

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目

ヒト末梢血 T 細胞における低酸素誘導性転写因子 HIF-1 の発現制御  
機構とその意義に関する研究

指導教官 森本幾夫教授

東京大学大学院

医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 中村博志

### 【緒言】

生体内の酸素分圧は絶えず広いレンジで変動している。リンパ球などの免疫担当細胞は生体内を幅広く循環する過程で様々な環境酸素濃度に暴露される。特にリンパ球の機能発現の場である炎症組織や腫瘍組織の酸素分圧は著しく低下していることが知られている。したがって、T リンパ球などの免疫担当細胞においては環境酸素濃度の変動に対する適応はきわめて重要なプロセスであるが、その詳細は不明である。

低酸素で活性化される転写因子 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、細胞の低酸素環境への適応に重要な多くの遺伝子の発現を転写レベルで制御している。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。VHL 病(von Hippel Lindau disease)の原因遺伝子産物である pVHL は酸素存在下において HIF-1 $\alpha$ の酸素依存性分解領域 ODD(oxygen dependent degradation domain)の水酸化された特定のプロリン残基を介して HIF-1 $\alpha$ と結合し、HIF-1 $\alpha$ タンパク質をユビキチン化、プロテアソーム依存性タンパク質分解を促進する。低酸素分圧下ではプロリンの水酸化が抑制され、

pVHLとHIF-1 $\alpha$ との結合が阻害されるため、HIF-1 $\alpha$ タンパク質は安定化する。

我々はヒト炎症組織中に浸潤しているT細胞がHIF-1 $\alpha$ タンパク質を発現していることを見出した。また、ヒト末梢血T細胞では、HIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現には低酸素単独では不十分で抗CD3抗体刺激の共存が必要であることを明らかにした。しかしながら、ヒト末梢血T細胞におけるHIF-1の発現制御機構、およびT細胞機能制御における意義の多くは不明である。そこで、本研究はこれらを明らかにすることを目的とした。

## 【材料・方法／結果】

最初に、ヒト末梢血T細胞におけるHIF-1 $\alpha$ タンパク質発現制御機構の解析を試みた。ウエスタンブロット法による検討からプロテアソーム阻害薬MG132単独による処理ではHIF-1 $\alpha$ タンパク質発現が認められず、抗CD3抗体刺激が必要であること、メタボリックラベリング法による検討からMG132と抗CD3抗体刺激の共存下でHIF-1 $\alpha$ が検出されることから、抗CD3抗体刺激はHIF-1 $\alpha$ の合成を促進させることが示唆された。HIF-1 $\alpha$  mRNAは抗CD3抗体、および低酸素いずれの刺激でも変化しないことがノザンブロット法による検討から示唆された。したがって、抗CD3抗体刺激依存性のHIF-1 $\alpha$ タンパク質発現は翻訳の促進によることが示唆された。さらに、ポリゾーム解析法により低酸素刺激はHIF-1 $\alpha$ の翻訳を抑制し、抗CD3抗体刺激はHIF-1 $\alpha$ の翻訳を促進することが明らかとなった。また、低酸素と抗CD3抗体刺激の共存下ではHIF-1 $\alpha$ の翻訳は促進されることが明らかとなった。

各種シグナル伝達経路阻害薬を用いた検討から、ヒト末梢血T細胞における抗CD3抗体刺激依存性のHIF-1 $\alpha$ タンパク質発現にはPI3K/mTOR経路が関与する可能性が示唆された。また、mTORの阻害薬ラパマイシンはHIF-1 $\alpha$  mRNAレベルは変化させず、MG132共存下においてもHIF-1 $\alpha$ タンパク質発現を抑制したことから、HIF-1 $\alpha$ の翻訳を抑制することが強く示唆された。続いて、ラパマイシンによるHIF-1 $\alpha$ 翻訳制御がHIF-1標的遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法で検討した。その結果、HIF-1標的遺伝子の発現はHIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現と相関していた。恒常的活性型HIF-1 $\alpha$ を安定発現したJurkat T細胞を用いた解析から、ラパマイシンはHIF-1 $\alpha$ の合成阻害により、HIF-1標的遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。以上の結果をあわせて、T細胞において低酸素はHIF-1 $\alpha$ の分解を抑制し、抗CD3抗体刺激はPI3K/mTOR経路依存性にHIF-1 $\alpha$ の翻訳を促進させ、HIF-1タンパク質およびHIF-1標的遺伝子の発現を誘導することが示

