

繰り返し免疫に伴うCTLメモリー細胞  
の遺伝子発現変動とDNAメチル化変化  
に関する研究

少作 純平

繰り返し免疫に伴う CTL メモリー細胞の遺伝子発現変動と  
DNA メチル化変化に関する研究

東京大学大学院医学系研究科社会医学専攻分子予防医学教室

指導教員： 松島 綱治 教授

少作 純平

# 目次

略語一覧.....	4
図一覧.....	8
表一覧.....	11
1. 要旨.....	13
2. 序文.....	14
3. 方法.....	27
3.1 マウスにおける感染実験、養子移入と CD8+ T 細胞の分離.....	27
3.2 アダプター精製 .....	28
3.3 MSCC ライブラリー.....	28
3.4 5'SAGE-Seq ライブラリー.....	30
3.5 データ解析に用いたマウスゲノム情報.....	30
3.6 各細胞間の HpaII count と MspI count の変遷の広域にわたる解析.....	30
3.7 各細胞間の DNA メチル化状態の変化の解析.....	31
3.8 各遺伝子発現量のそれぞれの細胞間における相違の解析.....	32
3.9 統計解析.....	32
3.10 MA plot.....	33

3.11 GSEA.....	33
3.12 UCSC genome browser によるデータ表示.....	36
3.13 DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) bioinformatics resources.....	36
3.14 RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative PCR) .....	37
3.15 MS-qPCR (Methylation-Specific qPCR) .....	39
4. 結果.....	42
4.1 繰り返し感染によるメモリーCD8+ T 細胞の広域にわたる DNA メチル化 状態の変遷と遺伝子発現の相違.....	42
4.2 繰り返し感染によるメモリーCD8+ T 細胞全体の DNA メチル化と遺伝子 発現制御の変化の比較.....	48
4.3 既知の CTL メモリーに特徴的な遺伝子における DNA メチル化・脱メ チル化による遺伝子発現制御.....	70
4.4 その他の免疫応答に重要な遺伝子における DNA メチル化・脱メチル化 による遺伝子発現制御.....	78
4.5 メモリー細胞における RPs(リボソームルプロテイン) の DNA メチル化 による遺伝子発現制御.....	89
4.6 メモリー細胞における MRPs(Mitochondrial ribosomal proteins) の DNA	



メチル化による遺伝子発現制御.....	100
4.7 メモリー細胞の老化現象の DNA メチル化・脱メチル化による遺伝子 発現制御.....	103
4.8 5'SAGE-Seq と MSCC の validation.....	116
5. 考察.....	123
6. 謝辞.....	138
7. 参考文献.....	139

## 略語一覽

CTL	Cytotoxic T lymphocytes
EB virus	Epstein-Bar virus
Tem	Effector memory T cells
Tcm	Central memory T cells
OVA	Ovalbumin
TCR	T cell receptor
Tg	Transgenic
cDNA	complementary DNA
mRNA	messenger RNA
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
TSS	Transcription start site
m <sup>7</sup> Gppp	7-methylguanosine 5'-triphosphate
BAP	Bacterial Alkaline Phosphatase
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
CGI	CpG island
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

BRCA1	Breast cancer susceptibility gene
NEP	Neprilysin
FXN	Frataxin
SLE	Systemic lupus erythematosus
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
PD1	Programmed death 1
DMR	Differentially methylated region
IHEC	International Human Epigenome Consortium
MeDIP	Methylated DNA Immunoprecipitation
PCR	Polymerase Chain Reaction
BS	Bisulfite sequencing
MSP	Methylation-specific PCR
NGS	Next generation sequencing
MSCC	Methylation-sensitive cut counting
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
ICGC	International Cancer Genome Consortium
MACS	Magnetic-activated cell sorting
LM-OVA	Listeria monocytogenes-OVA

IDT	Integrated Device Technology
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SOLiD	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
UCSC	University of California, Santa Cruz
GSEA	Gene set enrichment analysis
ES	Enrichment score
NES	Normalized enrichment score
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
SID	Similarity index of diversity
MH	Morisita-Horn similarity index
SINE	short interspersed nuclear element
LINE	long interspersed nuclear element
Gzma	Granzyme A
Gzmb	Granzyme B
Gzmk	Granzyme K
Ifng	Interferon-gamma
Prf1	Perforin 1
RPs	Ribosomal proteins

NMD	Nonesense-mediated RNA decay
MRPs	Mitochondrial ribosomal proteins
ITNK	Induced T-to-NK
cKO	conditional Knockout
Bcl11b	B-cell lymphoma/leukemia 11b
NK	Natural killer
Klrg1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1
Klrb1c	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1c
Nkg2d	Natural Killer group 2D
Nlrk1	Killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
Tbx21	T-box 21
RPM	Read Per Million

## 図一覧

図 1. MSCC と 5'SAGE-Seq ライブラリーに用いた各細胞の純度.....	42
図 2. 各細胞間の HpaII count と MspI count の散布図.....	44
図 3. 各細胞間の HpaII count と MspI count の広域での変遷.....	45
図 4. 各細胞の発現遺伝子の分布.....	47
図 5. ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T 細胞全てにおいて発現 している遺伝子の分布.....	50
図 6. ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T 細胞全てにおいて発現 している遺伝子で発現変動が大きかった遺伝子の DNA メチル化状態.....	52
図 7. ナイーブと 1次メモリー、ナイーブと 2次メモリー、1次メモリーと 2 次メモリーのそれぞれ 2グループのみに発現している遺伝子の分布.....	58
図 8. ナイーブ、もしくは 1次メモリー、もしくは 2次メモリーCD8+ T 細胞 のみに発現している遺伝子の発現.....	60
図 9. 1次メモリーと 2次メモリーCD8+ T 細胞のみに発現している遺伝子 とナイーブ CD8+ T 細胞のみに発現している遺伝子の DNA メチル化状態....	62
図 10. 各「GOLDRATH_ANTIGEN_RESPONSE」における遺伝子の発現量 の変化と DNA メチル化状態の変化..	72

図 11. 「GOLDRATH_IMMUNE_MEMORY」における遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態の変化.....	76
図 12. ケモカインケ・モカイン受容体における遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態の変化.....	79
図 13. サイトカイン・サイトカイン受容体における遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態の変化.....	82
図 14. ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞に発現している全 RPs の発現量の変化.....	90
図 15. GSEA において高い NES を示した RPs に関連する gene set .....	92
図 16. ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞に発現している全 RPs の DNA メチル化状態の変化.....	98
図 17. ナイーブから、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞へと継続的に発現量の上昇を示した 32 の MRPs の DNA メチル化状態の変化.....	102
図 18. GSEA での gene set、「FRIDMAN_SENESCENCE_UP」の plot .....	105
図 19. 「LI_INDUCED_T_TO_NATURAL_KILLER_UP」における遺伝子の発現量の変化.....	107
図 20. GSEA での「LI_INDUCED_T_TO_NATURAL_KILLER_UP」において、顕著に段階的な発現上昇が見られた遺伝子と Bcl11b の DNA メチル化状態の変	

化.....111

図 21. GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、  
顕著に段階的な発現低下が見られた遺伝子の発現量と DNA メチル化状態の変  
化.....112

図 22. NK 細胞受容体の発現量と DNA メチル化状態の変化.....115

図 23. qPCR による 5'SAGE-Seq の validation.....117

図 24. MS-qPCR による MSCC の validation.....118



## 表一覧

表 1. MSCC と 5'SAGE-Seq のマウスゲノムへの mapping の概要.....	43
表 2. 感染暴露により発現量の変動が大きかった遺伝子.....	64
表 3. GSEA において高い NES を示した免疫応答に関連する gene set .....	85
表 4. DAVID において高い相関性を示した免疫応答に関連する Annotation term.....	87
表 5. ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T 細胞に発現している全 RPs の発現量の変化.....	91
表 6. GSEA において高い NES を示した RPs に関連する gene set .....	95
表 7. DAVID において高い相関性を示した RPs に関連する Annotation term..	99
表 8. DAVID において高い相関性を示した MRPs に関連する Annotation term.....	100
表 9. ナイーブから、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T 細胞へと継続的に発現量の上昇を示した 32 の MRPs.....	102
表 10. GSEA において比較的高い NES を示したアポトーシスや老化に関連する gene set .....	103
表 11. GO における senescence に関連する遺伝子.....	105

表 12. GSEA における「LI_INDUCED_T_TO_NATURAL_KILLER_UP」と 「GRABARCZYK_BCL11B_TARGETS_UP」の gene set.....	108
表 13. GSEA での「LI_INDUCED_T_TO_NATURAL_KILLER_UP」において、 顕著に段階的な発現上昇が見られた遺伝子と Bcl11b の発現量.....	109
表 14. GSEA での「LI_INDUCED_T_TO_NATURAL_KILLER_UP」において、 顕著に段階的な発現低下が見られた遺伝子の発現量.....	112
表 15. GSEA における「KEGG_NATURAL_KILLERT_CELL_MEDIATED _CYTOTOXICITY」の gene set.....	114

## 1. 要旨

繰り返し感染に対して、メモリーCD8+T 細胞が樹立・維持する「免疫記憶」の特徴を解明するため、遺伝子発現量と DNA メチル化の変化を、NGS を用いて包括的に解析した。その結果、メモリー細胞において、CTL に特徴的なサイトカインやケモカインなどの遺伝子の顕著な発現量上昇と DNA 脱メチル化傾向、aging と関連深い RPs の発現量低下と DNA メチル化傾向、さらに老化 T 細胞に特徴的な NK 細胞に特異的な遺伝子の発現量上昇と DNA 脱メチル化傾向が発見された。以上より、繰り返し感染によりメモリー細胞が持ち得た「老化現象」が DNA メチル化・脱メチル化により制御されていると強く示唆された。

## 2. 序文

免疫細胞は、一度侵入(感染)した病原体を記憶し、同一病原体の再侵入の際、より効率的に排除することができる[1] [2]。これを「免疫記憶」といい、感染症に対するワクチンに応用されている。免疫系は自然免疫と獲得免疫(適応免疫)に大別され、一般的には、自然免疫は即時的な免疫応答で、侵入した病原体を感知し危険シグナルを出す。が、長期間に渡ることなく「免疫記憶」を持たない。一方、獲得免疫は、主に B 細胞(液性免疫を担う)と T 細胞(細胞性免疫を担う)による抗原特異的な免疫応答で、「免疫記憶」を保持する免疫系である。その中で、CTL(細胞傷害性 T 細胞)は、主に CD8+ T 細胞であり、非自己抗原を認識し感染細胞を排除する働きを担い、生体防御機構の観点から獲得免疫において非常に重要な役割を果たす[3]。

典型的な急性感染症では、ナイーブ CD8+ T 細胞が抗原提示細胞により抗原提示され(priming)、分化増殖が始まり、抗原特異的なエフェクター細胞が産出され、5~12 日間急激に増殖する(expansion 期) [4]。エフェクター細胞は非自己抗原(病原体抗原)を認識し排除した後、約 90%が死滅する(contraction 期)が、5~10%の細胞はメモリーCTL として、長期にわたり残存する(memory 期)。このメモリー細胞が獲得する顕著な特徴は、(A)長期生存、(B)同一抗原による再刺激において、

より迅速な増殖とエフェクター機能の再獲得、(C)自己再生と恒常的ターンオーバーによる安定したメモリーCD8+ T 細胞の細胞数の維持、(D)休止期にメモリーT細胞のアイデンティティを維持し、再感染時には活性化細胞傷害性エフェクターT細胞へ分化するという「多分化能」を持続する、などである[5][6]。このように、一回の感染(1次感染)から、1次応答により(1次)メモリーCTLが形成され、再感染(2次感染)に備えることになる。

これらの特徴を備え、再感染からの生体防御に貢献するメモリーCD8+ T細胞は、例えば、インフルエンザ[7]、ヘルペスウイルス[8]やマラリア原虫[9]などの病原体の繰り返し感染から宿主を防御する潜在能力を持つだけでなく、一時的な抗原暴露により生涯に渡り不顕性感染をも引き起こすEBウイルス(Epstein-Bar virus) [10]やサイトメガロウイルス[11]などに対しても防御システムを備えている。

このメモリーCD8+ T細胞の最も根本的な不明点は特異的な分子マーカーである。メモリーT細胞の最小限の定義は、上記(A)で、非自己抗原排除後も長期にわたり存続する集団(典型的なエフェクター細胞は長期にわたり存続しない)となるだろうが、「メモリー(免疫記憶)」として分類するに足りうる最小限の寿命に関する意見の一致はない。もう一つよく追加され用いられる定義は、エフェクター細胞にはなく、典型的なメモリー細胞がもつ能力として、再度細胞増

殖能を示し、2次エフェクターや2次メモリー細胞集団への分化能を示すことである。この「長期生存能」と「潜在的な細胞増殖能」という2つの要素から、ナイーブ、エフェクター、エフェクターメモリー、セントラルメモリーCD8+ T細胞という集団に分類でき、メモリーCD8+ T細胞は二つに分類される。CD62L-CCR7-のエフェクターメモリーT細胞(Tem)は抗原暴露時のサイトカイン産生能が高く、分裂能は低いのに対して、CD62L+CCR7+のセントラルメモリーT細胞(Tcm)はサイトカイン産生能が低く即時的なエフェクター機能を持たないが、分裂能は高く、寿命もTemより長い[6]。しかし、モノクローナルなTCR Tg(T細胞受容体トランスジェニック)T細胞においてTemとTcmが同一系統の関係にあること[12]や、Temには分化するがTcmには分化できないナイーブCD8+ T細胞の前駆細胞が存在すること[13]などが示されていることから、実際のメモリーT細胞は多様性に富み、TemとTcmのみで分類することは難しい。

上述のように、1次応答により形成された多様な1次メモリーCTLは、2次感染により2次メモリーCTLとなり、2次感染時に同時に形成された1次メモリーCTLと共存することとなり、再々感染(3次感染)に備えることになる。例えば、メモリーCD8+ T細胞は、ワクチンにより量的に増加し、より優位な防御能力を持ち得たこと[2]から、prime-boost regimenに基づくワクチン接種によりその絶対数を増やす治療法がHIVなどの感染症に対して頻繁に試みられている[14] [15]

が、1次と2次メモリーCTLの再感染による影響の相違だけでなく、2次メモリーCTLが1次メモリーCTLと同様の働きを担うのかなど、ワクチン接種と直結する重要な問題となっている[2]。そのため、1次と2次メモリーCTLの特徴を解析することは非常に意義がある。

また、反復抗原刺激によりメモリーCTLの総数は増えるあるいは一定数を維持するが、構成要素を詳細に解析すると、常に若いメモリーCTLが老化メモリーCTLを置換していることが当教室の解析から明らかになっている(後述する実験系により、3次と1次メモリーCD8+ T細胞の割合を100:1、10:1、1:1、1:10と変えて、養子移入し、感染実験を行った際、いずれの割合においても、60日以上でも新しいメモリーCTLが常にdominantであるという現象が見られた)。従って一度樹立されたメモリーCTLは決して無限に増殖を繰り返すわけではなく、いずれ老化を迎える。ワクチンで樹立されたメモリーCTLが個体防御作用を発揮するのは実際には二次応答以降であることを考えると、メモリーCTLが反復応答に際してどのように質的变化をきたしているのか、その分子機序を解明することは非常に重要である[16]。このように、様々な感染症において、より効果的なワクチン開発・ワクチン接種法や病態解明のためにその研究の重要性が高まっている[17][18][19][20]が、表現型や機能の観点から、抗原暴露によるメモリーCD8+ T細胞への分化という「免疫記憶」細胞の樹立について不明な点が多

い。

このような多様なサブセットが存在するメモリーCD8+ T 細胞について、同一病原体(抗原)による繰り返し感染という視点から、抗原特異的なメモリーCD8+ T細胞の興亡(維持機構)に着目した解析方法がある。ドナーマウス由来のOVA(卵白アルブミン)特異的 TCR Tg OT-I 細胞を養子移入し、レシピエントマウスに特異的抗原 OVA 発現遺伝子組み換え感染因子を接種して免疫応答の解析を行うものである[16] [21]。この解析には、抗原暴露回数という正確な分類分けによりメモリーCD8+ T 細胞を特徴付けられる利点と、繰り返し抗原暴露に応答するメモリーCD8+ T 細胞の自然動態により近づけるという利点と、再度免疫応答に寄与する一つの集団としてメモリー細胞の分化プロセスを全般的にとらえられるという利点がある。これまで、繰り返し抗原暴露によるメモリーCD8+ T 細胞の系統、表現型、機能への影響が報告されている[22] [23] [24]が、最近、その影響を端的に示すマイクロアレイによるメモリーCD8+ T 細胞の遺伝子発現解析により、上記の Tem と Tcm では分類できないようなメモリーCD8+ T 細胞集団の複雑性・多様性が示され、新たなメモリーCD8+ T 細胞特異的な分子マーカーの探索が試みられている[25]。

上述のように異なる細胞集団の網羅的遺伝子発現解析としてよく用いられるマイクロアレイは、一般的には、あらかじめデザインされたオリゴヌクレオチ



ドプローブ(遺伝子断片)と蛍光標識された(サンプルとなる細胞由来の)cDNA とのハイブリダイゼーションで得られる蛍光強度により mRNA 発現を定量化するアナログ的なものだが、クロスハイブリダイゼーションによる高バックグラウンドレベルやシグナルのサチュレーションによるダイナミックレンジの限界などの欠点がある[26]。マイクロアレイとは対照的に、SAGE法(Serial Analysis of Gene Expression)による網羅的遺伝子発現プロファイリングでは、mRNA の3'末端の特定の短い断片を分離し(この短い断片をタグという)、アダプター連結・逆転写・制限酵素による分離などにより調製されたライブラリー(最終的には、タグをライゲーションにより連結し、コンカテマーとしたもの)をベクターに挿入し、サンガー式 DNA シーケンシングにより配列決定し、タグのカウント数により mRNA 発現を定量化するデジタル的なものである[27] [28]。当教室では、実際の遺伝子発現制御に重要なプロモーター領域と完全長 cDNA の分析において不可欠な mRNA 転写開始点(TSS)の同定に着目し、mRNA の5'側末端をタグとする5'-end SAGE法(5'-SAGE)を開発した[29]。mRNA の5'末端には、メチルGTP が三つのリン酸により逆向きに結合したキャップ構造( $m^7Gppp$ )があるが、5'-SAGE では、BAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)により不完全な mRNA やキャップ構造のないミトコンドリア由来 mRNA の5'末端リン酸基を加水分解(脱リン酸化)し(トリリン酸化合物は分解しない)、次に TAP(Tobacco Acid

Pyrophosphatase)によりピロリン酸結合を特異的に開裂することでキャップ構造をはずし、リン酸基が残った mRNA の 5'末端にリンカーを結合し、逆転写・制限酵素による分離・ライゲーションなどによりライブラリー(最終的には、コンカテマーとしたもの)を調製する。最後に、従来の SAGE 法と同様にして、サンガー式 DNA シークエンシングにより配列決定し、タグカウント数により mRNA 発現を定量化する。しかし、現実的には、このサンガー式 DNA シークエンシングはコストと時間がかかり、大規模な解析は困難で、細胞中の一部の転写産物しか定量化できなかったが、近年開発された大規模並立処理配列決定法による次世代型シーケンサーを用いることで低コストで高速に大量の塩基配列決定が可能となり、全転写産物(トランスクリプトーム)の定量化への道を開いた[26][30]。当教室では、5'-SAGE を次世代型シーケンシング(NGS)に応用した[31]。ところで、メモリーCD8+ T 細胞を特徴づける遺伝子の発現が樹立され維持される機序はまだ明らかになっていないが、その顕著な遺伝子発現パターンはエピジェネティックな変異により制御されていると考えられているため、そのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を解明することが現在注目されている[32]。エピジェネティックな変異は、遺伝しうるが、ゲノム DNA 自体に配列の変化を伴わないもので、DNA メチル化やヒストン修飾などがあり、遺伝子転写に影響を与えうるものである[33]。

DNA メチル化とは、DNA を構成する 4 種類の塩基、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)、アデニン(A)のうち、シトシンのピリミジン環の 5 位炭素原子がメチル化され、メチルシトシンとなるもので、最もよく知られているエピジェネティックな指標である。哺乳類ではほとんど全ての DNA メチル化は CpG(シトシン-リン酸基-グアニン)ジヌクレオチドのシトシン残基で起こり、CpG が高密度にあるゲノム領域は CpG アイランド(CGI)と呼ばれ、多くの遺伝子のプロモーター領域に存在するが、その領域の DNA メチル化と隣接する遺伝子の転写抑制との相関性が知られている[34] [35]。特に癌においては、腫瘍抑制遺伝子(例えば、グリオーマ[36] [37]や大腸癌[38] [39]での MGMT、乳癌・卵巣癌での BRCA1[40] など)のプロモーター領域での過剰メチル化により遺伝子発現が抑制されていることが多数発見され[41] [42]、癌の成長に影響を及ぼしている[43]。癌以外でも、アルツハイマー病で NEP[44]、フリードライヒ運動失調症で FXN[45]に過剰メチル化が見られるほか、アテローム性動脈硬化症[46]、1 型糖尿病[47]や SLE(全身性エリテマトーデス) [48] [49]など多分野の疾患において異常メチル化が報告されている[50]。以上のことから、DNA メチル化の異常が診断マーカーや治療標的としての臨床的な意義を持っている[51] [52]。また、細胞の分化に関して、メモリーCD8<sup>+</sup> T 細胞では、CTL 機能の指標となる IFN $\gamma$  のプロモーターやエンハンサー領域での低 DNA メチル化と活性化 CTL での IFN $\gamma$  の高産生能との相関

性が示されている[53] [54]。最近では、ウイルス感染後の CD8+ T 細胞の分化過程において、細胞増殖の制御因子である PD1(Programmed death 1)の TSS 上流にある高度保存領域の CGI における DNA メチル化の変化が PD1 発現 (PD1-ナイーブ T 細胞→PD1<sup>hi</sup>T エフェクター細胞→PD1<sup>low</sup> メモリーT 細胞)と相関し、疲弊 CD8+ T 細胞ではその DNA メチル化の解除が持続されることから、その領域の DNA メチル化が抗原特異的な CD8+ T 細胞の抗ウイルス機能回復の指標となりうること[55]が報告されている。このように、同じゲノム領域で異なる DNA メチル化状態を示す複数の隣接する CpG 部位を DMR (Differentially methylated region)と呼び、最も頻繁に調べられている[56] [57] が、癌などの疾患や細胞の分化[58]だけでなくゲノムのインプリンティングや細胞のリプログラミングなどに特異的な DMR も存在することから、より広範囲に渡ってゲノムワイドに DNA メチル化の状態を調べ、包括的に特性化することへの関心が高まっている[57]。そこで、IHEC (International Human Epigenome Consortium) (<http://ihc-epigenomes.org>)では、国際的なプロジェクトとして、癌を含めた多岐にわたる疾患でのエピジェネティックな状態と比較できるように、ヒトの正常組織や各種分化・未分化細胞における参照エピゲノムマップ(DNA メチル化やヒストン修飾などのマップ)を作ることを第一の目標としている[59]。この中にはメモリーCD8+ T 細胞を含めた免疫細胞も含まれている。また、欧州の

BLUEPRINT project [60] [61]、米国の Roadmap Epigenomics Project[62]などでもエピゲノムマップ作成に着手している。そして、NGS の技術を取り入れたマップ作成に対して、種々のメチロームライブラリーの作製方法も開発されている。

DNA メチル化を調べる方法としては、(i)メチルシトシンに特異的な抗体で断片化したゲノム DNA を免疫沈降し、濃縮されたメチル化 DNA 断片をアレイで検出する MeDIP (Methylated DNA Immunoprecipitation)、(ii)ゲノム DNA のバイサルファイト(亜硫酸水素塩)処理により、非メチル化シトシンはウラシルに変換され(その後の PCR 反応によりチミンに変換される)、メチルシトシンはシトシンのまま残る(PCR 反応後もシトシンのまま)ことを利用し、最後に PCR で増幅された DNA 断片の配列を確認することで、DNA メチル化を調べるバイサルファイトシーケンス法(BS)、(iii)制限酵素認識サイト内の非メチル化シトシンは切断し、メチル化シトシンは切断されないメチル化感受性制限酵素でゲノム DNA を処理をし、その制限酵素認識サイトを含めた領域が PCR 反応で増幅されることで DNA メチル化を検出する MSP(Methylation-specific PCR)などがある。それぞれの方法が NGS に応用され、幹細胞や癌など多種の細胞・組織が解析されている[63]。特に(iii)では、メチル化感受性制限酵素、HpaII で消化されたゲノム DNA の切断端に、切断部位が制限酵素認識部位より 18~20bp 下流である MmeI の認識配列を持つアダプターをライゲーションし、その MmeI 処理で DNA を断片化

することにより、DNA断片のサイズを均一にし、最終的なライブラリー調製におけるPCR反応時のバイアスを減らすことで、より正確なDNAメチル化の評価ができるというMSCC (Methylation-sensitive cut counting)が非常に注目され[64] [65]、より低コストで総リード数も増やすことができるという利点に着眼し、当教室でも、同様の方法を開発している[66]。

エピジェネティックのもう一つの大きな指標であるヒストン修飾は、ヒストンテール(ヒストンのアミノ末端)のリジン残基やアルギニン残基がアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの化学修飾を受けることで、クロマチン構造や遺伝子発現の制御に関わり、DNAメチル化とも相互に影響を及ぼし合っている[67]。ヒストン修飾の変化は主に、アセチル化・メチル化ヒストンや転写因子に対する抗体で免疫沈降するChIP(クロマチン免疫沈降法)により調べられるが、DNAメチル化解析のように、NGSにも応用され、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞も含めて[68]、様々に解析されている[69] [70]。一方、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞のNGSを用いたDNAメチル化解析はまだ報告されていない。

NGSは、「革命的技術」と表現されることが多く、一般に、DNAやRNAを短い断片(数十~数百塩基)にしてアダプター連結して作製されたライブラリーに対して、プラットフォーム間の相違はあるが、たいていは数日間で1ラン当たり数十Gbを読むことができる[71]。30億塩基対にも及ぶヒト一人分の全ゲノム

を1ランでカバーできるが、例えば、米国の '\$1,000 Genome' プロジェクト(ヒト一人分のゲノムを1000ドルという低コストで解析するシステムを目指すもの) [72]のように、今なおNGS開発は進められている。現時点(2012年10月)では、Life technologies社のIon Proton sequencerが唯一、'\$1,000 Genome'を可能にすると言われている[73]。このようなNGSの技術に基づき、国際的には、世界中の1000人以上のヒトゲノムを解析し、医学的に有用な情報となる(遺伝的変異を含めた)ヒトゲノムマップを作成するという '1000 Genomes Project' (<http://www.1000genomes.org>) [74]や、罹患率・死亡率を含めて分類された少なくとも50種類の癌における体細胞的な遺伝的異常を包括的に解読し、カタログ化しようというICGC(International Cancer Genome Consortium) [75]などが立ち上がり、得られたデータは無償で公開され、多様な疾患に対する研究への貢献が期待されている。さらに、ICGCでは、体細胞遺伝子変異を遺伝子発現とエピジェネティック変異のプロファイルと統合した完全カタログ化は、疾病表現型、予後、薬剤感受性、化学療法への抵抗性などの基盤となり、患者自身の病巣より得られた遺伝的パターンと比較することで、事前に治療効果を予測することに役立ち、個々の患者に最適化した「個別化治療」における治療法決定につながる事が期待されている[75] [76] [52]。

上述してきたような背景から、本研究では、「個別化治療」へ向けたエピゲノ

ムマッピングという時流に沿って、NGS を用いて包括的に遺伝子発現と DNA メチル化を解析することを通じて、繰り返し免疫に伴うメモリーCD8+T 細胞が樹立・維持する「免疫記憶」の特徴をなすエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を解明することを目的とする。



### 3. 方法

#### 3.1 マウスにおける感染実験、養子移入と CD8+ T 細胞の分離

CD45.1+ OT-I マウス(B6) の脾臓より分離した脾細胞を congenic marker の CD45.1(Ly5.1)-FITC 抗体で染色後、Anti-FITC Microbeads で標識し、MACS を用いた positive selection により分離した CD45.1+ T 細胞を CD8a-PerCP-Cy5.5 抗体、V $\alpha$ 2-APC 抗体で染色後、ARIA cell sorter (BD)により sorting した(CD45.1+V $\alpha$ 2+) CD8+ T 細胞(ナイーブ CD8+ T 細胞)を WT の B6 レシピエントマウス(CD45.1-) に養子移入した。その後、組換え LM-OVA (OVA 発現組換えリステリア菌)(5 x 10<sup>4</sup> CFU)の尾静脈注射により、このレシピエントマウスを感染させた。50 日以上経過後[77]、レシピエントマウスの脾細胞を分離し、ナイーブ CD8+ T 細胞分離と同様の方法で、MACS を用いた positive selection により CD45.1+細胞を enrich 後、(CD45.1+V $\alpha$ 2+) CD8+ T 細胞(1 次メモリーCD8+ T 細胞)を sorting し、さらに別の WT の B6 レシピエントマウス(CD45.1-)に養子移入した。さらに、50 日以上経過後、同様にして、レシピエントマウスの脾細胞を分離し、MACS を用いた positive selection により CD45.1+細胞を enrich 後、(CD45.1+V $\alpha$ 2+) CD8+ T 細胞(2 次メモリーCD8+ T 細胞)を sorting した。それぞれの段階において sorting したナイーブ、1 次メモリー(感染暴露後 85 日経過)、2 次メモリー(感染暴露後 80 日経

過)CD8+ T 細胞から、ゲノム DNA や RNA を抽出した。MSCC に用いたゲノム DNA と 5'SAGE-Seq に用いた RNA に用いたマウスの個体数(n)としては、ナイーブ CD8+ T 細胞では、n=27、1 次メモリーCD8+ T 細胞では、n=20、2 次メモリーCD8+ T 細胞では、n=28、を使用した。

### 3.2 アダプター精製

IDT 社より購入したオリゴヌクレオチドをアダプターは、A と B をアニーリングさせて作製し、PAGE 精製を行った。XXXXXXXXXX は、SOLiD 5500 series 用に作製されたバーコード配列で 96 種類存在する。

プライマー	塩基配列
P1 adaptor A	5'-TTTCCAACACTACGCCTCCGCTTTCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCGAC-3'
P1 adaptor B	5'-CGGTCGGATCACCGACTGCCCATAGAGAGGAAAGCGGAGGCGTAGTGG-3'
P2 adaptor A	5'-CGCCTTGGCCGTACAGCAG-3'
P2 adaptor B	5'-TTTTAACTGCCCGGGTTCCTCATTCTCTXXXXXXXXXXCTGCTGTACGGCCAAGGCGNN-3'

### 3.3 MSCC ライブラリー

ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞のゲノム DNA を HpaII(NEB) もしくはそのメチル化非感受性 isoschizomer である MspI(NEB)を用いて 37℃、オーバーナイトで制限酵素処理をし、DNA 精製と制限酵素除去のため、フェノール・クロロホルム抽出(一回)、エタノール沈殿(一回)、70%エタノール洗浄(二回)を行い、dH2O(滅菌蒸留水)に溶解した(以後、酵素処理の後は同様にして精製)。

MmeI の認識配列を持つ P1 アダプターを T4 DNA Ligase(Life Technologies)を用いて 16°C、オーバーナイトで切断端にライゲーションし、フェノクロ精製後、MmeI(NEB)を用いて 37°C、オーバーナイトで制限酵素処理をし、精製後、PAGE 精製によりサイズセレクション(60~80bp)し、サンプルごとにバーコードが異なる P2 アダプターを T4 DNA Ligase を用いて 16°C、オーバーナイトでそれぞれライゲーションする。精製後、P2 アダプター結合サンプルのアダプター結合部にリン酸基を挿入するため、DNA Polymerase I (E.coli)(NEB)を 16°C、30 分反応させ、精製後、PAGE 精製によりサイズセレクション(120~140bp)する。最後に P1・P2 アダプター由来の配列によるプライマーで、High Fidelity PCR 酵素である Prime STAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて PCR 反応(98°Cで 30 秒の後、98°C5 秒、62°C15 秒、72°C1 分を 10 サイクル繰り返した後、72°Cで 10 分反応させる)を行い、その産物(120~140bp)を PAGE 精製し、ライブラリーを作製した。その後、両端のアダプター配列や挿入断片がマウスのゲノム DNA 由来であることを確認するため、ライブラリーの一部をクローニングし、3730xl DNA Analyzer(Life Technologies)により配列を確認した。また、各サンプルのライブラリーは Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies)を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer により各ライブラリーが単一のサイズであることを確認した。ライブラリーは SOLiD(Life Technologies)によりシーケンスされた。

### 3.4 5'SAGE-Seq ライブラリー

5'SAGE-Seq ライブラリーが開発された際の論文の記載と同様にして[29]、ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T細胞のRNAから、5'SAGE-Seq ライブラリーが作製され、Illumina社のシーケンサーによりシーケンスされた。

### 3.5 データ解析に用いたマウスゲノム情報

マウスゲノムは mm9 を用い、それに付随する遺伝子情報、RefSeq gene (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/mm9/database/>)、ゲノムデータ (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/mm9/bigZips/chromFa.tar.gz>)、repeat 領域の座標 (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/mm9/bigZips//chromOut.tar.gz>) はそれぞれ UCSC より得た。

### 3.6 各細胞間の HpaII count と MspI count の変遷の広域にわたる解析

個々の制限酵素切断位置における HpaII count (HpaII を用いたライブラリーでの CCGG の位置における read 数)と MspI count (MspI を用いたライブラリーでの CCGG の位置における read 数)を広域にわたり評価するため、region enrichment を行い、各細胞間の HpaII count と MspI count の変遷を示す領域群を R による

heatmap.2 を用いて評価した。この際、HpaII count では、HpaII を用いたライブラリーでの総 read 数が最大値を示したものを総 read 数として補正を行い、個々の領域における read 数を標準化した。MspI count でも同様に、MspI を用いたライブラリーでの総 read 数が最大値を示したものを総 read 数として補正を行い、個々の領域における read 数を標準化し、次に、同じ制限酵素切断位置で標準化 HpaII count が 10 以上の細胞が全くないときは、その制限酵素切断位置における HpaII count と MspI count は評価の対象外とする region enrichment を行った[78]。HpaII count と MspI count の変遷を示す散布図においても、同様にして region enrichment を行った。

### 3.7 各細胞間の DNA メチル化状態の変化の解析

MSCC の開発グループは一般的な標準化として、 $M/(M+U)$  (M はメチル化を示すシグナル、U は非メチル化を示すシグナル)に基づき、「MspI count / MspI count + HpaII count」という指標により DNA メチル化状態を評価しているが、本研究では、 $U/(M+U)$  を DNA 非メチル化の指標として、「HpaII count / MspI count + HpaII count」という簡略な指標によって限局的な領域における DNA メチル化解析を行った。[79]

### 3.8 各遺伝子発現量のそれぞれの細胞間における相違の解析

遺伝子発現解析に関しては、総タグ数を統一して補正を行い、各遺伝子におけるタグ数を標準化した。補正後に得られたタグ数を各遺伝子の発現量として、各遺伝子発現量のそれぞれの細胞間における相違をRによるheatmap.2を用いて評価した。ただし、発現量の尺度となる標準化タグ数が3細胞集団いずれにもおいて一桁台(<10)の遺伝子は除外した。

### 3.9 統計解析

多様度指数は、以下の Simpson index を用いた。

$$SID = 1 - D = 1 - \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

$n_i$ はi番目のタグ数で、 $N$ は総タグ数である。SID = 1とは、1タグが系の全タグ数を占めることで、多様度が全くないことを意味する。SID値が大きいほど、多様度が高いことを示す[80]。

類似度指数は、以下の Morisita-Horn similarity index(MH)を用いた。

$$C_{MH}(A, B) = \frac{2\sum p_i(A)p_i(B)}{\sum\{p_i^2(A) + p_i^2(B)\}}$$

$C_{MH}(A, B)$ は2つのライブラリーA、B間のMHを示し、 $p_i(A)$ は「Aにおけるi番目のタグ数/Aの総タグ数」で、 $p_i(B)$ は「Bにおけるi番目のタグ数/Bの総タグ数」である[81]。

順位相関係数は、Spearman's rank correlation coefficient を用いた。

### 3.10 MA plot

以下の公式によりプロットした。

$$M = \log_2(Y_i) - \log_2(X_i), A = (\log_2(Y_i) + \log_2(X_i))/2$$

### 3.11 GSEA(Gen Set Enrichment Analysis) [82]

5'SAGE-Seq の標準化データを data set とし、GSEA のホームページ (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)上の説明に従い、GSEA に付属しているデータベース、MSigDB(the Molecular Signatures Database)に基づき、特異的な遺伝子発現制御や生物学的機能を共有する遺伝子群を探索した。このデータベースは、Broad Institute で公開されているもので、これまで報告されている論文や BioCarta、Gene Ontology、KEGG などが由来となっている遺伝子群を含んでいる。

GSEA では、遺伝子発現プロファイル(N個の遺伝子を含むとする)の class A と

B の発現量の大きさに基づいて各遺伝子の発現量の変動値が数値化され、 $\text{ranking}(r_1, r_2, \dots, r_N)$ される( $r$ の算出方法にはいくつかのオプションが付属しているが、いずれも class A の方が class B より発現量が多い遺伝子ほど、その  $r$  値は大きくなり、class B の方が class A より発現量が多い遺伝子ほど、その  $r$  値は小さくなる)。遺伝子の順位による並び替えが行われた遺伝子リスト ( $L$ )( $L=\{g_1, g_2, \dots, g_N\}$ )の( $r$  値が大きい方からの)順位づけに従い(ただし、 $r_j$  は、遺伝子  $g_j$  に対する数値である( $r(g_j) = r_j$ ))、データベース上の gene set( $S$ )に含まれる遺伝子群( $N_H$  個の遺伝子を含むとする)の中の各遺伝子の ES(Enrichment Score)が算出される。 $S$ に含まれる遺伝子(“hits”)( $S$ には  $L$ における  $g_i$ までが含まれるとする)と  $L$ における  $i$  番目までに存在する  $S$ に含まれない遺伝子(“misses”)から、 $|P_{\text{hit}} - P_{\text{miss}}|$ (= running ES)の最大値が ES の値となる( $P_{\text{hit}}$  と  $P_{\text{miss}}$  については下記のとおりで、 $\text{ES}(S) = \max|\text{running ES}|$  である)。Leading edge の遺伝子群は、running ES が最大値となるような Rank の遺伝子までを含めた遺伝子群と定義されている。また、gene set に示された線状の「gene tags」と呼ばれるものは、ranking list における各遺伝子の rank(ranking された全遺伝子の中の順位)を示す。

Gene set の中で、ranking list における各遺伝子の順位が上位、もしくは、下位に集積される場合、それに相当して  $\text{ES}(S)$ の絶対値は高くなる。また、gene set



$$P_{\text{hit}}(S, i) = \sum_{\substack{g_j \in S \\ j \leq i}} \frac{|r_j|^p}{N_R}, \quad N_R = \sum_{g_j \in S} |r_j|^p$$

$$P_{\text{miss}}(S, i) = \sum_{\substack{g_j \notin S \\ j \leq i}} \frac{1}{(N - N_H)}$$

