

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月25日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390095
 研究課題名（和文） 次世代DNAシーケンサーによるCTLメモリー樹立・維持の分子基盤解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the molecular bases of the generation and maintenance of CTL memory by next generation DNA sequencer
 研究代表者
 松島 綱治 (MATSUSHIMA KOUJI)
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50222427

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現解析の結果からケモカイン受容体 CXCR3 に着目したところ、CD8 陽性 T 細胞の活性化直後のリンパ組織内局在を CXCR3 が制御することで、その後の免疫記憶 CD8 陽性 T 細胞の形成に影響を及ぼしていることが明らかになった。また、メモリー細胞において、CTL に特徴的なサイトカインやケモカインなどの遺伝子群の顕著な発現量上昇、細胞老化と関連深いリボソーム蛋白類の発現量低下とを認めた。さらに一次メモリーと比較して、二次メモリーCTLではNK細胞特異的遺伝子の発現量上昇が認められ、老化メモリーCTLの特徴となることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Based on the gene expression analyses, we focused on the chemokine receptor CXCR3 and revealed that CXCR3 regulates the localization of CD8⁺T cells within lymphoid tissues early after activation, which affects the formation of memory CD8⁺T cells. Memory CD8⁺T cells up-regulated the expression of chemokine and cytokine genes characteristic of CTLs, whereas down-regulated expression of ribosomal protein genes associated with cell senescence. Furthermore, we found that 2nd memory up-regulated the NK cell specific genes as compared to 1st memory. Thus we would like to propose that these molecules might be a marker of senescent memory CTLs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：遺伝子、感染症、免疫学、免疫記憶

1. 研究開始当初の背景

申請者は、1987年にケモカインのプロトタイプである IL-8 を発見し、特異的白血球サブセットが炎症組織に浸潤する分子機序を

解明した。免疫応答の時空間制御機構を追求して、一貫して動的免疫学の分野を開拓してきた。一方で1996年以降、ゲノム時代を先取りして SAGE 法を用いた包括的遺伝子発現

解析技術を応用し、ヒト白血球の全サブセット解析を展開してきた実績をもつ。本研究提案では申請者がもつこれら二点の優位性を結集して、免疫学に残された重大な enigma(謎)の一つである「メモリーCTL の樹立・維持に関する分子基盤」に挑む。(図 1)

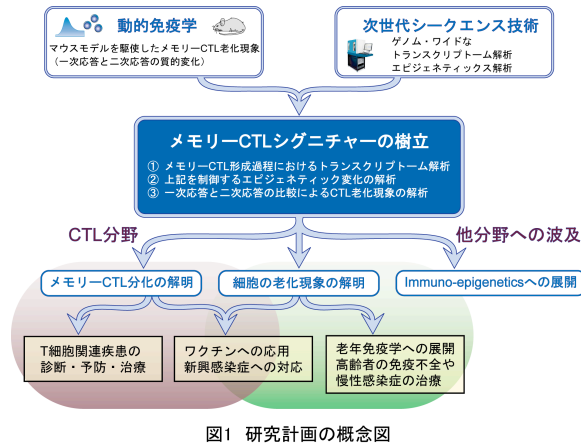


図1 研究計画の概念図

CTL は感染症や腫瘍の最終排除に決定的に重要な役割を果たしている。急性感染症(ワクチン接種後を含む)における典型的な CTL 応答では、ごく少数の抗原特異的ナイーブ細胞が抗原提示を受けて爆発的に増殖し(わずか 5-7 日で 13-18 回以上分裂する)、エフェクターCTL となってウイルス感染細胞などを排除する。大量に産生されたエフェクターCTL は増殖をほとんど止め、大半は死滅するが、一部(5-10%未満)がメモリーCTL へ移行し長期間残存して再感染に備える。このように CTL は非常にダイナミックな応答を示すが、エフェクターCTL のうち、ごく一部のみがメモリーCTL へ移行する分化過程は細胞性免疫記憶分野における最大の焦点であるにも関わらず、分子機序がほとんど明らかになっていない。またエフェクターCTL やメモリーCTL は活性化/成熟化/遊走分子マーカーおよびサイトカイン産生性の組合せから非常に多様性に富んでいるが(同時に複数のサブセットが存在する)、その分化機序も大半が謎である(Nat. Rev. Immunol. 8:107, 2008)。

