of RA. In clinical setting, we evaluated the clinical usefulness of several serum biomarker for RA including: anti-agalactosyl IgG

antibodies [anti-Gal(0) IgG], RF and ACPAs in the differential diagnosis of different rheumatic disorders mimicking RA. In basic research, we hypothesized that ACPAs may directly bind to cell surface citrullinated proteins to stimulate mononuclear cells to elicit inflammatory reaction. Indeed, our results clearly demonstrated ACPAs was the most specific biomarker for differential diagnosis of RA from its mimic. Then we found that ACPAs purified from pooled RA sera bound to surface-expressed citrullinated glucose-regulated protein 78 (GRP78) on monocytes/macrophages and stimulated TNF- α production.

Materials and Methods:

Patients. Thirty-nine patients fulfilling 1987 ACR revised criteria for the classification of RA, 49 patients fulfilling the American-European Consensus Group criteria for pSjS, and 19 normal individuals were recruited in the present study. In addition twenty-one chronic HCV infection with rheumatic manifestations [HCV(+) S(+)] and 19 chronic HBV infected patients with rheumatic manifestations [HBV(+) S(+)], 47 patients with chronic HCV infection and positive RF test but without rheumatic manifestations [HCV(+) RF(+) S(-)] and 46 patients with chronic HBV infection without rheumatic manifestation [HBV(+) S(-)] were also included. All of

the participants signed the informed consents that were approved by the Local Internal Review Board and Ethics Committee of Buddhist Dalin Tzu-Chi General Hospital in Chia-Yi, Taiwan (No.B09603003).

Measurement of ACPAs, anti-Gal(0) IgG Antibodies and RF. We used commercially available ELISA test for ACPAs (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) and anti-Gal(0) IgG (Eitest CARF kit, Eisai Co. Ltd, Tokyo, Japan) determination. RFs was measured by laser nephelometry for the IgM isotype (Date Behringer, Marburg, Germany)

Purification of ACPAs from pooled ACPA (+) RA sera. Sera samples with high ACPAs titer (more than 340 IU/ml) from 30 RA patients were collected. We used the first generation synthetic cyclic citrullinated peptide (CCP) antigen in the clinical test designed by Schellekens et al. to show the amino acid sequence of $\text{HQCHQESTXGRSRGR}\underline{\text{C}}\text{GRSGS}$ (X=citrulline and C represents the chemical bond between two Cs; Bionovas, Michigan, USA). The synthetic peptide was conjugated to NHS-activated Sepharose 4 fast flow gel (Pharmacia Biotech, Wisdoms, Sweden) according to the manufacturer's instruction and then packed as a CCP-affinity column. The pooled ACPA-containing RA sera were incubated with the CCP-affinity column

at 4°C overnight. After washing with 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) in 0.5 M NaCl, the bound ACPAs in the affinity column were eluted with 8M urea. The effluent was dialyzed against PBS (pH 7.2) and concentrated through a Vivaspin 20 polyethersulfone 30,000 MW CO membrane (Sartorius AG, Goettingen, Germany). The citrullinated peptide-binding activity of the affinity-purified human ACPAs was measured with ELISA kits. The ACPA-depleted [ACPA(-)] effluent was passed through the CCP-affinity column for several cycles and then collected until no CCP-binding activity (<7 IU/ml) was detected. The antigen-binding activity of the affinity-purified ACPAs at a protein concentration of 1 µg/ml was equal to 16 IU/ml. In both purified ACPAs and ACPA-depleted RA sera, the endotoxin levels were confirmed to be <0.5EU/ml with the limulus amoebocyte lysate assay (Lonza, Basel, Switzerland).

TNF- α production by U937 cells after co-culture with purified ACPAs.

U937 cells (1×10^6 cells/ml) that were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) were incubated with non-specific human IgG (5µg/ml) to block the Fc γ RII activity (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or with different concentrations of ACPAs (10, 20, 40 or 80 IU/ml) at 37°C for 24h. In another

experiment, U937 cells were incubated with ACPAs (80 IU/ml), ACPAs (80 IU/ml) + polymyxin B (10 µg/ml; Sigma-Aldrich), ACPAs (80 IU/ml) + anti-Toll-like receptor 4 blocking antibody (anti-TLR4, 10 µg/ml; BioLegend, San Diego, CA, USA), ACPAs (80 IU/ml) + synthetic CCP (50 µg/ml equal to 21.4 µM), ACPA(-) RA sera (5 µg/ml), or non-specific human IgG (5 µg/ml) at 37°C for 24h. After incubation, the cell-free culture supernatants were collected and stored at -20°C until analysis.

ELISA for TNF- α concentration in different culture supernatants. The concentration of TNF- α in different culture supernatants was determined by ELISA (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Preparation of nuclear extracts for measuring NF- κ B DNA binding activity.

NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) were used to prepare the different nuclear extracts from U937 cells according to the manufacturer's instruction. The DNA binding activity of NF- κ B in the nuclear extract was detected with a sensitive multi-well colorimetric assay kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA).

Flow cytometry analysis. The surface membrane binding activity with ACPAs on U937 cells or freshly prepared human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs,

the isolation procedures are shown below) were detected by flow cytometry. Briefly, cells were pre-incubated with 10 µg/ml non-specific human IgG in staining buffer containing 0.2% BSA and 0.1% sodium azide (BD Biosciences) at 4°C for 30 min to block the surface Fcγ receptor activity. The pre-treated cells were then stained with primary antibody or isotype control (BD Biosciences) in an ice-bath with staining buffer for 60 min. After several washes, the cells were stained with FITC- conjugated secondary antibody in an ice-bath with staining buffer for another 60 min. The monocyte and lymphocyte subpopulations in PBMCs were gated by both forward and side scatters by flow cytometry. The % positivity and mean fluorescence intensity (MFI) of the cells were determined by FACScan flow cytometry (Becton Dickinson) with Lysis II software analysis. The primary antibodies were purified ACPAs or rabbit polyclonal antibodies against the C-terminal of human GRP78 (anti-GRP78, H-129; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and the secondary antibodies were FITC-conjugated goat-anti-human IgG antibodies (Rockland, Philadelphia, PA, USA) or goat-anti-rabbit IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA).

Preparation of cell membrane protein extracts. Surface membrane proteins

on U937 were extracted using a ProteoExtract native membrane protein extraction kit (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Thereafter, the supernatant containing the extracted membrane proteins was collected and the protein concentration was measured by the Bradford method.

Western blot analysis. Eighty micrograms of U937 membrane protein extract or GST-tagged recombinant GRP78 (rGRP78 with MW 97.52 kDa, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) were electrophoresed and then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) sheet (Sigma-Aldrich). The membranes were incubated with the ACPAs (600IU) or anti-GRP78 (H-129) followed by HRP-conjugated goat anti-human IgGs (Santa Cruz Biotechnology) for ACPAs or HRP-conjugated goat anti-rabbit IgGs (Santa Cruz Biotechnology) for rGRP78. The cognate molecules were visualized using a chemiluminescence reaction (ECL; Amersham Biosciences).

Protein identification by MALDI-TOF/LC/LC mass spectrometry. The surface-expressed molecules on U937 cells that are capable of reacting with ACPAs as mentioned above were excised and sent for peptide identification (Pan Facility, Stanford, CA, USA). The enzyme-digested peptides were analyzed by

MALDI-TOF/LC/LC mass spectrometry (Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer).

Immunoprecipitation of U937 cell membrane extract by anti-GRP78 or APCA-conjugated protein G affinity column. U937 cell membrane protein extracts were immunoprecipitated by goat polyclonal anti-human GRP78 N-terminal peptides antibodies (anti-GRP78, N-20) or APCA-conjugated protein G Sepharose beads (Protein G Immunoprecipitation kits, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The protein molecules in the supernatant (immunoprecipitates) were then analyzed by Western blotting using anti-GRP78 (H-129), ACPAs or anti-MC as a probe.

Biotinylation of U937 cell surface proteins. U937 cells were incubated with 1 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin (Pierce Biotechnology) at room temperature for 30 min. Then the reaction was stopped the addition of 50 mM Tris (pH 8.0). After washing three times, the intact cells were incubated with 500 IU ACPAs at 4°C for 2 h. Then the cells were lysed and incubated with protein G-conjugated beads for further immunoprecipitation. The resultant immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting using anti-GRP78 (H-129) or streptavidine-conjugated HRP

(BioLegend).

Citrullination of recombinant GRP78. Recombinant GRP78 produced with a wheat germ expression system was successfully citrullinated (cit-GRP78) after incubation of the molecules with 10 mM CaCl₂ and PAD (Sigma-Aldrich) at a concentration of 20 IU per 1 mg GRP78 protein for 2 h according to the method reported by Lundberg et al. (11) with some modifications.

Detection of citrullinated proteins. The citrullination of proteins was detected by Western blotting using a modified anti-citrulline detection kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). Briefly, the citrulline residues of the proteins immobilized on the PVDF sheet after 10% SDS-PAGE were modified by 2, 3-butanedione monoxime and antipyrine in a strong acid solution in accordance with the manufacturer's instructions. The modified citrulline residues were detected with rabbit polyclonal anti-modified citrulline antibodies (anti-MC) and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies.

Flow cytometry analysis of the competition among anti-GRP78, rGRP78, and ACPAs for U937 cell surface binding. Freshly prepared U937 cells were pre-incubated with 10 µg/ml non-specific human IgG in staining buffer at 4°C for 30

min to block Fc γ R activity before analysis. Commercially available isotype control and primary antibodies in staining buffer were incubated with the U937 cells. Four experiments were conducted to examine binding inhibition (described below). Following staining in all four experiments, cells were analyzed by flow cytometry.

(a) Inhibition of anti-GRP78 binding to the U937 cell surface by pre-incubation of cells with ACPAs. U937 cells were pre-incubated with 50 IU or 250 IU human ACPAs in an ice-bath for 60min. After washing, the cells were stained with anti-GRP78 (H-129) and then incubated with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies.

(b) Inhibition of ACPAs binding to the U937 cell surface by pre-incubation of cells with anti-GRP78 (H-129). U937 cells were preincubated with 1 or 10 μ g anti-GRP78 (H-129). After several washes, the cells were stained with ACPAs (50IU) followed by FITC-conjugated goat anti-human IgG antibodies.

(c) Inhibition of ACPAs binding to the U937 cell surface by pre-incubation of ACPAs with rGRP78. GRP78 (1 or 10 μ g) was pre-incubated with ACPAs (50 IU) at room temperature for 60 min. The cells were then incubated with the formed complexes and stained with FITC-conjugated goat anti-human IgG antibodies.

(d) Inhibition of ACPAs binding to the U937 cell surface by pre-incubation of ACPAs with cit-GRP78. Citrullinated GRP78 (1 or 10 μ g) was pre-incubated with ACPAs (50 IU) at room temperature for 60 min. The cells were then incubated with the formed complexes and stained with FITC-conjugated goat anti-human IgG antibodies.

Preparation of PBMCs from healthy volunteers. Heparinized venous blood obtained from healthy volunteers was mixed with one-fourth volume of 2% dextran solution (MW 464,000 daltons; Sigma-Aldrich) and incubated at room temperature for 30 min. Leukocyte-enriched supernatant was collected and layered over a Ficoll-Hypaque density gradient solution (specific gravity 1.077; Pharmacia). After centrifugation at 250 x g for 25 min, PBMCs were aspirated from the interface.

Statistical analysis. The results are represented as mean \pm s.d. Continuous variables were analyzed by paired or unpaired Mann-Whitney *U* tests using a commercially available software package (Stata/SE 8.0 for Windows). A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Comparison of anti-Gal(0) IgG, ACPAs and RF in different disease groups.

In patients with RA, the sensitivities among RF (74.4%), anti-Gal(0) IgG (68.6%) and

ACPAs (81.0%) were not statistically significant. Both RF and anti-Gal(0) IgG were frequently detected in patients with diseases that mimic RA. In contrast, ACPA is rarely detected in these patients with RA mimic diseases. The overall specificity of ACPAs (97.7%) for differential diagnosis of RA from its mimic was significantly higher than RF (32.0%) or anti-Gal(0) IgG (85.7%)

ACPAs increased TNF- α production in U937 cells via binding to surface-expressed molecule(s) and NF- κ B activation. To determine whether ACPAs were phlogmotic, we incubated U937 cells with ACPAs for 24 h. TNF- α production was enhanced by ACPAs in a dose-dependent manner ranging from 10-80 IU/ml. This TNF- α -enhancing activity of ACPAs did not occur via Fc γ R or residual LPS contamination in the purified ACPAs, since the TNF- α production by 80 IU/ml of ACPAs was much greater than that induced by human non-specific IgG and ACPA-depleted RA sera. The addition of polymyxin B or anti-TLR4 antibodies did not affect the ACPA-mediated TNF- α production by U937 cells. Pre-incubation of CCP (50 μ g/ml) with ACPAs (80 IU/ml) significantly suppressed TNF- α production. These results suggest that ACPAs specifically activate U937 cells TNF- α production. Nuclear translocation of NF- κ B stimulates TNF- α transcription. Thus, we measured

the changes in DNA-binding activity of the five NF- κ B family members including p50, p52, p65, RelB, and c-Rel in U937 cells after stimulation by ACPAs. We found that the DNA binding activity of three family members, p50 (OD_{450nm} 3.31±0.05 vs. 2.79±0.13, $p<0.05$), p52 (OD_{450nm} 0.49±0.09 vs. 0.26±0.01, $p<0.05$) and p65 proteins (OD_{450nm} 1.80±0.18 vs. 0.45±0.05, $p<0.05$) were significantly increased in U937 cells after a 24-hour incubation with ACPAs (80 IU/ml). Since we confirmed that ACPAs specifically bind to U937 cell surface, this binding may elicit NF- κ B activation and enhanced TNF- α production.

