

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21125

研究課題名(和文) 制御性T細胞に対する低酸素環境の影響

研究課題名(英文) The effect of hypoxia on regulatory T cells

研究代表者

三上 統久(Mikami, Norihisa)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教

研究者番号：20710388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では低酸素応答のTregへの影響をiTregとnTregそれぞれのサブセットに分けて解析した。iTregに対しては低酸素がFoxp3の発現を著しく抑制することを示した。一方でnTregは低酸素に対して安定であり、むしろTim3やCD103といった活性化Tregマーカーの発現増強が認められた。これらの結果は低酸素応答を担うHIF分子を欠損したマウスでも確認できており、HIF1欠損TregではTim3やCD103といった分子の発現低下が見られた。このマウスでは抗原免疫時のメモリーB細胞産生が促進されており、HIF1依存的な免疫制御の存在が証明された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to reveal the effect of hypoxia on each Treg subset, iTreg and nTreg cells. In iTreg development, hypoxia inhibits Foxp3 expression in vitro stimulation. On the other hand, nTreg Foxp3 expression is resistant to hypoxia. Furthermore, activation markers CD103 and Tim3 are up-regulated in nTreg cells under hypoxia condition. This finding can be confirmed in vivo experiments using HIF1 cKO mice. HIF1 cKO nTreg cells show reduced level of CD103 and Tim3 expression after antigen immunization. In the settings, large number of memory B cells are observed in HIF1 cKO mice. These results demonstrate the importance of hypoxia and HIF1 in nTreg cells during immunological memory formation.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー制御において重要な細胞である制御性 T 細胞 (regulatory T cells : Treg) は定常状態においても免疫恒常性の維持に重要な役割を果たすヘルパー T 細胞 (Th 細胞) のサブセットであり, Treg の特徴的な分子である Foxp3 の変異や CTLA-4 の欠損は自発的な全身性自己免疫疾患を引き起こす。さらに近年では Treg が炎症組織 (皮膚, 筋肉など) や腫瘍組織へと浸潤し, 免疫応答の制御を介して様々な生理現象に影響を与えている可能性も示されてきた。これらの知見は Treg が末梢血中や二次リンパ組織のみならず多様な組織環境において機能を発揮していることを示唆している。

一方で炎症組織や腫瘍組織はその高い細胞密度などによって低酸素環境となっている。つまり Treg をはじめとする免疫細胞の低酸素環境における機能を明らかにすることは炎症性疾患や抗腫瘍免疫の全容解明において不可欠といえる。しかしながら低酸素環境が Treg に与える影響については研究が限定的かつ不十分であり, 生理的な意義や詳細な分子機序に関しても不明な点が多い。過去の報告でも *in vitro* における検討が中心であり, さらに Treg 特異的転写因子である Foxp3 の発現・分解と HIF-1 分子の関連については抑制的に働くという報告と (*Cell*. 2011, 146: 772) 促進的に働くという報告 (*PNAS*. 2012, 109: E2784) が両方存在しているなど, いまだ明確な結論は出ていない。

このような Treg と低酸素環境の影響を評価する上で重要な点のひとつは Treg の集団として胸腺由来の natural Treg (nTreg) と末梢でナイーブ T 細胞から分化する inducible Treg (iTreg) とを明確に区別して考えることである。特に iTreg に関しては一般的な *in vitro* での誘導では生理的な Treg との間に Foxp3 の安定性やエピ

ゲノムの状態など大きな違いがある。つまり, Treg における低酸素応答の違いを正確に理解するためにはこれらの細胞集団をそれぞれ明確に分けて考える必要があった。

## 2. 研究の目的

### 低酸素環境が iTreg の分化および機能に与える影響

まず過去の報告において結論が分かれている iTreg 誘導時の Foxp3 発現に対する低酸素環境の影響を明確にする。さらに Foxp3 の発現以外にも Treg の機能に関わる分子やエピゲノムの変化などを調べることでナイーブ T 細胞が低酸素環境においてどのように iTreg へと変化するのかを明らかとすることで, 未だ全く明らかとなっていない炎症部位における生理的な iTreg 誘導についての仮説を提示する。

### 低酸素環境が nTreg の機能や活性化に与える影響

*In vitro* で作製された iTreg と生体内に恒常的に存在する nTreg では Foxp3 の発現こそ類似しているものの, 転写因子の活性化やエピゲノムの状態など性質的には大きく異なる細胞集団である。しかし, 過去の低酸素環境と Treg の研究ではこれら二つの細胞集団の特徴の違いを理解して行われている研究がない。そこで iTreg に対する影響と同様に生体内で発生した nTreg に対する低酸素環境の影響も抑制能や機能的分子の発現などあらゆる面から明らかにしていく。

### 生体内における Treg の機能と低酸素応答および HIF-1 分子の関連 (HIF-1-cKO マウスの解析)

Treg による活性化 T 細胞の免疫応答抑制機構は多く提唱されているがそれぞれ

の重要性については不明な部分も多い。そして生体内の低酸素環境において Treg がどのような影響を受けるのか、また、低酸素応答における最重要因子である HIF-1 が Treg の機能においてどの程度の重要性や生理的な意義を持っているのかは明らかとなっていない。そこで Treg 特異的に HIF-1 分子を欠損させたマウスを作製し、その表現型を解析することで Treg と低酸素応答、HIF-1 分子の生理的な関連について明らかとしていく。

### 3. 研究の方法

iTreg の分化に対する影響に関してはマウスナイーブ Th 細胞を TGF- $\beta$  存在下で刺激し、低酸素環境下で培養後に Foxp3 を始めとする様々な分子の発現を評価することで明らかとする。エピゲノムについてはバイサルファイトシーケンス法による評価を行う。

