

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19082

研究課題名(和文) 糖尿病病態形成における自己免疫疾患関連遺伝子Lnk/sh2b3による新規制御機構

研究課題名(英文) Novel control mechanism by autoimmune disease-related gene Lnk/Sh2b3 in diabetic pathogenesis

研究代表者

森 泰三 (Mori, Taizo)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・免疫制御研究部・研究員

研究者番号：40625307

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)：ゲノムワイド関連解析により自己免疫疾患関連遺伝子として細胞内アダプター蛋白質 Sh2b3/Lnkの多型が報告されてきているが、疾病との関連や制御機構については不明であった。我々はLnk欠損マウスにおいて耐糖能の低下およびインスリン抵抗性が誘導されている事を見出し、それらは脂肪内における1型自然リンパ球の増加および活性化に伴う炎症カスケードによって惹起されている事を見いだした。また、JAKインヒビターが耐糖能異常の改善に有効である事を示した。本研究により、LnkはIL-15に対する反応性を調節する事で脂肪1型自然リンパ球の増殖を制御し、脂肪内の恒常性維持に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lnk/Sh2b3 is an adaptor protein that negatively regulates cytokine signaling in lymphopoiesis. A missense variant within the LNK/SH2B3 gene has been reported to be a risk variant for several autoimmune diseases including diabetes. We found that glucose tolerance and insulin responses were impaired in Lnk KO mice. Moreover, immune cells such as group 1 innate lymphoid cells and M1 macrophages accumulated in adipose tissues. When Lnk KO mice were crossed with IL15 KO mice or depleted of G1-ILCs but not CD8+ T cells, glucose intolerance and adipose inflammation were ameliorated. Lnk KO G1-ILCs showed activated phenotypes as well as enhanced reactivity for IL-15, and administration of a JAK3 inhibitor improved glucose tolerance. Thus, Lnk/Sh2b3 controls homeostasis in adipose tissues and reduces the risk for onset of diabetes by regulating the expansion and activation of IL-15-dependent adipose G1-ILCs.

研究分野：実験病理学

キーワード：2型糖尿病 免疫学 シグナル伝達 サイトカイン 自己免疫疾患関連遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

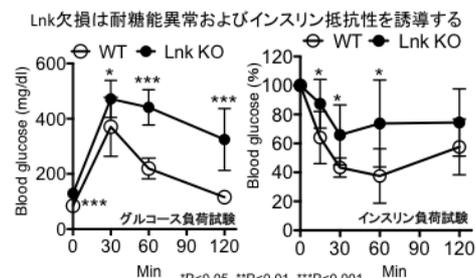
糖尿病は年間1万人以上が死亡し、現在も1000万人以上の予備軍が存在すると言われる疾病である。患者の増加を受け、糖尿病に伴う特徴を関連づけようとする試みが進んでいる。2型糖尿病を誘引する主な要因として肥満が挙げられるが、どのようなメカニズムで慢性の炎症を誘導し、インスリンに抵抗性を獲得するに至るかは未だ不明な部分が多い。近年の研究より、肥満がマクロファージをはじめとした特定の免疫細胞の浸潤および活性化を惹起し、炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導する事でインスリン抵抗性を獲得するといった免疫細胞を介した新規の制御機構が報告され注目を集めてきている。免疫系は病原体などの外敵から自己を守るために必須の生体機構であるが、過剰な活性化は組織における恒常性を破壊し、時に自己免疫疾患などの難治性疾患の原因となる。生体には免疫系活性化のアクセルとなりうるサイトカインシグナルに対して、ブレーキの役割を持つ分子が存在し、免疫系の恒常性を制御することが知られている。

Sh2b3/Lnk (Lnk)は、主に造血系細胞およびリンパ組織に発現する細胞内アダプター蛋白質である。富プロリン部を含み多量体形成に働くN末端領域、PHドメイン、SH2ドメインから形成され、サイトカインレセプター下流のJAK2あるいはC-KITのチロシン残基に結合することで、細胞外から受容したシグナルを抑制し細胞の機能を調節している。我々のグループはLnkの遺伝子改変マウスを作製、解析し、Bリンパ球前駆細胞の増殖・分化を制御しB細胞産生量を規定する事、造血幹細胞の維持・増幅及び生着能の制御機能を持つことを明らかにしてきた。加えて、研究代表者はLnkがCD8陽性T細胞の増殖を抑制し腸管の恒常性維持を制御すること、樹状細胞の産生および機能制御を介してIFN- $\gamma$ 産生性T細胞誘導を調節することを

報告した。これらの知見により、Lnkは多様な免疫細胞の産生および機能制御に重要な分子であることが明らかになってきた。一方で近年のヒトゲノムワイド関連解析(GWAS)より、SH2B3/LNK遺伝子のアミノ酸置換を伴うSNP(R262W)は1型糖尿病、セリアック病、さらには生活習慣病である心筋梗塞、高血圧などの疾患と高い関連を示すことが報告されてきている。これらの結果はLnkが自己免疫疾患および生活習慣病などの病態との密接な関連があることを示唆しているが、病態との関連は不明であった。

