

京都大学	博士（薬科学）	氏名	高橋 知里
論文題目	プロテオームプロファイリングによる ヒトがん細胞株の腫瘍モデルとしての評価に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>ヒトがん由来の細胞株は、がんを理解するためのモデルとして、抗悪性腫瘍薬の開発の諸段階において広く利用されている。細胞株と腫瘍の間には多くの類似点が見出され、がん細胞株を使用して、疾患における制御が緩和された遺伝子やシグナル伝達経路に関する情報が多く報告されている。しかし、最初のがん細胞株が開発されて以来、これらのモデルの臨床的妥当性は、絶えず議論されてきた。元の腫瘍とそこから派生したがん細胞株との間には、完全ではないがゲノム類似性があるとされ、元の腫瘍と比較した場合、がん細胞株は抗がん剤に対して同様の反応を示すことが報告されている。これまで、これらの細胞株の臨床的妥当性は遺伝子発現の比較によって行われることが多く、タンパク質発現を比較した報告は少ない。本研究では、24種の乳がん細胞株と腫瘍組織のプロテオームおよびリン酸化プロテオームを大規模に計測し、そのプロファイルについて腫瘍組織との相関を調べ、腫瘍モデルとしての妥当性について評価した。また近年、乳がん治療においては“intrinsic subtype”（内因性サブタイプ）の概念が実臨床に取り入れられており、治療方針決定の指標となっている。その中でも、2001年にSorlieらが乳がんのmicroarrayによるmRNA発現プロファイル解析により、乳がんには複数のサブタイプがあり、それが乳がんの治療選択の為のホルモン受容体と HER2 発現による分類と適合することを報告した。このmicroarrayデータから各サブタイプに対する signature遺伝子を 50個抽出したパネルは、PAM50 と呼ばれている。PAM50分類では、乳がんはLuminal A、luminal B、HER2-enriched、basal-likeとnormal-likeに分類される。乳がん由来の細胞株24試料のプロテオームおよびリン酸化プロテオームプロファイル計測し、ヒト乳がん組織77試料のプロテオームプロファイルおよび105試料のリン酸化プロテオームプロファイルを既報から収集して階層的クラスタリングを行ったところ、細胞株と組織は混じりあうことなくクラスタリングされた。さらに、PAM50分類のためのプロテオームおよびリン酸化プロテオームマーカーを同定し、これらの直接乳がんに関係していると考えられる分子のみを用いた階層的クラスタリングを行った。その結果、細胞株試料と腫瘍組織試料がPAM50分類クラスターにまとまって分類されることはなく、乳がん細胞株は腫瘍組織とは異なるプロテオームおよびリン酸化プロテオームプロファイルを有していることがわかった（第1章）。</p> <p>リン酸化酵素（キナーゼ）によるタンパク質のリン酸化修飾は、細胞増殖、分化、代謝など、生体内で起こる様々な生命現象に深く関わっており、多くの細胞機能を制御している。したがって、特定の疾患に特徴的なタンパク質リン酸化修飾を引き起こすキナーゼを見つけることは創薬標的探索の観点からも非常に重要である。近年、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC/MS/MS）とリン酸化ペプチド濃縮法の組み合わせにより、一度の分析で数千個のリン酸化修飾部位を同定することが可能となった。しかし、これらのリン酸化修飾部位の多くは、その生物学的機能が十分に解</p>			

明されていないのが現状である。そのため、リン酸化修飾を担ったキナーゼに情報を収斂させるアプローチが望ましいと考えられる。本研究では、キャピラリーLC/トリプル四重極質量分析計を用いて、選択反応モニタリング（SRM）モードでキナーゼ由来のリン酸化ペプチドを定量する分析システムを開発した。標的ペプチド配列は、研究室で有するリン酸化プロテオームライブラリーとキナーゼ活性を調節するリン酸化修飾部位に関する文献情報を用いて選択した。本手法を細胞由来試料に適用し、細胞内の標的キナーゼの活性をプロファイルしたところ、過バナジン酸処理後の細胞内キナーゼ活性の変動を測定することに成功した（第2章）。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、疾病モデルとしての細胞株を、LC/MS/MSを用いたプロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクスによってプロファイルし、乳がんを対象にして臨床検体のプロファイル結果と比較することによりその妥当性評価を試みたものである。また、リン酸化プロテオームプロファイルを解析するにあたって必要となるリン酸化酵素キナーゼの活性を大規模に取得するため、LC/MS/MSを用いた計測システムを開発したというものである。論文は2章から構成され、第1章では、乳がん細胞株のプロテオームプロファイルについて、第2章では、リン酸化酵素キナーゼの活性計測について記述されている。

