

論文の内容の要旨

Genome wide gene expression profile of murine naïve, effector and memory CD8⁺T lymphocytes

ナイーブ、エフェクター、メモリーCD8⁺ マウス T

リンパ球のゲノムワイド発現プロファイル

指導教員 松島 綱治 教授

東京大学大学院医学系研究科

社会医学専攻

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

氏名 李 庸準

【目的】

抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞は非自己抗原を認識して感染症や腫瘍のコントロールに重要な役割を果たす。免疫記憶は、免疫システムにおける最大の特徴のひとつである。急性感染症における CD8⁺T 細胞 応答は、時間に主軸をおくと大きく分けて naïve、effector、memory というステージを経過する。一方、遺伝子解析・トランスクリプトーム解析は細胞の増殖、分化、環境因子、薬物による影響、病気による細胞・組織の変化を理解するうえで大変重要である。現在、DNA アレイなど、数千～数万の発現遺伝子の包括的な解析方法が開発されている。しかしながら、特定の細胞や組織における全ての転写産物が明らかになっているわけではない。マウス CD8⁺T 細胞のメモリーの分化過程を明らかにするためには、まず CD8⁺T細胞の分化過程における全ての転写産物を明らかにする必要がある。それで、本研究では、マウス CD8⁺T細胞の分化過程における全ての転写産物を明らかにするため、次世代 DNA シーケンサー、Solexa により、遺伝子発現解析を行った。

【方法】

抗原特異的 CD8⁺T 細胞をコンジェニックマーカー、Ly5.1 陽性 C57BL/6 マウス脾臓から分離し、それを Ly5.2 陽性 C57BL/6 マウスに移入した。移入 1 日後に、 2×10^6 pfu の recombinant vaccinia virus (VV-OVA) を投与して感染刺激を加え、7 日目と 40 日目のエフェクターとメモリー細胞をそれぞれ単離し、サンプルとした。続いてナイーブ、エフェクター、メモリー CD8⁺T 細胞から mRNA を抽出し、5' 末端を含む 25 塩基からなるコンストラクトを作成し、これを次世代シーケンサー、Solexa により解析した(5' Solexa 法)。

【結果】

①Solexa により解析した結果、約 1000 万個ずつのシークエンスタグ(転写産物)が得られ、シークエンスエラー、さらにマウスゲノムに複数箇所ヒットするタグを取り除くと約 300–500 万のタグがゲノムに 1 箇所ヒットした(Table 1)。その中の約 80%がタンパク質をコード(RefSeq cDNA)している遺伝子に関連づけられ、遺伝子の種類についてはナイーブ、エフェクター、メモリー CD8⁺T 細胞それぞれの約 13,000 個であった。この中で細胞当たり 1 コピー以上の遺伝子(同一細胞集団で共通に発現しているものだけを解析)はそれぞれ 8,140, 7,929, and 7,799 個であり、ライブラリー間で約 73%の発現遺伝子が重複していた(Figure1)。また、ナイーブ、エフェクター、メモリー CD8⁺T 細胞に特異的に発現する遺伝子は、それぞれ 534、426、235、個であった。

Table 1. CD8 Sequencing Summary

| | Sequenced tags | Unique Tags | Mapped tags (one locus) | Tags in Refseq | Gene No. |
|----------------|----------------|-------------|-------------------------|----------------|----------|
| CD8 Naïve T | 9,853,396 | 4,949,255 | 2,957,436 | 2,329,997 | 13,235 |
| CD8 Effector T | 11,354,738 | 7,512,665 | 5,287,872 | 4,198,234 | 12,934 |
| CD8 Memory T | 8,405,854 | 3,395,702 | 3,232,022 | 2,675,564 | 12,771 |

Mapped tags represent number of 25bp 5'end tags getting hits in genome.

