

ナノ粒子曝露はタンパク質のシトルリン化を誘導する

東京理科大学大学院薬学研究科 修士課程2年 堀 寛

Citrullination of proteins: a common post-translational modification pathway induced by different nanoparticles in vitro and in vivo

Mohamed BM, Verma NK, Davies AM, et al.

Nanomedicine, **7**, 1181-1195 (2012)

ナノ粒子は特有の性質を有することから、一般消費材から医療現場へと広く応用され普及している。しかし、ナノ粒子が生体に触れた際に健康に及ぼす影響について未解明な点が数多く残っており、原因解明のための研究が進められている。疫学調査の結果では、大気中浮遊粒子状物質濃度の増加と心血管疾患や自己免疫疾患などの罹患数との間に正の相関が認められている。先行研究により、シリカ粒子の曝露が自己免疫疾患であるリウマチ性疾患の発症リスクを増加させる可能性があることも示唆されている (Stolt P et al. 2005)。ナノ粒子は生体内で、上皮細胞やマクロファージなどの食細胞内に取り込まれる。その後、炎症が引き起こされ、様々な生体影響を及ぼす可能性があると考えられている。

最近の研究により、リウマチ性疾患罹患者においてシトルリン化タンパク質が多く存在することが発見された (Vossenaar ER & Robinson WH, 2005)。シトルリン化は、タンパク質中のアルギニン (アミノ酸) をシトルリン (アミノ酸) に変換する反応のことを指し、タンパク質の構造と機能を決定する上で重要な反応である。シトルリン化を受けたタンパク質は、非自己抗原と認識されるため自己免疫応答を引き起こすと言われている。また、シトルリン化タンパク質は、細胞質外好中球トラップ (NETs; Neutrophil Extracellular Traps) と呼ばれる免疫機構にも深く関与しており、NETs が誘導されることで細胞内から細胞外へとリガンドが放出され、炎症が誘発されるということも分かっている。以上のように、タンパク質のシトルリン化は炎症や自己免疫疾患に深く寄与していることが明らかになっている。しかし、生体内におけるタンパク質のシトルリン化が担う生理学的な役割については未解明な点が多く、現在研究が進められている段階である。

筆者らは以前に、株化肺胞上皮細胞にシリカナノ粒子を作用させると、シトルリン化タンパク質量が増加することを示した。本研究では、ナノ粒子のサイズ (20-400nm) と種類 (シリカ、カーボンブラック、カーボンナノチューブ) を変えた場合に、ナノ粒子曝露によってシトルリン化タンパク質が誘導されるか否かを検証した。また、ナノ粒子曝露によるタンパク質のシトルリン化がシトルリン化誘導酵素として一般的に知られている PAD (Peptidyl Arginine Deminase) を介して誘導されるのか否かを併せて検証した。

本研究では、A549 細胞（気道上皮細胞）、THP-1 細胞（活性型マクロファージ細胞）、及びマウス（咽頭内噴霧）に対してナノ粒子を曝露した（表）。

表. 被検ナノ粒子の性状・濃度と解析時点

	曝露対象	粒子径	濃度	タイムポイント
シリカ	A549, THP-1	20, 30, 40, 80, 400 nm	10, 50, 100, 500 µg/ml	1, 3, 6, 24 時間
カーボンブラック	A549, THP-1	14 nm	1, 4, 10, 40 µg/ml	1, 3, 6, 24 時間
カーボンナノチューブ	A549, THP-1	外径: 1-2 nm, 長さ: 3-8 µm	1, 4, 10, 40 µg/ml	1, 3, 6, 24 時間
カーボンナノチューブ (吸入曝露)	成獣雌性C57BL/6	外径: 1-2 nm, 長さ: 3-8 µm	40 µg/mouse	7, 28, 60, 180 日

筆者らはまず、先述した曝露条件下でシトルリン化タンパク質の定量解析（免疫染色）を行った。その結果、ナノ粒子を曝露した細胞及び肺組織において、シトルリン化タンパク質の誘導を確認した。次に筆者らは、それぞれの細胞（A549, THP-1）にナノ粒子を曝露し、シトルリン化誘導酵素である PAD の活性を解析した。その結果、ナノ粒子曝露によってシトルリン化タンパク質の増加に伴う PAD の活性亢進が認められた。

さらに、PAD を直接阻害する Cl-amidine もしくは Ca チャネルをブロックする Verapamil をナノ粒子と併せて投与することで、PAD のサブタイプである PAD2, 4 活性化がタンパク質のシトルリン化に影響を及ぼすのか否かを検証した。その結果、A549 細胞では Cl-amidine もしくは Verapamil をナノ粒子と併せて曝露することで、PAD 活性化が抑制された。このとき、タンパク質のシトルリン化も抑制された。一方で、THP-1 細胞においてはナノ粒子曝露によって PAD2 のみが活性化され、PAD4 は活性化されなかった。THP-1 細胞では、Cl-amidine もしくは Verapamil 存在下において十分にシトルリン化が抑制されなかった。この結果を受けて筆者らは、THP-1 細胞には PAD4 が存在していないため十分に抑制が行われなかったと考察している。さらに、THP-1 細胞では PAD 以外のシトルリン化経路が存在する可能性もある。

本論文において注目される点は三点ある。それは、1) シリカ粒子以外のナノ粒子を曝露した場合にもタンパク質のシトルリン化が誘導されること、2) ナノ粒子曝露によって粒子径に依存せずシトルリン化が誘導されること、3) ナノ粒子曝露によって引き起こされるタンパク質のシトルリン化の一部が PAD を介した経路で誘導されることを示した点である。タンパク質のシトルリン化は、自己免疫疾患発症との関連も示唆されることから、さらなる研究の進展が望まれる。

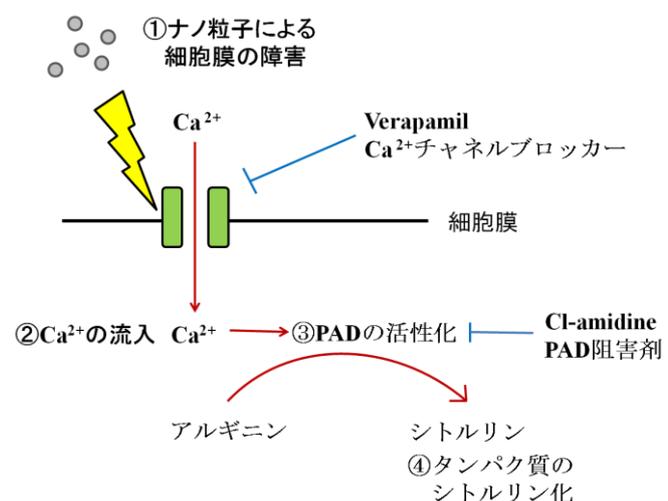


図. ナノ粒子曝露によるタンパク質シトルリン化のメカニズム