## 2. 研究の目的

1型糖尿病の誘導機構については免疫細胞の活性化を介した直接的なインスリン産生細胞の破壊が報告されている一方で、2型糖尿病の多くの場合肥満によって蓄積した脂肪細胞の活性化がトリガーとなり炎症を誘導し最終的にインスリン抵抗性を獲得することで病態が発症、増悪化する。我々はLnk欠損マウスが顕著な体重増加や脂肪の蓄積が見られないのも関わらず、耐糖能およびインスリン反応性が傷害されている事を見いだした。この制御機構の解明は今まで報告されてきたモデルとは全く異なる機構で糖尿病が誘導されていることが予想され、非常に新規性の高い研究になると考えた。同時に、日本人にも多く見られる肥満を伴わない糖尿病の制御機構を解明する上でも重要な検討課題であると考えられ、ヒトへの有効な治療法の開発につながる可能性を想定し検討を行うこととした。

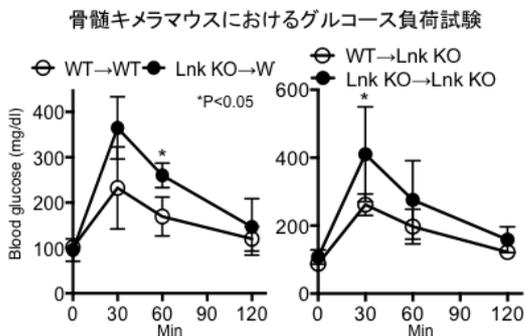


### 3. 研究の方法

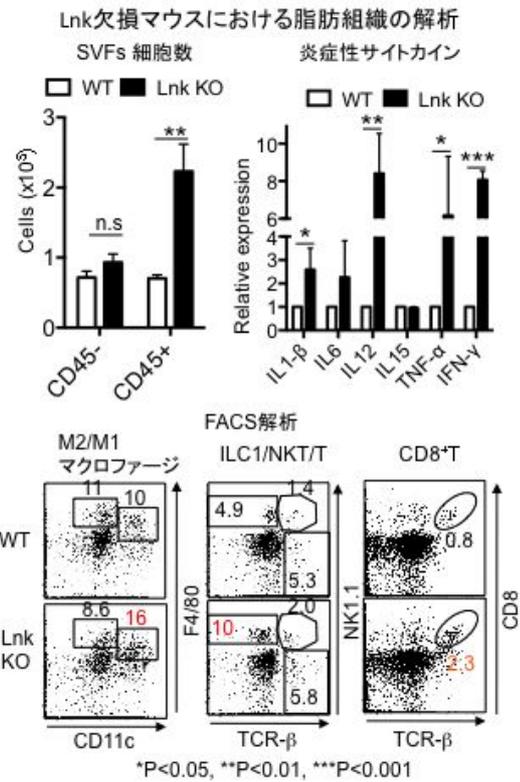
Lnk 欠損マウスにおいて顕著な増減のある脂肪内免疫細胞集団を探索し、脂肪内炎症のキーとなる細胞集団やそれらが産生する炎症性サイトカイン、シグナル伝達を明らかにし、どのようなメカニズムで脂肪内炎症を誘導しているかを解析する。同時にそれらの阻害による耐糖能異常の改善についても検証を行っていく。また、造血時において Lnk の発現が低下し幹細胞の増殖を促進させる機構があるように、高脂肪食負荷時において脂肪内の免疫細胞が増大する際の制御因子となりうることを想定し、Lnk レポーターマウスを用いてどのような細胞集団において発現の変化が見られるかを解析した。

### 4. 研究成果

はじめに、Lnk 欠損マウスにおける耐糖能異常が免疫細胞の影響に依存しているかについての検討を行った。野生型あるいは Lnk 欠損骨髄を野生型マウスに移植することで骨髄キメラマウスを作製し、耐糖能を解析した。その結果、Lnk 欠損骨髄移植マウスにおいて耐糖能の異常が再現された。一方で、野生型骨髄を Lnk 欠損マウスに移植すると耐糖能異常は改善した。腸内細菌の耐糖能異常に与える影響を考慮し、野生型および Lnk 欠損マウスを同ケージで共生させたが耐糖能の変化は認められなかった。以上の結果より、Lnk 欠損免疫細胞が耐糖能異常の責任細胞である事が明らかとなった。

