

## 第 41 回総会ポスター受賞記念論文

総説 (推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会理事, 第 41 回総会長 山田治基

関節リウマチの疾患感受性遺伝子である *Peptidylarginine deiminase type 4 (PADI4)* の免疫系における役割瀬理 祐<sup>\*1</sup>, 庄田宏文<sup>\*1</sup>, 松本 功<sup>\*2</sup>, 住田孝之<sup>\*2</sup>,  
藤尾圭志<sup>\*1</sup>, 山本一彦<sup>\*1</sup>*Peptidylarginine deiminase type4 (PADI4) role in immune system*Yu SERI<sup>\*1</sup>, Hirofumi SHODA<sup>\*1</sup>, Isao MATSUMOTO<sup>\*2</sup>, Takayuki SUMIDA<sup>\*2</sup>,  
Keishi FUJIO<sup>\*1</sup> and Kazuhiko YAMAMOTO<sup>\*1</sup><sup>\*1</sup>Department of Allergy and Rheumatology, Graduation School of Medicine, University of Tokyo<sup>\*2</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

(Accepted February 19, 2014)

## summary

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the representative auto-immune diseases, characterized by systemic inflammatory synovitis. Various genetic and environmental factors which contribute to RA pathogenesis, has been suggested, however, detailed mechanism remained unknown. While around 100 genetic risk factors for RA have been reported, *Peptidylarginine deiminase type4 (PADI4)* was firstly identified as a non-MHC RA genetic risk factor. Furthermore, *PADI4* risk allele possessed the association with bone damage regardless of anti citrullinated peptide antibody (ACPA) positivity in Asian RA patients. *PADI4* gene codes PAD4 protein which has post-translational modification activity (citrullination). *Padi4* is mainly expressed in myeloid cells and granulocytes. *PADI4* RA risk haplotype showed an increase of mRNA stability, which resulted in excess translation into PAD4 protein. According to ACPA specificity for RA, increasing *PADI4* mRNA stability suggested a hypothesis that excess expression of PAD4 induces a large amount of citrullinated protein, which causes the induction of ACPA. On the other hand, *PADI4* has nuclear trans-locational signals and is associated with regulation of various gene expression and formation of neutrophil extracellular traps. These information provide the possibility that *PADI4* contributes to not only excess citrullinated protein production, but also various roles in the immune system. We summarize *PADI4* function in the immune system and discuss *PADI4* roles in RA.

**Key words**—rheumatoid arthritis; Peptidylarginine deiminase type4; citrullination

## 抄 録

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は全身の慢性、破壊性の多関節炎を主症状とする代表的な自己免疫疾患である。病態形成において様々な遺伝、環境因子の関与が示唆されているが、依然として詳細な機序は不明である。最近、RA の疾患感受性遺伝子として約 100 種類が報告されたが、*Peptidylarginine deiminase type4 (PADI4)* は RA の genome-wide association study によって non-MHC 遺伝子の RA 感受性遺伝子として本邦より初めて報告され、様々な疾患の遺伝学的解析と併せて RA との特異的な関連が示唆されている。現在、*PADI4* はアジア人や欧米人の一部でも RA との関連が示され、アジア人では anti citrullinated peptide antibody (ACPA) の有無に関わらず骨破壊の危険因子となることも報告された。*PADI4* 遺伝子はシトルリン化による翻訳後修飾能を有する PAD4 蛋白をコードする。*PADI4* は骨髄球、顆粒球といった血球系細胞で特異的に発現している。*PADI4* の RA 感受性ハプロタイプでは mRNA の安定性が増すことで PAD4 蛋白が増加することが示唆されている。従来、RA における ACPA の特異性から、PAD4 蛋白の増加に伴うシトルリン化蛋白の過剰産生と ACPA の誘導といった仮説が注目されてきた。しかし、*PADI4* は核内移行シグナルを有することで様々な遺伝子発現の制御や neutrophil extracellular traps の形成に関与し、RA の病態形成において多彩な役割を担う可能性が示唆される。本項では *PADI4* の機能と RA における役割のまとめ、考察を行う。

