

## 論文審査の要旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

佐瀬 泰玄

主論文の題目

および

掲載誌・審査委員

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)

掲載誌 Biochemical and Biophysical Research Communications 2017; 482: 50-56

主査 松井 宏晃

副査 武半 優子

副査 三好 洋

### [論文の要旨・価値]

[目的]ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD1,2,3,4,6)は、Ca<sup>2+</sup>依存性の翻訳後修飾酵素であり、ペプチド中の塩基性アミノ酸であるアルギニンを中性アミノ酸であるシトルリン(Cit)に変換する。蛋白質Cit化は、蛋白質の陽電荷の減少、高次構造の著しい変化をもたらし、抗原性の変化などと関連する。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、その中央部には壊死が認められる。近年、数種の悪性腫瘍において、低酸素環境によりPAD4の産生および蛋白質Cit化の亢進が報告された。悪性神経膠腫でも、内部の低酸素環境形成が想定されるが、PADの発現や蛋白質Cit化の観点からは、ほとんど調べられていない。本研究では、ヒト神経膠腫由来細胞株(U-251 MG細胞)を用い、低酸素環境によりPADおよび細胞内Cit化蛋白質が誘導されるか否かについて検討した。

[方法] U-251 MG細胞を通常酸素あるいは低酸素環境(1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>)で24時間培養し、PAD mRNAを定量RT-PCR法で測定した。低酸素誘導因子1(HIF-1)活性化剤添加24時間後にPAD mRNAを測定しHIFの関与を調べた。Cit化蛋白質は、抗化学修飾Cit化抗体を用いたWestern blot法により検出した。また、細胞破砕液にCa<sup>2+</sup>(1 mM)を添加し、48時間後にCit化蛋白質を検出、質量分析により同定した。加えて、悪性神経膠腫患者で自己抗体産生の報告がある、血管内皮細胞増殖因子受容体(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、*in vitro*で検討した。

[結果] 1)PAD1、2、3、4 mRNAは、低酸素環境でHIF-1依存性に増加したが、生細胞内にCit化蛋白質は検出されなかった。2)細胞破砕液にCa<sup>2+</sup>を添加するとCit化蛋白質が検出され、蛋白質Cit化は、低酸素環境で亢進した。3)Cit化が亢進した蛋白質として、vimentin、glial fibrillary acidic protein計7種を同定した。5)VEGFR2細胞外ドメインが、PAD2により*in vitro*でCit化された。

[結論]悪性神経膠腫では、低酸素環境により誘導されたPADが細胞壊死で流出し、体液中のCa<sup>2+</sup>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示唆された。

[価値]本研究は、悪性神経膠腫の病態を理解する上で重要な、低酸素環境応答と蛋白質Cit化との関連性に関する基礎的新知見を明らかにした。今後、悪性神経膠腫患者において、Cit化蛋白質が抗原性を獲得し、自己抗体が産生される可能性を検証する研究への発展性が期待でき、本論文は、脳神経外科学のみならず臨床生化学分野において、高い価値を有している。

### [審査概要]

陪席者は16名であった。申請者がPCを用い、30分間、本研究の背景、方法、結果、考察、関連領域などについて、明快に発表した。続いて、60分間の質疑応答では、U-251 MG細胞を選択した理由、PAD1-4、6 mRNA発現の組織特異性、Ca<sup>2+</sup>/PADのモル比、PADの細胞内局在、PAD4 mRNAが増加する悪性腫瘍、PAD mRNA増加がHIF依存性であることの証明、生細胞でCit化蛋白質が検出できなかった理由、Western blotで顕著なCit化を認めた65 kDa蛋白質の由来、Cit化蛋白質を質量分析する際の問題点、同定した7種のCit化蛋白質と関連する疾患、PAD阻害剤の臨床応用の可能性、本研究成果に基づく今後の研究計画など、多岐にわたる質問に、申請者は的確に回答した。

## 最終試験結果の要旨

### [研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価]

申請者は、緻密な研究戦略を立て、本研究を遂行し、頭書の研究目的を達成したことから、高い研究能力を有している。外国語試験では、英文文献の一部を指定し、その場での和訳により十分な英文読解力があると判断した。以上、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、態度、人柄にも優れ、専門分野および関連領域における学識、研究意欲、研究遂行能力などを総合して、申請者は学位授与に値すると評価した。