

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591454

研究課題名(和文) 自己免疫制御因子としてのHIF-1 と解糖系の役割

研究課題名(英文) Regulatory roles of HIF-1a and glycolysis in autoimmunity

研究代表者

小端 哲二 (KOBATA, Tetsuji)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：10205445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス様の自己免疫疾患を発症する、HIF-1 欠損キメラマウスの病態形成機序を検討した。B細胞特異的HIF-1 欠損マウスの解析より、自己抗体の産生はB細胞の分化段階の極めて初期にHIF-1 により制御されている、あるいはB細胞以外の細胞においてHIF-1 が重要な働きをしている可能性が示された。一方、HIF-1 欠損キメラマウスで有意な増加が観察された制御性T細胞は、その生存には解糖系への依存度が低くCD2分子を介したアポトーシス促進因子Bimの減少が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the pathophysiology of HIF-1 /RAG-2#8211;deficient chimeric mice, which develop autoimmunity resembling human systemic erythematosus, we analyzed mice with conditional knock-outs in HIF-1 in B cells and revealed that autoantibody production is regulated by HIF-1 in the very early stages of B cell development and/or HIF-1 in cells other than B cells. Although HIF-1 /RAG-2#8211;deficient chimeric mice have increased regulatory T cells, we found that regulatory T cells less depend on glycolysis and need CD2-mediated down-regulation of pro-apoptotic Bim for their survival.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫 HIF-1a 解糖系

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) は、細胞が低酸素ストレスに適應するための重要な調節因子として同定された。生体内での酸素濃度は生体外でのそれよりもはるかに低く、臓器毎、あるいは状態によって酸素濃度が異なる事が示されている。したがって、HIF-1 は免疫系が低酸素状況下でその機能を発現する際にも、何らかの役割を果たしている事が予想される。“低酸素と免疫制御”、或いは“自己免疫応答における HIF-1 の役割”を解析している研究者は数年前までは皆無に等しく、免疫学研究において低酸素と HIF-1 に着目する事は極めてユニークであった。しかしながら最近では炎症を含めた免疫応答全般における HIF-1 の役割に注目が集まってきている。私達は免疫系における HIF-1 の役割にいち早く着目し、これまでに以下のような研究を行ってきた。

HIF-1 遺伝子欠損による致死性を回避し、免疫系における HIF-1 の役割を検討するために、HIF-1 遺伝子欠損胚由来幹細胞を免疫不全マウス RAG-2 欠損マウス由来の胚盤胞に移入して、HIF-1 欠損キメラマウスを作成し、その免疫系の発生・分化、機能発現を解析した。その結果、HIF-1 欠損キメラマウスでは、B 細胞の分化異常(骨髄中での分化異常および CD5<sup>+</sup>B220<sup>high</sup> の表現型を有する B-1 様細胞の異常発生)ならびに抗 dsDNA 抗体やリウマトイド因子などの自己抗体の産生・腎臓への抗体の沈着と高蛋白質尿が観察され、ヒト全身性エリテマトーデ様の自己免疫疾患が発症する事を初めて明らかにした。これまでにについては、骨髄での後期 pro-B 細胞から pre-B 細胞への分化には HIF-1 により制御される解糖系からのエネルギーが非常に重要である事を明らかにした。そこで、本研究では HIF-1 欠損により誘導される自己免疫応答の機序の解明を主な目的とした。

(2) 興味深い事に、私達の HIF-1 欠損キメラマウスでは自己免疫疾患を発症するにも拘わらず、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞 (Treg 細胞) が野生型マウスに比べて有意に増加しており、HIF-1 が骨髄中での B 細胞分化のみならず、Treg 細胞の分化をも制御する分化調節因子として機能している可能性を見出している。予備実験にて、蛍光グルコース誘導体を用いて T 細胞のグルコースの取り込みを検討した結果、Treg 細胞は他の T 細胞に比べてグルコースの取り込みが非常に低く、Treg 細胞に特異的なエネルギー代謝系が存在する事を示唆する結果を得ている。最近、Shi らによって HIF-1 依存性の解糖系が炎症性 Th17 細胞と自己免疫抑制性の Treg 細胞の分化を制御している事を示す報告がなされた。