※ $|r_j|^p$ における $p$ はGSEAの  
 使用者で設定する値で、通常  
 は $P=1$ に設定されている。

の中で、ranking listにおける各遺伝子の順位が、上位にも下位にも集積されず、無作為な分布となれば、ES(S)の値は小さくなる。Sに含まれる各遺伝子の中で、最大値を示す running ES が ES(S)となるが、ES(S)=0 とは、running ES が完全に横軸と重なるものを意味し(ただし、通常 ES(S)=0 を示すことはない)、この gene set との相関性が示されないと考えられる。(便宜上、以降において、「ES」と表記されている場合は、各 gene set における「ES(S)」を意味する。)

以上のように算出されたこの running ES の最大値(ES(S))やその gene set に含まれる遺伝子数を計上して算出された NES(Normalized Enrichment Score)がその gene set が示す表現型(Enrichment plot 名として表記)との相関性を示す。

そして、positively correlated とは、class A でより発現量が大きかった遺伝子群、negatively correlated とは class B でより発現量が大きかった遺伝子群を示す。本研究では、5' SAGE-Seq の標準化データをこのように class A、class B にセットして繰り返し免疫に伴うメモリーCTL の表現型を示す gene set を探索した。

### 3.12 UCSC genome browser によるデータ表示

SAMtools を用いて、MSCC の SAM file を BAM file に変換し、さらに、BEDtool を用いて、BAM file を BED file に変換して、UCSC のホームページ (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)上の説明に従い、UCSC genome browser に BED file を upload した。

### 3.13 DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) bioinformatics resources [83]

DAVID bioinformatics resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) における Functional Annotation Tools の Functional Annotation clustering を用いて、2 倍以上発現量に変動した、もしくは標準化タグ数が 0 から 2 以上に変動した遺伝子リスト中の遺伝子群と相関性があるデータベース上の annotation term を検索した(gene-term enrichment という)。このデータベースは、米国の NCI(National Cancer Institute)、Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics で公開されているもので、これまで報告されている論文や Gene Ontology、SWISS-PROT、InterPro、PANTHER、KEGG などが由来となっている annotation term における遺伝子群を含んでいる。Functional Annotation Tool では、遺伝子リストを upload することで、修正 Fisher's exact test により、遺伝子リスト中の遺伝子群と相関性があるそれぞれの

annotation term における EASE (Expression Analysis Systematic Explorer) score (=P-Value)が算出される。P-Value=0 は perfect enrichment を示し、通常 P-Value ≤ 0.05 を示す annotation term とは強い相関性があると想定される。また、補正值としては、Bonferroni, Benjamini and FDR(False Discovery Rate)を用いた。Count は遺伝子リストの中で annotation term に含まれる遺伝子数で、%はその遺伝子数の遺伝子リストにおける割合を示す。

### 3.14 RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative PCR)

各遺伝子に対して、Forward primer と Reverse primer の set をそれぞれ設計する。ナイーブ、1次、2次メモリーCD8+ T細胞由来の mRNA より逆転写された cDNA をテンプレートとし、各 primer set と SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies))とをそれぞれ混合し、7500 Real Time PCR system (ABI) により反応させる。

Gene name	Primer orientation	Primer sequence
<b>Ifng</b>	Forward	GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT
	Reverse	GTCACCATCCTTTTGCCAGT
<b>Rps271</b>	Forward	AAACATAAGAAGAAACGGCTGG
	Reverse	AGTAATCTTGTAGCAACCTGGA

<b>Bcl11b</b>	Forward	ATGTTCTCTCAGGCTTCTCC
	Reverse	TGGGACACAGTCAAGTTACC
<b>Klrg1</b>	Forward	ACCTCCAGCCATCAATGTTC
	Reverse	CCTCTGGACGAGGAATGGTA
<b>Tbx21</b>	Forward	AGCAAGGACGGCGAATGTT
	Reverse	GTGGACATATAAGCGGTTCCC
<b>Gapdh</b>	Forward	ACTCTTCCACCTTCGATGC
	Reverse	CCGTATTCATTGTCATACCAGG

Real-Time PCR (qPCR)により得られるデータの解析に関しては、Delta Rn (normalized reporter fluorescence) に任意の threshold line を設定し、蛍光シグナルによる増幅曲線と交差する  $C_T$ (threshold cycle)値を PCR cycle と定義すると、各遺伝子に対する任意の PCR 産物量(threshold line)に達するまでの PCR cycle 数( $C_T$  値)の差により、各サンプルにおける各遺伝子の初期量を比較定量することができる(例えば、1 cycle の差がある場合は、初期量に 2 倍量の差がある)。これを比較  $C_T$ 法( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法)といい、以下のように、 $\Delta C_T$ 、 $\Delta\Delta C_T$ を算出し、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ の値を相対発現量とする。ただし、 $\Delta\Delta C_T$ では、ナイーブ CD8+ T 細胞(N)を基準となるキャリブレーションサンプルとして、1次( $1^\circ$ )、2次( $2^\circ$ )メモリーCD8+

T 細胞における各遺伝子の  $\Delta\Delta C_T$  値を算出する。

- $\Delta C_T = \text{mean } C_T (\text{gene of interest}) - \text{mean } C_T (\text{internal control})$

- $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (1^\circ \text{ or } 2^\circ) - \Delta C_T (N)$

本研究では、internal control に Gapdh を用いた。最後に、各サンプルにおける各遺伝子の mRNA 量の変化として、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  の値を plot する。[84]

### 3.15 MS-qPCR (Methylation-Specific qPCR)

ナイーブ、1 次、2 次メモリー CD8<sup>+</sup> 細胞由来のゲノム DNA を EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) により bisulfite 処理し、EpiTect Whole Bisulfite Kit (QIAGEN) により bisulfite 変換ゲノム DNA を増幅する。また、各遺伝子の HpaII サイト内もしくはプロモーター領域を含むように methylation specific primer と unmethylation specific primer の set を以下のようにそれぞれ設計する。

Gene name	Primer orientation	Primer sequence	
Ifng (HpaII site)	Common forward	TGAAGAAAGGGTGTGTGTGTG	
	Methylation reverse	CCTAAACCATTCCCGAAATAA	
	Unmethylation reverse	CCTAAACCATTCCCAAATAATACA	
	(Promoter region)	Methylation forward	TGGTTGATCGTGGTTGATGT
		Methylation reverse	CGTAACACCCCATCTTCTCAA
		Unmethylation forward	TGGTTGGTTGATTGTGGTTG
	Unmethylation reverse	CATAACACCCCATCTTCTCAA	

<b>Rps271</b> (HpaII site within CpG island)	Methylation forward	ATTGAGACGGGAGTTTAGAGC
	Methylation reverse	AACAACCTCCGAAATAAAAACG
	Unmethylation forward	ATTATTGAGATGGGAGTTTAGAGT
	Unmethylation reverse	AACAACCTCCAAAATAAAAACAACA
<b>Bcl11b</b> (HpaII site within CpG island)	Methylation forward	GTTGGTGGCGGGGTTTGGAG
	Methylation reverse	CGCGCTCGCCAACTTTTCCCG
	Unmethylation forward	GTTGGTGGTGGGGTTTGGAGAG
	Unmethylation reverse	CACACTCACCAACTTTTCCCA
<b>Klrg1</b> (HpaII site)	Methylation forward	ATTTGTCGTTGGTGTTATTTT
	Methylation reverse	TCCATTTTTTAACACATAAAAAATCTACCG
	Unmethylation forward	ATTTGTTGTTGGTGTTATTTT
	Unmethylation reverse	TTCCATTTTTTAACACATAAAAAATCTACCA
(Promoter region)	Methylation forward	ACGTGGCGGGATATTAATTC
	Methylation reverse	AAAACAAACACGCTCGTCTT
	Unmethylation forward	TAGATGTGGTGGGATATTAATTT
	Unmethylation reverse	AAAAACAAACACACTCATCTTTA
<b>Tbx21</b> (HpaII site within CpG island)	Methylation forward	GTTTTTTCGGGTTTGGCG
	Methylation reverse	ACAAAATAACCATCCACGAAC
	Unmethylation forward	GTTTTTTTGGGTTTGGTG
	Unmethylation reverse	ACAAAATAACCATCCACAAAC

各細胞由来の、bisulfite 処理後、増幅したゲノム DNA をテンプレートとし、各 methylation specific primer set もしくは unmethylation specific primer set と SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies))とをそれぞれ混合し、7500 Real Time PCR system (ABI) により反応させる。

MS-qPCR の解析に関しては、上記の RT-qPCR と同様に、蛍光シグナルによる増幅曲線が Delta Rn の任意の threshold line と交差する  $C_T$  値を PCR cycle と定義し、各遺伝子のゲノム上のターゲットとする領域の DNA 非メチル化の割合を以下の式により相対的に定量化する。

$$\text{Unmethylation index} = 2^{(\text{methylated } C_T - \text{unmethylated } C_T)}$$

※Methylated  $C_T$  は methylation specific primer を用いて得られた  $C_T$  値。

Unmethylated  $C_T$  は unmethylation specific primer を用いて得られた  $C_T$  値。

最後に、各サンプルにおける各遺伝子のゲノム上のターゲットとする領域の DNA メチル化状態の変化として、Unmethylation index を plot する。[85]

## 4. 結果

### 4.1 繰り返し感染によるメモリーCD8+ T細胞の広域にわたる DNA メチル化状態の変遷と遺伝子発現の相違

ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T細胞のDNAメチル化と転写制御の変化をゲノムワイドに評価するため、MSCCと5'SAGE-Seqを行った。MSCCと5'SAGE-Seqのライブラリーに用いたそれぞれの細胞をsortingした際の純度は99.9%、99.5%、100%だった(図1)。

図1. MSCCと5'SAGE-Seqライブラリーに用いた各細胞の純度

Naiveはナイーブ、Primaryは1次メモリー、secondaryは2次メモリーCD8+ T細胞のことである。

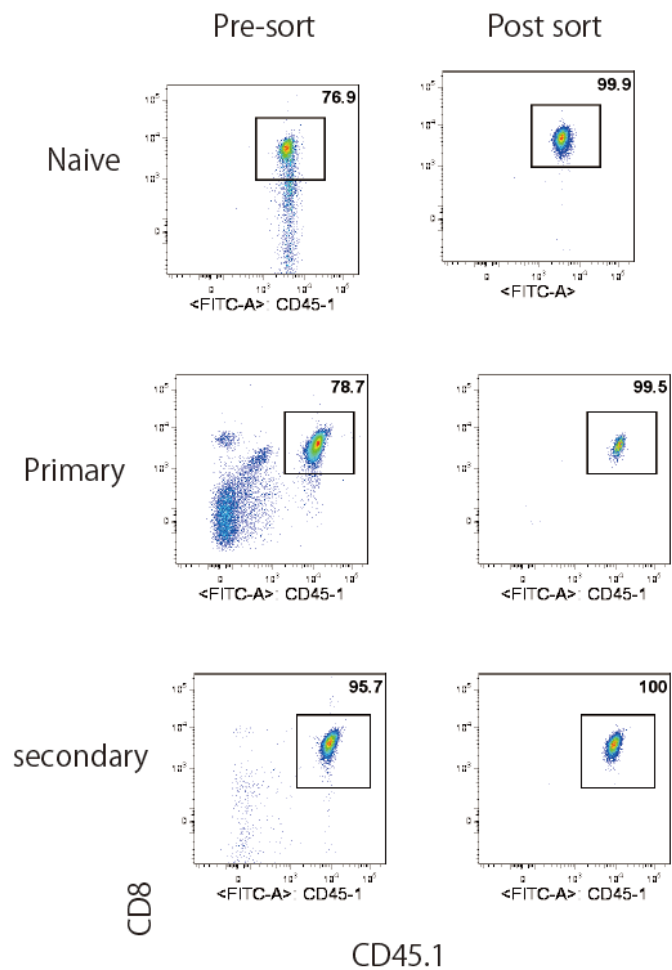




表 1. MSCC と 5'SAGE-Seq のマウスゲノムへの mapping の概要

A. MSCC

Cell type	Restriction enzyme of MSCC library	Total mapped read numbers	Uniquely matched read numbers (%)
Naïve CD8+ T cells	HpaII	5140801	1144860(22.3)
1° memory CD8+ T cells	HpaII	6152036	1272406(20.7)
2° memory CD8+ T cells	HpaII	6634772	1423884(21.5)
Naïve CD8+ T cells	MspI	8509455	2047629(24.1)
1° memory CD8+ T cells	MspI	9325678	2279400(24.4)
2° memory CD8+ T cells	MspI	12726779	2983332(23.4)

B. 5'SAGE-Seq

Cell type	Total mapped tags	Uniquely matched tags (%)	Tags in Refseq	Gene number
Naïve CD8+ T cells	6322847	3399234(53.8)	2391542	9997
1° memory CD8+ T cells	6326491	4028359(63.7)	2985168	10533
2° memory CD8+ T cells	6880234	4722919(68.6)	3490719	10204

(A)MSCC、(B)5'SAGE-Seq の mapping 結果。5'SAGE-Seq においては、read が、TSS より 500bp 上流からその RefSeq 遺伝子の末端までの範囲以内で開始位置が始まっていた場合は、「unique tag」に含めた。

MSCC と 5'SAGE-Seq におけるマッピング結果は表 1 のようになった。MSCC では、SINE(short interspersed nuclear element)や LINE(long interspersed nuclear element)などの繰り返し配列の位置の read は全て除いた。DNA メチル化の指標となりうる HpaII count と MspI count は、図 2 の chr16 の例示のように、他の染色体でもそれぞれ各細胞において大きな差は見られなかった。

広域にわたる各細胞間の HpaII count と MspI count の変遷においては、HpaII count では、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に変化していく領域が非常に多く見られたが、その領域における MspI count はほとん

ど大きな変化を示さなかった(図 3)。

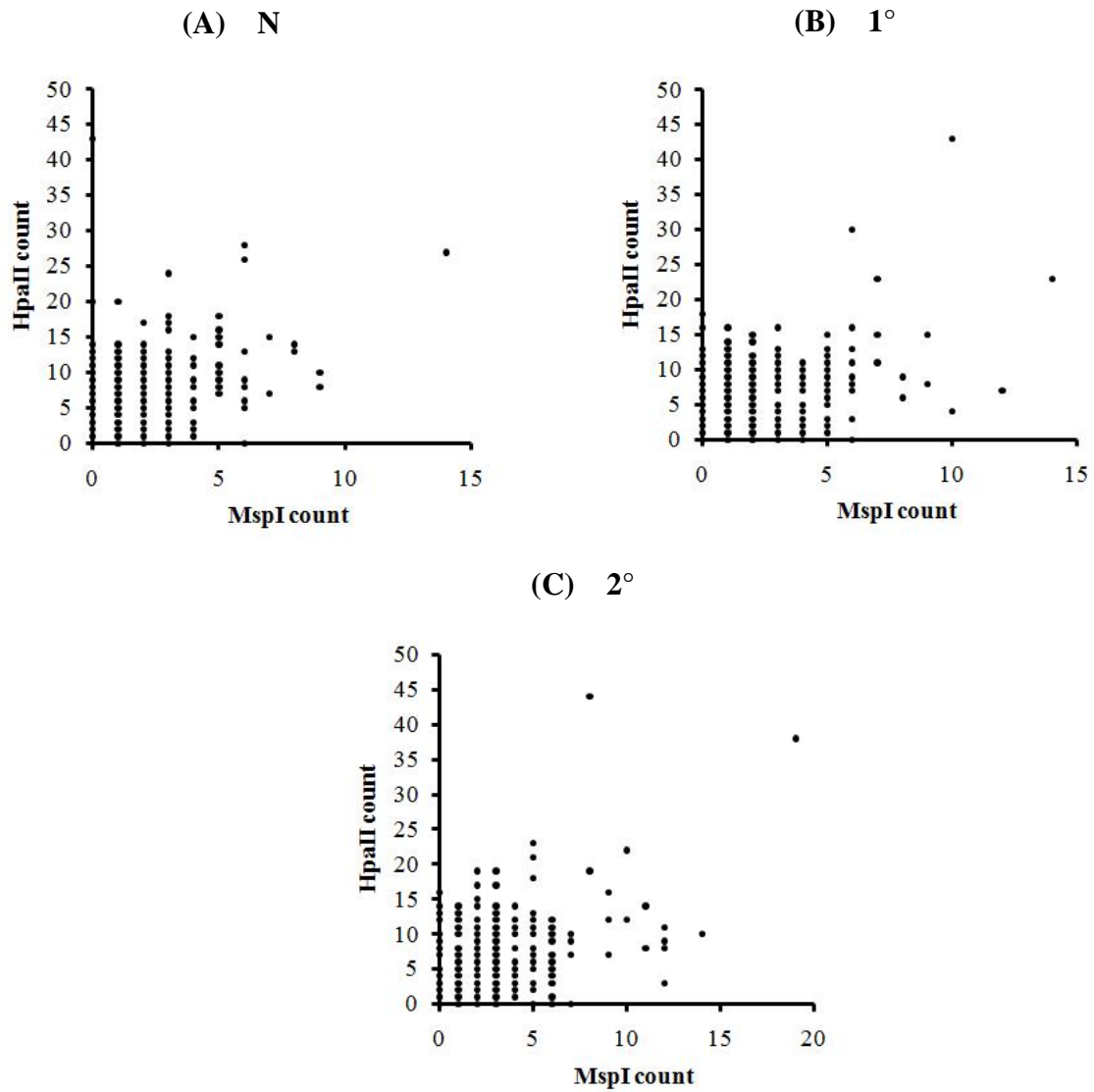
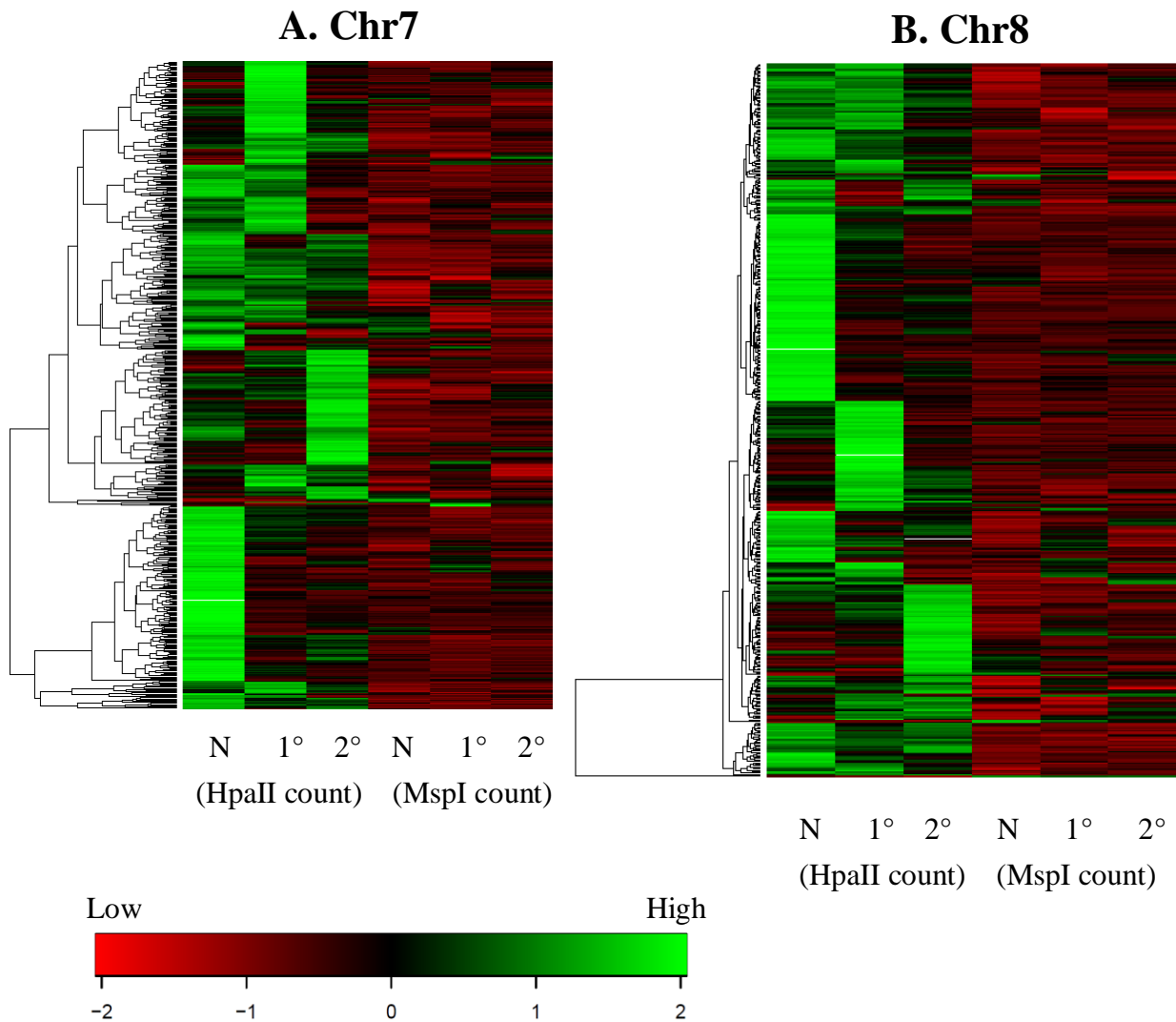


図 2. 各細胞間の HpaII count と MspI count の散布図

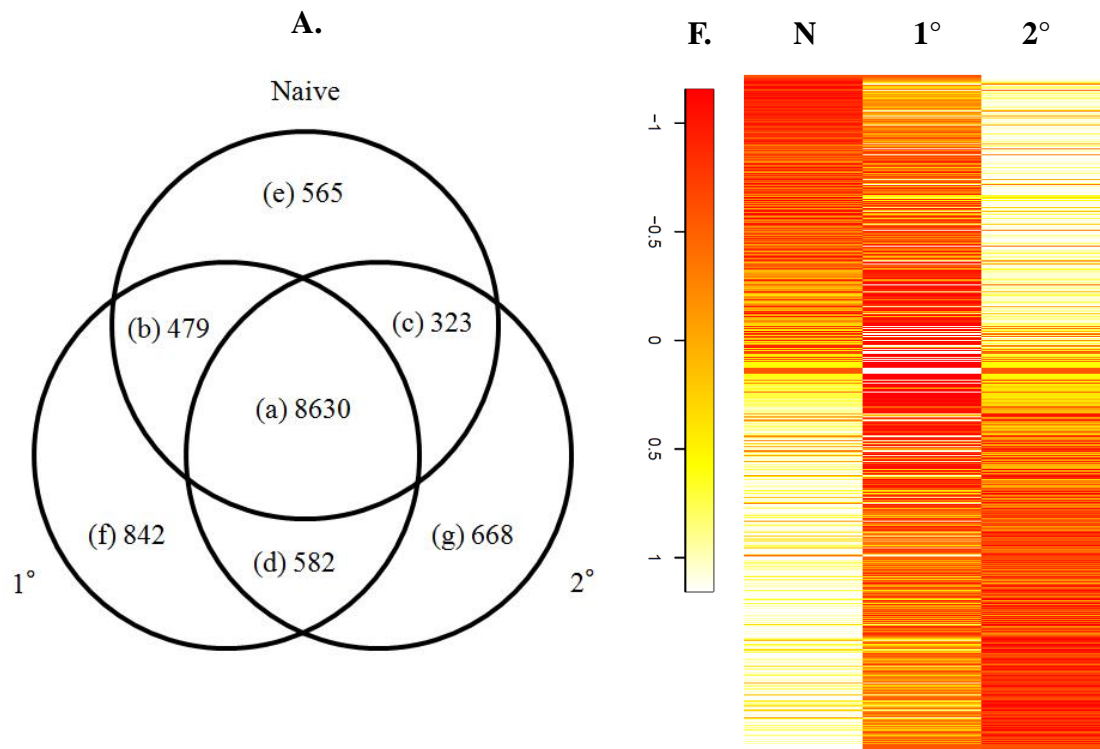
各細胞の Chr16 において、同制限酵素切断位置における HpaII により切断された read 数(HpaII count)と MspI により切断された read 数(MspI count)の散布図。N はナイーブ(A)、1° は 1 次メモリー(B)、2° は 2 次メモリー(C)CD8+ T 細胞のことである。



**図 3. 各細胞間の HpaII count と MspI count の広域での変遷**

各細胞の 7 番染色体(Chr7)(A)と 8 番染色体(Chr8)(B)において、同制限酵素切断位置における HpaII と MspI による MSCC ライブラリーでのそれぞれの read 数(それぞれを HpaII count、MspI count と表記)を比較したヒートマップ。目盛りの -2 は同制限酵素切断位置における read 数が最も低い相対値を示し、2 は read 数が最も高い相対値を示す。N はナイーブ、1° は 1 次メモリー、2° は 2 次メモリー CD8+ T 細胞のことである。

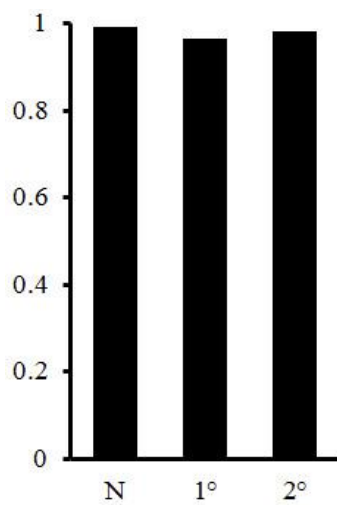
5'SAGE-Seq では、唯一マッピングされた発現遺伝子の種類はそれぞれ 9,997、10,533、10,204 と大きな相違はなかった。RefSeq にマッピングされ、遺伝子発現解析に用いる総タグ数はそれぞれ、2,391,542、2,985,168、3,490,719 と相違があったため、総タグ数を 3,000,000 と統一して補正を行い、各遺伝子におけるタグ数を標準化した。補正後に得られたタグ数を各遺伝子の発現量として、以降の遺伝子発現解析に用いた。それぞれの細胞の全発現遺伝子の発現量に関して、多様性指数は、ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーではそれぞれ、0.990234、0.964072、0.982751 といずれも 1 に近い値となり、同程度の高い多様性を示した。類似度指数は、ナイーブと 1 次メモリーが 0.328092、ナイーブと 2 次メモリーが 0.398289、1 次メモリーと 2 次メモリーが 0.865313 となり、1 次メモリーと 2 次メモリーで高い類似性を示した。それぞれの細胞の各遺伝子発現量の相違を示すヒートマップでも、ナイーブと比べ、1 次メモリーと 2 次メモリーの全体としての高い類似性が視覚的に示された(ヒートマップでは、ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーのいずれもが一桁のタグ数しか認められなかった遺伝子は含まれていない)。順位相関係数は、ナイーブと 1 次メモリーが 0.917541、ナイーブと 2 次メモリーが 0.911176、1 次メモリーと 2 次メモリーが 0.924796 となり、いずれも+1 に近く、同等に強い正の相関関係があることを示した。(図 4)



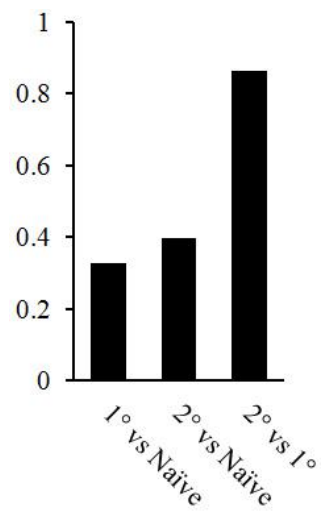
**B.**

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	Total
Naïve	86.33%	4.79%	3.23%	0	5.65%	0	0	100%
1°	81.93%	4.55%	0	5.53%	0	7.99%	0	100%
2°	84.58%	0	3.17%	5.70%	0	0	6.55%	100%

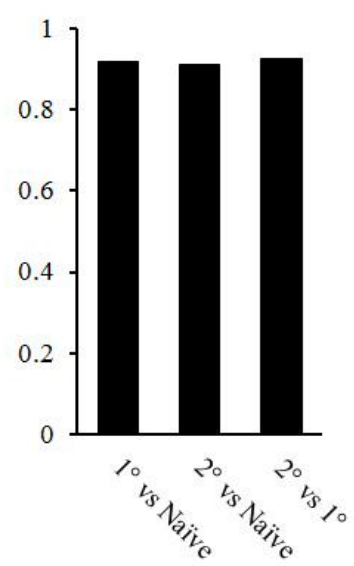
**C. 多様度指数**



**D. 類似度指数**



**E. 順位相関係数**



#### 図 4. 各細胞の発現遺伝子の分布

(A) 各細胞に発現している遺伝子の分布を示したベン図と、(B)それぞれの細胞における割合。(C)各細胞における多様度指数。(D)それぞれの細胞間での類似度指数と(E) 順位相関係数。(F)各遺伝子発現量のそれぞれの細胞間における相違を比較した heatmap。目盛りの -1 は標準化タグ数が最も低い相対値を示し、2 は標準化タグ数が最も高い相対値を示す。N もしくは Naive はナイーブ、1° は 1 次メモリー、2° は 2 次メモリーCD8+ T 細胞のことである。

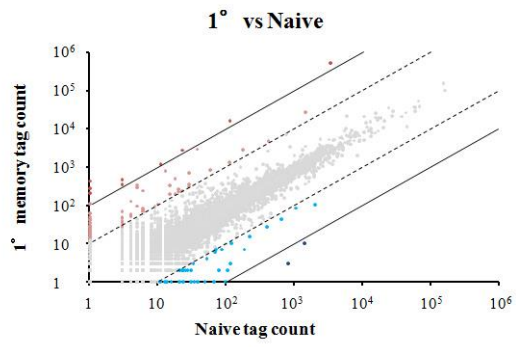
#### 4.2 繰り返し感染によるメモリーCD8+ T 細胞全体の DNA メチル化と遺伝子発現制御の変化

TSS の同定に有効である 5'SAGE-Seq を用いた点と、高発現遺伝子と低発現遺伝子において TSS の上流や下流の領域での DNA メチル化の状態が異なりうる [64]という点に着目し、概ね TSS を中心とし、その上流あるいは下流までの領域における DNA メチル化状態を評価することとし、それぞれの制限酵素切断位置における「HpaII count / MspI count + HpaII count」の値を指標とし、各領域において平均化した値によりそれぞれの領域における全体的な DNA メチル化の状態を比較した (平均値がより低い場合はよりメチル化されている領域であることを意味する)。そこで、DNA メチル化と遺伝子発現の関係を評価するため、図 4 のようにそれぞれの細胞の発現遺伝子を分類した。ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞全てにおいて発現している遺伝子(a)の数は 8630 とそれぞれの細胞において 80%以上を占めた。ナイーブと 1 次メモリー(b)、ナイーブと 2 次メモリー(c)、1 次メモリーと 2 次メモリー(d)のそれぞれ 2 グループのみ

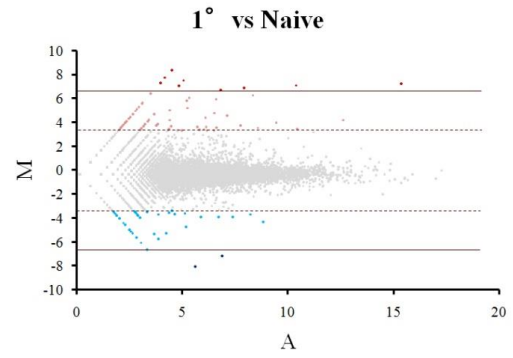
に発現している遺伝子の数は(b)479、(c)323、(d)582 と全体における割合は数%にしか満たなかった。ナイーブと1次メモリー((a)+(b))で発現している同遺伝子の割合がナイーブにおいて90%以上を占め、同様に1次メモリーと2次メモリー((a)+(d))で発現している同遺伝子の割合が2次メモリーにおいて90%以上を占めた。発現している同遺伝子の割合は、1次メモリーと2次メモリー(d)、ナイーブと1次メモリー(b)、ナイーブと2次メモリー(c)の順に高く、ナイーブと比べて1次メモリーと2次メモリーの特徴がより近いものであること、また、1次メモリーと比べ、2次メモリーはナイーブとの特徴がやや遠くなっていることを示している。さらに、ナイーブ(e)、1次メモリー(f)、2次メモリー(g)のみに発現している遺伝子は数%だった。

(a)における散布図(図5)より、ナイーブと1次メモリーでは発現量が100倍以上の差がある遺伝子は11と少数だが、ナイーブと2次メモリーでは発現量が100倍以上の差がある遺伝子数は17と増加している。発現量が10倍以上100倍以下の差がある遺伝子数に関しても、ナイーブと1次メモリーでの105と比べ、ナイーブと2次メモリーでは194と同様の増加傾向が見られた。

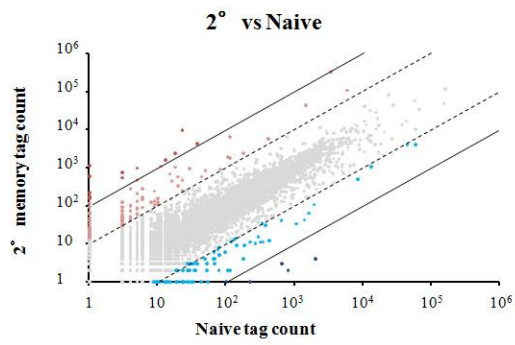
**A.**



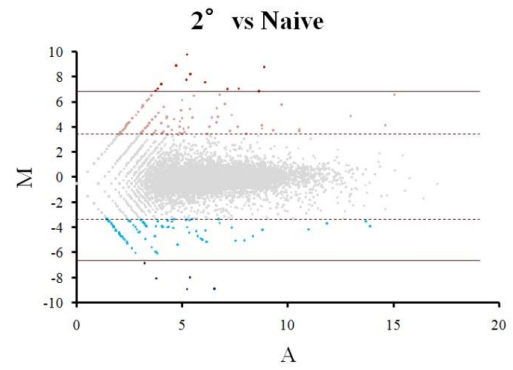
**D.**



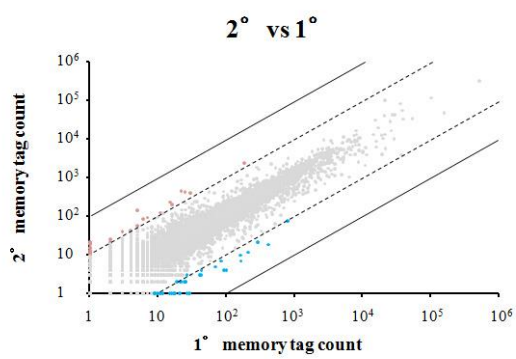
**B.**



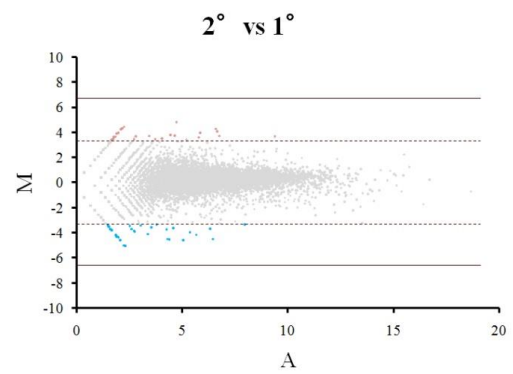
**E.**



**C.**

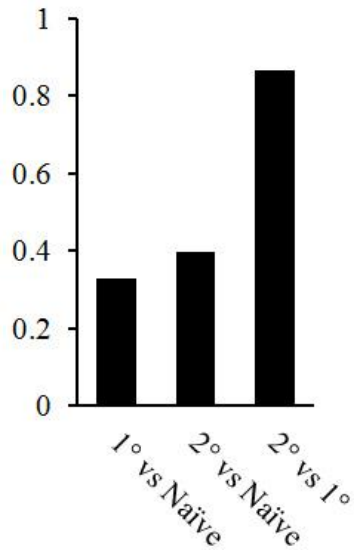


**F.**





G. 類似度指数



H. 順位相関係数

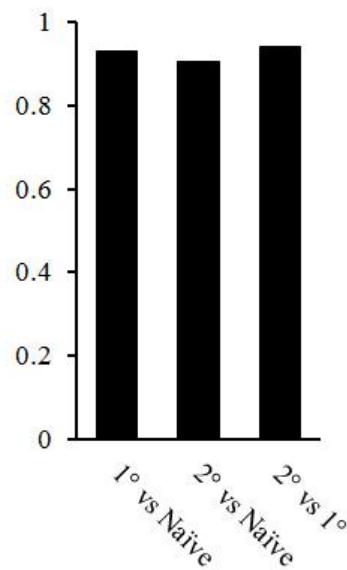
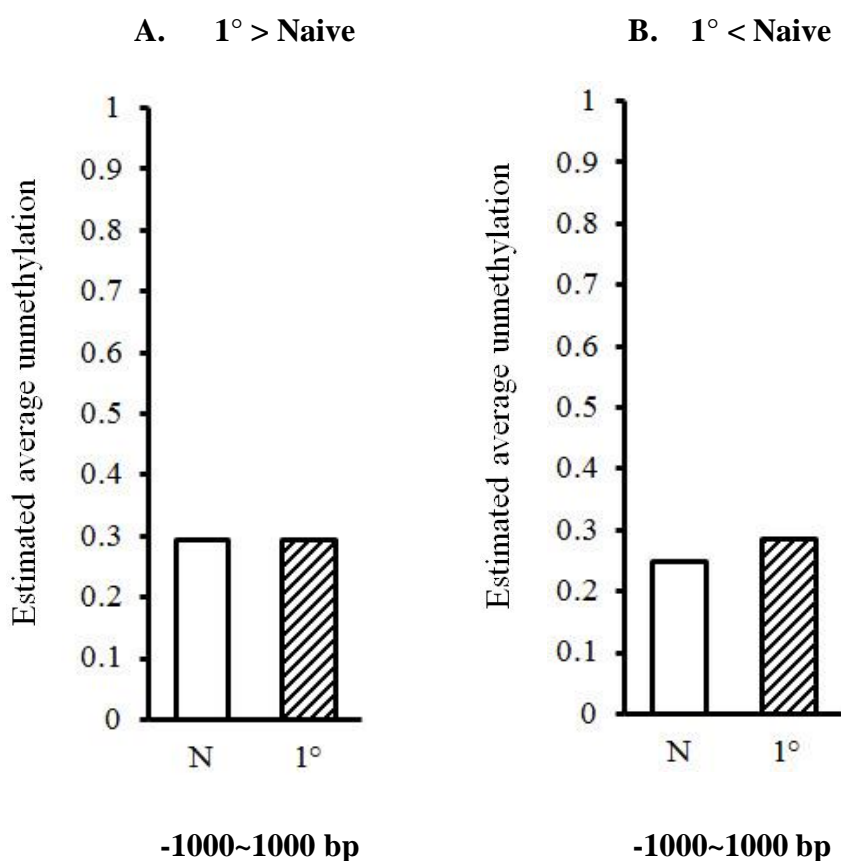


