

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	赤 松 政 彦
論文題目	Conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3-expressing Treg cells by inhibition of CDK8/19 (CDK8/19 阻害による抗原特異的エフェクターメモリーT 細胞から Foxp3 を発現する制御性 T 細胞への変換)		
(論文内容の要旨)			
<p>forkhead box protein 3 (Foxp3)を発現する制御性 T 細胞(Treg)は免疫応答を抑制的に制御する機能を持ち、免疫自己寛容や免疫恒常性の維持に重要な役割を有する。Treg は、主に、胸腺で発生し抑制機能を持つようになった内因性 Treg (nTreg) と末梢で TGF-β の作用によってコンベンショナル T 細胞(Tconv)から分化した誘導性 Treg (iTreg) に分類される。自己免疫疾患、アレルギー、移植時拒絶反応等において、病因抗原や抗原に応答する Tconv から iTreg の分化を誘導することができれば、病因抗原による免疫応答を選択的に抑制しうる革新的な免疫抑制薬の創成への応用が期待される。しかし、TGF-β を作用させることでナイーブ Tconv から iTreg を誘導することはできるが、抗原暴露を受けたエフェクターメモリーTconv からの iTreg 誘導は難しい。また、TGF-β の作用で誘導された iTreg は機能的な安定性が低いことが示されている。本研究では、上記の課題を克服するため、ナイーブ Tconv、エフェクターメモリーTconv のいずれからも TGF-β に依存せずに iTreg を誘導し得る化合物の探索を行った。</p> <p>約 5000 の低分子化合物に対して、Tconv における Foxp3 発現誘導を指標とした化合物スクリーニングを実施した。その結果得られた AS2863619 (AS)は抗原刺激を受けた Tconv において、TGF-β に非依存的に Foxp3 を誘導する活性を示した。AS はナイーブ Tconv、エフェクターメモリーTconv いずれに対しても作用を示し、炎症性サイトカインの存在下でも Foxp3 を誘導可能であった。AS を用いて誘導した iTreg は TGF-β で誘導した iTreg と同程度の抑制機能を示した。</p> <p>アフィニティー精製検討により、AS の結合分子候補として CDK8 と CDK19 が得られた。AS アナログを含めた複数の化合物を評価したところ、CDK8/19 に対する阻害活性は Foxp3 誘導活性と相関を示した。Tconv における CDK8/19 のノックダウンや kinase dead 型 CDK8/19 の過剰発現によって Foxp3 が発現誘導された。さらに、CDK8 の基質として知られている STAT5 のセリンリン酸化について検討したところ、AS による Foxp3 誘導と相関してセリンリン酸化が抑制されていた。また、AS を作用させると STAT5 の Foxp3 遺伝子のエンハンサー領域への結合が増加した。STAT5 S730A 変異体の過剰発現によって Foxp3 誘導が促進された。以上より、CDK8/19 阻害によって Foxp3 が発現誘導され、その作用には STAT5 セリン酸化制御が関与していると考えられた。</p> <p>次に、DO11.10TCR がノックインされた RAG2KO マウスに対して AS 投与を実施した際の Treg 誘導について検討を行ったところ、DO11.10TCR 陽性 T 細胞における Foxp3 発現誘導が OVA 免疫時にのみ確認された。本マウスには nTreg が存在せず、OVA 免疫時の AS 投与により誘導される Treg は末梢で誘導された pTreg と考えられる。AS で誘導された pTreg を単離し、nTreg において特異的に脱メチル化している領域(TSDR)の DNA メチル化状態について検討したところ、Foxp3, Helios 遺伝子上の TSDR において安定な機能を有する nTreg と同様の脱メチル化が認められ、抑制機能も nTreg と同様であった。以上より、AS 投与によって安定で抑制機能を有する pTreg を抗原刺激に依存的</p>			

<p>に誘導し得ると考えられた。</p> <p>接触過敏症マウスモデルを用いて、AS 投与時の治療効果の検討を行ったところ、AS 投与によって皮膚症状が抑制され、また、IFNγ 産生細胞浸潤が抑制された。さらに、AS 投与によって認められた薬効は Treg の除去によって解除された。その他、自己免疫性糖尿病マウスモデル、自己免疫性脳脊髄炎マウスモデル等においても AS 投与による治療効果が認められた。</p> <p>本研究により、従来課題となっていた iTreg 誘導が難しい条件においても CDK8/19 を阻害することでその克服が可能になることを示した。さらに、CDK8/19 阻害薬の投与によって、抑制機能を有する pTreg を抗原刺激依存的に誘導し得ること、また、各種炎症疾患モデルを用いて治療効果が認められることを示した。本成果は、Treg 誘導性の免疫制御薬として多様な炎症性疾患の治療に応用し得ると期待される。</p>			
<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>本研究では、抗原刺激を受けたコンベンショナル T 細胞（Tconv）から誘導性制御性 T 細胞（iTreg）の誘導を目指して化合物スクリーニングを実施し、TGF-β に非依存的に Foxp3 を誘導する活性を示す AS2863619 (AS)を得た。AS はナイーブ Tconv、エフェクターメモリーTconv いずれにも作用し、炎症性サイトカインの存在下でも Foxp3 を誘導可能であった。AS を用いて Foxp3 発現を誘導した iTreg は TGF-β で誘導した iTreg と同程度の抑制機能を有していた。AS の標的分子探索を実施し、AS が CDK8/19 のキナーゼ活性を阻害することで Foxp3 を発現誘導していることを明らかにした。さらに、AS と IL-2 が相乗的な Foxp3 誘導作用を示したことに着目して解析を進め、CDK8/19 阻害による Foxp3 誘導に STAT5 活性化が関係していることを示した。</p> <p>マウスへの投与実験で、AS が抑制機能を有する末梢誘導性 Treg を抗原刺激依存的に誘導し得ること、また、各種炎症疾患モデルにおける治療効果を有することを示した。本成果より、CDK8/19 阻害薬は Treg 誘導を機序とする免疫制御薬として多様な炎症性疾患の治療に応用し得ると期待される。</p>			
<p>以上の研究は誘導性 Treg の分化制御機序の解明に貢献し、誘導性 Treg の分化促進を機序とする薬物治療法の開発に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 3 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。</p>			

要旨公開可能日： 年 月 日 以降