

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

佐瀬 泰玄

専攻分野：脳神経外科学

コース：

指導教授：田中 雄一郎

主論文の題目：

Hypoxia-induced Production of Peptidylarginine Deiminases and Citrullinated Proteins in Malignant Glioma Cells

(悪性神経膠腫細胞における低酸素によるペプチジルアルギニンデイミナーゼとシトルリン化蛋白質の産生誘導)

共著者：

Mitsumi Arito, Hidetaka Onodera, Kazuki Omoteyama, Manae S. Kurokawa, Yayoi Kagami, Akihito Ishigami, Yuichiro Tanaka, Tomohiro Kato

緒言

固形悪性腫瘍には細胞増殖と血管新生の不均衡に起因する低酸素環境が存在し、その中央部は酸素及び栄養不足による壊死がしばしばみられる。近年、数種の悪性腫瘍細胞において低酸素環境によりシトルリン (Cit) 化酵素 peptidylarginine deiminase (PAD) 4 の産生及び蛋白質 Cit 化の亢進が報告された。悪性神経膠腫でもその内部は低酸素状態にあるとされるが、PAD の発現や蛋白質の Cit 化の観点からはほとんど調べられていない。それ故本研究では神経膠腫由来細胞を用いて、低酸素環境により PADs の発現が亢進するか否か、また PADs の発現が亢進した

場合に PADs により細胞内蛋白質が Cit 化されるか否かについて検討した。

方法・対象

ヒト悪性神経膠腫細胞株 U-251 MG 細胞を低酸素ないし通常酸素状態で24時間培養した。細胞からRNAを抽出し、逆転写後、定量的 polymerase chain reaction (PCR) により PADs mRNA 量を測定した。hypoxia inducible factor (HIF) の関与については、本細胞を HIF-1 活性化剤 dimethylxaloylglycine (DMOG) 添加培地で24時間培養し、PADs mRNA を測定した。

また、低酸素ないし通常酸素状態で24時間培養した細胞から蛋白質を抽出し、抗化学修飾 Cit 化抗体を用いたウエスタンブロットにより Cit 化蛋白質を検出した。さらに、培養細胞を破砕後、Ca²⁺を添加し、48時間インキュベート後、Cit 化蛋白質を検出した。検出した Cit 化蛋白質は、質量分析により同定した。

さらに、悪性神経膠腫患者で自己抗体産生の報告がある vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 2 の細胞外ドメインがヒト PAD2 により Cit 化されるか否かについて *in vitro* で検討した。

結果

U-251 MG 細胞を低酸素培養することで PAD1-4 の mRNA が有意に増加した ($p < 0.01$)。さらに、本細胞を DMOG 添加培地で培養すると PAD1-4 の mRNA は濃度依存的に増加した。これらから PAD1-4 の発現は HIF-1 依存性であることが示された。低酸素状態により PADs の発現が亢進したにも関わらず、生細胞内に Cit 化蛋白質は検出されなかった。しかし、細胞破砕液に Ca²⁺を添加した場合に Cit 化蛋白質が検出され、かつ、低

酸素培養した細胞の破砕液では通常酸素培養した細胞の破砕液に比べ Cit 化蛋白質が多く検出された。Cit 化が増強した蛋白質として vimentin など計 7 種類の蛋白質が同定された。また、*in vitro* で VEGFR2 の細胞外ドメインが PAD2 により Cit 化されることも見出した。

考察

本研究では、悪性神経膠腫細胞を低酸素培養することにより PAD1-4 の発現が増強することが判明した。悪性神経膠腫の内部は低酸素環境であるため腫瘍組織内で PAD1-4 の発現が増強していると考えられた。数種の腫瘍組織で PAD4 の発現が高く、その悪性腫瘍患者血清中の PAD4 濃度が高いため、PAD4 が悪性腫瘍の治療標的や診断マーカーとして提唱されている。本研究の結果から悪性膠腫患者の血清では PAD4 に加えて PAD1-3 も高値である可能性がある。

低酸素培養により PADs の発現が亢進したにも関わらず、生細胞内で蛋白質の Cit 化は検出されなかった。しかし、細胞破砕液に Ca^{2+} を添加した場合、通常酸素培養細胞より低酸素培養細胞の破砕液で蛋白質の Cit 化が強く検出された。これらから、低酸素により細胞壊死が誘導された場合に PADs が体液中の Ca^{2+} で活性化され、神経膠腫細胞もしくは周囲の細胞由来蛋白質の Cit 化を促進する可能性が考えられる。

本研究では低酸素培養後の細胞破砕で Cit 化が亢進する蛋白質として、7 種の蛋白質を同定した。これらの Cit 化蛋白質は、悪性神経膠腫患者の血液中を循環する可能性が考えられる。また、関節リウマチでは滑膜蛋白質の過剰な Cit 化に対する自己抗体が多数報告されている。このことから、悪性神経膠腫患者でも Cit 化蛋白質に対する自己抗体が産生される可能性が考えられ、今後の検討課題である。

VEGFR2 の細胞外ドメインがヒト PAD2 により Cit 化されることを見出

した。悪性神経膠腫患者で VEGFR2 に対する自己抗体産生の報告がある。VEGFR2 は脳微小血管内皮細胞膜上に局在しているため、低酸素により誘導された細胞由来の PADs が細胞壊死で流出し VEGFR2 を Cit 化し、それにより VEGFR2 が抗原性を獲得している可能性がある。

結論

本研究は、Cit 化蛋白質の観点から悪性神経膠腫の病態を理解する一助となる。