

論文審査の要旨及び担当者

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	早坂 亮祐
論文審査担当者	主 査	政策・メディア研究科委員 兼 政策・メディア研究科准教授 兼 環境情報学部准教授	平山 明由	
	副 査	政策・メディア研究科委員 兼 政策・メディア研究科教授 兼 環境情報学部教授	曾我 朋義	
	副 査	政策・メディア研究科委員 兼 政策・メディア研究科教授 兼 環境情報学部教授	金井 昭夫	
	副 査	大学共通教授	富田 勝	
学力確認担当者：				
<p>早坂亮祐君の学位請求論文は、「Development of the metabolomic analysis method for extracellular vesicles and its application to cancer cell profile analysis」と題され、全5章から構成されている。論文の邦題は、「細胞外小胞のメタボローム解析系の構築とがん細胞におけるその代謝物質プロファイル解析への応用」である。本研究における成果は次の通りの3点である。(1) 培養細胞から放出された小型細胞外小胞の定量的なメタボローム解析系を構築した点、(2) メタボローム解析により小型細胞外小胞中に625種類の代謝物質が含まれ、そのプロファイルが低酸素ストレスやIDH1の遺伝子変異によって変動することを明らかにした点、(3) 細胞と小型細胞外小胞中は異なった代謝物質プロファイルをしており、小型細胞外小胞においてプリン・ピリミジン代謝中の代謝物質が含まれやすく、がんの悪性化に関与する代謝物質を含むことを解明した点である。本研究は、がん細胞が放出する小型細胞外小胞中の網羅的な代謝物質解析法を確立し、小型細胞外小胞中の代謝物質の特徴を明らかにしたものである。</p> <p>第1章では、細胞が放出する小型細胞外小胞について整理し、多くのがんの悪性化に小型細胞外小胞が関与することを解説し、小型細胞外小胞研究の重要性を示した。既存の小型細胞外小胞の構成物質に着目した研究においては、核酸類やタンパク質に関したものがほとんどであり、代謝物質に関しては不明点が多いことを述べ、いくつかの技術的な課題があることを示した。本研究において、技術的な問題を解決した小型細胞外小胞のメタボローム解析システムを構築し、小型細胞外小胞中の代謝物質の特徴を理解することが重要であることを示している。</p> <p>第2章では、膵臓がん細胞株を対象に小型細胞外小胞のメタボローム解析システムを構築していた。ゴールドスタンダードである超遠心法を用いて小型細胞外小胞を回収し、親水性代謝物質はキャピラリーイオンクロマトグラフィー/質量分析法および液体クロマトグラフィー/質量分析法、脂質は超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法により狭雑物質を抑制し、定量的に解析していた。小型細胞外小胞中に、140種類の親水性代謝物質と494種類の脂質が含有することを示していた。これは、これまでに小型細胞外小胞中に含まれる代謝物質を最も多く定量的に解析した報告であった。また、がんの微小環境の一つである低酸素ストレスによって、小型細胞外小胞中の親水性代謝物質プロファイルが変化し、血管新生に関与する代謝物質の増加を確認している。さらに、細胞と細胞外小胞では、異なった代謝物質プロファイルをしており、小型細胞外小胞中</p>				

論文審査の要旨及び担当者

No.2

でプリン・ピリミジン代謝中の代謝物質が含まれやすいことを明らかにしていた。本技術は小型細胞外小胞中の代謝物質を介したがんの悪性化の解明の一旦を担う可能性があることを主張している。

第3章では、サイズ排除クロマトグラフィー法 (SEC)を用いて小型細胞外小胞の半自動回収法を構築していた。小型細胞外小胞回収のゴールドスタンダードである超遠心法は一度に処理できる量が限られているため、多検体処理に向いていなかった。また、SEC法も煩雑であり、どの画分に小型細胞外小胞が回収されているか確認する必要があった。そこで、SEC と分取高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた小型細胞外小胞の半自動回収法を構築した。構築した手法を用いて、大腸がん由来の小型細胞外小胞を超遠心法よりも効率的に回収でき、小型細胞外小胞特有の代謝物質プロファイルも確認された。この SEC 法は小型細胞外小胞回収における有用な手法であることを提唱した。

第4章では、がんの発がんや進展に関与する代謝物質であるオンコメタボライトが小型細胞外小胞中に含有するか述べている。がんの発がん等に関与するオンコメタボライトが小型細胞外小胞に含まれるか不明であった。そこで、申請者はオンコメタボライトの1つである2-ヒドロキシグルタル酸を多量に産生するイソクエン酸脱水素酵素1の変異に着目し、小型細胞外小胞のメタボローム解析を実施していた。その結果、イソクエン酸脱水素酵素の変異株によって有意に多くの小型細胞外小胞が放出され、小型細胞外小胞中の代謝物質プロファイルが変化し、オンコメタボライトの1つである2-ヒドロキシグルタル酸を多量に小型細胞外小胞中に含有することを明らかにした。本実験でも構築した SEC 法を用いており、SEC 法は小型細胞外小胞回収にて有用なツールであることが改めて示された。

第2章から第4章までで論じられた研究成果に関して、小型細胞外小胞に対する代謝物質の網羅的かつ定量的な解析系を構築し、細胞と小型細胞外小胞の代謝物質の関係性、小型細胞外小胞を介したがんの進展や細胞間コミュニケーションの一端を解明した。第5章ではこれらの解析結果をまとめると共に、微量解析におけるブランクの重要性や小型細胞外小胞の代謝物質の由来、がん細胞の放出する小型細胞外小胞中の代謝物質の可能性を議論した。本研究で開発した小型細胞外小胞の回収・解析技術は、培養細胞由来の小型細胞外小胞に限らず、ヒトや微生物、植物などが放出する小型細胞外小胞への適用可能であり、今後の小型細胞外小胞研究へ大きく貢献するものと考えられる。

請求者は分析化学や生化学など多数の分野を横断し、技術的な課題をクリアし、小型細胞外小胞の代謝物質について明らかにしたことは高く評価できる。

請求者は独立した研究者として、新規かつ独創的な研究課題を提案し、分野横断的に問題を解決していく研究遂行能力を有していると言える。故に、本学位請求論文は博士(学術)の学位授与の要求水準を満たすものと認められる。