

論文審査の結果の要旨

氏名 遠山 敦彦

本論文は、一般的な学術論文の仕様に則り、序章、方法、結果、考察、図表および参考文献リストの順番で構成されている。序章にて提起された課題に対して、適切な実験を実施したうえで、結果を評価し考察に結び付ける過程が首尾一貫しており、論文提出者の高い英語力と構成力により完成された論文と認められる。そのうえで、研究内容の妥当性と研究者としての資質を下記のように評価した。

序章では、血清中のタンパク質を網羅的に定量する方法論について概論が述べられている。近年の質量分析機器の発達に伴い、タンパク質の酵素消化ペプチドが非常に高感度に測定できるようになったほか、アミノ酸配列を決定することで元のタンパク質を同定する方法論が一般化されてきた。これに伴い、血清タンパク質を定量する方法も、消化ペプチドの検出量により元のタンパク質の存在量を推定する、ショットガン法がよく用いられてきており、網羅性の高い解析が可能になっている。消化ペプチドを定量する方法論としては安定同位体をペプチドに導入するラベリング法が主流であった。しかし、ラベリング法には限られたサンプル間の比較しかできない制限がある。論文提出者は、ラベリング法による定量精度の高さを認めながらも、臨床的に有意な変化を伴うバイオマーカーを捉えるためには数十サンプル規模の比較を行うことが肝要と考え、ラベルフリー法を採用するに至った。したがって、本論文にて挑戦する課題として、一点目に、ラベルフリー定量による血清タンパク質の網羅的解析の最適化、そして二点目に、最適化された系にて実際に肺癌バイオマーカー候補を同定することが挙げられた。

論文提出者は、ラベルフリー定量の効用を最大化するためには、分析間再現性を高めることが最も重要と考え、そのための検出系として、ナノスケール HPLC により分画されたペプチドを一旦ステンレスプレートに分取してからマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計にて測定する、LC-MALDI 法を採用した。この系はロバスト性が高く、数十サンプルを繰り返し測定するうえで分析条件が変動しにくい。また、網羅的解析においては主流であるエレクトロスプレーイオン化法と MALDI でペプチドのイオン化効率が異なることから、これまで報告のある解析とは異なったプロファイルが得られることが期待された。一方で、ラベルフリー定量を可能にするデータ解析プラットフォームが LC-MALDI に対応していない問題が生じたが、論文提出者は独自のプログラムにて測定データを編集し、定量可能なデータとしてソフトウェアに読み込ませることに成功した。

次に、論文提出者は、分析系のテストも兼ねた予備実験として、試料の前処理における脱糖鎖処理の影響を調べた。血清タンパク質のほとんどは糖鎖付加修飾がなされており、そのトリプシン消化物には多量の糖ペプチドが含まれる。糖ペプチドはイオン化効率が低いことが知られているため、糖ペプチドの存在は特に分析結果に影響を及ぼさないと予想されていた。しかし論文提出者は、情報量の増加に寄与しない妨害物質は極力除去しておくべきとの分析的観点を重要視し、脱糖鎖の有無のみが異なるコントロール試料をラベルフリー定量 LC-MALDI の系にて網羅的に比較することで検証した。その結果、脱糖鎖処理により分析系の再現性が向上し、多少ではあるが感度が底上げされていることが確認された。糖ペプチドの存在が共存している試料のイオン化効率にも影響を及ぼす可能性が示唆された。論文提出者は、分析系が高感度になるほどイオン化阻害の効果が大きくなる観点から、糖タンパク質に富む試料を分析する際には糖鎖を除去する処理をすべからく行うべきと結論づけた。

続く肺癌バイオマーカーの探索研究では、肺癌患者血清 20 症例および健常人血清 10 症例をラベルフリー定量 LC-MALDI の系による比較解析に供し、40 種類の候補分子を同定した。この中からバリデーシヨンの対象を効率的に選別するため、マルチプルリアクションモニタリングと呼ばれる、既知分子の定量に特化した質量分析計により、同定された候補分子の再測定を行った。最終的に、補体 C3 分子の断片化が早期肺癌症例において抑制されていることを見出し、追加症例を用いたバリデーシヨン試験においても、その現象が再現することを示した。

なお、上記成果は広島大、理化学研究所、滋賀医科大学との共同研究であるが、論文提出者が主体となって全ての分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。特に、分析系の構築において論文提出者は論理的に一貫した基準のもとに系の組み合わせを選択し、生じたトラブルを独創的な工夫で解決しており、その自立的な研究思考は高く評価できるものである。したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1992 字