

機関番号：10107

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591181

研究課題名 (和文)

低酸素応答装置による免疫細胞機能調節機構の解明と新規抗炎症療法の開発

研究課題名 (英文)

Mechanism of regulation of immune response by hypoxia-inducible factors and its therapeutic application to inflammatory diseases

研究代表者

牧野 雄一 (MAKINO YUICHI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：90345033

研究成果の概要 (和文)：免疫系細胞機能制御におけるHIF-1およびHIF-1-IPAS 相互作用をはじめとする低酸素シグナルの役割を明確にするとともに、低酸素応答装置を標的とする新たな抗炎症療法、免疫制御法開発の基盤を確立することを目的として展開された。HIF-1 $\alpha$ 発現が、細胞環境の酸素濃度のみならず、糖濃度やサイトカインなどによって制御されていることを解明した。また、HIF-1経路の抑制により、動物モデルにおける自己免疫性関節炎が改善することを明らかにし、低酸素シグナルをターゲットとする抗炎症療法の有用である可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：This study was performed to elucidate the role of hypoxia-inducible factors in regulation of immune cell functions and to develop a novel therapeutic approach for inflammatory diseases by targeting the hypoxia-inducible factors. We demonstrated that the expression of HIF-1 $\alpha$  was regulated not only by local oxygen tension but also by glucose level and cytokines. Expressed HIF-1 $\alpha$  critically contributed to the regulation of the cellular functions. Inhibition of HIF-1 signals in vivo resulted in amelioration of autoimmune arthritis model in mice, indicating that the hypoxia-inducible factors are possible therapeutic targets for inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー学

キーワード：低酸素、HIF-1、炎症細胞、関節炎、IPAS

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト体内における酸素濃度には、明らかな組織・臓器間差が存在するとともに、睡眠等の生理活動、運動などによって、各組織における酸素分圧は広いレンジ

で変動する。リンパ球、単球/マクロファージなどの免疫細胞は、生体内を広く移動し、異なる酸素環境間を往来する。さらに、炎症組織・腫瘍組織など、免疫細胞が機能する場においては、酸素分圧

が著しく低下していることが知られており、炎症細胞が低酸素環境への適応装置を有することの必然性は高い。低酸素によって活性化される転写因子 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)は、basic helix-loop-helix (bHLH)-Per-Arnt-Sim (PAS)型蛋白である HIF-1 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットからなるヘテロ二量体であり、各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増殖因子 (VEGF)、造血因子エリスロポイエチンなど、多くの遺伝子の発現を転写レベルで制御し、細胞から組織・個体にいたる全てのレベルの低酸素適応に重要な役割を果たしている。多くの基礎的、臨床的解析により、HIF-1が、がんや虚血性臓器障害など低酸素が関与する疾患・病態の成立に関わることが示され、かかる疾患の新たな治療標的としての可能性が注目されている。HIF-1活性の低酸素誘導性はHIF-1 $\alpha$ サブユニットが担っている。

最近、HIF-1 $\alpha$ の遺伝子破壊動物において、リンパ球系細胞の分化、骨髄球系細胞の機能異常が見いだされた他、関節リウマチ滑液中マクロファージでの HIF-1 $\alpha$ 発現異常などが報告されている。HIF-1は、低酸素環境における免疫細胞のエネルギー産生の維持などに密接に関わり、免疫細胞制御において重要な役割を果たすことが示唆されているが、不明な点を多く残している。申請者らは、HIF-1 $\alpha$ が、皮膚筋炎患者の皮膚病変、関節リウマチ患者滑膜などに浸潤しているT細胞に強く発現していることを突き止め、組織間質など低酸素環境下のT細胞において HIF-1 $\alpha$ が細胞活性化刺激依存性に発現し、活性型T細胞によるサイトカイン産生、T細胞のアポトーシスを制御することを明らかにした。さらに、かかる HIF-1 $\alpha$ 発現には、T細胞受容体刺激に引き続くPI3キナーゼ、mammalian target of rapamycin(mTOR)依存性のシグナル伝達系を介した HIF-1 $\alpha$ 蛋白の翻訳制御が重要であることを示した。一方、単球、マクロファージ系細胞においても、やはり活性化刺激依存性の HIF-1 $\alpha$ 発現増強機構が存在

する事を見いだした。すなわち、活性型免疫細胞機能あるいは局所の免疫応答の制御において、HIF-1 $\alpha$ による細胞内シグナルが、重要な役割を果たしている可能性を強く示唆する結果である。

