

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

所 祐介

2019 年

目次

序論	1
材料および方法	3
結果	13
考察	37
引用文献	43
発表論文	47
謝辞	49

序論

造血幹細胞はその固有の性質である多分化能と自己複製能を個体の生涯にわたって維持することにより、赤血球・白血球等の分化した血液細胞を産生し続けるが、Tie-2 (Angiopoietin 受容体)、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、その性質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[1-7]。また、実験手法の観点からも、Tie-2、c-Kit、MPL 等の細胞表面蛋白質は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・純化が可能となっている[6-8]。さらに、そのような陽性マーカーに加え、分化抗原 (Lin) 等の陰性マーカーも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となっており、例えば、マウスにおいては c-Kit、Sca-1、CD34 等の陽性・陰性マーカーが、ヒトにおいては CD34、CD38、CD90、CD45RA、CD49f 等の陽性・陰性マーカーが、分化抗原 (Lin) に加えて用いられている[9, 10]。これら陽性・陰性マーカーとなる細胞表面蛋白質やそれらを標識可能なモノクローナル抗体は、造血幹細胞のみならず、造血前駆細胞の純化にも用いられており、マウスやヒトにおける造血システムの階層性の研究進展に大きく寄与している[10, 11]。

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の癌細胞株や正常組織で同定されたが[12, 13]、その後に実施されたマウス遺伝子発現解析の結果から、造血幹細胞が濃縮された画分にその mRNA が発現していることが報告された[14, 15]。GPR56 は Adhesion GPCR と呼ばれる GPCR のサブグループに属しており、接着分子モチーフを伴う長い細胞外 N 末端領域を有するという特徴を持っている (図 1) [16]。ヒト GPR56 は Transglutaminase 2 や

Collagen III といった細胞外マトリクスに結合することが知られており[17, 18]、さらに、悪性黒色腫細胞株に加えて、甲状腺や脳、心臓といった正常組織にも発現していることが知られていることから[12, 13]、これらの細胞や組織において細胞接着に関与していることが考えられる。

その一方、マウス GPR56 について、その mRNA が造血幹細胞が濃縮された画分に発現していることは遺伝子発現解析によって示されていたが[14, 15]、その蛋白質が実際に造血幹細胞の表面に発現していることは、それを示すために必要となる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、これまで確認できていなかった。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、マウス骨髄単核細胞の造血幹細胞が濃縮された画分における GPR56 蛋白質の発現を確認した。さらに、GPR56 蛋白質を発現したマウス骨髄単核細胞を分取し、造血幹細胞としての性質を有するか否かについて解析を行った。

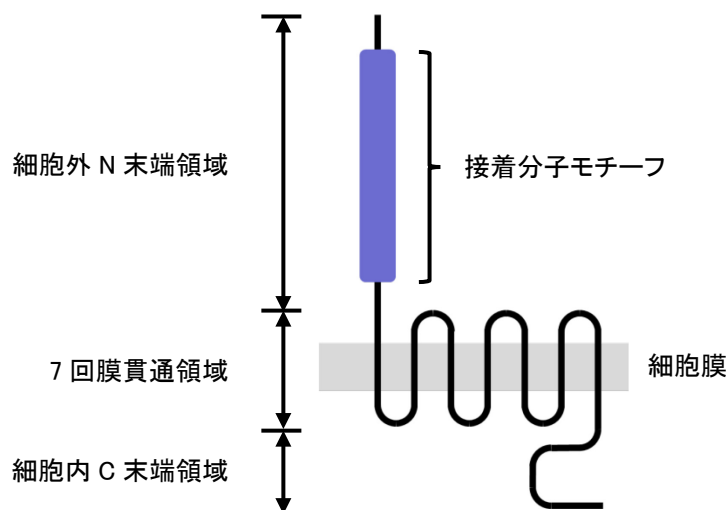


図 1. GPR56 蛋白質の模式図

GPR56 蛋白質は、接着分子モチーフを伴う長い細胞外 N 末端領域を有する特徴的な G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) である。

材料および方法

【GPR56 cDNA のクローニング】

マウス GPR56 cDNA は、マウス腎臓 cDNA (Clontech 社) から PCR (Polymerase Chain Reaction) を用いて増幅することにより入手し、当該 cDNA の配列は、GenBank Accession 番号 NM_001198894 のマウス GPR56 cDNA 配列と同一であることを確認した。

さらに、上記マウス GPR56 cDNA 配列を pEGFP-N1 ベクター (Clontech 社) に組み込み、マウス GPR56 蛋白質の細胞内 C 末端領域に EGFP (緑色蛍光蛋白質) を融合させることによって、マウス GPR56 蛋白質を EGFP で標識しつつも、発現細胞の表面には EGFP は発現せず、マウス GPR56 蛋白質のみが発現するようにした。そして、上記過程において作製されたマウス GPR56-EGFP 融合遺伝子を pcDNA6/Myc-His A ベクター (Invitrogen 社) に組み込むことにより、pcDNA6-GPR56-EGFP を構築し、マウス GPR56-EGFP 融合蛋白質の安定発現細胞株を Blasticidin で選抜できるようにした。この pcDNA6-GPR56-EGFP において、pcDNA6/Myc-His A ベクターに含まれていた Myc と His のタグは、それに先行する EGFP cDNA のストップコドンによって発現しないようにした (図 2)。

なお、対照実験に用いるため、上記と同様の方法により、ヒト腎臓 cDNA (Clontech 社) から PCR を用いて増幅したヒト GPR56 cDNA 配列を pEGFP-N1 ベクターに組み込み、さらにヒト GPR56-EGFP 融合遺伝子を pcDNA6/Myc-His A ベクターに組み込むことにより、pcDNA6-hGPR56-EGFP を構築し、ヒト GPR56-EGFP 融合蛋白質の安定発現細胞株を Blasticidin で選抜できるようにした。この pcDNA6-hGPR56-EGFP においても、pcDNA6/Myc-His A ベクターに含まれていた Myc と His のタグは、それに先行す

る EGFP cDNA のストップコドンによって発現しないようにした。

【GPR56 蛋白質安定発現細胞株の確立】

まずは、ラット繊維芽細胞株である 3Y1-B 細胞（理研 BRC 細胞バンク）[19]とヒト胎児腎細胞株である HEK293 細胞（American Type Culture Collection 番号 CRL1573）のそれぞれに、pcDNA6-GPR56-EGFP を導入した。その後、Blasticidin（5 μ g/mL）を添加して培養しつつ、EGFP 陽性細胞を FACS Aria（BD Biosciences 社）で分取することで、マウス GPR56-EGFP 融合蛋白質の安定発現細胞株を選抜した。このようにして選抜したマウス GPR56-EGFP 融合蛋白質安定発現 3Y1-B 細胞の代表クローン、マウス GPR56-EGFP 融合蛋白質安定発現 HEK293 細胞の代表クローンを、それぞれ 3Y1-GPR56-EGFP 細胞、HEK293-GPR56-EGFP 細胞とした（図 3）。

なお、対照実験に用いるため、上記と同様の方法により、pcDNA6-hGPR56-EGFP を HEK293 細胞に導入し、選抜したヒト GPR56-EGFP 融合蛋白質安定発現 HEK293 細胞の代表クローンを HEK293-hGPR56-EGFP 細胞とした。

【GPR56 蛋白質に対するモノクローナル抗体の確立】

以下、本章に記載する本研究の動物実験の手法の全ては、研究施設において定めた動物実験規程に沿ったものであり、かつ、研究施設の動物実験委員会で承認されたものである。

まず、3Y1-GPR56-EGFP 細胞を 8 週齢の雌 F344 ラット（日本エスエルシー社）の腹腔内に 2 週間ごとに合計 3 回免疫した。当該ラットの血清におけるマウス GPR56 蛋白質に対する抗体価上昇は、HEK293-GPR56-EGFP 細胞と Phycoerythrin（PE）標識抗ラット IgG 2 次抗体（OBMSTAR73、コスモバイオ社）、FACS Calibur（BD Biosciences 社）を用いたフローサイトメトリー解析により検出した。マウス GPR56 蛋白質に対する高

い抗体価が得られたラット個体から脾臓細胞を採取し、SP2/0-Ag14 細胞（American Type Culture Collection 番号 CRL1581）と融合させた。そこから得られたハイブリドーマの培養上清のマウス GPR56 蛋白質に対する反応性を、HEK293-GPR56-EGFP 細胞と PE 標識抗ラット IgG 2 次抗体、FACS Calibur を用いて、血清中の抗体価上昇を検出する場合と同様のフローサイトメトリー解析により検出することにより、ハイブリドーマのクローンを選抜した（図 4）。

当該選抜クローンからモノクローナル抗体を精製し、Alexa Fluor[®] 647 Protein Labeling Kit（Molecular Probe 社）を用いて直接蛍光標識した。

【マウス骨髄単核細胞の調製】

8～10 週齢の雄 C57BL/6-Ly5.1 マウス[20]（中内啓光博士から供与された後、外部施設に委託して飼育）の大腿骨と脛骨から骨髄細胞を採取し、Phosphate-Buffered Saline（PBS）に懸濁した。懸濁した骨髄細胞を Histopaque-1083（シグマアルドリッチ社）の液面上に積層し、300 x g で 15 分間、遠心分離機で処理した。その処理によって形成された骨髄単核細胞からなる中間層のみを採取し、Staining Medium（PBS に 2% FBS、1mmol/L EDTA、0.05% Sodium Azide を添加）に懸濁した上で、遠心分離機による処理と Staining Medium による懸濁を 2 回繰り返して、骨髄単核細胞を洗浄した。

【フローサイトメトリー解析または細胞分取のための骨髄単核細胞の標識抗体による染色】

少量の Staining Medium に懸濁した骨髄単核細胞に Fc Blocking 抗体（2.4G2、BD Biosciences 社）を添加し、4°C で 15 分間静置した。

その後、それぞれビオチンで標識された抗 CD4 抗体（H129.19、BD Biosciences 社）、抗 CD8a 抗体（53-6.7、BD Biosciences 社）、抗 B220 抗体（RA3-6B2、BD Biosciences

社)、抗 Gr-1 抗体 (RB6-8C5、BD Biosciences 社)、抗 Mac-1 抗体 (M1/70、BD Biosciences 社)、抗 TER-119 抗体 (TER-119、BD Biosciences 社) を混合した分化抗原 (Lin) に対するモノクローナル抗体を骨髓単核細胞に添加し、4°C で 30 分間静置した。

その後、Staining Medium による懸濁と遠心分離機による処理によって洗浄した上で、少量の Staining Medium に懸濁した骨髓単核細胞に、FITC で標識された抗 CD34 抗体 (RAM34、BD Biosciences 社)、PE で標識された抗 Sca-1 抗体 (E13-161.7、BD Biosciences 社)、PE-Cy7 で標識された抗 c-Kit 抗体 (2B8、BD Biosciences 社)、Alexa Fluor[®] 647 で標識された抗 GPR56 抗体 (57R2A) または Alexa Fluor[®] 647 で標識されたラット IgG2a アイソタイプコントロール抗体 (R35-95、BD Biosciences 社)、Allophycocyanin (APC) -Cy7 で標識されたストレプトアビジン (BD Biosciences 社) を添加し、4°C で 30 分間静置した。

なお、骨髓単核細胞を抗 MPL 抗体 (AMM2) によって標識する場合には、まず骨髓単核細胞に Fc Blocking 抗体を添加して 4°C で 15 分間静置した後、Alexa Fluor[®] 647 で標識された抗 GPR56 抗体 (57R2A)、ビオチン化された抗 MPL 抗体 (AMM2) [6] を添加し、4°C で 30 分間静置した。その後、Staining Medium による懸濁と遠心分離機による処理によって洗浄した上で、少量の Staining Medium に懸濁した骨髓単核細胞に PE で標識されたストレプトアビジン (BD Biosciences 社) を添加し、4°C で 30 分間静置した。

抗体等の添加が全て終わった後、Staining Medium による懸濁と遠心分離機による処理によって骨髓単核細胞を洗浄した上で、適量の Staining Medium に懸濁し、さらにヨウ化プロピジウムを 1µg/mL となるように添加した上で、FACS Aria (BD Biosciences 社) を用いたフローサイトメトリー解析または細胞分取に使用した。

【競合的長期骨髄再構築アッセイ】

分取した骨髄単核細胞の中に 12 週間以上の長期にわたって造血を維持する長期造血幹細胞が含まれていること、すなわち、分取した骨髄単核細胞が長期骨髄再構築能を有していることの確認は、既存の文献[20]に記載されている方法（競合的長期骨髄再構築アッセイ）によって実施したが、簡潔に記載すると以下の通りとなる。

まず、レシピエントマウスとして 8 週齢の雄 C57BL/6-Ly5.2 マウス（日本チャールス・リバー社）に致死量（8.5Gy）の X 線を移植前に照射しておく。さらに、別の 8 週齢の雄 C57BL/6-Ly5.2 マウス骨髄から、実験に使用するレシピエントマウス 1 匹あたり 2.0×10^5 個の骨髄細胞（競合細胞）を調製しておく。そして、FACS Aria で分取した C57BL/6-Ly5.1 マウス（ドナーマウス）の骨髄単核細胞（ドナー細胞）を、予め調製しておいた競合細胞と混合した上で、静脈投与によりレシピエントマウスに移植した（図 5）。

移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有しているか否かについて、移植 12 週間後のレシピエントマウスから採取した末梢血に、PE で標識された抗 Gr-1 抗体（RB6-8C5、BD Biosciences 社）、PE で標識された抗 Mac-1 抗体（M1/70、BD Biosciences 社）、APC で標識された抗 B220 抗体（RA3-6B2、BD Biosciences 社）、APC で標識された抗 Thy1.2 抗体（53-2.1、BD Biosciences 社）、FITC で標識された抗 Ly5.1 抗体（A20、BD Biosciences 社）をそれぞれ添加して実施したフローサイトメトリー解析の結果により判定した。その判定基準は、あるレシピエントマウス個体の骨髄球系（Mac-1⁺または Gr-1⁺）の細胞とリンパ球系（B220⁺または Thy1.2⁺）の細胞の両方において、ドナー由来細胞（Ly5.1⁺細胞）の割合が 1%より大きい場合に、当該マウスに移植されたドナー細胞に 12 週間以上の長期にわたって造血を維持する長期造血幹細胞が含まれていた、すなわち、当該マウスに移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたと判定するという基準であった（図 6）。