ナイーブ CD8⁺T 細胞において発現量が高い遺伝子はリボゾームタンパク関連遺伝子(5.9 %)であり、その他、細胞膜関連の遺伝子、CD52、CD8、CD3 の発現が高かった。エフェクターとメモリーにおいて発現量が高い遺伝子群はナイーブと同様の傾向であった。ライブラリー間の相関については、エフェクターとメモリー CD8⁺T 細胞の間では高い類似性(相関係数、0.89)を示し、ナイーブとエフェクターの間では、類似性(0.12)は低かった。ナイーブと比較して、エフェクター細胞で発現量が変化した遺伝子は galectin 3、granzymes、S100 calcium binding protein A4、phospholipase C beta 1、insulin-like growth factor binding protein 4、chemokine CC motif receptor 9 であった。ナイーブと比較してメモリー細

胞で発現が上昇または低下している遺伝子は、エフェクター細胞と共通するものが多かったが、特に dickkopf-like-1, activating transcription factor-3, RNA binding motif, ELMO/CED-12 domain 1, hypothetical protein LOC711177 の遺伝子は、メモリーCD8⁺T細胞でのみ発現が上昇していた。一方、変化のあった遺伝子を microarray のデータを比較したところ、これらの遺伝子は検出されなかったことから 5' Solexa が非常に高感度であることが示された。

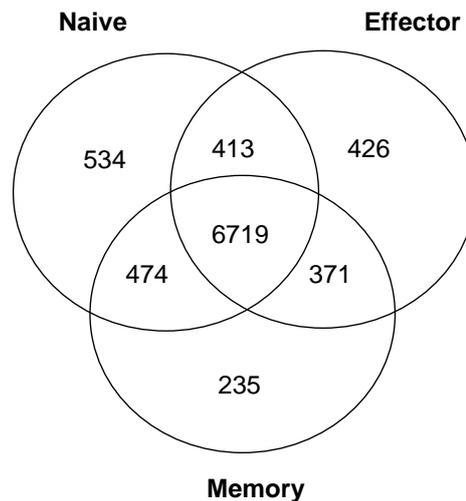
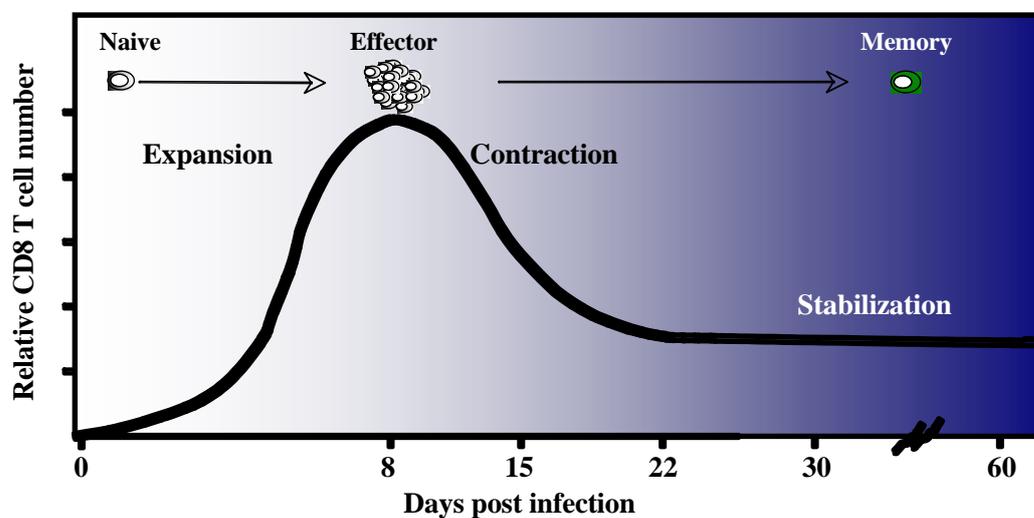


Figure1. Differentially expressed genes in naïve, effector, and memory CD8⁺T cells. Expression level : >10(>1 copy/cell)

