

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591453

研究課題名(和文)免疫細胞制御における低酸素応答性転写因子群の役割の解明と炎症性疾患治療への応用

研究課題名(英文)Role of hypoxia-inducible transcription factors in regulation of immune response and its therapeutic application

研究代表者

牧野 雄一 (Makino, Yuichi)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90345033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症や免疫応答の場でのリンパ球やマクロファージの機能制御における低酸素応答性転写因子(HIF-1)および関連分子が媒介するシグナルの役割を究明し、低酸素応答性転写因子群を標的とする新たな抗炎症療法の開発を目指して展開された。内因性HIF-1機能抑制分子IPASが、自己免疫性関節炎モデルを炎症性血管新生制御以外の経路により抑制する可能性が示され、疾患治療におけるHIF-1経路抑制の有用性が示唆された。一方、単球における新たな低酸素誘導性遺伝子としてヒスタミン4受容体(H4R)を同定した。H4R経路は関節リウマチ治療標的としても注目されており、低酸素が関わる新たな炎症制御機構である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to explore the role of hypoxia-inducible factors in regulation of immune response and to develop a novel therapeutic approach for inflammatory diseases by targeting the hypoxia-inducible factors. We demonstrated that IPAS, an endogenous dominant-negative regulator of HIF-1 alpha, negatively regulates joint inflammation in mouse autoimmune-arthritis model via a mechanism other than suppression of inflammatory angiogenesis, indicating a possible multi-dimensional regulation of the hypoxia-mediated pathology by IPAS in inflammatory diseases. On the other hand, we found histamine 4 receptor as a hypoxia-inducible gene, suggesting a novel mechanism of hypoxia-mediated regulation of immune response.

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・アレルギー内科学

キーワード：炎症 低酸素 単球 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

生体内の酸素濃度は吸入気酸素分圧や血管・血流分布をはじめとする様々な因子により規定され、広いレンジで変動する。たとえばヒトにおける体内の酸素濃度には、気道 150 mmHg、動脈血 100 mmHg、毛細血管や組織レベル 40 mmHg 以下、と大きな組織間差が存在するとともに、睡眠、運動等の生理活動によって、各組織における酸素分圧はさらに変動する。リンパ球、好中球などの免疫細胞は、骨髄、血液から組織間質へと生体内を広く移動し、極端な酸素環境の変動に曝される代表的組織といえる。さらに、免疫細胞が機能する場である炎症組織・腫瘍組織などにおいては、酸素分圧が著しく低下していることが知られている。したがって、リンパ球などの細胞にとって、低酸素をはじめとする環境酸素濃度のダイナミックな変化に適応することは、細胞の機能を維持するうえできわめて重要であるといえる。しかしながら、低酸素がリンパ球の機能・形質に与える影響、あるいはリンパ球の低酸素環境への適応のメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。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 と 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。HIF-1 が、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、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 サブユニットが担っている。最近、HIF-1 の遺伝子破壊動物において、リンパ球の分化、骨髄球系細胞の機能異常が見いだされた。また、HIF-1 が、Toll-like receptor2,4,6 の発現を直接に制御する事、関節リウマチ滑液中マクロファージで HIF-1 の発現異常が見られることなども報告され、自然免疫、獲得免疫のいずれの制御においても HIF-1 が重要な役割を果たしている事が示されている。申請者は、HIF-1 が、慢性炎症組織に浸潤

した 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 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。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 発現増強機構が存在する事を見いだした。さらにごく最近、腎組織における HIF-1 の発現が、局所グルコース濃度により酸素分圧非依存性に制御されることを明らかにした。すなわち、HIF-1 シグナルが、多彩な細胞環境により精緻な制御を受け、活性型免疫細胞機能あるいは局所の免疫応答・炎症の制御において、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、申請者は、自ら発見した HIF-1 機能抑制分子 IPAS を介した生体内 HIF-1 活性の制御法の確立を目指している。IPAS は HIF-1 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。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、抗コラーゲンモノクローナル抗体カクテル誘導関節炎の発症率、組織像が改善することを見いだした。一方、IPAS の発現は、低酸素依存性の遺伝子転写ならびに低酸素依存性選択的スプライシングにより mRNA のレベルで誘導される。低酸素依存性選択的スプライシング機構を標的とした 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いと確信し、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究は、免疫細胞機能制御における低酸素応答装置の役割を明確にすると共に、HIF-1 および関連分子が媒介するシグナルの制御法を確立し、低酸素応答性転写因子群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築くことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 免疫細胞における HIF-1 発現制御機構の解析

