

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	Ahmed Ali
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Single-Cell Screening of Tamoxifen Abundance and Effect Using Mass Spectrometry and Raman-Spectroscopy (質量分析とラマン分光法によるタモキシフェンの量と効果の一細胞スクリーニング)			
論文審査担当者			
主 査	教授	酒井 規雄	印
審査委員	教授	杉山 一彦	
審査委員	講師	角舎 学行	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>細胞は本来不均一で，薬剤のような外部刺激に対する反応が細胞によって異なるにもかかわらず，現在の創薬研究は細胞集団の平均測定値に基づいていて，潜在的に存在する亜集団や一細胞毎のばらつきについての情報が明らかでない。こうした情報の欠落は，薬の第 II 相臨床試験が失敗する一因となっている。したがって，細胞の不均一性は将来の創薬研究で検討すべきであり，この検討には，細胞と薬物との間の細胞相互作用（薬物取り込み，薬物代謝，および薬物応答など）を一細胞レベルで正確に測定することが必要となってきた。そこで，本研究では，ラマン分光法と質量分析（MS）を組み合わせたプラットフォームを開発した。この 2 つの方法を連結したプラットフォームは，以前にラマン分光法によって測定されてきた薬物処理細胞に対して，質量分析を使用しての薬物吸収と代謝物定量測定を加えることにより，ラマン分光法を使用した薬物応答の非標的分析を可能とした。薬物効果と薬物または代謝産物の濃度との間の関係も一細胞レベルで調べることが可能となった。</p> <p>本研究では，肝がん由来の HepG2 細胞を抗癌剤タモキシフェンで処理した。タモキシフェンは，HepG2 細胞内で，その薬理的に活性のある代謝産物 4-ヒドロキシ-タモキシフェン（4-HT）に代謝され，細胞自体に毒性を発揮する。HepG2 細胞を薬物処理細胞と未処理細胞の 2 つのグループに分けて検討した。処理細胞は DMSO に溶解した 10μ M タモキシフェンで 24 時間培養し，未処理細胞は対照として同容量の DMSO を加えて培養し，実験を 3 日間連続して繰り返した。増殖期の測定値のバラつきを最小にするために，3 つの実験にわたって細胞集団の増殖を同期させるための予備実験を行った。細胞の位置を記録しながらラマン測定を行い，その後の MS 分析のためにマイクロマニピュレーターを使用して同じ細胞をサンプリングするために，細胞はガラスボトムグリッド皿で培養した。ラマン測定は，10 秒間の露光時間で，単一ライン露光モードで個々のセルに対して行った。各実験において，処理細胞（80～120 細胞）および未処理細胞（35～40 細胞）をサンプリングし，合計 295 個の処理細胞および 115 個の未処理細胞をラマンにより測定した。これらの細胞のうち，同じ長径の 53 個の細胞を MS 分析のために選択した。マイクロマニピュレーターに取り付けられた 2～4μ m の内径を有する中空白金被覆ガラスキャピラリーを用いて，ラマン測定後に細胞をサンプリングした。各細胞をサンプリングしたキャピラリーをマイクロマニピュレーターから取り外し，そして有機溶媒をキャピラリーのもう一方の端から加えた。最後に，キャピラリーとその内容物を MS 装置（Thermo 社の Q-Exactive モード）のナノスプレー源に取り付け，そこでシングルセル MS 測定を施行した。</p>			

ラマン測定により、処理細胞と未処理細胞のスペクトルの違いが明らかになった。これは、タモキシフェンの肝毒性作用によるものと考えられ、細胞内に薬物による代謝変化があることが示された。投与された細胞がタモキシフェンの影響を受けているかどうかをラマンによる信号で正確に予測できるかどうかを検討した。2 回の実験からのデータを PLS-DA モデルにおけるトレーニングデータセット (n = 290 細胞) とした。

次いで、このモデルの予測能力を、第3の実験から得られたデータに対して検討した (n = 120 細胞)。今回のモデルで、タモキシフェンで処理した細胞を 100% の感度、および 72% の特異性で正しく分類することができた。これは、今回の実験プラットフォームが、別々の実験から得られた新しいデータにおいても、細胞がタモキシフェンの影響を受けているか否かを正確に予測しうることを示していた。この PLS-DA モデルから、それらの VIP スコアを計算することによって 13 個のピークが単離され、そして処理された細胞と未処理の細胞において有意に異なることが見出された。これらのピークは、単細胞レベルでの薬物反応と直接関連していると仮定されていることから、次の研究では薬効のスペクトルバイオマーカーとして使用可能と考えられた。ラマンによって測定された細胞から、53 細胞をピックアップして一細胞 MS 分析を行った (31 個の処理細胞と 22 個の未処理細胞)。この MS 法により、薬物と薬物で処理された単一細胞中の代謝産物 (4-HT) の両方が首尾よく検出され、それらは、対照細胞には存在しなかった。タモキシフェンおよび 4-HT の構造は MS / MS 分析によって確認され、この方法は、非常に選択的かつ高感度で単一細胞レベルで薬物およびその代謝産物をモニターできる技術であることが示された。

さらに、一細胞 MS 分析は、一つの細胞毎のタモキシフェンおよび 4-HT 濃度の強いばらつきを明らかにし、それらはそれぞれ 151% および 238% の %RSD を示した。タモキシフェン代謝の分布は、代謝されていないタモキシフェンに対する代謝されたタモキシフェンの比率がその分布において 222% の RSD を示すことでも検討された。この薬物濃度の不均一性は薬物取り込みの違いによって説明することができ、一方、4-HT 存在量の変動はその親分子であるタモキシフェンの取り込みの違いとその代謝の違いによって説明できた。一細胞中の薬物またはその代謝産物濃度と薬物応答との間の潜在的な関係を探求するために、薬物効果を示している可能性のある PLS-DA モデルから得られたラマンピークと、一細胞におけるタモキシフェンと 4-HT 濃度との関連性を検討した。PLS-DA モデルから選択された 13 個のピークのうち、6 個は薬物もしくはその代謝産物、または薬物とその代謝産物との比のいずれかと関連していた ($p < 0.05$)。さらに、20 個のそれぞれのラマンピークの比が、タモキシフェン代謝と関連していた。これらの相関ピークは、脂肪酸、脂質、およびタンパク質に対応していた。これは、脂肪酸酸化、脂質代謝、および膜動態におけるタモキシフェンおよび 4-HT の役割についての最近の文献のデータを裏付けるものであった。

今回の結果から、ラマンと MS の統合で、タモキシフェンに対する一細胞の応答を同定し、同一細胞中の薬物およびその代謝産物の定量が可能となった。すなわち、一細胞レベルで初めて薬力学および薬物動態をモニタリングすることが可能になったと考えられた。

以上の結果から、本論文は、ラマン分光法と質量分析器を統合することによって一細胞レベルで初めて薬力学および薬物動態モニタリングを可能と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。