

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	笠 原 秀 範
論文審査担当者	主 査	内科学	岡 本 真一郎	
	外科学	黒 田 達 夫	皮膚科学	天 谷 雅 行
	微生物学・免疫学	本 田 賢 也		
学力確認担当者：			審査委員長：黒田 達夫	
			試問日：平成30年 1月30日	
(論文審査の要旨)				
論文題名：Generation of alloantigen-specific induced-Treg stabilized by vitamin C treatment and its application for prevention of acute graft versus host disease model (ビタミンCによる安定的な誘導型制御性T細胞の作成と急性移植片対宿主病モデルでの予防への応用)				
<p>制御性T細胞 (Regulatory T cell; Treg) 移入療法は、同種移植における急性移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) に対する治療法として期待されている。Tregのマスタ転写因子 Forkhead Box P3 (Foxp3)の発現を人為的に誘導することでナイーブT細胞より試験管内で作成される誘導性Treg (induced Treg; iTreg) は抗原特異的かつ大量に作製できるが、Foxp3の発現が不安定であるとされてきた。本研究はDNA脱メチル化酵素 Ten Eleven Translocation (TET) の酵素活性を高めるビタミンC (VitC) の添加により Treg specific demethylated region (TSDR) を選択的にDNA脱メチル化し、iTregにおいてFoxp3を安定的に発現させ、その移入が急性GVHDモデル対して有効であることを示した。</p> <p>審査では、まずVitCに注目した理由を問われた。iTregのFoxp3安定性に転写遺伝子導入やヒストン脱アセチル化阻害剤の添加を試したがFoxp3安定性には無効で、脱メチル化の試薬として以前から知られる5-azacytidineも細胞毒性が強いため、最近のVitCとTETに関する論文を参考に選択したと回答された。またVitCの生化学的作用機序とFoxp3安定化以外の効果についてを問われた。これに対し、VitCの脱メチル化の作用機序はまだ完全に解明されているわけではないが、TETがDNA脱メチル化作用を起こす際にFe²⁺を必要とし、その際VitCがFe³⁺をFe²⁺に還元する働きがあるが他の効果については検討が必要であると回答された。次にFoxp3を発現しなくなったiTreg (exTreg) はどのような細胞性質を持っているか、また移入後にそれが出現することで副作用はないのかを問われた。これに対し、移入後のexTreg細胞でいくつか検討した炎症性サイトカインは転写因子レベルで上昇していなかったが、網羅的に遺伝子解析することでさらなる情報が得られることを期待できると回答された。さらにマウス生体内に移植した後のエピジェネティックな状態について説明を求められた。これに対し、移植後1週間で生体内から回収したiTregはVitCを用いたかどうかに関わらず脱メチル化を保っており、脱メチル化されたものだけが生体内でFoxp3発現を維持するものと推測されると回答された。次に、ヒトの系ではマウスに比べるとVitCによる脱メチル化の効果が弱いのではないかと問われた。これに対し、技術的な問題でヒトではFOXP3 lowな分画も含めて回収したが、FOXP3 highの部分だけを回収できるマーカーの発見が今後待たれると回答された。またヒトでの臨床応用のための細胞作製は同様の系で可能かを問われた。細胞源としてはヒトの末梢血から十分確保できるが誘導後にFOXP3 highの分画だけを集めてくるための手法の開発が必須であると回答された。最後に実際にヒトに移入する段階で課題はないかを問われた。細胞調整に時間を要することと細胞寿命に限界があるため繰り返しいつでも準備できるように培養方法および保存方法の検討を要すると回答された。</p> <p>以上、本研究には今後さらに検討すべき課題が残されているものの、VitCにより安定な抗原特異的iTregを誘導できることを示した本研究は、急性GVHDを含めた過剰な免疫応答に基づく疾患などにおける細胞免疫治療法の改善に貢献し得る点で、有意義な研究であると評価された。</p>				