一般的に細胞の分化では、細胞分裂に伴いエピジェネティック変化が蓄積し、個々の遺伝子の発現を調節し、それらの総合的な働きで細胞形質が変化すると理解されている。いまだに現象論にとどまっている CTL 応答と分化について、遺伝子発現変化とそのエピジェネティック制御を解析し、細胞性免疫記憶形成機序を分子レベルで明らかにすることは極めて重要である。ここから得られる分子情報は、全く新しいアプローチから新型インフルエンザ・パンデミックや HIV 等難治感染症に対するワクチン投与プロトコルを最適

化するための大切な情報を提供する。

CTL 応答の時間軸を個体の生涯レベルにまで拡大した場合、一度樹立された同一クローンのメモリー細胞が個体内で半永久的に同質の分裂応答を繰り返すわけではない。申請者らは、反復感染刺激により既存メモリーCTL の分裂能が低下し、より直近の応答で誘導された若いメモリーCTL が将来の応答で主役に台頭する、メモリーCTL 集団のクロノルな交代現象を伴う維持機序を解明した(Int. Immunol. 19:105, 2007、図 2)。

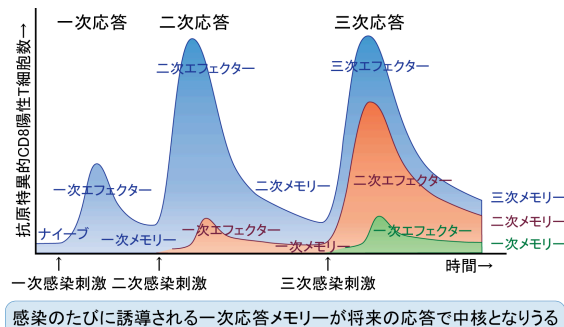


図2 反復感染における抗原特異的メモリーCTLの維持

これまで CTL 応答の解析はほとんどが一次応答を対象として行われてきたが、感染(ワクチン接種)後に形成されるメモリーCTL が実際の次感染に際して個体防御を發揮するのは二次(反復)応答の効果である。従って、真に個体防御に働く long-lived memory CTL 樹立を目指すのであれば、一次応答に限局せず二次応答以降を含めたメモリーCTL 動態、とりわけメモリーCTL の永続性 eternity の維持と老化現象 senescence を解明することが極めて重要となる。

包括的遺伝子解析分野では、次世代シーケンサーの登場により大きなブレイクスルーが生まれつつある。従来の DNA chip を用いた包括的トランスクリプトーム解析は、発現遺伝子中の上位 2-3 割(5 copies/cell 以上)の解析は可能であるが、より発現量の少ない膜蛋白質・シグナル伝達分子・細胞周期・転写因子の発現は検出不可能であり、感度・再現性・施設間での比較/データベース化に問題がある。また、DNA chip は一遺伝子=転写産物を前提として主に 3' -end を解析していたが、最近一つの遺伝子から多種類の転写物が読まれることが明らかになった。また、coding RNAs だけでなく non-coding RNAs である micro RNAs も重要な機能を有することが判明している。これらの問題を克服するために私達は 5' -end SAGE(serial analysis of gene expression)ならびに次世代高速 DNA シーケンサーを用いた 5' -端ト

ランスクリプトーム解析法を開発した (Hashimoto, Nature Biotechnol. 22:1146, 2004. 特許第 3845416 号)。このような遺伝子解析技術の発展により、今や ChIP on Chip ではなく次世代シーケンサーを用いた ChIP on sequencing の時代を迎え、トランスクリプトームとエピジェネティクスを全ゲノムレベルかつ超高解像度で解析することが可能となった。

2. 研究の目的

これまで述べてきた動的免疫学と遺伝子解析技術を背景に、以下の項目について CTL 応答を次世代 DNA シーケンシング技術で解析し、メモリー CTL の樹立・維持に関する分子基盤を解明する。

1) CTL 応答各期における遺伝子発現とエピジェネティック制御を全ゲノムレベルで解析し、ゲノムワイドなメモリー・シグニチャー (transcriptome+epigenetic signature; ゲノム DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化・メチル化情報など) を明らかにする。

2) 解析を一次応答に限局せず二次応答以降へ拡大し、遺伝子発現変化をもとに、CTL 老化 (分裂回数依存的变化) を規定する候補遺伝子とそのエピジェネティック制御機構を同定する。

3) 上記を通じて選定された候補遺伝子について、CTL への遺伝子導入、siRNA、ノックアウトマウスなどを利用して機能解析を行うとともに、ワクチン投与最適化の基礎的検討を行う。