一方、IPASはHIF-1 $\alpha$ への直接結合により HIF-1と標的遺伝子との結合を阻害する分子であり、かつてない機構で HIF-1機能を抑制する内因性装置として期待される。実際、申請者らは、IPASおよびIPASの構造を模倣した bHLH/PAS型蛋白をリンパ球内に発現させることにより、リンパ球における低酸素応答性遺伝子発現を抑制しうることを確認した。また、IPASトランスジェニックマウスでは、全身性に HIF-1標的遺伝子発現が抑制され、創傷治癒が遅延する事を示した。IPAS発現の人為的制御により、HIF-1機能を制御しうる可能性が高く、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、免疫系細胞機能制御における HIF-1 および HIF-1-IPAS 相互作用をはじめとする低酸素シグナルの役割を明確にするとともに、低酸素応答装置を標的とする新たな抗炎症療法、免疫制御法開発の基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- i) 免疫細胞における HIF-1 $\alpha$ 発現制御機構の解析
  - ①免疫細胞における HIF-1 $\alpha$ 遺伝子、蛋白発現とその制御機構の解析
  - ②疾患モデル動物における HIF-1 $\alpha$ 発現の解析
- ii) 免疫細胞における HIF-1 $\alpha$ 発現の意義の究明
  - ①低酸素が免疫細胞機能に与える影響の解明
  - ②免疫細胞における遺伝子発現様相の解析
  - ③低酸素非依存性に HIF-1 $\alpha$ を発現させた際の免疫細胞機能の解析
  - ④恒常的活性型 HIF-1 $\alpha$ 、優勢抑制型 HIF-1 $\alpha$ 、HIF-1 $\alpha$ 拮抗分子IPAS発現細胞での解析
- iii)免疫細胞における HIF-1 $\alpha$ システムの人

為的調節と疾患治療の試み

- ①HIF-1 $\alpha$ 発現に影響を与える薬剤のスクリーニング
- ②抗 HIF-1 分子 IPAS の発現誘導による HIF-1 機能抑制法の確立
- ③レンチウイルスシステムによる免疫細胞での HIF-1 $\alpha$ 活性の調節

#### 4. 研究成果

##### i) 免疫細胞における HIF-1 $\alpha$ 発現制御機構の解析

間葉系細胞 (MES-13) と免疫系細胞 (THP-1) との比較で解析した。THP-1 細胞においては正常酸素分圧下では LPS、PMA 刺激下でも HIF-1 $\alpha$ の発現は認められなかったが、低酸素分圧下では、LPS、PMA 添加により相乗的に HIF-1 $\alpha$ 発現が亢進した。高グルコース培地でも同様に低酸素下で相乗的な HIF-1 $\alpha$ 発現増強が見られた。一方、間葉系細胞では、高グルコースによる HIF-1 $\alpha$ 発現増強が顕著であり、正常酸素分圧下においても HIF-1 $\alpha$ 発現を誘導した点で免疫系細胞とは異なっていた。高グルコースによる HIF-1 $\alpha$ 発現増強には、グルコース応答性転写因子 ChREBP が介在していた。免疫系細胞は、間葉系細胞に比し、グルコース誘導性 ChREBP 発現が低い傾向にあったが、P53 の強制発現により ChREBP の発現は増強した。P53 は、従来より、直接に HIF-1 $\alpha$ 発現を制御することが示されていたが、本研究では ChREBP を介した新たな発現誘導機構が存在することが示された。

##### ii) 免疫細胞における HIF-1 $\alpha$ 発現の意義の究明

ヒト末梢血単核球 (PBMC) を分離し、酸素濃度 21% の正常酸素濃度条件下、酸素濃度 1% の低酸素条件下で 5 時間培養後、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および ionomycin による刺激を行い、それぞれの酸素条件下でさらに 24 時間培養し上清を回収した。培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法にて測定した。PMA/ionomycin は正常酸素濃度下の PBMC において IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ の産生を亢進させた。低酸素条件下の PBMC はいずれのサイトカインも正常酸素下に比べて 2 倍以上の産生能を示