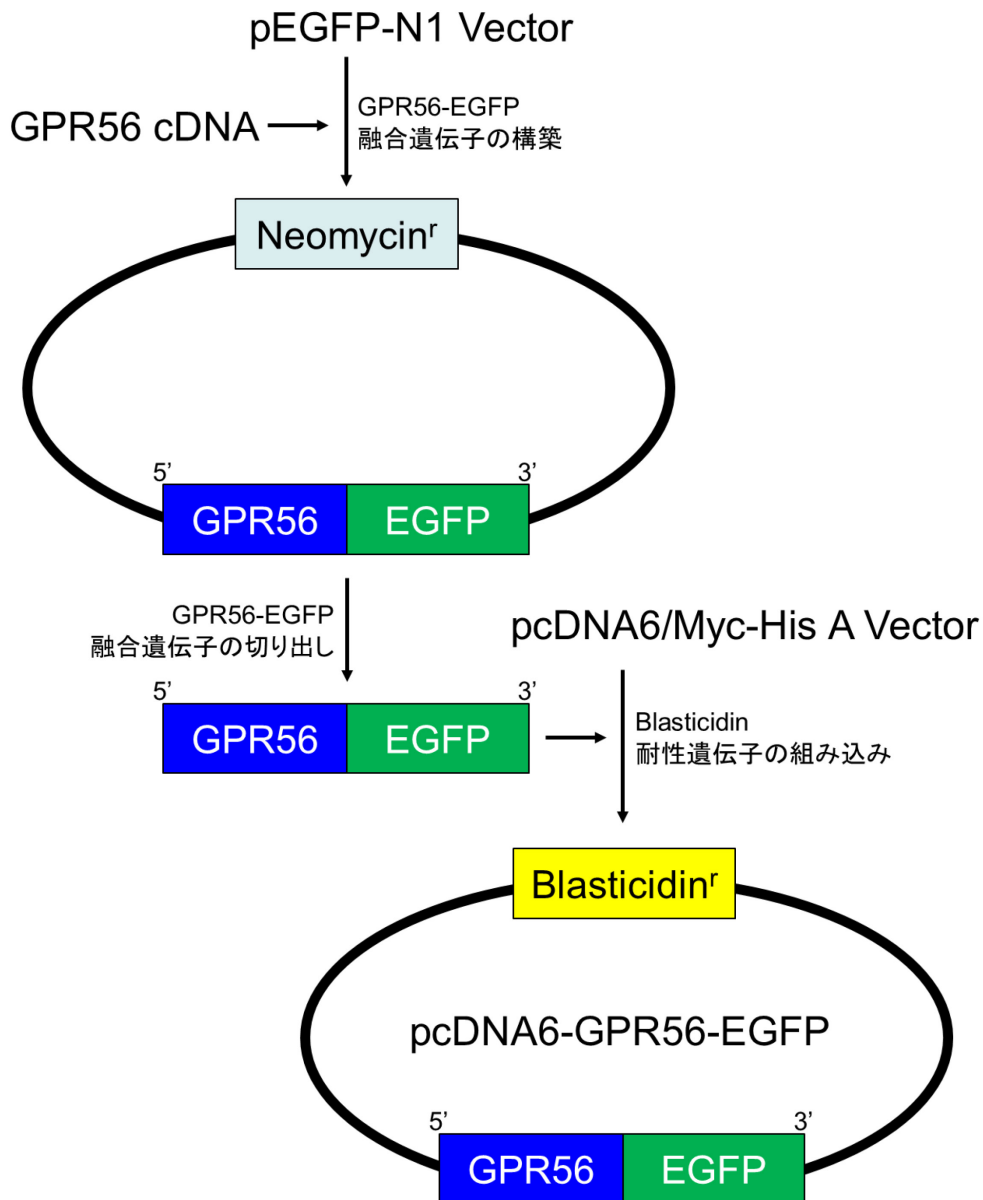


図 2. GPR56-EGFP 融合蛋白質の発現ベクターの構築

GPR56 cDNA を pEGFP-N1 ベクターに組み込むことにより、GPR56-EGFP 融合遺伝子（GPR56 cDNA の 3' 末端側に EGFP cDNA を融合）を構築し、そこから切り出した GPR56-EGFP 融合遺伝子を Blasticidin 耐性遺伝子を含む pcDNA6/Myc-His A ベクターに組み込むことにより、GPR56-EGFP 融合蛋白質の発現ベクター pcDNA6-GPR56-EGFP を構築した。なお、pcDNA6/Myc-His A ベクターに含まれていた Myc と His のタグは、それに先行する EGFP cDNA のストップコドンによって発現しない。

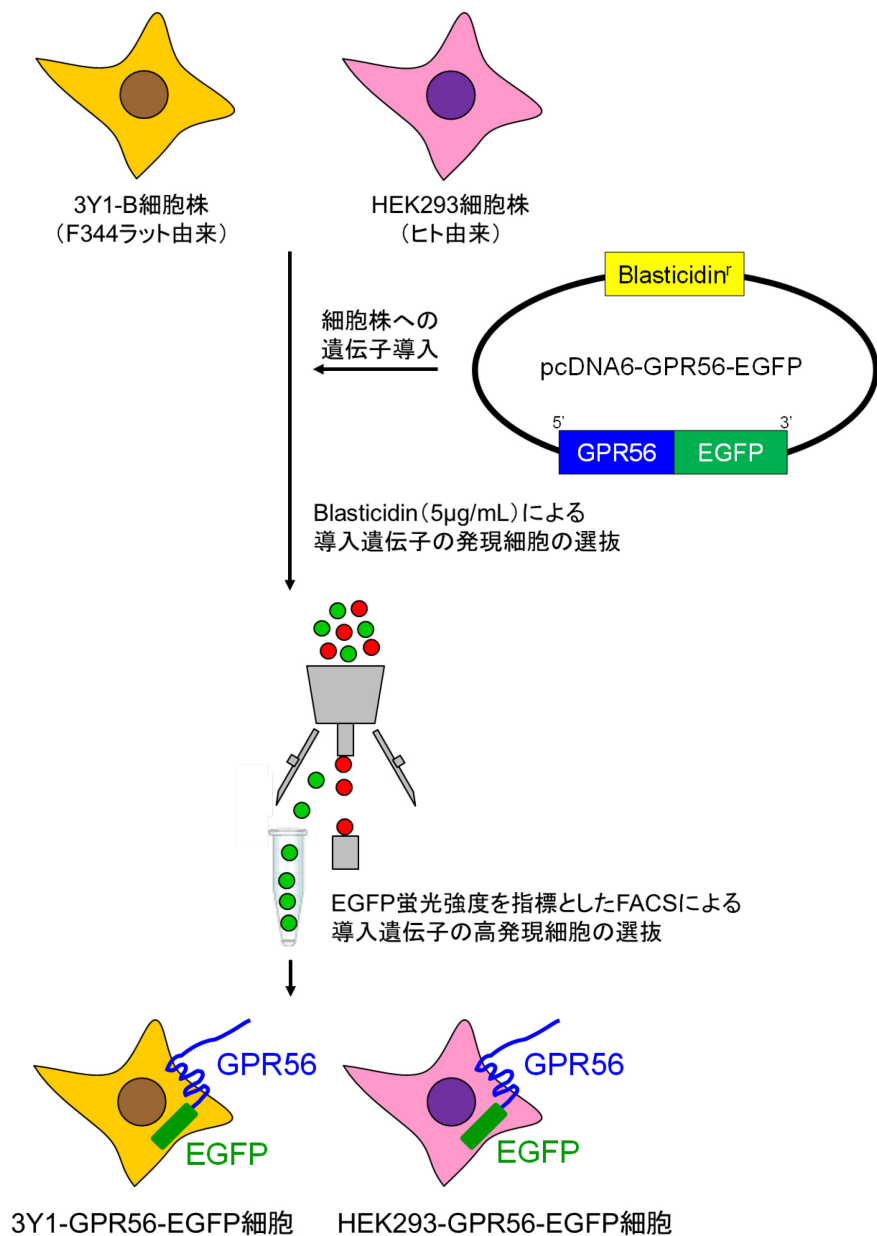


図 3. GPR56 蛋白質安定発現細胞株の確立

3Y1-B 細胞株と HEK293 細胞株それぞれに、pcDNA6-GPR56-EGFP を導入した。Blasticidin (5 μg/mL) を添加して培養することにより、導入遺伝子の発現細胞を選抜しつつ、EGFP の蛍光強度を指標として導入遺伝子の高発現細胞を FACS で選抜した。得られた GPR56 蛋白質安定発現細胞株を、それぞれ 3Y1-GPR56-EGFP 細胞、HEK293-GPR56-EGFP 細胞とした。なお、EGFP は GPR56 蛋白質の細胞内 C 末端に融合していることから、細胞内でのみ発現する。

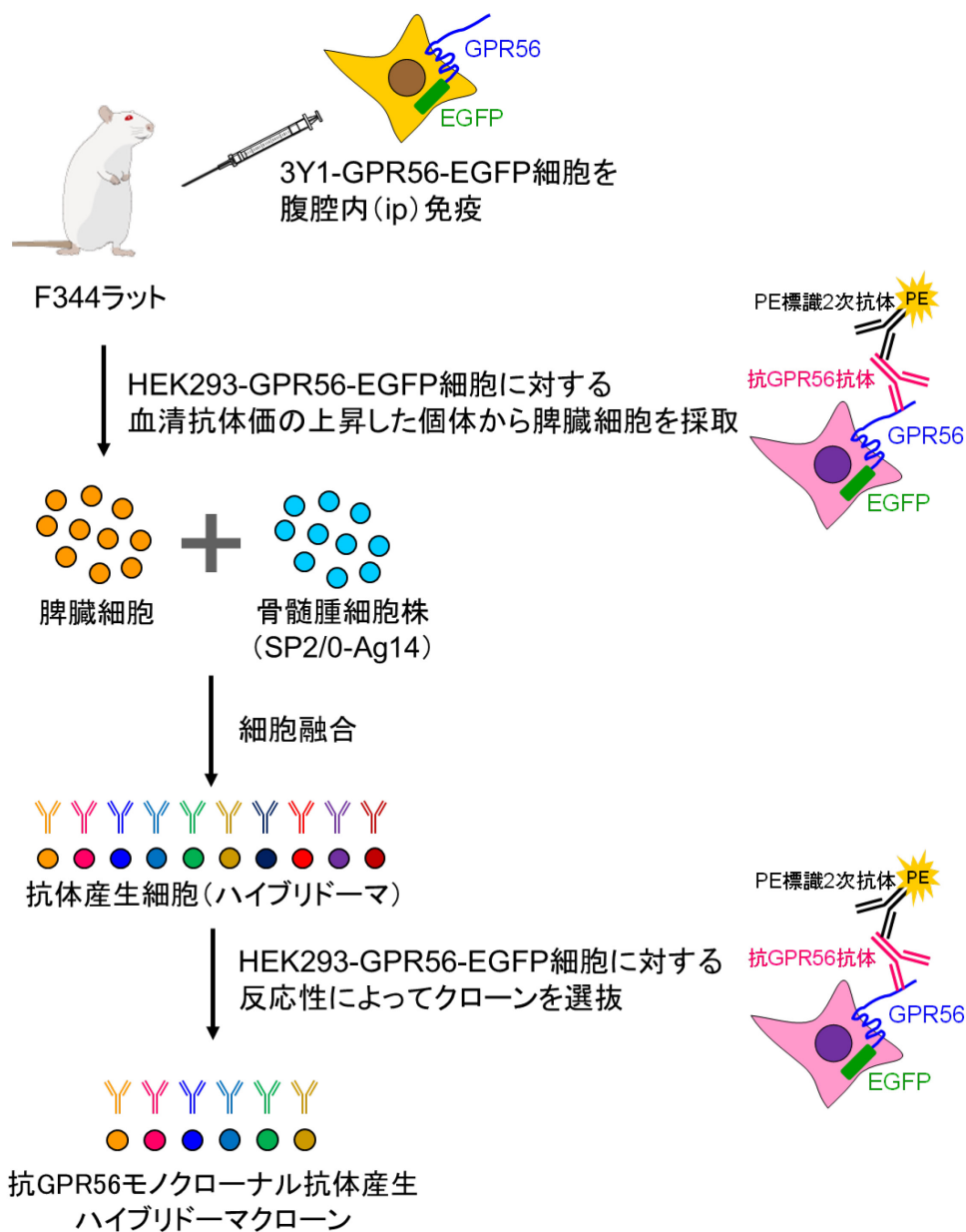


図 4. GPR56 蛋白質に対するモノクローナル抗体の確立

3Y1-GPR56-EGFP 細胞を F344 ラットの腹腔内に免疫し、その後、HEK293-GPR56-EGFP 細胞と PE 標識 2 次抗体を用いたフローサイトメトリー解析において血清抗体価の上昇が見られた個体から脾臓細胞を採取し、SP2/0-Ag14 細胞と融合させた。そこから得られたハイブリドーマの培養上清の GPR56 蛋白質に対する反応性を、HEK293-GPR56-EGFP 細胞と PE 標識 2 次抗体を用いたフローサイトメトリー解析において検出することにより、ハイブリドーマのクローンを選抜した。

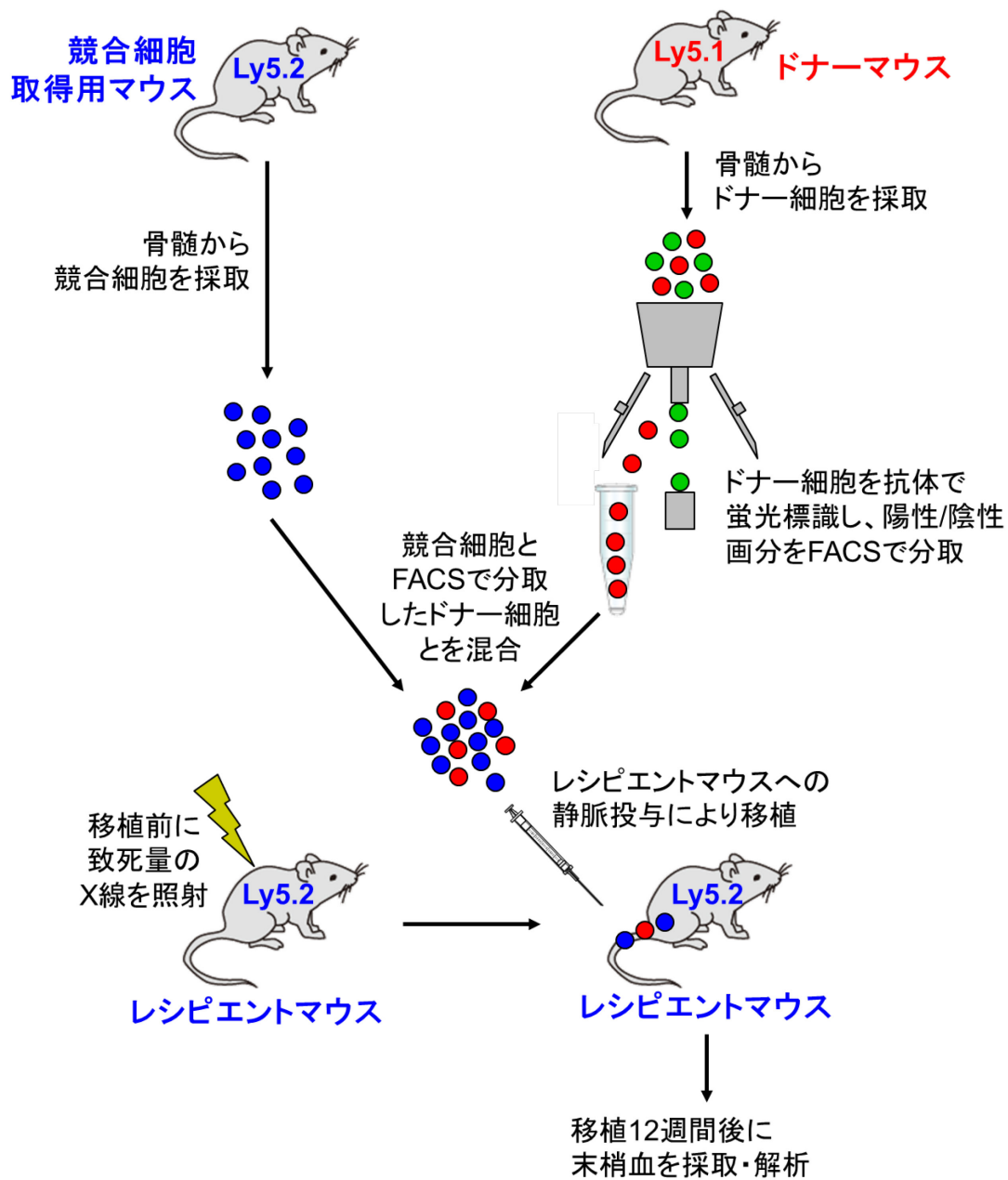


図 5. 競合的長期骨髄再構築アッセイ（その 1：レシピエントマウスへの移植）

レシピエントマウスとして Ly5.2 マウスに致死量の X 線を移植前に照射しておく。さらに、別の Ly5.2 マウスの骨髄から競合細胞を調製しておく。そして、Ly5.1 マウス（ドナーマウス）から骨髄単核細胞（ドナー細胞）を採取し、FACS で分取した後、予め調製しておいた競合細胞と混合した上で、静脈投与によりレシピエントマウスに移植する（移植 12 週間後に末梢血を採取・解析）。