図 5. ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞全てにおいて発現している遺伝子の分布

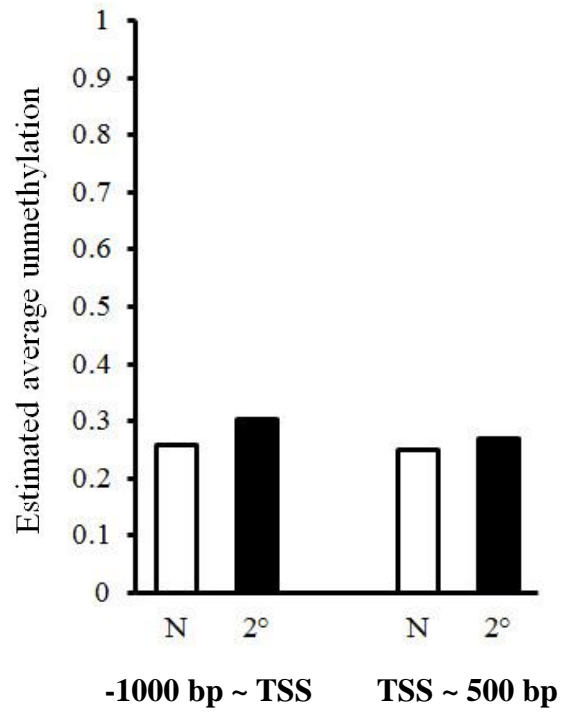
図 4A における(a)の遺伝子のそれぞれの細胞間での散布図(A)(B)(C)と MA plot(D)(E)(F)。ただし、 $M = \log_2(Y_i) - \log_2(X_i)$ 、 $A = (\log_2(Y_i) + \log_2(X_i))/2$ 。赤点は  $Y_i / X_i > 100$ 、ピンク点は  $100 > Y_i / X_i > 10$ 、青点は  $0.1 > Y_i / X_i > 0.01$ 、紺点は  $0.01 > Y_i / X_i$  の発現量を示す遺伝子 ( $X_i$ 、 $Y_i$  は細胞 X、Y における i 番目の遺伝子のそれぞれの細胞における発現量)。(G) 図 4A における(a)でのそれぞれの細胞間での類似度指数と(H) 順位相関係数。N もしくは Naive はナイーブ、1° は 1 次メモリー、2° は 2 次メモリーCD8+ T 細胞のことである。

1 次メモリーと 2 次メモリーでは、発現量が 100 倍以上の差がある遺伝子は全く存在せず、10 倍以上 100 倍以下の差がある遺伝子数が 74 と、ナイーブと 1 次メモリー、ナイーブと 2 次メモリーと比べてもより少ない遺伝子数しか発現量の大きな差を示さなかった。ナイーブと 2 次メモリーでは発現量が大きく異なる遺伝子数が多く、1 次メモリーと 2 次メモリーでは発現量が大きく異なる遺伝子数が少ないという結果は、M-A plot により端的に示された。

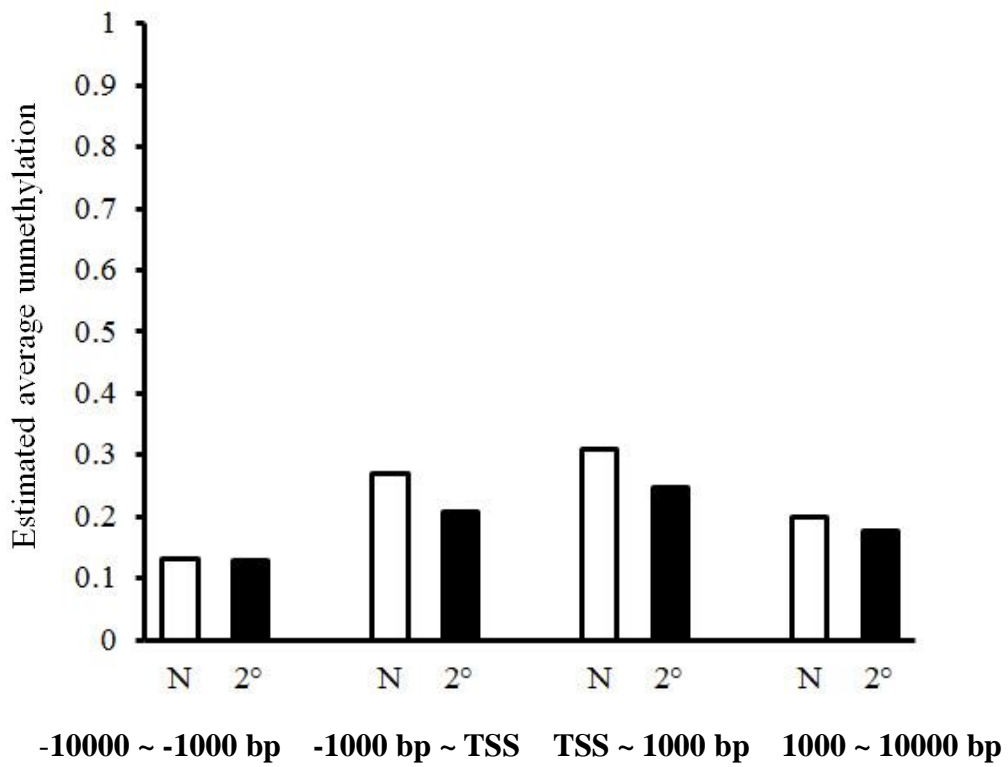
(a)における類似度指数は、ナイーブと1次メモリーが0.328016、ナイーブと2次メモリーが0.398173、1次メモリーと2次メモリーが0.865512となり、全体における類似度指数と数値はほとんど変わらず、同様に1次メモリーと2次メモリーで高い類似性を示した。(a)における順位相関係数は、ナイーブと1次メモリーが0.932359、ナイーブと2次メモリーが0.907034、1次メモリーと2次メモリーが0.944005となり、全体における順位相関係数と数値はほとんど変わらず、いずれも+1に近く、同等に強い正の相関関係があることを示した。



**C. 2° > Naive**



**D. 2° < Naive**



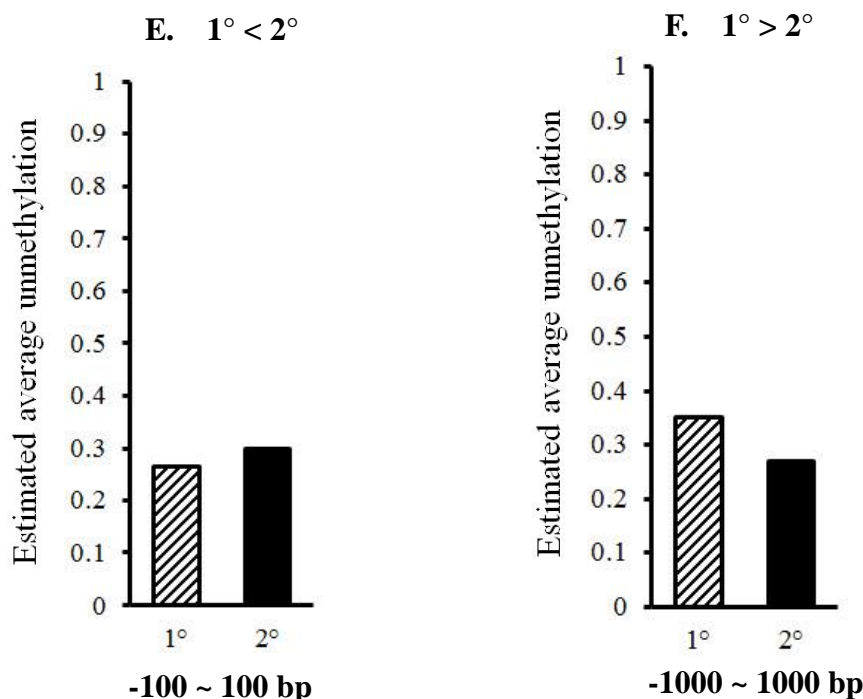


図 6. ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞全てにおいて発現している遺伝子で発現変動が大きかった遺伝子の DNA メチル化状態

(A) ナイーブと 1 次メモリーCD8+ T 細胞を比較した図 5(A)(C)において、 $Y_i / X_i > 10$  の発現量を示す遺伝子の、(B)  $0.1 > Y_i / X_i$  の発現量を示す遺伝子の各領域における全体的なメチル化状態。(C) ナイーブと 2 次メモリーCD8+ T 細胞を比較した図 5(B)(D)において、 $Y_i / X_i > 10$  の発現量を示す遺伝子の、(D)  $0.1 > Y_i / X_i$  の発現量を示す遺伝子の各領域における全体的な DNA メチル化状態。(E) 1 次メモリーと 2 次メモリーCD8+ T 細胞を比較した図 5(C)において、 $Y_i / X_i > 10$  の発現量を示す遺伝子の、(F)  $0.1 > Y_i / X_i$  の発現量を示す遺伝子の各領域における全体的なメチル化状態。 $X_i$ 、 $Y_i$  は細胞 X、Y における i 番目の遺伝子のそれぞれの細胞における発現量を指す。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。Naive はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■)CD8+ T 細胞における平均値。

(a)における DNA メチル化の状態に関して、ナイーブより 1 次メモリーの方が 10 倍以上高く発現している遺伝子群(図 5A、D の赤点とピンク点)では、TSS より 1000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、1 次メモリーで全体的にやや脱メチル化されている傾向が見られた。この遺伝子群には 2 次メモリーの方がナイーブ

ープと 1 次メモリーより発現量が低いものや高いものが混在していたが、全体として 2 次メモリーではよりメチル化傾向があった。1 次メモリーよりナイーブの方が 10 倍以上高く発現している遺伝子群(図 5A、D の青点と紺点)でも、前者と TSS より 1000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、1 次メモリーに全体的に脱メチル化されている傾向が見られた。同様に、この遺伝子群にも 2 次メモリーの方がナイーブと 1 次メモリーより発現量が低いものや高いものも混在していたが、全体として 2 次メモリーではナイーブよりやや脱メチル化傾向があり、1 次メモリーよりメチル化傾向があった。この結果により、ナイーブより 1 次メモリーの方が 10 倍以上高く発現している遺伝子群では、遺伝子発現が脱メチル化により正に制御されていることが示唆される。

ナイーブより 2 次メモリーの方が 10 倍以上高く発現している遺伝子群(図 5B、E の赤点とピンク点)では、1000bp 上流から TSS までの領域で、2 次メモリーで全体的に脱メチル化されている傾向が強く見られた。この遺伝子群には 1 次メモリーの方がナイーブと 2 次メモリーより発現量が低いものや高いものが混在していたが、全体として 1 次メモリーではよりメチル化傾向があった。TSS より 500bp 下流までの領域でも、2 次メモリーで全体的に脱メチル化されている傾向が顕著に見られた。1 次メモリーでは全体としてナイーブと 2 次メモリーより脱メチル化傾向があった。2 次メモリーよりナイーブの方が 10 倍以上高く発現

している遺伝子群(図 5B、D の青点と紺点)では、TSS より 10000 から 1000bp まで上流の領域、1000bp 上流から TSS までの領域、TSS から 1000bp まで下流の領域、TSS より 1000bp から 10000bp まで下流の領域のいずれにおいても 2 次メモリーで全体的にメチル化されている傾向が見られた。特に TSS より 1000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、そのメチル化傾向はより顕著だった。同様に、この遺伝子群には 1 次メモリーの方がナイーブと 2 次メモリーより発現量が低いものや高いものが混在していた(1 次メモリーにおける発現量はナイーブより高く、2 次メモリーより低い遺伝子がほとんどであった)が、いずれの領域においても、1 次メモリーのメチル化傾向はナイーブと 2 次メモリーの間であり、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的なメチル化傾向の変化が見られた。この結果により、これらの遺伝子群では、DNA メチル化により遺伝子発現が負に制御され、脱メチル化により正に制御されていることが強く示唆される。

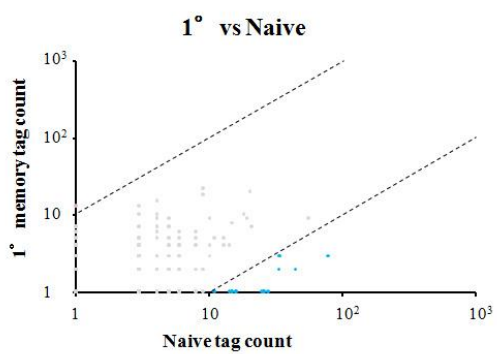
1 次メモリーより 2 次メモリーの方が 10 倍以上高く発現している遺伝子群(図 5C、F のピンク点)では、TSS より 100bp 上流から 100bp 下流までの領域で、1 次メモリーで全体的に脱メチル化されている傾向が顕著に見られた。この遺伝子群にはナイーブの方が 1 次メモリーと 2 次メモリーより発現量が低いものや高いものが混在していたが、全体としてナイーブでは 1 次メモリーと 2 次メモ

リーより脱メチル化傾向があった。2次メモリーより1次メモリーの方が10倍以上高く発現している遺伝子群(図5C、Fの青点)では、TSSより1000bp上流から1000bp下流までの領域で、1次メモリーで全体的に脱メチル化されている傾向が顕著に見られた。同様に、この遺伝子群にはナイーブの方が1次メモリーと2次メモリーより発現量が低いものや高いものが混在していたが、全体としてナイーブのメチル化傾向は1次メモリーと2次メモリーの間であった。この結果により、これらの遺伝子群では、DNAメチル化により遺伝子発現が負に制御され、脱メチル化により正に制御されていることが強く示唆される(図6)。

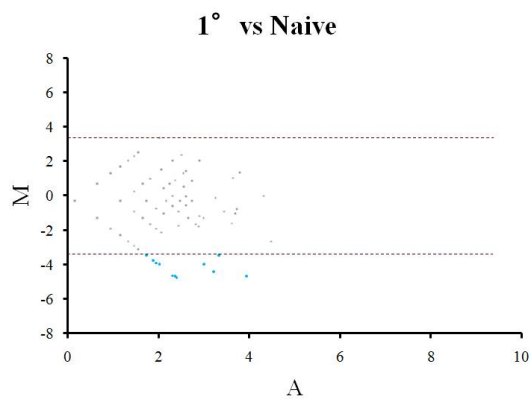
次に、(b)(c)(d)に関して、散布図(図7)より、ナイーブと1次メモリーのみ、ナイーブと2次メモリーのみ、1次メモリーと2次メモリーのみに発現している遺伝子の発現量はいずれも大きくなく、発現量が100倍以上の差がある遺伝子は全く存在しなかった。発現量が10倍以上の差がある遺伝子数に関して、ナイーブと1次メモリーのみでの16((b)の中の3.34%)に比べ、ナイーブと1次メモリーのみでは5((c)の中の1.548%)、1次メモリーと2次メモリーのみでは10((d)の中の1.718%)だった。また、ナイーブと1次メモリーのみ(b)、ナイーブと1次メモリーのみ(c)では20遺伝子がナイーブにおいてそれぞれ発現量が10倍以上大きく、1次メモリーと2次メモリーのみ(d)では9遺伝子が2次メモリーにおいて発現量が10倍以上大きかった。さらに、M-A plotにより、1次メモリーと2次メモ

モリーのみ(d)に発現しているいくつかの遺伝子(i)(図 7F)は発現量が顕著に大きいことが端的に示された。

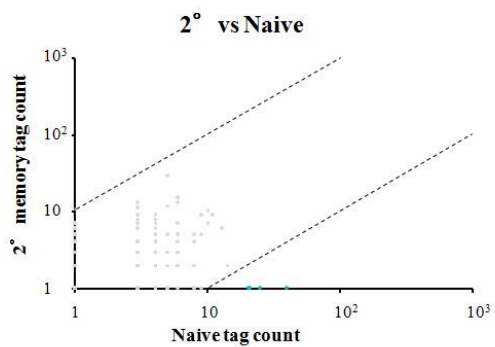
**A.**



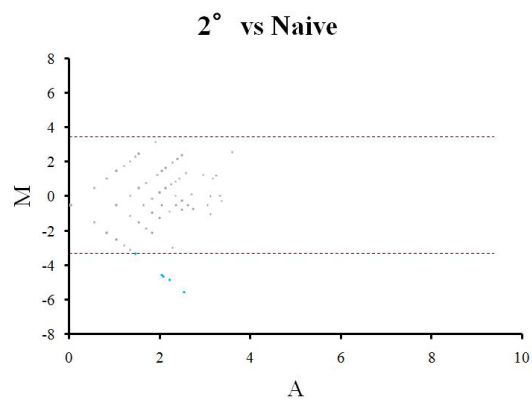
**D.**



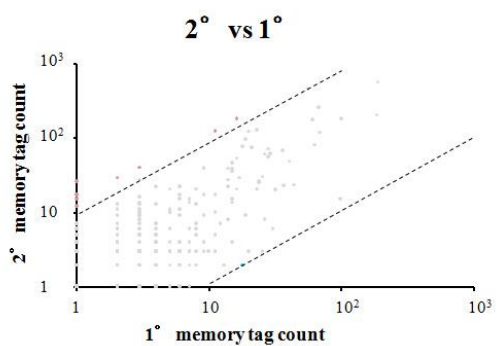
**B.**



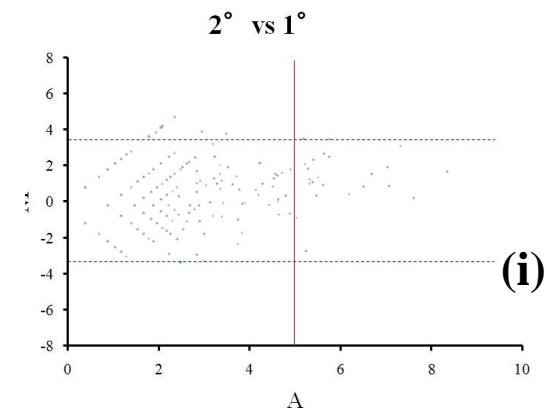
**E.**



**C.**

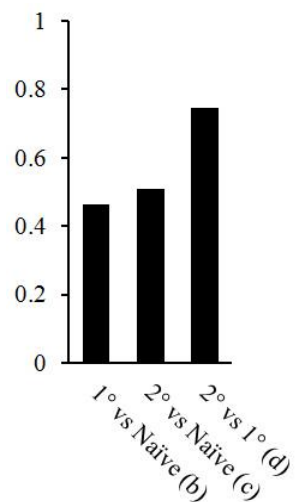


**F.**





G. 類似度指数



H. 順位相関係数

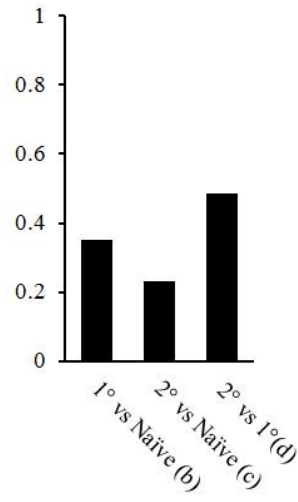
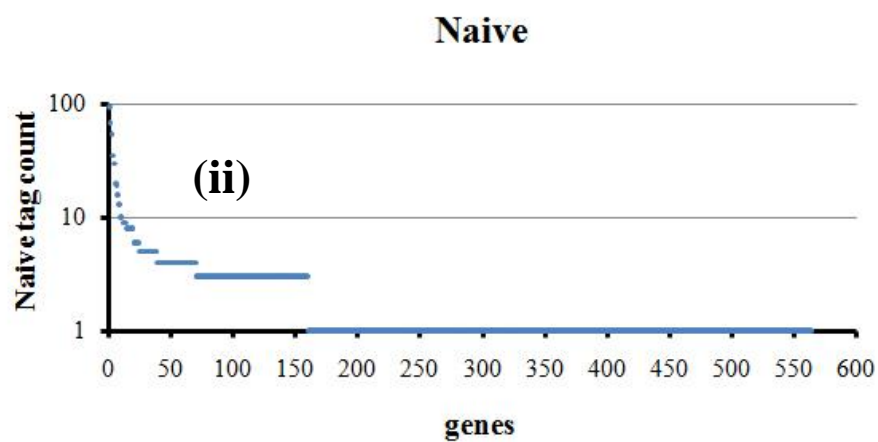


図 7. ナイーブと 1 次メモリー、ナイーブと 2 次メモリー、1 次メモリーと 2 次メモリーのそれぞれ 2 グループのみに発現している遺伝子の分布

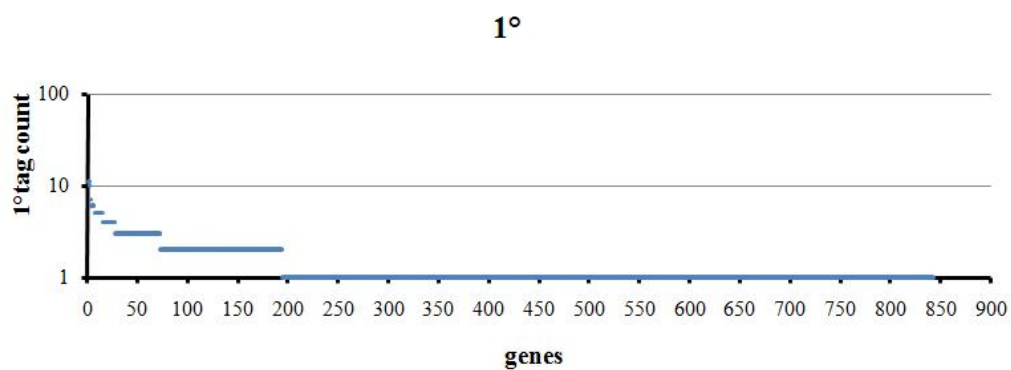
図 4A における(b)(c)(d)の遺伝子のそれぞれの細胞間での散布図(A)(B)(C)と MA plot(D)(E)(F)。ただし、 $M = \log_2(Y_i) - \log_2(X_i)$ 、 $A = (\log_2(Y_i) + \log_2(X_i))/2$ 。(F)において、(i)は赤線の A 値=5 以上の遺伝子を示す。ピンク点は  $Y_i / X_i > 10$ 、青点は  $0.1 > Y_i / X_i$  の発現量を示す遺伝子 ( $X_i$ 、 $Y_i$  は細胞 X、Y における i 番目の遺伝子のそれぞれの細胞における発現量)。(G) 図 4A における(b)(c)(d)でのそれぞれの細胞間での類似度指数と(H) 順位相関係数。Naïve はナイーブ、1° は 1 次メモリー、2° は 2 次メモリー CD8+ T 細胞のことである。

(b)(c)(d) における類似度指数は、ナイーブと 1 次メモリーのみ(b)が 0.462197、ナイーブと 2 次メモリーのみ(c)が 0.506157、1 次メモリーと 2 次メモリーのみ(d)が 0.745786 となり、数値は低くなったものの 1 次メモリーと 2 次メモリーで(d)より高い類似性を示した。(b)(c)(d) における順位相関係数は、ナイーブと 1 次メモリーのみ(b)が 0.352333、ナイーブと 2 次メモリーのみ(c)が 0.229595、1 次メモリーと 2 次メモリーのみ(d)が 0.487162 といずれも低い数値を示したが、1 次メモリーと 2 次メモリーのみ(d)でより強い正の相関関係があることを示した。

A.



B.



C.

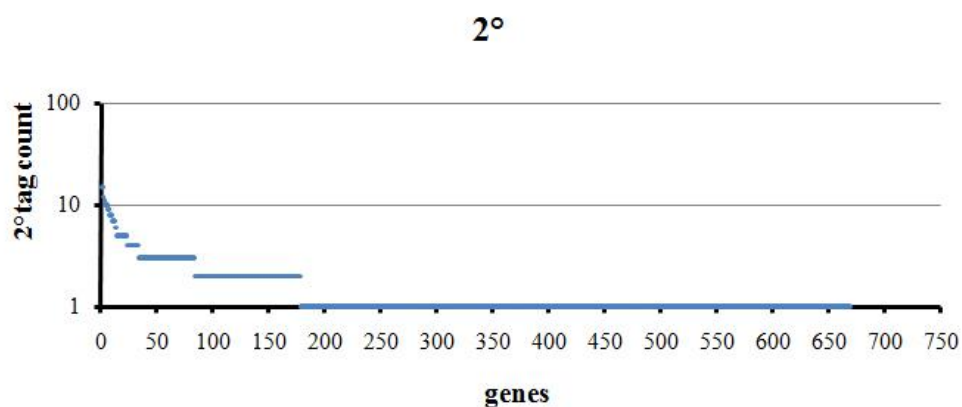


図 8. ナイブ、もしくは 1 次メモリー、もしくは 2 次メモリー CD8+ T 細胞のみに発現している遺伝子の発現

図 4A における(e): A)と(f): B)と(g): C)の遺伝子の標準化後のタグ数。(A)の(ii)は標準化タグ数が 10 以上の遺伝子。

ナイーブのみ(e)、1次メモリーのみ(f)、2次メモリーのみ(g)に発現している遺伝子に関して、その発現量はいずれも大きくなく、標準化後のそれぞれの総タグ数はナイーブのみ(e)では 1394、1次メモリーのみ(f)では 1170、2次メモリーのみ(g)では 941 だったが、(e)における遺伝子数が最も少ないことから、(e)ではより大きい発現量を示す遺伝子が多く含まれていることを示す結果となった。

(e)(f)(g)において、標準化後のタグ数で 100 を超えるものは全く存在せず、ほとんどのタグ数が一桁台だった。標準化後のタグ数が 10 を超える遺伝子数は、ナイーブのみ(e)では 10(図の(ii))(e)の中の 1.7699%)、1次メモリーのみ(f)では 2((f)の中の 0.2375%)、2次メモリーのみ(g)では 5((g)の中の 0.7485%)だった。その中でも、タグ数が 20 を超える遺伝子は、ナイーブのみ(e)に 6 遺伝子((e)の中の 1.0619%)だけ存在し、1次メモリーのみ(f)、2次メモリーのみ(g)には存在せず、極めて少ない割合ではあるが、より大きい発現量の遺伝子がより多くの割合でナイーブに特異的に発現していた。

メモリー細胞により特異的な特徴を評価するため、上記のようにナイーブもしくは 1次メモリーと 2次メモリーで全く発現していない遺伝子の中で発現量が顕著に大きかった(i)(ii)の DNA メチル化を評価した。(i)の遺伝子群では、TSS より 1000bp 上流までの領域で、ナイーブで全体的にメチル化傾向が非常に強く、1次メモリーと 2次メモリーで非常に大きく脱メチル化されていることが端的に

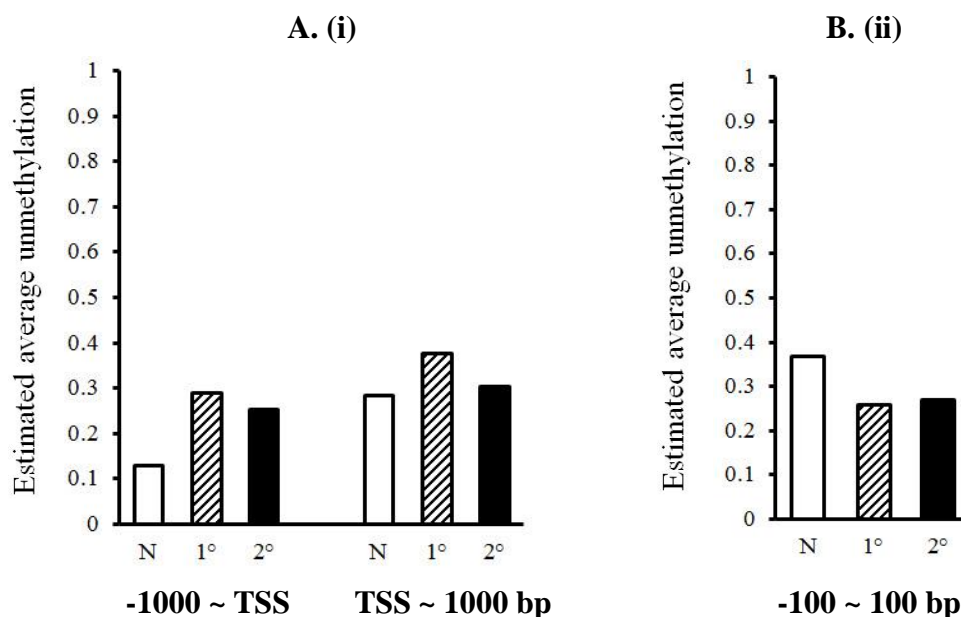


図 9. 1 次メモリーと 2 次メモリー CD8+ T 細胞のみに発現している遺伝子とナイーブ CD8+ T 細胞のみに発現している遺伝子の DNA メチル化状態 (A)1 次メモリーと 2 次メモリー CD8+ T 細胞のみに発現している遺伝子の発現量を比較した図 5(F)の(i)の遺伝子の各領域における全体的な DNA メチル化状態。(B) ナイーブ CD8+ T 細胞のみに発現している遺伝子の中で、標準化後のタグ数が 10 を超える遺伝子(ii)の各領域における全体的な DNA メチル化状態。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。□はナイーブ、▨は 1 次メモリー、■は 2 次メモリー CD8+ T 細胞における平均値。

示された。この遺伝子群には 1 次メモリーの方が 2 次メモリーより発現量が低いものや高いものが混在していたが、全体として 1 次メモリーではよりやや脱メチル化傾向があった。TSS より 1000bp 下流までの領域でも、多少の程度の違いはあるものの、同様の傾向が見られた。(ii)の遺伝子群では、1000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、ナイーブで全体的によりメチル化されていない傾向が見られ、ナイーブと比較し、1 次メモリーと 2 次メモリーではほぼ同等にメチル化されている傾向が顕著に見られた。この結果により、これらの遺伝子群で

は、DNA メチル化により遺伝子発現が負に制御され、脱メチル化により正に制御されていることが非常に強く示唆される(図 9)。

(a)において発現量の変動が大きかった遺伝子(表 2 A.~F.)に関しては、ナイーブと 2 次メモリーにおいて発現量の変動が大きかった遺伝子の中に、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な発現量の変動を 2 倍以上示した遺伝子がより多く含まれるということが端的に示された。1 次メモリーと 2 次メモリーにおいて発現量の変動が大きかった遺伝子の中には、ナイーブ、1 次メモリー、そして 2 次メモリーのそれぞれにおいて標準化タグ数が 100 以上の発現量の大きい遺伝子は比較的少なかった。

(b)(c)(d) において発現量の変動が大きかった遺伝子(表 2 G.~L.)に関しては、(d) の 1 次メモリーと 2 次メモリーに含まれる遺伝子を除き、(b)(c)のいずれにも標準化タグ数が 100 以上の発現量の大きい遺伝子は存在しなかった。(b)では、ナイーブにおいて発現量の大きい遺伝子が比較的多く、(c)では、ナイーブと 2 次メモリーのいずれもにおいて、全ての遺伝子の発現量が小さく、標準化タグ数が 50 以上の遺伝子は存在しなかった。(d)では、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な発現量の変動を比較的大きく示した遺伝子がより多く含まれていた。

表 2. 感染暴露により発現量の変動が大きかった遺伝子

B. 1° > Naïve (a)

A. 1° < Naïve (a)

Gene	Naïve	1°	2°
Xcl1	1	421	19
<b>Klrk1</b>	<b>1</b>	<b>269</b>	<b>576</b>
Itgax	3	457	529
<b>Klrb1c</b>	<b>1</b>	<b>201</b>	<b>1117</b>
Ccl5	3458	518157	321910
S100a6	115	15874	6140
<b>S100a4</b>	<b>3</b>	<b>338</b>	<b>724</b>
<b>Ifng</b>	<b>23</b>	<b>2692</b>	<b>9679</b>
Serpina3g	11	1172	1046
Soat2	1	108	212
Gzmm	38	2888	4299
4930434E21Rik	5	332	455
<b>Smpd13b</b>	<b>13</b>	<b>779</b>	<b>1580</b>
<b>Lgals3</b>	<b>5</b>	<b>283</b>	<b>959</b>
Lrrk1	1	62	91
<b>Camk2n1</b>	<b>1</b>	<b>60</b>	<b>169</b>
OTTMUSG00000000990	1	49	63
Kcnk5	6	233	268
Cd44	1	43	58
<b>Il18rap</b>	<b>4</b>	<b>123</b>	<b>270</b>
Gas7	1	39	6
<b>Ccl4</b>	<b>18</b>	<b>490</b>	<b>985</b>
1700001O22Rik	3	66	32
<b>Entpd1</b>	<b>1</b>	<b>33</b>	<b>150</b>
Tbx21	29	691	907
Syk	1	28	8
<b>Ly6c1</b>	<b>15</b>	<b>324</b>	<b>655</b>
Siglece	1	26	5
Ptpre	1	25	15
Irf8	3	47	28
<b>Ifitm1</b>	<b>5</b>	<b>92</b>	<b>198</b>
Ly6c2	1481	27248	42584
C6	3	44	7
<b>Il2ra</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>86</b>
E130306D19Rik	1	20	10
Cxcr3	178	2820	2342
Gfod1	4	56	96
Hsf4	3	37	58
Faim3	1	18	1
Camk1	1	18	12
Dkk1	4	52	102
C1qb	59	815	79
Sdcbp2	4	51	72
Otub2	1	17	9
Farp1	1	17	22
Mocos	3	33	49
Bspry	6	81	162
St14	1	16	18
<b>Ccl3</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>113</b>
Fcna	15	190	35

Gene	Naïve	1°	2°
Ramp1	808	3	2
Igfbp4	1419	10	42
Ifngr2	100	1	1
Ramp3	68	1	6
Cxzc5	107	2	2
Gsn	50	1	4
Wnt5b	80	2	5
Folr4	39	1	3
Gabbr2	117	3	2
Atp1b1	35	1	2
Pdlim4	31	1	1
Fxyd7	188	7	9
Itm2a	24	1	3
Emilin1	24	1	5
Dag1	21	1	3
Pxna3	21	1	3
<b>Dapl1</b>	<b>2055</b>	<b>102</b>	<b>4</b>
Brp44l	16	1	13
2210010C17Rik	31	2	3
<b>Id3</b>	<b>657</b>	<b>43</b>	<b>3</b>
<b>Slc16a5</b>	<b>227</b>	<b>15</b>	<b>1</b>
Plekho1	404	27	53
Nt5dc2	28	2	7
Chmp2b	14	1	9
Col11a2	53	4	13
Itgae	26	2	5
<b>Ephx1</b>	<b>1079</b>	<b>82</b>	<b>33</b>
Nr4a1	89	7	92
Btbd10	13	1	9
Spns3	13	1	9
Cdc42ep4	13	1	10
Tsc22d1	122	10	13
Prpsap2	24	2	8
Il6st	70	6	8
<b>Usp28</b>	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Snn</b>	<b>23</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
Amigo2	23	2	3
Nrip1	11	1	2
Rassf3	11	1	3
Dclk2	11	1	3
Rbbp8	11	1	4
Hdac1	11	1	6
Adk	11	1	7
Fnbp4	21	2	9
Ndrp1	73	7	11
St8sia1	30	3	2
Depdc1b	10	1	1
Armxc2	10	1	3
Pomp	10	1	5
Tcp11	10	1	7
Capn7	10	1	7
2610008E11Rik	10	1	10
Rbm17	10	1	22



### C. 2° > Naïve (a)

Gene	Naïve	1°	2°
Klrb1c	1	201	1117
Klrk1	1	269	576
Ifng	23	2692	9679
S100a4	3	338	724
Itgax	3	457	529
Lgals3	5	283	959
Soat2	1	108	212
Camk2n1	1	60	169
Gzma	18	188	2355
Smpdl3b	13	779	1580
Entpd1	1	33	150
Gzmm	38	2888	4299
Ccl5	3458	518157	321910
Serpina3g	11	1172	1046
4930434E21Rik	5	332	455
Ccl3	1	16	113
Lrrk1	1	62	91
Il18rap	4	123	270
Il2ra	1	22	86
Ccl4	18	490	985
S100a6	115	15874	6140
Ret	1	14	64
OTTMUSG00000000990	1	49	63
Casp1	3	11	121
Lamc1	3	12	120
Cd44	1	43	58
Ly6c1	15	324	655
Kcnk5	6	233	268
Ifitm1	5	92	198
Zbtb32	1	5	46
Tspan17	3	22	89
Oplah	1	15	40
Tbx21	29	691	907
P140	3	13	73
Ly6c2	1481	27248	42584
Slc15a3	3	27	70
Tbkbp1	20	219	553
Dkk1	4	52	102
Adamts14	9	89	234
Cish	16	136	433
Bspry	6	81	162
Gfod1	4	56	96
Lag3	1	8	32
Slc35e4	5	33	125
Hsf4	3	37	58
Cdkn1a	6	5	139
Tnfsf9	1	5	27
Cobll1	1	10	25
Endod1	23	234	449
Mocos	3	33	49

### D. 2° < Naïve (a)

Gene	Naïve	1°	2°
Dapl1	2055	102	4
Ramp1	808	3	2
Slc16a5	227	15	1
Id3	657	43	3
Ifngr2	100	1	1
Gabrr2	117	3	2
Col23a1	55	27	1
Cxxc5	107	2	2
Fabp5	44	29	1
Pacsin1	80	22	2
Il6ra	184	44	4
Usp28	34	3	1
Rpl23a	439	211	12
Pdlim4	31	1	1
Igfbp4	1419	10	42
Ephx1	1079	82	33
Slc43a1	28	17	1
Actn1	356	43	11
Acvrl1	53	6	2
2510009E07Rik	25	4	1
H2-Ob	326	50	11
Cd163l1	24	5	1
Egh3	69	8	3
Rangrf	273	164	10
Rpl5	1662	521	63
Snn	23	2	1
Slc16a10	20	6	1
Amz1	20	11	1
Fxyd7	188	7	9
Tctn2	19	2	1
Pard6g	19	2	1
Oas2	19	3	1
Tmie	36	8	2
Scmh1	36	10	2
Atp1b1	35	1	2
2610019F03Rik	227	40	11
H2-Oa	302	88	15
Ctsl	16	3	1
Mrp23	16	5	1
Calcr1	16	6	1
Rpl36a	1967	628	106
Ccr7	8515	2028	486
St8sia1	30	3	2
Laptn4b	15	5	1
Rgs10	656	184	40
Tox	98	10	6
Aldh1l1	14	2	1
Tmem120b	69	13	4
Mllt4	28	13	2
Inpp4b	14	7	1
Taf9	14	10	1
Ppia	14	11	1

**E. 2° > 1° (a)**

Gene	Naïve	1°	2°
Cdkn1a	6	5	139
Rbm17	10	1	22
Slamf1	3	1	21
Perp	1	1	21
Klrd1	75	22	436
Gpr44	1	1	20
Rab28	4	1	19
Ubc	73	25	414
Thoc1	6	1	15
Arl4a	5	1	15
Calm2	35	15	230
Zfp68	1	1	15
Dcun1d5	30	6	83
Gyg	28	3	40
Clk1	237	30	402
Nr4a1	89	7	92
Brp441	16	1	13
Zfp563	4	1	13
<b>Gzma</b>	<b>18</b>	<b>188</b>	<b>2355</b>
Upk1a	4	2	25
Cd69	35	16	198
Dynlt3	5	1	12
Fstl3	1	1	12
Dnd1	19	5	57
Krit1	4	1	11
Rem2	4	1	11
Kcna3	3	1	11
<b>Casp1</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>121</b>
Tjp3	4	2	21
Rnf216	6	4	43
Cdc42ep4	13	1	10
2610008E11Rik	10	1	10
Tnfaip8	6	1	10
Casd1	4	1	10
Amn1	1	1	10
<b>Lamc1</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>120</b>
Ywhaq	20	9	88
Cstf2t	11	4	39
Rbm25	21	10	96
Spns3	13	1	9
Prps1	15	2	19
Zfp472	8	1	9
Wdr44	6	1	9
Phf17	6	1	9
Sypl	5	1	9
Ehhadh	5	1	9
Cd1d1	4	1	9
Slc19a2	4	1	9
Ppp1r2	3	1	9
Dnaj1	6	4	37