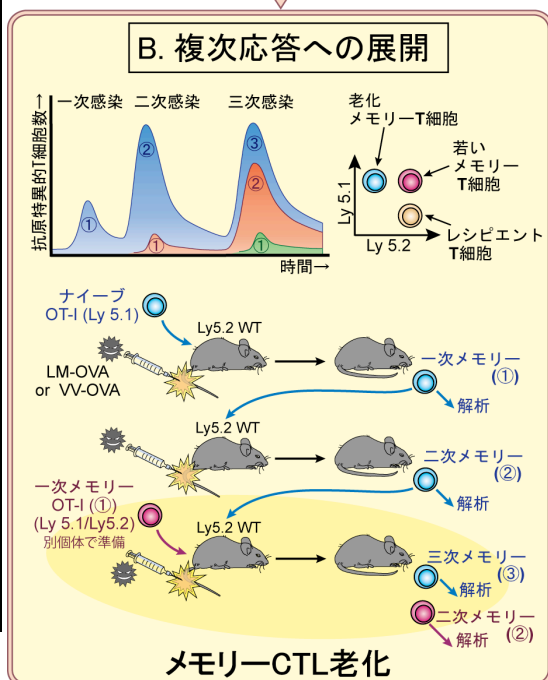
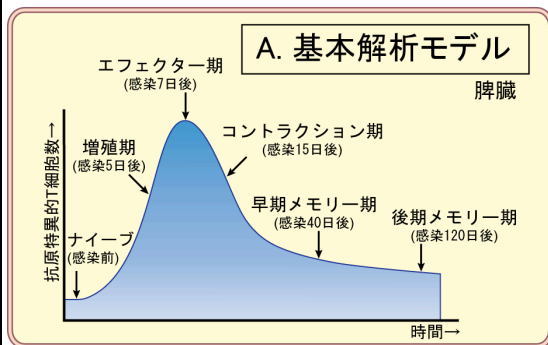
3. 研究の方法

均質な CTL を大量に得るために T 細胞受容体トランスジェニック (TCR Tg) 細胞とウイルス感染モデルマウスを利用する。CTL を応答の各期 (ナイーブ、エフェクター、コントラクション、メモリー) から分取して解析サンプルとし、各期で特異的に発現変化を示す遺伝子とエピジェネティック変化を、次世代 DNA シーケンサーと独自に開発した 5' 一端トランスクリプトーム解析法を用いて包括的に解析する。一次応答に加えて二次応答以降も解析対象とし、メモリー CTL 樹立と老化の分子基盤を明らかにする。メモリー CTL 樹立・維持への関与が示唆された遺伝子 (群) について機能解析を行うとともに、他病態モデルでの関与やワクチン増強効果などを積極的に確認して、新規の診断・予防・治療標的としての可能性を探究する。特に、メモリー CTL 樹立を促進するような遺伝子を同定することで、新規機序に基づくワクチンの開発へ発展させる。

① CTL 一次応答のサンプル取得 (基本モデル)

コンジェニック分子である Ly5.1 を発現する卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR Tg 由来の CD8+ T 細胞 (OT-I 細胞) をナイーブ野生型 (WT) レシピエントマウス (Ly5.2 を発現) に養子移入し、1 日後に OVA を発現する組換えリステリア菌 (LM-OVA) ないし組換えワクシニアウイルス (VV-OVA) を経静脈感染させる。コンジェニック分子の発現を指標に、図 3A に示した各期の OT-I 細胞を脾細胞から分取して解析サンプルとする。

② メモリー CTL 老化モデルの樹立と解析
同一病原体の反復感染において CTL が感染 (抗原) 刺激を受けた回数を明確に区別するために、連続養子移入モデルを作成する (図 3B)。①と同様に一次応答を誘導し、感染後 40 - 50 日以上経過したマウスの脾細胞から、コンジェニック分子 (Ly5.1) を用いてメモリー OT-I 細胞のみを回収する。回収したメモリー OT-I 細胞の一部を次のレシピエントマウスに養子移入し、1 日後に LM-OVA ないし VV-OVA を感染させる。このように養子移入と感染刺激を連続して繰り返すことで、感染応答経験回数 (分裂回数) の異なるメモリー CTL



CTL 応答免疫記憶の個体レベルでの理解

を樹立し、解析サンプルとする。また、必要に応じて三次、四次応答も検討する。

このモデルの特長は、TCR Tg 細胞を用いることでクローン間の TCR affinity 差異による CTL 応答プログラム差を排除できる点と、コンジェニック分子を含む複数のマーカーを用いた厳密な細胞分離により細胞分取時のコンタミネーションを極めて低いレベルに抑制できる点にあり、実験的に感染応答経回数を正確に制御した CTL を高い精度で解析可能である。連続養子移入法による老化メモリー CTL 樹立について、一次メモリーと二次メモリーを同じ感染後 60 日目で比較する。