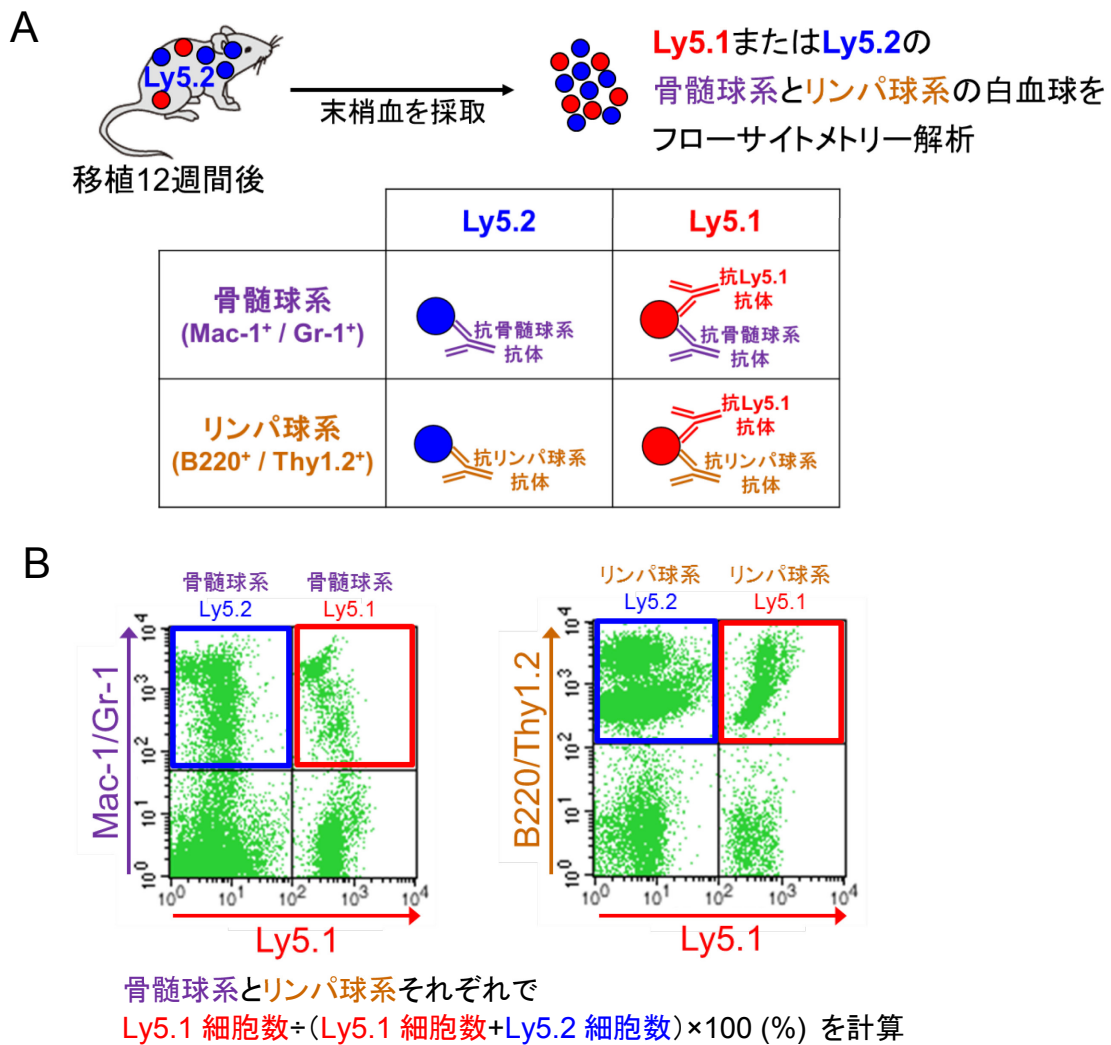


図 6. 競合的長期骨髄再構築アッセイ (その 2: レシピエントマウスの解析)

- (A) 移植 12 週間後のレシピエントマウスから採取した末梢血白血球のフローサイトメトリー解析において、Ly5.1 骨髄球系白血球には抗 Ly5.1 抗体と抗骨髄球系抗体 (抗 Mac-1 抗体または抗 Gr-1 抗体) が、Ly5.1 リンパ球系白血球には抗 Ly5.1 抗体と抗リンパ球系抗体 (抗 B220 抗体または抗 Thy1.2 抗体) が結合する。その一方で、Ly5.2 骨髄球系白血球には抗骨髄球系抗体のみが、Ly5.2 リンパ球系白血球には抗リンパ球系抗体のみが結合する。
- (B) フローサイトメトリー解析によって、Ly5.2 骨髄球系白血球数、Ly5.1 骨髄球系白血球数、Ly5.2 リンパ球系白血球数、Ly5.1 リンパ球系白血球数をそれぞれ測定し、骨髄球系とリンパ球系それぞれで、 $\text{Ly5.1} \div (\text{Ly5.1} + \text{Ly5.2}) \times 100 (\%)$ を計算する。骨髄球系とリンパ球系の両方で 1% より多い場合、当該レシピエントマウスに移植されたドナー細胞に長期造血幹細胞が含まれていたと判断する。

結果

【新規抗マウス GPR56 モノクローナル抗体 57R2A の確立】

マウス造血幹細胞における GPR56 蛋白質の発現を確認するため、以下の通り、フローサイトメトリー解析に適用可能な抗マウス GPR56 モノクローナル抗体を確立した。

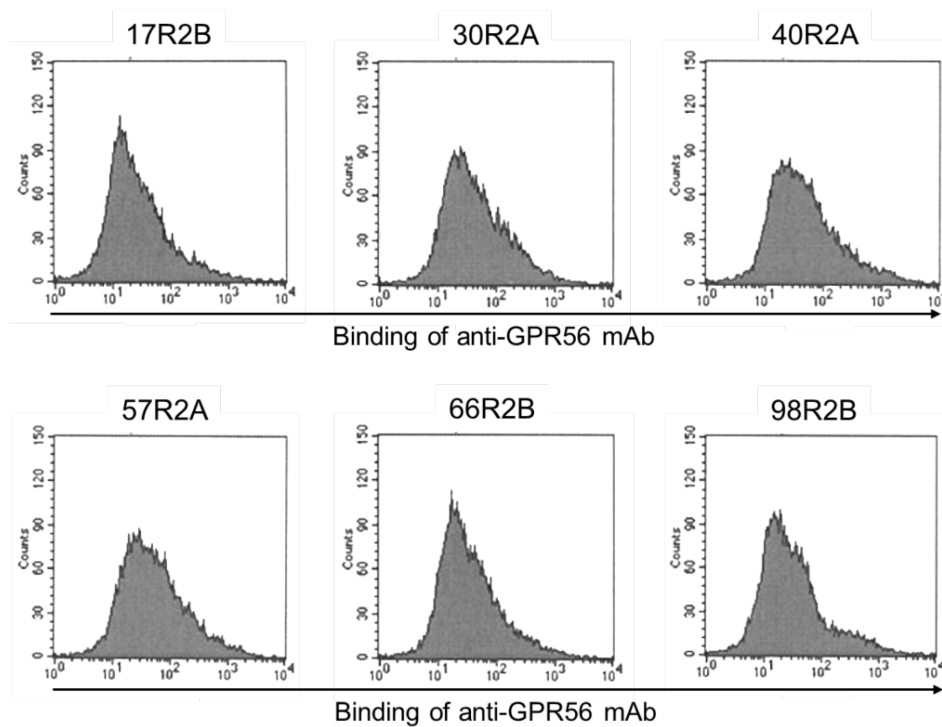
まず、3Y1-GPR56-EGFP 細胞をラットに免疫し、マウス GPR56 蛋白質に対して高い抗体価を示した個体から脾臓細胞を採取し、ハイブリドーマを作製した。そして、HEK293-GPR56-EGFP 細胞を用いたフローサイトメトリー解析により、抗マウス GPR56 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選抜し、合計 6 クローンのハイブリドーマを確立した。確立した各ハイブリドーマから精製したモノクローナル抗体の HEK293-GPR56-EGFP 細胞に対する結合性をフローサイトメトリー解析における蛍光強度により評価した。結合性の差異が最も検出されやすい濃度 (0.2 μ g/mL) で各モノクローナル抗体を HEK293-GPR56-EGFP 細胞に添加した場合で比較した結果、最も高い結合性を示した 57R2A (ラット IgG2a) を抗マウス GPR56 モノクローナル抗体の代表クローンとして選定した (図 7)。以降の実験には、Alexa Fluor[®] 647 で標識した 57R2A を使用した。

引き続き、マウス GPR56 蛋白質に対する 57R2A の結合特異性を調べるため、HEK293-GPR56-EGFP 細胞と 57R2A を用いてフローサイトメトリー解析を実施した結果、図 8A に示すように、マウス GPR56-EGFP 融合蛋白質 (細胞表面にはマウス GPR56 蛋白質のみが発現するように発現ベクターを設計) の発現強度に応じて、57R2A が HEK293-GPR56-EGFP 細胞に結合した。その一方、HEK293-GPR56-EGFP 細胞とアイソタイプコントロール抗体 (Alexa Fluor[®] 647 標識ラット IgG2a) を用いてフローサイトメトリー解析を実施した結果、図 8B に示すように、マウス GPR56-EGFP 融合蛋白

質の発現強度に関わらず、アイソタイプコントロール抗体は HEK293-GPR56-EGFP 細胞に結合しなかった。さらに、HEK293-hGPR56-EGFP 細胞と 57R2A を用いてフローサイトメトリー解析を実施した結果、図 8C に示すように、ヒト GPR56-EGFP 融合蛋白質（細胞表面にはヒト GPR56 蛋白質のみが発現するように発現ベクターを設計）の発現強度に関わらず、57R2A は HEK293-hGPR56-EGFP 細胞には結合しなかった。

以上の結果から、57R2A は宿主細胞（HEK293）に対する非特異的な結合性やヒト GPR56 蛋白質に対する交差結合性は有しない一方で、マウス GPR56 蛋白質に対して、その発現強度に応じた特異的な結合性を有することが明らかになった。

A



B

Clone	Isotype	Affinity (MFI)
17R2B	IgG2b, κ	24.5
30R2A	IgG2a, κ	40.0
40R2A	IgG2a, κ	42.1
57R2A	IgG2a, κ	47.3
66R2B	IgG2b, λ	32.1
98R2B	IgG2b, κ	28.5

図7. 抗マウス GPR56 モノクローナル抗体の代表クローンの選定

- (A) 確立した合計 6 クローンのハイブリドーマから精製したモノクローナル抗体について、HEK293-GPR56-EGFP 細胞に対する結合性の差異が最も検出されやすい濃度 (0.2μg/mL) でフローサイトメトリー解析を実施した。
- (B) 各モノクローナル抗体のアイソタイプを示すとともに、HEK293-GPR56-EGFP 細胞への結合性をフローサイトメトリー解析により算出した平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity : MFI) で示した。

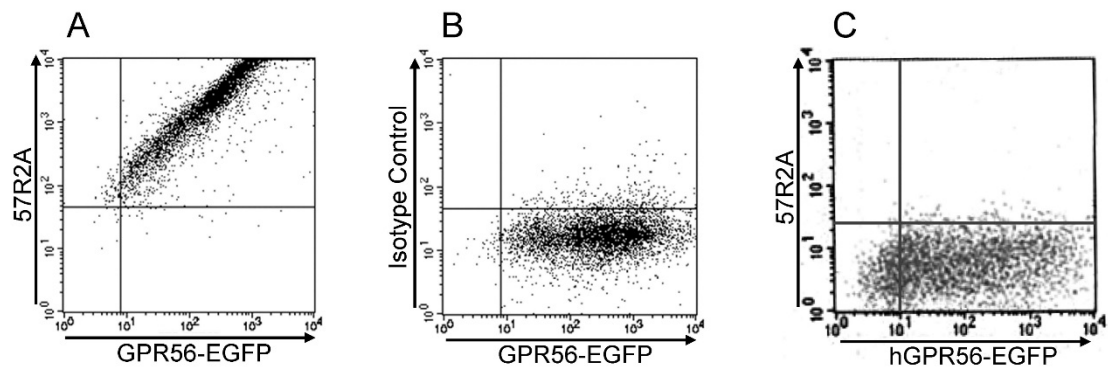


図 8. マウス GPR56-EGFP 融合蛋白質またはヒト GPR56-EGFP 融合蛋白質を発現した HEK293 細胞のフローサイトメトリー解析

- (A) Alexa Fluor[®] 647 で標識した 57R2A を用いた HEK293-GPR56-EGFP 細胞のフローサイトメトリー解析。
- (B) Alexa Fluor[®] 647 で標識したラット IgG2a (アイソタイプコントロール抗体) を用いた HEK293-GPR56-EGFP 細胞のフローサイトメトリー解析。
- (C) Alexa Fluor[®] 647 で標識した 57R2A を用いた HEK293-hGPR56-EGFP 細胞のフローサイトメトリー解析。

【マウス造血幹/前駆細胞画分における GPR56 蛋白質のフローサイトメトリー解析】

マウス骨髄単核細胞中の造血幹/前駆細胞表面における GPR56 蛋白質の発現を確認するため、抗分化抗原 (Lin) 抗体、抗 c-Kit 抗体、抗 Sca-1 抗体、抗 CD34 抗体、抗 GPR56 抗体 (57R2A) をマウス骨髄単核細胞に添加して、フローサイトメトリー解析を実施した。

まず、分化抗原陰性 (Lin⁻) 画分を c-Kit と Sca-1 からなる 2 次元で展開し、その結果生じた 3 つの画分を、図 9A に示すように、Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁻ 画分 (I)、Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ 画分 (II)、Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ (KSL) 画分 (III) と命名した。さらに KSL 画分 (III) について、CD34 の発現に基づき、CD34⁺ KSL 画分 (IV) と CD34⁻ KSL 画分 (V) に 2 分割した (図 9B)。そして、I~V の各画分におけるマウス GPR56 蛋白質の発現量を、Alexa Fluor[®] 647 で標識した 57R2A の結合量を反映する平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity : MFI) によって示した (図 9C)。

その結果、分化抗原陰性 (Lin⁻) の 3 種類の画分 (I、II、III) のうち、長期造血幹細胞を含む KSL 画分 (III) においてマウス GPR56 蛋白質の発現量が最も高くなること、KSL 画分 (III) を 2 分割して生じた画分 (IV、V) のうち、長期造血幹細胞を含む CD34⁻ KSL 画分 (V) [9]においてマウス GPR56 蛋白質の発現量が高くなることが明らかになった (図 9C)。