した。同じ条件下の PBMC における HIF-1 $\alpha$ 発現をウエスタンブロット法にて解析した結果、低酸素下で PMA/ionomycin 刺激した場合でのみ、HIF-1 $\alpha$ が発現しており、免疫細胞のサイトカイン産生等の機能には、HIF-1 $\alpha$ 発現が密接に関与してしていることが示された。すなわち、低酸素は末梢の活性型リンパ球の HIF-1 発現/活性制御を介して、リンパ球の寿命のみならず、機能も制御し、炎症の制御に積極的に関わっている可能性が示唆された。低酸素は Th1、Th 2 いずれのサイトカインの産生も増強させたことより、広く免疫の活性化に関わる可能性がある。

##### iii) 免疫細胞における HIF-1 $\alpha$ システムの人為的調節と疾患治療の試み

HIF-1 拮抗分子 Inhibitory PAS domain protein (IPAS) を高発現するマウス (IPAS Tg マウス) は HIF-1 機能低下モデルマウスである。IPAS Tg マウスを用いて炎症性疾患モデルである抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) マウスを作成し、HIF-1 抑制が炎症制御に及ぼす影響について解析した。IPAS Tg マウスおよび対照マウスに Arthrognen-CIA mAb<sup>®</sup> 5mg を尾静脈より投与し、4 日後に lipopolysaccharide 50 $\mu$ g を腹腔内に投与した。さらに 7 日後の四肢関節炎の理学的/組織学的評価を行った。対照マウス群では四肢関節炎の発症率は 95% 以上であったのに対し、IPAS Tg マウスでは 50% 以下に抑制されていた。関節炎病理像をスコア化しておこなった関節炎の重症度評価では、IPAS Tg マウスにおける関節炎重症度スコアは対照マウスの 40% に留まっていた。IPAS Tg マウスにおいては胸腺、脾臓などの免疫組織において HIF-1 標的遺伝子の発現が抑制されていた。すなわち、生体における HIF-1 抑制が、炎症性疾患の治療に有用である可能性が示された。

#### 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 8 件)

1) Toshiharu Yamashita, Osamu Ohneda,

Masumi Nagano, Motoyuki Iemitsu, Yuichi Makino, Hirotohi Tanaka, Takashi Miyauchi, Katsutoshi Goto, Kuniko Ohneda, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Lorenz Poellinger, and Masayuki Yamamoto  
Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking a HIF-related bHLH-PAS protein NEPAS  
(査読有り) *Mol. Cell. Biol.*, 28:1285-1297(2008)

2) Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, Sakagami H, Fujita Y, Honjo J, Takiyama Y, Itoh H, Haneda M.  
High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction via carbohydrate response element binding protein in glomerular mesangial cells  
(査読有り) *Kidney Int.* 78: 48-59, 2010

3) Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, Fujita Y, Honjo J, Shimizu N, Makino Y, Haneda M.  
Tubular Injury in a Rat Model of Type 2 Diabetes Is Prevented by Metformin: A Possible Role of HIF-1 $\alpha$ ; Expression and Oxygen Metabolism.  
(査読有り) *Diabetes.* 60:981-992. 2011

4) 牧野雄一、岡本健作、羽田勝計 レドックスシグナルと酸化ストレス応答の分子機構を探る  
(査読無し)分子消化器病 5: 6-11 (2008)

5) 牧野雄一、羽田勝計 低酸素による炎症・免疫制御-HIF-1と炎症・免疫  
(査読無し) 医学のあゆみ 225: 7203-7207, (2008)

6) 牧野雄一、羽田勝計 転写因子と糖尿病性腎症  
(査読無し) 月刊糖尿病 1: 50-58 (2009)

7) 牧野雄一、磯江つばさ、羽田勝計 高血糖による遺伝子発現異常と腎障害  
(査読無し) アンチ・エイジング医学-日本抗加齢医学会雑誌 5: 196-200 (2009)

8) 炎症制御における低酸素誘導性転写因子群の役割  
牧野雄一、羽田勝計  
(査読無し) 外科と代謝・栄養 44: 225-227, (2009)

[学会発表] (計 20 件)

1) 磯江つばさ 他  
高グルコース下培養メサンギウム細胞では

hypoxia-inducible factor (HIF) が活性化されその標的遺伝子発現が亢進する  
第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会 2008 年 5 月 22-24 日、東京都、東京国際フォーラム

2) Tsubasa Isoe et al.  
High Glucose Activates the Hypoxia-inducible Factors (HIFs)-Mediated Signal Transduction in Human Glomerular Mesangial Cells  
American Diabetes Association 68<sup>th</sup> Scientific Sessions  
2008 年 6 月 6-10 日、San Francisco, USA