Identification of ACPA cell surface binding molecule(s) on U937 cells by Western blotting. Western blot analysis of U937 cell membrane proteins probed by ACPAs revealed at least three distinct protein molecules with molecular weight of approximately 70-75, 50-55 and 40-45 kDa consistently reacted with ACPAs compared to ACPA(-) RA sera. Following excision and proteomic analysis, the contents of these protein bands were identified as glucose-regulated protein 78 (GRP78) and moesin in the 70- to 75-kDa band, protein disulfide isomerase-related protein 5 and KIAA0115 in the 50- to 55-kDa band, and macrophage-capping protein and fructose-bisphosphate aldolase A in the 40- to 45-kDa band. These

molecules, therefore, are potential cognate ACPA-binding molecules. After reviewing the literature, we tentatively concluded that GRP78 (MW 72.43 kDa) is the most likely target antigen of ACPAs on U937 cells.

ACPAs reacted with citrullinated GRP78 (55kDa) immunoprecipitated from U937 cell membrane extracts. To confirm that GRP78 on U937 cells is a target autoantigen of ACPAs, we performed Western blot analysis of U937 cell membrane extracts with anti-GRP78 (H-129). A distinct 72-kDa band in the U937 cell membrane extracts reacted with anti-GRP78 (H-129). As a positive control, anti-GRP78 robustly recognized the 97.52-kDa GST-tagged rGRP78; however, ACPAs failed to bind the GST-tagged rGRP78 due to the absence of citrullination of the rGRP78 molecule. To further confirm the reaction between ACPAs and surface-expressed GRP78 on U937 cells, we obtained U937 surface-expressed GRP78 by immunoprecipitation of U937 cells membrane protein extracts with anti-GRP78 (N-20) coupled to protein G-Sepharose beads. The immunoprecipitated GRP78 from U937 cell membranes experienced degradation from 72 kDa to 55 kDa in the process of immunoprecipitation, and both forms were recognized by both anti-GRP78 (H-129) and ACPAs. To exclude the possibility of non-specific binding of secondary antibody,

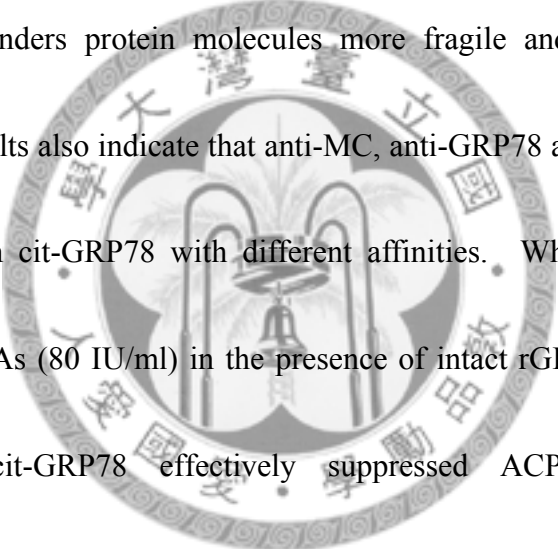
we used the anti-GRP78 (N-20) antibody as a control. As expected, no band was detected after probing with anti-GRP78 (H-129). These results suggest that rGRP78 produced by the wheat germ expression system was not citrullinated. Therefore, this recombinant protein failed to be recognized by ACPAs. In contrast, surface-expressed GRP78 immunoprecipitated from U937 cell membrane extract with anti-GRP78 (N-20) was citrullinated but was obtained in a truncated form (55 kDa) that was recognized by anti-MC. Furthermore, peptide analysis of the 55-kDa truncated molecule revealed evidence of GRP78 in this band with many confounding antibody fragments formed in the process of immunoprecipitation.

Anti-GRP78 bound to citrullinated 55-kDa proteins immunoprecipitated by ACPAs from U937 cell surface extracts. To confirm that ACPAs binding to cit-GRP78, Western blot analysis of U937 cell membrane extracts immunoprecipitated with purified ACPAs was conducted. We found that the 55-kDa protein was cit-GRP78 and was recognized by both anti-GRP78 (H129) and anti-MC. Next, we biotinylated fresh intact U937 cells and incubated them with ACPAs. After several washes, the cells were lysed and immunoprecipitated with protein G. The 55-kDa biotinylated GRP78 fragment was recognized by anti-GRP78 and the

presence of this protein on the U937 cell surface was confirmed by streptavidine-HRP.

ACPAs inhibited the binding of anti-GRP78 to U937 cells. Competitive inhibition studies demonstrated that anti-GRP78 could robustly bound to viable non-permealized U937 cells while the isotype control did not. Pre-incubation of U937 cells with ACPAs (50 or 250 IU) suppressed the binding of anti-GRP78 (H-129) to U937 cells in a dose-dependent manner. These results indicate that ACPAs and anti-GRP78 (H-129) recognize the same epitope(s) on the U937 cell surface. Pre-incubation of U937 cells with 1 or 10 μ g anti-GRP78, however, modestly suppressed the binding of ACPAs with U937 cells, suggesting that the ACPAs may recognize more epitopes on the U937 cell surface than anti-GRP78 does. Pre-incubation with rGRP78 and ACPAs failed to block the binding of ACPAs on U937 cells due to the absence of citrullination of the rGRP78. In addition, the fact that pre-incubation with cit-GRP78 and ACPAs modestly suppressed the binding of ACPAs with U937 cells. ACPAs appear to recognize more citrullinated molecules on U937 cell surface than the anti-GRP78 antibodies. Accordingly, cit-GRP78 is one of the cognate antigens for ACPAs presented on U937 cells.

Citrullinated GRP78 complexes with ACPAs to suppressed ACPA-mediated TNF- α secretion. A portion of the GST-tagged rGRP78 (MW=97.3 kDa) became truncated (MW=72kDa) following citrullination and this smaller form was detected by anti-MC in Western blots. Anti-MC and anti-GRP78 (H-129) recognized both the intact rGRP78 (97.52 kDa) and the truncated form of GRP78 (72 kDa); however, only the 72-kDa truncated form was recognized by ACPAs. These results further suggest that citrullination renders protein molecules more fragile and more likely to be truncated. These results also indicate that anti-MC, anti-GRP78 and ACPAs recognize different epitopes on cit-GRP78 with different affinities. When U937 cells were incubated with ACPAs (80 IU/ml) in the presence of intact rGRP78, anti-GRP78 or cit-GRP78, only cit-GRP78 effectively suppressed ACPA-mediated TNF- α production by U937 cells whereas anti-GRP78 (H-129) only partially suppressed this activity. As expected for negative control, anti-GRP78 (H-129) and rGRP78 alone had no effect on TNF- α production by U937 cells.

The logo of National Sun Yat-sen University is a circular emblem. It features a central bell (the Sun Yat-sen Bell) flanked by two traditional Chinese lanterns. The emblem is surrounded by the university's name in Chinese characters: '國立中央大學' (National Sun Yat-sen University) at the top and '中華民國' (Republic of China) at the bottom. The entire logo is rendered in a light gray, semi-transparent style, serving as a watermark in the background of the text.

ACPAs bound to human monocytes and lymphocytes to increased TNF- α production. ACPAs bound to both monocytes and lymphocytes. In addition, GRP78 was highly expressed on monocytes, whereas this protein was modestly

expressed on lymphocytes. The incubation of normal PBMCs with ACPAs from 10-80 IU/ml dose-dependently enhanced PBMC TNF- α production compared with non-specific IgG control. Kinetic studies revealed that TNF- α production by PBMC reached its maximum around 4-8 hours and decreased after 24h of incubation with 40 IU/ml ACPAs.

Discussion

The importance of autoantibodies in the pathogenesis of RA is highlighted by the efficacy of B cells depletion therapy in RA treatment. A number of autoantibodies such as rheumatoid factor, ACPAs, anti-collagen type II, anti-heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2 (anti-hnRNP A2), anti-calpastatin, and anti-stress proteins are present in RA serum. These autoantibodies have traditionally been regarded as disease markers for diagnostic purposes; however, the potential pathological roles of these autoantibodies in RA have also been reported recently. Among these autoantibodies, ACPAs were reported to be highly associated with RA disease activity, and these antibodies were even noted before the development of RA. These observations strongly suggest that ACPAs may be involved in the rheumatoid pathogenesis. While evidence supports the roles of protein citrullination in the breakdown of immune

tolerance in RA, in some autoimmune diseases such as myasthenia gravis or Graves' disease, autoantibodies directly bind and injure the target cells. Accordingly, we hypothesized that ACPAs may directly stimulate an inflammatory reaction in monocytes/macrophages. In the present study, we clearly demonstrated that ACPAs was the most specific biomarker for differential diagnosis of RA. As for the pathogenesis of RA, ACPAs elicited an inflammatory reaction by enhancing TNF- α production via binding to surface-expressed cit-GRP78 on U937 cells as well as on human monocytes. This finding is consistent with the report by Hueber et al. showing that RA patients with positive ACPAs tend to have higher serum levels of inflammatory cytokines due to the engagement of Fc γ RIIIa by ACPAs complexes with citrullinated fibrinogens. Here, we presented evidence that ACPAs directly bind to cit-GRP78 on monocytic cells to promote TNF- α production. Furthermore, ACPAs in complex with cit-GRP78 remarkably suppressed TNF- α production.

GRP78 is a well-known chaperone protein involved in protecting cells from stress by preventing denaturation of proteins and subsequently cell apoptosis. Chaperones may have immunomodulatory function that affects the inflammatory response. GRP78 was not limited to the endoplasmic reticulum, but also was detected

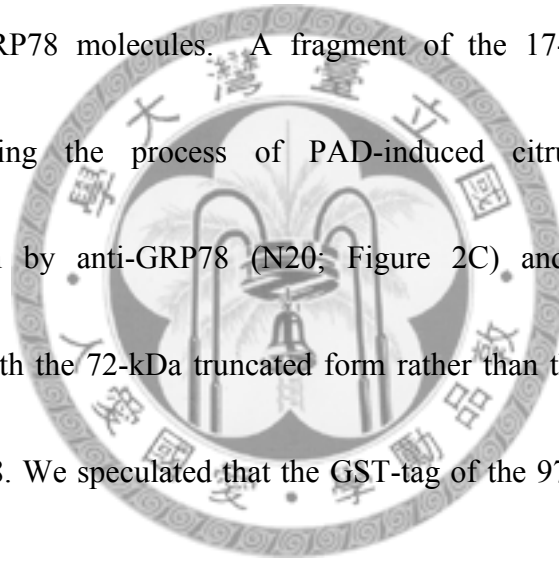
on the cell surface. Recently, GRP78 was also detected in the extracellular fluid acting as a danger signal during stress or inflammation. GRP78 is a unique autoantigen that stimulates proliferation of rheumatoid synovial T cells but not other inflammatory arthritides. In addition, GRP78 was overexpressed in RA synovium, and anti-GRP78 antibodies were identified in the serum of RA patients. In mouse collagen-induced arthritis, GRP78 may even suppress disease activity via increased interleukin (IL)-10 and IL-4 secretion.

In the present study, we found that cit-GRP78 was expressed on the cell surface of U937 and human mononuclear cells. Interestingly, ACPAs and anti-MC antibodies recognized a 55-kDa molecule on U937 cell surface after immunoprecipitation by anti-GRP78 (N-20). This 55-kDa molecule was determined to be the truncated form of cit-GRP78 (72 kDa) after Western blot analysis with anti-GRP78 (H-129).

Citrullination of the protein may change its structure due to the loss of the basic residues (arginines), and this change may result in altered charge distribution and/or loss of ionic interactions and H-bonds and may even cause denaturation of the protein.