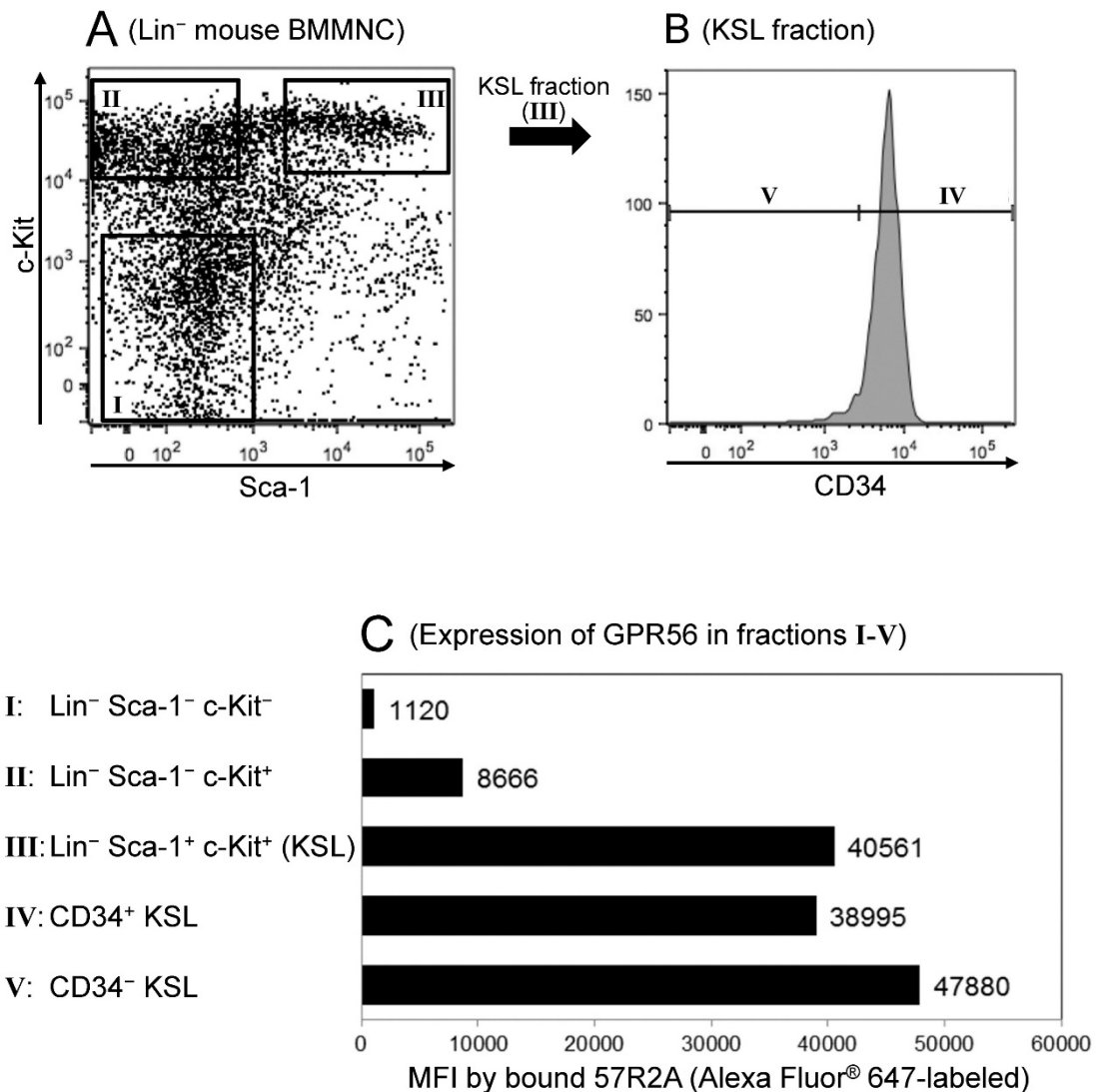


図9. 57R2Aを用いたマウス造血幹/前駆細胞画分におけるGPR56蛋白質の発現解析

- (A) マウス骨髄単核細胞の分化抗原陰性 (Lin⁻) 画分における、c-Kit と Sca-1 の発現を解析し、Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁻ 画分 (I)、Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ 画分 (II)、Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ (KSL) 画分 (III) を設定した。
- (B) KSL 画分 (III) を CD34 の発現によってさらに解析し、CD34⁺ KSL 画分 (IV) と CD34⁻ KSL 画分 (V) に2分割した。
- (C) I~V の各画分における GPR56 蛋白質の発現量を、Alexa Fluor[®] 647 で標識した 57R2A の結合量を反映する平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity : MFI) によって示した。

【GPR56 蛋白質を発現したマウス骨髄単核細胞を用いた競合的長期骨髄再構築アッセイ】

GPR56 蛋白質を発現したマウス骨髄単核細胞の長期骨髄再構築能を解析するため、図 10A に示すように、Alexa Fluor[®] 647 で標識した 57R2A の結合強度によって示される GPR56 蛋白質の発現強度のみに基づいて、マウス骨髄単核細胞を GPR56⁻、GPR56^{Low}、GPR56^{High} の 3 画分に分画した。なお、図 10A のヒストグラムにおける GPR56^{High} と GPR56^{Low} の境界について、分化抗原 (Lin)、Sca-1、c-Kit を指標とするフローサイトメトリー解析も併用することにより (図 10B)、GPR56^{High} 画分に Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ (KSL) 画分のほとんどが含まれるように設定した。そのようにして設定した GPR56⁻、GPR56^{Low}、GPR56^{High} の 3 画分のマウス骨髄単核細胞中の存在割合は、それぞれ 85%、12%、1.5%となった。そして、GPR56 蛋白質の発現強度のみに基づいて、長期骨髄再構築能を有するマウス骨髄単核細胞を濃縮できるか否かを確認するために、上記の 3 画分 (GPR56⁻、GPR56^{Low}、GPR56^{High}) と未分画のマウス骨髄単核細胞 (存在割合 100%、陽性対照) の合計 4 画分をドナー細胞として分取した上で、それぞれの画分のマウス骨髄単核細胞中の存在割合に基づいた細胞数を各レシピエントマウスに移植する、競合的長期骨髄再構築アッセイを実施した (図 10A)。

その結果は図 11A~C に示すように、GPR56^{High} 画分 (1 匹あたり 1,500 細胞) がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスにおける、移植 12 週間後の骨髄球系 (Mac-1⁺または Gr-1⁺) とリンパ球系 (B220⁺または Thy1.2⁺) の両方の細胞において、5 匹中 5 匹でドナー由来細胞の割合が 1%より大きくなっていったことから、5 匹中 5 匹において、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたと判定した。この結果は、未分画のマウス骨髄単核細胞 (1 匹あたり 100,000 細胞) がドナー細胞として移植された場合 (陽性対照) と同様であった。その一方、GPR56^{Low} 画分 (1 匹あたり 12,000 細胞) がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスの 5 匹中 1 匹のみに

において、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたと判定され（ドナー由来細胞の割合が1%より大きくなった個体は、骨髄球系について5匹中1匹、リンパ球系について5匹中5匹）、さらに、GPR56⁻画分（1匹あたり85,000細胞）がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスのすべてにおいて、移植されたドナー細胞は長期骨髄再構築能を有していなかったと判定された（ドナー由来細胞の割合が1%より大きくなった個体は、骨髄球系について4匹中0匹、リンパ球系について4匹中0匹）。なお、再現性の確認のため、本実験をもう1回繰り返しても、上と同様の結果が得られた（図12、図13）。

以上の結果から、マウス骨髄単核細胞において、GPR56^{High}画分とGPR56^{Low}画分を合わせたGPR56陽性（GPR56⁺）画分（存在割合≤15%）に含まれる細胞のみが長期骨髄再構築能を有すること、すなわち、GPR56⁺画分のみに12週間以上の長期にわたって造血を維持する長期造血幹細胞が含まれていることが明らかになったことから、長期造血幹細胞はその表面上に57R2Aによって認識されるGPR56蛋白質を発現していることが示された。

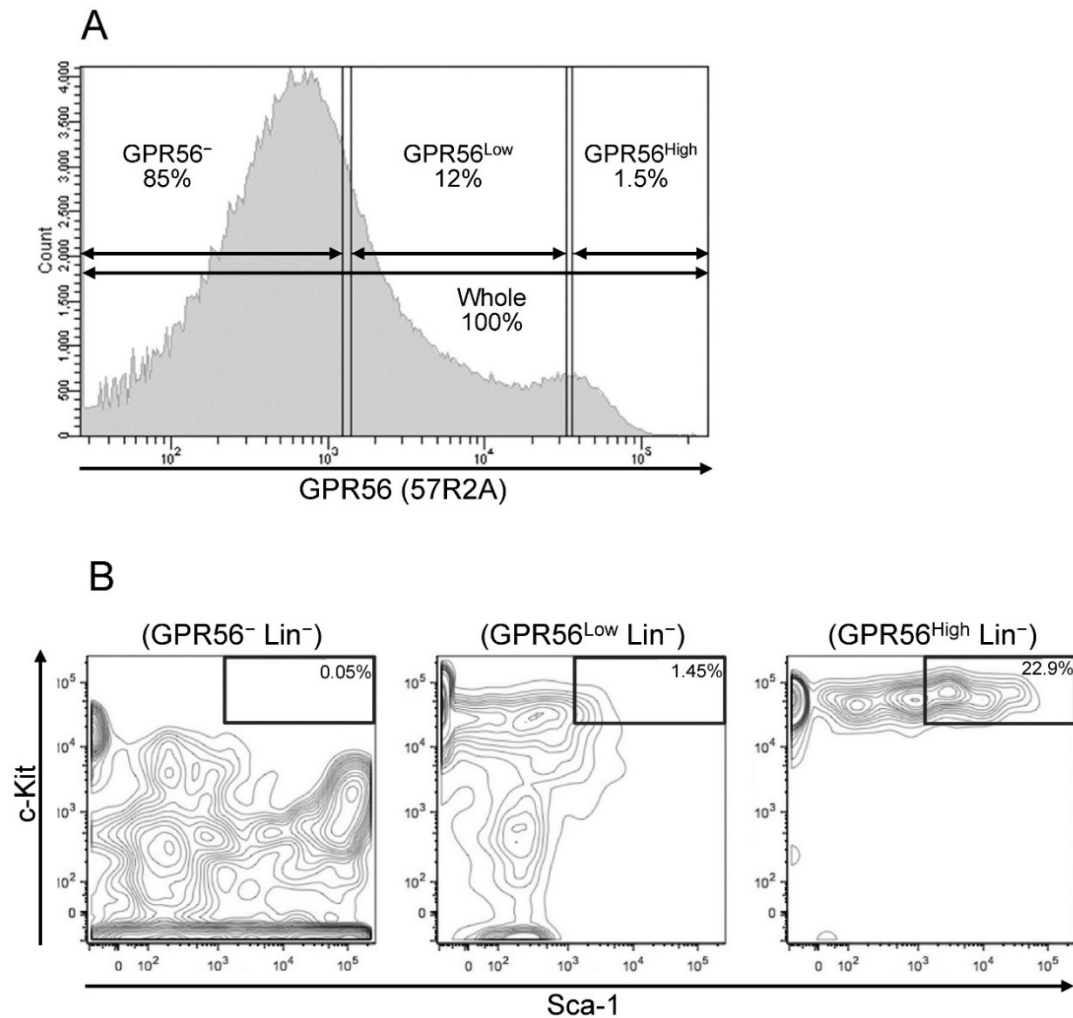


図 10. GPR56 蛋白質の発現によって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ (その 1)

- (A) 57R2A を用いてマウス骨髄単核細胞を $GPR56^-$ (85%)、 $GPR56^{Low}$ (12%)、 $GPR56^{High}$ (1.5%) の 3 画分に分画した (カッコ内は骨髄単核細胞中の存在割合)。 $GPR56^-$ 、 $GPR56^{Low}$ 、 $GPR56^{High}$ の 3 画分と、未分画の骨髄単核細胞 (100%、陽性対照) をドナー細胞として分取し、それらの存在割合に基づいて、致死量放射線を照射したレシピエントマウスに、それぞれ 85,000 細胞/匹、12,000 細胞/匹、1,500 細胞/匹、100,000 細胞/匹ずつ、静脈投与により移植した。
- (B) マウス骨髄単核細胞中の $GPR56^- Lin^-$ 画分、 $GPR56^{Low} Lin^-$ 画分、 $GPR56^{High} Lin^-$ 画分それぞれの中に存在する $Lin^- Sca-1^+ c-Kit^+$ (KSL) 画分の割合をフローサイトメトリー解析 (等高線表示) の図中に表示した。

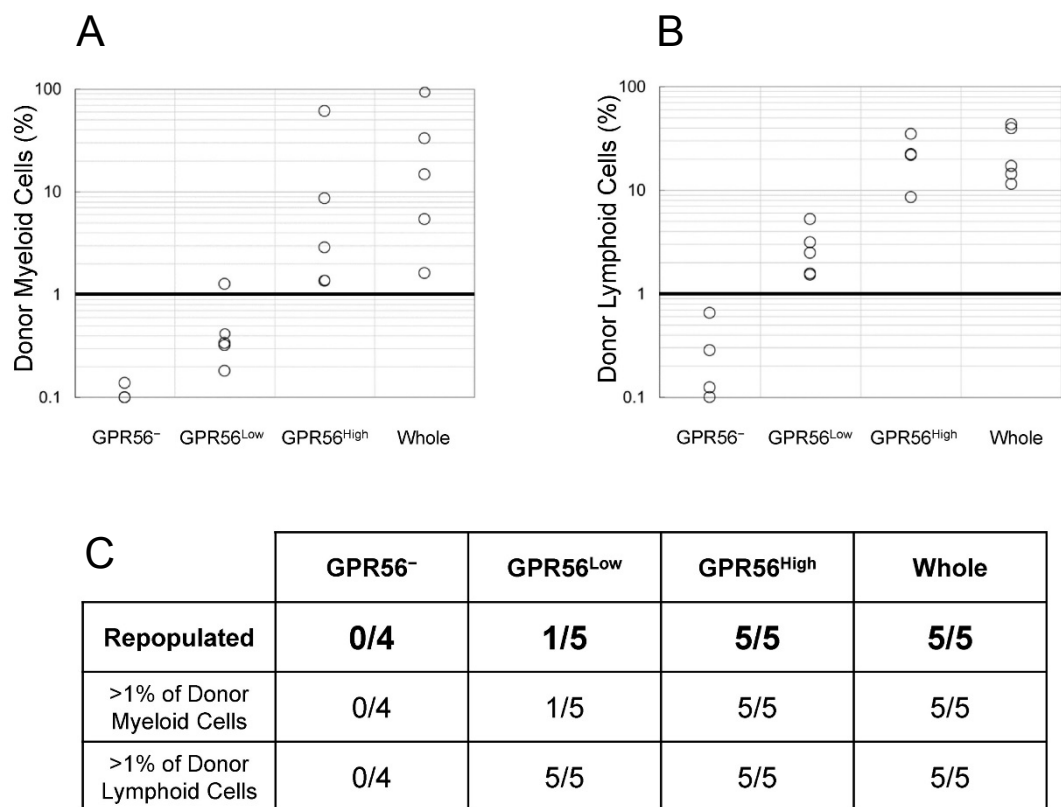


図 11. GPR56 蛋白質の発現によって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ (その 2)

- (A, B) フローサイトメトリー解析により、移植 12 週間後のレシピエントマウス末梢血の骨髄球系 ($\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (A) とリンパ球系 ($\text{B220}^+/\text{Thy1.2}^+$) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (B) を測定した。丸印は各レシピエントマウス末梢血の骨髄球系またはリンパ球系の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合を示すが、0.1%を最小値とする対数目盛による表示のため、0.1%を下回る場合でも 0.1%の位置に表示した。
- (C) ドナー細胞として各細胞画分を移植されたレシピエントマウスの末梢血の、骨髄球系 ($\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$) とリンパ球系 ($\text{B220}^+/\text{Thy1.2}^+$) の細胞それぞれにおいてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、さらに、骨髄球系とリンパ球系の両方の細胞においてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、すなわち、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたレシピエントマウス (Repopulated) の匹数を、解析したレシピエントマウスの総匹数を分母とする分数で表示した。