<sup>\*1</sup> 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科<sup>\*2</sup> 筑波大学膠原病内科

## 序 文

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は全身の関節に生じる慢性、破壊性の滑膜炎を特徴とし、血清学的には多くの症例で抗 cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体、リウマトイド因子といった自己抗体の出現を伴いうる、代表的な自己免疫疾患の一つである。RA の病態形成においては様々な遺伝因子、環境因子の関与が示唆されているものの、依然として完全には明らかでない<sup>1)</sup>。現在、様々な人種を対象とした遺伝学的解析によって約 100 種類が RA の疾患感受性遺伝子として報告されており<sup>2)</sup>、RA の発症における遺伝因子の寄与度は様々な遺伝学的検討から 30% 強と推察されている<sup>3)</sup>。Peptidylarginine deiminase type 4 (PADI4) は genome-wide association study (GWAS) によって、本邦より RA の non-MHC 遺伝子の疾患感受性遺伝子として初めて報告された<sup>4)</sup>。その後、アジア人では同様の結果が確認されてきたものの<sup>5,6)</sup>、欧米人では関連を否定する報告もなされてきたことから<sup>7,8)</sup>、欧米人での RA と Padi4 との関連には議論があった。しかし、現在では欧米人でもサブグループにおいてはアジア人に比して弱いものの RA と関連しているとの見解で一致している<sup>9)</sup>。さらに、現在までの他の自己免疫疾患における遺伝学的検討と比較したところ、non-MHC 遺伝子では PADI4 と CCL21 は RA でのみ関連が報告されていることから、PADI4 は RA の病態形成において特異的で重要な遺伝因子と考えられている<sup>10)</sup>。PADI 遺伝子群はアルギニンの =NH<sub>2</sub> (imine) を =O (ketone) に変換してシトルリン化する翻訳後修飾を酵素活性として有する PAD 蛋白をコードしている。ヒトでは PADI1, 2, 3, 4, 6 の 5 種類のサブセットが 1 番染色体でクラスターを形成して位置しており、各々が PADI 遺伝子の番号に対応した PADI1, 2, 3, 4, 6 蛋白をコードしている<sup>11)</sup>。各 PAD 蛋白は Ca<sup>2+</sup> 依存性に前述の酵素活性を発揮するが、この際に基質が陽電荷のアルギニンから中性のシトルリンに変換されることで電氣的極性の変化が生じ、結果として基質自体の構造的な変化や MHC を含めた他の物質との結合力の変化を生じうる<sup>11,12)</sup>。PADI1, 3 は皮膚等の比較的限定された組織に発現しており、PADI6 は卵等に発現している。また、PADI2 は全身の様々な臓器に恒常的に発現している。一方、PADI4 は主に骨髓球、顆粒球といった血球系細胞において特異的に発現しているが<sup>11)</sup>、関節リウマチ患

者の炎症滑膜の synovial lining cell においても発現が報告されている<sup>13)</sup>。そして、血球系細胞においては PAD2, PAD4 が主に発現していることから、免疫反応においてはこれら 2 つの PADI サブセットの重要性が示唆されてきた。しかし、PAD2 と PAD4 では至適な酵素活性を発揮する環境 (pH, Ca<sup>2+</sup> 濃度) やその基質によってシトルリン化の感受性、程度が大きく異なることが報告されている<sup>14)</sup>。さらに、PADI4 は他の PADI のサブセットとの大きな違いとして核内移行シグナル (nuclear localization signals; NLS) を有していることが挙げられ、後述の如く様々な遺伝子の発現制御に影響を与えることが報告されている<sup>15)</sup>。PADI4 の RA 感受性ハプロタイプでは非感受性ハプロタイプに比して mRNA の安定性が増していることから、RA 感受性ハプロタイプを有する群では PAD4 の発現量が増加することによって過剰なシトルリン化が惹き起こされている可能性が示唆されている<sup>4)</sup>。また、PADI4 の RA 感受性ハプロタイプの変異部分は酵素活性を有する C 末端ドメインでなく NLS を有する N 末端サブドメイン 1 に位置していることから、RA 感受性ハプロタイプの PAD4 は酵素活性自体には著明な異常を呈していないと考えられている<sup>16)</sup>。従来、RA の発症過程における PADI4 の役割については、慢性炎症の際に炎症性細胞における PAD 蛋白発現が亢進、細胞外へ漏出することでシトルリン化蛋白の過剰産生を呈し、結果として抗シトルリン化蛋白抗体 (anti citrullinated protein antibody; ACPA) の産生に関与するといった仮説に関連付けて提唱されてきた<sup>17)</sup>。しかし、最近では ACPA が陰性の RA 患者においても PADI4 の RA 感受性ハプロタイプが独立した骨破壊の危険因子であることが相次いで報告されていることから<sup>18,19)</sup>、従来の過剰なシトルリン化蛋白の産生に伴う ACPA の誘導といった仮説以外の役割が示唆されている。本項では PADI4 の機能と RA における役割についてまとめる。