**F. 2° < 1° (a)**

Gene	Naïve	1°	2°
Fabp5	44	29	1
<b>Col23a1</b>	<b>55</b>	<b>27</b>	<b>1</b>
Mpzl1	4	21	1
H2-Ab1	38	167	7
<b>Dapl1</b>	<b>2055</b>	<b>102</b>	<b>4</b>
Xcl1	1	421	19
Fcer1g	15	95	4
Faim3	1	18	1
Slc43a1	28	17	1
Cd5l	3	17	1
Fxyd4	5	16	1
<b>Rpl23a</b>	<b>439</b>	<b>211</b>	<b>12</b>
<b>Slc16a5</b>	<b>227</b>	<b>15</b>	<b>1</b>
<b>Id3</b>	<b>657</b>	<b>43</b>	<b>3</b>
Rangrf	273	164	10
Slc11a1	4	26	2
Rps17	19	25	2
Zscan22	9	12	1
Ints2	5	12	1
Clec4n	6	70	5
C1qc	29	294	22
<b>Pacsin1</b>	<b>80</b>	<b>22</b>	<b>2</b>
Amz1	20	11	1
Ppia	14	11	1
Slc30a5	10	11	1
Hck	3	11	1
Lrp1	3	22	2
H2-Aa	18	86	7
Ccr3	11	41	3
Taf9	14	10	1
Stab2	1	10	1
Hfe	3	19	2
9030617O03Rik	11	9	1
Ccdc47	10	9	1
Kifc3	8	9	1
Ctsf	4	9	1
Hspb1	13	27	3
C1qb	59	815	79
<b>Il6ra</b>	<b>184</b>	<b>44</b>	<b>4</b>
Rpsa	59793	36969	3898
Cfr	5	8	1
Ap1s3	3	8	1
C1qa	29	345	37
2010002M12Rik	19	23	3
Hax1	53	30	3
Slpi	88	135	15
Rell2	16	22	3
Cd81	18	58	7
<b>Rpl5</b>	<b>1662</b>	<b>521</b>	<b>63</b>
Inpp4b	14	7	1



**G. 1° > Naïve (b)**

Gene	Naïve	1°	2°
Emr1	1	13	0
Ltc4s	1	7	0
C130090K23Rik	1	7	0
Hebp1	3	13	0
Batf3	1	6	0
Itgad	4	15	0
Ctsh	3	10	0
Adams7	1	5	0

**I. 2° > Naïve (c)**

Gene	Naïve	1°	2°
Guca2a	1	0	11
8430410K20Rik	5	0	29
Lemd3	1	0	7
Adarb1	1	0	7
Stag3	1	0	7
Tgds	3	0	13
Gemin8	1	0	6
Nos3	1	0	6
Muc20	1	0	6
Notch4	1	0	6
Tcf4	3	0	11
Klhdc8b	1	0	5
Mbd4	1	0	5
Alkbh8	1	0	5
Cep76	1	0	5
1700109H08Rik	1	0	5
Sema6c	1	0	5
Srfbp1	1	0	5
Zfp109	1	0	5

**H. 1° < Naïve (b)**

Gene	Naïve	1°	2°
2700081O15Rik	28	1	0
Art4	26	1	0
Adcy6	26	1	0
Slc6a19	79	3	0
Kcnh3	25	1	0
Cnm3	44	2	0
5830411N06Rik	33	2	0
Gm1060	16	1	0
Sema4g	16	1	0
Maml3	15	1	0
Basp1	15	1	0
Adams14	14	1	0
Igf1r	34	3	0
St6gal1	34	3	0
F12	11	1	0
Kif23	9	1	0
Mterfd3	8	1	0
Rps27a	8	1	0
Nme4	56	9	0
Actr6	6	1	0
Tgm4	6	1	0
Gdap111	6	1	0
Ldhd	6	1	0
Ela2	6	1	0
Epb4.111	5	1	0
EG547347	5	1	0
Cask	5	1	0
Sqle	5	1	0
Gprc5b	5	1	0
Fabp7	5	1	0
Zfp2	9	2	0
Gm128	9	2	0

**J. 2° < Naïve (c)**

Gene	Naïve	1°	2°
Guca2a	1	0	11
8430410K20Rik	5	0	29
Lemd3	1	0	7
Adarb1	1	0	7
Stag3	1	0	7
Tgds	3	0	13
Gemin8	1	0	6
Nos3	1	0	6
Muc20	1	0	6
Notch4	1	0	6
Tcf4	3	0	11
Klhdc8b	1	0	5
Mbd4	1	0	5
Alkbh8	1	0	5
Cep76	1	0	5
1700109H08Rik	1	0	5
Sema6c	1	0	5
Srfbp1	1	0	5
Zfp109	1	0	5

**L. 2° < 1° (d)**

Gene	Naïve	1°	2°
Tgm2	0	18	2
Ccl24	0	25	3
H2-DMb1	0	7	1
Mapk12	0	20	3
Cd300a	0	13	2
Igf1	0	6	1
Wdr5b	0	6	1
Fn3k	0	99	15
OTTMUSG00000005737	0	5	1
Reck	0	5	1
Slc40a1	0	5	1
Pilrb1	0	30	6

**K. 2° > 1° (d)**

Gene	Naïve	1°	2°
Hspa1a	0	1	26
Smtn	0	1	18
Mpp2	0	1	17
Mt3	0	2	30
Alcam	0	1	15
Tmprss13	0	3	41
Itgam	0	1	12
Ccl9	0	16	180
Cx3cr1	0	11	123
Osbp3	0	3	28
Klrg1	0	55	457
Cyfip1	0	1	7
1810055E12Rik	0	1	7
Adrb1	0	2	13
Sema6b	0	2	13
Tmem151a	0	20	125
Peyox11	0	1	6
Snx21	0	1	6
Lmln	0	1	6
5830403L16Rik	0	1	6
Pik3ap1	0	4	22
Bivm	0	2	11
Gzmb	0	23	127
Atf3	0	3	16
Ankrd26	0	1	5
Mdfic	0	1	5
Ar	0	1	5
Wdr54	0	1	5
Dsn1	0	1	5

**M. Naïve (e)**

Gene	Naïve	1°	2°
Ccr9	95	0	0
Ampd1	69	0	0
Xkrx	54	0	0
Ccnjl	35	0	0
Eng	30	0	0
Rragd	20	0	0
Rapgef4	19	0	0
Mtss1	16	0	0
Fbln1	13	0	0
Pdzd4	10	0	0
Card9	10	0	0
Gtf2ird1	9	0	0
Prtn3	9	0	0
Pklr	9	0	0
Cldn13	8	0	0
Ccdc114	8	0	0
Ube2e3	8	0	0
Zfp174	8	0	0
Rrm2	8	0	0
1700027A23Rik	8	0	0
Eif3m	6	0	0
Gbe1	6	0	0
A630007B06Rik	6	0	0
Ppp1r1b	6	0	0
Apbb2	5	0	0
Myo5b	5	0	0
Itga7	5	0	0
Il17rb	5	0	0
Mbd5	5	0	0
Slc25a32	5	0	0
Cldn10	5	0	0
Aqp11	5	0	0
Dmbt1	5	0	0
Ankrd55	5	0	0
Irgc1	5	0	0
Irf6	5	0	0
Grifin	5	0	0
Pp11r	5	0	0
6720460F02Rik	5	0	0

**N. 1° (f)**

Gene	Naïve	1°	2°
Nav1	0	11	0
Chu	0	10	0
Ppap2b	0	7	0
Clec1b	0	6	0
Dupd1	0	6	0
Slamf9	0	6	0
2010107G23Rik	0	5	0
Necab2	0	5	0
Nubpl	0	5	0
Ppap2a	0	5	0
Ryr3	0	5	0
Ly86	0	5	0
Tmem121	0	5	0
Clec4b1	0	5	0

**O. 2° (g)**

Gene	Naïve	1°	2°
Prss16	0	0	15
Cldn12	0	0	12
Esm1	0	0	11
Klre1	0	0	10
Zfp367	0	0	10
Pcdh21	0	0	9
2600010E01Rik	0	0	9
Msc	0	0	8
Trim16	0	0	8
Lancl3	0	0	7
Hs3st3a1	0	0	7
Klrc2	0	0	7
Nlrp6	0	0	6
Popdc2	0	0	5
Ggh	0	0	5
Havcr2	0	0	5
Arpm1	0	0	5
Mtap6	0	0	5
Rhbdf1	0	0	5
4430402I18Rik	0	0	5
2310007A19Rik	0	0	5
Zkscan16	0	0	5
Ttc30a1	0	0	5

(A)~(L). 図 4. (A)のベン図における(a)(b)(c)(d)で発現変動が大きかった遺伝子。赤字はナイーブから 1 次、2 次へといずれも 2 倍以上段階的な発現量上昇を示した遺伝子、青字は同様に 2 倍以上段階的な発現量低下を示した遺伝子。(M)~(O). (A)のベン図における(e)(f)(g)で発現量が大きかった遺伝子。

### 4.3 既知の CTL メモリーに特徴的な遺伝子における DNA メチル化・脱メチル化による遺伝子発現制御

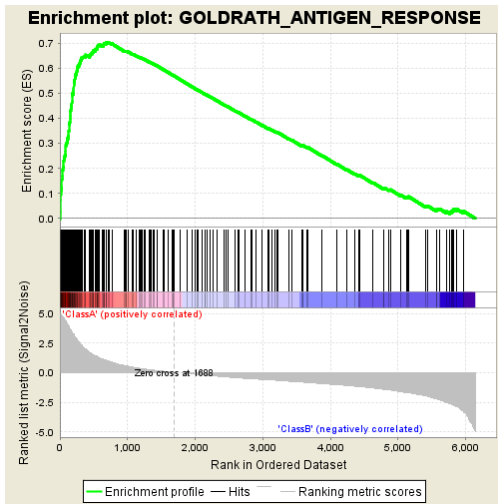
それぞれの細胞集団に特異的な遺伝子発現制御や生物学的機能を共有する遺伝子群を探索し、メモリーCTL の特徴を明らかにするため、GSEA (Gene set enrichment analysis) [82]によりナイーブと 1 次メモリーと 2 次メモリーの発現遺伝子をそれぞれ比較した際の発現変動遺伝子群を評価した。ただし、GSEA に用いる Dataset として、ナイーブと 1 次メモリーと 2 次メモリーのいずれもにおいて発現量がごく微量の遺伝子では、発現変動がみられたとしても細胞集団全体に与える影響は極めて低いと考えられるため、発現量の尺度となる標準化タグ数が 3 細胞集団いずれもにおいて一桁台(<10)の遺伝子は除外した。合計 6141 遺伝子が dataset に用いられた。また、Phenotype labels において、ナイーブと 1 次メモリーの発現変動遺伝子を比較した「1° vs Naïve」では class A を 1 次メモリー、class B をナイーブとし、ナイーブと 2 次メモリーの発現変動遺伝子を比較した「2° vs Naïve」では class A を 2 次メモリー、class B をナイーブとし、1 次メモリーと 2 次メモリーの発現変動遺伝子を比較した「2° vs Naïve」では class A

を2次メモリー、class Bを1次メモリーとした。

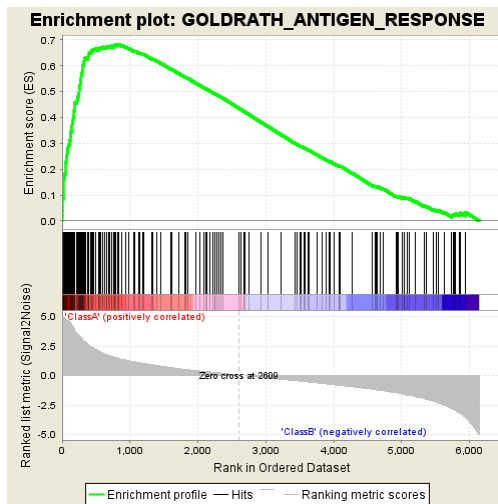
まず、発現上昇を示す gene set の中で、「1° vs Naïve」、「2° vs Naïve」、「2° vs 1°」のいずれもにおいて、感染暴露に対する免疫応答に関する「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」の gene set が非常に高い NES で enrich された。「1° vs Naïve」と「2° vs Naïve」では、正に enrich された gene set の中で最も高い NES だった(表3)。

この gene set が基づく研究[77]では、B6 マウス由来の OT-I T 細胞を B6 マウスの宿主に養子移入し、宿主への VV-OVA 投与による感染の6日後にエフェクターT細胞、50日以上後にメモリーT細胞をコンジェニックマーカーと CD8+ で sorting して、ナイーブ OT-I CD8+ T 細胞とともにそれぞれの細胞由来の RNA を抽出し、マイクロアレイにより遺伝子発現を行った。そのうち、ナイーブ細胞に対してエフェクター細胞で発現が増加した遺伝子発現プロファイルが「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」で、このエフェクター細胞で発現上昇した遺伝子を除いて、ナイーブ細胞に対してメモリー細胞で特異的に発現が増加した遺伝子発現プロファイルが「GOLDRATH\_IMMUNE\_MEMORY」の gene set である。後者の gene set も、「2° vs 1°」では enrich されなかったが、「1° vs Naïve」と「2° vs Naïve」において、非常に高い NES で enrich された(表3)。

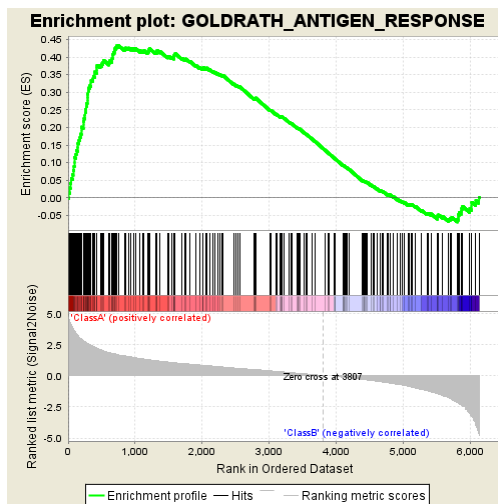
**A. 1° vs Naïve**



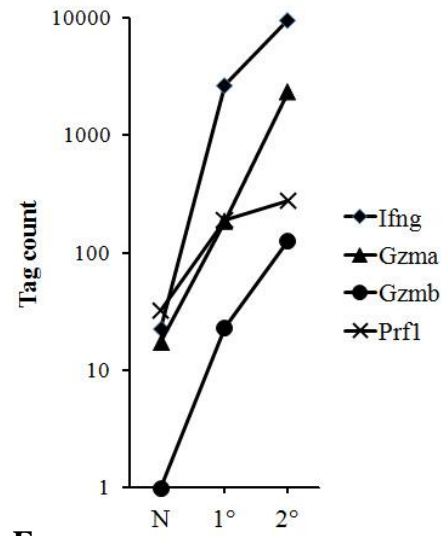
**B. 2° vs Naïve**



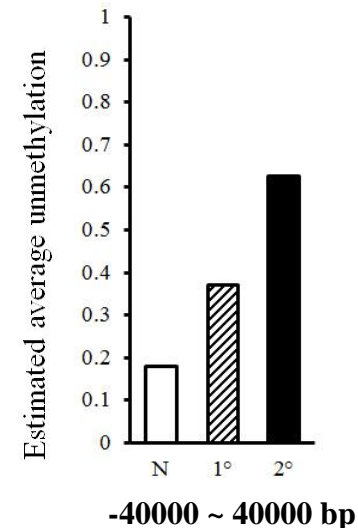
**C. 2° vs 1°**



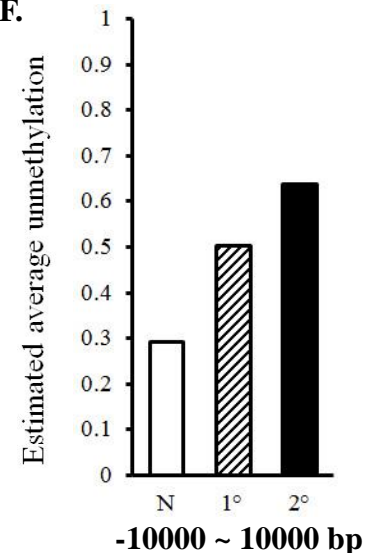
**D.**



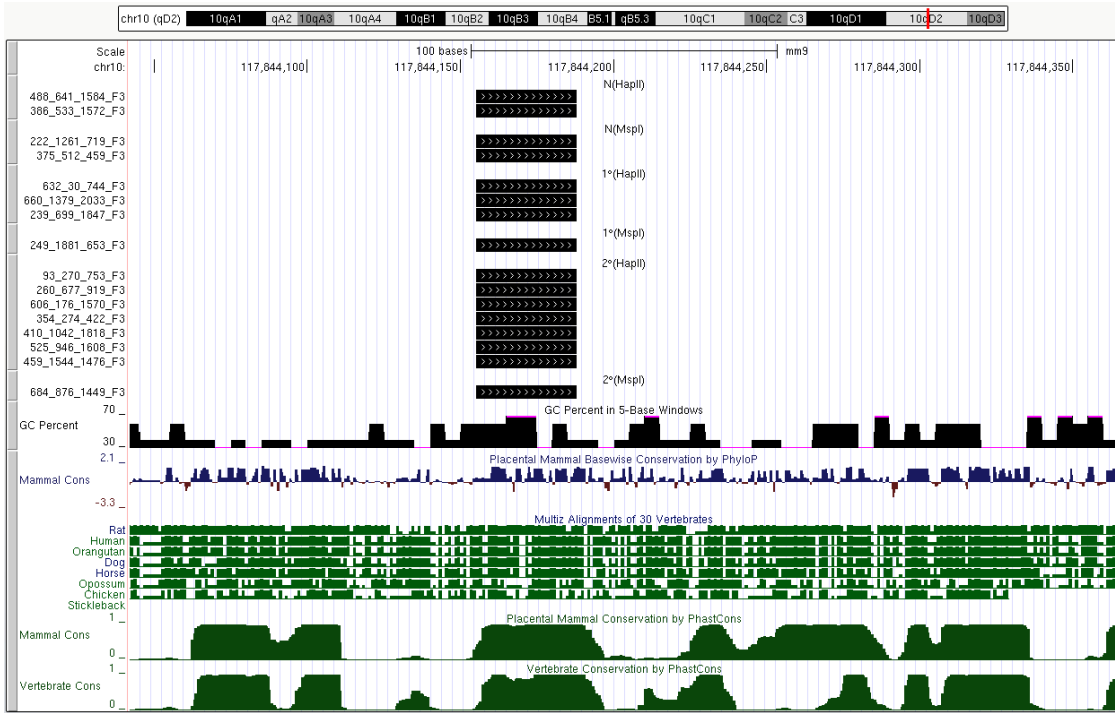
**E.**



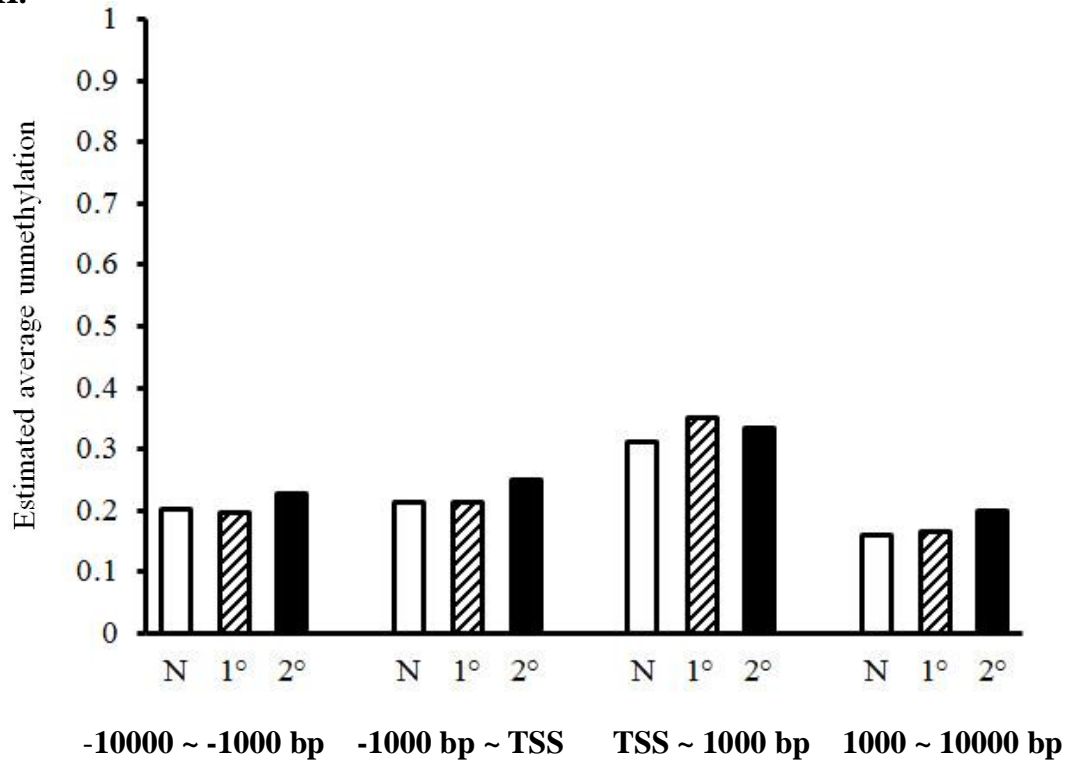
**F.**



G.



H.



## 図 10. 「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」における遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態の変化

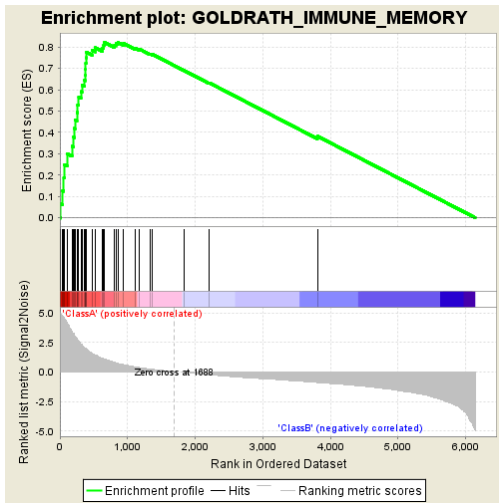
GSEA における gene set、「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」での「1° vs Naïve」(A)、「2° vs Naïve」(B)、「2° vs 1°」(C)の plot。(D)特に発現量の増加傾向が顕著だったサイトカインの発現量の変化。(E)Ifng の広い領域における全体的なメチル化状態の変化。(F)Ifng 以外の CTL に特徴的なサイトカインの TSS に近い領域における全体的なメチル化状態の変化。(G)Ifng の TSS より 33943bp 上流の位置でのナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞の HpaII や MspI を用いた MSCC における read の UCSC genome browser による表示。(H)「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」でナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーCD8+ T 細胞へと段階的に発現量が増加した遺伝子全体の各領域におけるメチル化状態の変化。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。N もしくは Naïve はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■)CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」では、多数の遺伝子が leading edge subset として示されているが、Gzma、Gzmb、Gzmk、Ifng、Prfl などのサイトカインをはじめ、多くの既知の CTL に特徴的な遺伝子が正の相関関係を示し、高い NES に寄与した。また、これまで報告されているマイクロアレイのデータと比較し、その変化の度合いが非常に大きいことも端的に示された。このことから、1 次メモリーと 2 次メモリーがいずれもエフェクター機能を十分保持していることが強く示唆され、さらに繰り返し感染による 2 次メモリーの方が 1 次メモリーよりも高いエフェクター機能を保持していることが示唆された。DNA メチル化に関して、Ifng では TSS より 40000bp 上流から 40000bp 下流までに渡る広範囲の領域において、全体としてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへ

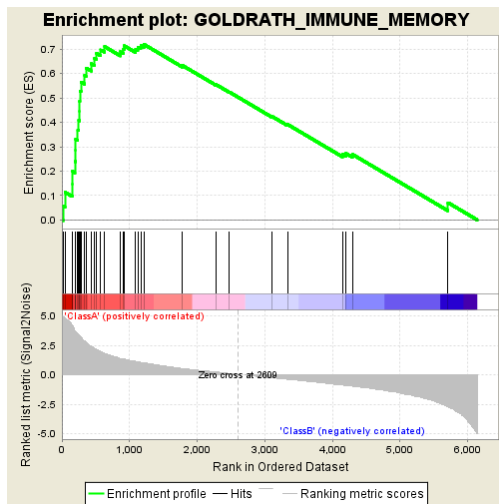


と段階的な脱メチル化傾向が顕著に見られた。図 10G にゲノム上の *Ifng* の TSS より 33943bp 上流の領域においてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に脱メチル化されている典型例が示してあるが、それぞれの制限酵素切断位置でのその段階的な脱メチル化傾向は一見すると看過されるような非常に緩やかなものだった。*Gzma*、*Gzmb*、*Gzmk*、*Gzkm*、*Prf1* のサイトカインでも、TSS より 10000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、全体としてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が顕著に見られた。これらのサイトカインを含めてこの *gene set* の中でナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に発現量が上昇した 62 遺伝子でも、TSS より 10000bp から 1000bp まで上流の領域、1000bp 上流から TSS までの領域、TSS より 1000bp から 10000bp まで下流の領域においてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が見られた。他と比較し、特に 2 次メモリーの脱メチル化が顕著だった。TSS から 1000bp まで下流の領域では、1 次メモリーと 2 次メモリーいずれもナイーブより脱メチル化傾向が見られたが、1 次メモリーの方がより顕著だった。この結果により、この遺伝子群(特に *Ifng* などのサイトカイン)では、DNA 脱メチル化により遺伝子発現が正に制御されていることが強く示唆される。

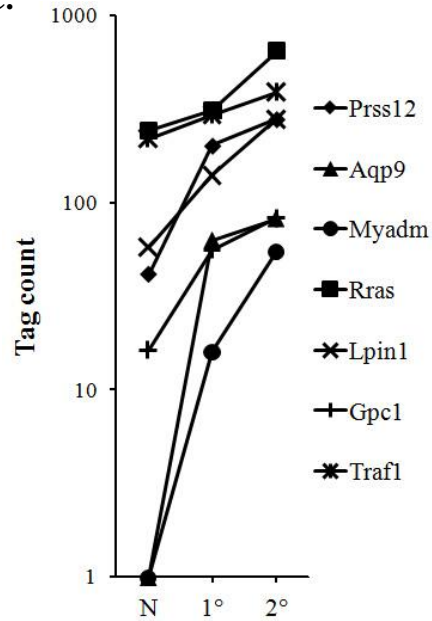
**A. 1° vs Naïve**



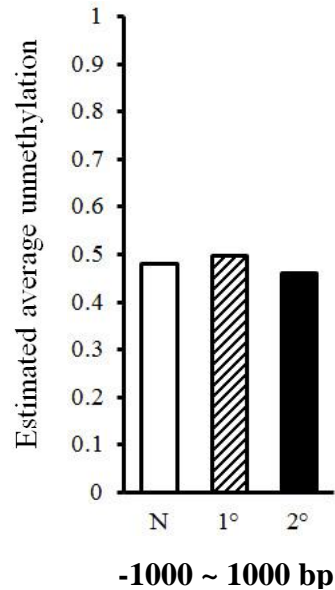
**B. 2° vs Naïve**



**C.**



**D.**



**図 11. 「GOLDRATH\_IMMUNE\_MEMORY」における遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態の変化**

GSEAにおける gene set、「GOLDRATH\_IMMUNE\_MEMORY」での「1° vs Naïve」(A)、「2° vs Naïve」(B)の plot。(C)特に発現量の増加傾向が顕著だった遺伝子の発現量の変化。(D)gene setに含まれる全遺伝子の TSS に近い領域における全体的なメチル化状態の変化。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。N もしくは Naïve はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■)CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

また、「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」では、負の相関関係を示す遺伝子もいくつか存在したが、「GOLDRATH\_IMMUNE\_MEMORY」では、負の相関関係を示す遺伝子はほとんどなく、ナイーブに対して1次メモリーと2次メモリーがいずれも既知の「メモリーCD8+ T細胞」に特徴的な遺伝子を持つことが示された。この gene set に含まれる全ての遺伝子の DNA メチル化に関しては、TSS より 1000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、全体として1次メモリーでは脱メチル化されている傾向が見られたが、2次メモリーではナイーブと1次メモリーよりメチル化傾向があった。この結果により、この遺伝子群では、DNA 脱メチル化により遺伝子発現が正に制御されていることが示唆される。両 gene set は、本研究とほぼ同じ方法による遺伝子発現プロファイル由来であることから、事象の再現性を確認できる結果ともなった。この研究においては、ナイーブ OT-I CD8+ 細胞を、放射線照射によりリンパ球を減少させたマウスに養子移入し、6日後にコンジュニックマーカーと CD8+ で sorting した細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイにより遺伝子発現を行い、「恒常的な細胞増殖」に関わる遺伝子を探索したが、その際の gene set 「GOLDRATH\_HOMEOSTATIC\_PROLIFERATION」は、「1° vs Naïve」、「2° vs Naïve」、「2° vs 1°」において全く enrich されなかった。

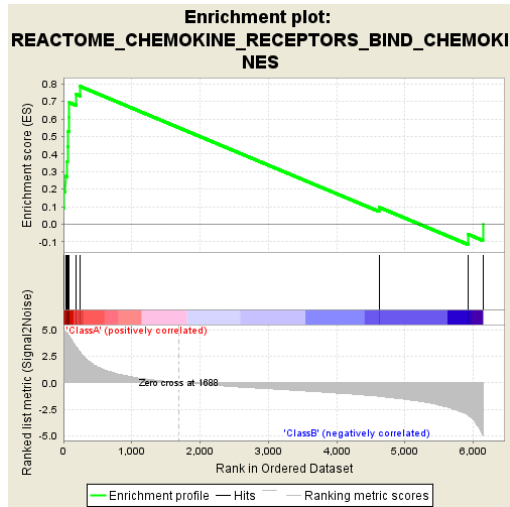
#### 4.4 その他の免疫応答に重要な遺伝子における DNA メチル化・脱メチル化による遺伝子発現制御

他にも、「1° vs Naïve」と「2° vs Naïve」において、「IMMUNE\_RESPONSE」や「DEFENSE\_RESPONSE」などの gene set をはじめ、CTL の免疫応答に重要な役割を果たすサイトカインやケモカインに関連した、KEGG、REACTOME、BIOCARTA、Gene Ontology などのデータベースに基づいた gene set が多数 enrich されたが、「2° vs 1°」において enrich された gene set は、「1° vs Naïve」や「2° vs Naïve」と比べて明らかに少なかった(表 3)。

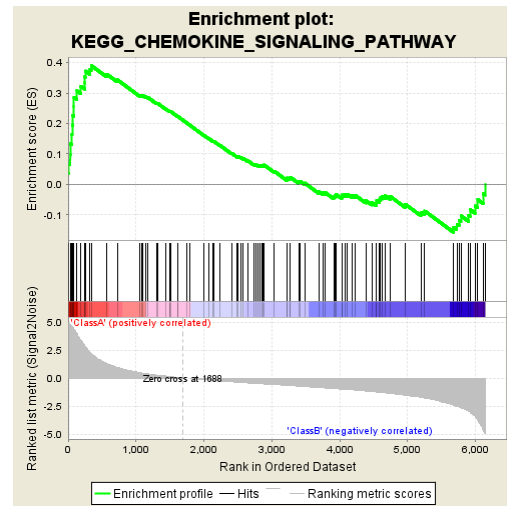
Tcm のマーカーでもある CCR7 は、抗原特異的なメモリーCD8+ T 細胞全体としては、繰り返し感染により発現量が減少傾向にあることが示された。DNA メチル化に関しては、TSS から 45000bp 下流までに渡る広範囲の領域において、全体としてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的なメチル化傾向が非常に顕著に見られた。

他の多くのケモカイン・ケモカインレセプターの発現量に関して、ナイーブに対して 1 次メモリーと 2 次メモリーで顕著な増加傾向を示したが、1 次メモリーに対して 2 次メモリーでは、そのほとんどが小さな増減傾向を示した。特に図 12 に示したケモカイン・ケモカインレセプターの DNA メチル化に関しては、TSS より 10000bp 上流から 10000bp 下流までの領域で、全体としてナイーブか

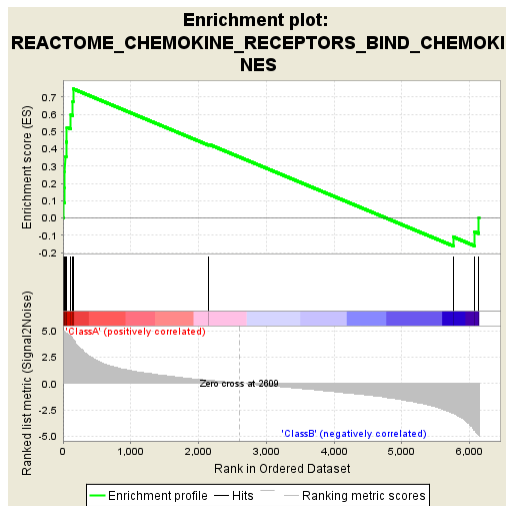
**A. 1° vs Naïve**



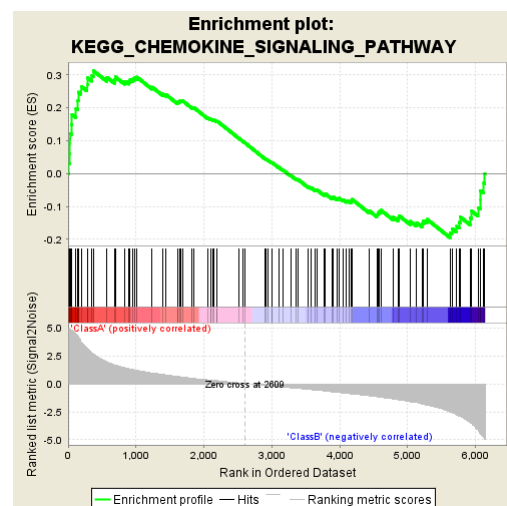
**C. 1° vs Naïve**



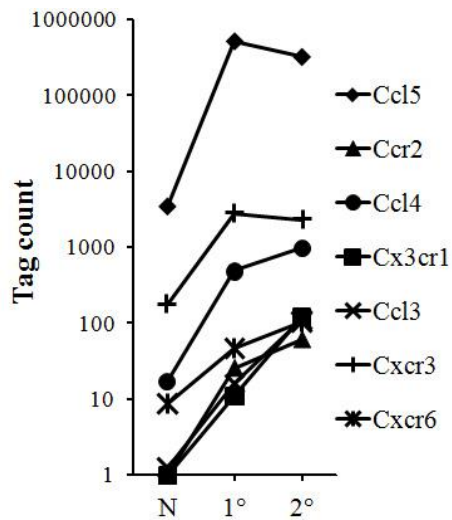
**B. 2° vs Naïve**



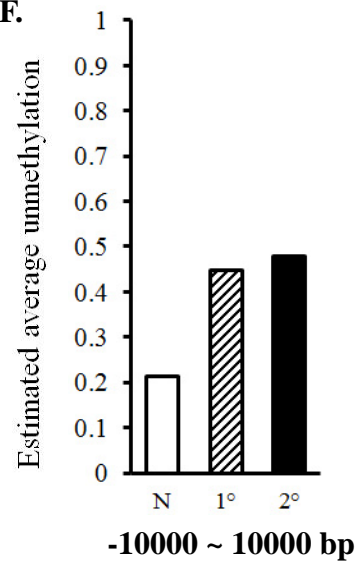
**D. 2° vs Naïve**



**E.**



**F.**



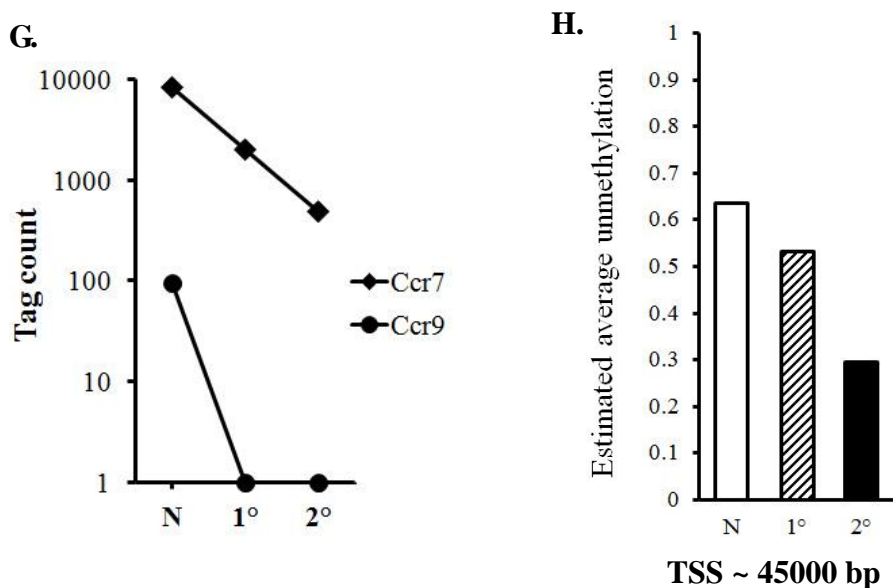


図 12. ケモカイン・ケモカイン受容体における遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態の変化

GSEA における gene set、「REACTOME\_CHEMOKINE\_RECEPTORS\_BIND\_CHEMOKINES」と「KEGG\_CHEMOKINE\_SIGNALING\_PATHWAY」での「1° vs Naive」(A)(C)、「2° vs Naive」(B)(D)の plot。(E)(F)特に発現量の増加傾向が顕著だったケモカインとケモカイン受容体の発現量変化(E)と TSS に近い領域における全体的なメチル化状態の変化(F)。(G)特に発現量の減少傾向が顕著だったケモカインとケモカイン受容体の発現量変化。(H)CCR7 の TSS からその下流 45000bp までの領域における全体的なメチル化状態の変化。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。N もしくは Naive はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■)CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

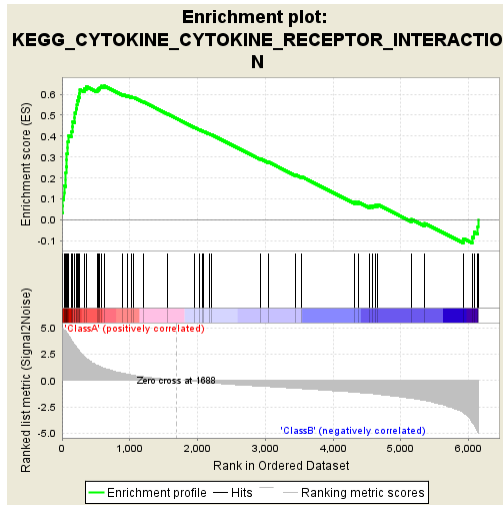
ら 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向に見られ、その傾向はナイーブと比較し、1 次メモリーと 2 次メモリーで非常に顕著であった。この結果により、これらのケモカイン・ケモカインレセプターでは、DNA メチル化により遺伝子発現が負に制御され、脱メチル化により正に制御されていることが非常に強く示唆される。

