

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 「SAGE法を用いたヒトナチュラルキラー細胞及びCD8⁺Tリンパ球の
包括的な遺伝子発現解析」

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 転入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 小内亜矢

(いん)

I 背景

リンパ球による細胞傷害性は、癌細胞、ウイルス感染細胞及び細胞内病原体を排除する主要な免疫反応である。この過程は、主にNK細胞及びCD8⁺T細胞によって担われている。NK細胞はIgレセプターやT細胞レセプターなど抗原特異的なレセプターを発現していないが、最近NK細胞が正常細胞と癌細胞を見分けるメカニズムが、分子レベルで明らかにされつつある。正常細胞においては、NK細胞が細胞表面上の主要組織適合抗原(MHC)を認識し、それによって抑制性のシグナルが伝達され、NK細胞の機能が抑制される。一方、癌細胞やウイルス感染細胞などの様に、MHCの発現が低下または欠如している細胞では、抑制性シグナルは伝達されず、NK細胞は標的細胞を傷害し、さらにサイトカインやケモカインを産生することで、免疫反応、炎症及び造血を制御している。CD8⁺T細胞は、抗原特異的な反応を引き起こす獲得性免疫の重要なメディエーターの一つである。抗原提示細胞により、病原体由来の抗原に特異的なTCRをもつCD8⁺T細胞が選択される。このエフェクターCD8⁺T細胞は病原体の排除に貢献し、その後一部はメモリー細胞となり維持される。この様に、NK細胞とCD8⁺T細胞は、異なったリンパ球系列に属するが、細胞傷害性を示すという共通の特徴を持っている。本研究で用いたSAGE(Serial Analysis of Gene Expression)法は、様々な細胞や組織での包括的遺伝子発現を解析するために確立された方法である。個々の遺伝子のtagと呼ばれる配列を解析することで、未知の遺伝子を含め、遺伝子発現プロファイルを得る事ができる。私はこのSAGE法を用いて、NK細胞及びCD8⁺T細胞の遺伝子プロファイルを解析し、それぞれの細胞群に発現する遺伝子を多数同定した。さらにその結果から、NK細胞においてα-defensin 1が特異的に発現していることを同定した。defensinは抗菌

ペプチドの一種だが、ヒトナイーブ CD4⁺ T 細胞及び未熟樹状細胞を遊走させる活性をもっている。本研究では、in vitro で、 α -defensin 1 のナイーブ CD8⁺ T 細胞に対する選択的な遊走活性を証明した。また NK 細胞の発生、分化、増殖、活性化及び生存に重要なサイトカインである IL-15 が、NK 細胞の α -defensin 1 の発現を増強することを証明した。

II 材料と方法

1. ヒト末梢血からの NK 細胞及び CD8⁺ T 細胞の精製

健康人末梢血からヒト末梢血単核球を分離し、ハプテンが結合した抗 CD3、抗 CD4、抗 CD19、抗 CD36 及び抗 IgE モノクローナル抗体の混合物とインキュベートした後、抗ハプテン抗体でコートされた磁気ビーズとインキュベートし、磁力を利用したカラムによる分離にて、ネガティブフラクションを NK 細胞として分離した。CD8⁺ T 細胞は、NK 細胞と同様の方法で末梢血単核球を分離後、抗 CD8 モノクローナル抗体でコートされた磁気ビーズとインキュベートし、同様のカラムに結合した細胞を分離し CD8⁺ T 細胞とした。

2. SAGE プロトコール

NK 細胞及び CD8⁺ T 細胞から精製した poly (A)⁺ mRNA を用いて、5'端をビオチン化したオリゴ d(T)₁₈ をプライマーとして cDNA を合成した。この後 NlaIII で消化し、3'側のフラグメントをストレプトアビジンでコートしたビーズに結合させた。これを 2 つに分け、それぞれに異なるリンカーをライゲーションした。リンカーには制限酵素 BsmF I の認識部位が含まれており、この制限酵素により cDNA を切り離した。cDNA を平滑末端化しお互いにライゲーションさせた後、それぞれのリンカーに含まれる配列をプライマーとして、PCR によりライゲーション産物を増幅した。これを再び NlaIII で消化し、tag が 2 つつながった ditag を得た。T4 リガーゼで ditag が数珠つなぎ状になったコンカタマーを作製し、ベクター pZero-1 にサブクローニングした。この後シーケンサーを用いて tag の配列を決定した。この結果から、NK 細胞及び CD8⁺ T 細胞のライブラリー間の統計的有意差を評価した。また異なるライブラリー間の類似性を解析するため、NK 細胞、CD8⁺ T 細胞、Th1、Th2、単球、マクロファージ、未熟樹状細胞及び成熟樹状細胞のライブラリー間の相関係数を求めた。

3. RT-PCR

PCR 反応は逆転写反応後の反応液をテンプレートとして用い、15 μ M プライマー、125 μ M dNTP、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH8.3)、1.5 mM MgCl₂ 及び 4 U Amplitaq を用いて行なった。

4. CD45RA⁺ CD27⁺ ナイーブ、CD45RA⁻ CD27⁺ メモリー及び CD45RA⁺ CD27⁻ エフェクター CD8⁺ T 細胞の精製

CD8⁺ T細胞を抗 CD45RA 及び抗 CD27 モノクローナル抗体で染色し、cell sorter にて CD45RA⁺ CD27⁺ ナイーブ CD8⁺ T 細胞、CD45RA⁻ CD27⁺ メモリーCD8⁺ T 細胞及び CD45RA⁺ CD27⁻ エフェクターCD8⁺ T 細胞を精製した。