### 1. シトルリン化抗原産生、ACPA 産生

RA において ACPA の出現は非常に高い特異性を有することより、前述のごとく PAD4 の増加に伴って過剰なシトルリン化された抗原が産生されることで、結果として ACPA が誘導されるといった仮説が提唱されてきた<sup>4,17)</sup>。RA 患者の炎症滑膜組織においても PAD4、シトルリン化フィブリノーゲンの蓄積を認めることから、炎症組織において細胞外に

漏出した PAD4 が局所でフィブリノーゲンを始めとした様々な蛋白をシトルリン化することが示唆された<sup>13)</sup>。最近, *Tnf-alpha* transgenic (Tg) 関節炎モデルにおいて *Padi4* knock out (KO) マウスを用いた報告においては, *Padi4* KO マウスにおいても WT マウスと同等の血中のシトルリン化抗原を有していることが示されており, 同モデルにおいては少なくとも PAD4 が血中のシトルリン化抗原の量には影響しないことが示唆された<sup>20)</sup>。一方, *Padi4* KO マウスは WT マウスと比して骨髄の形質細胞数は同等であったが血清の総 IgG と ACPA の減少を認めた<sup>20)</sup>。以上より, *Tnf-alpha* Tg 関節炎モデルにおいては少なくとも *Padi4* の欠損によっても血中のシトルリン化抗原の減少は認めず, 血清 IgG の内で ACPA のみの特異的に減少するといった結論も得られなかった。また, 後述する好中球の neutrophil extracellular traps (NETs) の形成においても PAD4 は重要であるが, NETs には ACPA の対象となる様々なシトルリン化抗原が含まれていることが報告されており, ACPA の産生における重要性も示唆されている<sup>21-23)</sup>。しかし, 現時点では PAD4 によるシトルリン化蛋白の過剰産生と ACPA の誘導といった仮説を支持する知見はまだ不十分である。

## 2. 遺伝子発現の制御

*PADI4* は他の *PADI* サブセットと違い NLS を有していることから, 核内においてヒストンや転写因子といった様々な対象をシトルリン化することによって遺伝子発現の制御に関与することが知られている。まず, PAD4 がヒストン 3, ヒストン 4 をシトルリン化することによって同部位のメチル化による転写開始を競合阻害することとなり, 結果として対象遺伝子の発現を負に制御することが報告された<sup>24, 25)</sup>。一方, PAD4 が転写因子の一つである Elk-1 をシトルリン化することによって間接的に *c-fos* の発現を惹起することが報告されている<sup>26)</sup>。以上のように, *PADI4* が対象によって正負の遺伝子発現の制御を行うことから, 後述の如く細胞の様々な機能に重要な影響を与えることが示唆される。

## 3. 細胞の分化, 増殖, アポトーシス

様々な悪性腫瘍細胞において *PADI4* の発現が確認されており<sup>27)</sup>, 現在まで PAD4 が直接的, 間接的に p53 の発現を介して細胞増殖, アポトーシスを制御することが報告されてきた<sup>28-30)</sup>。さらに,