サイトカインに関しては、「KEGG\_CYTOKINE\_CYTOKINE\_RECEPTOR

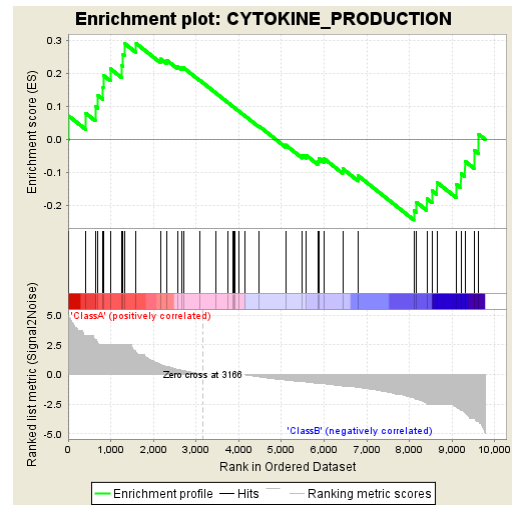
「\_INTERACTION」や「CYTOKINE\_ACTIVITY」などが高いNESを示したが、いずれのgene setもCCL5、CCL3などの多くのケモカインを含んでおり、前述したIfngを除き、ケモカインと比較し、概ねインターロイキンでは大きな発現量の変化を示さなかった。インターロイキンレセプターに関しては、「メモリーCD8+ T細胞」に特徴的なIl7rなどがナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと段階的な発現量の増加傾向を示した。特にIl7rのDNAメチル化に関しては、TSSより52000bp上流から100000bp下流までの領域で、全体としてナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が見られ、その傾向はナイーブと比較し、1次メモリーと2次メモリーで非常に顕著であった。Il2rbでは、TSSから34000bp下流までの領域で、全体としてナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が顕著に見られた(図13)。

この結果により、これらのインターロイキンレセプターでは、DNA脱メチル化により正に制御されていることが強く示唆される。また、Il2rに関連してenrichされたgene setがいくつかあり、CTCL(cutaneous T cell lymphoma)由来の培養細胞(ヒト)をIL-2で刺激した際に発現上昇したgene setの「MARZEC\_IL2\_SIGNALING\_UP」[86]では、「1° vs Naïve」、「2° vs Naïve」、「2° vs 1°」において有意にenrichされた。

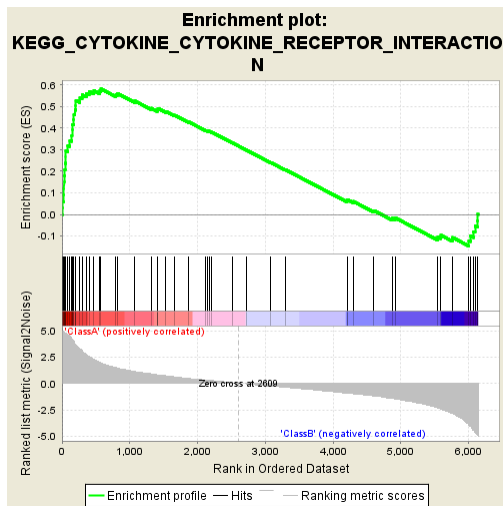
### A. 1° vs Naïve



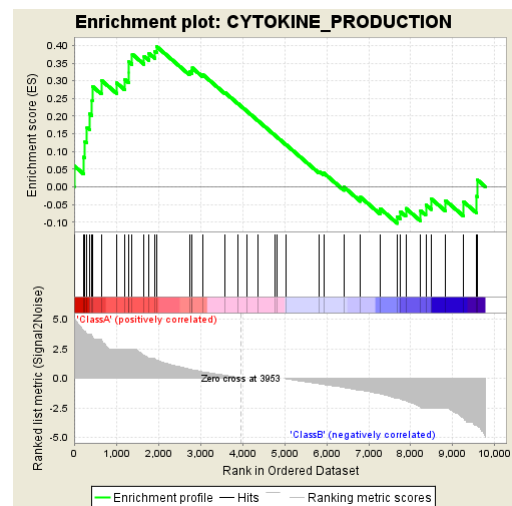
### D. 1° vs Naïve



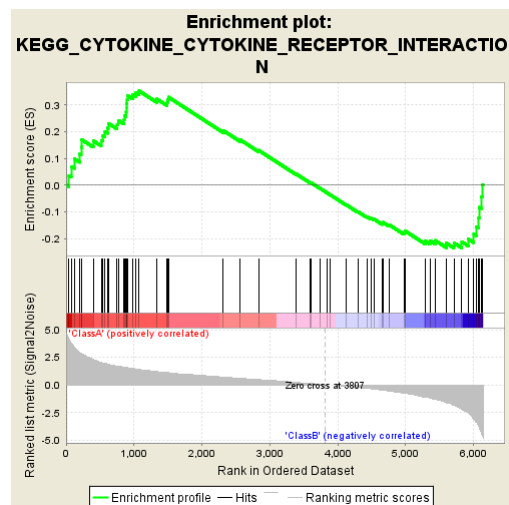
### B. 2° vs Naïve



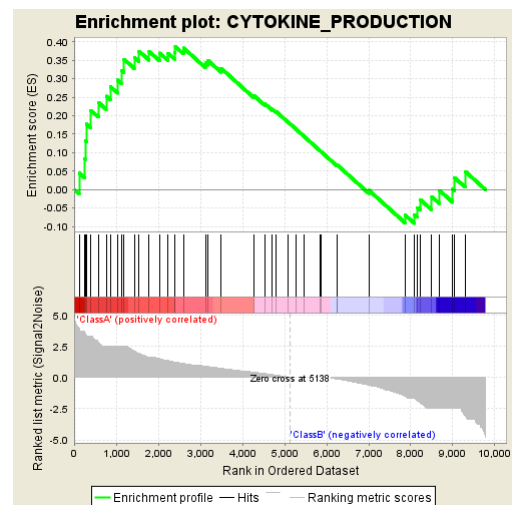
### E. 2° vs Naïve



### C. 2° vs 1

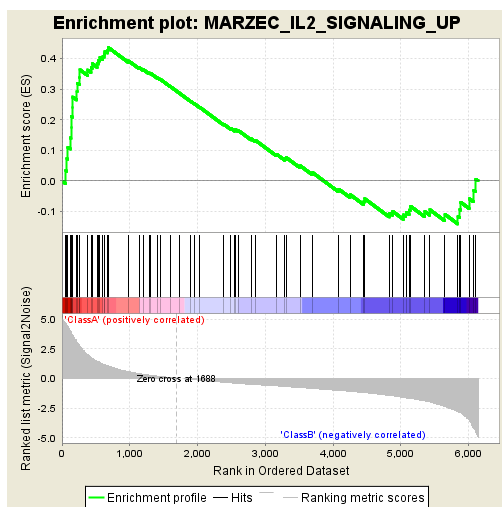


### F. 2° vs 1

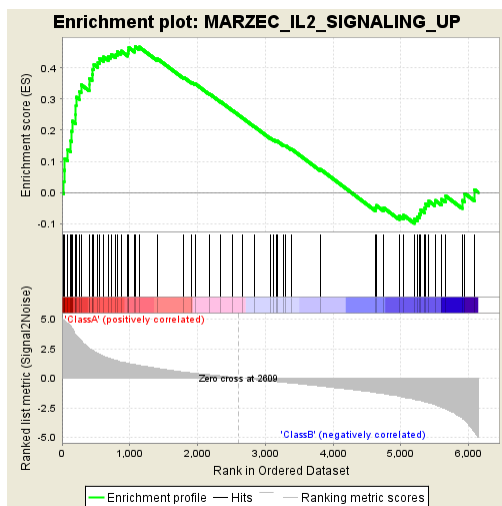




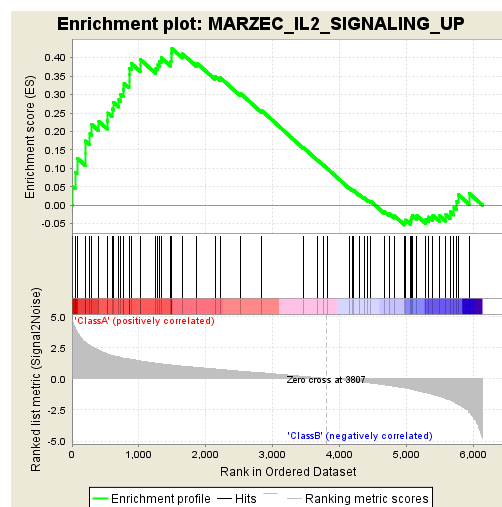
### G. 1° vs Naïve



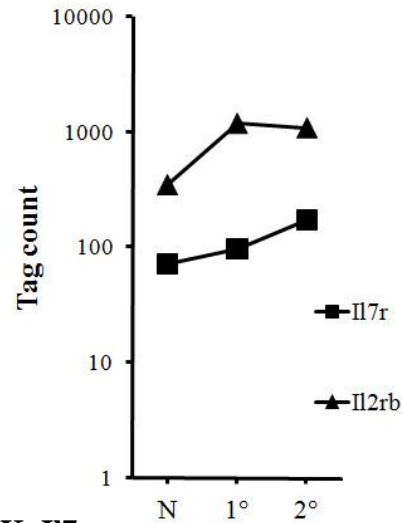
### H. 2° vs Naïve



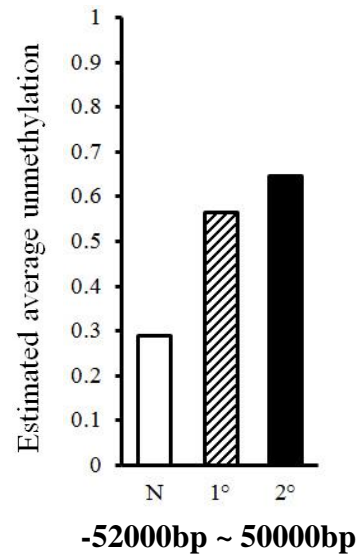
### I. 2° vs 1



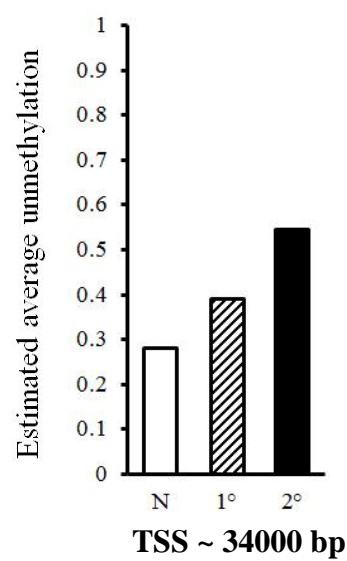
### J.



### K. Il7r



### L. Il2rb



### 図 13. サイトカイン・サイトカイン受容体における遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態の変化

GSEA における gene set、「KEGG\_CYTOKINE\_CYTOKINE\_RECEPTOR\_INTERACTION」と「CYTOKINE\_PRODUCTION」と「MARZEC\_IL2\_SIGNALING\_UP」での「1° vs Naive」(A)(D)(G)、「2° vs Naive」(B)(E)(H)、「2° vs 1°」(C)(F)(I)の plot。(ただし、「CYTOKINE\_PRODUCTION」では、標準化タグ数が 3 細胞集団いずれもにおいて一桁台(<10)の遺伝子も含む。)(J)IL2rb と IL7r の発現量の変化。(K) IL7r の広い領域における全体的なメチル化状態の変化。(L) IL2rb の TSS からその下流 34000bp までの領域における全体的なメチル化状態の変化。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。N もしくは Naive はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■)CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

IL-15 のシグナルは IL-2 受容体  $\gamma_c$  と  $\beta$  を共有するが、この文献では、CTCL 細胞を IL-15 で刺激した際も IL-2 で刺激した場合と同様の遺伝子群が発現上昇したと報告している(ただし、「MARZEC\_IL15\_SIGNALING\_UP」という gene set は GSEA には存在しない)。この際、IL-2 や IL-15 で刺激した CTCL 細胞の細胞増殖が促進されたことも示されている。

ところで、細胞増殖に関連する「`POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_PROLIFERATION`」や「`T_CELL_PROLIFERATION`」などの gene set は、正の相関関係を示して enrich されたが、高い NES を示さなかった。

また、GSEA とは異なるアルゴリズムで発現量が大きく変動した遺伝子群の生物学的な意義を理解するため、ナイーブと 1 次メモリー、ナイーブと 2 次メモリー、1 次メモリーと 2 次メモリーにおいて、2 倍以上発現量に変動した、もし

くは標準化タグ数が 0 から 2 以上に変動した遺伝子リストを作成し、DAVID bioinformatics resources における Functional Annotation Tools の Functional Annotation clustering を用いて、発現量が大きく変動した遺伝子群と相関性があるデータベース上の annotation term を検索した。ナイーブより 1 次メモリー、ナイーブより 2 次メモリー、1 次メモリーより 2 次メモリーで発現量が上昇した遺伝子リストにおいて、多くの免疫応答に関連する Annotation term が高い相関性を示した(表 4)。

**表 3. GSEA において高い NES を示した免疫応答に関連する gene set**

**A. 1° vs Naïve**

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
GOLDRATH_ANTIGEN_RESPONSE	197	0.7039	3.4412	0	0
GOLDRATH_IMMUNE_MEMORY	36	0.8218	2.954	0	0
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	60	0.6396	2.5931	0	0
REACTOME_PEPTIDE_LIGAND_BINDING_RECEPTORS	24	0.7252	2.3884	0	8.6E-05
CYTOKINE_ACTIVITY	18	0.7152	2.1834	0	0.00458
REACTOME_CHEMOKINE_RECEPTORS_BIND_CHEMOKINES	13	0.7861	2.1627	0	0.0037
REACTOME_GPCR_LIGAND_BINDING	52	0.5512	2.142	0	0.00404
IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	142	0.3917	1.8545	0	0.04474
IMMUNE_RESPONSE	104	0.4226	1.8271	0	0.04596
MARZEC_IL2_SIGNALING_UP	66	0.4367	1.803	0	0.05939
PID_IL2_PI3KPATHWAY	26	0.5221	1.749	0	0.08342
INTERLEUKIN_BINDING	11	0.6461	1.6999	0.01488	0.10229
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	93	0.3903	1.6648	0	0.12741
CYTOKINE_BINDING	24	0.5047	1.6604	0.00904	0.12849
PID_IL2_STAT5PATHWAY	24	0.505	1.6348	0.01974	0.14215
BIOCARTA_IL2RB_PATHWAY	34	0.4428	1.5841	0.00697	0.16944
SANA_TNF_SIGNALING_UP	33	0.4143	1.448	0.04332	0.24273
PLASARI_TGFB1_TARGETS_10HR_UP	58	0.3535	1.4136	0.03653	0.26903

### B. 2° vs Naïve

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
GOLDRATH_ANTIGEN_RESPONSE	197	0.6823	3.1395	0	0
GOLDRATH_IMMUNE_MEMORY	36	0.7195	2.5036	0	0
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	60	0.5814	2.2322	0	7.47E-04
CYTOKINE_ACTIVITY	18	0.7152	2.1242	0	0.01818
REACTOME_CHEMOKINE_RECEPTORS_BIND_CHEMOKINES	13	0.7473	1.9893	0.00228	0.01681
REACTOME_PEPTIDE_LIGAND_BINDING_RECEPTORS	24	0.6099	1.9139	0	0.03449
RECEPTOR_ACTIVITY	144	0.4327	1.9219	0	0.0449
MARZEC_IL2_SIGNALING_UP	66	0.4687	1.83	0	0.05592
INTERLEUKIN_RECEPTOR_ACTIVITY	10	0.7091	1.781	0.01199	0.09752
PLASARI_TGFB1_TARGETS_10HR_UP	58	0.4498	1.7416	0	0.09547
IMMUNE_RESPONSE	104	0.4144	1.7391	0	0.13357
PID_IL2_STAT5PATHWAY	24	0.5432	1.7375	0.00228	0.09632
BIOCARTA_CCR5_PATHWAY	12	0.6524	1.7329	0.01149	0.09627
IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	142	0.3885	1.7162	0	0.14882
REACTOME_GPCR_LIGAND_BINDING	52	0.4375	1.628	0.0069	0.15636
SANA_TNF_SIGNALING_UP	33	0.4798	1.6027	0.01624	0.17413
PHONG_TNF_TARGETS_UP	33	0.4508	1.5366	0.0186	0.2177

### C. 2° vs 1°

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
GOLDRATH_ANTIGEN_RESPONSE	197	0.4329	1.8646	0	0.05705
PLASARI_TGFB1_TARGETS_10HR_UP	58	0.507	1.8335	0	0.05889
PHONG_TNF_TARGETS_UP	33	0.5515	1.7921	0	0.06267
DASU_IL6_SIGNALING_UP	33	0.5088	1.6317	0.00773	0.17973
MARZEC_IL2_SIGNALING_UP	66	0.4251	1.5894	0.00554	0.22494
BIOCARTA_CCR5_PATHWAY	12	0.6382	1.5879	0.02022	0.2236
PLASARI_TGFB1_TARGETS_1HR_UP	12	0.6228	1.5584	0.02568	0.24105
*BIOCARTA_IL1R_PATHWAY	25	0.4931	1.4922	0.04398	0.495
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	60	0.3527	1.3016	0.09573	0.49273

「1°vs Naïve」(A)、「2°vs Naïve」(B)、「2°vs 1°」(C)に関して、GSEAにおいて高いNESを示した既知の免疫応答に関連する gene set。SIZEは gene setに含まれる遺伝子数。\*は、標準化タグ数が3細胞集団いずれにもおいて一桁台(<10)の遺伝子も含む。



表 4. DAVID において高い相関性を示した免疫応答に関連する Annotation term

A. 1° > Naïve

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0048583~regulation of response to stimulus	50	4.17362	3.42E-08	1.03E-04	3.42E-05	6.16E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0002682~regulation of immune system process	49	4.09015	4.17E-08	1.25E-04	3.13E-05	7.50E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0048002~antigen processing and presentation of peptide antigen	14	1.16861	1.20E-07	3.59E-04	5.98E-05	2.15E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0050776~regulation of immune response	33	2.75459	5.65E-07	0.00169441	2.12E-04	0.001018
PANTHER_BP_ALL	BP00255:Cytokine/chemokine mediated immunity	22	1.83639	1.10E-06	2.21E-04	1.10E-04	0.001383
GOTERM_BP_ALL	GO:0002684~positive regulation of immune system process	33	2.75459	3.09E-06	0.00922091	7.72E-04	0.00556
GOTERM_BP_ALL	GO:0040011~locomotion	48	4.00668	3.91E-06	0.01167121	9.03E-04	0.007046
PANTHER_BP_ALL	BP00107:Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	34	2.83806	7.31E-06	0.00146042	2.92E-04	0.009159
GOTERM_BP_ALL	GO:0002449~lymphocyte mediated immunity	18	1.5025	5.12E-06	0.01524181	0.0010965	0.009219
GOTERM_BP_ALL	GO:0042330~taxis	22	1.83639	5.29E-06	0.01575332	0.001058	0.00953
GOTERM_BP_ALL	GO:0006935~chemotaxis	22	1.83639	5.29E-06	0.01575332	0.001058	0.00953
GOTERM_BP_ALL	GO:0002443~leukocyte mediated immunity	19	1.58598	1.22E-05	0.03598731	0.0018309	0.021996
GOTERM_BP_ALL	GO:0002250~adaptive immune response	18	1.5025	2.10E-05	0.06106667	0.00286	0.037813
GOTERM_BP_ALL	GO:0002460~adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	18	1.5025	2.10E-05	0.06106667	0.00286	0.037813
GOTERM_MF_ALL	GO:0019955~cytokine binding	18	1.5025	2.82E-05	0.02478392	0.0062544	0.043923
GOTERM_BP_ALL	GO:0016477~cell migration	34	2.83806	3.01E-05	0.08631823	0.0037543	0.054169
GOTERM_BP_ALL	GO:0009605~response to external stimulus	68	5.67613	5.36E-05	0.14856699	0.0057276	0.09649
GOTERM_MF_ALL	GO:0005102~receptor binding	69	5.7596	8.34E-05	0.07143137	0.0147129	0.129653
PANTHER_BP_ALL	BP00122:Ligand-mediated signaling	41	3.42237	1.23E-04	0.02421221	0.0030591	0.153487
GOTERM_BP_ALL	GO:0007626~locomotory behavior	32	2.67112	1.56E-04	0.37293721	0.0136329	0.279738
GOTERM_BP_ALL	GO:0002252~immune effector process	21	1.75292	1.57E-04	0.37564519	0.013368	0.282328
GOTERM_BP_ALL	GO:0050778~positive regulation of immune response	22	1.83639	1.62E-04	0.38507573	0.0134163	0.291437
GOTERM_BP_ALL	GO:0050865~regulation of cell activation	24	2.00334	1.65E-04	0.390003	0.0132707	0.296252
GOTERM_MF_ALL	GO:0005125~cytokine activity	25	2.08681	3.80E-04	0.28665572	0.0368367	0.589587
GOTERM_BP_ALL	GO:0002694~regulation of leukocyte activation	23	1.91987	3.57E-04	0.65727158	0.0264153	0.640669
KEGG_PATHWAY	mmu04062:Chemokine signaling pathway	25	2.08681	6.40E-04	0.09501943	0.0141619	0.76651

## B. 2° > Naïve

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0002682~regulation of immune system process	54	3.55263	3.84E-07	0.00129113	1.44E-04	7.00E-04
KEGG_PATHWAY	mmu04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	42	2.76316	2.94E-06	5.14E-04	5.14E-04	0.003605
GOTERM_BP_ALL	GO:0002684~positive regulation of immune system process	38	2.5	2.77E-06	0.00927059	6.21E-04	0.005049
GOTERM_BP_ALL	GO:0001775~cell activation	42	2.76316	5.79E-06	0.01927834	0.0010809	0.010552
PANTHER_BP_ALL	BP00107:Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	38	2.5	1.95E-05	0.00409617	6.84E-04	0.024593
GOTERM_BP_ALL	GO:0051251~positive regulation of lymphocyte activation	21	1.38158	4.63E-05	0.14422111	0.005178	0.084393
GOTERM_BP_ALL	GO:0050867~positive regulation of cell activation	22	1.44737	4.33E-05	0.13558856	0.0050118	0.078957
GOTERM_BP_ALL	GO:0045321~leukocyte activation	36	2.36842	6.68E-05	0.20125145	0.0067862	0.121741
PANTHER_BP_ALL	BP00255:Cytokine/chemokine mediated immunity	21	1.38158	9.93E-05	0.02072786	0.0026148	0.125435
BIOCARTA	m_nktPathway:Selective expression of chemokine receptors during T-cell polarization	12	0.78947	1.23E-04	0.02648342	0.0264834	0.155774
GOTERM_BP_ALL	GO:0002696~positive regulation of leukocyte activation	21	1.38158	9.99E-05	0.28537911	0.0083649	0.181983
GOTERM_BP_ALL	GO:0050865~regulation of cell activation	28	1.84211	1.14E-04	0.3193829	0.0093404	0.20836
GOTERM_BP_ALL	GO:0050776~regulation of immune response	32	2.10526	1.28E-04	0.34939321	0.0101823	0.232752
GOTERM_BP_ALL	GO:0051249~regulation of lymphocyte activation	26	1.71053	1.92E-04	0.47599298	0.0133733	0.349721
GOTERM_BP_ALL	GO:0002694~regulation of leukocyte activation	27	1.77632	2.29E-04	0.53776043	0.015315	0.417452

## C. 2° > 1°

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
PANTHER_BP_ALL	BP00157:Natural killer cell mediated immunity	13	0.82855	0.00416	0.58156339	0.0761474	5.126433
GOTERM_BP_ALL	GO:0048583~regulation of response to stimulus	42	2.67686	0.005454	0.99999997	0.1603552	9.440722
GOTERM_BP_ALL	GO:0002684~positive regulation of immune system process	29	1.84831	0.006053	1	0.1687219	10.42465

ナイーブと1次メモリー(「1° > Naïve」(A))、ナイーブと2次メモリー(「2° > Naïve」(B))、1次メモリーと2次メモリー(「2° > 1°」(C))において、2倍以上発現量が変動した、もしくは標準化タグ数が0から2以上に変動した遺伝子リストに関して、DAVIDにおいて高い相関性を示した既知の免疫応答に関連する Annotation term。

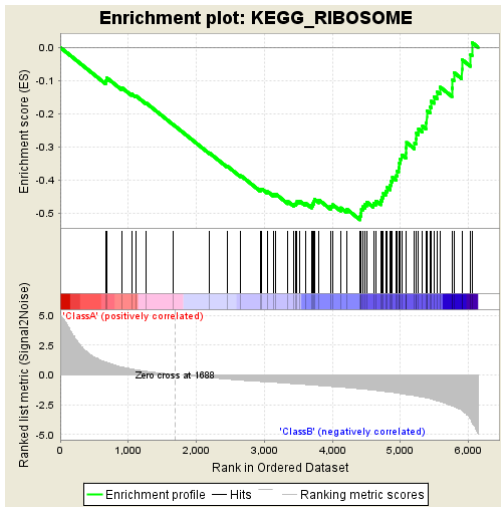
#### 4.5 メモリー細胞における RPs(リボソームタンパク質) の DNA メチル化による遺伝子発現制御

発現抑制を示す gene set では、「KEGG\_RIBOSOME」、「MIPS\_RIBOSOME\_CYTOPLASMIC」(MIPS: RP 遺伝子に関するデータベース RPG[87]に基づく gene set)、REACTOME や Gene Ontology などのデータベースに基づいた RPs に関連した多数の gene set が、「1° vs Naïve」、「2° vs Naïve」、「2° vs 1°」において高い NES で、さらに非常に有意性が高く enrich された(表 6)。

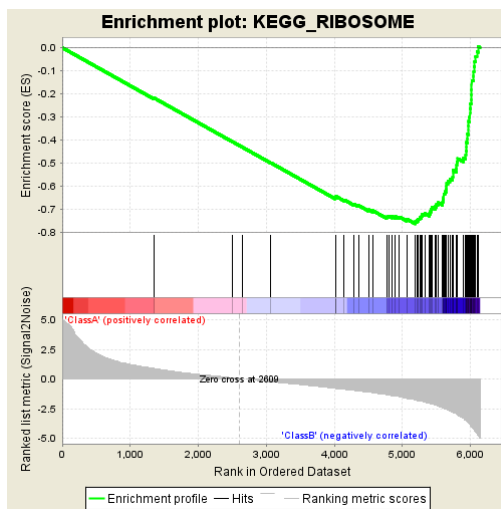
発現量を示す標準化されたタグ数においては、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと分化が進んでいく際、発現している 84 の RPs の中では、継続的に増加傾向を示す RP は全く存在しなかった(表 5)。そして、若干の非継続的な発現変化は見られたが、どれか一つの RP が際立って大きな増加や減少を示すことなく、全発現 RPs は全体として協調的に緩やかな減少傾向を示した。

いずれの RPs にも発現量の極端に異常な変化がないことから、繰り返し感染による RPs の影響を評価するため、ナイーブ、1 次メモリー、そして 2 次メモリーにおける RPs の平均発現量を調べたところ、繰り返し感染により着実に減少しているが、その減少傾斜はよりなだらかになっていた(図 14)。

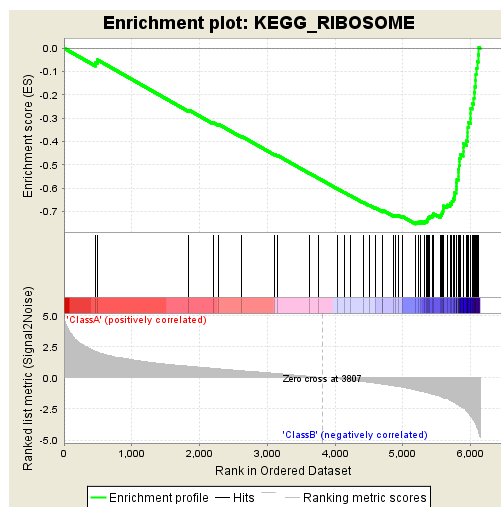
**A. 1° vs Naïve**



**B. 2° vs Naïve**



**C. 2° vs 1**



**D.**

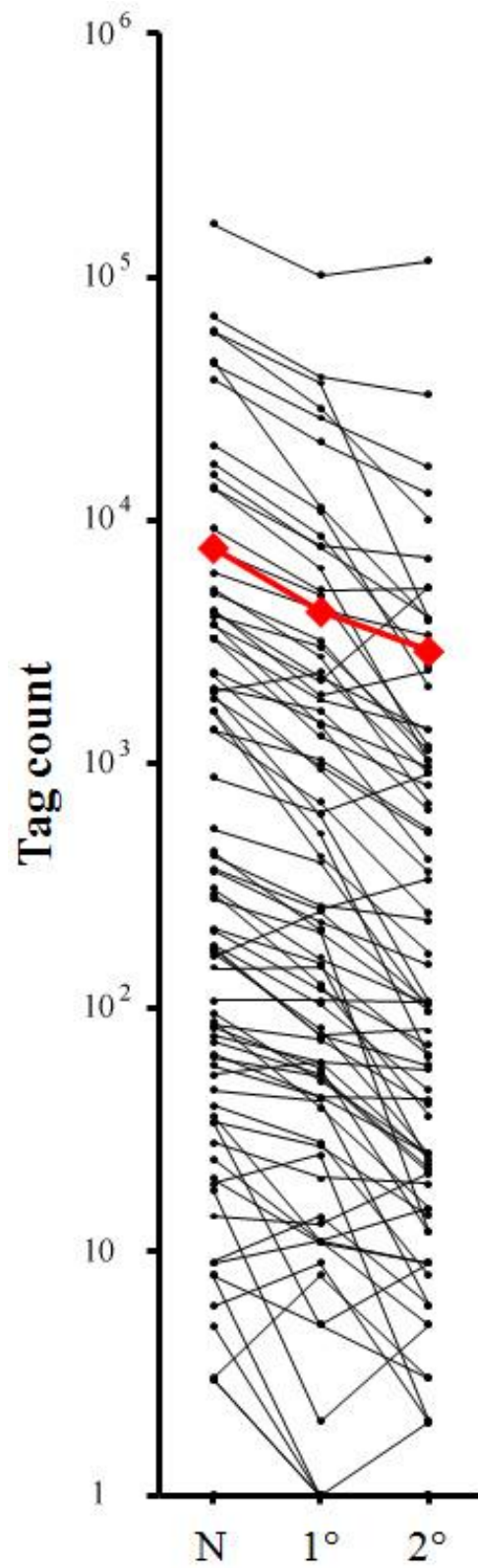




図 14. ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞に発現している全 RPs の発現量の変化

GSEA における gene set、「KEGG\_RIBOSOME」での「1° vs Naïve」(A)、「2° vs Naïve」(B)、「2° vs 1°」(C)の plot。(D) ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞に発現している全 RPs の発現量の変化(●)。(●)は、それぞれの細胞での全 RPs の平均発現量。N もしくは Naïve はナイーブ、1° は 1 次メモリー、2° は 2 次メモリーCD8+ T 細胞のことである。

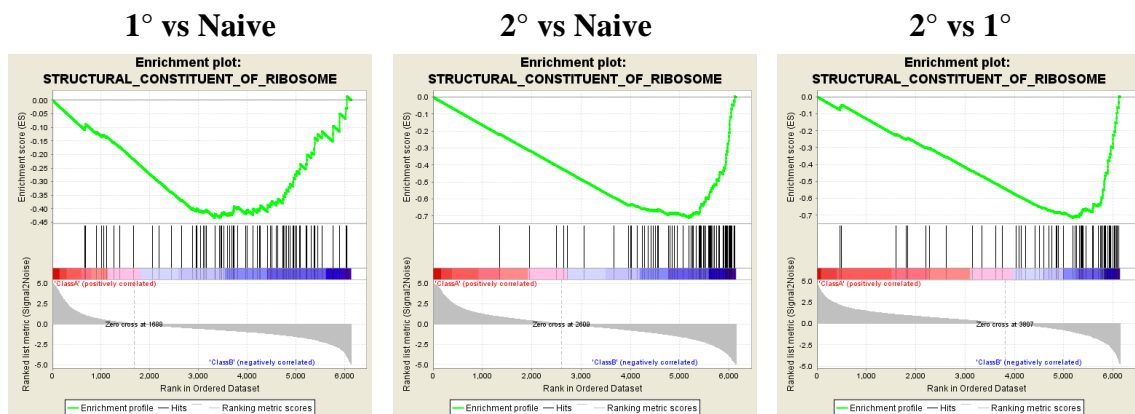
表 5. ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞に発現している全 RPs の発現量の変化

Gene	Naïve	1°	2°
Rps5	165403	100923	116145
Rpl8	69181	39083	33019
Rpl38	60389	28952	10108
Rpsa	59793	36969	3898
Rps20	45300	11436	3914
Rplp2	44068	26318	16566
Rps16	38175	21114	12994
Rps21	20350	10954	2078
Rpl32	17228	8717	2546
Rpl13a	15480	7823	3978
Rps3	13766	7846	6990
Rpl37a	13529	6376	1035
Rpl18a	9286	5209	5312
Rpl14	7612	4960	1189
Rps11	6096	4335	3366
Rps18	5267	2791	692
Rps14	5019	3222	1036
Rpl7	4315	1925	2429
Rpl41	4230	2263	1383
Rps10	4056	3027	1131
Rpl10a	3786	1453	403
Rpl6	3747	2208	5377
Rplp1	3325	1819	1391
Rps24	3307	1300	812
Rps26	2408	1480	978
Rpl23	2343	947	361
Rps2	2061	1650	645
Rpl29	1998	2392	917
Rpl36a	1967	628	106
Rpl36al	1868	995	525
Rpl5	1662	521	63
Rpl35	1655	421	167
Rpl22	1382	697	243
Rps9	1381	1044	539
Rpl7a	887	630	921
Rpl18	544	395	97
Rpl23a	439	211	12
Rpl4	423	263	228
Rps15	371	252	338
Rpl27a	364	226	151
Rps15a	309	161	104
Rpl31	294	125	36
Rpl11	282	207	97
Rpl39	213	152	23
Rps271	207	119	70
Rps3a	182	104	46
Rpl35a	179	77	58
Rps4x	174	77	81
Rps25	169	82	25
Rps13	163	250	104
Rps19	146	148	64
Rpl711	107	107	105
Rpl36	95	50	25
Rpl37	88	39	15
Rpl12	85	74	40
Rps23	83	56	12
Rpl15	77	60	56
Rps6	73	54	22
Rpl30	65	43	25
Rpl13	63	53	21
Rpl26	58	43	42
Rpl21	53	60	24
Rpl24	46	42	6
Rps29	40	28	8
Rpl2211	36	11	5
Rps28	34	5	3
Rpl3	34	27	14
Rps12	28	20	19
Rpl34	24	11	15
Rpl10	20	11	9
Rps17	19	25	2
Rpl19	18	2	5
BC003885(Rpl241)	14	13	21
Rps8	9	14	6
Rps27	9	11	9
Rps27a	8	1	0
Rpl28	8	5	9
Rpl9	6	9	2
Rpl27	5	0	2
EG668319(Rpl211)	3	0	0
Rps7	3	1	0
Rpl17	3	8	3
Rpl31	1	0	0
Rpl39l	0	1	0
AVERAGE	7714.2	4240	2920.4

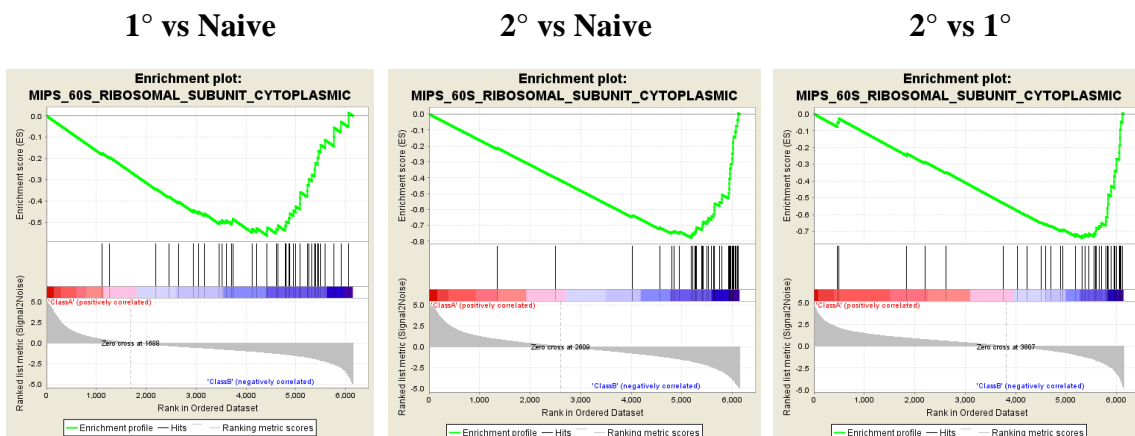
ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T細胞に発現している全RPの標準化タグ数とその平均。

そして、enrichされた gene set が示すように(図 15)、1次メモリーさらに2次メモリー細胞に及ぼす機能的な影響として、細胞内のリボソームの構成、ペプチド鎖の伸長をはじめとした翻訳(タンパクの合成過程)、RNAの代謝やNMD(Nonsense-mediated RNA decay)などが抑制的に制御されていることが強く示唆される。