5. ケモタキシスアッセイ

ナイーブ、メモリー及びエフェクターCD8⁺ T細胞を RPMI1640 培地に懸濁した。細胞懸濁液をケモタキシスチャンバーの上層に加え、下層には希釈した α -defensin 1 を加え、下層に遊走した細胞の数をカウントすることで評価した。

6. NK 細胞の精製と培養

NK 細胞を精製後、IL-2 または IL-15 の存在下で培養し、total RNA を調製した。ferritin heavy chain 及び α -defensin 1 の発現レベルを調べるため、RT-PCR を行なった。

III 結果

1. NK 細胞において発現頻度が高かった遺伝子は、 β -2-microglobulin、MHC class I,C、RANTES、thymosin β 10 及び profilin などだった。一方 CD8⁺ T細胞は NK 細胞に比べ、リボゾームタンパクの発現が上位をしめており、他には β -2-microglobulin、MHC class I, C 及び ferritin, heavy polypeptide 1 の発現頻度が高かった。

2. 大部分の遺伝子は両細胞群での発現頻度が等しかったが、どちらか一方の細胞で発現している遺伝子も検出された。NK 細胞において発現頻度が高かったのは、Ksp37、cystatin F、killer cell Ig like receptor、及び α -defensin 1 などだった。CD8⁺ T細胞では、v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homologue (c-jun)、interleukin 8、TRAIL 及び chemokine receptor CCR7 などが発現頻度が高かった。

3. NK 細胞は、granulysin、granzyme B、 α -defensin 1、perforin、DNAX activating protein (DAP) 10 及び NK receptor などの、細胞傷害性に関与する遺伝子を発現していた。サイトカイン、ケモカインとそのレセプターに関しては、NK 細胞は IL-2R β 及び CX₃C receptor 1、CD8⁺ T細胞は interleukin 8、CCR7、IL-4R、IL-7R 及び LARC などを発現していた。またアポトーシスに関与する分子では、NK 細胞は apoptosis-associated speck like proteins containing CARD、CD8⁺ T細胞は TRAIL、TNF receptor associated factor; TRAF 4、apoptosis-related cystain protease ; caspase 8 及び TRAF 5 などを選択的に発現していた。シグナル伝達に関与する分子では、STAT 6 の発現が CD8⁺ T細胞において発現していた。この結果から NK 細胞において galectin 1 の発現が、CD8⁺ T細胞において LARC の発現が明らかとなった。

4. NK 細胞の CD8⁺ T細胞に対する相関係数は 0.779 であり、高い類似性を示した。一方 CD8⁺ T細胞は、Th2 細胞に対して最も高い相関係数 (0.806) を示した。

5. SAGE の結果において、ドナーによる差がないことを確認するために、両細胞群で

発現に差がある遺伝子について RT-PCR を行なった。granulysin、perforin、granzyme B、 α -defensin 1、prostaglandin D2 synthase、CX₃CR1、及び 4 つの新規遺伝子は NK 細胞において高く発現していた。一方 CCR7 と LARC は、CD8⁺T 細胞において発現が高かった。それぞれの相対的な遺伝子発現は SAGE による結果にほぼ一致していた。

同様に、CD8⁺T 細胞の 3 つのサブセットにおける発現を RT-PCR により検討した。Perforin、granzyme B 及び CX₃CR1 はエフェクター CD8⁺T 細胞において強く発現していたが、CCR7 はナイーブ及びメモリー CD8⁺T 細胞において特異的に発現していた。また hypothetical protein FLJ12443 及び MGC915 も、メモリー及びエフェクター CD8⁺T 細胞において発現が認められた。

6. α -defensin 1 は、ヒトナイーブ CD4⁺T 細胞及び未熟樹状細胞を遊走させることが報告されている。そこで CD8⁺T 細胞サブセットに対する α -defensin 1 の遊走活性を検討した。 α -defensin 1 はナイーブ CD8⁺T 細胞を濃度に依存して遊走させた。また IL-15 存在下で培養した NK 細胞において、 α -defensin 1 の発現は培養開始後すぐに増強されたが、時間が経過するに従い徐々に低下した。

IV 考察

細胞傷害性に関与する遺伝子は、NK 細胞で顕著に発現が認められた。一方 CD8⁺T 細胞は、未刺激の状態では、細胞傷害性に関与する分子は殆ど発現していなかった。CD8⁺T 細胞は樹状細胞などの抗原提示細胞によるプライミングを受けた後、抗原により再度活性化されエフェクター細胞として機能するので、未刺激の細胞では細胞傷害性に関与する分子を発現していないという SAGE の結果は、生物学的に理にかなった結果だと考えられる。以上から NK 細胞は CD8⁺T 細胞と比較して、抗原刺激がない状態で既にある程度活性化状態にあり、ウイルス感染などにおいて、抗原刺激に依存せずに CD8⁺T 細胞よりも早期に反応する細胞である可能性が考えられた。

本研究において、NK 細胞が α -defensin 1 を発現し、さらに IL-15 刺激により α -defensin 1 の発現が増強されることが明らかとなり、NK 細胞の機能における IL-15 の役割の一つが示された。また、 α -defensin 1 はナイーブ CD8⁺T 細胞に対して特異的に遊走活性を示すことが明らかとなった。 α -defensin 1 のレセプターは現在まで明らかになっていないが、メモリー及びエフェクター CD8⁺T 細胞ではなく、ナイーブ CD8⁺T 細胞のみがそのレセプターを発現している可能性が考えられる。この結果から私は、NK 細胞が産生する α -defensin 1 がナイーブ CD8⁺T 細胞と樹状細胞をリクルートさせることによって、自然免疫と獲得性免疫を仲介するシグナルを供給すると推測する。本研究で得られた結果は、細胞傷害性を持つ細胞の機能を明らかにするために役立つと共に、癌及びウイルス感染などの疾患治療の新たな標的分子の発見につながることを期待される。