*Padi4* KO マウスでは *c-myc* が前述の如くヒストンの修飾の変化によって発現が亢進することで, 結果として造血幹細胞の一つである LSK 細胞の特に多能性前駆細胞が増殖することが報告され, *PADI4* が免疫系細胞の分化, 増殖にも関与することが示唆された<sup>31)</sup>。最近, embryonic stem (ES) 細胞, induced pluripotent stem (iPS) 細胞の分化過程での PAD4 によるヒストン 1 のシトルリン化に伴うクロマチンからの乖離が多能性分化能の獲得において重要であるとの報告がなされた<sup>32)</sup>。以上より, 骨髄球系細胞を始めとした免疫細胞や多能性幹細胞における *PADI4* の発現と分化, 増殖, 生存における役割は非常に興味深い現象である。

## 4. Neutrophil extracellular traps (図 1)

NETs とは細菌等の感染によって活性化した好中球が DNA, 顆粒蛋白を含む網目状の構造物を放出し, 従来のファゴソームで対象を取り込む機序とは別の殺菌活性 (NETosis) として報告され<sup>33)</sup>, この過程で PAD4 によるヒストンのシトルリン化と核クロマチンの脱凝縮が重要であることが示されている<sup>34)</sup>。そして, NETs が後述のごとく殺菌活性以外の様々な免疫反応に関与しうることが相次いで報告されている。NETs は豊富なシトルリン化抗原 (ヒストン, ビメンチン,  $\alpha$  エノラーゼ等) を含む様々な物質で構成されており, これらは自己抗体 (ACPA, rheumatoid factor; RF), 炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$  等), 膜障害物質 (Perforin; Pfn, Granzyme B; GzmB) で誘導され, さらに刺激によっても NETs の構成物質が異なることが報告されている<sup>21-23)</sup>。さらに, RA 患者の ACPA には NETs のシトルリン化抗原 (ヒストン, ビメンチン) を対応抗原としたものも含まれていることが示されている<sup>21, 22)</sup>。以上より, RA において重要と考えられている自己抗原 (シトルリン化抗原) や自己抗体 (ACPA) が NETs に由来している可能性が示唆されている<sup>21, 22)</sup>。さらに, 炎症関節の fibroblast-like synoviocytes (FLS) と NETs との共培養によって炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) やケモカイン (ICAM-1, CCL20) の発現が亢進することが報告されている<sup>21)</sup>。また, アルミニウムアジュバンドの投与によって免疫局所に遊走した好中球が NETs 様の構造物を放出し, この構造物内の DNA のみでも抗原特異的な抗体産生 (IgE) や T 細胞分化 (Th<sub>2</sub> 細胞) を促すことが報告されている<sup>35)</sup>。さらに, NETs と樹状細胞との共作用によって T cell