### A. STRUCTUAL\_CONSTITUENT\_OF\_RIBOSOME

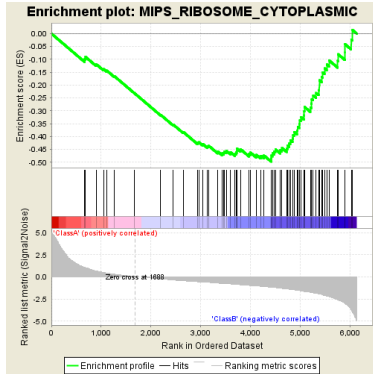


### B. MIPS\_60S\_RIBOSOMAL\_SUBUNIT\_CYTOPLASMIC

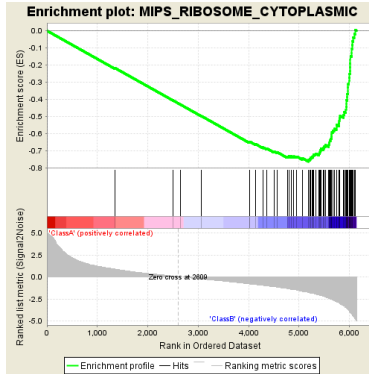


## C. MIPS\_RIBOSOME\_CYTOPLASMIC

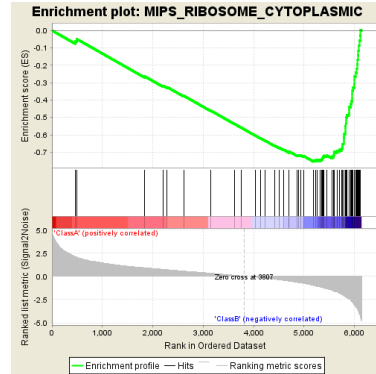
1° vs Naive



2° vs Naive

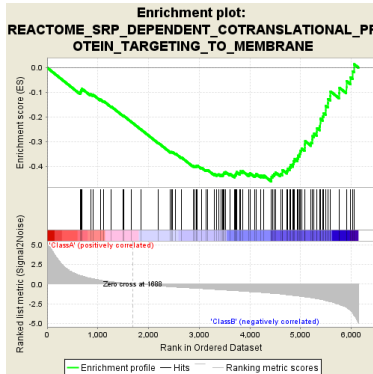


2° vs 1°

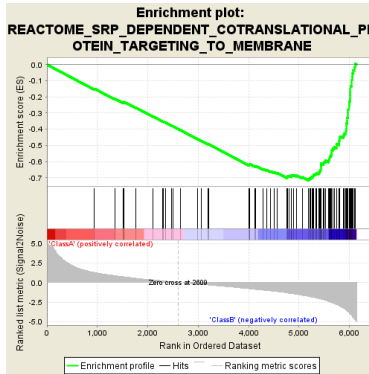


## D. REACTOME\_SRP\_DEPENDENT\_COTRANSLATIONAL\_PROTEIN\_TARGETING\_TO\_MEMBRANE

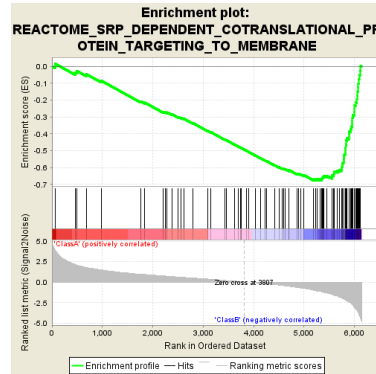
1° vs Naive



2° vs Naive

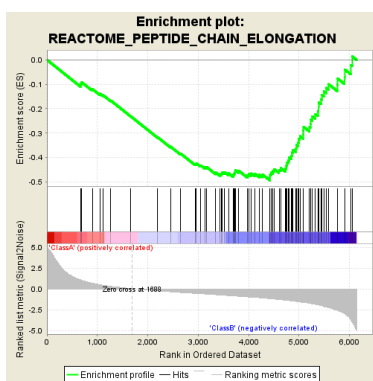


2° vs 1°

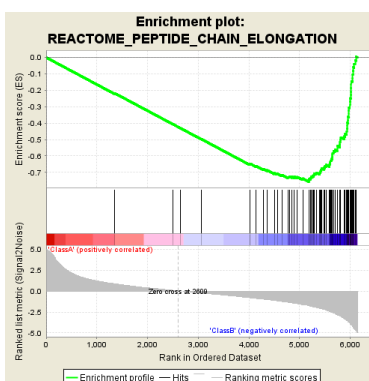


## E. REACTOME\_PEPTIDE\_CHAIN\_ELONGATION

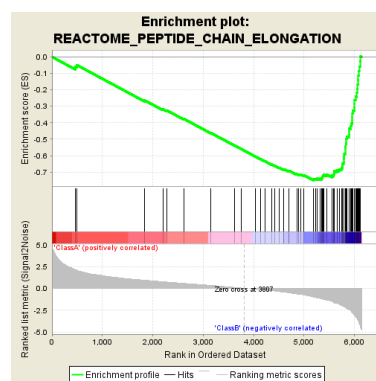
1° vs Naive



2° vs Naive

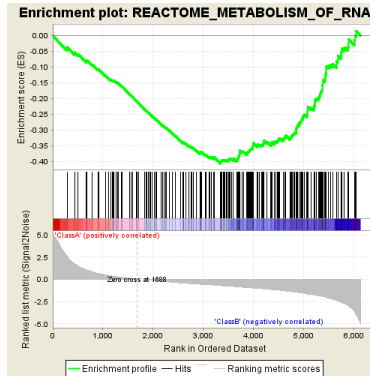


2° vs 1°

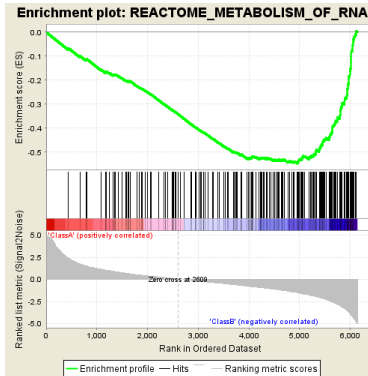


## F. REACTOME\_METABOLISM\_OF\_RNA

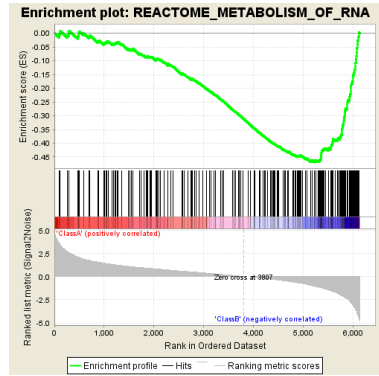
1° vs Naive



2° vs Naive

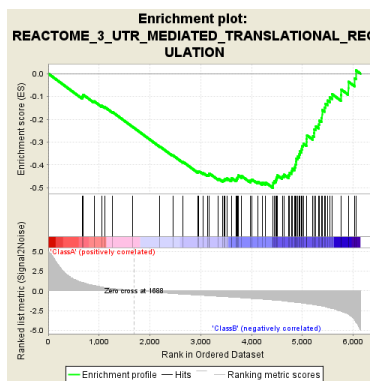


2° vs 1°

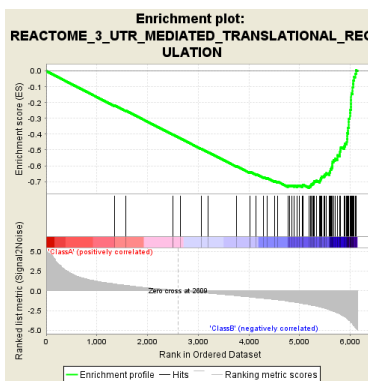


## G. REACTOME\_3\_UTR\_MEDIATED\_TRANSLATIONAL\_REGULATION

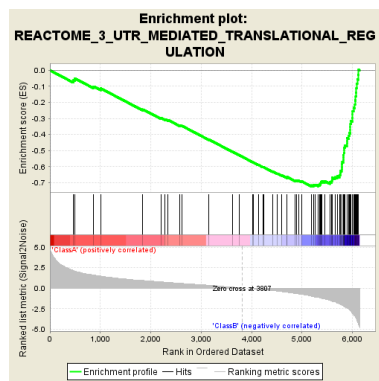
1° vs Naive



2° vs Naive

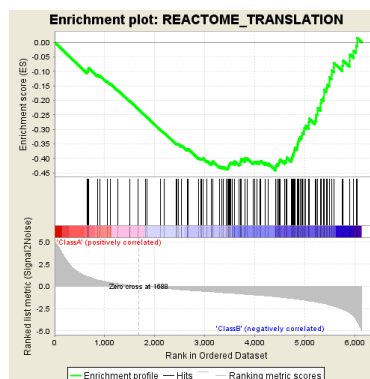


2° vs 1°

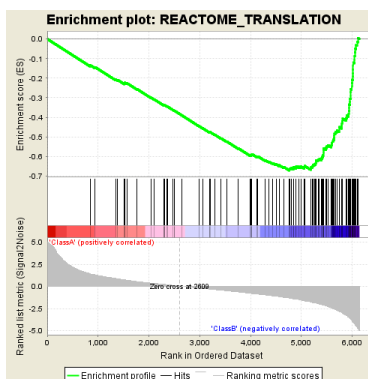


## H. REACTOME\_TRANSLATION

1° vs Naive



2° vs Naive



2° vs 1°

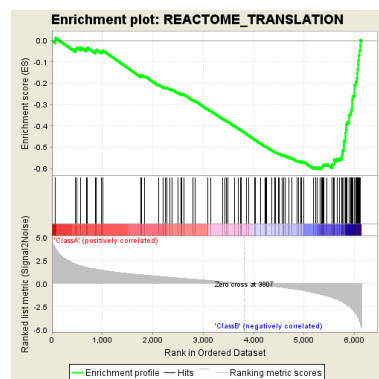




図 15. GSEA において高い NES を示した RPs に関連する gene set  
 (A)~(H)GSEA において高い NES で enrich された RPs に関連する gene set。

表 6. GSEA において高い NES を示した RPs に関連する gene set

A. 1° vs Naïve

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
MIPS_60S_RIBOSOMAL_SUBUNIT_CYTOPLASMIC	74	-0.5238	-1.9152	0	0.35565
REACTOME_3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION	42	-0.5621	-1.88	0	0.29917
KEGG_RIBOSOME	75	-0.5192	-1.8688	0	0.14331
MIPS_RIBOSOME_CYTOPLASMIC	72	-0.4979	-1.8219	0	0.14913
REACTOME_NONSENSE_MEDIATED_DECAY_ENHANCED_BY_THE_EXON_JUNCTION_COMPLEX	88	-0.4778	-1.7995	0	0.16166
REACTOME_PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	74	-0.4934	-1.7987	0.00134	0.15214
REACTOME_SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	94	-0.4623	-1.7536	0	0.13976
REACTOME_TRANSLATION	114	-0.4418	-1.7253	0	0.17299
REACTOME_METABOLISM_OF_RNA	207	-0.407	-1.7074	0	0.19635
REACTOME_METABOLISM_OF_MRNA	175	-0.4042	-1.6713	0	0.23625
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME	73	-0.4331	-1.5798	0.00535	0.56583

B. 2° vs Naïve

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
KEGG_RIBOSOME	75	-0.7627	-2.9034	0	0
MIPS_RIBOSOME_CYTOPLASMIC	72	-0.7636	-2.8608	0	0
REACTOME_SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	94	-0.7171	-2.8495	0	0
REACTOME_PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	74	-0.7573	-2.8443	0	0
REACTOME_3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION	78	-0.7403	-2.84	0	0
REACTOME_NONSENSE_MEDIATED_DECAY_ENHANCED_BY_THE_EXON_JUNCTION_COMPLEX	88	-0.7053	-2.7642	0	0
REACTOME_TRANSLATION	114	-0.6718	-2.7169	0	0
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME	73	-0.7105	-2.6994	0	0
MIPS_60S_RIBOSOMAL_SUBUNIT_CYTOPLASMIC	42	-0.7784	-2.6298	0	0
REACTOME_METABOLISM_OF_MRNA	175	-0.5761	-2.4632	0	0
REACTOME_METABOLISM_OF_RNA	207	-0.5471	-2.41	0	0
MIPS_40S_RIBOSOMAL_SUBUNIT_CYTOPLASMIC	29	-0.7391	-2.3415	0	0
REACTOME_ACTIVATION_OF_THE_MRNA_UPON_BINDING_OF_THE_CAP_BINDING_COMPLEX_AND EIFS_AND_SUBSEQUENT_BINDING_TO_43S	37	-0.6933	-2.2764	0	0
STRUCTURAL_MOLECULE_ACTIVITY	109	-0.5587	-2.2428	0	0
TRANSLATION	108	-0.5313	-2.145	0	8.84E-04
RNA_BINDING	163	-0.494	-2.1224	0	8.93E-04

### C. 2° vs 1°

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
MIPS_RIBOSOME_CYTOPLASMIC	72	-0.7545	-3.2257	0	0
KEGG_RIBOSOME	75	-0.7538	-3.205	0	0
REACTOME_PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	74	-0.7499	-3.1785	0	0
REACTOME_3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION	78	-0.7243	-3.0982	0	0
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME	73	-0.7149	-3.0015	0	0
REACTOME_SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	94	-0.6765	-2.9892	0	0
REACTOME_NONSENSE_MEDIATED_DECAY_ENHANCED_BY_THE_EXON_JUNCTION_COMPLEX	88	-0.6569	-2.8364	0	0
MIPS_40S_RIBOSOMAL_SUBUNIT_CYTOPLASMIC	29	-0.7977	-2.7791	0	0
MIPS_60S_RIBOSOMAL_SUBUNIT_CYTOPLASMIC	42	-0.7386	-2.7744	0	0
REACTOME_TRANSLATION	114	-0.6023	-2.7514	0	0
STRUCTURAL_MOLECULE_ACTIVITY	109	-0.5531	-2.5098	0	0
REACTOME_ACTIVATION_OF_THE_MRNA_UPON_BINDING_OF_THE_CAP_BINDING_COMPLEX_AND_EIFS_AND_SUBSEQUENT_BINDING_TO_43S	37	-0.6897	-2.5091	0	0
REACTOME_METABOLISM_OF_MRNA	175	-0.5059	-2.4848	0	0
REACTOME_METABOLISM_OF_RNA	207	-0.469	-2.3091	0	1.27E-04
TRANSLATION	108	-0.4686	-2.1409	0	0.01115
RNA_BINDING	163	-0.4411	-2.1252	0	0.00988

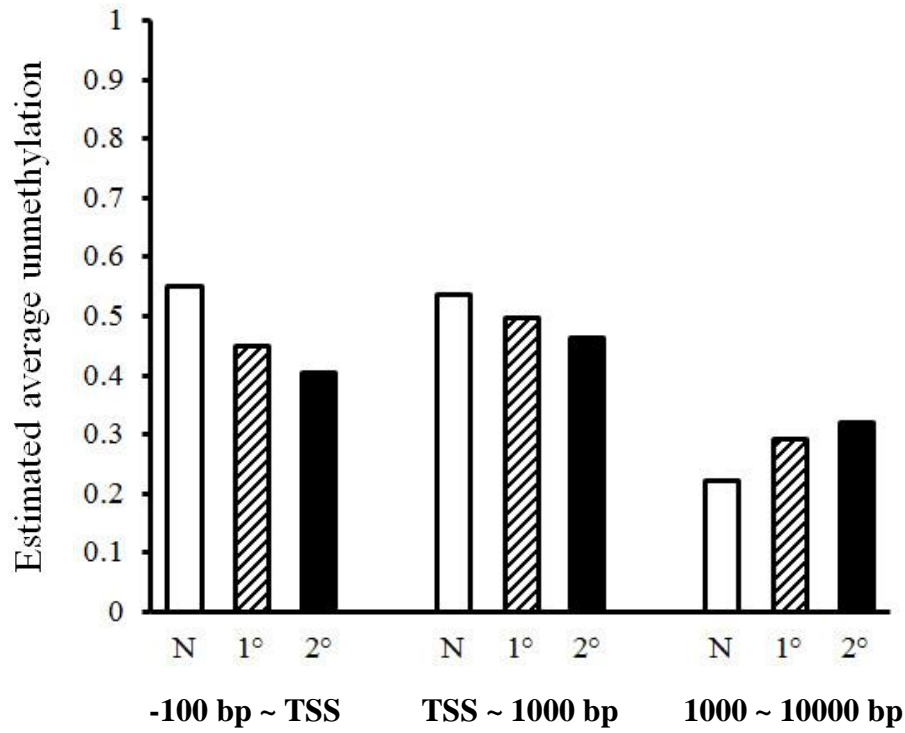
「1° vs Naïve」(A)、「2° vs Naïve」(B)、「2° vs 1°」(C)に関して、GSEAにおいて高いNESを示したRPsに関連するgene set。SIZEはgene setに含まれる遺伝子数。

これらのRPsのDNAメチル化に関しては、100bp上流からTSSまでの領域、TSSから1000bpまで下流の領域では、ナイーブと比較し、全体として2次メモリーで顕著にメチル化傾向が見られた。1次メモリーでも、100bp上流からTSSまでの領域、TSSから1000bpまで下流の領域では、ナイーブと比較し全体として顕著にメチル化傾向が見られた。特にTSSより100bp上流から1000bp下流までの領域では、ナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと段階的なメチル化傾向が顕著に見られた。TSSより100bp上流から1000bp下流までの領

域での段階的なメチル化傾向とは対照的に、TSS より 1000bp から 10000bp まで下流の領域では、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が顕著に見られた。RPs は全長が短いものが多く、3'末端より下流の領域が、TSS より 1000bp から 10000bp までの領域に含まれるものが多かったが、3'付近、特に 3'下流において高発現遺伝子では低発現遺伝子より顕著なメチル化傾向を示すという現象が報告されているが、それと同様の結果が得られた(図 16)。この結果により、これらの RPs では、DNA メチル化により遺伝子発現が制御されていることが強く示唆される。また、図 16 に Rps271 のゲノム上の TSS より 22bp 上流の領域においてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的にメチル化されている典型例が示してあるが、それぞれの制限酵素切断位置におけるその段階的なメチル化傾向は一見すると看過されるような非常に緩やかなものだった。TSS より 1000bp から 10000bp まで下流における各領域での段階的な脱メチル化傾向も同様に緩やかなものだった。

また、DAVID bioinformatics resources による、発現量が大きく変動した遺伝子群と相関性があるデータベース上の annotation term の検索に関しては、ナイーブより 1 次メモリー、ナイーブより 2 次メモリー、1 次メモリーより 2 次メモリーで発現量が低下した遺伝子リストにおいて、多くの RPs に関連する Annotation term が高い相関性を示した(表 7)。

A.



B.





図 16. ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞に発現している全 RPs の DNA メチル化状態の変化

(A) ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞に発現している全 RPs の各領域における全体的なメチル化状態の変化。(B) Rps27l における TSS より 22bp 上流の位置でのナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーCD8+ T 細胞の HpaII や MspI を用いた MSCC における read の UCSC genome browser による表示。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。N はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■)CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

表 7. DAVID において高い相関性を示した RPs に関連する Annotation term

A. Naïve > 1°

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
SP_PIR_KEYWORDS	ribonucleoprotein	49	2.64151	1.80E-05	0.00898368	7.52E-04	0.025943
KEGG_PATHWAY	mmu03010:Ribosome	23	1.23989	2.42E-05	0.00422312	0.0042231	0.029643
GOTERM_CC_ALL	GO:0005840~ribosome	36	1.9407	9.73E-05	0.04832229	0.0019031	0.140378
GOTERM_MF_ALL	GO:0003735~structural constituent of ribosome	30	1.61725	1.19E-04	0.1199936	0.0084855	0.188963
SP_PIR_KEYWORDS	ribosomal protein	34	1.83288	1.86E-04	0.0888431	0.0057981	0.267146

B. Naïve > 2°

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_CC_ALL	GO:0005840~ribosome	86	4.45596	5.91E-36	3.03E-33	7.58E-34	8.54E-33
SP_PIR_KEYWORDS	ribosomal protein	83	4.30052	9.41E-36	4.93E-33	4.93E-33	1.36E-32
KEGG_PATHWAY	mmu03010:Ribosome	60	3.10881	1.47E-35	2.68E-33	2.68E-33	1.82E-32
SP_PIR_KEYWORDS	ribonucleoprotein	98	5.07772	1.31E-31	6.84E-29	3.42E-29	1.89E-28
GOTERM_CC_ALL	GO:0030529~ribonucleoprotein complex	115	5.95855	2.44E-21	1.25E-18	1.14E-19	3.52E-18
GOTERM_BP_ALL	GO:0006412~translation	91	4.71503	3.85E-21	1.26E-17	4.21E-18	7.00E-18
GOTERM_CC_ALL	GO:0033279~ribosomal subunit	30	1.5544	5.23E-13	2.68E-10	1.34E-11	7.56E-10
GOTERM_MF_ALL	GO:0005198~structural molecule activity	93	4.81865	3.12E-12	3.48E-09	1.74E-09	4.99E-09
PANTHER_MF_ALL	MF00075:Ribosomal protein	70	3.62694	2.89E-08	6.50E-06	6.50E-06	3.69E-05
GOTERM_CC_ALL	GO:0015934~large ribosomal subunit	16	0.82902	1.77E-06	9.09E-04	2.84E-05	0.002561

### C. $1^\circ > 2^\circ$

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
KEGG_PATHWAY	mmu03010:Ribosome	41	3.01028	1.35E-21	2.37E-19	2.37E-19	1.66E-18
GOTERM_MF_ALL	GO:0003735~structural constituent of ribosome	46	3.37739	1.47E-17	1.42E-14	1.42E-14	2.32E-14
SP_PIR_KEYWORDS	ribosomal protein	50	3.67107	3.83E-17	1.84E-14	1.84E-14	5.48E-14
GOTERM_CC_ALL	GO:0005840~ribosome	52	3.81791	7.27E-17	5.26E-14	5.26E-14	1.55E-13
SP_PIR_KEYWORDS	ribonucleoprotein	54	3.96476	5.57E-12	2.68E-09	1.34E-09	7.98E-09
GOTERM_CC_ALL	GO:0030529~ribonucleoprotein complex	62	4.55213	2.44E-06	0.0011564	1.16E-04	0.003489
GOTERM_BP_ALL	GO:0006412~translation	54	3.96476	7.93E-09	2.34E-05	1.17E-05	1.43E-05

ナイーブと1次メモリー(「Naive > 1°」(A))、ナイーブと2次メモリー(「Naive > 2°」(B))、1次メモリーと2次メモリー(「1° > 2°」(C))において、2倍以上発現量が変動した、もしくは標準化タグ数が0から2以上に変動した遺伝子リストに関して、DAVIDにおいて高い相関性を示した既知のRPsに関連するAnnotation term。

#### 4.6 メモリー細胞におけるMRPs(Mitochondrial ribosomal proteins)のDNAメチル化による遺伝子発現制御

GSEAにおいて高いNESを示したRPsに関連したgene setの中に、いくつかのMRPsが含まれていたが、DAVID bioinformatics resourcesを用いても、ナイーブより1次メモリー、ナイーブより2次メモリー、1次メモリーより2次メモリーで発現量が低下した遺伝子リストにおいて、多くのMRPsに関連するAnnotation termが高い相関性を示した(表8)。

表8. DAVIDにおいて高い相関性を示したMRPsに関連するAnnotation term

##### A. Naive > 1°

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrion	106	5.71429	5.27E-04	0.23196595	0.012489	0.755939
GOTERM_CC_ALL	GO:0044429~mitochondrial part	73	3.93531	6.09E-04	0.26660209	0.010635	0.875573

## B. Naïve > 2°

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrion	168	8.70466	8.88E-22	4.65E-19	1.16E-19	1.29E-18
GOTERM_CC_ALL	GO:0005739~mitochondrion	237	12.2798	1.37E-21	7.01E-19	7.01E-20	1.97E-18
GOTERM_CC_ALL	GO:0044429~mitochondrial part	115	5.95855	6.66E-17	5.70E-14	4.33E-15	1.55E-13
GOTERM_CC_ALL	GO:0005743~mitochondrial inner membrane	78	4.04145	4.69E-16	2.28E-13	1.63E-14	6.44E-13
GOTERM_CC_ALL	GO:0031966~mitochondrial membrane	85	4.40415	7.99E-14	4.10E-11	2.16E-12	1.16E-10
GOTERM_CC_ALL	GO:0005740~mitochondrial envelope	86	4.45596	9.96E-13	5.11E-10	2.43E-11	1.44E-09
SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrion inner membrane	52	2.6943	6.55E-12	3.43E-09	4.90E-10	9.50E-09
UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	97	5.02591	9.13E-11	3.38E-07	3.38E-07	1.68E-07
GOTERM_CC_ALL	GO:0005759~mitochondrial matrix	37	1.9171	2.39E-06	0.00122646	3.61E-05	0.003457
GOTERM_CC_ALL	GO:0031980~mitochondrial lumen	37	1.9171	2.39E-06	0.00122646	3.61E-05	0.003457
GOTERM_CC_ALL	GO:0005761~mitochondrial ribosome	13	0.67358	3.97E-04	0.18419872	0.0052065	0.571902

## C. 1° > 2°

Annotation Category	Annotation Term	Count	%	PValue	Multiple Testing Correction		
					Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_CC_ALL	GO:0005739~mitochondrion	148	10.8664	2.99E-08	1.42E-05	2.84E-06	4.28E-05
GOTERM_CC_ALL	GO:0044429~mitochondrial part	68	4.99266	2.45E-06	0.00115841	1.05E-04	0.003495
SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrion	92	6.75477	2.97E-06	0.00142787	1.79E-04	0.004254
GOTERM_CC_ALL	GO:0005743~mitochondrial inner membrane	45	3.30396	3.01E-06	0.00142404	1.10E-04	0.004297
GOTERM_CC_ALL	GO:0005740~mitochondrial envelope	51	3.74449	4.58E-05	0.02147811	0.0012764	0.065446
GOTERM_CC_ALL	GO:0031966~mitochondrial membrane	48	3.52423	7.91E-05	0.03679138	0.0018725	0.112963

ナイーブと1次メモリー(「Naïve > 1°」(A))、ナイーブと2次メモリー(「Naïve > 2°」(B))、1次メモリーと2次メモリー(「1° > 2°」(C))において、2倍以上発現量が変動した、もしくは標準化タグ数が0から2以上に変動した遺伝子リストに関して、DAVIDにおいて高い相関性を示した既知のMRPsに関連するAnnotation term。

発現量を示す標準化されたタグ数においては、ナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと分化が進んでいく際、発現している77のMRPsの中で、2つのMRPsを除き、継続的に増加傾向を示すMRPは存在しなかった。発現している77の全MRPsの中で、32のMRPsが継続的に発現減少傾向を示した(表



9)が、RPsと同様に、どれか一つのMRPが際立って大きな増加や減少を示すこ

となく、全発現MRPsは全体として協調的に緩やかな減少傾向を示した。

表 9. ナイーブから、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T細胞へと継続的に発現量の上昇を示した32のMRPs

Gene	Naïve	1°	2°
Mrps34	917	814	434
Mrpl36	521	465	127
Mrpl54	463	332	203
Mrpl48	403	294	248
Mrpl11	340	280	223
Mrpl33	306	164	128
Mrpl55	289	252	186
Mrpl17	228	206	78
Mrps6	202	155	124
Mrpl30	199	90	68
Mrpl10	197	186	145
Mrps14	183	121	76
Mrpl34	149	91	51
Mrpl3	128	103	97
Mrpl15	105	80	46
Mrps36	104	63	19
Mrps28	104	68	45
Mrps35	104	79	46
Mrps12	103	78	75
Mrpl41	89	70	56
Mrps9	65	40	39
Mrp63	61	33	15
Mrps17	50	30	21
Mrpl45	46	37	35
Mrpl44	44	30	24
Mrps33	38	24	4
Mrps18b	23	20	11
Mrpl39	16	14	3
Mrpl23	16	5	1
Mrps22	16	13	11
Mrpl18	11	8	6
Mrpl22	4	3	2
AVERAGE	172.68	132.88	82.692

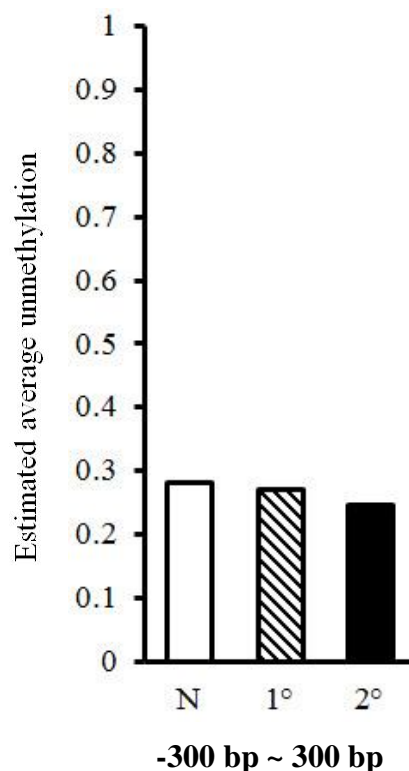


図 17. ナイーブから、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T細胞へと継続的に発現量の上昇を示した32のMRPsのDNAメチル化状態の変化

ナイーブから、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T細胞へと継続的に発現量の上昇を示した32のMRPs(表9)のTSSより300bp上流から300bp下流までの領域における全体的なメチル化状態。数値(bp)はTSSからの距離を示す。□はナイーブ(N)、▨は1次メモリー(1°)、■は2次メモリー(2°)CD8+ T細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと継続的に発現減少傾向を示した 32 の MRPs では、TSS より 300bp 上流から 300bp 下流までの比較的狭い領域で、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な DNA メチル化傾向が若干見られた(図 17)。

#### 4.7 メモリー細胞の老化現象の DNA メチル化・脱メチル化による遺伝子発現制御

RP と MRPs が与える影響として、老化[88] [89]や寿命[90] [91] [92]の制御機構が多数報告されているが、典型的なメモリー細胞が持つ特徴として「長期生存能」に着目し、GSEA で enrich された gene set を検索したところ、「長期生存能」とは対照的なアポトーシスや老化[93](図 18)に関連する多数の gene set が比較的高い NES で enrich された(表 10)。

**表 10. GSEA において比較的高い NES を示したアポトーシスや老化に関連する gene set**

##### A. 1° vs Naïve

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
DEMAGALHAES_AGING_UP	30	0.5933	2.0976	0	0.00606
LEE_AGING_CEREBELLUM_UP	53	0.5184	2.0017	0	0.01462
RODWELL_AGING_KIDNEY_UP	209	0.3741	1.8312	0	0.05196
APOPTOTIC_PROGRAM	43	0.4845	1.6894	0.00331	0.10673
BIOCARTA_CASPASE_PATHWAY	19	0.5105	1.6108	0.03313	0.15439
* POSITIVE_REGULATION_OF_CASPASE_ACTIVITY	18	0.56	1.5992	0.02141	0.13284
RODWELL_AGING_KIDNEY_NO_BLOOD_UP	58	0.3945	1.5588	0.01805	0.17678
* CASPASE_ACTIVATION	17	0.5449	1.544	0.04846	0.16286
DUTTA_APOPTOSIS_VIA_NFKB	21	0.4496	1.4233	0.04207	0.25763
* FRIDMAN_SENESCENCE_UP	58	0.3184	1.176	0.21064	0.49591

## B. 2° vs Naïve

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
BIOCARTA_CASPASE_PATHWAY	19	0.6987	2.0663	0	0.00951
APOPTOTIC_PROGRAM	35	0.5693	1.9653	0	0.0545
UEDA_CENTRAL_CLOCK	47	0.5104	1.8975	0	0.0393
POSITIVE_REGULATION_OF_CASPASE_ACTIVITY	13	0.6904	1.8315	0.00224	0.06358
CASPASE_ACTIVATION	13	0.6904	1.81	0.00223	0.07288
AMUNDSON_DNA_DAMAGE_RESPONSE_TP53	12	0.6948	1.7684	0.00871	0.08064
REACTOME_BMAL1_CLOCK_NPAS2_ACTIVATES_CIRCADIAN_EXPRESSION	15	0.632	1.7219	0.00932	0.10048
PID_CASPASE_PATHWAY	38	0.495	1.7181	0.00226	0.10258
CONCANNON_APOPTOSIS_BY_EPOXOMICIN_UP	113	0.3954	1.7114	0	0.10632
DEMAGALHAES_AGING_UP	30	0.5003	1.6581	0.01134	0.13687
BRUINS_UVC_RESPONSE_VIA_TP53_GROUP_B	219	0.3499	1.643	0	0.14805
SA_CASPASE_CASCADE	14	0.5772	1.5708	0.05569	0.19584
FRIDMAN_SENESCENCE_UP	38	0.4422	1.525	0.02613	0.22532
UEDA_PERIFERAL_CLOCK	87	0.367	1.5163	0.00267	0.22738
REACTOME_CIRCADIAN_CLOCK	26	0.4675	1.4876	0.05679	0.25205
DUTTA_APOPTOSIS_VIA_NFKB	21	0.4819	1.4446	0.05399	0.28023
REACTOME_INTRINSIC_PATHWAY_FOR_APOPTOSIS	24	0.433	1.3676	0.07299	0.33767

## C. 2° vs 1°

Gene set	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
REACTOME_BMAL1_CLOCK_NPAS2_ACTIVATES_CIRCADIAN_EXPRESSION	15	0.6894	1.8704	0	0.0554
WHITFIELD_CELL_CYCLE_S	60	0.5162	1.8579	0	0.06111
CONCANNON_APOPTOSIS_BY_EPOXOMICIN_UP	113	0.4598	1.8397	0.00137	0.05656
UEDA_CENTRAL_CLOCK	47	0.5231	1.8037	0.00152	0.06552
BIOCARTA_CASPASE_PATHWAY	19	0.6289	1.7743	0.00316	0.07605
DEBIASI_APOPTOSIS_BY_REOVIRUS_INFECTION_UP	138	0.4208	1.7388	0	0.10141
PEREZ_TP53_AND_TP63_TARGETS	57	0.4707	1.7048	0.00287	0.12103
CEBALLOS_TARGETS_OF_TP53_AND_MYC_UP	12	0.6784	1.6683	0.00498	0.15539
LU_AGING_BRAIN_UP	100	0.4049	1.6068	0.00134	0.20647
REACTOME_CIRCADIAN_CLOCK	26	0.5137	1.5688	0.02287	0.23734
FRIDMAN_SENESCENCE_UP	38	0.4718	1.5496	0.01937	0.25242
PID_CASPASE_PATHWAY	38	0.4535	1.5034	0.0229	0.29411

「1° vs Naïve」(A)、「2° vs Naïve」(B)、「2° vs 1°」(C)に関して、GSEAにおいて比較的高いNESを示したアポトーシスや老化に関連するgene set。SIZEはgene setに含まれる遺伝子数。\*は、標準化タグ数が3細胞集団いずれにもにおいて一桁台(<10)の遺伝子も含む。

## FRIDMAN\_SENESCENCE\_UP

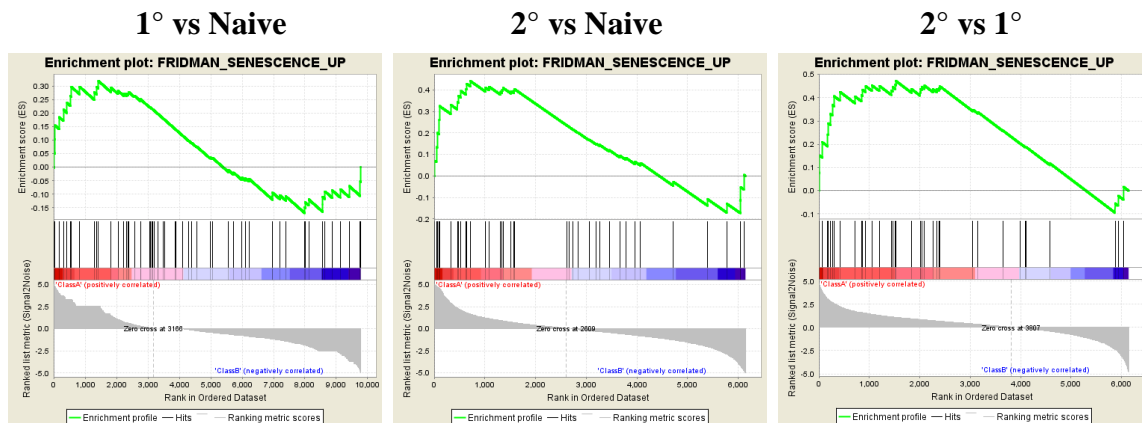


図 18. GSEA での gene set、「FRIDMAN\_SENESCENCE\_UP」の plot

GSEAにおいて、「1° vs Naive」、「2° vs Naive」、「2° vs 1°」の全てに比較的高いNESを示した老化に関連する gene set「FRIDMAN\_SENESCENCE\_UP」[93]の plot。(ただし、「1° vs Naive」では、標準化タグ数が3細胞集団いずれもにおいて一桁台(<10)の遺伝子も含む。)

DAVID bioinformatics resources を用いても、アポトーシスや老化に関連する多数の Annotation term が比較的高い相関性を示した(Data not shown)。また、GOにおける「senescence」の term に含まれる、既知の「老化」に特徴的ないくつかの遺伝子においても、ナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと継続的に発現量の変動が見られた(表 11)。

表 11. GO における senescence に関連する遺伝子

### A. Trp53(p53)

Gene	N	1°	2°
Trp53(p53)	586	484	331

### B. Hmgal

Gene	N	1°	2°
Trp53(p53)	586	484	331

(A) Replicative senescence (; GO:0090399)、Oxidative stress-induced premature senescence (; GO:0090403)などに関連する遺伝子。(B) Positive regulation of cellular senescence (; GO:2000774)、Oncogene-induced senescence (; GO:0090402)、Senescence-associated heterochromatin focus (; GO:0035985)などに関連する遺伝子。青字はナイーブから1次、2次へと段階的な発現量低下を示した遺伝子。



C.

