

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	所 祐介
論文題目	長期造血幹細胞を標識する新規抗マウスGPR56モノクローナル抗体に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>造血幹細胞は個体の生涯にわたって赤血球・白血球等の分化した血液細胞を産生し続けるが、c-Kit (Stem Cell Factor受容体)、MPL (Thrombopoietin受容体) などの細胞表面蛋白質は造血幹細胞に発現し、造血幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが知られている。そのような細胞表面蛋白質は、実験手法の観点からも造血幹細胞の陽性マーカーとして有用であり、それらの蛋白質を標識可能なモノクローナル抗体を用いることにより、造血幹細胞の濃縮・純化が可能である。さらに、そのような陽性マーカーと分化抗原 (Lin)、CD34などの陰性マーカーを組み合わせた一細胞レベルでの細胞分取・移植実験により、造血幹細胞の存在を証明することも可能であり、造血幹細胞の表面蛋白質やそれらを標識するモノクローナル抗体は血液分野の研究進展に大きく寄与している。</p> <p>GPR56はG蛋白質共役型受容体 (GPCR) の一つであり、当初はリガンド不明のオーファン受容体としてヒト癌細胞株等で同定された。GPR56は細胞外N末端領域に接着分子モチーフを有するAdhesion GPCRと呼ばれるサブグループに属しており、ヒトGPR56はCollagen IIIなどの細胞外マトリクスに結合することが知られている。その一方、マウスGPR56は、そのmRNAが造血幹細胞において発現していることは遺伝子発現解析によって示唆されていたが、GPR56が実際に造血幹細胞の表面に蛋白質として発現しているかどうかは、実証のために必要なフローサイトメトリー解析や細胞分取に適した抗マウスGPR56モノクローナル抗体が確立されていなかったため、これまで確認されていなかった。そこで、本研究において、フローサイトメトリー解析や細胞分取に適した抗マウスGPR56モノクローナル抗体57R2Aを新規に確立した上で、長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞 (長期造血幹細胞) の表面におけるマウスGPR56蛋白質の発現について解析を行った。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>最初に、マウスGPR56とEGFP (緑色蛍光蛋白質) の融合蛋白質の安定発現株を2種類の細胞株から作製した。ラット由来細胞株から作製した安定発現株はラット免疫用の抗原として、ヒト由来細胞株から作製した安定発現株はハイブリドーマ選抜用の抗原として用いることにより、抗マウスGPR56モノクローナル抗体57R2Aを得た。そこで、57R2A抗体を用いてフローサイトメトリー解析を実施したところ、長期造血幹細胞が濃縮されていることが既に知られている、マウス骨髄単核細胞中のCD34陰性/Lin陰性/Sca-1陽性/c-Kit陽性の画分にGPR56蛋白質が発現していることが明らかになっ</p>			

た。

続いて、57R2A抗体を用いて、GPR56蛋白質の発現強度を指標としてマウス骨髄単核細胞を分取し、放射線照射したレシピエントマウスに、各画分の細胞を存在割合に基づいて移植した（競合的長期骨髄再構築アッセイ）。その結果、長期造血幹細胞は、マウス骨髄単核細胞中に15%以下しか存在しないGPR56陽性画分のみから検出され、残り約85%のGPR56陰性画分からは検出されないことが明らかになった。すなわち、長期造血幹細胞はその表面上に57R2Aによって標識されるGPR56蛋白質を発現していることが示された。

さらに、長期造血幹細胞を濃縮可能な陽性マーカーとして既に知られているMPL蛋白質に対するモノクローナル抗体AMM2を、57R2A抗体と共に用いて、マウス骨髄単核細胞のフローサイトメトリー解析を実施したところ、GPR56/MPL共陽性画分（存在割合0.8%）が、残り約99.2%の画分から明確に分離された。そこで、当該共陽性画分と残りの画分を分取し、放射線照射したレシピエントマウスに、各画分の存在割合に基づいて移植した。その結果、長期造血幹細胞は当該共陽性画分のみから検出され、残りの画分からは検出されなかった。すなわち、長期造血幹細胞はその表面上にGPR56とMPLの両蛋白質を発現し、57R2AとAMM2の両抗体によって、他のマウス骨髄単核細胞から明確に分離されることが示された。

最後に、57R2AとAMM2の二つの抗体を用いて、GPR56/MPL両蛋白質の発現強度に基づいて当該共陽性画分をさらに3分割した画分を分取し、放射線照射したレシピエントマウスに、各画分の細胞を存在割合（各0.27%）に基づいて移植した。その結果、GPR56/MPL両蛋白質の発現量が高い画分ほど長期造血幹細胞を含んでいる頻度が高くなることが明らかになった。すなわち、GPR56/MPL共陽性画分中の両蛋白質の発現強度と長期造血幹細胞の濃縮レベルは、密接に関連することが示された。

以上、本研究において新規に確立した抗マウスGPR56モノクローナル抗体57R2Aを用いた実験結果から、マウス骨髄単核細胞におけるすべての長期造血幹細胞はGPR56蛋白質をその表面に発現し、その発現強度が長期造血幹細胞の濃縮レベルと密接に関連することが明らかになった。これらの研究成果より、GPR56蛋白質は長期造血幹細胞の陽性マーカーとなることが新たに示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

造血幹細胞の細胞表面に発現する蛋白質には、造血幹細胞の維持に重要な役割を果たしているものがある。さらに、細胞表面蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製することによって、造血幹細胞の濃縮・純化という重要な実験手法が可能となる。G蛋白質共役型受容体であるマウスGPR56は、造血幹細胞においてmRNAレベルでの発現は示唆されていたが、造血幹細胞の表面に実際に蛋白質として発現していることは、これまで確認されていなかった。

本論文は、抗マウスGPR56モノクローナル抗体57R2Aを新規に確立した。さらにそれを用いることにより、フローサイトメトリー解析や細胞分取を実施し、長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞（長期造血幹細胞）の表面におけるマウスGPR56蛋白質の発現について解析を行ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. フローサイトメトリー解析や細胞分取に適した抗マウスGPR56モノクローナル抗体57R2Aを新規に確立した。
2. 57R2A抗体を用いてマウス骨髄単核細胞を分取・解析した結果、長期造血幹細胞はGPR56陽性画分のみから検出されること、すなわち、長期造血幹細胞はその表面上にGPR56蛋白質を発現していることを明らかにした。
3. 57R2A抗体に加えて、造血幹細胞の既知陽性マーカーMPL蛋白質に対するモノクローナル抗体AMM2を用いて分取・解析した結果、長期造血幹細胞は存在割合0.8%のGPR56/MPL共陽性画分のみから検出されること、すなわち、長期造血幹細胞はその表面上にGPR56とMPLの両蛋白質を発現し、57R2AとAMM2の両抗体によって他のマウス骨髄単核細胞から明確に分離されることを明らかにした。
4. 57R2AとAMM2の二つの抗体を用いて、GPR56/MPL共陽性画分を両蛋白質の発現強度に基づいて3分割し、分取・解析した結果、GPR56/MPL両蛋白質の発現量が高い画分ほど長期造血幹細胞を高頻度に含んでいること、すなわち、GPR56/MPL両蛋白質の発現強度と長期造血幹細胞の濃縮レベルは、密接に関連することを明らかにした。

以上のように、本論文は、GPR56蛋白質が長期造血幹細胞の陽性マーカーとなることを明らかにしたものであり、細胞生物学および基礎生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成31年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）