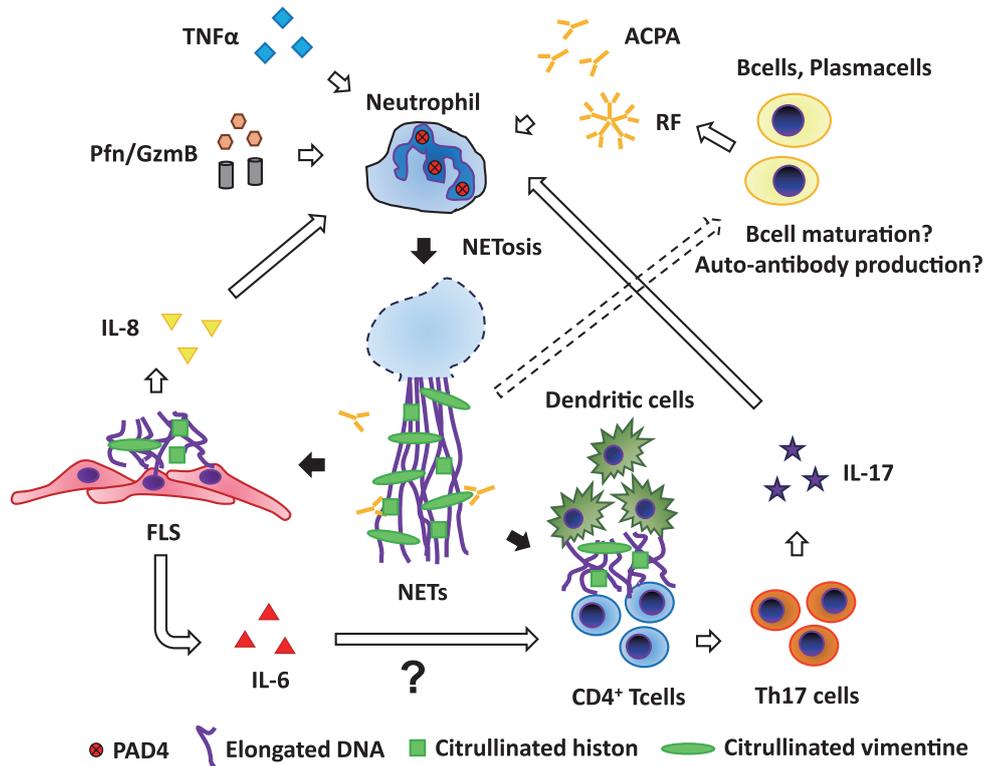


図1 NETsの免疫における役割

receptor (TCR) 依存性の Th<sub>1</sub>, Th<sub>17</sub> 細胞の分化, 活性化に影響を与えることが示されている<sup>36)</sup>. 以上より, NETsが自然免疫のみならず獲得免疫にも影響を与えることが示唆されているが, 現時点ではRAにおけるNETsの役割については不明な点が多い.

### 5. マウス関節炎モデルにおける PADI4 の役割

最近, 様々なマウス関節炎モデルで *Padi4* KO マウスや PAD 阻害薬を用いて PADI4 の機能解析を試みた報告が相次いでいる. 自己抗体依存型のマウス関節炎モデルである K/BxN 血清移入関節炎では T, B 細胞反応を主とした獲得免疫は必要ではなく, 関節局所での抗原特異的自己抗体の沈着と補体, Fc 受容体等からのシグナルを介した好中球による組織障害が主な病態とされているが<sup>37)</sup>, 同モデルでは *Padi4* KO マウスでも wild type (WT) マウスと同等の関節炎の重症度を呈することが報告された<sup>38)</sup>. さらに, 同じく自己抗体依存型のマウス関節炎モデルで好中球が重要なエフェクター細胞である抗マウス II 型コラーゲン抗体移入関節炎においても PAD 阻害薬である Cl-amidine の投与によっても改善を認めないとの報告もなされている<sup>39)</sup>. 以上より, 好中球による関節組織の障害といったエフェクター期においては少なくとも *Padi4* が重要でないと考えられて

いる. 一方, 獲得免疫系, 特に抗 II 型コラーゲン IgG の産生が重要である II 型コラーゲン誘導性関節炎においては Cl-amidine で血清抗 II 型コラーゲン抗体低下と関節炎の改善を認めることが報告されている<sup>39)</sup>. さらに, *Tnf-alpha* Tg 関節炎モデルにおいては, *Padi4* KO マウスは WT マウスに比して関節炎後期における関節炎の重症度の軽減を認め, やはり関節炎後期においては血清の総 IgG, 自己抗体や脾臓の活性化 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞の減少を認めたことから, PADI4 は何らかの機序で TNFα の下流においてこれらの炎症状態の形成に寄与する可能性が示唆された<sup>20)</sup>. 以上より, 様々なマウス関節炎モデルを用いた研究によって *Padi4* が自己抗体を含む総 IgG の産生や炎症性サイトカインの発現といった多彩な免疫反応に関与していることが示唆されている.

### 結 語

以上のように PADI4 はシトルリン化といった特徴的な酵素活性によって生体内で非常に多彩な役割を担っていることが示唆されており, RA の病態形成においても本項で記載した内容を含めた様々な形で関与している可能性が考慮され, 今後も PADI4 の新たな役割から RA における役割まで幅広い解明, さらに治療への応用が期待される.

