

論文内容の要旨

申請者氏名 Janewanthanakul Suphamon

細胞にはさまざまな特性を持っているが、細胞の特性は、細胞の増殖によって徐々に変化し、細胞の不均一性につながるということが知られている。クローン化された1細胞由来の細胞株でも、細胞の特性は増殖に伴い徐々に変化し、細胞集団として不均一性の獲得をする。このような特性の変化は、貪食能を有するマクロファージ細胞株において顕著であり、貪食作用の有無に現れる。貪食作用は、細胞膜の変形と細胞骨格の再配列を伴う複雑なプロセスであり、異物を細胞内に取り込むことであるが、このような不均一性の獲得の際に、貪食作用に関与する遺伝子の発現がどのように変化して、貪食作用の不均一性が現れるか、明らかではない。

本研究では、マクロファージ細胞株(RAW264.7)の各細胞の貪食作用を記録し、その記録した細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析データから、貪食作用の不均一性を担う遺伝子を同定することを試みた。

約 10,000 の遺伝子発現プロファイルを細胞ごとに貪食能に関連して分析したところ、608 個の遺伝子が貪食作用と相関する発現差のある遺伝子として同定され、400 個の遺伝子が貪食を示した細胞で高い発現を示し、208 個の遺伝子が貪食を示した細胞で低い発現を示した。高い発現を示した遺伝子の機能を調べたところ、免疫応答、シグナル伝達、および Fc 受容体を介した貪食関連遺伝子が濃縮されていることが示され、遺伝子発現プロファイルが適切に取得されていることがわかった。

次に、約 10,000 の遺伝子発現量のピアソンの相関に基づいて共発現ネットワークを、「重み付き遺伝子共発現ネットワーク解析(WGCNA)」を用いて構築した。この WGCNA ネットワークは、発現相関のグループによって 16 モジュールに分割された。次に、各モジュールの固有特徴量を求め、貪食作用との相関を調べたところ、16 モジュールのうち、2 モジュールは貪食と統計的に正の相関を示した。2 モジュールのうち、モジュール有意性分析は、1 つのモジュールのみが、モジュールを構成する遺伝子の発現量とファゴサイトーシスの関連に対して、共発現度が有意な相関を示した。遺伝子の発現量とファゴサイトーシスの関連が高く、共発現度が高い遺伝子 16 個を候補遺伝子とした。

次に、候補遺伝子の欠損により、候補遺伝子の貪食作用への関与を調べるために、ゲノム編集酵素 CRISPR/Cas9 と候補遺伝子のガイド RNA をマクロファージ細胞株に導入した。16 遺伝子のうち、10 遺伝子を調べることができ、その中で、CCDC162、CXCL2、FAM214A、HCK、KAT8、MMP19、TBC1D4 の 7 遺伝子が貪食に関与していることが示唆された。CCDC162 と FAM214A は貪食への関与は報告されていなかったが、他の 5 遺伝子はすでに報告されていた。

以上の結果から、貪食に関与する既知および未知の遺伝子が同定できたと考えられることから、本研究方法の有用性が示されたと考えられた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Janewanthanakul Suphamon

細胞が増殖に伴って、その性質を変化させていくことはよく知られている。その性質はまず細胞画像に現れる。しかし、その際に生じる遺伝子発現の変化と、細胞の画像の特徴の変化や貪食作用の変化などの細胞の表現系の変化の関連はよくわかっているとは言えない。本研究では、貪食能力の表現系と関連した1細胞トランスクリプトームデータから、貪食能力と関係する遺伝子を抽出することを試みた。抽出された候補遺伝子は、ノックアウトを試みることで、貪食作用に関与しているかどうか検証した。このような研究は、ある表現系に関連する遺伝子を、既知および未知遺伝子を問わず、網羅的に同定する上で、重要である。

本研究の第一の発見は、重み付き遺伝子共発現ネットワーク解析(WGCNA)を1細胞トランスクリプトームデータに適用し、貪食作用と関連する候補遺伝子を同定することに成功したことである。WGCNAは広く用いられる手法であるが、マクロファージの1細胞トランスクリプターデータに対して、貪食作用との関連で、用いられた例はなく、1細胞トランスクリプトームデータに対するWGCNAの有用性を初めて報告した。

本研究の第二の発見は、候補遺伝子のノックアウトを試み、実際に候補遺伝子が、貪食作用に関与していることを強く示唆したことである。候補遺伝子には、すでに貪食に関与することが示されていたものが、多く含まれている一方で、機能未知の未解析の遺伝子も含まれ、本手法が、ある表現系に関与する未同定の遺伝子を探索することができることを示した。

以上のように、本論文の研究で見出した未解析の遺伝子を含む遺伝子群は、貪食作用に関与する可能性が高いと考えられる。本論文の研究は、この遺伝子の同定の方法論を含めて、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】