

# 博士学位論文審査要旨

2022年1月18日

論文題目： 全身イメージング質量分析法を用いたデキサメタゾン投与によるマウス胸腺を主軸とする免疫代謝変動の解明

学位申請者： 辻 雄大

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

副査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査： 生命医科学研究科 教授 祝迫 恵子

要 旨：

がんや感染症・自己免疫性疾患などにおける個体レベルの免疫反応の解析手法としては、これまでフローサイトメトリーを用いた免疫細胞学的解析や免疫組織化学的解析法が主流であった。近年、質量分析法やバイオインフォマティクスの進展に伴い、シングルセルレベルでの免疫細胞の動態についての網羅的解析手法が有効となってきている。本研究では、組織をホモジナイズ・抽出・精製することなく生体低分子代謝物の網羅的解析を目的としたイメージング質量分析法に注目し、組織構造や病変部位など興味領域での変動が予測される物質を明らかにするアプローチに加え、先入観なしに生体物質の局在を捉える方法を開発した。すなわち新しい免疫代謝解析手法として「全身イメージング質量分析法」の標準プロトコルを作製しデキサメタゾン投与マウスの胸腺を中心とする薬剤投与前後のダイナミックな免疫代謝変動を解析した。これまでデキサメタゾン投与後マウスにおいて、胸腺内では大量のアポトーシスの起こることが知られていたが、胸腺内外における免疫細胞の動きや代謝変動についてはまだまだ未解明であった。本手法では、フィルムを用いる従来法である川本法に依らず、独自の直接切片作製の技術を確立し、1個体あたり400枚以上の胸部横断面マップを作製し、HE染色を行いデータベースとした。さらに島津製作所社製の顕微質量計を用いてプリン・ピリミジン代謝物を中心とする低分子代謝物の網羅的イメージング質量分析を行い、有効な代謝物として3000のイオン種を背景に、デキサメタゾン投与マウスでの薬剤投与前後での免疫代謝イメージングを行った。その統計解析手法として代謝物の局在情報データ群に機械学習法や次元削減法を応用することにより、薬剤投与の影響に加え、骨髄・胸腺・リンパ節などの免疫組織の基本的な「代謝コンパートメント」の可視化に成功した。この手法を用いることによりマウス胸腺におけるデキサメタゾン投与における部位別プリン・ピリミジン代謝の全貌と特異性の高いデキサメタゾン投与におけるバイオマーカーの発見に成功した。今後は、これらのマウス実験に於いて得られた代謝物のバイオマーカーをヒト胸腺病理における重症筋無力症や胸腺腫の鑑別診断に役立てるかどうかの解析を行うことにより臨床研究への応用が期待される。よって、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

## 総合試験結果の要旨

2022年1月18日

論文題目： 全身イメージング質量分析法を用いたデキサメタゾン投与によるマウス胸腺を主軸とする免疫代謝変動の解明

学位申請者： 辻 雄大

審査委員：

主 査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

副 査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副 査： 生命医科学研究科 教授 祝迫 恵子

要 旨： 上記審査委員は辻 雄大氏に対する総合試験を2022年1月18日午後4時より約1時間40分実施した。時間構成は口頭発表60分、質疑応答20分、口頭試問20分であった。総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する口頭試問に適切に応答し、研究内容と意義、研究方法、解析法について深い理解を示すとともに、研究の背景について広範な専門知識を有していることを示した。

研究内容は、新しい免疫代謝解析手法として「全身イメージング質量分析法」の標準プロトコルを作製しデキサメタゾン投与マウスの胸腺を中心とする薬剤投与前後のダイナミックな免疫代謝変動の解析に成功した。本手法では、フィルムを用いる従来法である川本法に依らず、独自の直接切片作製の技術を確立し、1個体あたり400枚以上の胸部横断面マップを作製し、顕微質量計を用いてプリン・ピリミジン代謝物を中心とする低分子代謝物の網羅的イメージング質量分析を行い、有効な代謝物として3000のイオン種を背景に、デキサメタゾン投与マウスでの薬剤投与前後での免疫代謝イメージングを行った。その統計解析手法として代謝物の局在情報データ群に機械学習法や次元削減法を応用することにより、薬剤投与の影響に加え、骨髄・胸腺・リンパ節などの免疫組織の基本的な「代謝コンパートメント」の可視化に成功した。これらのマウス実験に於いて得られた代謝物バイオマーカーをヒト胸腺病理における重症筋無力症や胸腺腫の鑑別診断に役立てるかどうかの解析を行うことにより臨床研究への応用が期待される。