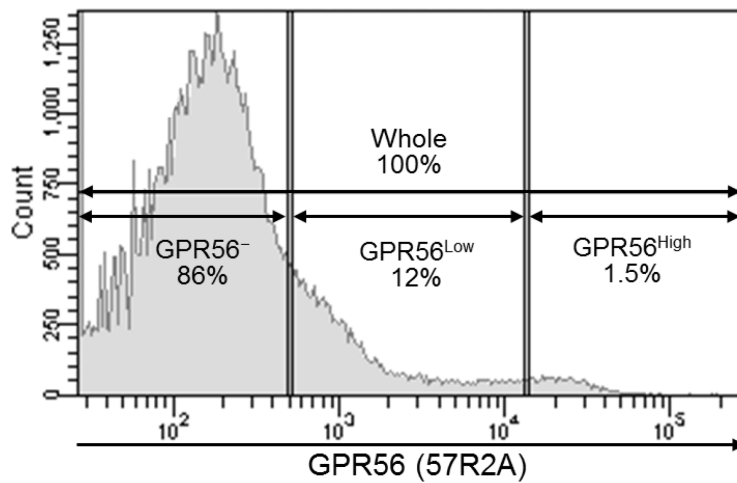


図 12. GPR56 蛋白質の発現によって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ（再現性の確認：その 1）

57R2A を用いてマウス骨髄単核細胞を GPR56⁻ (86%)、GPR56^{Low} (12%)、GPR56^{High} (1.5%) の 3 画分に分画した（カッコ内は骨髄単核細胞中の存在割合）。GPR56⁻、GPR56^{Low}、GPR56^{High} の 3 画分と、未分画の骨髄単核細胞（100%、陽性対照）をドナー細胞として分取し、それらの存在割合に基づいて、致死量放射線を照射したレシピエントマウスに、それぞれ 85,510 細胞/匹、12,320 細胞/匹、1,500 細胞/匹、100,000 細胞/匹ずつ、静脈投与により移植した。

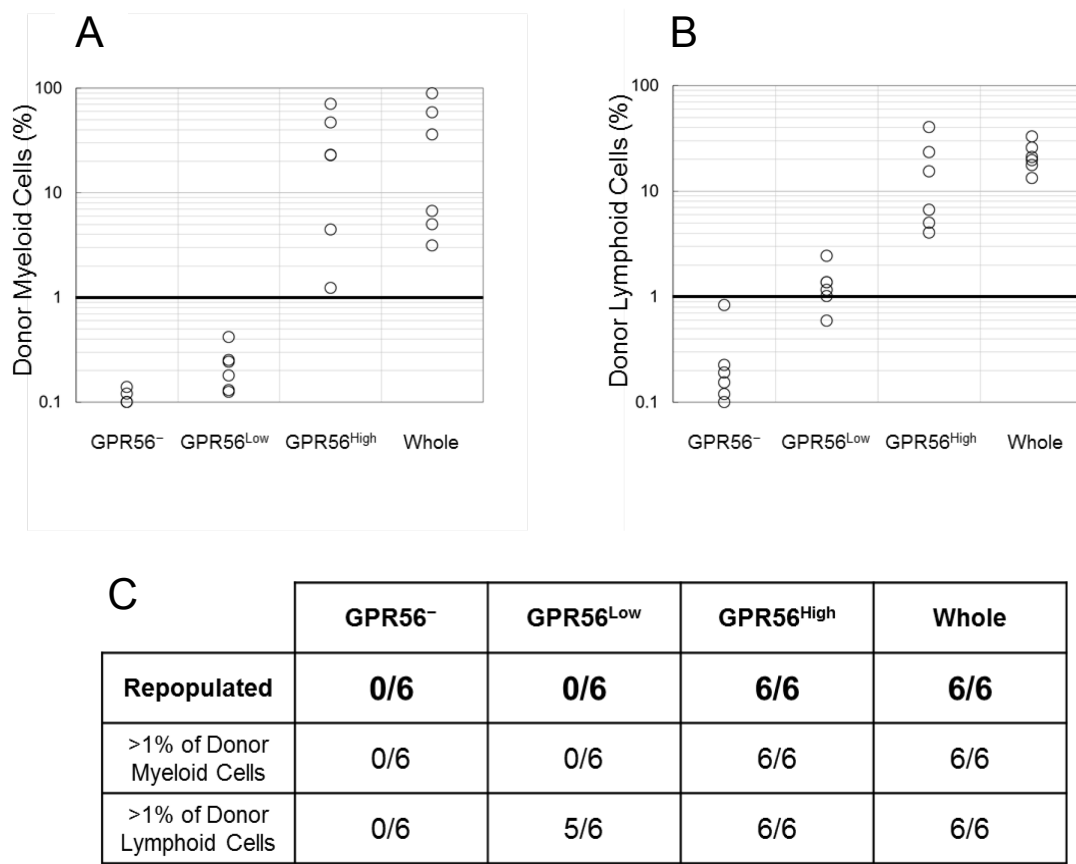


図 13. GPR56 蛋白質の発現によって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ（再現性の確認：その 2）

- (A, B) フローサイトメトリー解析により、移植 12 週間後のレシピエントマウス末梢血の骨髄球系 ($\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (A) とリンパ球系 ($\text{B220}^+/\text{Thy1.2}^+$) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (B) を測定した。丸印は各レシピエントマウス末梢血の骨髄球系またはリンパ球系の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合を示すが、0.1%を最小値とする対数目盛による表示のため、0.1%を下回る場合でも 0.1%の位置に表示した。
- (C) ドナー細胞として各細胞画分を移植されたレシピエントマウスの末梢血の、骨髄球系 ($\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$) とリンパ球系 ($\text{B220}^+/\text{Thy1.2}^+$) の細胞それぞれにおいてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、さらに、骨髄球系とリンパ球系の両方の細胞においてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、すなわち、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたレシピエントマウス (Repopulated) の匹数を、解析したレシピエントマウスの総匹数を分母とする分数で表示した。

【GPR56 蛋白質に加えて、MPL 蛋白質も陽性マーカーとして用いた場合の長期造血幹細胞の濃縮】

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が示されたことから、長期造血幹細胞の陽性マーカーとしての GPR56 蛋白質の性状をさらに解析するため、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 (Thrombopoietin 受容体) [6]も GPR56 蛋白質と共に陽性マーカーとして用いて、マウス骨髄単核細胞の分画を試みた。まず、マウス骨髄単核細胞を 57R2A と AMM2 (抗 MPL モノクローナル抗体) [6]で染色し、フローサイトメトリー解析を実施した。その結果、図 14A に示すように、マウス骨髄単核細胞中の存在割合は 0.8%ではあるが、GPR56/MPL 共陽性画分 (GPR56⁺ MPL⁺ 画分) が、いずれかの単陽性画分 (GPR56⁺ MPL⁻ 画分、GPR56⁻ MPL^{Low} 画分) から明確に分離されて存在することが明らかになった。そこで、GPR56⁺ MPL⁺ 画分に長期造血幹細胞が濃縮されているか否かを確認するため、GPR56⁺ MPL⁺ 画分 (存在割合 0.8%) と GPR56⁺ MPL⁺ 以外の画分 (存在割合 99.2%)、未分画のマウス骨髄単核細胞 (存在割合 100%、陽性対照) の合計 3 画分をドナー細胞として分取した上で、それぞれの画分のマウス骨髄単核細胞中の存在割合に基づいた細胞数を各レシピエントマウスに移植する、競合的長期骨髄再構築アッセイを実施した (図 14A、B)。

その結果は図 15A~C に示すように、GPR56⁺ MPL⁺ 画分 (1 匹あたり 807 細胞) がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスにおける、移植 12 週間後の骨髄球系 (Mac-1⁺または Gr-1⁺) とリンパ球系 (B220⁺または Thy1.2⁺) の両方の細胞において、5 匹中 5 匹でドナー由来細胞の割合が 1%より大きくなっていたことから、5 匹中 5 匹において移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたと判定した。この結果は、未分画のマウス骨髄単核細胞 (1 匹あたり 100,000 細胞) がドナー細胞として移植された場合 (陽性対照) と同様であった。驚くべきことに、GPR56⁺ MPL⁺ 以外の画

分（1匹あたり 99,194 細胞）がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスのすべてにおいて、移植されたドナー細胞は長期骨髄再構築能を有していなかったと判定された（ドナー由来細胞の割合が 1%より大きくなった個体は、骨髄球系について 5 匹中 0 匹、リンパ球系について 5 匹中 4 匹）。なお、再現性の確認のため、本実験をもう 1 回繰り返しても、上と同様の結果が得られた（図 16、図 17）。

以上の結果から、マウス骨髄単核細胞において、 $GPR56^+ MPL^+$ 画分（存在割合 0.8%）に含まれる細胞のみが長期骨髄再構築能を有すること、すなわち、 $GPR56^+ MPL^+$ 画分のみに 12 週間以上の長期にわたって造血を維持する長期造血幹細胞が含まれていることが明らかになったことから、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。

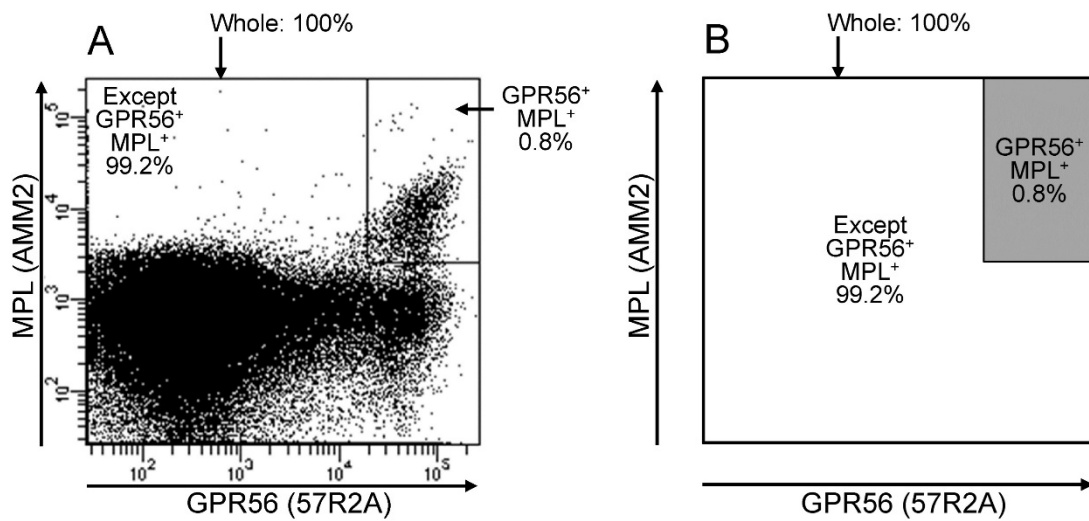


図 14. GPR56 蛋白質と MPL 蛋白質の発現のみによって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ (その 1)

- (A) 57R2A と AMM2 のみを用いて、マウス骨髄単核細胞を GPR56⁺ MPL⁺ 画分 (0.8%) とそれ以外の画分 (99.2%) に分画した (カッコ内は骨髄単核細胞中の存在割合)。GPR56⁺ MPL⁺ 画分、それ以外の画分、未分画の骨髄単核細胞 (100%、陽性対照) を分取し、それらの存在割合に基づいて、致死量放射線を照射したマウスに、それぞれ 807 細胞/匹、99,194 細胞/匹、100,000 細胞/匹ずつ、静脈投与により移植した。
- (B) 分取し移植した画分をそのマウス骨髄単核細胞中の存在割合とともに模式図で示した。

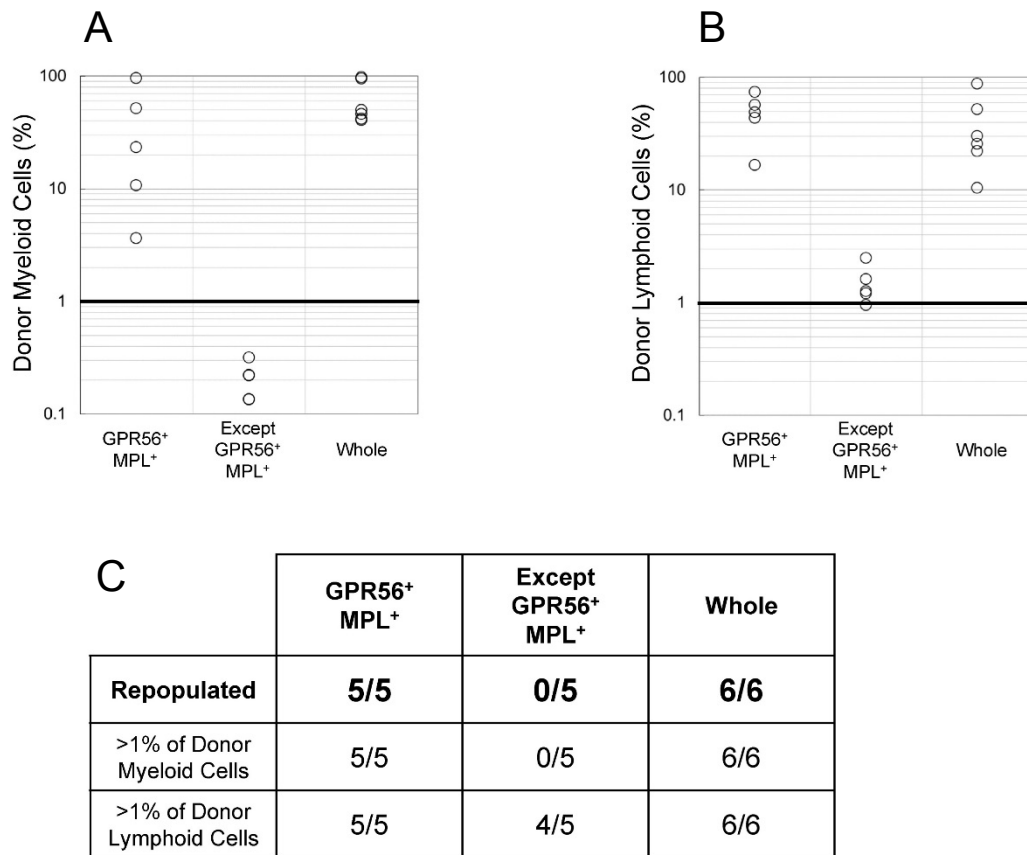


図 15. GPR56 蛋白質と MPL 蛋白質の発現のみによって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ (その 2)

- (A, B) フローサイトメトリー解析により、移植 12 週間後のレシピエントマウス末梢血の骨髄球系 (Mac-1⁺/Gr-1⁺) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (A) とリンパ球系 (B220⁺/Thy1.2⁺) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (B) を測定した。丸印は各レシピエントマウス末梢血の骨髄球系またはリンパ球系の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合を示す。
- (C) ドナー細胞として各細胞画分を移植されたレシピエントマウスの末梢血の、骨髄球系 (Mac-1⁺/Gr-1⁺) とリンパ球系 (B220⁺/Thy1.2⁺) の細胞それぞれにおいてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、さらに、骨髄球系とリンパ球系の両方の細胞においてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、すなわち、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたレシピエントマウス (Repopulated) の匹数を、解析したレシピエントマウスの総匹数を分母とする分数で表示した。