免疫細胞における HIF-1 遺伝子、蛋白発現とその制御機構の解析
疾患モデル動物における HIF-1 発現の解析

2) 免疫応答・炎症制御における HIF-1 システムの役割の究明

低酸素が免疫細胞機能に与える影響の解明

恒常的活性型 HIF-1 , 優勢抑制型 HIF-1 , HIF-1 拮抗分子 IPAS が免疫細胞に与える影響の解析

クロマチン免疫沈降 / シーケンス法 (ChIP-Seq) による HIF-1 の標的遺伝子の同定

HIF-1 標的遺伝子が免疫細胞の機能に与える影響の解析

3) 免疫細胞における HIF システムの人為的調節と疾患治療の試み

HIF-1 発現に影響を与える薬剤のスクリーニング

抗 HIF-1 分子 IPAS の発現誘導による HIF-1 機能抑制法の確立

レンチウイルスシステムによる免疫細胞での HIF-1 活性の調節

HIF-1 発現制御化合物の炎症性疾患モデル動物における効果の解析

ウイルスシステムによる HIF-1 機能変化の炎症性疾患モデル動物における効果の解析

HIF-1 ノックアウトマウス、IPAS トランスジェニックマウスの応用

4. 研究成果

1) 免疫細胞における HIF-1 発現制御機構の解析

これまで、THP-1 細胞において、低酸素分圧下の LPS, PMA 添加により相乗的に HIF-1 発現が亢進する事を確認していた。これに対し、今回検討した HL60 細胞では、単球への分化誘導がなければ低酸素分圧下でも HIF-1 発現は認めず、単球に分化後は酸素分圧によらず HIF-1 発現が亢進する事が判明した。HIF-2 については、HL60 細胞では分化誘導の有無、低酸素刺激の有無にかかわらず、発現を認めなかった。一方、HIF-1 機能抑制分子 HIF-3 /IPAS の発現は、分化未誘導 HL60 細胞では恒常的に認められるが、単球へ分化誘導した HL60 細胞では低下していた。すなわち、単球においては恒常的な HIF-1 発現がみられ、HIF-1 機能抑制分子 HIF-3 /IPAS の発現が低く抑えられており、単球が、HIF-1 を介したシグナルが十分に伝達される細胞内環境を維持していることが示唆された。実際、分化誘導 HL60 (単球) では酸素分圧に関わらず、VEGF, GLUT-1, HK2 などの HIF-1 標的遺伝子の発現が亢進していた。単球がその機能を酸素分圧に関わらず維持するメカニズムの一つとして興味深い。

2) 免疫応答・炎症制御における HIF-1 システムの役割の究明

免疫細胞における新たな HIF-1 標的遺伝子の検索を行った。ヒスタミン H4 受容体 (H

4R) は骨髄、末梢白血球に高レベルで発現する他、胸腺、小腸などにも発現する事から、免疫細胞の機能制御に関わる事が注目されている。マスト細胞や好酸球の他、好中球、樹状細胞の動員を引き起こすことが示され、関節リウマチなどの治療薬としての可能性も期待されている。これまで、単球、マクロファージ系での H4R の発現についての解析は多くなされていない。

HL60 細胞由来の単球において、H4R の発現は低酸素により誘導された。かかる低酸素による誘導は IL-6, TNF- α の共存下で相乗的に増強した。しかしながら IL-6, TNF- α それぞれ単独では H4R 発現に影響を与えなかった。一方、THP-1 細胞由来のマクロファージでは H4R の発現はほとんど検出されず、低酸素暴露、サイトカイン添加などによっても誘導されなかった。つづいて、単球における H4R シグナルの役割について解析した。Enolase は HIF-1 の標的遺伝子であるが、関節リウマチ患者血清中でシトルリン化 enolase 抗体が検出されるなど、関節リウマチの病因論的抗原としても注目されている。低酸素下培養の HL60 由来単球において、ヒスタミンは enolase の mRNA 発現を増強させた。H4R 選択的阻害薬の添加によりこの enolase 誘導は是正された。すなわち、単球において HIF-1 は H4R と共同して標的遺伝子発現を制御する可能性が示された。H4R の発現自体が低酸素の制御下にあることから、単球においては H4R を介した低酸素シグナルの正のフィードバック制御機構が存在することが示唆された。