(3) このように、HIF-1 により制御される解糖系が B 細胞の発生・分化に極めて重要な働きを果たしている事が判明し、HIF-1 と

解糖系の免疫系、とりわけ自己免疫制御における役割を Treg 細胞との関係において明らかにする事は非常に興味深い。

### <引用文献>

Sitkovsky, M., D. Lukashev. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF-1 $\alpha$  and adenosine receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 712-721, 2005.

Kojima, H. et al. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  deficient chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2170-2174, 2002.

Kojima, H. et al. Differentiation stage-specific requirement in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -regulated glycolytic pathway during murine B cell development in bone marrow. *J. Immunol.* 184:154-163, 2010.

Shi, L. Z. et al. HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of Th17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 208: 1367-1376, 2011.

## 2. 研究の目的

(1) これまでに、HIF-1 の機能不全が自己抗体産生を伴う自己免疫疾患の発症を誘導する事を明らかにした。また、骨髄内 B 細胞の正常な分化に HIF-1 が分化段階特異的に解糖系を制御する事で重要な役割を果たしている事を突き止めた。つづいて、B 細胞分化に加え Treg 細胞分化における HIF-1 と解糖系の役割を明らかにする事は、自己免疫応答の制御機構の解明につながると考えられる。したがって、本研究では、正常な骨髄での B 細胞分化過程における HIF-1 の機能発現機序、自己抗体産生 B 細胞分化における HIF-1 と解糖系の役割、Treg 細胞の機能発現における HIF-1 とエネルギー代謝、特に解糖系の役割、の3点を明らかにする事を目的とした。

(2) さらに、HIF-1 の免疫系(特に自己免疫制御機構)における役割と Treg 細胞の分化・機能発現とエネルギー代謝の制御機構を明らかにする事で、膠原病などのヒト自己免疫疾患の病因病態の解明・診断および治療法の開発など、臨床への応用のための基盤的研究成果を提供する事が期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 正常な骨髄での B 細胞分化過程における HIF-1 の機能発現機序の検討: HIF-1 は低酸素状況下だけでなく液性因子によっても誘導されるので、B 細胞分化に関与する液性因子(IL-3、IL-7、IGF1、SCF等)で HIF-1 が分化段階特異的に誘導されるか否かを *in vitro* にて検討した。HIF-1 の機能発現は、FCM や ELISA にて蛋白レベルの発現、なら

びに HIF-1 の標的遺伝子の一つである VEGF の発現等で検討した。

(2) 自己反応性 B 細胞分化における解糖系の役割の解析: 野生型骨髄 B 細胞をグルコース不含 / ピルビン酸添加条件下で培養すると HIF-1 欠損 B 細胞と酷似した分化パターンを示す。自己反応性 B 細胞の分化における解糖系の役割を検討するために、野生型骨髄 B 細胞を上記の条件下で培養し、RAG-2 欠損マウスに養子移入する事により自己免疫疾患が発症するか否かを確認した。HIF-1 欠損キメラマウスでは脾臓に多くの辺縁帯 B (MZB) 細胞が存在する。これらの細胞が骨髄由来か否かを検討するため、HIF-1 欠損キメラマウスの骨髄を RAG-2 欠損マウスに移植し骨髄キメラを作製し、末梢に出現する B 細胞の表現型を調べた。

(3) Treg 細胞の機能発現における HIF-1 $\alpha$  とエネルギー代謝、特に解糖系の役割の解析: HIF-1 $\alpha$  欠損キメラマウスでは野生型マウスと比べ末梢に多くの Treg 細胞が観察される。末梢 Treg 細胞は conventional T (Tconv) 細胞に比べ解糖系への依存度が低いので、さらに次の点について検証した。Treg 細胞と Tconv 細胞との糖代謝の差を、蛍光標識グルコース誘導体の取り込み率と代謝速度にて比較した。Treg 細胞と Tconv 細胞とのエネルギー供給遺伝子の発現の差異を real-time PCR にて比較した。