It is also quite possible that citrullination of GRP78 and the resultant change in protein structure may renders this protein more fragile during the process of

immunoprecipitation by ACPAs and anti-GRP78 (N-20). In fact, the fragmentation of GRP78 has been previously reported during two-dimensional gel electrophoresis in the literatures. Here, we reported that some of the 97-kDa GST-tagged rGRP78 molecule became a 72-kDa citrullinated fragment following citrullination. Both intact and truncated rGRP78 showed different affinities toward anti-MC, anti-GRP78 (H-129), and ACPAs. These three antibodies may actually recognize different epitopes on the GRP78 molecules. A fragment of the 17-25-kDa peptide was deleted either during the process of PAD-induced citrullination or during immunoprecipitation by anti-GRP78 (N20; Figure 2C) and ACPAs. ACPAs, however, reacted with the 72-kDa truncated form rather than the 97-kDa full-length citrullinated-rGRP78. We speculated that the GST-tag of the 97.52-kDa GRP78 may sterically hinder the binding of GRP78 with ACPAs. Skriner et al. showed that GRP78 was not citrullinated in the exosome, although the mechanism and location of GRP78 citrullination remain unknown. Protein citrullination appears to be essential for ACPAs binding to the cognate antigens. Citrullination of chemokines modulate their biological activity. Accordingly, citrullination of GRP78 is not only crucial for binding to ACPAs, but also for modification of its biological activities. We found

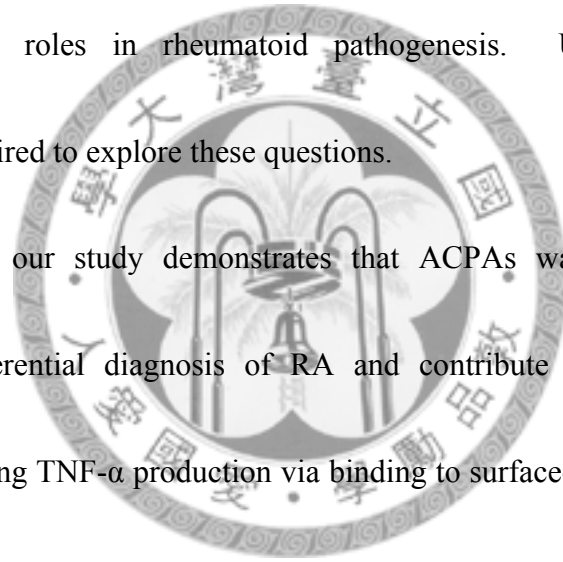


that ACPAs inhibited anti-GRP78 (H-129) antibody binding to surface-expressed GRP78 molecules due to cross-reactivity effects. The anti-GRP78 (H-129) antibody is a rabbit polyclonal antibody against the C-terminal amino acids (525-653) of human GRP78, which contains four arginines as potential targets for citrullination.

Pre-incubation of CCP with ACPAs slightly suppressed TNF- α production by 25-30%. Since the CCP was a relative small sequence that contains only one citrulline in the 21 amino acids, APCAs and CCP failed to form stable immune complexes. The same CCP-conjugated affinity column was successfully used to collect ACPA (-) RA sera, and these samples failed to stimulate U937 cell TNF- α production. Thus, ACPA-stimulated U937 cell TNF- α production is likely unique for ACPAs and not the case for other serum antibodies or factor(s) in RA serum. The complete abrogation of ACPA-mediated TNF- α production in U937 cells following pre-incubation of cit-GRP78 with ACPAs further confirmed the direct stimulation of U937 cell TNF- α production by ACPAs via specific binding to surface-expressed cit-GRP78. Notably, ACPAs can react with multiple U937 cell surface proteins in addition to citrullinated GRP78. The anti-citGRP78 antibody is one of the ACPAs. Recently Trouw et al. reported that APCAs from patients with RA activated the complement system *in vitro*

via the classic and alternative pathways to exert phlegmotic effects. Obviously, protein citrullination is not an uncommon phenomenon for monocytic cell surface protein due to sufficient PAD enzyme activity in this cell type. In addition to monocytes, ACPAs and anti-GRP78 also bound to the cell surface of lymphocyte, although the binding was much weaker than that with monocytes. It would be interesting to know the biological/pathological functions of these citrullinated antigens and their roles in rheumatoid pathogenesis. Undoubtedly, further investigation is required to explore these questions.

In conclusion, our study demonstrates that ACPAs was the most specific biomarker for differential diagnosis of RA and contribute to the inflammatory reactions by triggering TNF- α production via binding to surface-expressed cit-GRP78 followed by NF- κ B activation in monocytes/ macrophages. These results also suggest that prevention of protein citrullination is a potential therapeutic strategy for the treatment of patients with RA.



七 參考文獻

1. Alenius GM, Berglin E, and Rantapää Dahlqvist S. Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) in psoriatic patients with or without joint inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 2006, Mar;65(3):398-400.
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315-24.
3. Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Lama N, Bonacci E, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C, and Caporali R. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in primary Sjogren syndrome may be associated with non-erosive synovitis. *Arthritis Res. Ther.* 2008 May;10(3):R51.
4. Auger I, Sebbag M, Vincent C, Balandraud N, Guis S, Nogueira L, Svensson B, Cantagrel A, Serre G, and Roudier J. Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3424-32.

5. Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, Veys EM, and De Keyser F. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2255-62.

6. Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Gibbons L, Plant D, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P, YEAR consortium, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, and Worthington J. Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key pathway underlying susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* 2008 Aug 1;17(15):2274-9.

7. Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, Van Venrooij WJ, Klareskog L, and Dahlqvist SR. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2004;6(4):R303-8.

8. Bingham CO 3rd. Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.* 2008;66(3):210-5.

9. Bläss S, Haferkamp C, Specker C, Schwochau M, Schneider M, and Schneider EM.

Rheumatoid arthritis: autoreactive T cells recognising a novel 68k autoantigen. *Ann.*

Rheum. Dis. 1997 May;56(5):317-22.

10. Bläss S, Specker C, Lakomek HJ, Schneider EM, and Schwochau M. Novel 68

kDa autoantigen detected by rheumatoid arthritis specific antibodies. *Ann. Rheum.*

Dis. 1995 May;54(5):355-60.

11. Bläss S, Union A, Raymackers J, Schumann F, Ungethüm U, Müller-Steinbach S,

De Keyser F, Engel JM, and Burmester GR. The stress protein BiP is overexpressed

and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001

Apr;44(4):761-71.



12. Bodman-Smith MD, Corrigan VM, Berglin E, Cornell HR, Tzioufas AG,

Mavragani CP, Chan C, Rantapää-Dahlqvist S, and Panayi GS. Antibody response to

the human stress protein BiP in rheumatoid arthritis. *Rheumatology. (Oxford)* 2004

Oct;43(10):1283-7.

13. Bombardieri M, Alessandri C, Labbadia G, Iannuccelli C, Carlucci F, Ricciardi V,

Paoletti V, Valesini G. Role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in

discriminating patients with rheumatoid arthritis from patients with chronic hepatitis

C infection-associated polyarticular involvement. *Arthritis Res Ther.*

2004;6(2):R137-41.

14. Brennan FM. and McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* 2008 Nov;118(11):3537-45.

15. Brownlie RJ, Myers LK, Wooley PH, Corrigan VM, Bodman-Smith MD, Panayi GS, and Thompson SJ. Treatment of murine collagen-induced arthritis by the stress protein BiP via interleukin-4-producing regulatory T cells: a novel function for an ancient protein. *Arthritis Rheum.* 2006 Mar;54(3):854-63.

16. Bugatti S, Codullo V, Caporali R, and Montecucco C. B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2007 Dec;7(2):137-42.

17. Campanella ME, Chu H, Wandersee NJ, Peters LL, Mohandas N, Gilligan DM, and Low PS. Characterization of glycolytic enzyme interactions with murine erythrocyte membranes in wild-type and membrane protein knockout mice. *Blood* 2008 Nov 1;112(9):3900-6.

18. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C, and Malmstrom V.

CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* 2004;6(4):R335-46.

19. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, and Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975 Sep;72(9):3666-70

20. Chan MT, Owen P, Dunphy J, Cox B, Carmichael C, Korendowych E, and McHugh NJ. Associations of erosive arthritis with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and MHC Class II alleles in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2008 Jan;35(1):77-83.

21. Chang J. and Girgis L. Clinical use of anti-TNF-alpha biological agents--a guide for GPs. *Aust. Fam. Physician* 2007 Dec;36(12):1035-8.

22. Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiko S, and Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology. (Oxford)* 2005 Jan;44(1):40-50.

23. Chen HA, Lin KC, Chen CH, Liao HT, Wang HP, Chang HN, Tsai CY, and Chou

CT. The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2006 Jan;65(1):35-9.

24. Cho ML, Yoon CH, Hwang SY, Park MK, Min SY, Lee SH, Park SH, and Kim HY. Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2004 Mar;50(3):776-84.

25. Ciesielski CJ, Andreakos E, Foxwell BM, Feldmann M. TNFalpha-induced macrophage chemokine secretion is more dependent on NF-kappaB expression than lipopolysaccharides-induced macrophage chemokine secretion. *Eur J Immunol* 2002 Jul;32(7):2037-45.

26. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, and Serre G. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc gamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 2008 Mar;58(3):678-88.



27. Corrigan VM, Bodman-Smith MD, Fife MS, Canas B, Myers LK, Wooley P, Soh C, Staines NA, Pappin DJ, Berlo SE, van Eden W, van Der Zee R, Lanchbury JS, and Panayi GS. The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis. *J. Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):1492-8.

28. Dorner T, Egerer K, Feist E, and Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004 May;16(3):246-53.

29. Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, Zimmermann R. Functional and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci.* 2009 May; 66(9): 1556-69.

30. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 Jun 17;350(25):2572-81

31. Egsmose C, Lund B, Borg G, Pettersson H, Berg E, Brodin U, and Trang L. Patients with rheumatoid arthritis benefit from early 2nd line therapy: 5 year followup of a prospective double blind placebo controlled study. *J. Rheumatol.* 1995



Dec;22(12):2208-13.

32. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, and Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* 2004 Aug 2;200(3):277-85.

33. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, Racewicz AJ, van Vollenhoven RF, Li NF, Agarwal S, Hessey EW, and Shaw TM; DANCER Study Group. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* 2006 May;54(5):1390-400.

34. Fearon WR. The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline. *Biochem. J.* 1939 Jun;33(6):902-7.

35. Feldmann M, Brennan FM, and Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;14:397-440.

36. Finckh A, and Gabay C. At the horizon of innovative therapy in rheumatology: new biologic agents. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2008 May;20(3):269-75.

37. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003 May 15;423(6937):356-61.
38. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, and Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 1990 May 1;144(9):3347-53.
39. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of Disease: a ‘DAMP’ view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Jul;3(7):382-90
40. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, and Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 1996 Jun 1;183(6):2593-603. .
41. Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, and Kunkel HG. An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 1957 May 1;105(5):425-38 .
42. Gartlehner G, Hansen RA, Jonas BL, Thieda P, Lohr KN. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic

review and metaanalysis. *J Rheumatol.* 2006 Dec;33(12):2398-408.

43. Gebe JA, Novak EJ, Kwok WW, Farr AG, Nepom GT and Buckner JH. T cell selection and differential activation on structurally related HLA-DR4 ligands. *J. Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3250–6.

44. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessière C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, and Serre G.

The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J. Immunol.* 1999 Jan 1;162(1):585-94.

45. Goëb V, Thomas-L'otellier M, Daveau R, Charlionet R, Fardellone P, Le Loët X, Tron F, Gilbert D, and Vittecoq O. Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Res. Ther.* 2009;11(2):R38.

46. Handel ML, McMorrow LB, Gravallesse EM. Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* 1995 Dec;38(12):1762–70.

47. Harauz G and Musse AA. A tale of two citrullines--structural and functional

aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochem. Res.* 2007 Feb;32(2):137-58.

48. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, and Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J. Immunol.* 2003 Jul 15;171(2):538-41.

49. Hitchon CA, Alex P, Erdile LB, Frank MB, Dozmorov I, Tang Y, Wong K, Centola M, and El-Gabalawy HS. A distinct multicytokine profile is associated with anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in patients with early untreated inflammatory arthritis. *J. Rheumatol.* 2004 Dec;31(12): 2336-46.

50. Hu L, Evers S, Lu ZH, Shen Y, and Chen J. Two-dimensional protein database of human pancreas. *Electrophoresis* 2004 Feb;25(3):512-8.

51. Hueber W, Tomooka BH, Zhao X, Kidd BA, Drijfhout JW, Fries JF, van Venrooij WJ, Metzger AL, Genovese MC, and Robinson WH. Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines. *Ann. Rheum. Dis.* 2007 Jun;66(6):712-9

52. Hung HC, Lin CY, Liao YF, Hsu PC, Tsay GJ, Liu GY. The functional haplotype of peptidylarginine deiminase IV (S55G, A82V and A112G) associated with susceptibility to rheumatoid arthritis dominates apoptosis of acute T leukemia Jurkat cells. *Apoptosis*. 2007 Mar;12(3):475-87.

53. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, Schreuder GM, Wener M, Breedveld FC, Ahmad N, Lum RF, de Vries RR, Gregersen PK, Toes RE, and Criswell LA. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*. 2005 Nov;52(11):3433-8.

54. Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E. M. and Sousa, R. Structural basis on interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol. Cell*. 2005 Nov;20(4):513-24.

55. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Huizinga TW, Klareskog L, and Alfredsson L. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet*. 2007 May;80(5):867-75.