唆された。

末梢血 T 細胞における、mTOR の下流の翻訳制御因子の発現、リン酸化状態をウエスタンブロット法により検討した結果、低酸素条件下において、S6K1 のリン酸化状態と HIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現が相関した。同様の傾向は Jurkat 細胞でも認められた。そこで、Jurkat 細胞における S6K1 の HIF-1 $\alpha$ タンパク質発現に与える影響を検討する目的で、S6K1 を siRNA によりノックダウンし、HIF-1 $\alpha$ タンパクをウエスタンブロット法により検出した。その結果、ノックダウンにより、HIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現は抑制された。かかる現象は HeLa 細胞でも同様であった。さらに、S6K1 ノックアウトマウスの脾臓細胞における HIF-1 $\alpha$ タンパクは野生型に比べ、著しく低下していた。以上の結果から S6K1 およびそのリン酸化が HIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現を正に制御していることが示唆された。

最後に T 細胞機能に対する HIF-1 発現の意義を解析した。ヒト末梢血 T 細胞においてグルコーストランスポーター、PGK-1 などの解糖系酵素の発現を HIF-1 $\alpha$ が制御することから、T 細胞におけるエネルギー産生に HIF-1 $\alpha$ が意義を有するとの仮説をたて検討した。恒常的活性型 HIF-1 $\alpha$ 安定発現 Jurkat 細胞、およびドミナントネガティブ HIF-1 $\alpha$ 安定発現 Jurkat 細胞を用いた解析から、ミトコンドリアの電子伝達系阻害薬存在下において HIF-1 $\alpha$ は細胞内 ATP の維持に寄与する可能性が示された。実際に、低酸素条件下において抗 CD3 抗体刺激はヒト末梢血 T 細胞の細胞内 ATP および乳酸産生を増加し、その増加はラパマイシンにより抑制された。以上の結果より、低酸素条件下の T 細胞において TCR を介したシグナル依存性に HIF-1 $\alpha$ の翻訳が促進され、解糖系の活性化により ATP 産生に至ることが示唆された。したがって、末梢血 T 細胞において、HIF-1 $\alpha$ の発現は解糖系を介するエネルギー産生などを通して、その機能維持に深く関わっている可能性が考えられた。

## 【考察】

本研究では、ヒト末梢血 T 細胞において HIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現は TCR を介したシグナル依存性の翻訳の促進と、低酸素による HIF-1 $\alpha$ の分解の抑制が必要であることを明らかにした。翻訳のされやすさは mRNA の種類によりに差があることが知られている。すなわち、一部の mRNA は mitogen やラパマイシンにより著しく翻訳速度が変化する。このような翻訳制御を受ける mRNA として N 末端にポリミジン構造を有する 5'TOP mRNA があり、その翻訳は S6K1 に制御されることが報告されている。一方、HIF-1 $\alpha$ は 5'TOP mRNA

には含まれないものの、5'TOP 同様の翻訳制御を受けていることが示された。一方、mRNA 特異的な RNA 結合タンパク質がその翻訳を制御しえることも報告されており、HIF-1 $\alpha$ の翻訳制御の詳細なメカニズムの解明は今後の課題である。

T 細胞においてラパマイシンは HIF-1 $\alpha$ のタンパク質発現を抑制し、解糖系酵素を含む HIF-1 標的遺伝子の発現を低下させた。かかる HIF-1 標的遺伝子の発現低下により ATP 産生が抑制されたと考えられた。活性化に伴う、機能発現には ATP が必須であることから、ラパマイシンの免疫抑制作用の一部に HIF-1 の抑制が関与する可能性がある。一方、ラパマイシンは抗腫瘍効果を示すが、この効果の一部に HIF-1 標的遺伝子発現に対する作用が関与することが報告されている。すなわち、mTOR/S6K1/HIF-1 を標的とした薬剤は抗腫瘍効果を有する免疫抑制薬となりえる。

mTOR はアミノ酸やエネルギーのセンサーであることが示されている。アミノ酸やグルコース濃度が低い状態では S6K1 は脱リン酸化される。本研究ではこのような条件下で T 細胞の HIF-1 $\alpha$ タンパク質発現が選択的に低下することが明らかとなった。すなわち、T 細胞は生体内を循環する過程で、酸素分圧の変化だけでなく、栄養状態の変化を感知し、HIF-1 $\alpha$ の発現に反映させ細胞内の恒常性やエネルギーバランスの調節を行っている可能性が考えられた。