

審査の結果の要旨

氏名 李 庸準

本研究は、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い、下記の結果を得た。

1. 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、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代表的表面マーカーである CD62L, CD127, CD44 の発現を FACS analysis を行ったところ、それぞれの特異的に発現していることが分かった。
2. 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 により解析した結果、約 1000 万個ずつのシーケンスタグ（転写産物）が得られ、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。
3. 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。
4. 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) によって分類した結果、エフェクター CD8⁺T 細胞では、cell division 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。
5. 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 Ifitm1、Nfil3、Atp1b1、Ret などが観察され、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 Cmkrl が新たに明らかとなった。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。

以上、最近私たちが開発した次世代高速 DNA シーケンサー、Solexa を用いた 5' -端トランスクリプトーム解析法は、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 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の解析から、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を明らかにした。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に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。