56. Karr RW, Rodey GE, Lee T, Schwartz BD. Association of HLA-DRw4 with

rheumatoid arthritis in black and white patients. *Arthritis Rheum.* 1980

Nov;23(11):1241-5

57. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, and Skogh T. Anti-CCP antibody test

predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish

TIRA project). *Ann. Rheum. Dis.* 2004 Sep;63(9):1085-9.

58. Kim KW, Cho ML, Park MK, Yoon CH, Park SH, Lee SH, and Kim HY.

Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*

Ther. 2005;7(1):R139-48.

59. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, and Alfredsson L. Immunity

to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 2008;26:651-75.

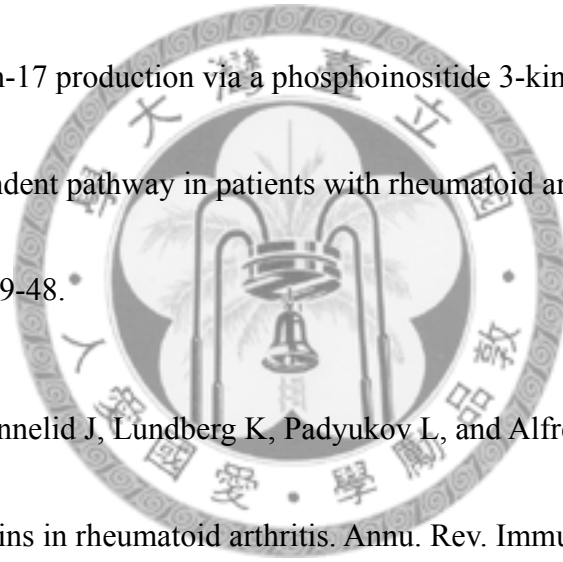
60. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J,

Rönnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapää-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L,

and Alfredsson L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may

trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens

modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006 Jan;54(1):38-46.



61. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, and Holers VM. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J. Clin Invest* 2006 Apr;116(4):961-73.
62. Lee DM and Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001 Sep;358(9285):903-11.
63. Li Q, Lu Q, Bottero V, Estepa G, Morrison L, Mercurio F, Verma IM. Enhanced NF-kappaB activation and cellular function in macrophages lacking IkappaB kinase 1 (IKK1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Aug 30;102(35):12425-30.
64. Liu GY, Liao YF, Chang WH, Liu CC, Hsieh MC, Hsu PC, Tsay GJ, Hung HC. Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. *Apoptosis*. 2006 Feb;11(2):183-96.
65. Lubberts E, Koenders MI, and van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.* 2005;7(1):29-37.
66. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, Zendman AJ, and Harris HE. Citrullinated proteins have increased immunogenicity

and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res. Ther.* 2005;7(3):R458-67.

67. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L, and Catrina AI. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* 2008 Oct;67(10):1488-92.

68. Mastronardi FG, Wood DD, Mei J, Raijmakers R, Tseveleki V, Dosch HM, Probert L, Casaccia-Bonofil P, and Moscarello MA. Increased citrullination of histone H3 in multiple sclerosis brain and animal models of demyelination: a role for tumor necrosis factor-induced peptidylarginine deiminase 4 translocation. *J. Neurosci.* 2006 Nov;26(44):11387-96.

69. Mavropoulos JC, Cuchacovich M, Llanos C, Aguillón JC, Gatica H, Pizzo SV, and Gonzalez-Gronow M. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy augments dipeptidyl peptidase IV activity and decreases autoantibodies to GRP78/BIP and phosphoglucose isomerase in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2005 Nov;32(11):2116-24.

70. May MJ and Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today* 1998 Feb;19(2):80-8.

71. Méchin MC, Sebbag M, Arnaud J, Nachat R, Foulquier C, Adoue V, Coudane F, Duplan H, Schmitt AM, Chavanas S, Guerrin M, Serre G, and Simon M. Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2007 Jun;29(3):147-68.

72. Mewar D and Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed. Pharmacother.* 2006 Dec;60(10):648-55.

73. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, 2 receptor for alpha2-macroglobulin-dependent signaling. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):2092-7.

74. Misra UK, Deedwania R, and Pizzo SV. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J. Biol. Chem.* 2006 May 12;281(19):13694-707.

75. Nakae S, Nambu A, Sudo K, and Iwakura Y. Suppression of immune induction of

collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* 2003 Dec
1;171(11):6173-7.

76. Neumann E, Barnum SR, Turner IH, Echols J, Fleck M, Judex M, Kullmann F,
Mountz JD, Schölmerich J, Gay S, and Müller-Ladner U. (2002). Local production of
complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 2002
Apr;46(4):934-45.

77. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der
Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, and Dijkmans
BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of
serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb;50(2):380-6.

78. Nienhuis RL. and Mandema E. (1964). A new serum factor in patients with
rheumatoid arthritis; the antiperinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 1964 Jul;23:302-5

79. Niewold TB, Harrison MJ, and Paget SA. Anti-CCP antibody testing as a
diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis. *QJM.* Apr;100(4):193-201.

80. Oliver JE, Worthington J, and Silman AJ. Genetic epidemiology of rheumatoid
arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2006 Mar;18(2):141-6.

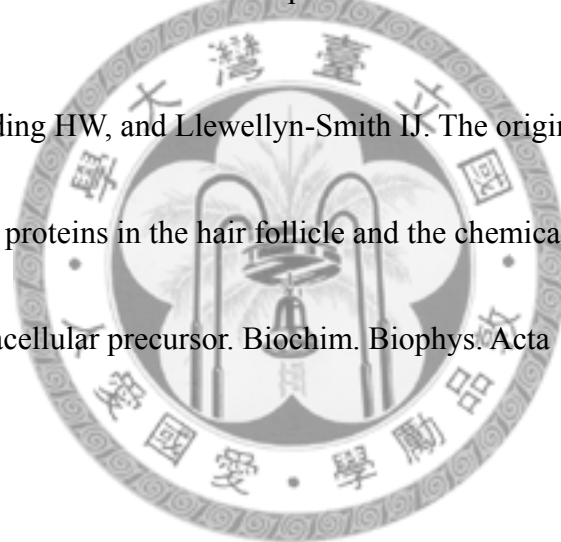


81. Olsen NJ and Stein CM. (2004). New drugs for rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2004 May 20;350(21):2167-79.

82. Person MD, Shen J, Traner A, Hensley SC, Lo HH, Abbruzzese JL, and Li D. Protein fragment domains identified using 2D gel electrophoresis/MALDI-TOF. *J. Biomol. Tech.* 2006 Apr;17(2):145-56.

83. Rogers GE. Occurrence of citrulline in proteins. *Nature* 1962 Jun 23;194:1149-51.

84. Rogers GE, Harding HW, and Llewellyn-Smith IJ. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochim. Biophys. Acta* 1977 Nov 25;495(1):159-75.



85. Rønningen KS, Spurkland A, Egeland T, Iwe T, Munthe E, Vartdal F, and Thorsby E. Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74. *Tissue Antigens* 1990 Nov;36(5):235-40.

86. Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J and Carson DA. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1

chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989 Jul;86(13):5104–8.

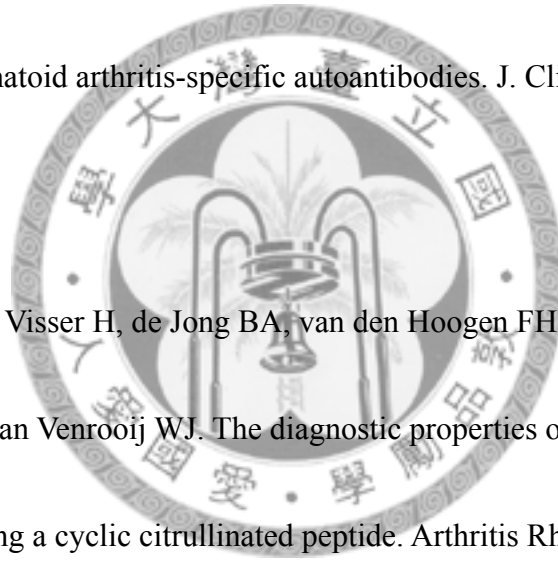
87. Ruddy S and Austen KF. Activation of the complement and properdin systems in rheumatoid arthritis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975 Jun 13;256:96-104.

88. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, and van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J. Clin. Invest 1998 Jan 1;101(1):273-81.

89. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, and van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum. 2000 Jan;43(1):155-63.

90. Scott DL and Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. 2006 Aug 17;355(7):704-12.

91. Senshu T, Sato T, Inoue T, Akiyama K, and Asaga H. Detection of citrulline residues in deaminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. Anal.



Biochem. 1992 May 15;203(1):94-100.

92. Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, Zhao R, Puravs E, Tra J, Michael CW, Misek DE, and Hanash SM. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function.

J. Biol. Chem. 2003 Feb 28;278(9):7607-16.

93. Simmonds RE and Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis:

NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. Rheumatology. (Oxford)

2008 May;47(5):584-90.

94. Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. Arthritis Res Ther. 2005;7 Suppl 2:S4-14.

95. Smeets TJ, Dolhain RJEM, Miltenburg AM, de Kuiper R, Breedveld FC, and Tak

PP. Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation

markers in early rheumatoid synovial tissue. Clin. Immunol. Immunopathol. 1998

Jul;88(1):84-90.

96. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. Nat

Rev Immunol. 2002 Mar;2(3):185-94

97. Stamp LK, James MJ, and Cleland LG. Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? *Immunol. Cell Biol.* 2004 Feb;82(1):1-9.
98. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* 1976 May;57(5):1148-57.
99. Stastny P. HLA and the role of T cells in the predisposition to disease. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1987 Apr;13(1):1-6.
100. Stensland ME, Pollmann S, Molberg Ø, Sollid LM, Fleckenstein B. Primary sequence, together with other factors, influence peptide deimination by peptidylarginine deiminase-4. *Biol Chem.* 2009 Feb;390(2):99-107
101. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, and Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2003 Aug;34(4):395-402.

102. Suzuki A, Yamada R, and Yamamoto K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007 Jun;1108:323-39.

103. Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, Ødegård S, Haavardsholm EA, Mowinckel P, van der Heijde D, Landewé R, and Kvien TK. High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann. Rheum. Dis.* 2008 Feb;67(2):212-7.

104. Trouw LA, Haisma EM, Levarht EW, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Daha MR, Huizinga TW, and Toes RE. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):1923-31.

105. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, and Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):253-61.

106. van der Heide A., Jacobs,J.W., Bijlsma,J.W., Heurkens,A.H., van Booma-Frankfort,C., van,d., V, Haanen,H.C., Hofman,D.M., van Albada-Kuipers,G.A.,

ter Borg, E.J., Brus, H.L., Dinant, H.J., Kruize, A.A., and Schenk, Y. (1996). The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 124, 699-707.

107. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes RE, and Huizinga TW. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004a Mar;50(3): 709-15.

108. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E, van Venrooij WJ, Verweij CL, Toes RE, and de Vries RR. (2004b). Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004b Jul;50(7):2113-21.

109. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, and van Venrooij WJ. (2004a). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* 2004a Apr;63(4):373-81.

110. Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, and Tak PP.

The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue.

Arthritis Rheum. 2004b Nov;50(11):3485-94.

111. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, and Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease.

Bioessays 2003 Nov;25(11):1106-18.

112. Walser-Kuntz DR, Weyand CM, Fulbright JW, Moore SB & Goronzy JJ.

HLA-DRB1 molecules and antigenic experience shape the repertoire of CD4 T cells.

Hum. Immunol. 1995 Dec;44(4):203-9.

113. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS,

McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, and

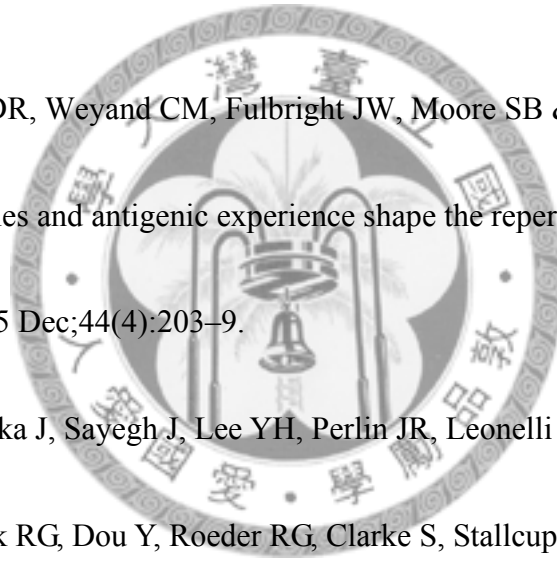
Coonrod SA. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via

demethylination. Science 2004 Oct;306(5694):279-83.

114. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI,

Jackson CG, Lange M, Burge DJ. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis

factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving



methotrexate. *N Engl J Med.* 1999 Jan;340(4):253–9.