がん細胞モデルとして多くのヒトがん由来細胞株が開発・管理され、世界中に頒布されている。これらの細胞株は、抗がん剤開発のあらゆる段階で広く利用されている。細胞株と腫瘍組織細胞との間には多くの類似点が見出されており、がん細胞株を用いて疾患における重要な遺伝子やシグナル伝達経路に関する多くの情報が得られ、報告されてきた。しかし、これらの研究の臨床的妥当性は十分に保証されていない場合も多い。

ゲノムについては、元の腫瘍細胞とそれに由来するがん細胞株との間には、完全ではないが類似性があり、元の腫瘍細胞と比較した場合、がん細胞株は抗がん剤に対して同様の反応を示すことが報告されている。また、これまで、これらの細胞株の臨床的妥当性は遺伝子発現を比較して判断されることが多く、タンパク質発現を比較した報告はほとんどなかった。本研究では、24の乳がん細胞株と患者由来の腫瘍組織細胞のプロテオームとリン酸化プロテオームを大規模に測定し、それらのプロファイルと比較することにより、細胞株の腫瘍モデルとしての妥当性を評価した。

近年、乳がん治療において「内在性サブタイプ」という概念が臨床に導入され、治療方針を決定する指標となっている。内在性サブタイプ分類の一つであるPAM50分類では、乳がんはLuminal A、Luminal B、HER2濃縮型、基底型、正常型に分類されている。乳がん由来の24細胞株のプロテオームプロファイルとリン酸化プロテオームプロファイルを測定し、乳がん患者77名の組織プロテオームプロファイルと105名の組織リン酸化プロテオームプロファイルを既報から収集して比較した。その結果、2つのプロテオームプロファイルはいずれも細胞株と組織の違いが最も大きな分類パラメータとなっていた。また、PAM50分類のためのプロテオミクスマーカーとリン酸化プロテオミクスマーカーをそれぞれの試料において別々に同定し、共通して同定された分子情報のみを用いて階層的クラスタリングを行った結果においても、最大の分類パラメータは由来試料であり、乳がん細胞株は腫瘍組織細胞とは異なるプロテオームプロファイルとリン酸化プロテオームプロファイルを有することが明らかとなった。

リン酸化酵素キナーゼによるタンパク質のリン酸化修飾は、細胞増殖、分化、代謝など生体内の様々な生命現象に深く関与しており、多くの細胞機能を制御している。したがって、特定の疾患に特徴的なタンパク質のリン酸化修飾を誘導するキナーゼを発見することは、創薬標的探索の観点から非常に重要である。近年、LC/MS/MSとリン酸化ペプチド濃縮法を組み合わせることで、1回の分析で数千～数万種のリン酸化修飾部位を同定することが可能になってきた。しかし、これらのリン酸化修飾部位の多くの生物学的機能は十分に解明されていない。そのため、リン酸化修飾を担うキナーゼに情報を集約した手法が望まれている。本研究では、キャピラリーLC/三重四重極型質量分析を用いて、選択的反応モニタリング (SRM) モードでキナーゼ由来のリン酸化修飾ペプチドを定量する分析系を開発した。目的とするペプチド配列は、リン酸化プロテオームライブラリーとキナーゼ活性を制御するリン酸化修飾部位の文献情報を用いて選択した。この方法を細胞由来試料に適用し、細胞内の標的キナーゼ活

性をプロファイリングしたところ、過バナジン酸処理後の細胞内キナーゼ活性の変動を測定することに成功した。

本論文では、乳がん細胞に注目し、細胞株と患者由来腫瘍組織細胞の比較をプロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクスを用いて行ったところ、試料間のばらつきよりも、細胞株と組織の違いの方が大きいことを明らかにした。また細胞内キナーゼ活性の大規模計測法としてキャピラリーLC/三重四重極型質量分析を用いたSRM法を開発し、細胞内キナーゼ活性変動を測定することに成功した。よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年2月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降

〔注〕

1. （記述例1）を参考に、論文審査の結果の要旨の結句には学位論文の審査についての認定を明記するとともに、試問の結果の要旨を付け加えること。
2. 論文の公表方法について、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断され、かつその旨を「論文審査の結果の要旨」に記載する場合は、（記述例2）を参考に記述すること。
3. 論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表する。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、欄外の「要旨公表可能日」欄に、公表可能とする日付を記入すること。（ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内となる。）