② ナイーブ CD8⁺T 細胞と比べて抗原刺激により発現が上昇した遺伝子を Gene ontology (GO) によって分類した。ナイーブ CD8⁺T 細胞では、cell adhesion、enzyme linked receptor protein signaling pathway、hormone metabolism、behavior、cell communication、protein amino acid phosphorylation に関連する遺伝子群の発現が上昇しており、一方、エフェクターCD8⁺T 細胞では、mitotic cell cycle cell division、nucleosome assembly に関連する遺伝子群の発現が上昇しており、これはエフェクター細胞の増殖能を示唆していると考えられた。一方、メモリー細胞では、negative regulation of lymphocyte activation など抑制系に関連する遺伝子群の発現が上昇しており、エフェクター細胞の特徴であるサイトカイン産生、細胞増殖、細胞障害活性などを抑制する遺伝子が働いていることが明らかとなった。

③ エフェクター及びメモリーCD8⁺T 細胞において発現増加が共通している遺伝子の中で、今まで CD8⁺T 細胞との関連が明らかにされていないものとしては Irf4、Ifitm1、Nfil3、Atp1b1、Ret などが観察され、これらの変化についてはリアルタイム PCR 法においても確認された。また、一過性にエフェクター細胞で上昇する遺伝子として Ccna2 と Cmkr1 が新たに明らかとなった。

【結論と考察】



| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>N<E</p> <p>Irf4(T cell activation) Iftm1(negatively regulated cell growth) Nfil3(cell survival or apoptosis) Ret(cell cycle) Ccna2(cell cycle) Cmklr1(chemotaxis and immunosuppression) CD148 (inhibition of activation)</p> | <p>N>E<M</p> <p>CD75 (susceptibility to cell death) CD87 (inhibition of activation) CD302 (cell adhesion and migration)</p> | <p>N<M</p> <p>Maff (cell cycle) Irf4 (T cell activation) Iftm1 (negatively regulated cell growth) Nfil3 (cell survival or apoptosis) Ret (cell cycle)</p> <p>N>M</p> <p>Atp1b1(ion transport)</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Figure 2. Schematic illustration of the three phases of an antigen-specific CD8 T cell response following immunization. Newly identified genes which are associated with CD8 T cell differentiation are listed. (N:gene expression level in naive CD8 T cells, E: effector, M: memory).

最近私たちが開発した次世代高速 DNA シークエンサー、Solexa を用いた 5'-端トランスクリプトーム解析法は、従来の cDNA microarray/DNA chip を用いた包括的遺伝子発現検索に比べ感度が 100 倍以上すぐれているだけでなく、細胞が発現しているすべての遺伝子を知ることが出来る。本研究では、この技術を用いて CD8⁺T 細胞の解析に適用し全ゲノムレベルでのトランスクリプトーム解析を行った。このエフェクター及びメモリー CD8⁺T 細胞におけるすべての発現遺伝子情報は CD8⁺T 細胞サブセットの動態をより詳細に解析する上で非常に重要である。今回新たに、エフェクター及びメモリー CD8⁺T 細胞において見出された発現遺伝子は、Figure 2 に示す通り、細胞膜上や核内にあるタンパク質をコードする遺伝子でその機能は転写因子や細胞増殖、アポトーシスに関与すると推定されることから、メモリー CD8⁺T 細胞への分化、さらに維持や増殖に関与すると考えられる。これらの遺伝子の発現時期と細胞状態の関連をより詳細に検討することで、ワクチン接種における prime-boost 法を最適化させ、より効率的な予防ワクチンの開発設計に応用出来ると予想される。今後、これらの遺伝子について詳細に検討することで、予防ワクチンの開発設計に応用できるだけでなく自己免疫疾患や悪性腫瘍などの難治疾患に対する新たな治療戦略を見出せる可能性がある。