115. Weyand CM and Goronzy JJ. Pathomechanisms in rheumatoid arthritis--time for a string theory? *J. Clin. Invest* 2006 Apr;116(4):869-71.

116. Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, and Bell JI.

HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*

1989 Dec;86(24),10049-53.

117. Yamada R. Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2005 Apr;4(4):201-6.

118. Yamasaki S, Kawakami A, Nakashima T, Nakamura H, Kamachi M, Honda S,

Hirai Y, Hida A, Ida H, Migita K, Kawabe Y, Koji T, Furuichi I, Aoyagi T, Eguchi K.

Importance of NF-kappaB in rheumatoid synovial tissues: in situ NF-kappaB

expression and in vitro study using cultured synovial cells. *Ann Rheum Dis* 2001

Jul;60(7):678–84.

119. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, and Hamblin TJ. Anti-keratin

antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.* 1979 Jul 14;2(6182):97-9.



120. Young CL, Feierstein A, and Southwick FS. (1994). Calcium regulation of actin filament capping and monomer binding by macrophage capping protein. *J. Biol. Chem.* 1994 May 13;269(19):13997-4002.

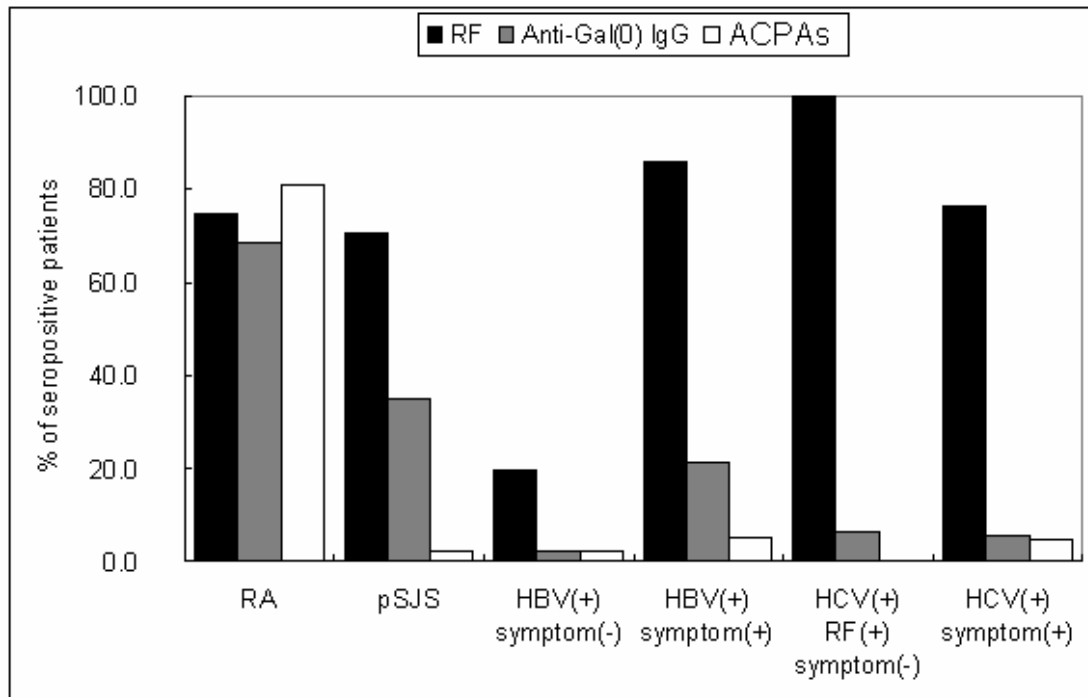
121. Zanelli E, Breedveld FC and de Vries RR. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatology* 2000 Oct;39(10):1060–6.

122. Zvaifler NJ. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.* 1973;16(0):265-336.



八 圖表

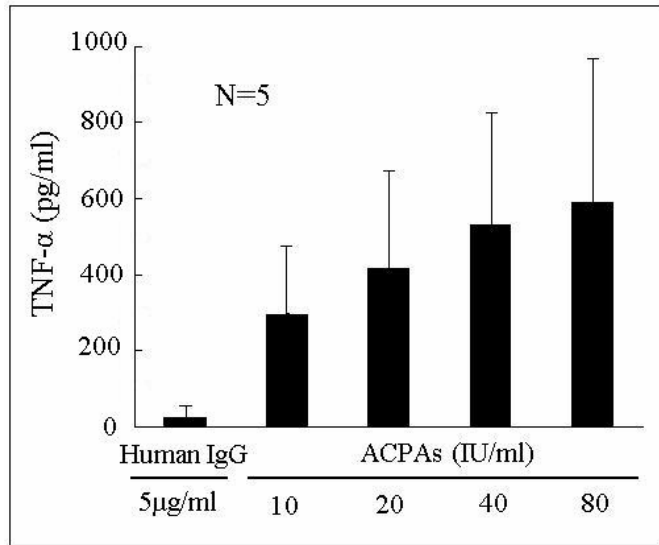
圖一



ACPAs 專一的存在類風濕性關節炎患者血清中

比較抗瓜氨酸化胜肽抗體(ACPAs)，類風濕因子(RF)及抗無乳酸免疫球蛋白抗體 [Anti-Gal(0) IgG] 在類風濕性關節炎及其相仿者患者血清的陽性率。(RA, rheumatoid arthritis; pSjS, primary Sjögren's syndrome)

圖二

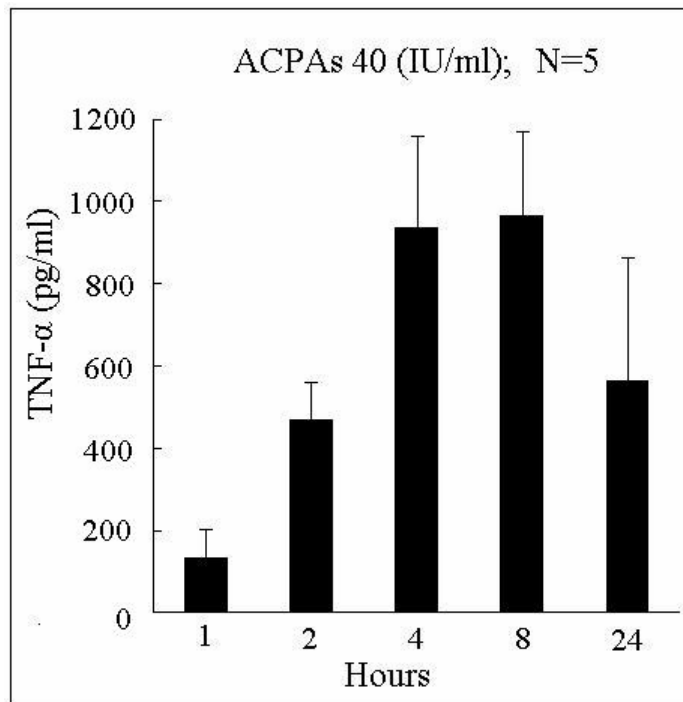


ACPs 依劑量促進正常周邊單核性白血球分泌 TNF- α

正常周邊單核性白血球分泌 TNF- α 的量隨著 ACPs 的濃度(10-80 IU/ml)增加而增加。



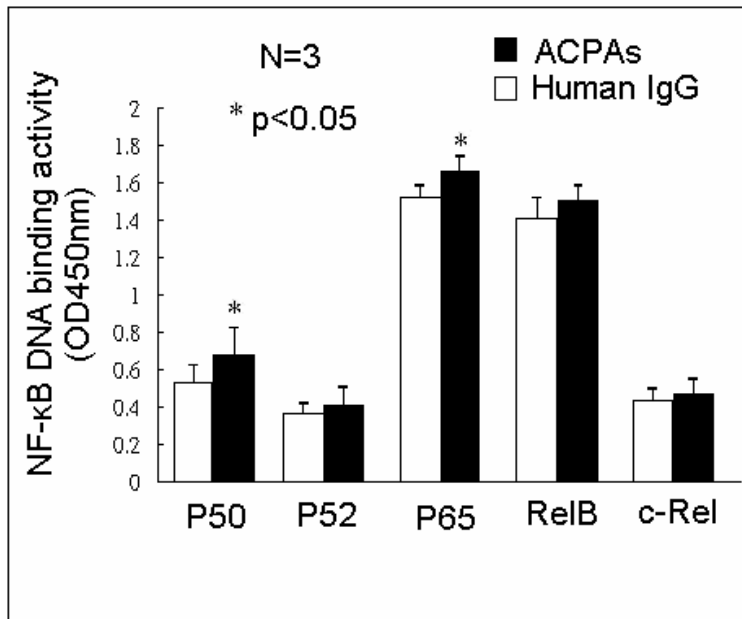
圖三



ACPs 促進正常周邊單核性白血球 TNF- α 分泌的時序性

以 ACPs(40IU/ml)促進正常周邊單核性白血球的 TNF- α 分泌，在四到八小時左右達到最高點。

圖四

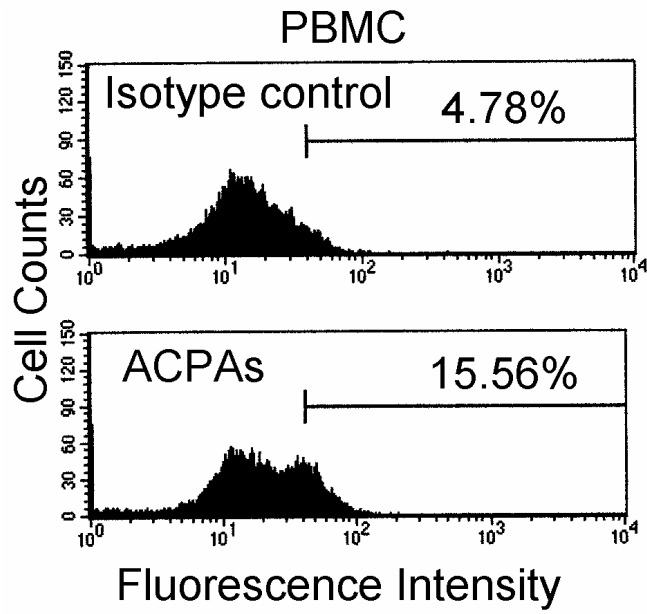


ACPs 促進正常周邊單核性白血球的 NF-κB 活性

ACPs (40IU/ml) 可以促進正常周邊單核性白血球 NF-κB family 中的 p50 及 p65 之 DNA 結合活性。



圖五



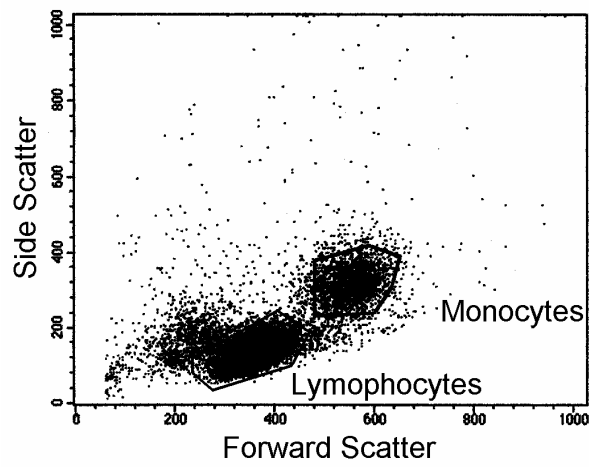
ACPAs 可以結合在周邊單核性白血球的細胞膜上

以流式細胞儀偵測到 ACPAs 可以結合正常周邊單核性白血球的細胞膜上。

(PBMC, peripheral blood mononuclear cell)



圖六

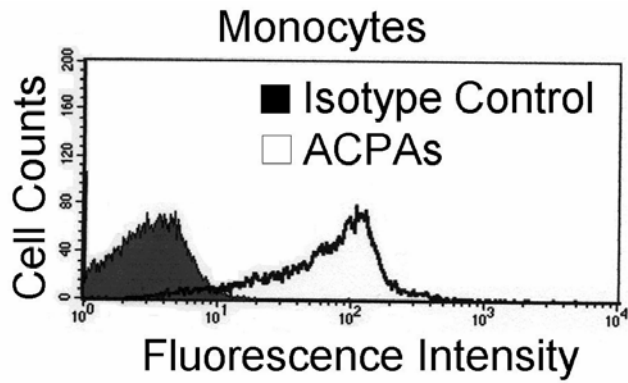


正常周邊單核性白血球可分為淋巴球及單核球

在流氏細胞儀分析中，依細胞大小(Forward Scatter)及顆粒性(Side Scatter)，正常周邊單核性白血球可以清楚的區分為淋巴球及單核球。



圖七

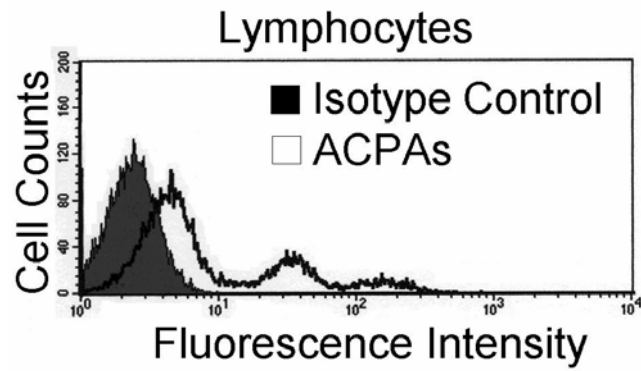


ACPs 可以結合在單核球細胞膜上

在流氏細胞儀分析中，先依細胞大小(Forward Scatter)及顆粒性(Side Scatter)區分出單核球(monocyte)，而 ACPs 可以高比率地結合在單核球細胞膜上。