Gene	N	1°	2°
1500015O10Rik	0	0	0
Calr	923	694	951
Cdkn1a(p21)	6	5	139
Cdkn2a(p16)	0	0	0
Hras1	171	122	221
Id2	25	119	203
Myst3	176	179	194
Map2k1	39	19	24
Nsmce2	0	3	1
Opa1	18	19	24
Pml	503	472	535
Prkcd	114	88	103
Smc5	4	1	4
Smc6	21	14	21
Srf	174	184	198
Tbx2	1	0	2
Tbx3	0	2	0

(C) Cellular senescence (; GO:0090398)  
 (A cell aging process stimulated in response to cellular stress, whereby normal cells lose the ability to divide through irreversible cell cycle arrest.)に関連する遺伝子群。赤字はナイーブから1次、2次へと段階的な発現量上昇を示した遺伝子。

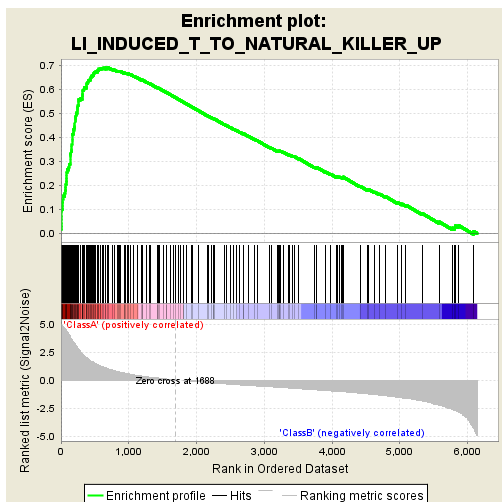
ところで、老化 CD8+ T 細胞は NK 細胞に特異的な遺伝子発現を獲得することが知られている[94] [95]が、「1° vs Naïve」、「2° vs Naïve」、「2° vs 1°」のいずれにおいても、「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」[96]の gene set が enrich された。「1° vs Naïve」と「2° vs Naïve」では、発現上昇を示す gene set の中で、「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」の次に高い NES を示した(表 12)。

この gene set は、Bcl11b の cKO(コンディショナルノックアウト)マウスにおいて T 細胞への分化に拘束された T 細胞前駆体が NK 様細胞(ITNK 細胞 : Induced T-to-NK cells)にリプログラミングされた際にこの T 細胞前駆体に対して ITNK 細胞で発現上昇した遺伝子群であり、本研究と全く異なる実験系に基づいている。

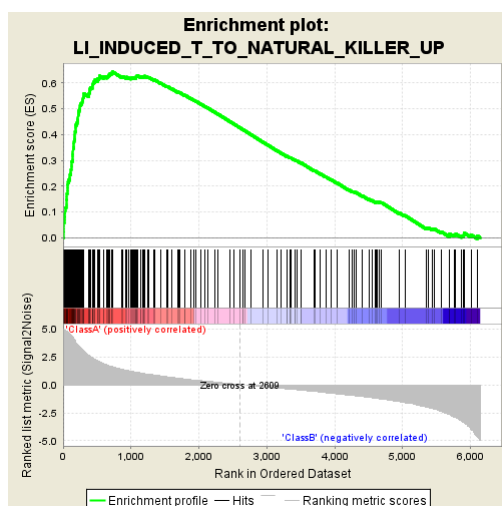
この gene set が基づく研究では、ITNK 細胞の IL-2 による増殖能や、*in vitro* と *in*



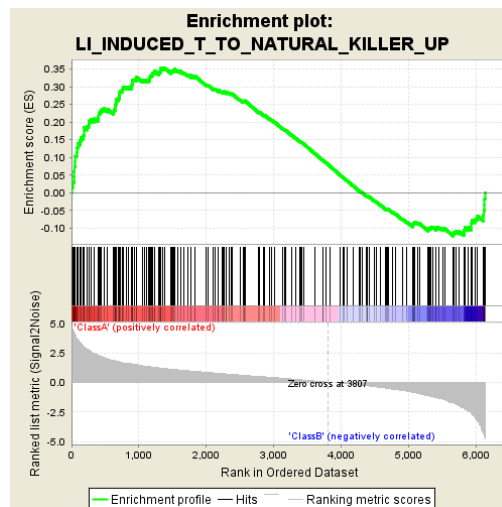
**A. 1° vs Naïve**



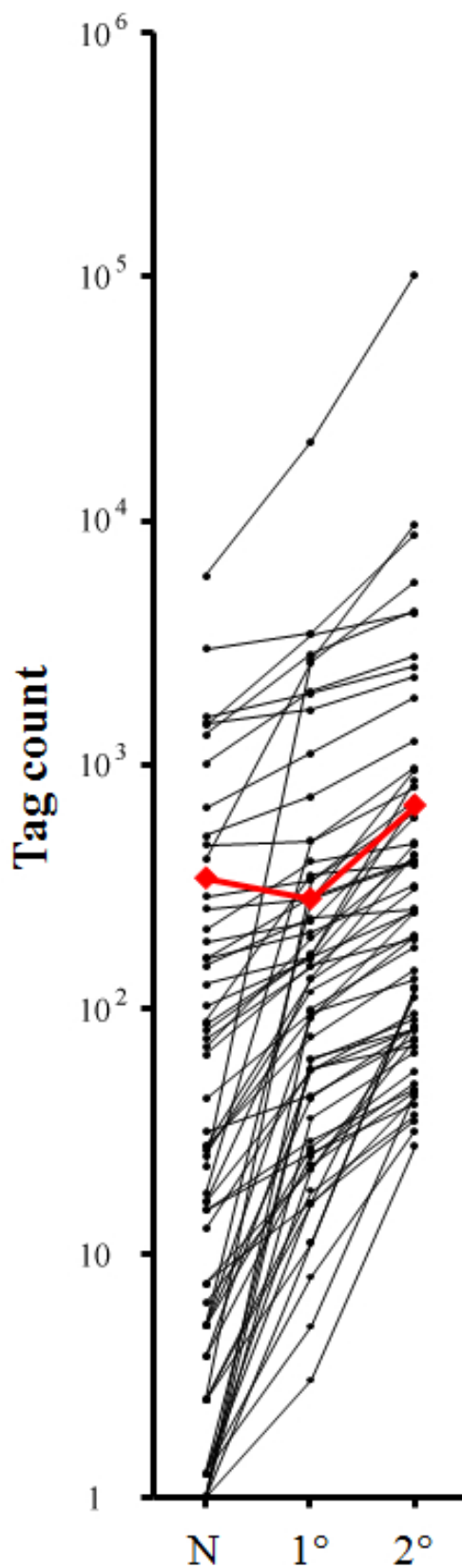
**B. 2° vs Naïve**



**C. 2° vs 1**



**D.**



**図 19. 「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」における遺伝子の発現量の変化**

GSEA における gene set、「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」での「1° vs Naïve」(A)、「2° vs Naïve」(B)、「2° vs 1°」(C)の plot。(D) ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリー-CD8+ T 細胞へと段階的に発現量が上昇している遺伝子の発現量の変化(●)。(●)は、Bcl11b の発現量(Bcl11b は「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」の gene set に含まれていない)。N もしくは Naïve はナイーブ、1° は 1 次メモリー、2° は 2 次メモリー-CD8+ T 細胞のことである。

**表 12. GSEA における「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」と「GRABARCZYK\_BCL11B\_TARGETS\_UP」の gene set**

**A.**

LI_INDUCED_T_TO_NATURAL_KILLER_UP						
class A	class B	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1°	Naïve	185	0.6914	3.3856	0	0
2°	Naïve	185	0.6435	2.9532	0	0
2°	1°	185	0.3526	1.511	0.00247	0.2874

**B.**

GRABARCZYK_BCL11B_TARGETS_UP						
class A	class B	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1°	Naïve	40	0.4024	1.4911	0.02055	0.21117
2°	Naïve	40	0.4578	1.6338	0.00496	0.15236
2°	1°	40	0.3759	1.2555	0.14766	0.53195

「1° vs Naïve」、「2° vs Naïve」、「2° vs 1°」における、GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」(A)と「GRABARCZYK\_BCL11B\_TARGETS\_UP」(B)の NES などのスコア。SIZE は gene set に含まれる遺伝子数。

*vivo* での腫瘍細胞への細胞傷害性も示されている。

この gene set では、「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」と同様に、多くの遺伝子がナイーブより 1 次メモリーと 2 次メモリーでより高い発現量を示し、そ

の gene size(gene set に含まれる全遺伝子)の約 3 分の 1 において、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に発現量が上昇した。また、Bcl11b に関する gene set、「GRABARCZYK\_BCL11B\_TARGETS\_UP」 [97]が正に enrich されたように、Bcl11b の発現量は決して継続的に減少することなく、顕著にその発現を示していた(図 19)(表 13)。

**表 13. GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、顕著に段階的な発現上昇が見られた遺伝子と Bcl11b の発現量**

gene	Naïve	1°	2°
Lgals1	5979	21280	102233
Ifng	23	2692	9679
Rhof	2982	3451	8832
Anxa2	409	2617	5621
Sema4a	1333	2838	4278
Ctsw	1461	3448	4227
Nkg7	1015	2017	2788
Cd7	1581	1977	2546
Elov11	1483	1679	2302
Bscl2	670	1118	1891
Mapkapk3	513	744	1256
Ccl4	18	490	985
Lgals3	5	283	959
Nfil3(E4BP4)	82	167	875
Pkp3	473	494	816
S100a4	3	338	724
Capg	87	168	700
Pltp	290	338	644
Dok2	189	229	616
Prdx4	103	162	482
Aim1	211	402	474
Cish	16	136	433
Chsy1	70	197	429
Prr13	162	290	409
Hao	256	285	404
Myo1f	89	352	391
Tes	161	206	322
Capn2	75	150	315
Ncf4	151	237	259
Il18r1	28	133	254

Sdf2l1	127	164	253
Tnf	26	93	251
Id2	25	119	203
Ifitm1	5	92	198
Slc39a4	65	152	194
Slamf7	0	100	180
Ctma1	28	77	145
Tmem154	43	97	133
Cx3cr1	0	11	123
Casp1	3	11	121
Ccl3	1	16	113
Gfod1	4	56	96
Lrrk1	1	62	91
Il2ra	1	22	86
Errfi1	5	43	84
Gpc1	16	56	83
Aqp9	0	63	83
Sh3bp2	31	44	76
Ifitm2	8	22	75
Dapk2	0	36	67
F2r	5	27	56
F2rl2	4	25	50
Gramd1b	15	29	47
Arsb	6	23	46
Zbtb32	1	5	46
Sytl2	3	16	44
Tnfrsf9	15	26	41
St3gal6	3	18	37
Dusp5	8	16	35
Lag3	1	8	32
Osbpl3	0	3	28
<b>Bcl11b</b>	<b>344</b>	<b>282</b>	<b>683</b>

GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリー CD8+ T 細胞へと段階的に発現量が上昇している遺伝子のナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞における標準化タグ数(黒字)。(赤字)は、Bcl11b の標準化タグ数。

この gene set の中でナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に発現量が上昇した遺伝子の DNA メチル化に関して、TSS より 10000bp から 1000bp まで上流の領域、1000bp 上流から TSS までの領域、TSS より 1000bp 下流までの領域、TSS より 1000bp から 10000bp まで下流の領域のいずれもにおいて、ナイーブと比較し 1 次メモリーと 2 次メモリーで全体として脱メチル化傾向が見られ、特に 2 次メモリーにおいてその傾向は顕著だった。TSS より 1000bp 下流までの領域を除き、他の領域では全体としてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が見られた。発現量が継続的な変化を示さなかった Bcl11b の DNA メチル化に関して、TSS より 1000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、ナイーブと比較し 1 次メモリーと 2 次メモリーで全体として脱メチル化傾向が見られ、1 次メモリーの方が 2 次メモリーより脱メチル化傾向はやや大きく、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと継続的な変化は見られなかった(図 20)。

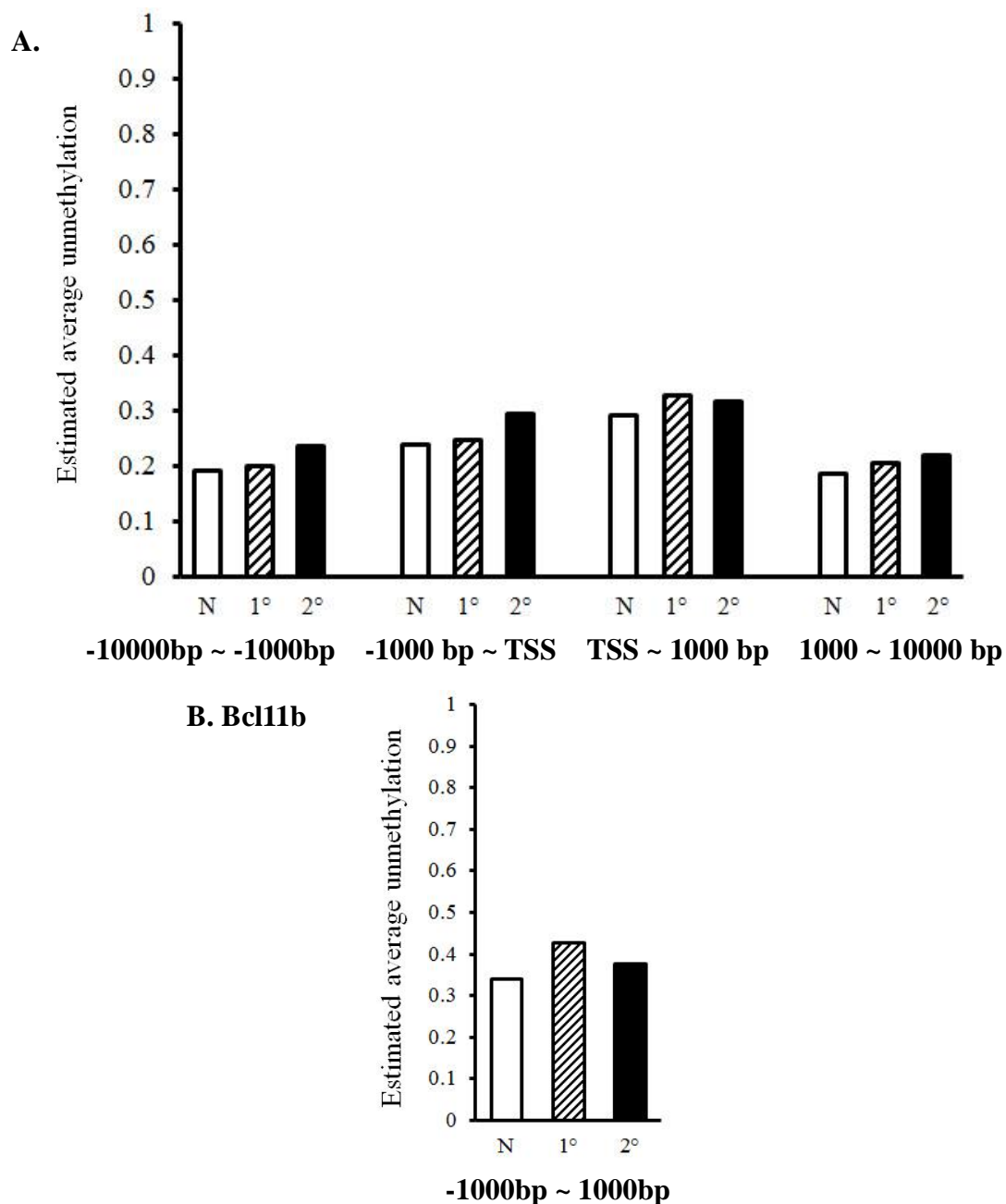


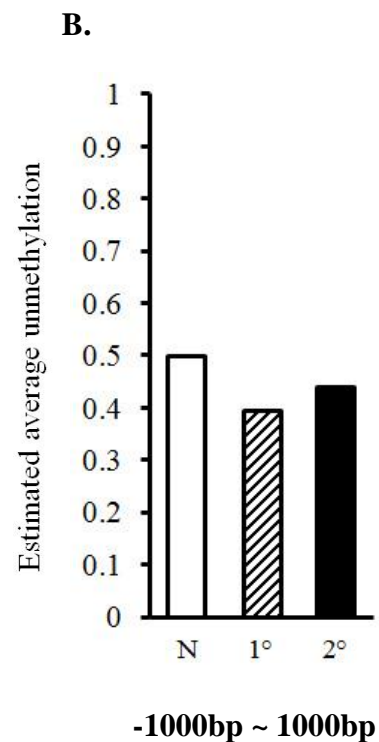
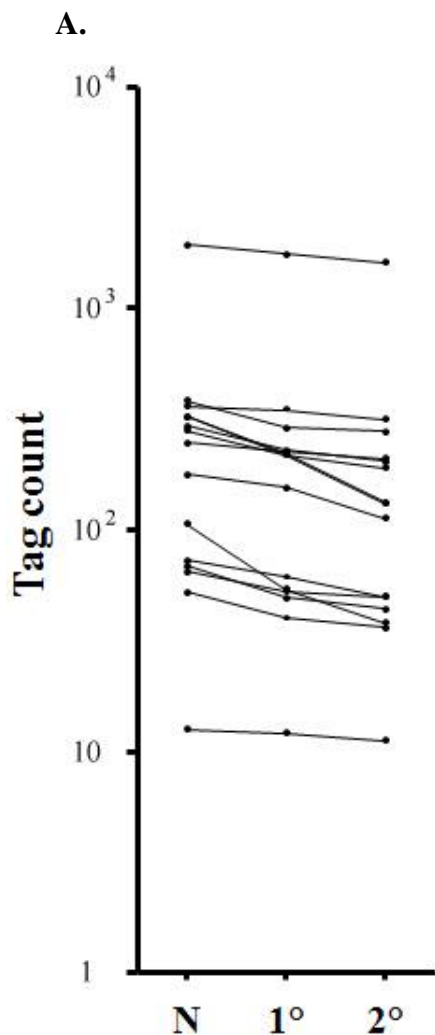
図 20. GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、顕著に段階的な発現上昇が見られた遺伝子と Bcl11b の DNA メチル化状態の変化

(A) GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリー-CD8+ T 細胞へと段階的に発現量が上昇している遺伝子(表 7)の各領域における全体的なメチル化状態。(B)Bcl11b の TSS に近い領域における全体的なメチル化状態の変化。TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。□はナイーブ(N)、▨は 1 次メモリー(1°)、■は 2 次メモリー(2°)CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

表 14. GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、顕著に段階的な発現低下が見られた遺伝子の発現量の変化

GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリー CD8+ T 細胞へと段階的に発現量が低下している遺伝子のナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞における標準化タグ数。

gene	Naïve	1°	2°
Myl6	329	219	131
Cstb	327	222	133
Vps29	107	54	38
Nfkb1	179	157	113
Dennd3	73	61	50
Klk8	282	218	190
Gpr114	363	351	315
Ccdc102a	69	49	44
Med10	296	228	205
Lrrc8c	53	40	36
Cotl1	1966	1779	1624
Rbms1	13	12	11
Lasp1	250	229	211
Tmbim4	65	53	50
Sertad1	386	290	279



**図 21. GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、  
顕著に段階的な発現低下が見られた遺伝子の発現量と DNA メチル化状態の  
変化**

GSEA での「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」において、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリー CD8+ T 細胞へと段階的に発現量が低下している遺伝子の発現量の変化 (A) と TSS に近い領域における全体的なメチル化状態の変化 (B)。TSS は Transcription start site のことで、数値 (bp) は TSS からの距離を示す。N はナイーブ (□)、1° は 1 次メモリー (▨)、2° は 2 次メモリー (■) CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

一方、この gene set において、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に発現量が減少した遺伝子もいくつか見られた (表 14) が、その減少勾配は非常に緩やかなものだった。この gene set が基づくマイクロアレイの結果では、これらの遺伝子はいずれも 10 倍以下の発現上昇にとどまり、そのほとんどが 2 倍程度の発現上昇だった。

これらの遺伝子の DNA メチル化に関しては、TSS より 1000bp 上流から 1000bp 下流までの領域で、ナイーブと比較し 1 次メモリーと 2 次メモリーで全体としてメチル化傾向が見られ、1 次メモリーの方が 2 次メモリーよりメチル化傾向は大きく、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な変化は見られなかった (図 21)。この結果により、この遺伝子群の特にナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に発現量が上昇した遺伝子では、DNA 脱メチル化により遺伝子発現が正に制御されていることが強く示唆される。



表 15. GSEA における「KEGG\_NATURAL\_KILLER\_CELL\_MEDIATED\_CYTOTOXICITY」の gene set

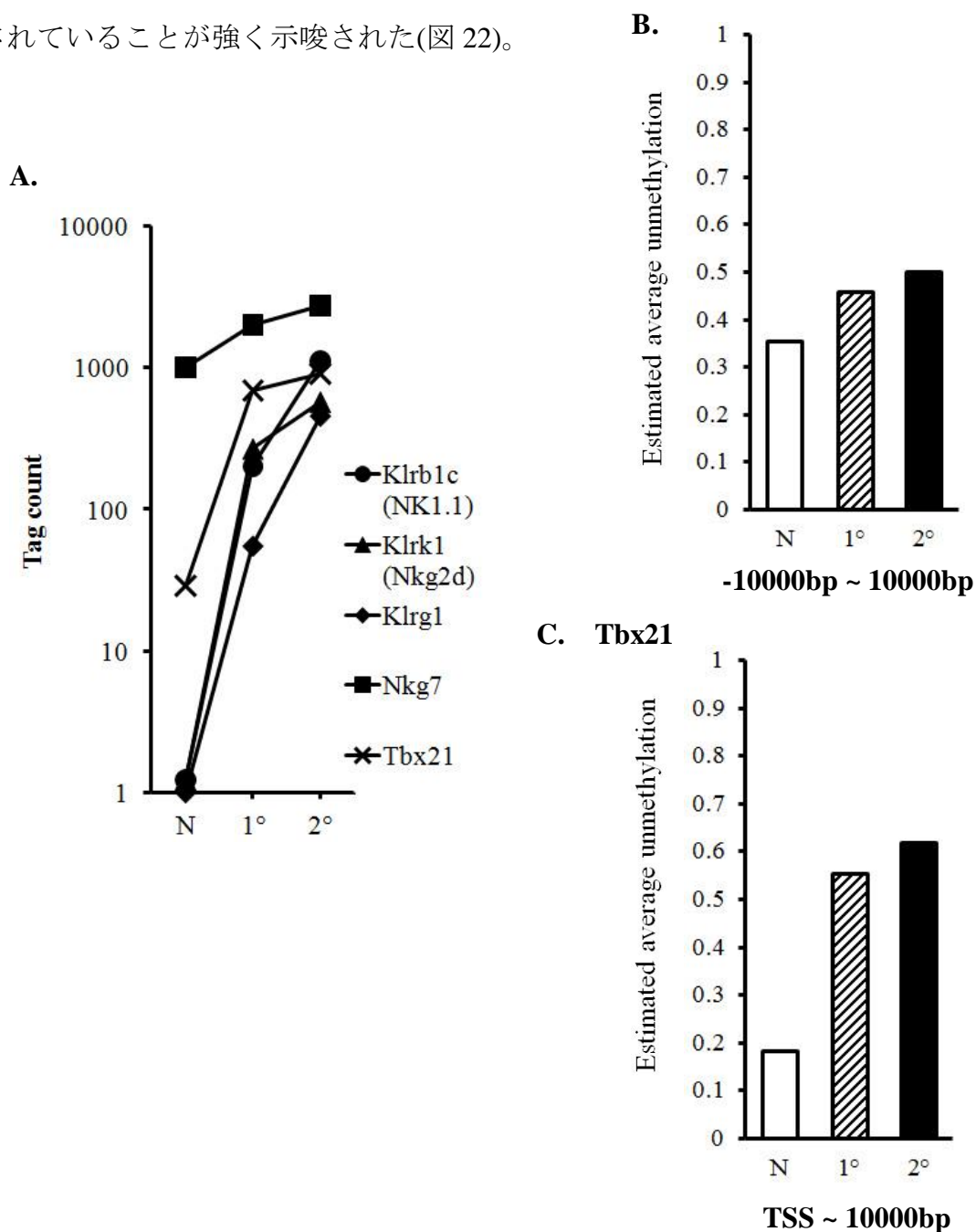
KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY						
class A	class B	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1°	Naïve	65	0.3998	1.6153	0.0083	0.15268
2°	Naïve	65	0.3943	1.5508	0.01292	0.21034
2°	1°	65	0.2478	0.91	0.61263	0.83547

「1° vs Naïve」、「2° vs Naïve」、「2° vs 1°」における、GSEA での「KEGG\_NATURAL\_KILLER\_CELL\_MEDIATED\_CYTOTOXICITY」の NES などのスコア。SIZE は gene set に含まれる遺伝子数。

さらに、データベースに基づく gene set、「KEGG\_NATURAL\_KILLER\_CELL\_MEDIATED\_CYTOTOXICITY」が正に enrich された(表 15)が、特に老化 T 細胞のマーカーとしても知られる Klrg1[98]をはじめ、NK1.1(Klrb1c)や Nkg2d(Klrk1)などの多くの NK 細胞受容体において、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に発現量が上昇し、その DNA メチル化に関しても、TSS より 10000bp 上流から 10000bp 下流までの領域で、全体としてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が見られ、DNA 脱メチル化により遺伝子発現が正に制御されていることが強く示唆された(図 22)。さらに、この gene set に Ifng が含まれているように、「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」における遺伝子と同様に、それぞれの制限酵素切断位置におけるその段階的なメチル化傾向は一見すると看過されるような非常に緩やかなものだった。また、CTL と NK 細胞のいずれ



にも重要な役割を果たす転写因子 Tbx21 がこの gene set に含まれるが、同様にして発現量の上昇傾向を示し、TSS より 10000bp 下流までの広範囲の領域で、全体としてナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的な脱メチル化傾向が非常に顕著に見られ、DNA 脱メチル化により遺伝子発現が正に制御されていることが強く示唆された(図 22)。



## 図 22. NK 細胞受容体の発現量とメチル化状態の変化

ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリー CD8+ T 細胞へと段階的に発現量が増加した NK 細胞受容体と Tbx21 の発現量の変化 (A)。 (A)における NK 細胞受容体の TSS に近い領域における全体的なメチル化状態の変化(B)。 (C) Tbx21 の TSS からその下流 10000bp までの領域における全体的なメチル化状態の変化。 TSS は Transcription start site のことで、数値(bp)は TSS からの距離を示す。 N もしくは Naive はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■)CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの平均値。

以上の結果により、メモリー細胞は、老化 T 細胞の特徴でもある「NK 細胞に特異的な遺伝子発現」を、エピジェネティックな制御に基づき、獲得していたことが強く示唆される。

## 4.8 5'SAGE-Seq と MSCC の validation

5' SAGE-Seq と MSCC の validation として、Ifng、Rps27l、Bcl11b、Klrg1、Tbx21 に関して、RT-qPCR による mRNA 量の再現性(図 23)と MS-qPCR による DNA メチル化の再現性(図 24)を確認した。

RT-qPCR に関しては、Ifng、Klrg1、Tbx21 において、ナイーブと比較し、1 次メモリーと 2 次メモリーで顕著な発現量上昇傾向が見られ、5'SAGE-Seq と同様に、1 次メモリーより 2 次メモリーでさらに発現量の増加が見られた。逆に、Rps27l では段階的な発現量の減少傾向が見られた。Bcl11b では、顕著な発現量の減少傾向は見られず、ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーのいずれにもお

いて顕著にその発現を示していた。

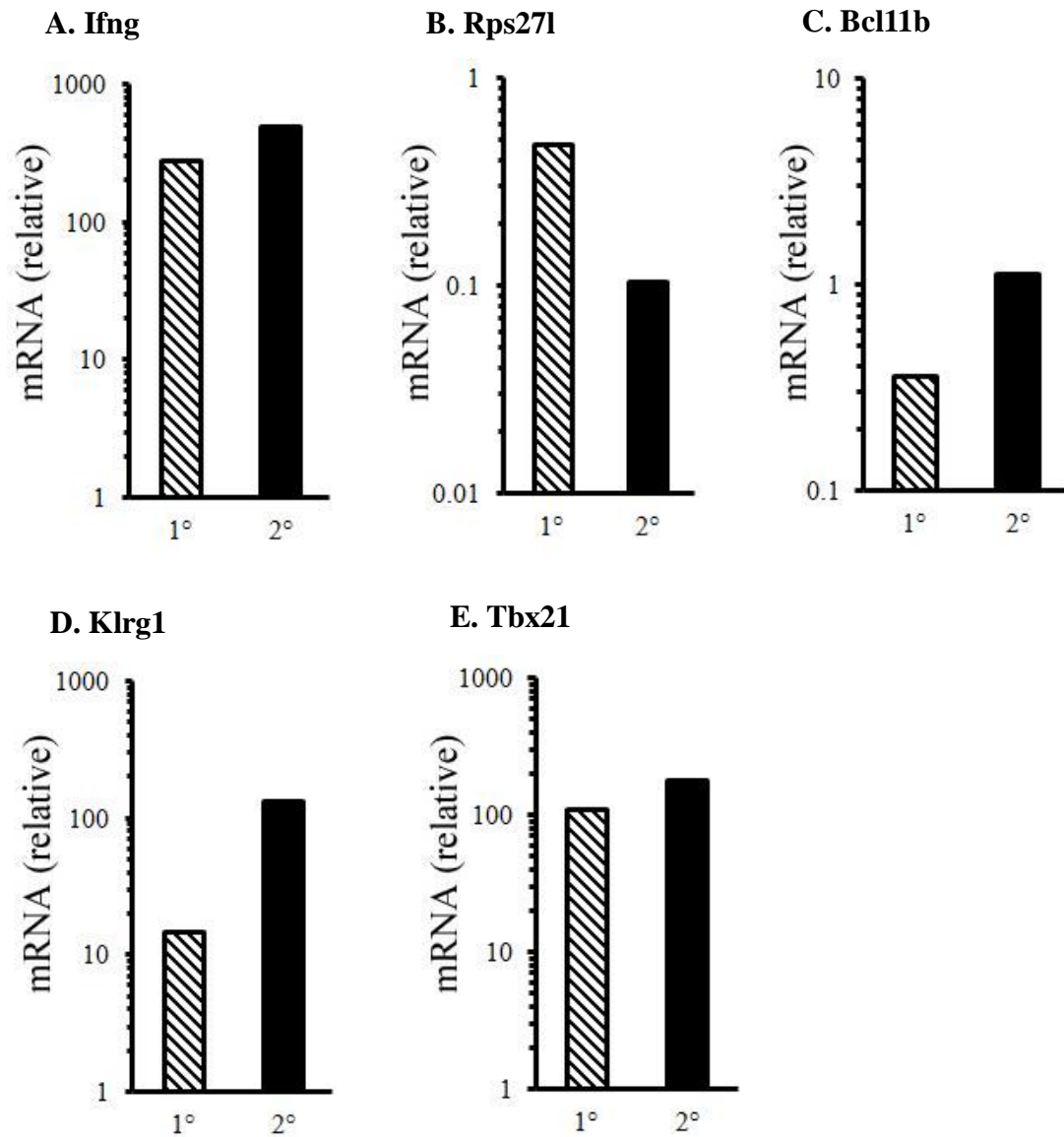
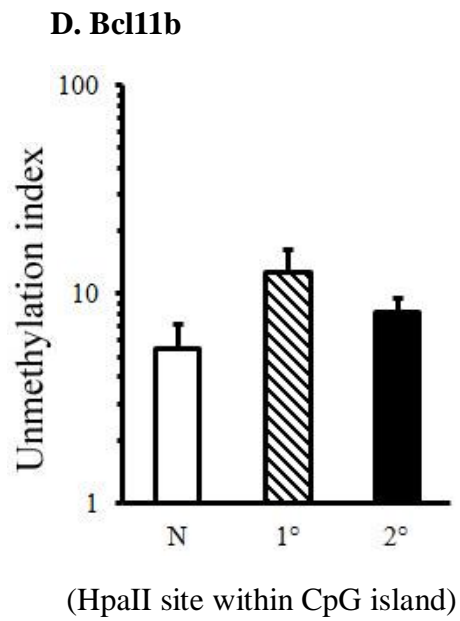
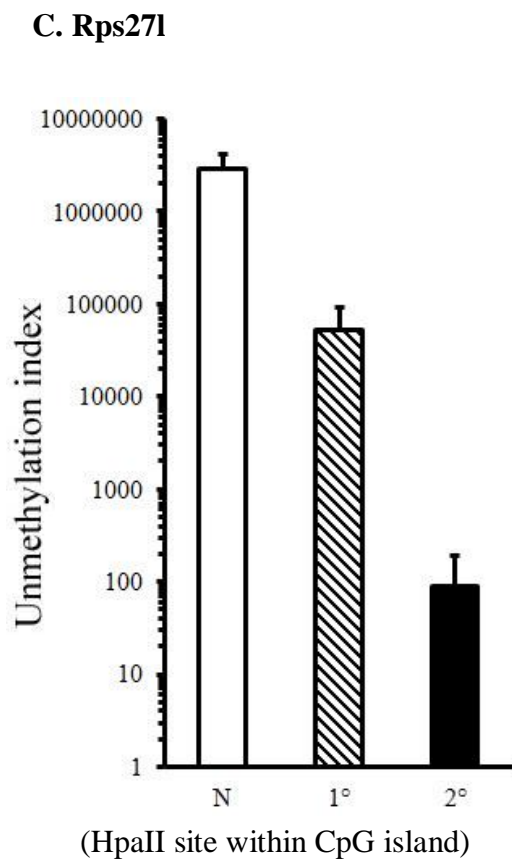
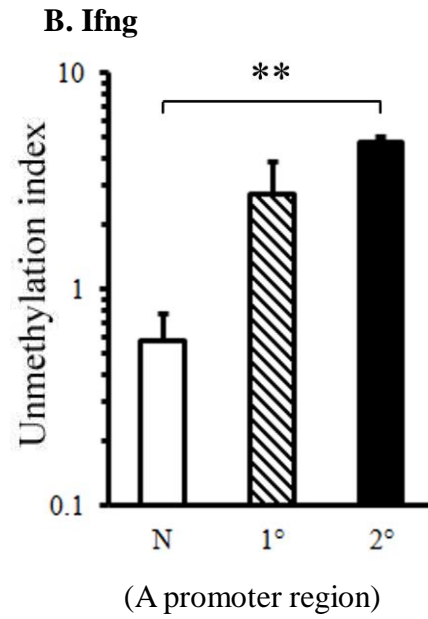
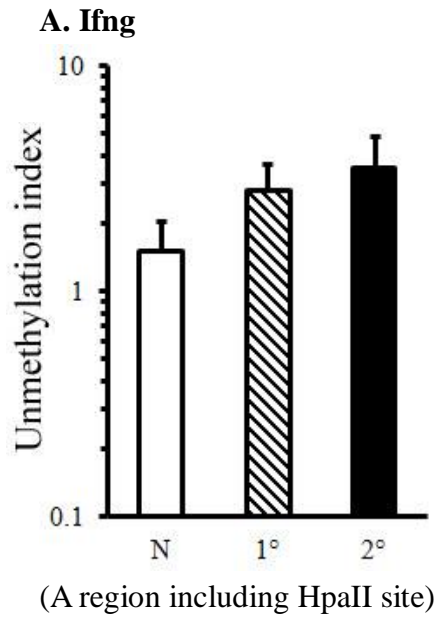
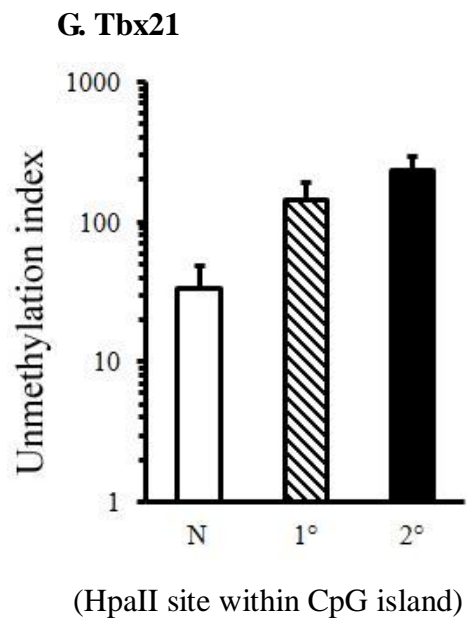
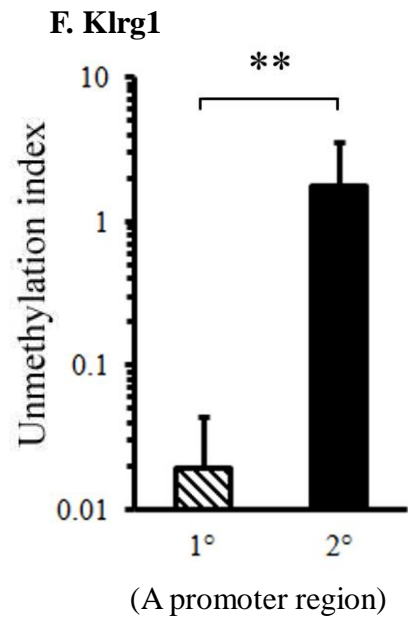
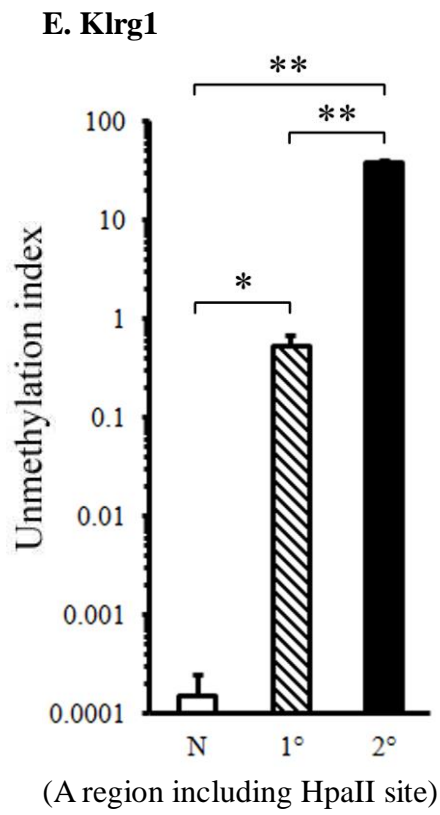


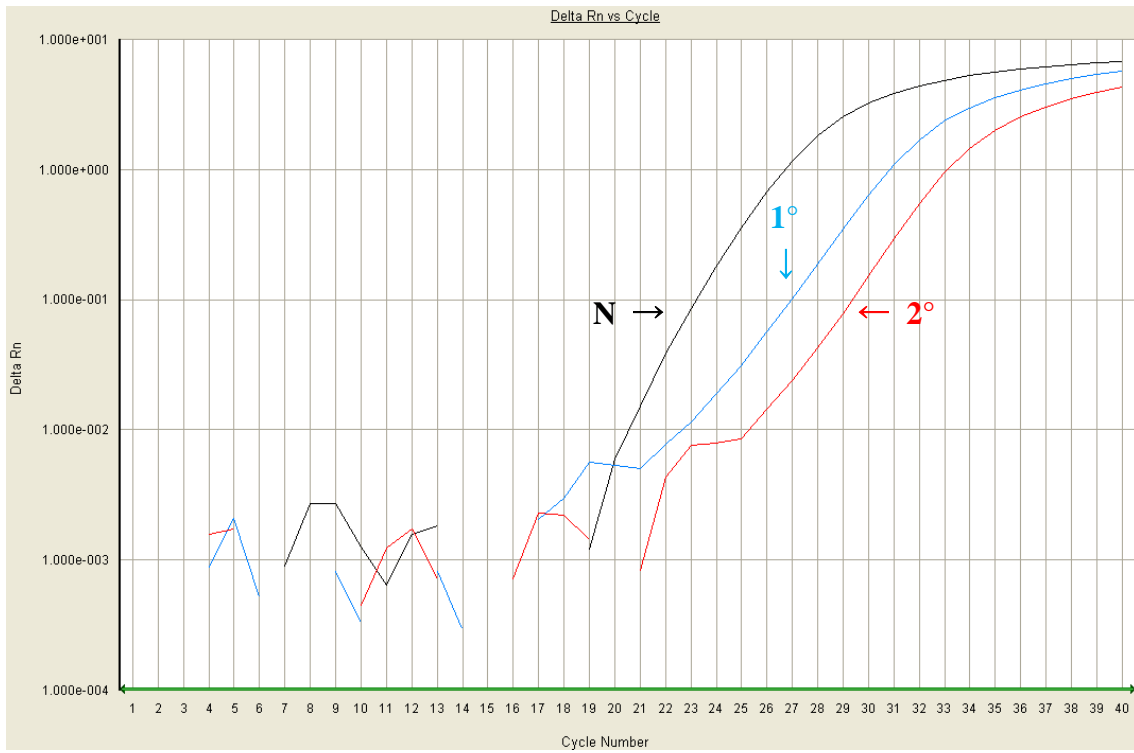
図 23. qPCR による 5'SAGE-Seq の validation

ナイーブ、1次メモリー、そして2次メモリーCD8+ T細胞における *Ifng*(A)、*Rps27l*(B)、*Bcl11b*(C)、*Klr1*(D)、*Tbx21*(E)の mRNA の RT-qPCR の解析。それぞれの遺伝子の発現量は、internal gene の *Gapdh* の発現量に対して標準化された。さらに、結果の棒グラフはナイーブでの発現量との比較により得られた1次メモリー(▨)、2次メモリー(■)CD8+ T細胞における発現量である。1° は1次メモリー、2° は2次メモリーCD8+ T細胞のこと。グラフは2回の独立した実験の典型例。

