

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression) 法によるヒト活性化

Th 1 及び Th 2 細胞における包括的遺伝子発現解析

指導教官 松島 綱治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 永井 重徳

論文の要旨

【目的】

CD4 陽性 T 細胞は抗原刺激により、Th1 及び Th2 細胞の 2 つのタイプのエフェクター細胞に分化する。Th1 細胞は IFN- γ を産生し細胞性免疫に、Th2 細胞は IL-4 や IL-5 を産生し液性免疫に関与すると言われている。我々は SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いてヒト活性化 Th1 及び活性化 Th2 細胞に発現する遺伝子を包括的に検索し比較することで、それらの機能を決定する分子の同定を目的とし実験を行った。

【方法】

ヒト臍帯血からリンパ球を密度勾配遠心法により分離し、PHA (フィトヘマグルチニン) 刺激 3 日後、IL-12、抗 IL-4 抗体、IL-2 を加えて 2 週間培養して Th1 細胞を、また IL-4、抗 IL-12 抗体、IL-2 を加えて 2 週間培養し Th2 細胞をそれぞれ *in vitro* で分化させた。細胞内サイトカイン染色により Th1 及び Th2 細胞への分化を確認した後、細胞を回収し mRNA を抽出した。ビオチン化オリゴ dT をプライマーとして逆転写し、得られた cDNA を 4 塩基 (CAT \downarrow G) 認識の制限酵素 *Nla*III で消化の後に 2 群に分け、ストレプトアビジンビーズにより各 cDNA の 3' 末端を回収した。それぞれの cDNA 断片に異なるリ

ンカー A と B をライゲーションし、認識部位より 13 塩基下流で切断する制限酵素 *BsmF1* で消化して cDNA 断片をビーズから切り離した。2 群の cDNA 断片をライゲーションの後、リンカー A、B に含まれる配列をプライマーとして PCR を行い、cDNA ライブラリーを増幅した。その後再びそれを *NlaIII* で消化することにより、tag と呼ばれる各遺伝子の最も 3' 末端側にある *NlaIII* 認識部位から 10 塩基が 2 つ繋がったもの (ditag) が得られる。この ditag をライゲーションして数珠繋ぎにし、シークエンスベクター pZero-1 に組み込んだ後大腸菌に形質転換してからコロニー PCR 法にてシークエンスを行った。tag は各遺伝子に特有の配列を持つため、tag の種類と頻度を調べることにより、細胞に発現している遺伝子の種類と発現量が明らかとなる。

【結果】

以上の方法で、Th1 細胞については 32,219 tag を、Th2 細胞については 32,291 tag を検索し、22,096 種類の異なる遺伝子配列を得た。統計学的処理により両群を比較したところ、ほとんどの遺伝子について差が見られなかったが、Th1 及び Th2 細胞に優位に発現している遺伝子を、 $p < 0.05$ でそれぞれ 171 種類 (うち既知のものは 68 種類) 及び 50 種類 (うち既知のものは 14 種類) 同定した。Th1 細胞については定義通りに IFN- γ が最も多く優位に発現しており、全遺伝子の 5.6% にのぼり、Th2 細胞の発現量の 49.2 倍に相当した。また IL-2、IL-3、GM-CSF といったサイトカインのみならず、MIP-1 α 、MIP-1 β 、lymphotactin などのケモカインも Th1 細胞特異的に発現していることが明らかになった。特に lymphotactin については、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞に対する走化性因子であるがこれが Th1 細胞に優位に発現していることをこの実験により初めて明らかにした。一方、Th2 細胞に優位に発現している遺伝子は IL-13 などわずかであり、Th1 細胞に比べ分泌される液性因子はそれほど多くないことがわかった。また EST データベース上に存在する未知の遺伝子もそれぞれに多数存在するため、これらの遺伝子を同定することで新たな Th1 及び Th2 細胞の役割を発見できる可能性が示唆された。

【まとめ】

以上の結果から Th1 及び Th2 細胞の機能に関わる多数の遺伝子が同定された。今後は未知の遺伝子をクローニングする予定である。また DNA マイクロアレイと組み合わせることによりそれらの遺伝子の経時的変化を調べ、将来の遺伝子診断等に應用したいと考えている。