

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 少作 純平

CTL(主に CD8+ T 細胞)は、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。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)。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。例えば、メモリーCTL は、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 などの感染症に頻繁に試みられているが、1 次と 2 次メモリーCTL の再感染による影響の相違などは、ワクチン接種と直結する重要な問題である。また、反復抗原刺激によりメモリーCTL の総数は増加か一定数を維持するが、その構成要素の詳細は、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。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 の反復応答時の質的変化の分子機序の解明は非常に重要である。そこで、同一病原体による繰り返し感染により、抗原特異的なメモリーCTL の維持機構に着目した解析方法がある。抗原暴露回数という正確な分類分けによりメモリーCTL を特徴付けられる利点、繰り返し抗原暴露に応答するメモリーCTL の自然動態により近づけるという利点、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から、ドナーマウス由来の OVA 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。

メモリーCTL を特徴づける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制御機構の解明が現在注目されている。そのうち、DNA メチル化は、最もよく知られているエピジェネティックな指標で、プロモーター領域などの 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。そして、多分野の疾患でも異常メチル化が報告され、DNA メチル化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。また、細胞分化に関して、メモリーCTL 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。

DNA メチル化を調べる方法として、MeDIP、バイサルファイトシーケンス法、MSP などがあり、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。だが、メモリーCTL の NGS を用いた DNA メチル化解析はまだ報告されていない。現在、NGS の技術に基づき、医学的に有用な情報となるよう癌などにおける遺伝的異常を包括的に解読し、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により、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し、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ことを期待されている。

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、繰り返し感染を通じてメモリーCTL 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した。

そこで、繰り返し感染によるメモリーCTL に関して、これまで NGS による報告がない遺伝子発現解析と DNA メチル化解析を行った。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、いずれも文献通り、比較的低コストで正確な結果を導き出すことができた。それぞれのヒートマップより、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、遺伝子が多く、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た。MSCC

では、 $U/(M+U)$  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。ナイーブ、1 次メモリー、2 次メモリー CD8+ T 細胞全てに発現している遺伝子群においても、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多く示された。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 1 次と 2 次メモリーの比較でも、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発見されたことは非常に意義深い。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。また、ナイーブ、もしくは、1 次と 2 次メモリーで全く発現していない遺伝子群での顕著な DNA メチル化が発見され、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。

次に、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、発現量上昇が見られた多くの遺伝子の DNA 脱メチル化傾向が発見されたことから、1 次と 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 CTL に特徴的な *Ifng* などのサイトカインや、ケモカイン・ケモカインレセプターでも顕著な発現量上昇と DNA 脱メチル化傾向を示した。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、個々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が発見された。

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、発現している全 84 RPs の中で継続的に遺伝子発現量の増加傾向を示す RP が全く存在しなかったことやその発現量の減少が協調的であったことが発見された。DNA メチル化に関しては、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 DNA メチル化傾向が顕著に見られ、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」が見られ、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緩やかな DNA メチル化・

DNA 脱メチル化を示した。ヒト 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など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に DNA メチル化が深く関与していることが示唆された。さらに、類似した現象が見られた MRPs についてもメモリー細胞における「aging」の関与が示唆された。

GSEA によるこれらの結果がアルゴリズムの異なる DAVID でも同様の結果が得られ、両者の解析により、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への関連性も強く示唆された。

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が、メモリー細胞において「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」が高い NES を示し、gene set に含まれる多くの遺伝子において、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の上昇が見られた。老化 T 細胞のマーカーとしても知られる *Klrg1*をはじめ、多くの NK 細胞受容体でも、同様の発現量上昇傾向が見られた。これらの遺伝子は、ナイーブと比較し 1 次と 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ことから、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」の発現を、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。

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の評価はより本質的な特徴をとらえるという点で意義があると考えられる。