圖八

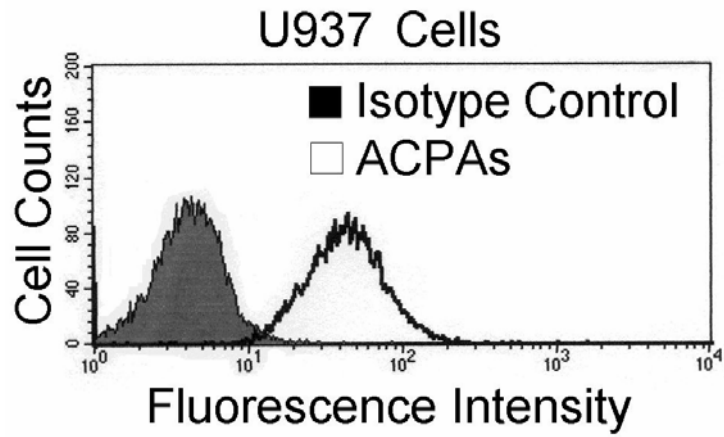


ACPAs 可以結合在淋巴球細胞膜上

在流氏細胞儀分析中，先依細胞大小(Forward Scatter)及顆粒性(Side Scatter)區分出單核球(monocyte)，而 ACPAs 可以結合在淋巴球細胞膜上但是比率較單核球來得低。



圖九

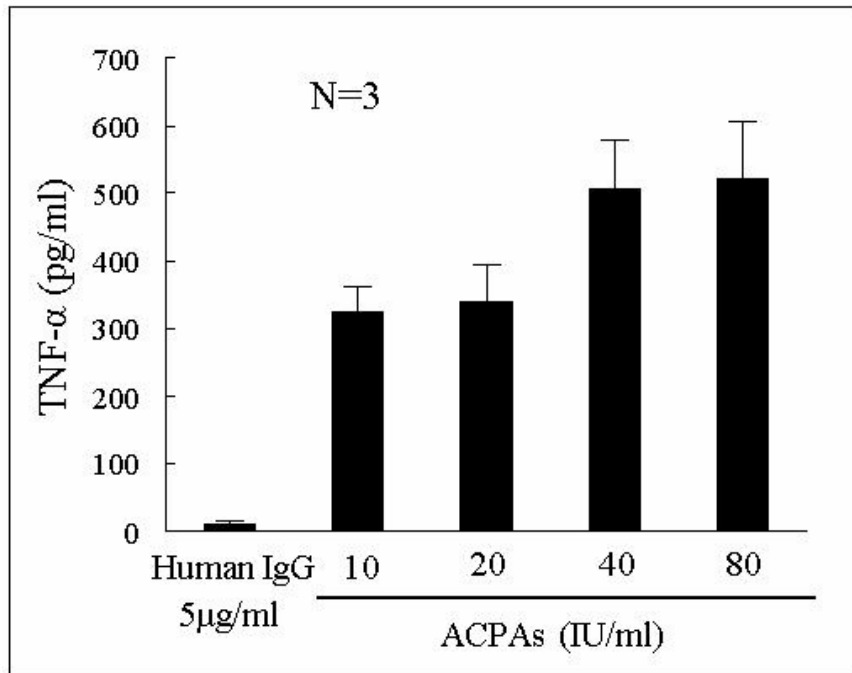


ACPAs 可以結合在 U937 細胞的細胞膜上

以流氏細胞儀分析顯示 ACPAs 可以結合在 U937 細胞的細胞膜上



圖十

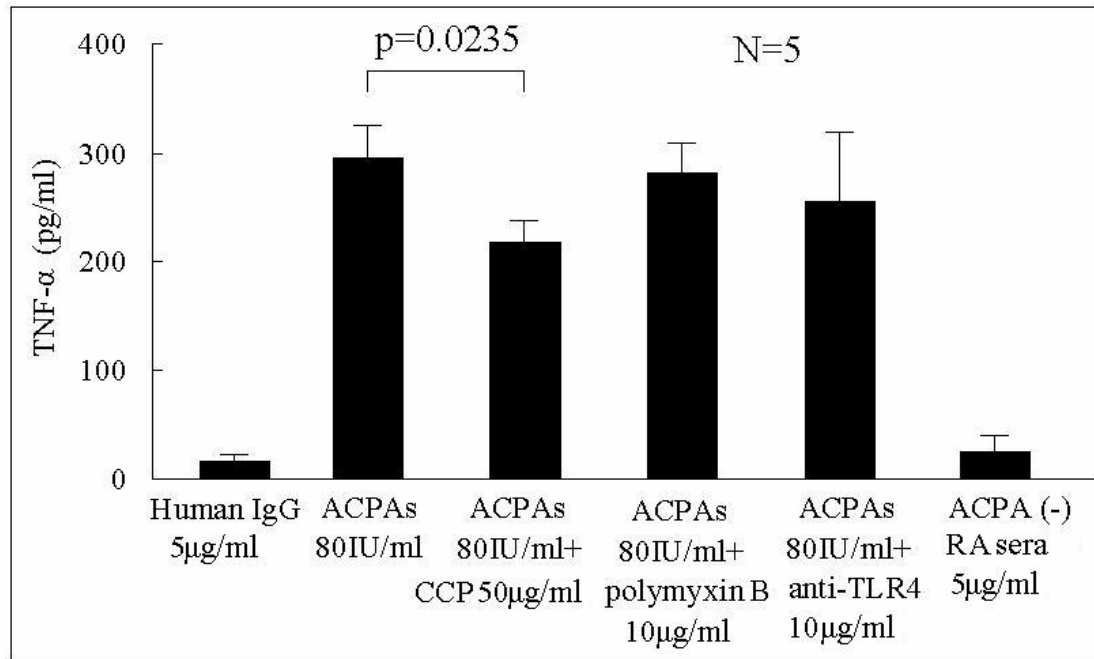


ACPAs 依劑量促進 U937 細胞的 TNF- α 分泌

U937 細胞分泌 TNF- α 的量隨著 APCAs 的濃度(10-80 IU/ml)增加而增加。



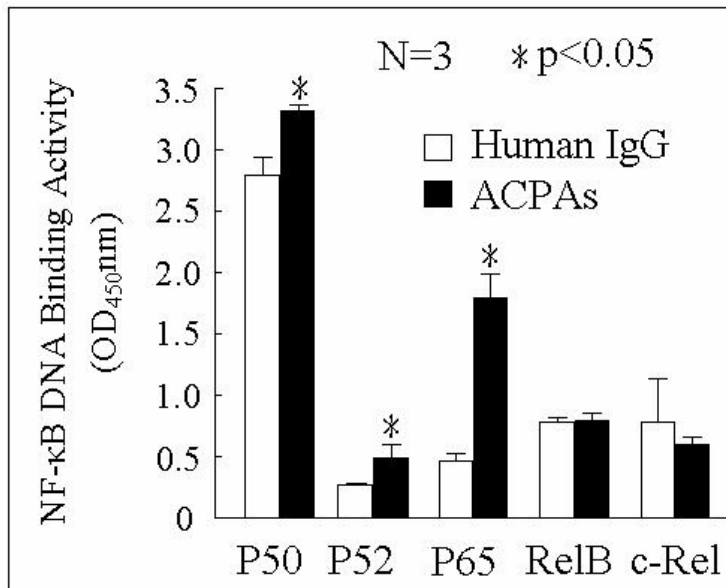
圖十一



APCAs 專一性的促進 U937 細胞 TNF- α 分泌

ACPAs (80IU/ml)可以促進 U937 細胞 TNF- α 分泌，加入 CCP (50 μ g/ml)可以明顯的降低其 TNF- α 分泌，而加入 polymyxin B (10 μ g/ml)及 anti-TLR4 (10 μ g/ml) (用以阻斷細菌內毒素)並不會影響其 TNF- α 分泌，而去除 ACPAs 的類風濕性關節炎患者的血清[ACPA (-) RA sera]並不會造成 U937 細胞 TNF- α 分泌。(CCP, cyclic citrullinated peptide; TLR-4, Toll-like receptor 4)

圖十二



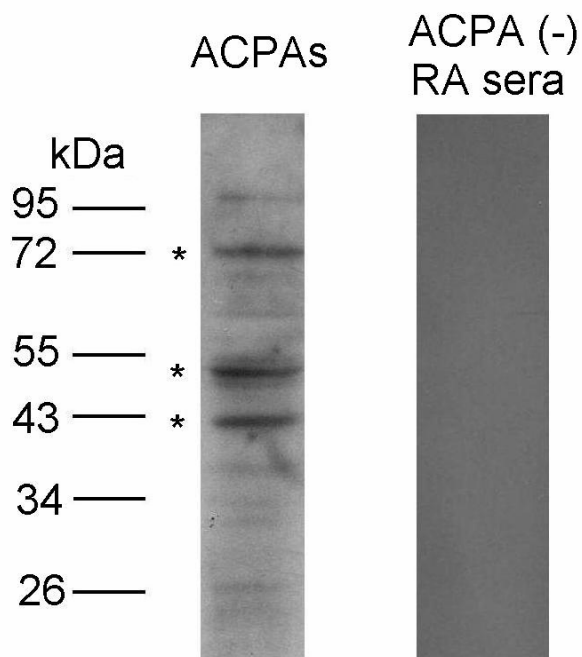
ACPAs 促進 U937 細胞的 NF-κB 活性

ACPAs (40IU/ml) 可以促進 U937 細胞 NF-κB family 中的 p50、p52 及 p65 之 DNA

結合活性



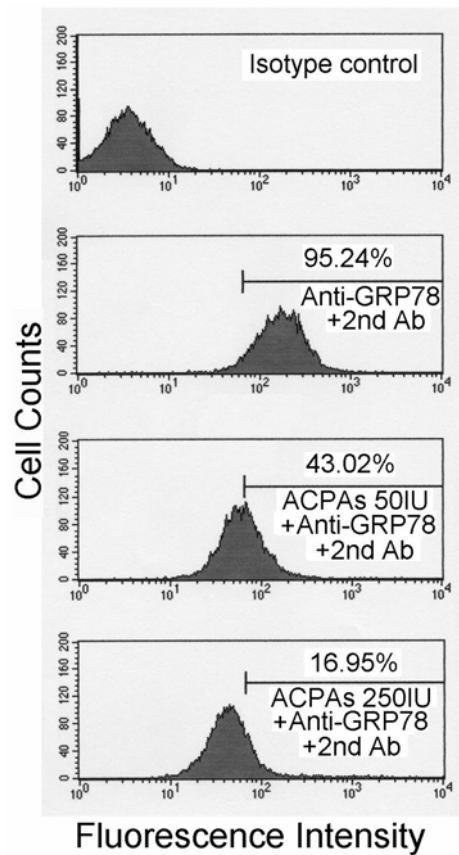
圖十三



以 Western blot 方法找到 ACPAs 作用在 U937 細胞膜上的蛋白質

將 U937 細胞膜蛋白質分離出來後，以抗瓜氨酸化胜肽抗體做第一抗體，以 Western blot 方法偵測，發現 ACPAs 至少作用在三處 U937 細胞株膜蛋白質萃取物。(kDa, kilodaltons)

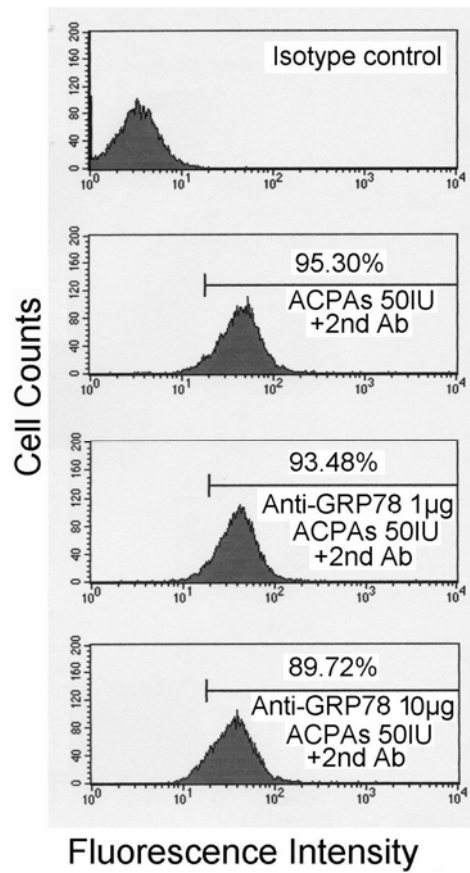
圖十四



ACPAs阻斷anti-GRP78 Abs和U937細胞的表面結合

U937細胞先和不同濃度的ACPAs (0, 50 IU, 250 IU)作用，再以Anti-GRP78及含FITC其相對應的第二抗體染色，可以發現隨ACPAs濃度的增加(0, 50, 250 IU)，anti-GRP78與細胞膜上GRP78的結合比例也逐漸下降(95.24%, 43.02%, 16.95%)。