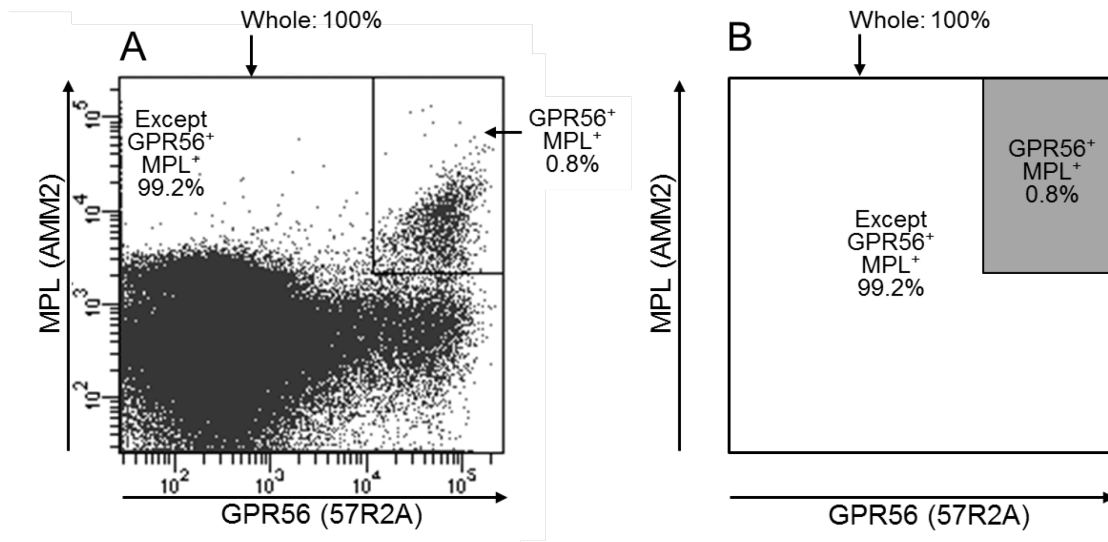


図 16. GPR56 蛋白質と MPL 蛋白質の発現のみによって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ（再現性の確認：その 1）

- (A) 57R2A と AMM2 のみを用いて、マウス骨髄単核細胞を GPR56⁺ MPL⁺ 画分 (0.8%) とそれ以外の画分 (99.2%) に分画した (カッコ内は骨髄単核細胞中の存在割合)。GPR56⁺ MPL⁺ 画分、それ以外の画分、未分画の骨髄単核細胞 (100%、陽性対照) を分取し、それらの存在割合に基づいて、致死量放射線を照射したマウスに、それぞれ 804 細胞/匹、99,197 細胞/匹、100,000 細胞/匹ずつ、静脈投与により移植した。
- (B) 分取し移植した画分をそのマウス骨髄単核細胞中の存在割合とともに模式図で示した。

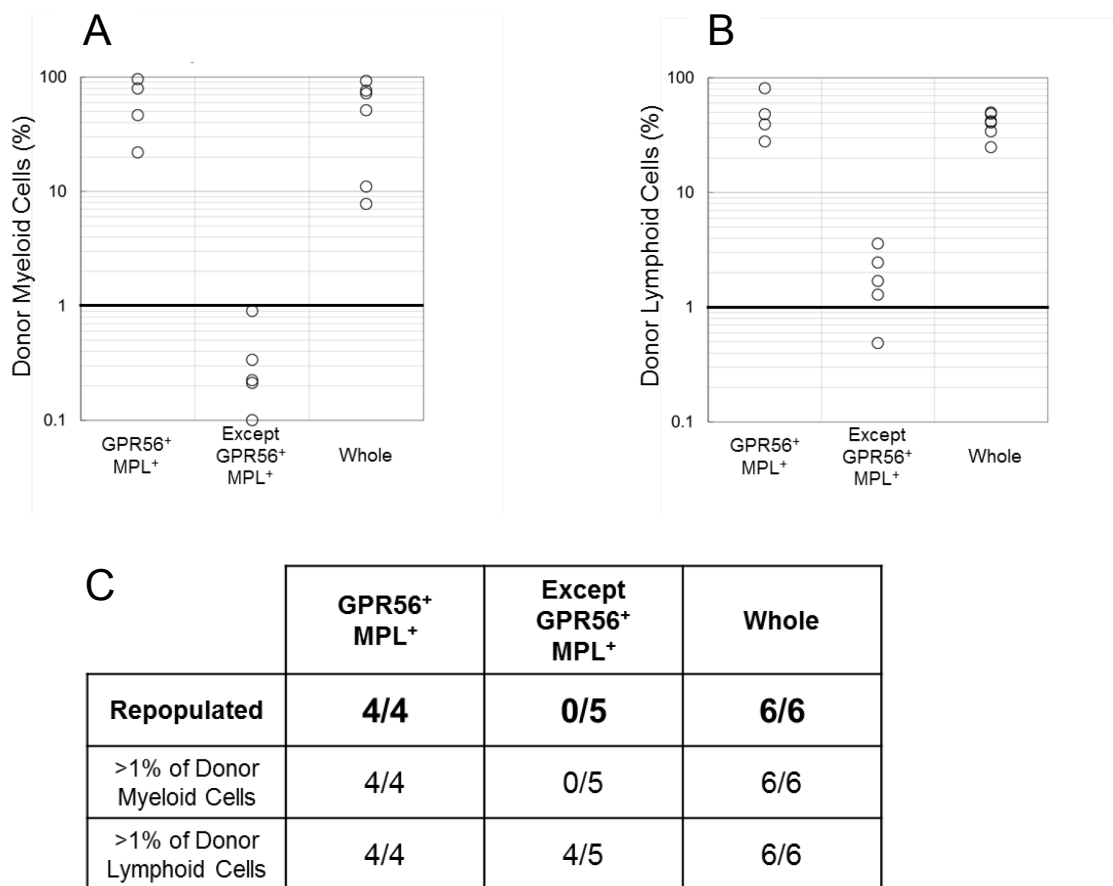


図 17. GPR56 蛋白質と MPL 蛋白質の発現のみによって分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ（再現性の確認：その 2）

- (A, B) フローサイトメトリー解析により、移植 12 週間後のレシピエントマウス末梢血の骨髄球系 (Mac-1⁺/Gr-1⁺) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (A) とリンパ球系 (B220⁺/Thy1.2⁺) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (B) を測定した。丸印は各レシピエントマウス末梢血の骨髄球系またはリンパ球系の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合を示すが、0.1%を最小値とする対数目盛による表示のため、0.1%を下回る場合でも 0.1%の位置に表示した。
- (C) ドナー細胞として各細胞画分を移植されたレシピエントマウスの末梢血の、骨髄球系 (Mac-1⁺/Gr-1⁺) とリンパ球系 (B220⁺/Thy1.2⁺) の細胞それぞれにおいてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、さらに、骨髄球系とリンパ球系の両方の細胞においてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、すなわち、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたレシピエントマウス (Repopulated) の匹数を、解析したレシピエントマウスの総匹数を分母とする分数で表示した。

【GRP56⁺ MPL⁺ 画分における 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との関連】

長期造血幹細胞は GRP56⁺ MPL⁺ 画分のみに含まれることが示されたが、57R2A と AMM2 を用いたマウス骨髄単核細胞のフローサイトメトリー解析において、GRP56⁺ MPL⁺ 画分中の GPR56 蛋白質と MPL 蛋白質の発現強度には一定の関連が見られたことから (図 14A、図 16A)、GRP56⁺ MPL⁺ 画分中の 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に関連があるか否か、さらに確認を試みた。まず、マウス骨髄単核細胞中の GRP56⁺ MPL⁺ 画分 (存在割合 0.8%) を GPR56/MPL 両蛋白質の発現強度に基づいて、さらに Segment#1 (存在割合 0.27%)、Segment#2 (存在割合 0.27%)、Segment#3 (存在割合 0.27%) の 3 画分に分割し、それら 3 画分と GRP56⁺ MPL⁺ 以外の画分 (存在割合 99.2%)、未分画のマウス骨髄単核細胞 (存在割合 100%、陽性対照) の合計 5 画分をドナー細胞として分取した上で、それぞれの画分のマウス骨髄単核細胞中の存在割合に基づいた細胞数を各レシピエントマウスに移植する、競合的長期骨髄再構築アッセイを実施した (図 18A、B)。

その結果は図 19A~C に示すように、Segment#3 (1 匹あたり 267 細胞) がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスにおける、移植 12 週間後の骨髄球系 (Mac-1⁺ または Gr-1⁺) とリンパ球系 (B220⁺ または Thy1.2⁺) の両方の細胞において、10 匹中 10 匹でドナー由来細胞の割合が 1% より大きくなっていったことから、10 匹中 10 匹において移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたと判定した。この結果は、未分画のマウス骨髄単核細胞 (1 匹あたり 100,000 細胞) がドナー細胞として移植された場合 (陽性対照) と同様であった。その一方、Segment#2 (1 匹あたり 267 細胞) がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスの 10 匹中 1 匹のみにおいて、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたと判定され (ドナー由来細胞の割合が 1% より大きくなった個体は、骨髄球系について 10 匹中 1 匹、リンパ球系について

10 匹中 8 匹)、さらに、Segment#1 (1 匹あたり 267 細胞) がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスのすべてにおいて、移植されたドナー細胞は長期骨髄再構築能を有していなかったと判定された(ドナー由来細胞の割合が 1%より大きくなった個体は、骨髄球系では 9 匹中 0 匹、リンパ球系では 9 匹中 4 匹)。また、図 15 と図 17 に示す結果から予期された通り、GRP56⁺ MPL⁺ 以外の画分 (1 匹あたり 99,200 細胞) がドナー細胞として移植されたレシピエントマウスのすべてにおいて、移植されたドナー細胞は長期骨髄再構築能を有していなかったと判定された (ドナー由来細胞の割合が 1%より大きくなった個体は、骨髄球系では 7 匹中 0 匹、リンパ球系では 7 匹中 0 匹)。なお、再現性の確認のため、本実験をもう 1 回繰り返しても、上と同様の結果が得られた (図 20、図 21)。

以上の結果から、マウス骨髄単核細胞の GRP56⁺ MPL⁺ 画分において、GPR56/MPL 両蛋白質の発現量が高い画分ほど長期骨髄再構築能を有する頻度が高くなること、すなわち、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ことから、GRP56⁺ MPL⁺ 画分中の 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が示された。

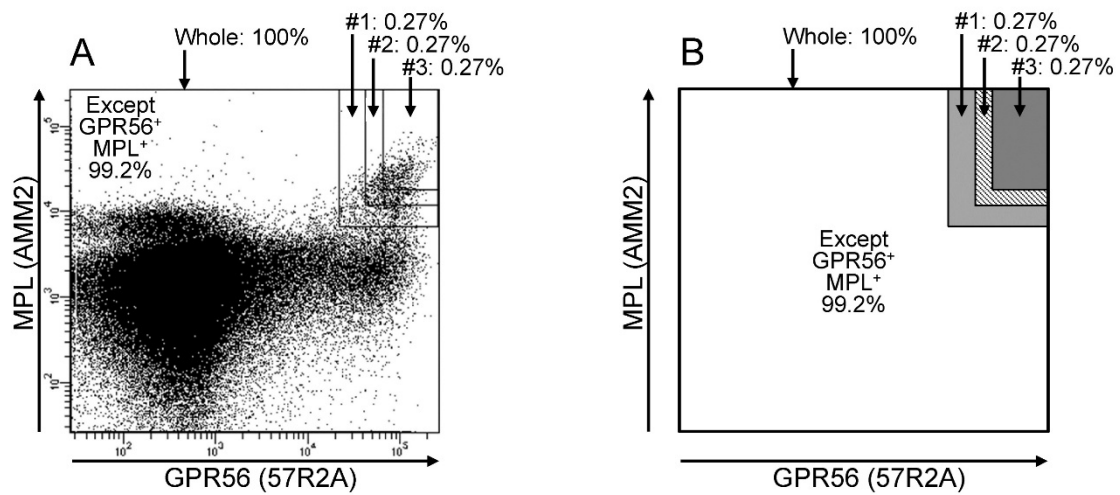


図 18. GPR56/MPL 両蛋白質の発現強度に基づいてさらに分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ (その 1)

- (A) 57R2A と AMM2 のみを用いて、マウス骨髄単核細胞中の GPR56⁺ MPL⁺ 画分 (0.8%) を GPR56/MPL 両蛋白質の発現強度に基づいて、Segment#1 (0.27%)、Segment#2 (0.27%)、Segment#3 (0.27%) の 3 画分に分画した (カッコ内は骨髄単核細胞中の存在割合)。それら 3 画分と GPR56⁺ MPL⁺ 以外の画分 (99.2%)、分画しなかったマウス骨髄単核細胞 (100%、陽性対照) を分取し、それらの存在割合に基づいて、致死量放射線を照射したマウスに、それぞれ 267 細胞/匹、267 細胞/匹、267 細胞/匹、99,200 細胞/匹、100,000 細胞/匹ずつ、静脈投与により移植した。
- (B) 分取し移植した画分をそのマウス骨髄単核細胞中の存在割合とともに模式図で示した。

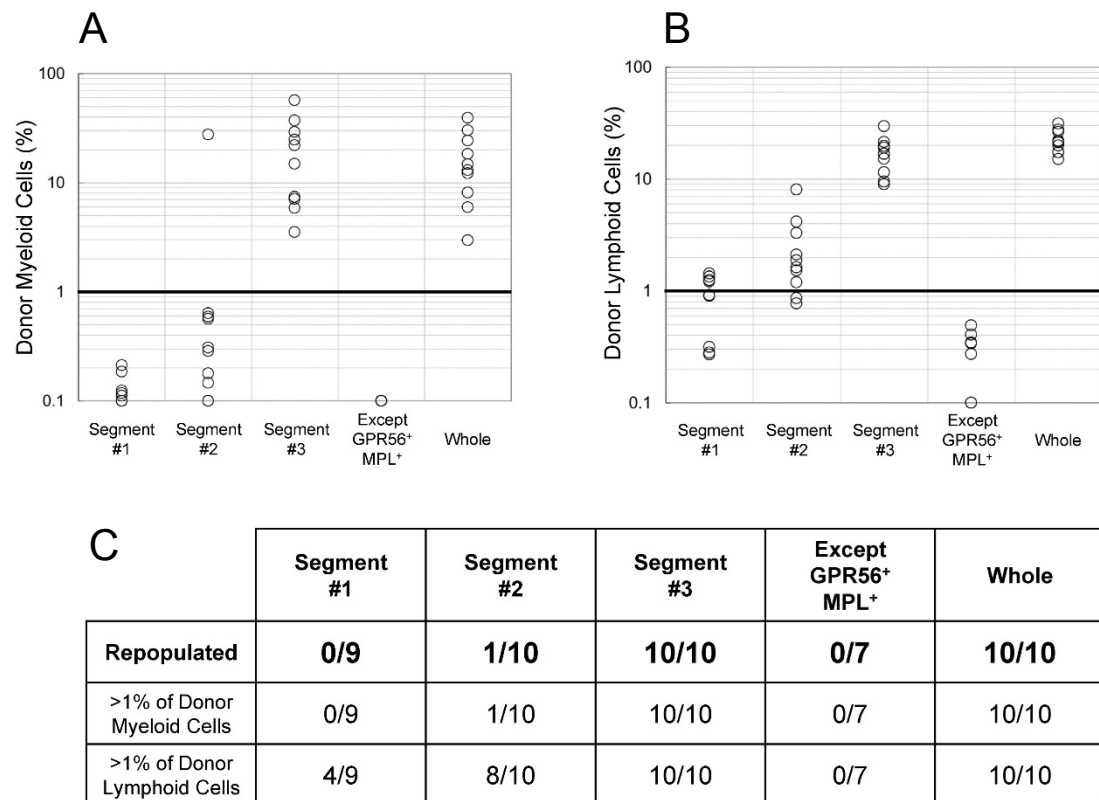


図 19. GPR56/MPL 両蛋白質の発現強度に基づいてさらに分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ (その 2)