③ メモリー CTL 老化サンプルの細胞免疫学および細胞分子生物学的手法による検証

②に述べた分裂能が低下したメモリー CTL の「CTL 機能」と「細胞老化」を詳細に解析し、反復感染モデルで誘導される老化 CTL に生じている現象を明らかにすることを目的として、細胞免疫学的・細胞分子生物学的手法により CTL 機能や細胞分化/老化関連マーカーの解析を行う。分取したメモリー CTL の一部を用いて、*in vivo/in vitro* CTL killing assay、細胞内サイトカイン染色によるサイトカイン多重染色性、チャレンジテストにより CTL 機能面での評価を行い、細胞老化の指標である SA- β gal 染色、テロメア長/テロメラーゼ活性/DNA 損傷度の測定、細胞サイクルに関連する p16/p21 等の活性化状態を比較・解析する。得られた結果を後述の包括的遺伝子発現解析と比較することで、応答経回数依存的なメモリー CTL の質的変遷を解明する。

④ 次世代シーケンサーを用いた CTL サブセットにおける包括的遺伝子発現解析

上述のサンプルを対象に CTL サブセットライブラリーを作製後、次世代 DNA シーケンサーを用いて数百万の転写産物 (tag) を解析する。現在開発されている次世代 DNA シーケンサーには主に Solexa (イルミナ)/SOLiD (ABI) システムがあるが、私達はすでに 5' シーケンス法を両装置にて適応出来るように開発済みである (Hashimoto, PLoS One, 2009)。これにより、coding / non-coding / microRNAs を、従来法では検出しえなかった微細な発現変化レベル (1 copy/cell 以下) で包括的かつ定量的に同定する。特異的に発現すると同定された遺伝子は、さらに細胞膜/転写因子/シグナル伝達などに分類し、⑤に述べる確認を経て、機能解析のための候補遺伝子を選定する。

⑤ 5'-端大規模並列処理配列決定法で得られた包括的遺伝子発現情報の確認

④で得られた遺伝子発現情報をもとにして各細胞で RT-PCR、Northern blotting、定量的 PCR を行う。また、未知およびイントロン領域からの遺伝子発現の存在を実際に証明するために、5' RACE 法および 5' -end tag を primer として発現遺伝子をクローニングする。

⑥ エピジェネティック制御のゲノムワイド解析

DNA メチル化検索測定：細胞から抽出された DNA をメチル化感受性制限酵素で切断する。その切断端にリンカー (読み出し側) を接続し、ソニケーションにより 200-300bp に切断する。その後、切断面を平滑にし、その末端に平滑リンカー (読み込み側) を接続する。PCR にて目的の Tag の純度を上げた後、次世代シーケンサーにかけて酵素によるメチル化感受性部位を検索する。また、出来たサンプルを TA クローニングし、通常のサンガー法にて配列の確認を行う。DNA メチル化部位のゲノム領域におけるアノテーション：得られた tag をゲノム領域にアノテーションし、既存の報告と比較するとともに、遺伝子発現との相関を調べる。包括的な DNA メチル化測定後にデータの確認を目的として、抽出したゲノム DNA を Bisulfite 処理し、各遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドを含む領域 (DNA メチル化が集中する) を標的とするプライマーを用いて PCR で増幅後、TA クローニングしメチル化の程度を測定する。

4. 研究成果

① 5'-端大規模並列処理配列決定法で得られた、CTL メモリーの遺伝子発現変化を詳細に解析した。発現が変化する遺伝子群のなかで、ケモカイン受容体 CXCR3 の発現がナイーブから一次メモリーに移行する際に 160 倍以上と強く誘導され、一次メモリーから二次メモリーに移行すると若干低下することが明らかとなった。ケモカイン受容体は生体内で CTL の局在を調整することが知られているが、メモリー形成に及ぼす影響はこれまで知られていない。そこで、ケモカイン受容体がメモリー CTL の樹立に及ぼす影響について、ウイルス感染マウスモデルを用いて機能解析を行った。感染後早期の脾臓内局在に焦点を当てて組織学的な解析を実施した。その結果、活性化後早期に CD8 陽性 T 細胞上に発現誘導される CXCR3 が、脾臓内において CD8 陽性 T 細胞を傍リンパ鞘周辺 T 細胞領域から辺縁帯へ遊走させることで、エフェクター型への分