(4) 自己抗体産生における HIF-1 $\alpha$  欠損 B 細胞の役割の検討: HIF-1 欠損による自己抗体産生が、骨髄での B 細胞分化異常によるものか、あるいは末梢での分化過程で獲得されるのかを検証するため、B 細胞特異的 HIF-1 欠損 (*Hif1a<sup>lox</sup>/Cd79<sup>Cre</sup>*) マウスを作成し解析した。

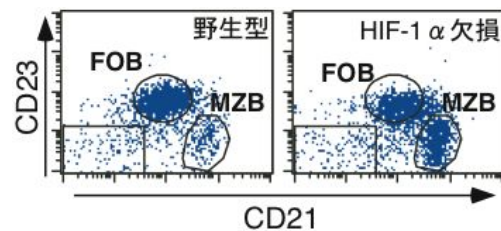
#### 4. 研究成果

(1) 骨髄での B 細胞の発生分化過程では、転写因子 HIF-1 が液性因子によりその機能の発現が制御されていると予想しマウスの実験を行った。結果、最も未熟な pro-B 細胞では、HIF-1 により制御される分子 (VEGF) の発現が IL-7 により誘導され、これは HIF-1 阻害剤により抑制された。よって骨髄 B 細胞では、IL-7 により HIF-1 の機能発現が制御されている事を明らかにした。

(2) HIF-1 欠損キメラマウスで観察される自己免疫現象が骨髄 B 細胞分化異常に起因するか否かを検討した。これまでに解糖系阻害剤 2DOG を用いた骨髄細胞培養では、HIF-1 欠損キメラマウス骨髄での B 細胞分化と同様な表現型を再現できる事を確認した。そこで、2DOG を用いて培養した骨髄細胞を免疫不全 RAG-2 欠損マウスに移植してキメラマウスを作製し解析した。その結果、このキメラマウスでは自己抗体産生は観察されず、脾臓 B 細胞亜集団も正常マウスとほぼ同様であった。しかし、骨髄での B 細胞分化は、pre-B 細胞分画が著しく減少している

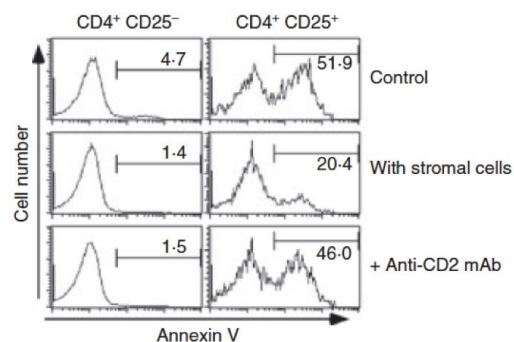
HIF-1 欠損キメラマウスと同様であった。これらの結果から、HIF-1 欠損 B 細胞の骨髄での分化異常が末梢 B 細胞の表現型および自己抗体産生に直接関与するものではない事が示唆された。

次に、HIF-1 欠損キメラマウスでは、末梢に follicular B (FOB) 細胞に比べ MZB 細胞が多く出現する。これは野生型マウス同様に脾臓でのみ観察され、HIF-1 が脾臓での B 細胞の分化に関与している事を明らかにした。