- (A, B) フローサイトメトリー解析により、移植 12 週間後のレシピエントマウス末梢血の骨髄球系 (Mac-1⁺/Gr-1⁺) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (A) とリンパ球系 (B220⁺/Thy1.2⁺) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (B) を測定した。丸印は各レシピエントマウス末梢血の骨髄球系またはリンパ球系の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合を示すが、0.1%を最小値とする対数目盛による表示のため、0.1%を下回る場合でも 0.1%の位置に表示した。
- (C) ドナー細胞として各細胞画分を移植されたレシピエントマウスの末梢血の、骨髄球系 (Mac-1⁺/Gr-1⁺) とリンパ球系 (B220⁺/Thy1.2⁺) の細胞それぞれにおいてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、さらに、骨髄球系とリンパ球系の両方の細胞においてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、すなわち、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたレシピエントマウス (Repopulated) の匹数を、解析したレシピエントマウスの総匹数を分母とする分数で表示した。

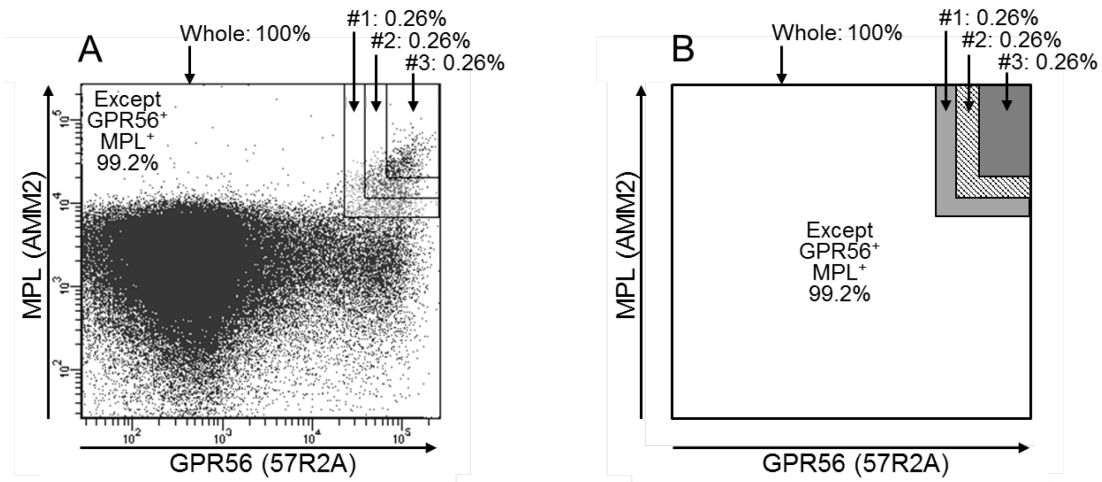


図 20. GPR56/MPL 両蛋白質の発現強度に基づいてさらに分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ（再現性の確認：その 1）

- (A) 57R2A と AMM2 のみを用いて、マウス骨髄単核細胞中の GPR56⁺ MPL⁺ 画分 (0.8%) を GPR56/MPL 両蛋白質の発現強度に基づいて、Segment#1 (0.26%)、Segment#2 (0.26%)、Segment#3 (0.26%) の 3 画分に分画した (カッコ内は骨髄単核細胞中の存在割合)。それら 3 画分と GPR56⁺ MPL⁺ 以外の画分 (99.2%)、分画しなかったマウス骨髄単核細胞 (100%、陽性対照) を分取し、それらの存在割合に基づいて、致死量放射線を照射したマウスに、それぞれ 255 細胞/匹、255 細胞/匹、255 細胞/匹、99,235 細胞/匹、100,000 細胞/匹ずつ、静脈投与により移植した。
- (B) 分取し移植した画分をそのマウス骨髄単核細胞中の存在割合とともに模式図で示した。

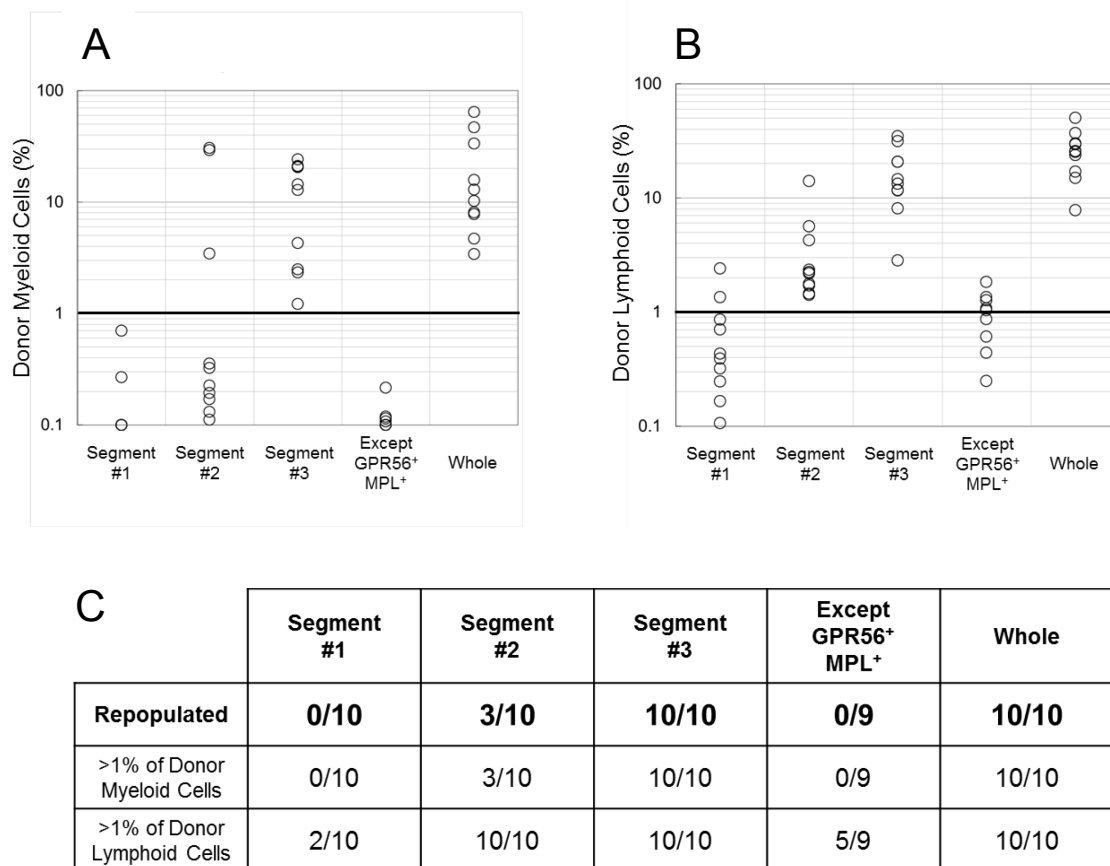


図 21. GPR56/MPL 両蛋白質の発現強度に基づいてさらに分画したマウス骨髄単核細胞による競合的長期骨髄再構築アッセイ（再現性の確認：その 2）

- (A, B) フローサイトメトリー解析により、移植 12 週間後のレシピエントマウス末梢血の骨髄球系 ($\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (A) とリンパ球系 ($\text{B220}^+/\text{Thy1.2}^+$) の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合 (B) を測定した。丸印は各レシピエントマウス末梢血の骨髄球系またはリンパ球系の細胞におけるドナー由来細胞の存在割合を示すが、0.1%を最小値とする対数目盛による表示のため、0.1%を下回る場合でも 0.1%の位置に表示した。
- (C) ドナー細胞として各細胞画分を移植されたレシピエントマウスの末梢血の、骨髄球系 ($\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$) とリンパ球系 ($\text{B220}^+/\text{Thy1.2}^+$) の細胞それぞれにおいてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、さらに、骨髄球系とリンパ球系の両方の細胞においてドナー由来細胞の存在割合が 1%を上回るマウスの匹数、すなわち、移植されたドナー細胞が長期骨髄再構築能を有していたレシピエントマウス (Repopulated) の匹数を、解析したレシピエントマウスの総匹数を分母とする分数で表示した。

考察

GPR56 蛋白質は細胞内 G 蛋白質を通じて細胞に機能的なシグナルを伝達することが可能な G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の一つである[16]。さらに、マウス造血幹細胞が濃縮された細胞画分を用いた遺伝子発現解析において、GPR56 mRNA の発現が検出されていたため、GPR56 蛋白質はマウス造血幹細胞の陽性マーカーとなる可能性が高いことが示されていた[14, 15]。以上を合わせて考えると、G 蛋白質共役型受容体である GPR56 蛋白質が自己複製能や多分化能といった造血幹細胞の重要な機能に関与するシグナルを伝達する可能性に加えて、GPR56 蛋白質のリガンドも、そのようなシグナル伝達に関与する可能性が考えられた。そこで、造血幹細胞の重要な機能に関与する可能性がある GPR56 蛋白質の生理的機能を解明するに際して、まずは GPR56 蛋白質がマウス造血幹細胞の表面に実際に発現していることを確認する必要があると考えた。筆者らは、GPR56 蛋白質を陽性マーカーとしてマウス造血幹細胞を選抜することができれば、GPR56 蛋白質がマウス造血幹細胞の表面に実際に発現していることを示すことができると考え、フローサイトメトリー解析と細胞分取に適用可能な新規抗マウス GPR56 モノクローナル抗体の確立に取り組んだ。まずは、マウス造血幹細胞の選抜のために十分な特異性と反応性を持ったモノクローナル抗体を得ることを意図して、免疫原として、さらにはハイブリドーマ選抜の手段として、マウス GPR56 蛋白質の安定発現細胞株を用いることにより、本研究の目的に適合する抗マウス GPR56 モノクローナル抗体のクローン 57R2A を新たに確立することができた。なお、マウス血液細胞表面上の GPR56 蛋白質に結合する抗体は他にも知られており、その一つは、マウス GPR56 蛋白質への交差結合性を有する抗ヒト GPR56 モノクローナル抗体 CG4 であり、ヒト GPR56 とマウス Fc との融合蛋白質を免疫原に用いることにより取得された[21,

22]。もう一つは抗マウス GPR56 ポリクローナル抗体で、ウサギへの免疫原にマウス GRP56 蛋白質細胞外領域を用いつつ、さらにはウサギ抗血清のアフィニティー精製にもマウス GRP56 蛋白質細胞外領域を用いることにより取得された[23, 24]。マウス造血幹細胞が濃縮された画分中のいずれかの細胞に GPR56 蛋白質が発現していることは、これら既存の抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって既に示されてはいたものの、ここで特筆すべきことは、57R2A により GPR56 蛋白質を陽性マーカーとしてマウス造血幹細胞を分取できたこと、つまり、GPR56 蛋白質がマウス造血幹細胞の表面に実際に発現していることが本研究によって初めて示されたことである。なお、本研究が公表される前に、ノックアウトマウスにおける GPR56 蛋白質の機能欠損により、骨髓単核細胞中における造血幹細胞が濃縮された画分である $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$ (KSL) 画分の存在割合が低下し、さらに、それら骨髓単核細胞や KSL 画分の長期骨髓再構築能も野生型マウスと比較して低下していることが報告されていた[24]。そのような知見の一方、筆者らは、マウス骨髓単核細胞において、57R2A によって分画される GPR56 陽性 (GPR56^+) 画分 (存在割合 $\leq 15\%$) に含まれる細胞のみが長期骨髓再構築能を有すること (図 10~図 13)、すなわち、すべての長期造血幹細胞はその表面上に 57R2A によって認識される GPR56 蛋白質を発現していることを、初めてかつ直接的に示した。GPR56 ノックアウトマウスによって得られた知見と 57R2A によって得られた知見は、異なった手法により得られたにも関わらず、お互いを矛盾なく説明することができる。

さらに、マウス造血幹/前駆細胞として既に確立されている細胞画分における GPR56 mRNA の発現は、BloodSpot という血液細胞における遺伝子発現解析の公開データベース (www.bloodspot.eu) [25]においても確認することができた。BloodSpot を用いた解析の結果 (図 22)、造血前駆細胞画分 (LT-HSC と ST-HSC 以外) よりも未分化な造血幹細胞画分 (LT-HSC と ST-HSC) における GPR56 mRNA の発現強度の方が高かったことから、未分化な状態になるほど GPR56 mRNA の発現強度が高くなることが示唆され

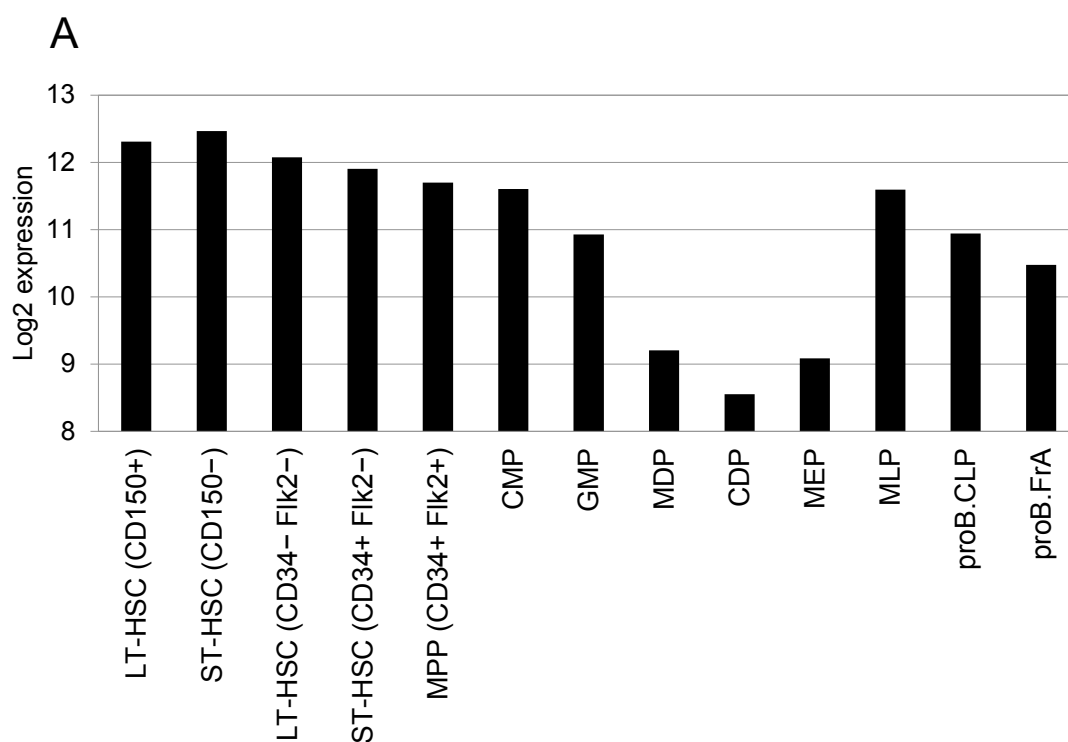
た。また、BloodSpot を用いた別の解析の結果 (図 23)、ヒト GPR56 mRNA が $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD90}^+$ 等で定義されるヒト造血幹細胞画分[26]において発現していることも確認されたことから、マウス GPR56 蛋白質と同じく、ヒト GPR56 蛋白質も造血幹細胞において発現していることが示唆された。このように、GPR56 mRNA はマウスとヒトの造血幹細胞画分において共通して発現していることから、GPR56 蛋白質もマウスとヒトの造血幹細胞において共通して発現し、共通した機能を担っている可能性が考えられた。

筆者らは、抗マウス GPR56 モノクローナル抗体である 57R2A と抗マウス MPL モノクローナル抗体である AMM2 のみを組み合わせることにより、骨髓単核細胞中の長期造血幹細胞のすべてが濃縮されている、わずか 0.8%しか存在しない $\text{GRP56}^+ \text{MPL}^+$ 画分を明確に分離することができた (図 14~図 17)。さらに、 $\text{GRP56}^+ \text{MPL}^+$ 画分の中でも、GPR56/MPL 両蛋白質の発現量が最も高い画分において、長期造血幹細胞が最も濃縮されていることも明らかにした (図 18~図 21)。これらの結果から、すべての長期造血幹細胞は GPR56/MPL 両蛋白質をその表面に発現し、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から、GPR56 蛋白質は、MPL 蛋白質と同様に、多分化能や自己増幅能といった長期造血幹細胞の機能の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