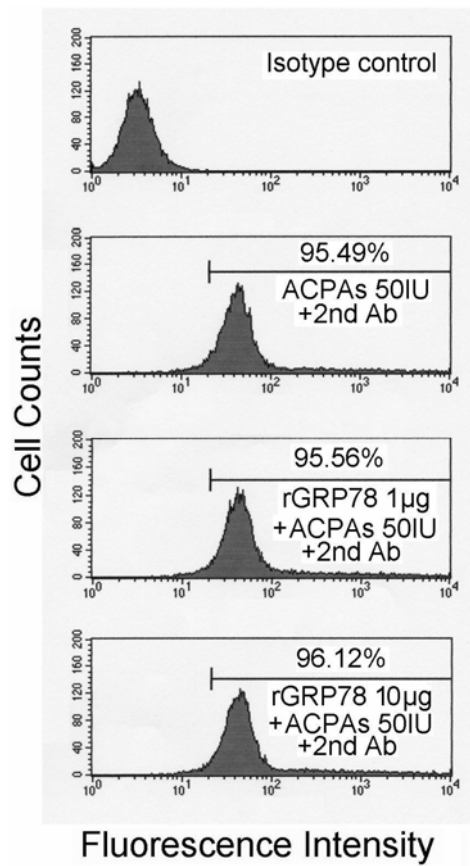
圖十五



Anti-GRP 78 Abs 輕微阻斷 ACPAs 和 U937 細胞的表面結合

U937 細胞先和不同濃度的 anti-GRP78 Abs (0, 1, 10µg) 作用，再以 ACPAs 及含 FITC 其相對應的第二抗體染色，可以發現隨著 anti-GRP78 Abs 濃度的增加 (0, 1, 10µg)，ACPA's 與細胞膜上蛋白質的結合比例有些許下降 (95.30%, 93.48%, 89.72%)。

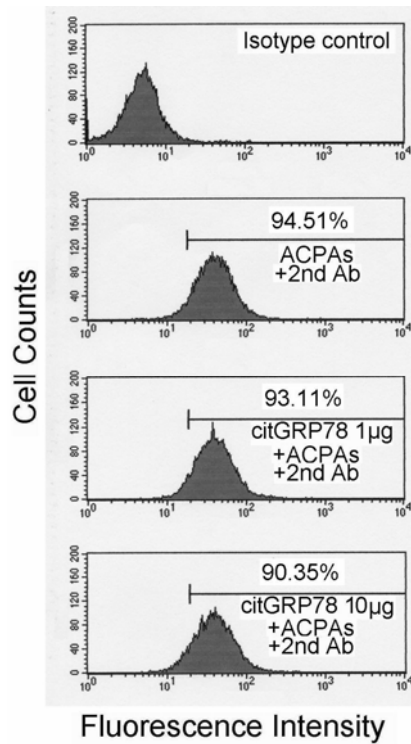
圖十六



合成的GRP78不會阻斷ACPAs和U937細胞的表面結合

ACPAs先和不同濃度合成的GRP78 (0, 1, 10µg)反應後，再加入U937細胞，最後以含FITC其相對應的第二抗體染色，可以發現合成的GRP78不會阻斷ACPAs和U937細胞的表面結合。

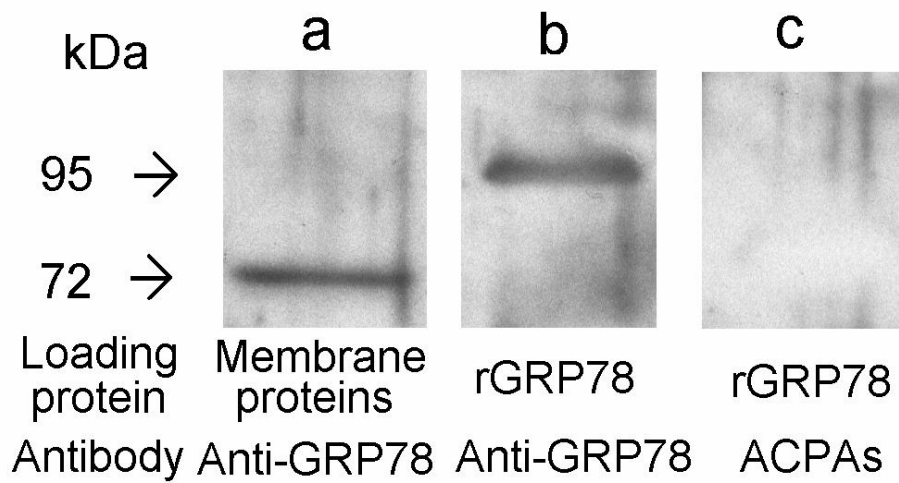
圖十七



瓜氨酸化的GRP78輕微阻斷ACPAs和U937細胞表面的結合

ACPAs先和不同濃度瓜氨酸化的GRP78 (0, 1, 10μg)反應後，再加入U937細胞，最後以含FITC其相對應的第二抗體，可以發現隨著瓜氨酸化的GRP78 濃度的增加 (0, 1, 10μg)，ACPAs與細胞膜上蛋白質的結合比例有些許的下降(94.51%, 93.11%, 90.35%)

圖十八

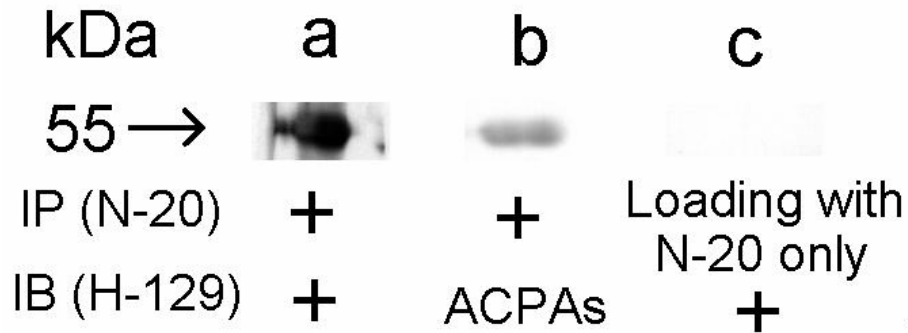


ACPAs 無法和合成的 GRP78 做結合

以西方墨點法作分析，(a)anti-GRP78 Abs可以和之前純化的U937細胞膜蛋白質72kDa處結合，(b)也可以和合成的GRP78結合，(c)但是ACPAs並不能和合成的GRP78結合。因為合成的GRP78有 glutathione S-transferase 標定，因此分子量約為 97.33 kDa。



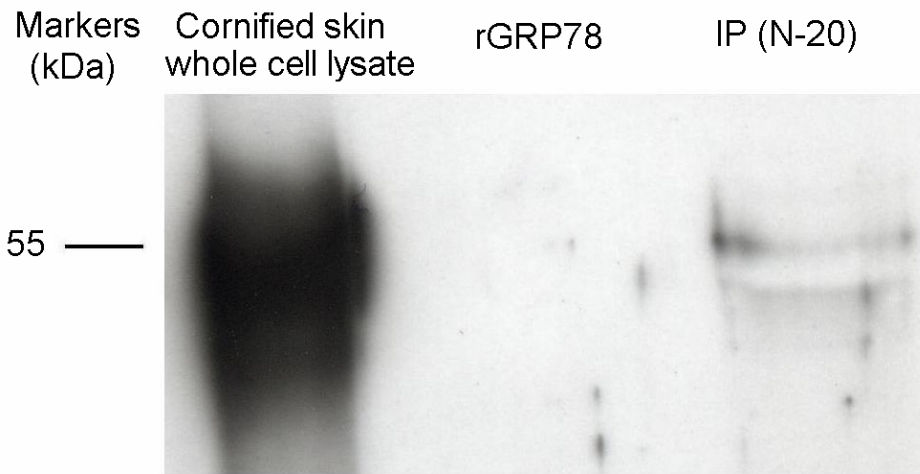
圖十九



ACPAs 和從 U937 細胞膜以免疫沉澱法所得的 GRP78 做結合

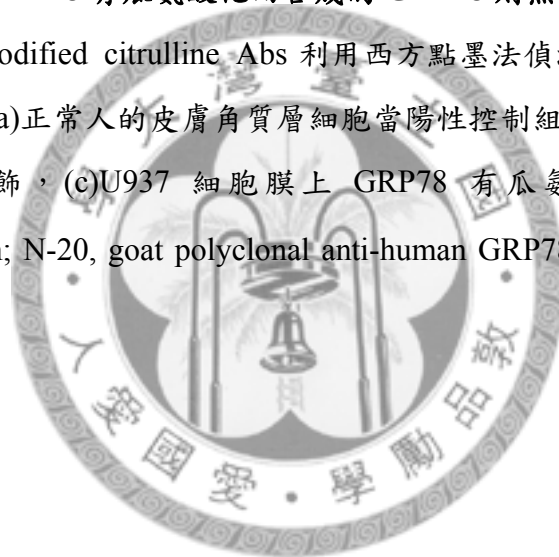
以 U937 細胞膜蛋白質做受質，利用 anti-GRP78 (N-20)免疫沉澱法純化出 U937 細胞膜上的 GRP78。我們可以發現(a)anti-GRP78(H-129)和(b)ACPAs 可以和 55kDa 的 GRP78 蛋白質碎片作結合，(c)為了排除第二抗體會和 anti-GRP78 Abs (N-20)做非特異性的結合，我們單純以 0.5μg 的 anti-GRP78 Abs (N-20)跑電泳，之後再以 anti-GRP78(H-129)染色，並無 Cross reaction 的存在。(N-20, goat polyclonal anti-human GRP78 N-terminal peptides antibodies; H-129, rabbit polyclonal antibodies against the C-terminal of human GRP78; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting)

圖二十

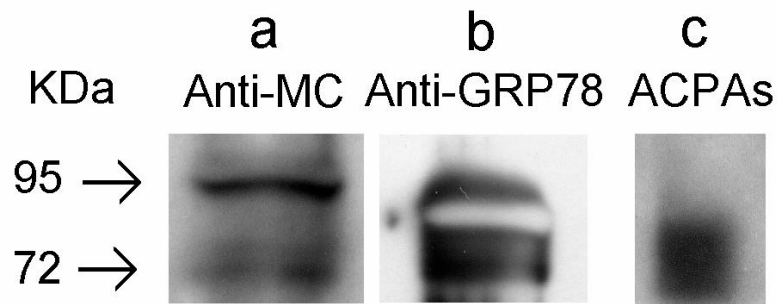


U937 細胞膜上的 GRP78 有瓜氨酸化而合成的 GRP78 則無

因此我們以 Anti-modified citrulline Abs 利用西方點墨法偵測蛋白質上是否存在瓜氨酸化的修飾，(a)正常人的皮膚角質層細胞當陽性控制組，(b) 合成的 GRP78 無瓜氨酸化的修飾，(c)U937 細胞膜上 GRP78 有瓜氨酸化的修飾。(IP, immunoprecipitation; N-20, goat polyclonal anti-human GRP78 N-terminal peptides antibodies)



圖二十一

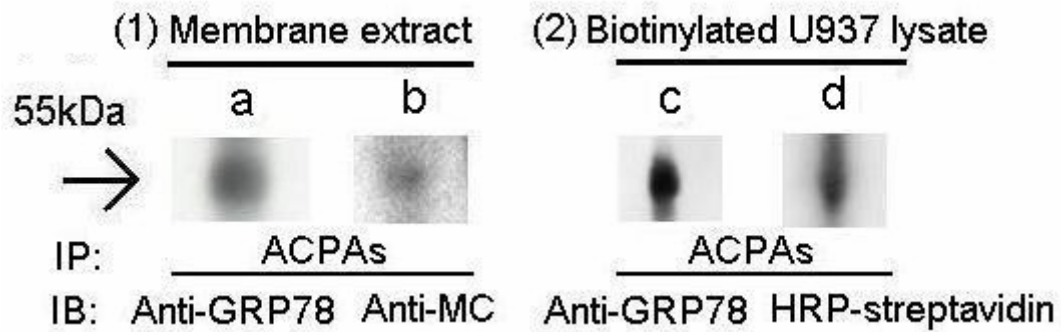


ACPAs 可以與瓜氨酸化 GRP78 作用

將合成的 GRP78 予瓜氨酸化，利用西方點墨法偵測，(a)首先我們以 Anti-MC Abs 確定其已經被瓜氨酸化，(2)接著以 anti-GRP78 Abs 發現其分為兩個碎片，(c) ACPAs 可以染上 72kDa 的蛋白質片段。(Anti-MC, anti-modified citrulline antibodies)