## 文 献

- 1) Isaacs, J.D.: The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nat Rev Immunol.* **10**: 605–611, 2010.
- 2) Okada, Y., et al.: Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature.* **506**: 376–381, 2014.
- 3) Stahl, E.A., et al.: Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* **44**: 483–489, 2012.
- 4) Suzuki, A., et al.: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* **34**: 395–402, 2003.
- 5) Ikari, K., et al.: Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. *Arthritis Rheum.* **52**: 3054–3057, 2005.
- 6) Kang, C.P., et al.: A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheumatol.* **54**: 90–96, 2006.
- 7) Barton, A., et al.: A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum.* **50**: 1117–1121, 2004.
- 8) Burr, M.L., et al.: PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Ann Rheum Dis.* **69**: 666–670, 2010.
- 9) Kochi, Y., et al.: Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* **6**: 290–295, 2010.
- 10) Eyre, S., et al.: High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* **44**: 1336–1340, 2012.
- 11) Vossenaar, E.R., et al.: PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays.* **25**: 1106–1118, 2003.
- 12) Scally, S.W., et al.: A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* **210**: 2569–2582, 2013.
- 13) Foulquier, C., et al.: Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum.* **56**: 3541–3553, 2007.
- 14) Nakayama-Hamada, M., et al.: Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun.* **327**: 192–200, 2005.
- 15) Nakashima, K., et al.: Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem.* **277**: 49562–49568, 2002.
- 16) Arita, K., et al.: Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 5291–5296, 2006.
- 17) Klareskog, L., et al.: Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* **26**: 651–675, 2008.
- 18) Bang, S.Y., et al.: Peptidyl arginine deiminase type IV (PADI4) haplotypes interact with shared epitope regardless of anti-cyclic citrullinated peptide antibody or erosive joint status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis Res Ther.* **12**: R115, 2010.
- 19) Suzuki, T., et al.: PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PLoS One.* **8**: e61045, 2013.
- 20) Shelef, M.A., et al.: Peptidylarginine deiminase 4 contributes to tumor necrosis factor alpha induced inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**: 1482–1491, 2014.
- 21) Khandpur, R., et al.: NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* **5**: 178ra40, 2013.
- 22) Pratesi, F., et al.: Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis.* **73**: 1414–1422, 2013.
- 23) Romero, V., et al.: Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* **5**: 209ra150, 2013.
- 24) Cuthbert, G.L., et al.: Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell.* **118**: 545–553, 2004.
- 25) Wang, Y., et al.: Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science.* **306**: 279–283, 2004.
- 26) Zhang, X., et al.: Genome-wide analysis reveals PADI4 cooperates with Elk-1 to activate c-Fos expression in breast cancer cells. *PLoS Genet.* **7**: e1002112, 2011.

- 27) Chang, X., Han, J.: Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog.* **45**: 183–196, 2006.
- 28) Cui, X., et al.: The induction of microRNA-16 in colon cancer cells by protein arginine deiminase inhibition causes a p53-dependent cell cycle arrest. *PLoS One.* **8**: e53791, 2013.
- 29) Guo, Q., Fast, W.: Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53. *J Biol Chem.* **286**: 17069–17078, 2011.
- 30) Yao, H., et al.: Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis. *J Biol Chem.* **283**: 20060–20068, 2008.
- 31) Nakashima, K., et al.: PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression. *Nat Commun.* **4**: 1836, 2013.
- 32) Christophorou, M.A., et al.: Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature.* **507**: 104–108, 2014.
- 33) Brinkmann, V., et al.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* **303**: 1532–1535, 2004.
- 34) Li, P., et al.: PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* **207**: 1853–1862, 2010.
- 35) Marichal, T., et al.: DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* **17**: 996–1002, 2011.
- 36) Tillack, K., et al.: T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol.* **188**: 3150–3159, 2012.
- 37) Sadik, C.D., et al.: Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR and FcγR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**: E3177–3185, 2012.
- 38) Rohrbach, A.S., et al.: PAD4 is not essential for disease in the K/BxN murine autoantibody-mediated model of arthritis. *Arthritis Res Ther.* **14**: R104, 2012.
- 39) Willis, V.C., et al.: N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol.* **186**: 4396–4404, 2011.