

審査の結果の要旨

氏名 永井重徳

本研究では、免疫疾患に重要な役割を果たしている I 型ヘルパー T (Th1) 細胞と II 型ヘルパー T (Th2) 細胞の機能の違いを決定する遺伝子を検索するため、SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いて包括的遺伝子発現解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト臍帯血からリンパ球画分を単離し、Th1 細胞については IL-12 及び抗 IL-4 を、Th2 細胞については IL-4 及び抗 IL-12 を加えて約 2 週間培養した。さらに抗 CD4 抗体をコートしたビーズを用いて CD4 陽性細胞を単離し、それぞれ Th1 及び Th2 細胞とした。PMA 及び Ionomycin でこれらを活性化した後、細胞内サイトカイン染色を行ったところ、Th1 細胞では IFN- γ のみを、Th2 細胞では IL-4 のみを産生しており、正しく細胞が分化していることを確認した。
2. PMA 及び Ionomycin を用いて 6 時間活性化したそれぞれの細胞から poly(A) RNA を抽出し、SAGE を行った。すなわち、各遺伝子の持つ配列のうち最も 3'側の *Mla*III 消化部位 (CATG) から 10 塩基 (tag) を取り出し、これをライゲーションにより連鎖状にした concatemer を作製し、これをシーケンスすることで遺伝子の種類及び発現頻度を包括的に解析した。活性化 Th1 細胞から 32,219 tag、活性化 Th2 細胞から 32,291 tag を解析し合わせて 22,096 tag の異なる転写産物を得た。発現上位の遺伝子はリボゾームタンパク及び分泌タンパクをコードするものが占めていた。
3. それぞれの細胞に特異的に発現する遺伝子を解析するため、両遺伝子発現プロファイルを統計学的手法を用いて比較した。その結果活性化 Th1 及び Th2 細胞に特異的に発現する遺伝子は、それぞれ 171 及び 50 種類 (うち既知遺伝子はそれぞれ 68 及び 14 種類) であった ($p < 0.05$)。RT-PCR を行い発現差を確認した。

4. 活性化 Th1 細胞に特異的に発現する新規遺伝子のうちの一つを、データベースを用いてクローニングした。この遺伝子は糖分解酵素の一つであるトレハラーゼに相同性をもっとも高いことがわかった。

以上、本論文は SAGE 法を用いた活性化 Th1 及び Th2 細胞の包括的遺伝子発現解析から、それぞれの細胞に特異的に発現する遺伝子を多数同定した。これは両細胞の機能を明らかにするための有用な情報となり得、これらの細胞が関与する様々な免疫疾患の治療及び診断への応用が期待されると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。