結論として、本研究における 57R2A を用いた実験結果から、マウス骨髓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ていることが明らかとなり、GPR56 蛋白質はマウス長期造血幹細胞の陽性マーカーとなることが示された。今後は、c-Kit[2-5, 8]、Sca-1 [27]、CD150 [28]といった既知の造血幹細胞の陽性マーカーに対するモノクローナル抗体と 57R2A を組み合わせた検討を重ねることにより、造血幹細胞をさらに効率的に選抜する方法を見出すことができれば、造血幹細胞を用いたあらゆる研究の進展に寄与することができると考えられる。例えば、マウス

胎仔の造血性内皮細胞 (Hemogenic Endothelial Cells) から造血幹細胞が発生する過程において、GPR56 mRNA の発現レベルが上昇するという興味深い報告が近年なされているが[29]、このような胎仔マウスの場合においても、成体マウスと同様に、GPR56 蛋白質を陽性マーカーとして造血幹細胞を標識・選抜できる可能性があり、57R2A はそのための有用な手段となり得る。また、57R2A に GPR56 蛋白質のリガンドへの結合を阻害する活性がある場合には、その阻害活性を用いた候補リガンドの活性評価、さらには、57R2A を用いたプルダウンアッセイによる GPR56 蛋白質と相互作用する蛋白質の同定、といった GPR56 蛋白質の機能解析においても、57R2A は有用な手段となり得る。

以上から、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 は、造血幹細胞の研究進展に寄与するのみならず、GPR56 蛋白質の機能解析にも寄与することができると思う。

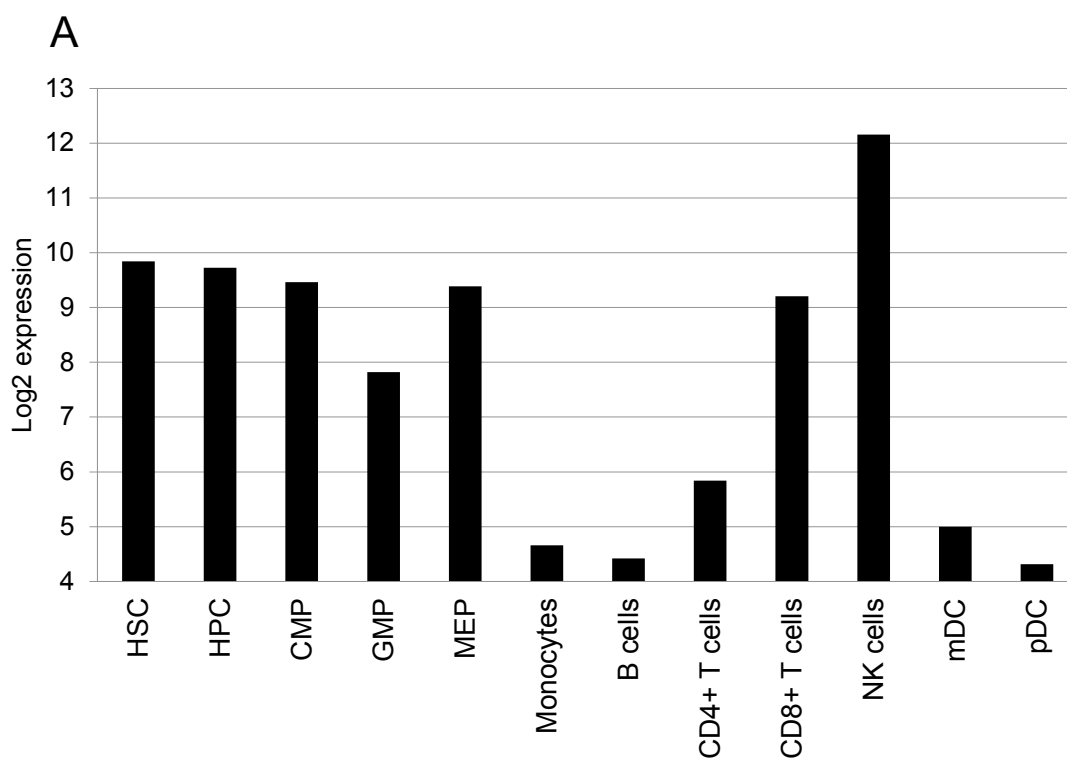


B

Population	Description	Phenotype
LT-HSC (CD150+)	Long-Term Reconstituting Stem Cells from Bone Marrow	CD150 ⁺ CD48 ⁻ Lin ⁻ AA4.1 ⁺ CD43 ⁺ IgM ⁻ CD24 ⁻ c-Kit ⁺ IL7R ⁻
ST-HSC (CD150-)	Short-Term Reconstituting Stem Cells from Bone Marrow	CD150 ⁻ CD48 ⁻ Lin ⁻ AA4.1 ⁺ CD43 ⁺ IgM ⁻ CD24 ⁻ c-Kit ⁺ IL7R ⁻
LT-HSC (CD34- Flk2-)	Long-Term Reconstituting Stem Cells from Bone Marrow	CD34 ⁻ Flk2 ⁻ Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺
ST-HSC (CD34+ Flk2-)	Short-Term Reconstituting Stem Cells from Bone Marrow	CD34 ⁺ Flk2 ⁻ Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺
MPP (CD34+ Flk2+)	Multipotent Progenitors from Bone Marrow	CD34 ⁺ Flk2 ⁺ Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺
CMP	Common Myeloid Progenitors from Bone Marrow	Lin ⁻ IL7R ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ⁺ FcgR ^{lo} CD34 ⁺
GMP	Granulocyte-Monocyte Progenitors from Bone Marrow	Lin ⁻ IL7R ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ⁺ FcgR ^{hi} CD34 ⁺
MDP	Monocyte DC Precursors from Bone Marrow	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ^{hi} Flt3 ⁺ CD115 ⁺
CDP	Common DC Precursors from Bone Marrow	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ^{lo} Flt3 ⁺ CD115 ⁺
MEP	Megakaryocyte-Erythroid Progenitors from Bone Marrow	Lin ⁻ IL7R ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ⁺ FcgR ^{lo} CD34 ⁻
MLP	Multilineage Progenitors from Bone Marrow	Lin ⁻ AA4.1 ⁺ c-Kit ⁺ IL7R ⁻ B220 ⁻
proB.CLP	Common Lymphoid Progenitors from Bone Marrow	Lin ⁻ AA4.1 ⁺ c-Kit ⁺ IL7R ⁺ B220 ⁻
proB.FrA	Fr. A (pre-pro-B) from Bone Marrow	Lin ⁻ AA4.1 ⁺ c-Kit ⁺ IL7R ⁺ B220 ⁺

図 22. BloodSpot によるマウス造血幹/前駆細胞における GPR56 mRNA の発現解析

- (A) 既知のマウス骨髄造血幹/前駆細胞画分における GPR56 mRNA の発現を BloodSpot (www.bloodspot.eu)のデータセット“Mouse immgen Stem and progenitor cells”を用いて解析した。
- (B) (A)の解析に用いたマウス造血幹/前駆細胞画分の注釈と表現型を記載した。



B

Population	Description	Phenotype
HSC	Hematopoietic Stem Cells from Bone Marrow	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD90 ⁺ / CD34 ⁺ CD33 ⁻ CD38 ⁻ Rho ^{lo} c-Kit ⁺
HPC	Hematopoietic Progenitor Cells from Bone Marrow	CD34 ⁺ CD33 ⁻ CD38 ⁻ Rho ^{hi}
CMP	Common Myeloid Progenitors from Bone Marrow	CD34 ⁺ CD123 ^{lo} CD45RA ⁻ CD110 ⁻
GMP	Granulocyte Monocyte Progenitors from Bone Marrow	CD34 ⁺ CD123 ^{lo} CD45RA ⁺ CD110 ⁻
MEP	Megakaryocyte-Erythroid Progenitors from Bone Marrow	CD34 ⁺ CD123 ^{lo} CD45RA ⁻ CD110 ⁺
Monocytes	Monocytes from Peripheral Blood	CD14 ⁺
B cells	B Cells from Peripheral Blood	CD19 ⁺
CD4+ T cells	CD4 ⁺ T Cells from Peripheral Blood	CD4 ⁺
CD8+ T cells	CD8 ⁺ T Cells from Peripheral Blood	CD8 ⁺
NK cells	Natural Killer Cells from Peripheral Blood	CD56 ⁺
mDC	Myeloid Dendritic Cells from Peripheral Blood	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cells from Peripheral Blood	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD123 ⁺

図 23. BloodSpot によるヒト血液細胞における GPR56 mRNA の発現解析

- (A) 既知のヒト血液細胞画分における GPR56 mRNA の発現を BloodSpot (www.bloodspot.eu)のデータセット“HemaExplorer”を用いて解析した。
- (B) (A)の解析に用いたヒト血液細胞画分の注釈と表現型を記載した。

引用文献

- [1] Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118:149-161.
- [2] Anderson DM, Lyman SD, Baird A, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 1990;63:235-243.
- [3] Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature*. 1990;347:667-669.
- [4] Nocka K, Buck J, Levi E, Besmer P. Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors. *EMBO J*. 1990;9:3287-3294.
- [5] Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium. *Cell*. 1990;63:195-201.
- [6] Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1:685-697.
- [7] Yano M, Iwama A, Nishio H, Suda J, Takada G, Suda T. Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. *Blood*. 1997;89:4317-4326.
- [8] Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 1991;174:63-71.
- [9] Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*.

1996;273:242-245.

- [10] Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011;333:218-221.
- [11] Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404:193-197.
- [12] Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, Ruiters DJ, van Muijen GN. TM7XN1, a novel human EGF-TM7-like cDNA, detected with mRNA differential display using human melanoma cell lines with different metastatic potential. *FEBS Lett*. 1999;446:292-298.
- [13] Liu M, Parker RM, Darby K, et al. GPR56, a novel secretin-like human G-protein-coupled receptor gene. *Genomics*. 1999;55:296-305.
- [14] Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, et al. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science*. 2000;288:1635-1640.
- [15] Terskikh AV, Easterday MC, Li L, et al. From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:7934-7939.
- [16] Langenhan T, Aust G, Hamann J. Sticky signaling--adhesion class G protein-coupled receptors take the stage. *Sci Signal*. 2013;6:re3.
- [17] Xu L, Begum S, Hearn JD, Hynes RO. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:9023-9028.
- [18] Luo R, Jeong SJ, Jin Z, Strokes N, Li S, Piao X. G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108:12925-12930.

- [19] Kimura G, Itagaki A, Summers J. Rat cell line 3y1 and its virogenic polyoma- and sv40-transformed derivatives. *Int J Cancer*. 1975;15:694-706.
- [20] Osawa M, Nakamura K, Nishi N, et al. In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 1996;156:3207-3214.
- [21] Peng YM, van de Garde MD, Cheng KF, et al. Specific expression of GPR56 by human cytotoxic lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2011;90:735-740.
- [22] Rao TN, Marks-Bluth J, Sullivan J, et al. High-level Gpr56 expression is dispensable for the maintenance and function of hematopoietic stem and progenitor cells in mice. *Stem Cell Res*. 2015;14:307-322.
- [23] Iguchi T, Sakata K, Yoshizaki K, Tago K, Mizuno N, Itoh H. Orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulates neural progenitor cell migration via a G alpha 12/13 and Rho pathway. *J Biol Chem*. 2008;283:14469-14478.
- [24] Saito Y, Kaneda K, Suekane A, et al. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. *Leukemia*. 2013;27:1637-1649.
- [25] Bagger FO, Sasivarevic D, Sohi SH, et al. BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:D917-924.
- [26] Majeti R, Becker MW, Tian Q, et al. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:3396-3401.
- [27] van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:4634-4638.

- [28] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121:1109-1121.
- [29] Solaimani Kartalaei P, Yamada-Inagawa T, Vink CS, et al. Whole-transcriptome analysis of endothelial to hematopoietic stem cell transition reveals a requirement for Gpr56 in HSC generation. *J Exp Med*. 2015;212:93-106.

発表論文

A. Yusuke Tokoro, Yoko Yamada, Shin-ichiro Takayanagi, Tetsuya Hagiwara

57R2A, a newly established monoclonal antibody against mouse GPR56, marks long-term repopulating hematopoietic stem cells.

Experimental Hematology. 2018;59:51-59.

参考論文

**B. Naoyuki Kataoka, Mutsuhito Ohno, Kenji Kangawa, Yusuke Tokoro,
Yoshiro Shimura**

Cloning of a complementary DNA encoding an 80 kilodalton nuclear cap binding protein.

Nucleic Acids Research. 1994;22(19):3861-3865.

C. Yusuke Tokoro, Toshiyuki Isoe, Kazutoshi Shindo

Gilvusmycin, a new antitumor antibiotic related to CC-1065.

The Journal of Antibiotics. 1999;52(3):263-268.

**D. Syuichi Koarada, Yoshifumi Tada, Yoshiaki Sohma, Yoshio Haruta, Rie Suematsu,
Mio Mitamura, Hisako Inoue, Hiromi Ehara, Yusuke Tokoro, Akihide Ohta,
Kohei Nagasawa**

Autoantibody-producing RP105(-) B cells, from patients with systemic lupus erythematosus, showed more preferential expression of BCMA compared with BAFF-R than normal subjects.

Rheumatology. 2010;49(4):662-670.

謝辞

指導教員の京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 細胞生化学研究室 教授 植田和光先生には、社会人博士課程への入学以降、本研究を投稿論文と博士論文にまとめ上げるまで、約6年の長きにわたって多くのご指導、ご鞭撻を賜り、心より感謝申し上げます。植田先生のご指導、ご鞭撻がなければ、最後までたどり着くことはできませんでした。また、大学院入学の前から継続的にご相談させて頂き、細胞生化学研究室をご紹介下さった京都大学大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻 細胞全能性発現学講座 遺伝子特性学分野 教授 河内孝之先生にも感謝申し上げます。大学院生として細胞生化学研究室でご指導を受けるにあたり、准教授の木岡紀幸先生、助教の木村泰久先生、特任助教の永田紅先生、小段篤史先生、京都女子大学 准教授 松尾道憲先生にも数多くのご助言を賜り、御礼申し上げます。また、長きにわたり大変お世話になりました細胞生化学研究室内の学生の皆様、スタッフの皆様にも、この場をお借りして御礼申し上げます。

本研究の実施、さらに大学院入学の機会を与えて下さった麒麟ビール株式会社、麒麟ファーマ株式会社、協和発酵キリン株式会社と、当時の上長であった西川光郎博士、安澤亨博士に御礼申し上げます。投稿論文の共著者となって下さった協和発酵キリン株式会社の山田洋子氏、高柳晋一郎博士、萩原哲也博士には、本研究の重要部分を担って下さり、厚く御礼申し上げます。投稿論文の内容についてご助言頂いた協和発酵キリン株式会社の佐々木克敏博士にも御礼申し上げます。また、本研究の重要な材料である C57BL/6-Ly5.1 マウスを供与頂いた東京大学医科学研究所 特任教授 中内啓光先生に感謝申し上げます。さらに、業務と社会人大学院との両立に理解を示して下さい下さった協和キリン富士フィルムバイオロジクス株式会社の上長の

津村治彦博士、鈴木秀文博士、そして全社員の皆様に感謝申し上げます。

最後に、会うたびに叱咤激励してくれた姉 由紀と弟 伸介、論文作成に多くの時間を費やすことを受け入れてくれた妻 和子、さらには、今は亡き父 周一と母 喜久子に、心より感謝します。