

氏 名	伊達（益井） 実鈴		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	統合科学		
学位授与番号	博甲第	7 3 0 8	号
学位授与の日付	2 0 2 5 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	ヘルスシステム統合科学研究科 ヘルスシステム統合科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Improved linear epitope-specific autoantibody discovery and quantitative assay system (リニアエピトープを認識する自己抗体バイオマーカーの探索法と評価系の改良)		
論文審査委員	教授 大槻 高史	教授 徳光 浩	教授 二見 淳一郎
学位論文内容の要旨			
がん治療において革新的な効果を示す免疫チェックポイント阻害剤は、治療効果の個人差が大きく、奏効率の予測や免疫関連有害事象のリスク管理が大きな課題となっており、治療の指標となる診断ツールが求められている。当研究室では、抗腫瘍免疫反応のレベルを反映するバイオマーカーとして、がん免疫サイクルの活性化に伴って増加する「がん抗原に対する自己抗体群」に着目し、100 種類以上の自己抗体を網羅的に定量評価する診断システムの開発を進めている。自己抗体プロファイルは個人差が大きいため、患者の末梢血中に高頻度に出現する自己抗体をパネルに追加することで診断精度の向上が期待できる。よって、本研究では臨床検体の血漿中に含まれる自己抗体バイオマーカーを血清学的プロテオミクス手法で同定し、パネルの拡張を進めた。この過程で、プロテオミクスの効率化をはかるため、従来法よりも多検体解析に適した新規 2 次元分離技術の開発に取り組んだ。 第 2 章では、動物細胞内の総タンパク質可溶化技術を活用し、細胞内総タンパク質(TCP)を逆相 HPLC で疎水性度別に、さらに SDS-PAGE で分子量別に分画することで新規 2 次元分離法を開発した。逆相 HPLC を用いた分離は、疎水性の高い膜タンパク質を溶出可能であり、また、分離時にサンプルの回収時間を調整することで、その後の SDS-PAGE におけるバンド解像度を向上させることも可能なことが示された。本手法の再現性について、逆相 HPLC インジェクト間差とサンプル調製間差を検証した結果、どちらの結果も高い再現性でサンプル分離が可能であることが示された。本手法を用いて肺がん細胞由来の TCP を 2 次元分離し、肺がん患者血漿との反応性を western blotting で観察したあと、LC-MS/MS 分析を行った結果、血漿中の自己抗体が認識するがん抗原の同定に成功した。また、本手法は 1 度の逆相 HPLC によるサンプル分離で最大 8 枚の均一なゲルを作製可能な技術であるので、新規 2 次元分離技術は大規模な自己抗体探索に適した方法であることが示された。 第 3 章では、新規 2 次元分離技術を用いた自己抗体バイオマーカー探索と、自己抗体が認識するがん抗原タンパク質の特性を調査した。肺がん細胞株と肺がん患者血漿を用いたプロテオミクスにより、26 種類の新規バイオマーカーの同定に成功した。自己抗体はがん抗原の構造エピトープよりもリニアエピトープを主に認識する仮説に基づいて、変性抗原と native 抗原に対する自己抗体の反応性を比較した。その結果、大半の自己抗体が主にリニアエピトープを認識していることが観察された。また、変性抗原を用いた自己抗体価測定は、より高精度な測定が可能であることが確認され、変性抗原を用いた自己抗体測定の優位性が示された。本手法は変性抗原を認識する自己抗体の探索に特化していることから、自己抗体測定ツールとの相性が非常に良いことが示唆された。さらに、同定したバイオマーカーを加えた 118 種類の自己抗体プロトタイプパネルを用いて診断ツールを構築した結果、がん識別精度は 98.2%に達した。特に、診断において重要とされた上位 20 要素のうち 5 つが本手法で同定したバイオマーカーであり、本手法の有用性が強調された。			

論文審査結果の要旨

本論文は、がん免疫および自己免疫疾患領域において重要な自己抗体バイオマーカーを、多様かつ微量な末梢血検体から効率的に探索するための新規プロテオミクス技術の開発についてまとめている。バイオバンク等には多種多様な血漿・血清検体の保管が進んでいるが、疾患の早期発見や薬剤応答性との相関を示すバイオマーカーの探索が重要な課題である。免疫応答の異常に起因する疾患では、血中に多様な自己抗体が増加するため、これらのプロファイリングおよびモニタリング技術が個別化医療の実現に向けて期待されている。

本論文では、培養がん細胞内の総タンパク質を可溶化する技術と、疎水性度に基づく分離技術を組み合わせることで、再現性が高く低コストで細胞内総タンパク質を 2 次元分離する技術の開発に成功した。さらに、この技術を活用して新規に同定した自己抗原を調製し、自己抗体の定量評価を行った結果、がんの識別に相関する自己抗体バイオマーカーが同定できていることを明らかにした。

これらの研究成果は、変性タンパク質を扱う高度なタンパク質工学技術の成功例を示すとともに、微量の血漿・血清検体を用いて免疫関連疾患の基礎研究および個別化医療を推進する基盤技術を確立した点で極めて意義深い。学位審査委員会の全委員は、本論文が学位論文として十分な価値を有するものであると高く評価した。