

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	小笠原 朋子
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	小松澤 均	印
審査委員	教授	谷本 幸太郎	
審査委員	教授	宮内 睦美	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>細胞の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の臨床応用も有用である。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解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。本研究では，この問題を解決するため，複数の抗体を共固定させたスポットを持つ新しいタイプの抗体アレイを作製し，集合演算という概念に基づく解析手法を取り入れた。これによって，細胞のサブセット分析が可能になることを実験的に検証した。</p> <p>これまでの研究により，従来の抗体アレイを用いた方法によって，細胞分散液中の目的の表面抗原を発現している細胞の割合を定量的に求められることが明らかになっている。ここで，表面抗原 A および B を発現している細胞集団を A⁺，B⁺ とする。細胞播種密度 D_s で結合アッセイを行った時の抗 A 抗体および抗 B 抗体のスポット上に結合した細胞の密度を D_a，D_b とする。細胞懸濁液中の A 発現細胞 (AR_{A+}) および B 発現細胞 (AR_{B+}) の存在割合 (AR) は，次式で表されるように D_a および D_b と，D_s の比に比例する。</p> $AR_{A+} = D_a/D_s, \quad AR_{B+} = D_b/D_s$ <p>ここでは，抗原 A と B の発現に関して A⁺B⁺，A⁺B⁻，A⁻B⁺，および A⁻B⁻ の 4 種類の細胞集団が考えられる。従来の抗体アレイ法ではこれらの細胞集団の存在割合を直接的に決定することはできない。しかし，AR_{A+} と AR_{B+} については，それぞれ A⁺B⁺ + A⁺B⁻ 細胞の AR，A⁺B⁺ + A⁻B⁺ 細胞の AR として表すことが可能である。</p> $AR_{A+B+} + AR_{A+B-} = D_a/D_s, \quad AR_{A+B+} + AR_{A-B+} = D_b/D_s$ <p>次に，抗 A 抗体および抗 B 抗体の共固定したスポット上に結合した細胞の密度を D_{ab} とすると，そのスポットに結合した細胞集団の存在割合 (AR_{A+B+} + AR_{A+B-} + AR_{A-B+}) は以下のように表すことができる。}}}</p> $AR_{A+B+} + AR_{A+B-} + AR_{A-B+} = D_{ab}/D_s$ <p>ここで集合演算の概念を導入すると，A 及び B を発現する細胞の集合（それぞれ [A⁺] 及び [B⁺]）と各サブセットの存在割合の関係は以下ようになる。</p> $[A^+B^+] = [A^+] \cap [B^+], \quad AR_{A+B+} = D_a/D_s + D_b/D_s - D_{ab}/D_s$			

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

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

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

ただし、 $AR_{A+B+} + AR_{A+B-} + AR_{A-B+} + AR_{A-B-} = 1$ である。本研究では、実験的に求めた D_a , D_b , D_{ab} , D_s を上記の式に代入して AR_{A+B+} , AR_{A+B-} , AR_{A-B+} , AR_{A-B-} を求めた。

まず、抗 CD45 抗体を搭載した抗体アレイを作製し、CCRF-CEM 細胞 (T 細胞株) を用いて分析条件の最適化を行った。次に、上述の抗体アレイを用いたサブセット分析の基盤となる考え方を検証するため、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、5 パターンのランダムな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 , D_b 及び D_{ab} を求めた。それらの値を集合演算の式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。

実験の結果、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 細胞を用いて抗 CD45 抗体スポットへの結合試験を行った結果、細胞播種密度が 4,500 cells/mm² 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により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結合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、細胞播種密度として 4,500 cells/mm² が最適であることがわかった。次に、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。さらに、これらの細胞の抗 CD13 抗体-抗 CD49f 抗体共固定スポットへの結合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非特異的抗体は特異的抗体の結合細胞密度に影響を与えないことがわかった。最後に、上述の 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、抗体アレイでの定量的サブセット解析を行った結果、各スポットへの細胞結合数から求め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。

以上の結果から、本論文は抗体アレイを用いた表面抗原の発現解析において、1つのスポットに 2 種類の抗体を共固定化したスポットを加えること、そして集合演算に基づいた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サブセット分析が可能であると結論し、十分な科学的価値を示したと考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。