(図) 野生型マウスと HIF-1 $\alpha$  欠損キメラマウスの脾臓での FOB と MZB 割合

(3) Treg 細胞の機能発現における解糖系等の細胞代謝の役割を検討するために、マウス Treg 細胞を調整し実験を行った。その過程で新たに樹立した末梢リンパ組織由来ストローマ細胞が CD2 分子依存的に Treg 細胞の生存を支持する事を見出した。これにはアポトーシス促進因子 Bim の発現減少を伴うことを明らかにした。また、Treg 細胞は解糖系への依存度が Tconv 細胞と比べて低いもの、オートファジー関連遺伝子の発現が高い事、酸化リン酸化経路による ATP 産生の依存度が高い事を示唆する結果が得られた。その一方、ミトコンドリア状態は Tconv 細胞と同様であった。しかし、脂肪酸の T 細胞活性化における役割を検討したところ、脂肪酸により Treg 細胞依存性に Tconv 細胞の活性化を阻害する可能性を示唆する結果が得られ、Treg 細胞は糖ではなく脂肪酸をエネルギー源として利用し、自己免疫を含む免疫応答の制御に寄与する可能性が示された。この結果はリンパ球サブセットにおけるエネルギー代謝の違いが免疫制御の標的となる可能性を示している。



(図) CD2 阻害抗体による Treg 細胞アポトーシスの誘導

(4) 作出した B 細胞特異的 HIF-1 欠損マウスでは、HIF-1 欠損キメラマウスで見られた自己抗体産生を伴った自己免疫現象が観察されなかった。また、B 細胞特異的 HIF-1 欠損マウスでは野生型マウスと同様の MZB 細胞と FOB 細胞の分布を示していた。B 細胞特異的 HIF-1 欠損マウスでは HIF-1 は B 細胞分化の初期段階で欠損するが、HIF-1 欠損キメラマウスでは骨髄幹細胞の段階で既に HIF-1 を欠損しており、自己抗体産生および末梢での B 細胞分化は、B 細胞の分化段階の極めて初期に HIF-1 により制御されている、あるいは B 細胞以外のリンパ球において HIF-1 が重要な働きをしている可能性が示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kashiwakura, Y., D. Sakurai, Y. Kanno, M. Hashiguchi, A. Kabayashi, A. Kurosu, S. Tokudome, T. Kobata, H. Kojima. CD2-mediated regulation of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell apoptosis accompanied by down-regulation of Bim. *Immunology* 139: 48-60, 2013. 査読有  
DOI: 10.1111/imm.12054

〔学会発表〕(計 11 件)

小嶋英史 他、Cellular metabolism of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is distinct from that of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> conventional T cells、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 12 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

柏倉裕志 他、CD2 stimulation up-regulates Foxp3 in murine peripheral regulatory T cells、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 12 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

菅野由美子 他、Glycolysis, that impacts on bone marrow B cell development, dose not have a decisive influence on peripheral B cell differentiation、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 11 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

柏倉裕志 他、CD2-mediated regulation of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell apoptosis accompanied by down regulation of Bim、第 42 回日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 13 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

小嶋英史 他、Cytokine-dependent CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activation during immune responses、第 42 回日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 13 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

菅野由美子 他、HIF-1 $\alpha$  is regulated by IL-7 in pro-B cells during B cell development、第 42 回日本免疫学会学術集

会、2013 年 12 月 12 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Kashiwakura, Y. et al, CD2-mediated regulation of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell apoptosis accompanied by downregulation of Bim、15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2013 年 8 月 26 日、Milan (Italy)

Kojima, H. et al、TCR-independent CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activation during immune responses、15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2013 年 8 月 23 日、Milan (Italy)

菅野由美子 他、IL-7 is a principal factor for HIF-1 $\alpha$  regulated pro-B development、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 7 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

柏倉裕志 他、Peripheral CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell survival is regulated by a combination of CD2 stimuli and the interaction with stromal cells、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

小嶋英史 他、Characterization of activated CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during immune responses、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.dokkyomed.ac.jp/dusm/kousei/403.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

小端 哲二 (KOBATA, Tetsuji)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：10205445

### (2) 連携研究者

橋口 昌章 (HASHIGUCHI, Masaaki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20372443

柏倉 裕志 (KASHIWAKURA, Yuji)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：40382890