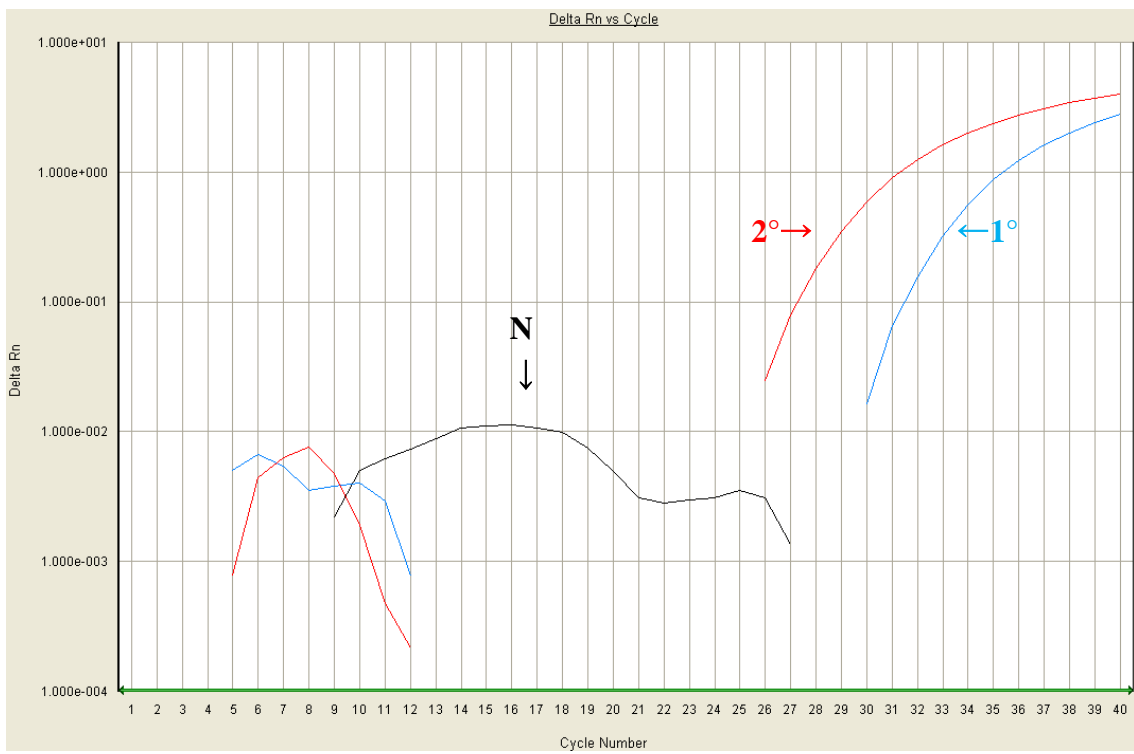




## H.



## I.



#### 図 24. MS-qPCR による MSCC の validation

ナイーブ、1 次メモリー、そして 2 次メモリー CD8+ T 細胞における Ifng(A)(B)、Rps27l(C)、Bcl11b(D)、Klrg1(E)(F)(H)(I)、Tbx21(G) の DNA メチル化の MS-qPCR の解析。(A)は Ifng の TSS より 33943bp 上流の、(C)は Rps27l の TSS より 22bp 上流の、(D)は Bcl11b の TSS の 627bp 下流の、(E)は Klrg1 の TSS より 9877bp 上流の、(G)は Tbx21 の TSS より 400bp 下流の HpaII サイトを含む領域の DNA メチル化状態の変化を示す。(B)は Ifng の、(F)は Klrg1 の TSS より下流 500bp 以内のプロモーター領域内の領域の DNA メチル化状態の変化を示す。(C)(D)(G)は CpG island 内の HpaII サイトを含む領域の DNA メチル化状態の変化を示す。また、Klrg1 のプロモーター領域の MS-qPCR の解析に関して、(H)は DNA メチル化特異的な primer set、(I)は DNA 非メチル化特異的な primer set を用いた際のナイーブ(黒)、1 次メモリー(青)、2 次メモリー(赤) CD8+ T 細胞における増幅曲線。N もしくは Naive はナイーブ(□)、1° は 1 次メモリー(▨)、2° は 2 次メモリー(■) CD8+ T 細胞のことで、棒グラフはそれぞれの DNA 非メチル化の割合。グラフは 2 回の独立した実験の典型例(平均と s.e.m.)。\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.005$  (One-way Anova)。

MS-qPCR に関しては、Ifng、Klrg1、Tbx21 において、MSCC と同様に、ナイーブから 1 次メモリー、2 次メモリーへと段階的な DNA 脱メチル化傾向が見られた。特に、Klrg1 においてはその DNA 脱メチル化傾向が顕著で、ナイーブにおいて、DNA 非メチル化特異的な primer set では全く増幅されないほど DNA メチル化が顕著な領域がプロモーター領域に存在した(図 24. I.)。逆に、Rps271 においては、ナイーブから 1 次メモリー、2 次メモリーへと段階的な DNA メチル化傾向が見られた。Bcl11b では、ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリーにおいて顕著な DNA メチル化状態の変化は示さず、そのいずれもにおいて、DNA メチル化傾向(Unmethylation index  $< 1$ )は決して示さず、若干の DNA 脱メチル化傾

向を示し(Unmethylation index > 1)、ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーのいずれもにおいて顕著にその発現を示していた RT-qPCR の結果と相関しうることを示唆する結果となった。

以上より、Ifng、Rps271、Bcl11b、Klrg1、Tbx21 に関して、いずれも 5' SAGE-Seq と MSCC の相関性と同様にして、RT-qPCR による mRNA 量の変化と MS-qPCR による DNA メチル化状態の変化の相関性が確認された。



## 5. 考察

本研究では、繰り返し免疫における CTL メモリーの樹立・維持・老化の基盤をなすと想定される DNA メチル化変動に基づく遺伝子発現制御について解明することを目的とした。繰り返し免疫に伴う CD8+ T 細胞における遺伝子発現プロファイルとしては、マイクロアレイによる報告があったが、より正確でより定量的なデータが得られる NGS による報告がないことから、当教室で開発された 5' SAGE-Seq による解析データを用いた。さらに、これまでに報告されていない繰り返し免疫に伴う CD8+ T 細胞における DNA メチル化状態の変化を解析するため、当教室では、MSCC によりゲノムワイドに DNA メチル化状態を解析しているという背景から、本研究においては、MSCC により繰り返し免疫に伴う CD8+ T 細胞における DNA メチル化状態を解析することにした。NGS において、メチロームとトランスクリプトーム解析のためにすでに確立された方法、MSCC と 5' SAGE-Seq を用いて評価したが、両方とも read の count を DNA メチル化や遺伝子発現量の指標とするという簡略な解析に基づき、いずれも文献通り [31] [31, 64]、比較的低コストで正確な結果を導き出すことができた。本研究での MSCC での参照ゲノムに unique match した各サンプルの総 read 数に関して、最も少ないものは 114.5 万であったが、MSCC の開発グループによると、ヒトゲノム上の

約 230 万の HpaII site に対して、解析には約 230 万ほどの総 read 数で十分と説明している[64]ので、マウスゲノム上の約 120 万ほどの HpaII site に対して、解析には約 120 万ほどの総 read 数で十分と考えられる。MSCC の validation としては、別のライブラリーを用いた NGS による再評価が最適だが、コスト面での限界から実施は困難であった。そこで、validation として、5'SAGE-Seq に対しては RT-qPCR により mRNA 量、MSCC に対しては MS-qPCR により DNA メチル化状態を、本研究において重要な遺伝子について検証したところ、その再現性を確認することができ、さらにその相関性も確認することができた。この結果から、5'SAGE-Seq と MSCC により得られた結果の高い信頼性が強く示唆された。

メチロームとトランスクリプトームのヒートマップでは、全般的にナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に変化していく領域、遺伝子が多いということが発見され、繰り返し感染によるエピジェネティックな転写制御が概ね段階的なものだったことが示唆される。5'SAGE-Seq では、一貫して総タグ数を統一するという RPM(Read Per Million)と類似した一般的な標準化を用いたが、MSCC では、一般的な DNA メチル化解析における標準化である、 $M / (M + U)$  (M はメチル化を示すシグナル、U は非メチル化を示すシグナル) [63] を用いず、多くの場合で DNA メチル化が遺伝子発現を抑制するという事象に基づき、遺伝子発現解析との混同を避けるため、本研究では、独自の方法とし

て、 $U/(M+U)$  を DNA 非メチル化の指標として、限局的な領域における DNA メチル化解析を行った。さらに、異なる遺伝子の異なる領域は比較せず、同遺伝子の同領域を比較するという点で、それぞれの制限酵素切断位置における「HpaII count / MspI count + HpaII count」という簡略な指標によって、正確にメチル化状態を評価することができると考えられる。この標準化を用いて、ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーのそれぞれを比較した結果、ほとんどの領域で各細胞の遺伝子発現が DNA メチル化・脱メチル化により制御されている可能性を示すことができた。遺伝子発現に影響を及ぼすプロモーター領域の多くが TSS より近傍の上流に見つかっているが、エンハンサー領域は TSS より数 10kbp 上流の領域や TSS の下流にも存在しうることから、TSS を中心にその上下流のメチル化状態の相違を評価することは非常に意義深い(Hela 細胞での遺伝子発現に関連して、エンハンサー領域が TSS より 200kbp 上流から 200kbp 下流にも及びることが報告されている。[99])。例えば、マウスの *Ifng* では、CD4 サブセットで TSS より 50kbp 上流から 50kbp 下流にわたり DNA メチル化状態の変化が示され、その遠く離れた各領域の NK 細胞と CD8+細胞でのエンハンサー活性が報告されているが[100]、本研究でも、同様に広域にわたって DNA 脱メチル化が見られたことから、TSS より数 10kbp 以上遠く離れた領域が脱メチル化によりエンハンサー活性を示し、1次メモリー、さらに2次メモリーCD8+ T細胞での

Ifng 発現量上昇傾向と関与していることが強く示唆される。

ナイーブ、1次メモリー、2次メモリーCD8+ T細胞全てにおいて発現している遺伝子群においても、概ね転写促進とDNA脱メチル化、転写抑制とDNAメチル化の相関性が示された。「1° vs Naïve」において、1次メモリーよりナイーブの方が10倍以上高く発現している遺伝子群では、転写抑制とDNAメチル化の相関性が示されなかったが、2次メモリーの方がナイーブと1次メモリーより発現量が低いものも混在しているため、本来のメモリー細胞に特異的に発現が変動することがない「偽陽性」のような遺伝子とその遺伝子群に含まれている可能性がある。2度の感染実験を経た2次メモリーとナイーブの比較である「2° vs Naïve」においては、そのような「偽陽性」の遺伝子が減り、転写促進とDNA脱メチル化、転写抑制とDNAメチル化の相関性が明確に示された可能性が高い。ナイーブと2次メモリーにおいて発現量の変動が大きかった遺伝子の中に、ナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと段階的な発現量の変動を2倍以上示した遺伝子がより多く含まれるということからもその可能性が強く示唆される。2次メモリーよりナイーブの方が10倍以上高く発現している遺伝子群では、広範囲の領域でナイーブから1次メモリー、そして2次メモリーへと段階的なメチル化傾向の変化が発見されたことから、「偽陽性」の遺伝子が非常に少ないと考えられる。特にプロモーター領域が多く含まれると考えられる

1000bp 上流から TSS までの領域で、転写促進と DNA 脱メチル化、転写抑制と DNA メチル化の相関性が顕著に示されたことは、エピジェネティックな遺伝子発現制御という観点から非常に意義深い。また、散布図、類似度指数、順位相関係数から、相違が非常に小さいと考えられる 2 次メモリーと 1 次メモリーの比較である「2° vs 1°」においても、転写促進と DNA 脱メチル化、転写抑制と DNA メチル化の相関性が示されたことは非常に興味深い。繰り返し感染による遺伝子発現が DNA メチル化というエピジェネティックな制御を綿密にうけていることの証拠となるだろう。

ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞全てにおいて発現している遺伝子以外の遺伝子では、ナイーブには発現していなくて 1 次メモリーと 2 次メモリーのみで発現しているいくつかの遺伝子の発現量が顕著に大きく、1 次メモリーと 2 次メモリーには全く発現していなくてナイーブのみで発現しているいくつかの遺伝子の発現量が顕著に大きいことから、両者の DNA メチル化の状態を調べたところ、全く発現していない場合は顕著に DNA メチル化されているということが発見され、それぞれの細胞における遺伝子発現の有無が DNA メチル化・脱メチル化により厳密に制御されていると考えられる。

本研究では、DNA メチル化状態の評価対象とする発現量変動遺伝子群を GSEA により解析したところ、ダイナミックレンジの大きさにより、高い NES を示す

多数の gene set が得られた。既知の CTL メモリーに特徴的な遺伝子に関して、「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」が非常に高い NES で enrich され、その発現量上昇が見られた多くの遺伝子が DNA 脱メチル化を示したことが発見されたことから、1 次メモリーと 2 次メモリーはともにエフェクター機能を十分保持し、それがエピジェネティックな修飾により転写制御されていることが示唆される。既知のメモリー細胞の gene set でもある「GOLDRATH\_IMMUNE\_MEMORY」が、ナイーブに対する 1 次メモリーと 2 次メモリーにおいて高い NES で enrich されたにも関わらず、1 次メモリーに対する 2 次メモリーで全く enrich されなかったことから、この遺伝子群には繰り返し感染により発現量が大きく変動するものはあまり含まれていないと考えられる。1 次メモリーでは転写促進と DNA 脱メチル化の相関性が見られたが、2 次メモリーでは 1 次メモリーだけでなくナイーブよりもメチル化傾向が見られたことから、図で示されているように「1° vs Naïve」より「2° vs Naïve」の方が若干多い負の相関関係を示す遺伝子が 2 次メモリーにおける全体としての DNA メチル化傾向に影響を与えていると考えられる。また、「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」の gene set が由来するマイクロアレイの結果において、数 10 倍以上の発現上昇した遺伝子が多数あったのに対して、「GOLDRATH\_IMMUNE\_MEMORY」の遺伝子群は、全てが 4 倍以下の発現上

昇にとどまっていたことから、メモリー細胞に特異的な遺伝子であるかもしれないが、繰り返し感染によりメモリーが樹立・維持する「免疫記憶」の特徴をなすことを説明することは困難である。

既知の CTL に特徴的な *Gzma*、*Gzmb*、*Gzmk*、*Ifng*、*Prf1* などのサイトカインに加え、ケモカイン・ケモカインレセプターでも非常に顕著な発現量上昇と DNA 脱メチル化傾向を示した。また、*Tcm* のマーカーでもある *CCR7* では、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に広範囲の領域での全体的な DNA メチル化傾向があり、この DNA メチル化により転写抑制が厳密に制御されていることが強く示唆される。*Wirth* らの報告[25]と同様に、本研究でのメモリー細胞が *Tcm* と *Tem* を含んだヘテロジニアスな集団であるという観点から、全体としては *Tcm* の方が集団の割合が多く、全集団における寿命にも影響していると考えられる。さらに、概して、限局的な領域では全体として顕著な DNA メチル化・DNA 脱メチル化傾向を示した一方、それぞれの制限酵素切断位置においては顕著な DNA メチル化・DNA 脱メチル化は見られず、そのほとんどが非常に緩やかなものだったことも発見された。わずかな DNA メチル化・DNA 脱メチル化で転写活性が大きく変動するプロモーター・エンハンサー領域が含まれていたかもしれないが、繰り返し感染により発現量が著しく増加した *Ifng* さえも顕著な脱メチル化を示す位置が発見されなかったことから、メモリー

細胞の特徴として、このように緩やかな DNA メチル化・DNA 脱メチル化を示す位置の数が増え、領域全体として DNA メチル化・DNA 脱メチル化傾向が顕著となり、転写活性の減少や上昇を顕著にしている可能性がある。以上より、生体防御機構の観点から、「メモリーCD8+ T 細胞」において、免疫反応におけるサイトカイン産生や、病原体の侵入を免疫組織に伝搬する際のリンパ球の動態制御に深く関与する各ケモカインの高い産生能、さらに細胞遊走活性の選択的な亢進などの特徴を示す分子基盤がエピジェネティックに厳密な制御をうけている遺伝子発現に基づいていることが示唆される。

また、GSEA とは異なるアルゴリズムを持つ DAVID bioinformatics resources を用いても多くの免疫応答に関連する Annotation term が高い相関性を示したことで、GSEA で確認された 1 次メモリーと 2 次メモリーの免疫応答における役割が再確認された。

発現抑制を示す gene set では、多数の RPs 関連のものが enrich されたが、過去の文献[25]においても示していた繰り返し感染による RPs の発現量低下に関して、本研究においては、発現している全 84 RPs の中で継続的に遺伝子発現の増加傾向を示す RP が全く存在しなかったことが発見されたことは非常に意義深い。DNA メチル化に関して発見されたことは、概ね、ナイーブと比較し、1 次メモリーと 2 次メモリーで TSS 近傍ではメチル化傾向が顕著に見られたこと、



さらに3'末端より下流を多く含む領域では、「高発現遺伝子では低発現遺伝子より顕著なメチル化傾向を示すという現象」[64]が見られたことであり、その発現量の変動に影響を及ぼしていることが示唆される。また、上述したメモリー細胞の特徴のように、それぞれの制限酵素切断位置においては顕著な DNA メチル化・DNA 脱メチル化は見られなかったことも発見され、緩やかな DNA メチル化・DNA 脱メチル化を示す位置の数が増えたことが考えられる。このようにして、全体として協調的に転写抑制傾向を示し、エピジェネティックに制御されていた可能性があることから、決して機能的に異常をきたしているのではなく、調和的なコントロールのもとで機能抑制が正常に制御されていると考えられる。このように制御機構が協調的である点は RPs の特徴でもある[101]。また、ヒトの RPL7 が老化線維芽細胞で顕著に発現抑制された遺伝子として同定されたこと[89]や、様々な RPs を欠失させることで酵母や *C. elegans* の寿命が延びたこと[91]が報告されているように、RPs は「aging」に深く関わっていると考えられている。本研究では、ナイーブ、1次メモリー、そして2次メモリーにおける PRs の平均発現量の減少傾斜がよりなだらかになっていったことから全 RPs の発現がさらなる繰り返し感染後も存続していくだろうと考えられるが、メモリー細胞において、全発現 RPs が協調的に一定の割合だけ発現抑制されるという原因、機序やその効果については知られていない。だが、本研究によりこの発

現抑制機構の分子基盤としてDNAメチル化が深く関与していることが示唆された。繰り返し感染によりメモリーCD8+T細胞が樹立・維持する「免疫記憶」の特徴を理解する上で、この現象の解明は最も重要な点の一つである。また、DAVID bioinformatics resourcesの結果から、繰り返し感染によりMRPsも発現抑制されていることが発見されたが、RPsほど顕著ではなかったが、RPsと類似した傾向が見られたMRPsもメモリー細胞における「aging」と深く関わっていることが示唆され、その機序の解明も重要であると考えられる。

さらに、GSEAでは、典型的なメモリー細胞が持つ特徴の「長期生存能」とは対照的なアポトーシスや老化に関連するgene setが比較的高いNESを示したのは興味深い。生体防御機構の観点から、アポトーシスや老化は細胞にとって不可欠な現象であり、例えば、発癌における細胞の不死化とは、老化を免れ、無限の寿命を獲得することが重要な過程となっていると考えられている[93]が、このメモリー細胞においても、アポトーシスや老化の特徴を備えることで、「長期生存能」が決して不死化に至らないよう制御されていると考えられる。そして、この制御機構は、複製エラーによるDNA変異の誘発により不死化が導かれうるという観点からも、繰り返し感染を受けたメモリー細胞において、個々のCpGにおけるDNAメチル化・DNA脱メチル化傾向が緩やかであることや、協調的な全PRsの発現量の緩やかな減少と密接に関係しているかもしれない。さらに、

GSEA 検索の結果から、老化と深く関与する Cell cycle や p53 に関連する gene set が多く正に enrich されたことから、これらの遺伝子群も、老化の分子基盤としての役割を担っていることが示唆される。

老化によるメモリー細胞における CTL の免疫記憶の制御という観点から、老化 T 細胞が持つ NK 細胞に特異的な遺伝子発現の獲得という特徴をメモリー CD8+ T 細胞も持っていたことは非常に意義深い。

「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」の gene set が非常に高い NES を示しながらも、Bcl11b の発現が着実に維持されていたことで、CD8+ T 細胞のアイデンティティを失うことなく [102]、NK 細胞に特異的な遺伝子発現の獲得を果たしていると考えられる。そして、これらの遺伝子の発現量の変化と DNA メチル化状態が相関性を示したことで、その発現がエピジェネティックな制御による可能性が強く示唆される。特に、MS-qPCR の結果より、Klrg1 のプロモーター領域で非常に強く DNA メチル化されている領域が存在していることが発見されたことから、NK 細胞に特異的な遺伝子発現のエピジェネティックな制御の程度が非常に強いものであることが示唆される。

また、老化 T 細胞のマーカーとしても知られる Klrg1 がウイルス感染により発現量が上昇したという報告 [103] や、別の NK 細胞受容体においても、ウイルス感染後に、NK 細胞受容体を発現した NK 細胞様 CD8+ T 細胞が少ない割合で出

現し、そのウイルス特異的な CTL の活性が示されていること[104]、さらに NK 細胞とエフェクター CD8+ T 細胞が NK 細胞受容体を含む多くの共通遺伝子を発現していること[105]などは、T 細胞における NK 細胞に特異的な遺伝子のエフェクター機能とも強く関連しているだろう。また、NK 細胞受容体は、CD8+ T 細胞のエフェクター機能の活性化だけでなく、アポトーシスに抵抗して免疫恒常性を確立し、CTL メモリーの樹立・維持に関与しているとも考えられている[95]。そして、これらの NK 細胞受容体においても発現量上昇と DNA 脱メチル化傾向が発見されたことより、NK 細胞受容体の発現変動もエピジェネティックな制御が働いていると考えられる。この NK 細胞受容体や「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」の gene set の中で、ナイーブから 1 次メモリー、そして 2 次メモリーへと段階的に発現が上昇している遺伝子においても、個々の CpG における DNA メチル化・DNA 脱メチル化傾向が緩やかだったことから、このような NK 細胞に特異的な遺伝子によるエフェクター機能も上述の制御機構に従っていると考えられる。以上より、老化 CD8+ T 細胞に特徴的な「NK 細胞に特異的な遺伝子」の獲得の分子基盤が DNA 脱メチル化というエピジェネティックな制御に基づくことが強く示唆された。今後、このような DNA 脱メチル化により、どのようにして「NK 細胞に特異的な遺伝子」が老化 CD8+ T 細胞に特徴的なものとなり得たのかということの解明すること

が、老化に伴うエフェクター機能を理解する上でも、非常に重要であるだろう。

以上のように、メモリー細胞において、aging と関連深い RPs の発現量低下と DNA メチル化傾向、さらに老化 T 細胞に特徴的な「NK 細胞に特異的な遺伝子」の発現量上昇と DNA 脱メチル化傾向が発見されたことより、繰り返し感染によりメモリー細胞が持ち得た「老化現象」の分子基盤が DNA メチル化・脱メチル化により厳密に制御されていることが強く示唆された。新規性という観点から、繰り返し免疫に伴う「現象」として、「老化現象」に関連する遺伝子群の発現量変動が見出され、これらの遺伝子群の DNA メチル化状態の変動傾向の相関性が明らかにされたことから、以上の結果が繰り返し免疫に伴う CTL メモリー細胞の「老化現象」における分子基盤の解明につながる意義あるものと考えられる。

本研究では、メモリー細胞において発現量が顕著に変動する遺伝子における DNA メチル化状態の変化について、全体的な DNA メチル化状態の傾向を評価してきたが、繰り返し配列における DNA メチル化状態の評価が困難な点や、MSCC では HpaII や MspI の認識配列しか解析できないため、ゲノム上の全ての CpG サイトを確認できない点などの限界もある。今後、NGS のさらなる技術開発の進展によりコストが下がっていくことで、これらの限界も克服されるような新しいメチロームライブラリー作製法が開発されることが期待される。

また、ナイーブ、1 次、2 次メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞の特異的な遺伝子発現制御

や生物学的機能を共有する発現量変動遺伝子群を探索し、その発現量変動遺伝子群のエピジェネティックな指標としてのDNAメチル化状態の変化を調べるため、Broad InstituteのデータベースであるMSigDBに基づいてGSEAにより解析した結果、発現量上昇が見られた遺伝子群ではTSS近傍でのDNA脱メチル化傾向、発現量減少が見られた遺伝子群ではTSS近傍でのDNAメチル化傾向という、これまでに報告されているようなDNAメチル化状態による遺伝子発現制御と考えられる現象が確認できたことは非常に意義深いと考えられる。GSEAでは、利点として、細胞集団に特異的な遺伝子発現制御や生物学的機能を共有する発現量変動遺伝子群を探索することができるが、一方では、GSEAのアルゴリズムにより、機械的に発現変動遺伝子を決めるための一定の基準を作るということで、発現変動遺伝子の中にノイズが混じりやすくなり、データ比較の精度も低下したり、基準を決めたことによる恣意性も問題となる。また、Gene ontologyやパスウェイの情報が豊富ではない生物種では、データベース上のgene setが少なく、実際にGSEAを使用できるのはごく一部の生物種であるという点などが欠点となる。幸いに、マウスに関するgene setがデータベース上に比較的多く存在し、メモリーCD8+ T細胞に特徴的な遺伝子群としてこれまで報告されている。本研究においては、免疫応答に関する遺伝子群が高いNESを示したことは、NGSの5' SAGE-SeqのデータをGSEAに活用することは意義があると考えられ、また、

ナイーブと 1 次と 2 次メモリーCD8+ 細胞におけるこれまで報告されていない生物学的機能の可能性を GSEA により見出すことができた。これらの遺伝子群のメモリーCTL における生物学的機能が明らかにされていくことが、今後の展望となるだろう。将来、DNA メチル化を含むエピジェネティック変異に関するデータベースに基づく変動するエピジェネティックな領域群を検索できるような機能が追加される、もしくはそのような検索ソフトが開発されることで、エピジェネティックな遺伝子発現制御をより簡潔にかつ明確に理解できるようになるかもしれない。臨床的には、「個別化治療」へ向け、データベースが拡充されていく中、そのデータに基づき疾患の特徴を的確に理解することが重要であるが、本研究のように、遺伝子発現に基づく DNA メチル化などのエピジェネティックな厳密な制御を評価することはより本質的な特徴をとらえるという点で非常に意義があると考えられる。

## 6. 謝辞

本研究に当たり、貴重な研究の機会や場を与えて下さり、様々な場面で多大なご指導、ご鞭撻とご援助を頂きました松島綱治先生、次世代シーケンサーを用いた研究にご助力を頂きました森下真一先生、服部正平先生、そして、多岐にわたるご支援を頂きました分子予防医学教室と情報生命科学教室の皆様、また、直接ご指導を頂きました金沢大学の橋本真一先生、ペンシルバニア大学にご留学中の倉知慎先生に心より御礼を申し上げます。



## 7. 参考文献

1. Butz, E.A. and M.J. Bevan, *Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection*. *Immunity*, 1998. **8**(2): p. 167-75.
2. Harty, J.T. and V.P. Badovinac, *Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(2): p. 107-19.
3. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. 2012, Philadelphia: Elsevier/Saunders. x, 545 p.
4. Wirth, T.C., J.T. Harty, and V.P. Badovinac, *Modulating numbers and phenotype of CD8+ T cells in secondary immune responses*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(7): p. 1916-26.
5. Williams, M.A. and M.J. Bevan, *Effector and memory CTL differentiation*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 171-92.
6. Rutishauser, R.L. and S.M. Kaech, *Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation*. *Immunol Rev*, 2010. **235**(1): p. 219-33.
7. McGill, J., N. Van Rooijen, and K.L. Legge, *Protective*

- influenza-specific CD8 T cell responses require interactions with dendritic cells in the lungs.* J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1635-46.
8. Torti, N. and A. Oxenius, *T cell memory in the context of persistent herpes viral infections.* Viruses, 2012. **4**(7): p. 1116-43.
  9. Schmidt, N.W., et al., *Memory CD8 T cell responses exceeding a large but definable threshold provide long-term immunity to malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 14017-22.
  10. de Bree, G.J., et al., *Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung.* J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1433-42.
  11. Reeves, M. and J. Sinclair, *Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation.* Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 297-313.
  12. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets.* Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.
  13. Marzo, A.L., et al., *Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment.* Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 793-9.
  14. *A (prime) boost for HIV vaccine research?* Lancet, 2009. **374**(9696): p. 1119.

15. Letvin, N.L., *Virology. Moving forward in HIV vaccine development.* Science, 2009. **326**(5957): p. 1196-8.
16. Kurachi, M., et al., *Maintenance of memory CD8+ T cell diversity and proliferative potential by a primary response upon re-challenge.* International Immunology, 2007. **19**(1): p. 105-15.
17. Seder, R.A. and A.V. Hill, *Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity.* Nature, 2000. **406**(6797): p. 793-8.
18. Badovinac, V.P., et al., *Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination.* Nat Med, 2005. **11**(7): p. 748-56.
19. Masopust, D., et al., *Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination.* J Immunol, 2006. **177**(2): p. 831-9.
20. Page, A.J., M.L. Ford, and A.D. Kirk, *Memory T-cell-specific therapeutics in organ transplantation.* Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(6): p. 643-9.
21. Vezyz, V., et al., *Memory CD8 T-cell compartment grows in size with immunological experience.* Nature, 2009. **457**(7226): p. 196-9.

22. Williams, M.A., A.J. Tyznik, and M.J. Bevan, *Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 890-3.
23. Kurachi, M., et al., *Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration*. J Exp Med, 2011. **208**(8): p. 1605-20.
24. Martin, M.D., et al., *Population dynamics of naive and memory CD8 T cell responses after antigen stimulations in vivo*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1255-65.
25. Wirth, T.C., et al., *Repetitive antigen stimulation induces stepwise transcriptome diversification but preserves a core signature of memory CD8(+) T cell differentiation*. Immunity, 2010. **33**(1): p. 128-40.
26. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 57-63.
27. Liang, P. and A.B. Pardee, *Analysing differential gene expression in cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 869-76.
28. Harbers, M. and P. Carninci, *Tag-based approaches for transcriptome*

- research and genome annotation*. Nat Methods, 2005. **2**(7): p. 495-502.
29. Hashimoto, S., et al., *5'-end SAGE for the analysis of transcriptional start sites*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(9): p. 1146-9.
30. Martin, J.A. and Z. Wang, *Next-generation transcriptome assembly*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(10): p. 671-82.
31. Hashimoto, S., et al., *High-resolution analysis of the 5'-end transcriptome using a next generation DNA sequencer*. PLoS ONE [Electronic Resource], 2009. **4**(1): p. e4108.
32. Weng, N.P., Y. Araki, and K. Subedi, *The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 306-15.
33. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 597-610.
34. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
35. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-8.
36. Riemenschneider, M.J., M.E. Hegi, and G. Reifenberger, *MGMT*

- promoter methylation in malignant gliomas*. Target Oncol, 2010. **5**(3): p. 161-5.
37. Weller, M., et al., *MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?* Nat Rev Neurol, 2010. **6**(1): p. 39-51.
38. Nagasaka, T., et al., *Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases*. Clinical Cancer Research, 2003. **9**(14): p. 5306-12.
39. Shima, K., et al., *MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers*. Cancer Causes Control, 2011. **22**(2): p. 301-9.
40. Veeck, J., et al., *BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors*. J Clin Oncol, 2010. **28**(29): p. e563-4; author reply e565-6.
41. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
42. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p.

- 1148-59.
43. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 286-98.
  44. Mastroeni, D., et al., *Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6617.
  45. Evans-Galea, M.V., et al., *FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia*. Ann Neurol, 2012. **71**(4): p. 487-97.
  46. Wierda, R.J., et al., *Epigenetics in atherosclerosis and inflammation*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(6A): p. 1225-40.
  47. Rakyan, V.K., et al., *Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis*. PLoS Genetics, 2011. **7**(9): p. e1002300.
  48. Kaplan, M.J., et al., *Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4+ lupus T cells*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3652-61.
  49. Javierre, B.M., et al., *Changes in the pattern of DNA methylation*

- associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus.*
- Genome Res, 2010. **20**(2): p. 170-9.
50. Heyn, H. and M. Esteller, *DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges.* Nat Rev Genet, 2012. **13**(10): p. 679-92.
51. Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller, *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.* Nat Med, 2011. **17**(3): p. 330-9.
52. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond.* Nat Rev Genet, 2012. **13**(7): p. 484-92.
53. Kersh, E.N., et al., *Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells.* Journal of Immunology, 2006. **176**(7): p. 4083-93.
54. Northrop, J.K., et al., *Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells.* Journal of Immunology, 2006. **177**(2): p. 1062-9.
55. Youngblood, B., et al., *Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells.* Immunity, 2011. **35**(3): p. 400-12.
56. Hansen, K.D., et al., *Increased methylation variation in epigenetic*



- domains across cancer types.* Nat Genet, 2011. **43**(8): p. 768-75.
57. Rakyan, V.K., et al., *Epigenome-wide association studies for common human diseases.* Nat Rev Genet, 2011. **12**(8): p. 529-41.
58. Sawalha, A.H., *Epigenetics and Tcell immunity.* Autoimmunity, 2008. **41**(4): p. 245-52.
59. *Time for the epigenome.* Nature, 2010. **463**(7281): p. 587.
60. Abbott, A., *Europe to map the human epigenome.* Nature, 2011. **477**(7366): p. 518.
61. Adams, D., et al., *BLUEPRINT to decode the epigenetic signature written in blood.* Nat Biotechnol, 2012. **30**(3): p. 224-6.
62. Bernstein, B.E., et al., *The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium.* Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1045-8.
63. Laird, P.W., *Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis.* Nat Rev Genet, 2010. **11**(3): p. 191-203.
64. Ball, M.P., et al., *Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells.* Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 361-8.
65. Berman, B.P., D.J. Weisenberger, and P.W. Laird, *Locking in on the*

- human methylome*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 341-2.
66. Ogoshi, K., et al., *Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells*. Genomics, 2011. **98**(4): p. 280-7.
67. Cedar, H. and Y. Bergman, *Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(5): p. 295-304.
68. Araki, Y., et al., *Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 912-25.
69. Park, P.J., *ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(10): p. 669-80.
70. Northrup, D.L. and K. Zhao, *Application of ChIP-Seq and related techniques to the study of immune function*. Immunity, 2011. **34**(6): p. 830-42.
71. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.
72. Mardis, E.R., *Anticipating the 1,000 dollar genome*. Genome Biol, 2006. **7**(7): p. 112.

73. DeFrancesco, L., *Life Technologies promises \$1,000 genome*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(2): p. 126.
74. Gunter, C., *Genomics: A picture worth 1000 Genomes*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(12): p. 814.
75. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
76. Macconail, L.E. and L.A. Garraway, *Clinical implications of the cancer genome*. J Clin Oncol, 2010. **28**(35): p. 5219-28.
77. Goldrath, A.W., et al., *The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(48): p. 16885-16890.
78. Ficiz, G., et al., *Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 398-U589.
79. Irizarry, R.A., et al., *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores*. Nature Genetics, 2009. **41**(2): p. 178-186.

80. Simpson, E.H., *Measurement of Diversity*. Nature, 1949. **163**(4148): p. 688-688.
81. Wu, Z.J., et al., *Gene expression profiling of human breast tissue samples using SAGE-Seq*. Genome Research, 2010. **20**(12): p. 1730-1739.
82. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(43): p. 15545-15550.
83. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nature Protocols, 2009. **4**(1): p. 44-57.
84. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method*. Nature Protocols, 2008. **3**(6): p. 1101-1108.
85. Akirav, E.M., et al., *Detection of beta cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(47): p. 19018-19023.

86. Marzec, M., et al., *Differential effects of interleukin-2 and interleukin-15 versus interleukin-21 on CD4+ cutaneous T-cell lymphoma cells*. *Cancer Research*, 2008. **68**(4): p. 1083-1091.
87. Nakao, A., M. Yoshihama, and N. Kenmochi, *RPG: the Ribosomal Protein Gene database*. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**: p. D168-D170.
88. Zhang, W.Y., et al., *Decreased expression of ribosomal proteins in human age-related cataract*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2002. **43**(1): p. 198-204.
89. Seshadri, T., et al., *Identification of a Transcript That Is down-Regulated in Senescent Human Fibroblasts - Cloning, Sequence-Analysis, and Regulation of the Human L7 Ribosomal-Protein Gene*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. **268**(25): p. 18474-18480.
90. Sinclair, D.A., S.J. Lin, and L. Guarente, *Life-span extension in yeast*. *Science*, 2006. **312**(5771): p. 195-196.
91. Steffen, K.K., et al., *Yeast life span extension by depletion of 60S ribosomal subunits is mediated by Gcn4*. *Cell*, 2008. **133**(2): p.

292-302.

92. Houtkooper, R.H., et al., *Mitochondrial protein imbalance as a conserved longevity mechanism*. *Nature*, 2013. **497**(7450): p. 451-+.
93. Fridman, A.L. and M.A. Tainsky, *Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling*. *Oncogene*, 2008. **27**(46): p. 5975-5987.
94. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation*. *Arthritis Res Ther*, 2003. **5**(5): p. 225-34.
95. Young, N.T. and M. Uhrberg, *KIR expression shapes cytotoxic repertoires: a developmental program of survival*. *Trends in Immunology*, 2002. **23**(2): p. 71-75.
96. Li, P., et al., *Reprogramming of T Cells to Natural Killer-Like Cells upon Bcl11b Deletion*. *Science*, 2010. **329**(5987): p. 85-89.
97. Huang, X., et al., *Inhibition of BCL11B Expression Leads to Apoptosis of Malignant T Cells but Not CD34(+)*. *Blood*, 2010. **116**(21): p. 1539-1539.

98. Henson, S.M. and A.N. Akbar, *KLRG1-more than a marker for T cell senescence*. *Age*, 2009. **31**(4): p. 285-291.
99. Heintzman, N.D., et al., *Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression*. *Nature*, 2009. **459**(7243): p. 108-12.
100. Schoenborn, J.R., et al., *Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(7): p. 732-42.
101. Xue, S.F. and M. Barna, *Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012. **13**(6): p. 355-369.
102. Liu, P.T., P. Li, and S. Burke, *Critical roles of Bcl11b in T-cell development and maintenance of T-cell identity*. *Immunological Reviews*, 2010. **238**: p. 138-149.
103. Voehringer, D., et al., *Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells*. *Journal of Immunology*, 2001. **167**(9): p. 4838-4843.
104. Kambayashi, T., et al., *Emergence of CD8(+) T cells expressing NK cell*

*receptors in influenza A virus-infected mice.* Journal of Immunology, 2000. **165**(9): p. 4964-4969.

105. Bezman, N.A., et al., *Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells.* Nature Immunology, 2012. **13**(10): p. 1000-1009.