

京都大学	博士 (医学)	氏名	池田 篤志
論文題目	Colorectal cancer-derived CAT1-positive extracellular vesicles alter nitric oxide metabolism in endothelial cells and promote angiogenesis		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>大腸癌は早期発見・早期治療により予後の改善が見込まれ、早期発見を可能にするバイオマーカー開発が求められている。臨床的に広く使用される CEA や、便検査は感度・特異度ともに低く、一方、高感度な大腸内視鏡検査は侵襲的であることから、高感度かつ低侵襲なリキッドバイオプシーによる診断技術の開発が求められる。細胞外小胞 (Extracellular vesicle, EV) は細胞より血液や尿などの体液中に放出される小胞である。EV には放出細胞由来の情報が含まれ、リキッドバイオプシーによる診断に有用であるという報告が数多くなされている。</p> <p>本研究では、EV を利用したリキッドバイオプシーによる大腸癌診断法を開発するため、手術切除後の新鮮な組織 (大腸癌原発巣、近傍正常腸管、n = 17) を無血清培地で培養し、その培養上清より得られた組織由来細胞外小胞 (Tissue-exudative extracellular vesicles: Te-EVs) を用い網羅的プロテオーム解析を行った。同組織ペア (大腸癌原発巣、近傍正常腸管) よりタンパク質を抽出して得られた組織プロテオームと比較すると、EV マーカーである tetraspanin family タンパク質 (CD9, CD63) に加えて、Vacular protein sorting (VPS) タンパク質群が有意に多く含まれており、新たな EV マーカータンパク質の候補となりえることが示唆された。</p> <p>同定された 6,307 の Te-EV タンパク質のうち、正常腸管 Te-EV と比較し腫瘍 Te-EV が有意 (補正 $p < 0.05$) に、かつ 5 倍以上発現しているものを 487 個認めた。そのうち膜タンパク質であり、かつ大腸癌と強い関連性が報告されている、high affinity cationic amino acid transporter 1 (CAT1) ($p = 5.0 \times 10^{-3}$, fold change = 6.2) に着目した。健常者血漿 25 例、大腸癌患者血漿 94 例を用いた EV-CAT1 sandwich ELISA の結果、大腸癌患者を有意に識別可能であった ($p = 3.8 \times 10^{-7}$)。</p> <p>CAT1 は細胞外アルギニンを細胞内へ輸送する主要なトランスポーターであり、アルギニンは血管新生の重要な調節因子である一酸化窒素 (NO) の基質である。大腸癌組織および近傍正常腸管における CAT1 および血管内皮細胞マーカー CD31 の発現を免疫組織化学染色により検討したところ、大腸癌組織内あるいは近傍の血管内皮細胞が近傍正常腸管組織の血管内皮細胞よりも有意に CAT1 高発現であった。CAT1 高発現 EV を血管内皮細胞に添加すると、EV が細胞内に取り込まれ、また EV 取り込みを介して細胞膜で外来性 CAT1 が発現することが確認された。さらに CAT1 高発現 EV 添加により血管新生細胞の増殖および管腔形成が促進された。</p> <p>CAT1 を高発現させた血管内皮細胞では NO の代謝産物 (アルギニン、cGMP) の上昇が認められ、既知の NO/cGMP 経路による血管新生が誘導されていると示唆された。最後に、CAT1 高発現 EV を添加した血管内皮細胞内で cGMP の上昇を認め、より生理学的なモデルにおいて同経路が誘導されることが支持された。</p> <p>以上より CAT1 内包細胞外小胞は大腸癌診断に有望なバイオマーカーであり、また大腸癌の新しい治療戦略開発の標的ともなり得ることが示唆された。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>大腸癌において、リキッドバイオプシー技術を利用した低侵襲・高感度なバイオマーカー開発が望まれている。近年、細胞外小胞 (EV) を検出対象としたリキッドバイオプシーが研究されているが、大腸癌の存在診断を目的に開発されたものは未だ実用化されていない。また、EV は細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割をもつことが報告されているが、EV 内タンパク質が受け取り側の細胞に与える影響も多くのタンパク質で未解明であった。</p> <p>本研究では、大腸癌および正常腸管粘膜が分泌する EV を精製し、質量分析で比較解析することにより、大腸癌バイオマーカーの候補として CAT1 タンパク質を同定した。大腸癌患者・健常者血漿を利用し、EV 上に発現する CAT1 を検出するサンドイッチ ELISA では、大腸癌患者血漿において ELISA の反応が健常者血漿よりも有意に高値を示し、大腸癌存在診断のためのバイオマーカーとなりうることを示された。</p> <p>また、大腸癌組織内の血管内皮細胞では、正常腸管組織における血管内皮細胞と比較して CAT1 が高発現していることから、大腸癌より分泌された CAT1 高発現 EV が血管内皮細胞に取り込まれ、血管内皮細胞内に発現しているとの仮説がたてられ、検証された。CAT1 が EV を介して血管内皮細胞上に発現することが確認され、さらに CAT1 高発現 EV の添加実験にて血管内皮細胞の増殖および管腔形成が促進されることが明らかにされた。また、CAT1 高発現 EV 取り込み後の血管内皮細胞において、アルギニンの細胞内取り込みから一酸化窒素の生理機能発現へと至るシグナル伝達の賦活が示唆された。以上から、大腸癌が腫瘍微小環境において EV を介して血管新生を促進する可能性が示された。</p> <p>以上の研究は EV を利用した大腸癌リキッドバイオプシーの可能性を示し、さらに EV 内タンパク質の機能解明に寄与するところが大きい。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 5 月 20 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>

要旨公開可能日： 年 月 日以降