3) 免疫細胞における HIF 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 マウスに Arthrogen-CIA mAb[®] 5mg の尾静脈投与ならびに lipopolysaccharide 50 μ g の腹腔内投与を行い作製した抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) モデルでは、四肢関節炎発症が 50%以下に抑制され、関節炎病理像スコア重症度評価では、対照マウスの 40%に留まることがすでに確認されている。今回、同モデルの滑膜病変における HIF-1 ならびに HIF-1 標的遺伝子 VEGF 発現を検討した。対照の野生型マウスでは、浸潤炎症細胞において HIF-1 が発現し、同細胞での VEGF 発現亢進を認めた。IPAS Tg マウスでは浸潤炎症細胞における HIF-1 発現に変化はなく、また VEGF 発現亢進が必ずしも抑制されないにも関わらず、滑膜増殖は軽減していた。すなわち、IPAS は CAIA モデルにおいては、VEGF 以外の HIF-1 標的遺伝子を抑制し、滑膜増殖を制御している可能性が示された。IPAS の高発現は多彩なメカニズムによって抗炎症作用を発現することが期待さ

れ、内因性の IPAS 発現制御機構の解明は炎症性疾患の治療戦略上重要である。IPAS 発現制御機構のひとつとして低酸素依存性選択的スプライシング機構が示されている。今回 PC12 細胞をモデルにして IPAS 型選択的スプライシング機構を検討した。予備検討において、IPAS 型選択的スプライシングにはイントロン 3 に結合するスプライシング因子 KSRP が重要であることを確認していた。PC12 細胞では、KSRP が他のスプライシング因子との相互作用を酸素分圧により変化させる事が明らかになった。KSRP ならびに結合スプライシング因子の発現調節によって IPAS 発現および炎症に関わる HIF-1 標的遺伝子発現がいかなる影響を受けるかについてさらに検討を重ねている。

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 9 件)

1) Loss of HIF-1 α impairs GLUT4 translocation and glucose uptake by the skeletal muscle cells. Sakagami H, Makino Y, Mizumoto K, Isoe T, Takeda Y, Watanabe J, Fujita Y, Takiyama Y, Abiko A, Haneda M.

(査読あり) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306:E1065-76. 2014

2) Angiotensin II type 1 receptor antagonist prevents hepatic carcinoma in rats with nonalcoholic steatohepatitis.

Tamaki Y, Nakade Y, Yamauchi T, Makino Y, Yokohama S, Okada M, Aso K, Kanamori H, Ohashi T, Sato K, Nakao H, Haneda M, Yoneda M.

(査読あり) *J Gastroenterol.* 48:491-503, 2013

3) The Krüppel-like zinc finger transcription factor, GLI-similar 1, is regulated by hypoxia-inducible factors via non-canonical mechanisms

Khalesi E, Nakamura H, Lee KL, Putra AC, Fukazawa T, Kawahara Y, Makino Y, Poellinger L, Yuge L, Tanimoto K

(査読あり) *Biochem Biophys Res Commun* 441:499-506, 2013

4) Reduction of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice.

Takeda Y, Fujita Y, Honjo J, Yanagimachi T, Sakagami H, Takiyama Y, Makino Y, Abiko A, Kieffer TJ, Haneda M.

(査読あり) *Diabetologia.* 55:404-12, 2012

5) 糖尿病性腎症の現況と今後の展望 高血糖が関わる新たな分子機構

牧野雄一、羽田勝計

Diabetes Frontier 23 (5); 535-539, 2012

6) 骨格筋のインスリン感受性制御における転写因子 HIF-1 の役割の解明とインスリン抵抗性解除法開発への応用

牧野雄一

(査読なし) *Therapeutic Research* 33 (6); 843-847, 2012

7) 心腎連関：腎虚血の病態における意義

牧野雄一、羽田勝計

(査読なし) *月刊糖尿病* 4 (2); 75-83, 2012

8) 糖尿病性腎症の成因と病態～新たな展開～ III. HIF-1

牧野雄一、磯江つばさ、羽田勝計

(査読なし) *日本腎臓学会誌* 53(7); 1006-1009, 2011

9) シンポジウム 1：糖尿病腎症の新展開 腎症発症・進展と転写因子

牧野雄一、磯江つばさ、羽田勝計

(査読なし) *日本糖尿病合併症* 25(1); 36-39, 2011

[学会発表](計 14 件)

1) グルコース応答性転写因子 ChREBP はメサンギウム細胞において platelet-derived growth factor (PDGF)-C 発現を誘導する 橋内 博哉, 牧野 雄一, 坂上 英充, 水元克俊, 柳町 剛司, 竹田安孝, 藤田 征弘, 安孫子 亜津子, 滝山 由美, 羽田 勝計
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013 年 5 月 16 日-18 日、熊本市