学位申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得していること、修了要件を満たしていることを成績原簿より確認した。語学能力については、英文原著論文を1報執筆、国際学会での発表経験（8回）があり、英語の資質は十分備わっていると判断した。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

# 博士學位論文要旨

論文題目：全身イメージング質量分析法を用いたデキサメタゾン投与によるマウス胸腺を主軸とする免疫代謝変動の解明

氏名： 辻 雄大

要旨：

個々の免疫細胞は、生体内環境から受ける栄養素の時間的・空間的分布に大いに依存しており、がんや炎症病巣においてはさらに微小環境に大きく影響を受ける。免疫細胞を対象としたシングルセルレベルでの代謝解析については、遺伝子発現解析やある種の代謝物測定の報告はあるが、まだまだ実用化には至っていない。また免疫反応においては、生体内での時間軸も重要な要素であり、フローサイトメトリーを用いた免疫細胞分離ののちに行う解析より組織から直接解析する手法が望まれている。このように個体レベルでの免疫細胞の時間・空間的代謝の全貌の理解が進めば、新しい疾患治療法のみならず治療後の反応や不応例についての情報、さらには個別化医療への展望も得られることとなる。

本研究において、新しい免疫代謝解析手法として「全身イメージング質量分析法」を開発し、デキサメタゾン投与マウスの胸腺を中心とする薬剤投与前後のダイナミックな免疫代謝変動を解析した。マウスにおいて、細胞組織学レベルの全身アトラスは整備されていなかったため、フィルムを用いる従来法である川本法に依らず、独自の直接切片作製の技術を確立し、1個体あたり12  $\mu\text{m}$  ごとに400枚以上の胸部横断面マップを作製し、すべてHE染色を行いデータベースとした。さらに顕微質量計を用いてプリン・ピリミジン代謝物を中心とする低分子代謝物の網羅的イメージング質量分析を行い、有効な代謝物として3000のイオン種を背景に、デキサメタゾン投与マウスでの薬剤投与前後での免疫代謝イメージングに挑んだ。その手法としてMachine Learning法やDimensionality Reduction法が有効であり、薬剤投与の影響ばかりではなく、骨髄・胸腺・リンパ節などの免疫組織の基本的な代謝ネットワークの可視化にも成功した。この手法を用いることにより胸腺におけるデキサメタゾン投与における部位別プリン・ピリミジン代謝の全貌と特異性の高いデキサメタゾン投与におけるバイオマーカー候補分子の発見に成功した。今後の臨床応用や治療法への応用について若干の考察を行った。

イメージング質量分析の有用性は、従来からの組織をホモジナイズ・抽出・精製し情報を全て均一化させる方法とは異なり、*in vivo*の状態を保ち解析できる点にある。つまり、先入観をもって組織構造や病変部位など興味領域で変動する物質を明らかにするだけでなく、先入観なしに興味領域を問わずに局在する物質を捉えることが期待できる。本研究では、個体レベルのマウス胸部組織を作製したことで胸部組織全体の代謝状態を俯瞰し情報を得ることが可能になり、均一マニフォールド近似と投影法という統計解析手法を用いたことにより、予期しない情報までも引き出すことに成功した。今後の解析においてイメージング質量分析法をヒト手術中採取試料やバイオプシー試料などに応用することにより胸腺疾患の解析や、ステロイドなどの薬剤の影響をヒトにおいても検出可能かを検証する必要性が示唆された。