

要 約

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	染 谷 和 江
主 論 文 題 名				
Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation (TET酵素誘導および活性化によるCNS2脱メチル化を介したFoxp3安定性の改善)				
(内 容 の 要 旨)				
<p>誘導性制御性T (induced regulatory T : iTreg) 細胞は試験管内において大量に産生可能であるため、免疫寛容を促すツールとして様々な免疫疾患治療への応用が期待されている。しかし、iTregは生体の中で発生する胸腺由来のTreg (tTreg) と異なり、マスター転写因子である<i>Forkhead box P3 (Foxp3)</i> 遺伝子の発現が不安定である。これは、iTregでは<i>Foxp3</i>遺伝子のconserved non-coding sequence 2 (CNS2) 領域におけるCpG配列のDNA脱メチル化が起これないためと考えられている。iTregの不安定性はiTregを用いた養子免疫治療の確立における大きな障害となっている。</p> <p>そこで我々は、iTregにおいてCNS2領域のDNA脱メチル化を介したFoxp3発現の安定化を目的として、5-メチルシトシンの脱メチル化反応を触媒するten-eleven translocation (TET) タンパク質の酵素活性ドメイン (catalytic domain : CD) を、レトロウイルスベクターを用いて過剰発現させた。コントロールベクター感染iTregに比べ、TET-CD過剰発現iTregではCNS2領域の部分なDNA脱メチル化が促進され、<i>in vitro</i>および<i>in vivo</i>においてFoxp3はより安定的に発現維持されることがわかった。また、Naïve CD4⁺ T細胞をRag2欠損マウスへ移入することで誘発される大腸炎モデルにおいて、TET-CD過剰発現iTregはコントロールベクター感染iTregよりもより効果的に腸炎を抑制することが確認された。</p> <p>次に我々は、iTregにおける内在的なTETの発現を促進させる方法の確立を試みた。TETタンパク質には、TET1、TET2およびTET3の3種類のアイソフォームが存在する。我々は、低酸素 (O₂ 5%) 培養条件下において、すべてのTET発現が増強されるとともに、CNS2領域のDNA脱メチル化がTET2/3依存的に促進され、さらに、Foxp3の発現が<i>in vitro</i>および<i>in vivo</i>において安定的に保持されることを発見した。</p> <p>また、TETタンパク質の触媒活性は、ビタミンC処理により増強されることが解っている。そこで我々は、iTregの誘導時における低酸素条件およびビタミンC処理による相乗効果を調べた。その結果、それぞれ単独の誘導条件よりも、低酸素条件およびビタミンC処理により誘導されたiTregの方がCNS2領域のDNA脱メチル化がより促進され、さらに、<i>in vitro</i>および<i>in vivo</i>両方においてFoxp3発現の安定性がより保持されることがわかった。また、Rag2欠損マウスを用いた大腸炎モデルにより各種iTregの抑制効果を比較したところ、低酸素条件およびビタミンCによって誘導されたiTregは、ビタミンC処理のみで誘導されたiTregまたは通常のiTregよりも腸炎を効果的に抑制することがわかった。</p> <p>以上により、TETタンパク質の誘導とその酵素活性の増強によって<i>in vitro</i>において安定なiTregの産生が可能であること、さらにこれらの方法で作成されたiTregは生体での炎症性疾患の強力な治療効果を有することが示された。</p>				