化を促進していることが明らかになった。CXCR3 は抗原特異的な活性化を受けた T 細胞のみに発現が誘導されるため、辺縁帯への集積は抗原特異的 T 細胞に限定され、その他の非特異的な集団は T 細胞領域内に残ることになる。これにより辺縁帯のスペースやサイトカインなどのリソースは抗原特異的細胞が大量のエフェクター CTL を産出するために有効に利用され、大多数の非特異的集団は炎症性サイトカインによる bystander 活性化を避けることができるのではないかと、我々は考えている。CXCR3 がほぼ全ての活性化 CTL 上に発現することから、ワクチン接種量（抗原や炎症シグナルの総量）を増加させずとも CXCR3 シグナルを制御することでワクチン効果を増強することが可能であると考えられる。本研究の成果は、The Journal of Experimental Medicine にて発表した。

② ①で得られた成果は主に一次応答におけるメモリー CTL 形成機序に焦点を当てたものであった。反復感染におけるメモリー CTL の維持機序を解析するため、解析対象を二次応答にも拡大し、遺伝子発現量と DNA メチル化の変化について次世代 DNA シークエンス技術を用いて包括的に解析した。その結果、メモリー細胞において、CTL に特徴的なサイトカインやケモカインなどの遺伝子群の顕著な発現量上昇、細胞老化と関連深いリボゾーム蛋白質類の発現量低下とを認めた。さらに一次メモリーと比較して、二次メモリー CTL では NK 細胞特異的遺伝子の発現量上昇が認められ、老化メモリー CTL の特徴となることを明らかにした。これらの遺伝子発現変化は当該遺伝子領域の DNA のメチル化・脱メチル化と相関性が強く、メモリー CTL の分化状態が DNA メチル化・脱メチル化により制御されていると強く示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Hashimoto S, Ogoshi K, Sasaki A, Abe J, Qu W, Nakatani Y, Ahsan B, Oshima K, Shand FH, Ametani A, Suzuki Y, Kaneko S, Wada T, Hattori M, Sugano S, Morishita S, Matsushima K. Coordinated Changes in DNA Methylation in Antigen-Specific Memory CD4 T Cells, J Immunol. 査読有り、2013(190)4076-4091. (DOI: 10.4049/jimmunol.1202267)

- ② Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, Kubo A, Cho YH, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, Amagai M. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin, Nat Immunol. 査読有り、2012(13)744-752. (DOI: 10.1038/ni.2353)
- ③ Qu W, Hashimoto S, Shimada A, Nakatani Y, Ichikawa K, Saito TL, Ogoshi K, Matsushima K, Suzuki Y, Sugano S, Takeda H, Morishita S. Genome-wide genetic variations are highly correlated with proximal DNA methylation patterns, Genome Res. 査読有り、2012(22)1419-1425. (DOI: 10.1101/gr.140236.112)
- ④ Kurachi M, Kurachi J, Suenaga F, Tsukui T, Abe J, Ueha S, Tomura M, Sugihara K, Takamura S, Kakimi K, Matsushima K. Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8+ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration, The Journal of Experimental Medicine, 査読有り、2011(208)1605-1620. (DOI: 10.1084/jem.20102101)
- ⑤ Ogoshi K, Hashimoto S, Nakatani Y, Qu W, Oshima K, Tokunaga K, Sugano S, Hattori M, Morishita S, Matsushima K. Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. Genomics, 査読有り、2011(98)280-287. (DOI: 10.1016/j.ygeno.2011.07.003)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 倉知 慎, Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8+ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration, 米国免疫学会(AAI2011), 平成 23 年 5 月 16 日, サンフランシスコ国際会議場(アメリカ合衆国).
- ② 小杉 瑞葉, Destruction of hematopoietic niche after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, 第 34 回日本炎症再生医学会, 平成 24 年 7 月 5 日, ホテル日航福岡(福岡)
- ③ 小杉 瑞葉, Bone marrow dysfunction and defective B lymphopoiesis during

chronic GVHD, 第 41 回日本免疫学会,
平成 24 年 12 月 5 日、神戸国際展示場(兵
庫)

[その他]

<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 綱治 (MATSUSHIMA KOUJI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：5 0 2 2 2 4 2 7

(2) 研究分担者

橋本 真一 (HASHIMOTO SHINICHI)
金沢大学・医学(系)・教授
研究者番号：0 0 3 1 3 0 9 9

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：0 0 3 9 6 7 2 2

上羽 悟史 (UEHA SATOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：0 0 4 4 7 3 8 5

阿部 淳 (ABE JUN)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：5 0 5 8 1 8 3 1

(3) 連携研究者