生体内から精製した nTreg を低酸素環境下で刺激した際の応答性も同様に評価する。

In vivo の解析として、Treg 特異的 HIF-1 欠損マウスを作製し、表現型解析を行う。モデルとして OVA を免疫することによる抗体反応評価系を用いる。

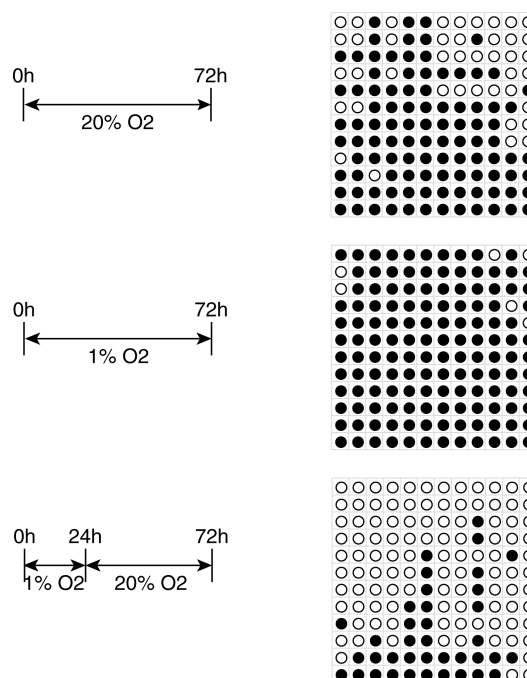
### 4. 研究成果

#### 低酸素環境が iTreg の分化および機能に与える影響

iTreg 分化誘導時に低酸素状態にした結果、Foxp3 陽性細胞の誘導は強く抑制された。一方で後述する通り nTreg については低酸素培養を行っても Foxp3 の発現に変化は見られなかった。この結果は iTreg と nTreg では低酸素に対する反応性が異なる事を示唆している。

一方で興味深い発見として、限定的な低酸素条件下で培養した iTreg では Treg 特異的脱メチル化の促進が確認できた(図 1)。

また、この現象については HIF1 欠損 T 細胞でも同様に認められたことから低酸素依存性かつ HIF1 分子非依存性であることも確認した。以上の結果は低酸素応答と HIF1 分子の機能は iTreg において非常に複雑かつ多様な制御を担っており、さらなる詳細な解析が必要である事を示唆している。

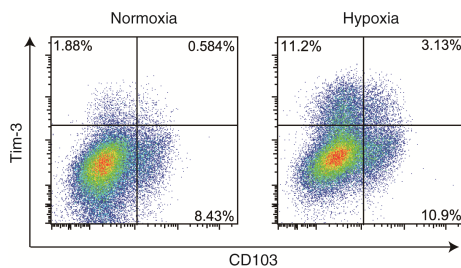


**図 1. 低酸素応答が Foxp3 CNS2 脱メチル化に与える影響**

Foxp3CNS2 領域の CpG 脱メチル化をバイサルファイト法で評価。●：メチル化、○：脱メチル化。

## 低酸素環境が nTreg の機能や活性化に与える影響

本研究の重要な発見のひとつとして nTreg に対する低酸素環境の与える分化促進作用がある。先述の通り nTreg は低酸素環境において安定に Foxp3 を維持しているが、それだけではなく CD103 や Tim3 といった最終分化マーカーの発現促進を発見した(図 2)。これらのマーカー分子が発現する機序は今まで不明であり、この発見から低酸素状態において Treg が強く活性化し、組織 Treg に見られるような最終分化状態を呈することが明らかとなった。また、この現象は Acetate などメタボライトの添加によっても再現でき、低酸素応答、HIF1 分子の機能のひとつとして代謝系の制御が Treg の活性化に重要な役割を担っていることも示唆された。



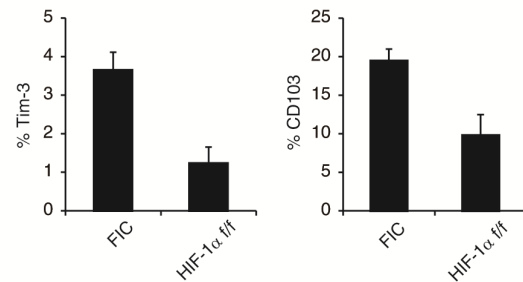
## 図 2, 低酸素応答が Tim3, CD103 発現に与える影響

nTreg における Tim3, CD103 の発現を刺激 72 時間後に FCM 法にて解析。

## 生態内における Treg の機能と低酸素応答および HIF-1 分子の関連 (HIF-1-cKO マウスの解析)

最後に In vivo における HIF1 依存的な Treg 低酸素応答を評価した。 において明らかとなった通り、Treg における Tim3 陽性細胞の割合は HIF1 欠損マウスで低下し

ていた(図 3)。また、この cKO マウスでは OVA 免疫時のメモリー B 細胞の成立が増加しており、HIF1 依存的な Treg の分化もしくは機能が B 細胞反応の抑制に寄与していることが示された。



## 図 3, HIF1 欠損が Treg に与える影響

HIF1 欠損 nTreg における Tim3, CD103 の発現を FCM 法にて解析。

以上のように本研究で Treg をそれぞれのサブセットに分類しながら低酸素応答を評価した結果として包括的な結論が得られている。特に nTreg への影響として、終末分化を促進し、生理的に免疫応答の抑制に寄与するという結果は炎症病態の制御に向けて重要な知見と考えている。現在、これらの結果をまとめた論文の投稿を準備中である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三上統久（京都大学・ウイルス再生研・  
特定助教）

研究者番号： 20710388

### (2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

### (3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：

### (4) 研究協力者

（ ）