

京都大学	博士 (医学)	氏 名	笠原 桂子
論文題目	A large-scale targeted proteomics of plasma extracellular vesicles shows utility for prognosis prediction subtyping in colorectal cancer (血漿細胞外小胞体を対象とした大規模ターゲットプロテオミクスの大腸癌予後予測サブタイプ分類における有用性)		
(論文内容の要旨) 大腸癌は、全癌のなかでも罹患数や死亡数が上位にある癌である。個々の分子生物学的背景は様々であるが、基本的な治療方針は病期に基づいて決められるため、より精密な治療選択が行えていない可能性がある。日常診療でルーチンに採取されており、患者に更なる侵襲を加えずに入手が可能な血液から、病期以外のサブタイプ分類が可能となれば、治療選択に重要な情報となる。血液中の細胞外小胞体は DNA、RNA、miRNA やタンパク質を含んでおり、腫瘍の進行や治療抵抗性に影響を与えていることが明らかとなってきた。そこで、大腸癌患者の血漿細胞外小胞体タンパク質のなかに臨床に還元できるような有用なバイオマーカーがあるのか、検討した。 本研究では、457 タンパク質由来の 1344 ペプチドのリストを作成し、質量分析計を用いたターゲットプロテオミクスを行った。ターゲットプロテオミクスは、ノンターゲットプロテオミクスと比較し感度と定量精度が高いのが特徴で、測定対象タンパク質と同じ配列を持つ安定同位体標識合成ペプチドが内部標準として必要となる。通常の化学合成で得られる合成ペプチドを使用する場合、労力や費用の問題で数百種類のタンパク質を測定対象とするのは現実的ではなかった。そこで、無細胞発現系を利用したペプチド合成技術を駆使し、大規模なターゲットプロテオミクスの解析系を構築し、複数の施設から提供された大腸癌患者と健常人血漿の細胞外小胞体の解析を行った。 コホート 1 では、26 名の Stage I、33 名の Stage IV を選び、それぞれの集団に対し年齢、性別をマッチさせた健常人 26 名/33 名を比較対象とした。定量が可能であった 162 タンパク質由来の 230 ペプチドのデータを、Mann-Whitney-Wilcoxon 検定と Unsupervised Random Forest を行い、99 タンパク質由来の 139 ペプチドを抽出した。 コホート 2 では、これらの 99 タンパク質について、すべての病期を含む大腸癌患者 150 名を測定した。のちに得た臨床情報から 40 名を除外した 110 名のデータについて Consensus Clustering を行い、大腸癌患者は 2 つのクラスターに分かれることがわかった。生存時間分析である Kaplan-Meier を行ったところ、クラスター 1 はクラスター 2 と比較して生存期間に有意差 (p=0.017) があることがわかった。Volcano plot で示すように、p<0.05 の 2 倍以上高い発現量を示すクラスター 1 に含まれるタンパク質は 12 個認められた。すべてのサンプルで定量できた 5 タンパク質について、年齢、性別、病期と共に Cox proportional hazards regression 解析を行った。その結果、ORM-1 は独立した予後予測因子の可能性が示唆された。この 2 つのクラスターには、それぞれすべての病期の大腸癌患者が含まれており、病期以外の予後を規定するサブタイプが存在する可能性が考えられた。クラスター 1 の Stage IV の患者は、生存期間および根治切除率がクラスター 2 の Stage IV より低い傾向にあり、クラスター全体の生存期間に影響を与えた可能性が考えられた。 大規模ターゲットプロテオミクスを用いて、大腸癌患者の血漿細胞外小胞体を解析することにより、予後予測を可能とするサブタイプおよびマーカー候補タンパク質 ORM-1 を見出した。メカニズム解明に向けて、更なる研究が必要である。			

(論文審査の結果の要旨)

大腸癌の予後予測を可能とするサブタイプ分類の報告はあるが、腫瘍組織を解析する必要があることも多く、患者に侵襲の少ない検体による検討は十分ではなかった。本研究は、100 μl と少量の血漿から精製した細胞外小胞体にターゲットプロテオミクスを行い、病期分類によらず大腸癌患者に予後の悪いサブタイプがあることを発見した。また、予後予測因子として可能性のある細胞外小胞体タンパク質 ORM-1 を同定した。研究全体で大腸癌患者 209 名、健常人 59 名の臨床サンプルを用い、457 タンパク質に由来する 1344 ペプチドのターゲットプロテオミクスを行ったことは、過去の報告と比較しても上位にあり、効果的に機械学習を取り入れた解析方法も独自性が高いと考える。ORM-1 以外にも、予後の悪いサブタイプで有意に発現量が多かったとされる細胞外小胞体タンパク質群は、相互作用解析および共発現解析において関連がある可能性が示唆されており、研究の方法論としても一定の信頼性があるものと考えられる。予後予測細胞外小胞体タンパク質を同定し、タンパク質の機能解析において多くの示唆に富む情報が得られていることも評価できる。

以上の研究は、大腸癌患者における血漿細胞外小胞体タンパク質の発現量の変化の解明に貢献し、今後の細胞外小胞体タンパク質の機能の探索に寄与するところが多い。

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。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 4 月 1 4 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降