

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 少作 純平

本研究は、繰り返し免疫における CTL メモリーの樹立・維持・老化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、これまでNGSによる報告がなかった遺伝子発現とDNAメチル化プロファイルとして、5'SAGE-SeqとMSCCにより解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. CD45.1+ (OVA 特異的 TCR Tg) OT-I マウスよりナイーブ CD8+ T 細胞を分離し、(CD45.1-) WT マウスに養子移入後、感染因子である LM-OVA(OVA 発現組換えリステリア菌)を接種することでこのレシピエントマウスを感染させ、50 日以上経過後に、CD45.1+ CD8+ T 細胞(1次メモリー)を分離し、さらにこの1次メモリーCD8+ T 細胞を(CD45.1-) WT マウスに養子移入し、同様の感染実験を行い、50 日以上経過後に、CD45.1+ CD8+ T 細胞(2次メモリー)を分離した。各細胞を sorting した際の純度はいずれも 99.5% 以上の高いものであった。
2. 1.において分離されたナイーブ、1次と2次メモリーCD8+ T 細胞より mRNA とゲノム DNA を抽出し、5'SAGE-Seq と MSCC のライブラリーを作製し、NGS によりシーケンスした。マッピングの結果、MSCC では、各細胞における HpaII と MspI の総 read 数に大きな相違は認められなかった。5'SAGE-Seq では、各サンプルにおいて、RefSeq に唯一マッピングされた総タグ数を 3,000,000 と統一して補正する標準化を行い、この標準化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。
3. MSCC では、MspI count とは対照的に、広域にわたり各細胞間の HpaII count がナイーブから、1次、そして2次メモリーCD8+ T 細胞へと段階的に変化していく領域が heatmap により多く認められた。5'SAGE-Seq では、全体として、ナイーブと比べ、1次と2次メモリーCD8+ T 細胞において、統計的・(heatmap により)視覚的に転写レベルでの高い類似性が示された。
4. 「HpaII count / MspI count + HpaII count」の値を指標とし、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 メチル化を評価したところ、ナイーブ、1次と2次メモリーCD8+ T 細胞をそれぞれ比較し、発現量の増加・減少が大きかった遺伝子では、概ね DNA 脱メチル化もしくは DNA メチル化傾向が示された。
5. 1次と2次メモリーCD8+ T 細胞のみに発現していた遺伝子では、ナイーブと比べて DNA 脱メチル化傾向が示され、ナイーブ CD8+ T 細胞のみに発現していた遺伝子では、ナイーブと比べて1次と2次メモリーにおいては DNA メチル化傾向が示された。また、ナイーブと2次メモリーの間で発現量の変動が大きかった多くの遺伝子では、ナイーブ

から、1次、そして2次メモリーCD8+ T細胞へと段階的な発現量の増減傾向が認められた。

6. 繰り返し免疫に伴い発現量が増加した遺伝子群では、GSEAとDAVIDにより、Ifngなどのサイトカインやケモカインなどの既知のCTLメモリーに特徴的な遺伝子群との高い相関性が示された。さらにこれらの遺伝子群において、ナイーブから、1次、そして2次メモリーCD8+ T細胞へと段階的なDNA脱メチル化傾向が示された。特に、GSEAにおいては、本研究とほぼ同様の実験系に基づく「GOLDRATH\_ANTIGEN\_RESPONSE」のgene setが非常に高いNESを示したことにより、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。また、これまでに繰り返し免疫に伴う発現量の減少が報告されているTcmのマーカでもあるCCR7では、繰り返し免疫に伴う段階的なDNAメチル化傾向が示された。
7. 繰り返し免疫に伴い発現量が減少した遺伝子群では、GSEAとDAVIDにより、RPsに関連する遺伝子群との非常に高い相関性が示された。各細胞に発現していた全84RPsの中で、繰り返し免疫に伴い継続的に増加傾向を示すRPは全く存在しなかった。さらに、これらのRPsにおいて、繰り返し免疫に伴い、TSS付近での段階的なDNAメチル化傾向が示された。また、RPsほど顕著ではなかったが、多数のMRPsにおいても、繰り返し免疫に伴う発現量減少とDNAメチル化傾向が示された。
8. RPsとMRPsが与える影響として、老化や寿命の制御機構が多数報告されているが、繰り返し免疫に伴い発現量が増加した遺伝子群においても、GSEAにより、アポトーシスや老化に関連する多数の遺伝子群との比較的高い相関性が示された。その他に、「senescence」に関連する複数のGOのtermに含まれる遺伝子として、p53などで繰り返し免疫に伴う発現量の変動が認められた。
9. 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、繰り返し免疫に伴い発現量が増加した遺伝子群で、GSEAにより、「LI\_INDUCED\_T\_TO\_NATURAL\_KILLER\_UP」のgene setと非常に高い相関性が示された。このgene setは、本研究と実験系が全く異なる「Bcl11bのcKO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細胞で発現量が増加した遺伝子群」であり、この遺伝子群に含まれる約3分の1の遺伝子において、繰り返し免疫に伴う発現量増加とDNA脱メチル化傾向が示された。また、繰り返し免疫に伴い、Bcl11bの発現量は決して継続的に減少せず、DNAメチル化状態も継続的な変化を示さなかったことより、CD8+ T細胞のアイデンティティーが失われていないことが示唆された。これらのことから、繰り返し免疫により、CD8+ T細胞が「NK細胞に特異的な遺伝子発現の獲得」を果たしていることが示され、これらの遺伝子群が、CTLメモリー細胞が持ち得た「老化現象」の分子基盤に寄与していることが示唆された。

10. 老化 T 細胞のマーカーとしても知られている *Klrg1* をはじめ、*Nk1.1* や *Nkg2d* などの多くの NK 細胞受容体において、繰り返し免疫に伴う発現量増加と DNA 脱メチル化傾向が示された。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* も同様の傾向を示した。これらの遺伝子群も、CTL メモリー細胞が持ち得た「NK 細胞に特異的な遺伝子発現の獲得」という「老化現象」の分子基盤に寄与していることが示唆される。
11. 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である *Ifng*, *Rps27l*, *Bcl11b*, *Klrg1*, *Tbx21* について検証したところ、その再現性を示すことができ、さらにその相関性も示すことができた。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示唆された。

以上、本論文は、繰り返し免疫に伴う様々な遺伝子群の発現量増加と DNA 脱メチル化傾向、発現量減少と DNA メチル化傾向を見出し、さらに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を見出し、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を明らかにした。これら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、学位の授与に値するものと考えられる。