圖二十二

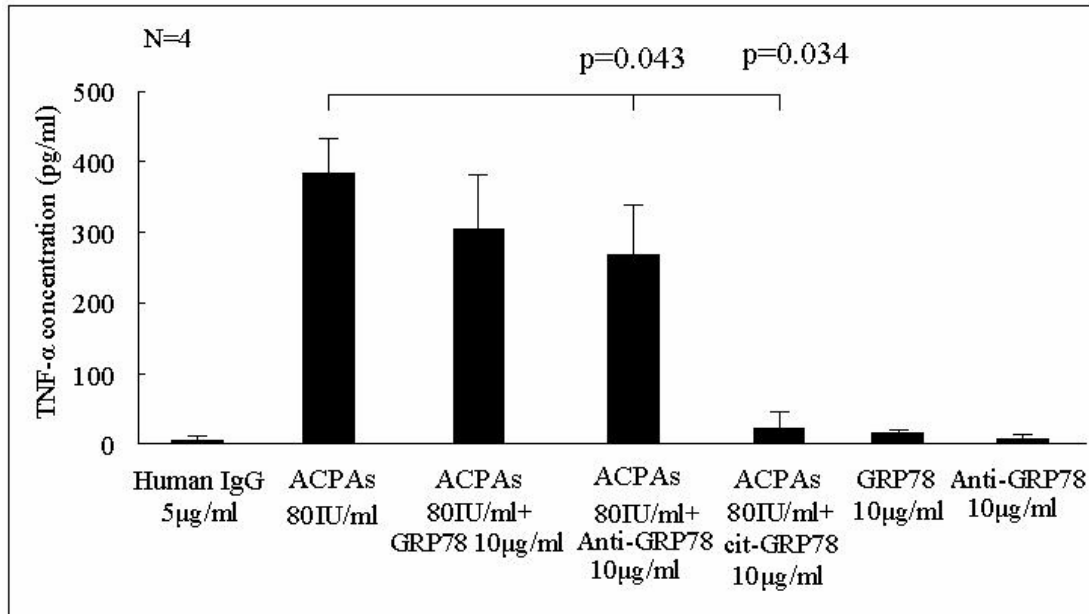


Anti-GRP78 結合在從 U937 細胞表面所得的瓜氨酸化蛋白質

(1)以 ACPAs 做為結合抗體，以 U937 細胞膜蛋白質做受質，以免疫沉澱法純化出 U937 細胞膜上的瓜氨酸化蛋白質，(a)以 anti-GRP78 Abs 確定 55kDa 為 GRP78 的碎片，(b)並且以 anti-MC 證實其有瓜氨酸化的修飾。(2)將 U937 細胞表面給予 Biotinylation，以完整的細胞跟 ACPAs 作用，最後再以 ACPAs 做為結合抗體做免疫沉澱，(c)anti-GRP78 Abs 可以跟 55kDa 的 GRP78 片斷做結合，(d)這個片段可以被 Streptavidin 結合 HRP 所作用，證實其表現在細胞表面。(Anti-MC, anti-modified citrulline antibodies)



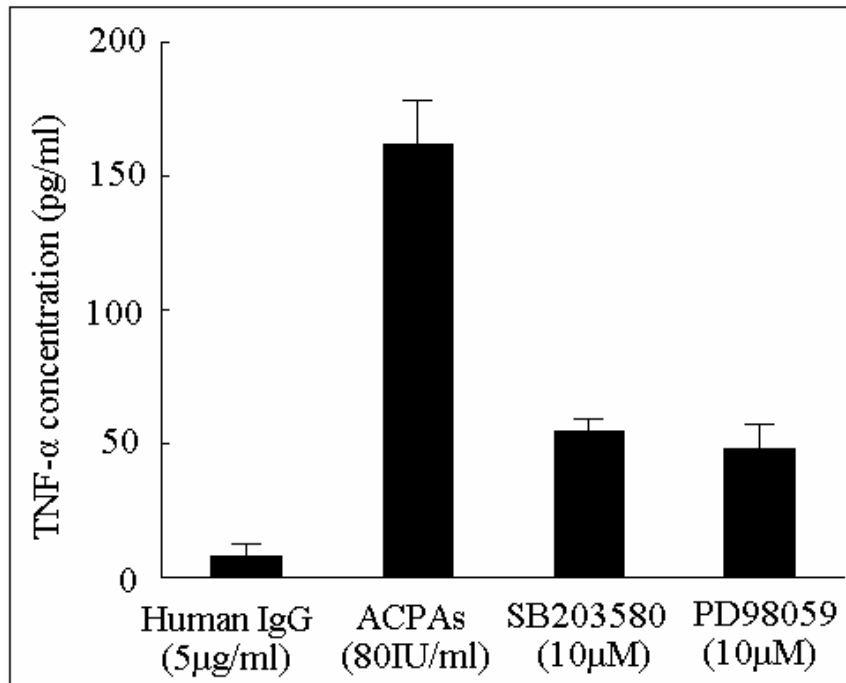
圖二十三



瓜氨酸化 GRP78 抑制 ACPAs 所造成的 U937 細胞 TNF- α 釋放

U937 細胞在 ACPAs (80 IU/ml)及合成的 GRP78 (10µg/ml)，anti-GRP78 (10µg/ml) 或瓜氨酸化的 GRP78 (10µg/ml)一起培養 24 小時後。我們發現瓜氨酸化 GRP78 則可以充分抑制 ACPAs 所造成的 U937 細胞 TNF- α 釋放($p < 0.05$)，而 anti-GRP78 可以部分抑制 ACPAs 所造成的 U937 細胞 TNF- α 釋放($p = 0.043$)而合成的 GRP78 則不會抑制 ACPAs 所造成的 U937 細胞 TNF- α 釋放；最後只有加入 GRP78 (10µg/ml)或 anti-GRP78 (10µg/ml)本身則不會影響 U937 細胞 TNF- α 的釋放。

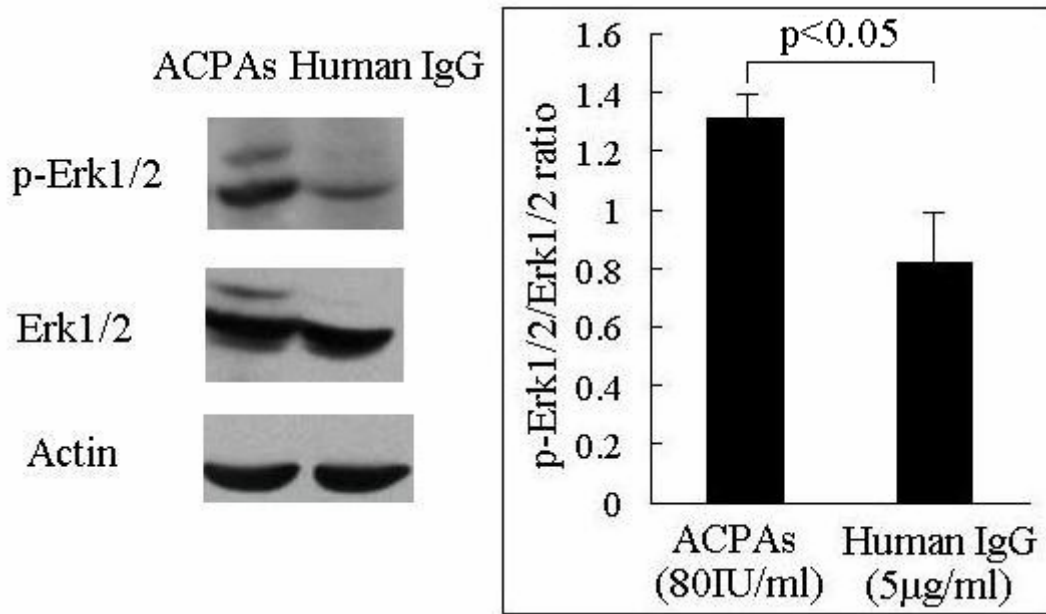
圖二十四



MAPK pathway 的抑制劑抑制 ACPAs 所引起 TNF- α 釋放

U937 細胞在 ACPAs 80IU/ml，ACPAs 80IU/ml + 10 μ M SB203580 (MAPK p38 pathway inhibitor)，ACPAs 80IU/ml + 10 μ M (MAPK ERK-1/2 pathway inhibitor) 或對照組 Polyclonal human IgG 5 μ g/ml 一起培養 24 小時後。我們發現 SB203580 及 PD98059 均可以明顯的抑制 ACPAs 所引起 U937 細胞 TNF- α 釋放。(MAPK, Mitogen-activated protein kinases; ERK-1/2, Extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2)

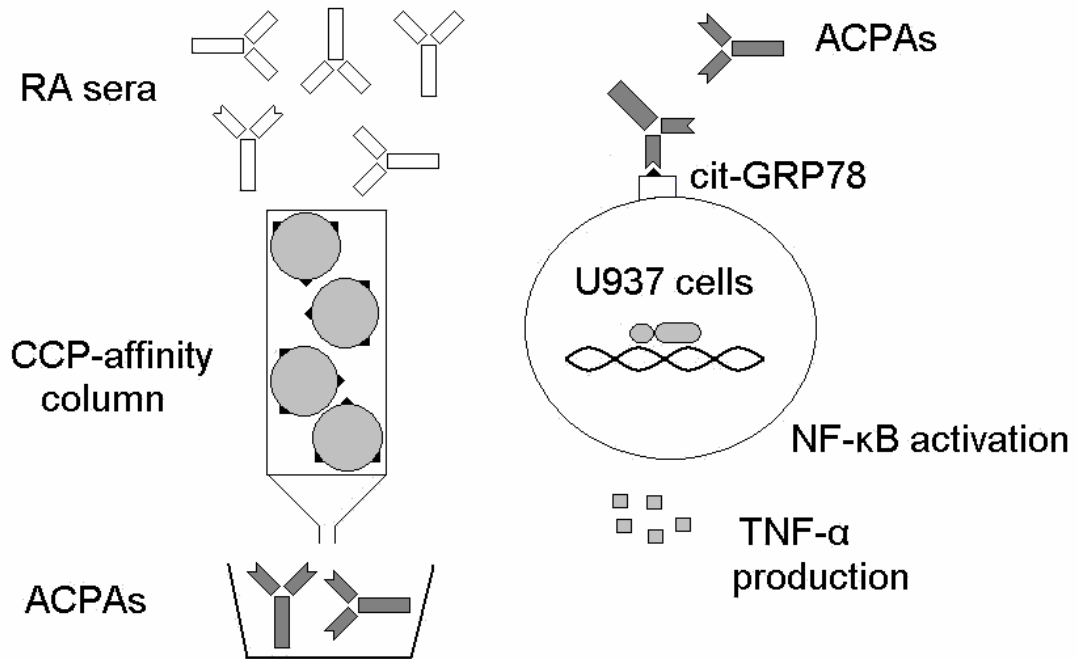
圖二十五



ACPAs 促進 ERK-1/2 的磷酸化

U937 細胞在 ACPAs 80 IU/ml 或對照組 Polyclonal human IgG 5 µg/ml，一起培養 24 小時後。以西方點墨法可以發現 ACPAs 促進 ERK-1/2 的磷酸化，以統計軟體 Image J 分析三重複的樣本並且定量，確認 ACPAs 組的磷酸化 ERK-1/2 之於無磷酸化 ERK-1/2 的比率統計學上高於對照組 Polyclonal human IgG。(ERK-1/2, Extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2)

圖二十六



ACPs 促進發炎反應的示意圖

以 CCP 的親合性管柱，從類風濕性關節炎的患者血清純化出 ACPs，之後我們證實 ACPs 可以藉由結合在 U937 細胞膜上瓜氨酸化的 GRP78，促進單核性白血球轉錄因子 NF-κB 的活化及 TNF-α 的釋放，引起發炎反應。

附錄

在博士班修業期間所發表的相關論文

1. Ming-Chi Lu, Song-Chou Hsieh, Ning-Sheng Lai Ko-Jen Li, Cheng-Han Wu, Chia-Li Yu. Comparison of anti-agalactosyl IgG antibodies, rheumatoid factors and anti-cyclic citrullinated peptides antibodies in the differential diagnosis of rheumatoid arthritis and its mimics, *Clinical and Experimental Rheumatology* 2007, Sep-Oct, Vol 25, No5, P716-21 (SCI, IF:2.364 , Ranking 50%, 11/22)
2. Ming-Chi Lu, Ning-Sheng Lai, Hui-Chun Yu, Hsien-bin Huang, Song-Chou Hsieh and Chia-Li Yu. Anti-Citrullinated Protein Antibodies Bind Surface-Expressed Citrullinated GRP78 on Monocyte/Macrophages and Stimulate Tumor Necrosis Factor α Production, *Arthritis and Rheumatism* 2010, May, Vol 62, No. 5, P1213-23 (SCI, IF: 6.787, Ranking 9%, 2/22)

