

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	美山 貴彦
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Highly functional T-cell receptor repertoires are abundant in stem memory T cells and highly shared among individuals (高機能 T 細胞受容体は幹細胞様メモリー T 細胞分画に豊富に存在し個人間で高頻度に共有されている)			
論文審査担当者			
主 査	教授	菅野 雅元	印
審査委員	教授	坂口 剛正	
審査委員	准教授	鎌田 英明	
〔論文審査の結果の要旨〕 近年、新たに同定された stem-cell memory (SCM) T 細胞は、高い自己複製能と多分化能を有していることから、免疫記憶の根幹を形成する T 細胞群であると考えられているが、その中に包含される T 細胞クローンの特徴は明らかにされていない。このように多様なクローンから構成される特定の T 細胞分画を包括的に理解するために、近年 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子配列の next-generation sequencing (NGS) 技術を用いた半定量解析が開発されている。しかし、NGS では個々の T 細胞が有する TCR α 鎖と β 鎖の遺伝子配列をペアとして同定できないため、TCR の機能検証が行えない。一方、シングルセルソーティング技術を用いた TCR 解析は、網羅性の点では NGS に劣るものの、単一細胞レベルでの α 鎖と β 鎖ペア遺伝子配列を取得することができるため、TCR の抗原特異性および機能検証が可能という優れた利点がある。そこで、本研究では、NGS と単一細胞 TCR 解析を組み合わせることにより、サイトメガロウイルス (CMV) pp65 抗原特異的 TCR の網羅的同定と、それらを発現する T 細胞レパトワの階層性を検証した。さらに、異なる個人間で共有される TCR (shared TCR) は感染免疫応答において機能的に優位なクローンを形成することが報告されていることから、SCM を含む T 細胞亜分画でそれらの頻度を解析し、それらの shared TCR がどの分画で維持されているのかを検討した。 まず、健常者 (CMV 既感染者 : 4 人、未感染者 : 1 人) の末梢血検体を用いて、全 T 細胞における TCR の complementarity determining region 3 (CDR3) を含む抗原結合領域の遺伝子配列を NGS で網羅的に同定し、リード集計を行った。次いで HLA-A*02 陽性の CMV 既感染者から CD8 陽性 T 細胞を分離し、CMV のテグメント蛋白 pp65 に由来する HLA-A*02 拘束性 NLVPMVATV (NLV) ペプチドによる抗原刺激で感作増幅した NLV 特異的 T 細胞をテトラマーとセルソーターを用いて分取し、同様に NGS で解析を行った。NLV 特異的 T 細胞レパトワは全 T 細胞と比較して極めて多様性が低下しており、さらに単一 T 細胞解析を行うことにより、これらを構成するドミナントクローンおよびサブドミナントクローンに発現している TCR α 鎖・ β 鎖のペア遺伝子配列を同定した。同定された TCR $\alpha\beta$ 遺伝子を CMV 未感染者から樹立した PHA 芽球および TCR 欠損 T 細胞株に導入し、それぞれの TCR の抗原特異性と機能解析を行なったところ、TCR 導入 PHA 芽球は、NLV ペプチド特異的なインターフェロ γ 産生能を獲得し、ドミナントクローンはサブド			

ミナントクローンよりも NLV テトラマーに対して強い結合力をもつことが確認された。

次に CD8 陽性 T 細胞サブセット (naïve T cells, SCM T cells, central memory T cells, effector memory T cells, terminal effector T cells) および CMV 既感染者における NLV 特異的 T 細胞における、shared TCR (異なる個人間に見出される共通の CDR3 アミノ酸配列をもつ TCR) の頻度を NGS で解析した。各 T 細胞サブセットにおける shared TCR の頻度は非常にわずかであったが、いずれのサブセットにおいても定量的に上位を構成するクローンほど共有性が高い TCR を有しており、特に SCM サブセットにおいては顕著な傾向を認めた。また、NLV 特異的 shared TCR は CMV 既感染者のみならず未感染者の末梢血にも存在していた。

以上より、CMV 既感染者における NLV 特異的 T 細胞レパトワにおいては、NLV ペプチドとの結合力がより強く、個人間での共有性がより高い TCR を有するクローンが優位性を獲得していることが明らかとなった。またこのように共有性の高い TCR を有するクローンは SCM サブセットに豊富に存在していることが示唆された。これらの結果は、ウイルス免疫応答において SCM に存在する shared TCR が、免疫記憶の主体となる機能的に優位なクローンの維持に重要な役割を果たしている可能性を示すものと考えられる。本研究で新たに開発された NGS と単一細胞 TCR 解析を組み合わせたハイスループット解析法は、T 細胞レパトワの階層性を網羅的に検証可能とする技術であり、様々な抗原特異的 T 細胞のレパトワ解析への応用も可能と考えられることから、今後の医学への貢献が大きい。したがって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	美山 貴彦
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Highly functional T-cell receptor repertoires are abundant in stem memory T cells and highly shared among individuals (高機能 T 細胞受容体は幹細胞様メモリーT 細胞分画に豊富に存在し個人間で高頻度に共有されている)			
最終試験担当者			
主 査	教授	菅野 雅元	印
審査委員	教授	坂口 剛正	
審査委員	准教授	鎌田 英明	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年8月3日の第70回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年8月9日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 サイトメガロウイルス pp65 蛋白の由来と抗原性 2 NGSによって同定される T 細胞受容体の遺伝子配列と抗原結合領域の関係 3 CD8+T 細胞亜分画群における幹細胞様メモリーT 細胞分画の機能的役割 4 幹細胞様メモリーT 細胞分画のヒト体内における局在 5 本研究手法を用いた CD4+T 細胞を含む他の抗原特異的 T 細胞群同定の可能性 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			