

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	Yasmine Abouleila
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells (一生細胞質量分析法を用いた循環腫瘍細胞のがん特異的代謝プロファイルの解析)			
論文審査担当者			
主査教授	杉山 一彦	印	
審査委員教授	小林 正夫		
審査委員准教授	田邊 和照		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>一細胞レベルでの癌細胞にみられる様々な特性は、腫瘍の再発および転移に寄与する要因の 1 つと考えられるが、単一細胞レベルで癌を研究することは容易ではない。臨床では診断目的のための画像診断とは別に、癌細胞を検討する唯一の信頼できる方法は腫瘍生検を実施であるが、これはその侵襲が大きく大規模研究は困難である。そこで、侵襲的処置なく単一の癌細胞の分子情報へのアクセスする方法としてリキッドバイオプシーが導入されつつある。これでは癌患者の末梢血中の循環遊離核酸（cfDNA および cfRNA）または循環腫瘍細胞（CTC）を標的とする単純で非侵襲的な技術で、特に CTC は、それらの原発性腫瘍源に応じて表現型および遺伝子型情報の広範囲の特徴を有している。CTC は、原発腫瘍から血管系に脱落して血流を循環し、その一部はさまざまな体の臓器に転移する可能性がある細胞であり、癌診断に非常に重要となる原発腫瘍に関する有用かつ本質的な特徴を有していると考えられる。しかしながら、CTC 自体がごく希少であることから、特に単一細胞レベルでのそれらの分子的解析を行うこと自体が困難であった。</p> <p>そこで、本研究では、マイクロ流体工学と一生細胞質量分析法（LSC-MS）を統合して患者由来の CTC を分離、濃縮し、その特性を評価することにより、CTC 分析を試みた。胃がん（GC）および大腸がん（CRC）患者から得られた CTC の分離分析を行った。同一の患者から得られた CTC とリンパ球との識別ならびに異なる癌種から得られた CTC での鑑別について検討した。対象は、血液サンプルは、胃がんと診断された 3 人の患者と大腸がんと診断された 7 人の患者とし、CTC 濃縮は、ClearCell®FX システムを使用した。濃縮された CTC を蛍光抗体（マウス抗ヒト CD45-FITC）で染色した。CD45 陰性 CTC がは、マイクロマニピュレーターを使用してナノスプレーチップに個々にサンプリングした。同様に、CD45 陽性のリンパ球もまた個々にサンプリングして対照として使用した。質量分析の前に、マイクロピペットによって 2 μ l の有機溶媒（80%メタノール，10%ジメチルスルホキシド，0.1%ギ酸）をチップの後端に注入し、次いで、ホモジナイザーロッドを用いて細胞を含むチップに超音波処理を施した。質量分析測定は、ナノスプレー源を備えた質量分析器（LTQ OrbiTRAP Velos pro, Thermo Fisher Scientific 社製）を用いた。脱プロトン化プロセスと比較してプロトン化の効率がよく、ポジティブモードはネガティブモードより網羅的であったため、ポジティブモードによるより広い代謝産物および脂質分析を選択した。さらに、両方の癌の種類におけるそれらの特性を探求するために脂質を検出することに焦点を合わせた。これは当該研究グループの質量分析法を最適化することによって行われた。複数のサンプルにわたるメタボロームの違いを視覚化するために、主成分分析とそれに続く判別分析（PCA-DA）を利用したスーパーバイズドアプローチをソフトウェア（MarkerView, Sciex 社製）を用いて行った。さらに、いくつかのグループに固有のピークの意義を見分けるために、CTC とリンパ球（コントロール）の間、および胃がん CTC と大腸がん CTC の間で Welch 検定を R 統計ソフトウェアで行った。</p> <p>まず、単一の CTC と対照細胞（リンパ球）との間のメタボロミクス差異を明らかにした。これは、PCA-DA で CTC，リンパ球，および有機溶媒ブランクの間に明らかに層別化された。このクラスタリングは、癌種だけでなく患者間でも観察され、各グループ間のメタボロミ</p>			

クスプロファイルの違いが示された。さらに、多数の代謝産物／脂質が全ての CTC に共通かつ特徴的であることが示された ($p < 0.05$)。具体的には、PC (32 : 1) , PC (34 : 1) , PS (38 : 5) , PE (38 : 6) , PC (32 : 3) と PC (34 : 2) を含む、癌細胞において意義があると考えられるいくつかのグリセロリン脂質 (GPLs) が見出された。これらの GPLs は細胞の生体膜に必須の構成成分であり、従って、全ての CTC におけるそれらの共通の存在は将来の研究において潜在的なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

次に、胃がん CTC と大腸がん CTC の間のメタボロミクスの違いを、PCA-DA によって検討した。異なる患者から得られた検体によってみられたヘテロ性にもかかわらず、TKC がそれぞれの癌種に対応する 2 つの異なる群に集積した。表現型における差異は、異なる癌タイプの m/z スケールにわたるピーク分布の頻度を検討すると、高い m/z ピークは、胃がん、大腸がん CTC においてより高頻度であった。これは、癌細胞の特徴と考えられ、CTC メタボロームの特徴的背景と考えられた。大腸がん CTC が他の脂質クラスと比較して高いレベルのステロール脂質 (SL) を示すことから、胃がん CTC との間の代謝の違いを検討した。すでに、大腸がん患者における高レベルの SL と遠隔転移との間の相関関係が示されていて、これは今回の結果と一致した。エイコサノイドが大腸がん CTC でも上昇しており、大腸がんの発症に伴う慢性炎症が原因である可能性が示唆された。さらに、大腸がん CTC では低レベルの脂肪族アシル (FA) および GPL が検出されが、FA と GPL は胃がん CTC の中でも高レベルを示した。これは、胃がん細胞での FA と GPL のデノボ合成および伸長作用によると考えられた。中でも、GPL 合成は、主に細胞膜およびエネルギー産生に必須であるため、癌増殖における重要な因子であると考えられた。これらの結果は、CTC の代謝産物／脂質プロファイリングが、単一の CTC が癌に分化するバイオマーカーとなりうると思われた。これらは、CTC の分子特性をより大規模に研究し、それを将来の診断マーカーとして位置付けるために、きわめて興味深い結果であると思われた。

以上の結果から、本論文は胃がん、大腸がん患者の循環腫瘍細胞 (CTC) を直接吸引して質量分析することによる分子パーカーががん診断の有用な診断マーカーになりうることを示したことで高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	Yasmine Abouleila
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells (一生細胞質量分析法を用いた循環腫瘍細胞のがん特異的代謝プロファイルの解析)			
最終試験担当者			
主査教授	杉山 一彦	印	
審査委員 教授	小林 正夫		
審査委員 准教授	田邊 和照		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年2月7日の第78回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年2月8日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 循環腫瘍細胞（CTC）の検出と捕捉法 2 循環腫瘍細胞（CTC）で得られた代謝性物質の細胞内の局在 3 循環腫瘍細胞（CTC）間でのヘテロ性とその意義 4 胃がんと大腸がんでの循環腫瘍細胞（CTC）の差異 5 循環腫瘍細胞（CTC）の代謝プロファイルの有用性と将来への展開 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			