

論文内容要旨

Quantitative Analysis of Cell Subsets Using Antibody Microarrays

(抗体マイクロアレイを用いた細胞サブセットの
定量分析)

主指導教員：加藤 功一教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：柿本 直也教授

(医系科学研究科 歯科放射線学)

副指導教員：光畑 智恵子准教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

小笠原 朋子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】

表面抗原発現パターンの分析は、細胞を対象とする基礎研究に加え、病気の診断や再生医療に用いる幹細胞の品質管理など、応用面でも有用である。申請者の研究グループではこれまでに、多種類の表面抗原に対する抗体を一枚のチップ上に搭載した抗体アレイが、表面抗原発現パターンの分析に有用であることを報告してきた。しかしながら、抗体アレイ法には、表面抗原の発現解析法として一般的なフローサイトメトリーが得意とする細胞のサブセット分析に用いることができない、という欠点があった。細胞集団内に表面抗原発現パターンの異なるサブセットが存在する場合、その存在割合を定量的に求めることは、細胞集団の特徴付けを行う上で重要である。本研究では、抗体アレイを用いた表面抗原の発現解析に集合演算の概念を取り入れることによって定量的細胞サブセット分析が可能になるとの仮説に基づき、実験的な検証を行った。

【分析原理に関する仮説】

A 及び B の 2 種類の異なる表面抗原を発現する細胞集団を考え、A 及び B を発現する細胞の集合を $[A^+]$ 及び $[B^+]$ とする。A と B の組み合わせを考慮すると、4 種類の異なるサブセット ($[A^+B^+]$ 、 $[A^+B^-]$ 、 $[A^-B^+]$ 、 $[A^-B^-]$) が考えられる。それらのサブセットの存在割合 ($AR_{A^+B^+}$ 、 $AR_{A^+B^-}$ 、 $AR_{A^-B^+}$ 、 $AR_{A^-B^-}$) を求めるため、抗 A 抗体のみを固定化したスポット (a)、抗 B 抗体のみを固定化したスポット (b)、及び両抗体を共固定化したスポット (ab) の 3 種類の異なるスポットをもつ抗体アレイを作製する。これまでの研究により、抗体スポットに結合する細胞密度は特異的な表面抗原を発現している細胞の分散液中の割合に相関することが明らかにされている。そこで、細胞播種密度を D_s とし、(a)、(b)、(ab) の各スポットに結合した細胞密度を D_a 、 D_b 、 D_{ab} と表すと、A 発現細胞、B 発現細胞、A 及び B 共発現細胞の存在割合はそれぞれ次のように表される。

$$[A^+] = [A^+B^-] + [A^+B^+], \quad AR_{A^+} = AR_{A^+B^+} + AR_{A^+B^-} = D_a/D_s \quad (1)$$

$$[B^+] = [A^-B^+] + [A^+B^+], \quad AR_{B^+} = AR_{A^+B^+} + AR_{A^-B^+} = D_b/D_s \quad (2)$$

$$[A^+] \cup [B^+] = [A^+B^-] + [A^+B^+] + [A^-B^+], \quad AR_{A^+B^+} + AR_{A^+B^-} + AR_{A^-B^+} = D_{ab}/D_s \quad (3)$$

式 1~3 の連立方程式を解くと、4 つのサブセットの存在割合は次のようになる。

$$[A^+B^+] = [A^+] \cap [B^+], \quad AR_{A^+B^+} = D_a/D_s + D_b/D_s - D_{ab}/D_s \quad (4)$$

$$[A^+B^-] = [A^+] \cap \overline{[B^+]}, \quad AR_{A^+B^-} = D_a/D_s - D_{ab}/D_s \quad (5)$$

$$[A^-B^+] = \overline{[A^+]} \cap [B^+], \quad AR_{A^-B^+} = D_b/D_s - D_{ab}/D_s \quad (6)$$

$$[A^-B^-] = \overline{[A^+]} \cap \overline{[B^+]}, \quad AR_{A^-B^-} = D_s/D_s - D_{ab}/D_s = 1 - D_{ab}/D_s \quad (7)$$

よって、抗体アレイへの細胞接着試験を行い、 D_a 、 D_b 、 D_{ab} を計測すれば (D_s は実験条件として既知)、4 種類のサブセットの存在割合を定量的に求めることができる。

【実験】

まず、抗 CD45 抗体を搭載した抗体アレイを作製し、白血病細胞株(CCRF-CEM)を用いて分析条件の最適化を行った。次に、上述の仮説を検証するため、抗 CD13 抗体及び抗 CD49f 抗体を単独あるいは混合して固定した抗体アレイを作製した。一方、CD13 及び CD49f の発現パターンが異なると考えられる 4 種類の白血病細胞株(THP-1、HL-60、CCRF-CEM、Ramos)を準備し、CD13 及び CD49f の発現をフローサイトメトリーにより分析した。それら 4 種類の細胞を、乱数を発生させて得られた 5 パターンの比率で混合した細胞分散液を用いて抗体アレイへの接着試験を行い、各スポットに結合した細胞数から D_a 、及び D_b 、 D_{ab} を求めた。それらの値を式 4~7 に代入して細胞分散液中のサブセットの存在割合を求め、細胞混合比に一致するかを検証した。

【結果・考察】

1. 抗体アレイに播種した細胞は面内方向に静止した。また、分散液中の細胞数と抗体アレイの表面積から求めた播種密度は、アレイ上に沈降した細胞密度の計測値とよく一致した。さらに、全細胞が CD45 を発現する CCRF-CEM を用いて、抗 CD45 抗体スポットへの結合試験を行った結果、播種密度が $4,500 \text{ cells/mm}^2$ 以下の場合に結合細胞密度と播種密度が一致し、それ以上では細胞の重層が原因で結合細胞密度は一定値となった。これらの結果から、抗体アレイ上での細胞接着試験では細胞の水平方向の動揺は起こらず、結合細胞密度が分散液中の当該細胞の割合を反映することが確認された。また、細胞の播種密度として $4,500 \text{ cells/mm}^2$ が最適であることがわかった。
2. フローサイトメトリーによる分析の結果、THP-1、HL-60、CCRF-CEM、Ramos はそれぞれ $CD13^+CD49f^+$ 、 $CD13^+CD49f^-$ 、 $CD13^-CD49f^+$ 、 $CD13^-CD49f^-$ の表面形質をもつことがわかった。また、これらの細胞の抗 CD13 抗体-抗 CD49f 抗体共固定スポットへの接着細胞密度を求めた結果、THP-1、HL-60、CCRF-CEM では、いずれかの抗体のみを固定化したスポット上のそれと差がなかった。一方、Ramos は、すべての抗体混合比で細胞接着は認められなかった。以上の結果、抗体を共固定しても結合細胞密度には影響のないことがわかった。
3. 乱数を発生させて得られた 5 パターンの比率で 4 種類の細胞を混合した分散液を用いて、抗体アレイへの細胞接着試験を行った結果、それぞれのスポットへの細胞結合数から求められたサブセットの存在割合は既知の細胞混合比によく一致した。

【結論】

共固定スポットを搭載した抗体アレイを用い、集合演算に基づくデータ処理を行うことで、2 種類の表面抗原に着目した定量的細胞サブセット分析が可能である。