3) Makino Y.  
Negative feedback regulation of gene expression in hypoxic cells.  
Invited lecture 7, The 36th Annual Meeting of International Society on Oxygen Transport to Tissue, 2008, Sapporo, Japan

4) 牧野雄一 他  
高グルコースはメサンギウム細胞において HIF-1 を介した転写調節系を作動させる  
第 23 回日本糖尿病合併症学会、2008 年 10 月 3 日-4 日、日本都市センター、東京都

5) 牧野雄一 他  
高グルコースによる HIF シグナルの活性化  
第 6 回がん&ハイポキシア研究会、2008 年 11 月 29-30 日、広島市

6) 牧野雄一 他  
血管新生抑制分子 IPAS によるコラーゲン誘導関節炎の抑制  
第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 23-26 日、東京都

7) 磯江つばさ 他  
高グルコースは転写因子 ChREBP を介してメサンギウム細胞における HIF システムを活性化する  
第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会、2009 年 5 月 21-23 日、大阪市

8) Makino Y, et al  
High glucose activates hypoxia-inducible factor-mediated signals via carbohydrate response element binding protein in human glomerular mesangial cells.  
American Diabetes Association 69<sup>th</sup> Scientific Sessions  
2009 年 6 月 5 日-9 日、New Orleans, USA

9) 牧野雄一  
低酸素応答性転写因子による生体機能調節機構  
日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会

北海道支部・北海道分子生物研究会 2009  
年度合同シンポジウム、2009年11月13日、  
札幌市

10) 牧野雄一

炎症制御における低酸素誘導性転写因子群  
の役割

日本外科代謝栄養学会第46回学術集会、  
2009年7月9日、東京都

11) Makino Y et al

High glucose activates the  
hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$   
(HIF-1 $\alpha$ )-mediated gene expression in  
human glomerular mesangial cells.

The 15<sup>th</sup> Korea-Japan Symposium on  
Diabetes Mellitus, 2009年11月20-21日、  
Jeju, Korea

12) 牧野雄一 他

インスリン依存性糖取込みにおける HIF-1 $\alpha$   
の役割

第7回がんとハイポキシア研究会、2009年  
12月5-6日、京都市

13) Makino Y, et al

Role of hypoxia-independent activation of  
HIF-1 $\alpha$  by high glucose in diabetic  
glomerulopathy

Keystone symposia, Hypoxia: Molecular  
mechanisms of oxygen sensing and  
response pathways

2010年1月19-24日、Keystone, USA

14) 坂上英充 他

骨格筋における HIF-1 $\alpha$ を介したインスリン  
感受性制御機構

第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010  
年5月27-29日、岡山市

15) 牧野雄一 他

糖尿病性腎症糸球体病変における転写因子  
HIF-1の活性化

第3回生活習慣病の転写・シグナルネットワ  
ーク研究会、2010年2月20日、鎌倉市

16) Makino Y et al

The Glucose-Responsive Transcription  
Factor ChREBP Activates HIF-1-Mediated  
Gene Expression in Glomerular Mesangial  
Cells

American Diabetes Association 70<sup>th</sup>  
Scientific Sessions

2010年6月25-29日、Orlando, USA

17) Sakagami H, et al

Knockdown of hypoxia-inducible factor-1

$\alpha$  ameliorates insulin-stimulated  
glucose uptake in the skeletal muscle cells  
46<sup>th</sup> EASD meeting, 2010年9月20-24日、  
Stockholm, Sweden

18) 牧野雄一

低酸素応答性転写因子群による遺伝子発現  
調節機構

第98回北海道癌談話会例会、2010年9月19  
日、札幌市

19) Makino Y et al.

Role of HIF-1 $\alpha$  in regulation of  
insulin-dependent glucose uptake by  
Skeletal Muscle Cells

The 3<sup>rd</sup> Insulin Resistance in Metabolic  
Disease Forum, 2010年11月21日、  
Fukuoka, Japan

20) 坂上英充 他

骨格筋のインスリン感受性制御における  
HIF-1 $\alpha$ の役割

第8回がんとハイポキシア研究会、2011年1  
月29-30日、札幌市

〔図書〕(計1件)

牧野雄一 Hypoxia-inducible factor-1  
(HIF-1)の発現制御 からだと酸素の事典、  
pp198-201, 朝倉書店(2009)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 雄一 (MAKINO YUICHI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：90345033

(2) 研究分担者

小村 景司 (KOMURA KEIJI)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：10396385

(3) 連携研究者

なし