2) グルコース応答性転写因子 ChREBP が誘導するメサンギウム細胞における遺伝子発現の変化

牧野雄一、橋内博哉、坂上英充、柳町剛司、藤田征弘、安孫子亜津子、滝山由美、羽田勝計

第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013 年 4 月 25 日-27 日、仙台市

3) 糖尿病性腎症の成因—転写因子を中心に—

牧野雄一、羽田勝計

第 47 回糖尿病の進歩 シンポジウム 4: 糖尿病性腎症の進歩—最近の進歩 2013 年 2 月 15 日-16 日 四日市市

4) Regulation of IPAS expression; a model for hypoxia-inducible alternative splicing

Yuichi Makino

Singapore SGP seminar 2012 年 8 月 17 日, Singapore

5) Critical involvement of HIF-1 α in regulation of insulin-dependent GLUT4 translocation and

glucose uptake by skeletal muscle cells
Yuichi Makino, Hidemitsu Sakagami, Hiroya Kitsunai, Shuhei Tomita, Kensaku Okamoto, Yukihiro Fujita, Yumi Takiyama, and Masakazu Haneda
The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases
26-29 Jun, 2012, Sapporo, Japan

6) High glucose induces platelet derived growth factor C (PDGF-C) expression in glomerular mesangial cells via a glucose responsive transcription factor, carbohydrate response element binding protein (ChREBP)
Hiroya Kitsunai, Yuichi Makino, Hidemitsu Sakagami, Katsutoshi Mizumoto, Tsuyoshi Yanagimachi, Yasutaka Takeda, Yukihiro Fujita, Atsuko Abiko, Yumi Takiyama, and Masakazu Haneda
72th Scientific Sessions, American Diabetes Association, Jun 8-12, 2012, Philadelphia, USA

7) グルコース応答性転写因子 ChREBP がメサンギウム細胞において制御する遺伝子群の探索
橘内 博哉, 牧野 雄一, 坂上 英充, 柳町剛司, 藤田 征弘, 安孫子 亜津子, 滝山 由美, 羽田 勝計
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 2012 年 5 月 17 日-19 日 横浜市

8) HIF-1 α is a determinant of insulin-dependent glucose uptake by Skeletal Muscle Cells.
Yuichi Makino, Hidemitsu Sakagami, Shuhei Tomita, Katsutoshi Mizumoto, Kensaku Okamoto, Hiroya Kitsunai, Yukihiro Fujita, Yumi Takiyama, and Masakazu Haneda
Keystone Symposia, Advances in Hypoxic Signaling: From Bench to Bedside, 12-17 Feb, 2012, Banff, Canada

9) 骨格筋のインスリン感受性制御における転写因子 HIF-1 の役割の解明とインスリン抵抗性解除法開発への応用
牧野雄一
第 8 回メタボリックシンドローム研究会 2012 年 1 月 21 日、東京都

10) 低酸素応答システムによる生体機能調節機構
牧野雄一
第 45 回 北海道リウマチ膠原病談話会 教育講演 2011 年 10 月 29 日 札幌市

11) HIF-1 は骨格筋におけるインスリン依存性糖取込みの制御に重要である
牧野雄一、坂上英充、藤田征弘、滝山由美、藤代大介、児玉暁、小林厚志、小村景司、岡本健作、羽田勝計
第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー 2011

年 7 月 7 日-9 日、 仙台市

12) 骨格筋のインスリン感受性制御における転写因子 HIF-1 の役割
牧野雄一、坂上英充、藤田征弘、滝山由美、羽田勝計
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011 年 4 月 21 日-23 日 神戸市

13) Knockdown of HIF-1 α abrogates insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle cells.
Hidemitsu Sakagami, Yuichi Makino, Hiroya Kitsunai, Katsutoshi Mizumoto, Yukihiro Fujita, Yumi Takiyama, Atsuko Abiko, Masakazu Haneda
71th Scientific Sessions, American Diabetes Association, Jun 24-28, 2011, San Diego, USA

14) 骨格筋のインスリン感受性制御における HIF-1 の役割
坂上英充、牧野雄一、水元克俊、富田修平、羽田勝計
第 8 回がんとハイポキシア研究会 2011 年 1 月 29 日-30 日 札幌市

〔図書〕(計 1 件)
腎症のトピックス Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)
牧野雄一、羽田勝計
『ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて』『糖尿病腎症のすべて』(中山書店) pp 225-230, 2012

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 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
牧野雄一 (MAKINO YUICHI)

旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90345033

(2)研究分担者

羽田勝計 (HANEDA MASAKAZU)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：00124751

(3)連携研究者

()

研究者番号：