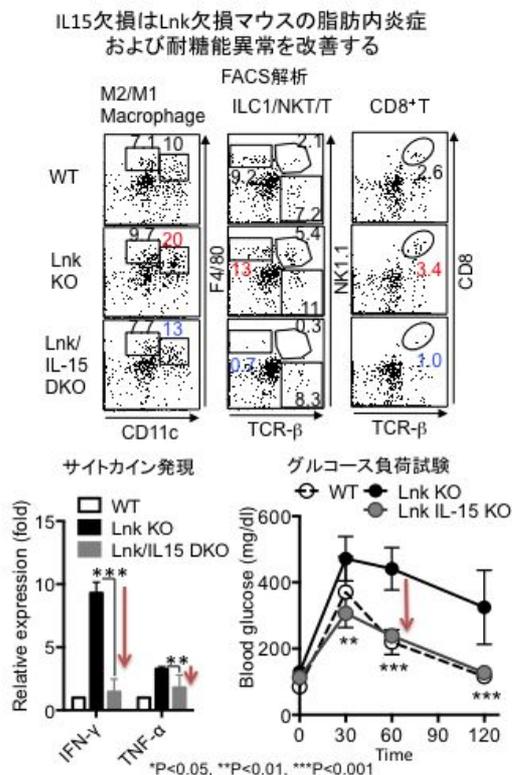


脂肪内に局在する細胞集団を詳細に調べたところ、Lnk 欠損マウスにおいて脂肪内の免疫細胞の絶対数が約 2 倍に増大しており、その中でも特に 1 型自然リンパ球、CD8 陽性 T 細胞、M1 マクロファージの 3 つの細胞集団の割合が顕著に増大している事がわかってきた。また、Lnk 欠損マウスの脂肪内においては野生型マウスと比較して IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加している事から脂肪内炎症が誘導されている事が示された。



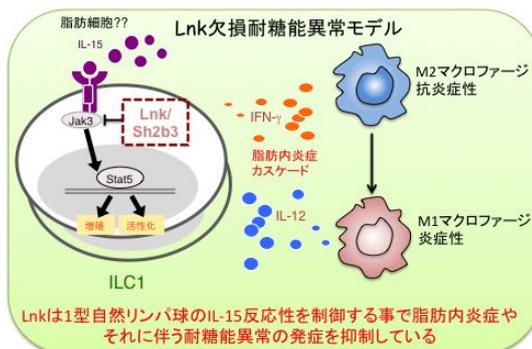
次に、脂肪内における1型自然リンパ球に着目し、検討を行った。細胞内にBrdUを取り込ませる事で脂肪内における細胞増殖を調べたところ、1型自然リンパ球は脂肪内における増殖細胞が非常に多く認められ、さらにLnk欠損によってその割合は増加した。また、Lnk欠損1型自然リンパ球は活性化マーカーであるKLRG-1の発現が亢進しており、活性化状態にあることがわかった。先行研究において、LnkはCD8陽性T細胞、樹状細胞におけるIL-15シグナルを制御する因子である事が浮かび上がってきていた為、IL-15との関連に着

目して検討を進めることにした。Lnk/IL-15 二重欠損マウスを作成し解析を行ってみると、増大が認められた1型自然リンパ球、CD8陽性T細胞、M1マクロファージの抑制が認められた。さらに、二重欠損マウスでは脂肪内炎症および耐糖能異常が改善されることが明らかとなり、IL-15依存的細胞集団がLnk欠損マウスの脂肪内炎症および耐糖能異常を制御している事が予想された。



Lnk欠損により誘導される脂肪内炎症の責任細胞を同定するため、抗体による阻害実験を行った。Lnk欠損マウスの1型自然リンパ球を一定期間枯渇させるとM1マクロファージの増大が抑制され、耐糖能異常についても回復することが明らかになった。一方で、CD8陽性T細胞の阻害ではLnk欠損マウスの耐糖能異常は回復しなかった。また、Lnk欠損1型自然リンパ球はIL-15で刺激してみると、下流シグナルであるSTAT5のリン酸化が野生型と比べて亢進していることが明らかになった。つまり、Lnk欠損1型リンパ球はIL-15の反応性亢進を受け、脂肪内で増殖しつつIFN- $\gamma$ 等のサイトカインを産生することでマクロファ

ジを炎症型にプライミングし、慢性脂肪内炎症のループを形成していることが想定された。本モデルの生理的意義について総括すると、Lnkは1型自然リンパ球のIL-15反応性を制御する事で脂肪内炎症やそれに伴う耐糖能異常の発症を抑制している事が明らかとなった。



Lnkは細胞内においてJAK2/3に結合してシグナルを抑制している分子であることより、JAKインヒビターがLnk欠損マウスの糖尿病が改善するかどうかを明らかにすることでIL-15反応性亢進による糖尿病病態形成の新規治療法になりうるのかどうかの検証を行った。JAKインヒビターを4週間作用させると、1型自然リンパ球の増大および活性化が抑制されており、それに伴いM1マクロファージの割合も野生型マウスと同等に回復する事がわかった。さらに、耐糖能異常についても改善が認められた。今後、ヒトにおいてIL-15反応性亢進を介した糖尿病病態形成が認められるかどうか、JAK阻害剤が糖尿病への改善効果があるかどうかについても検討を行っていきたいと考えている。

Lnk-Venus ノックインヘテロマウスを用いて、高脂肪食負荷時の免疫細胞におけるLnkの発現をモニターしてみると、興味深い事にCD8陽性T細胞における発現が高脂肪食負荷によって低下する事を発見した。また、野生型マウスにおいても高脂肪食負荷によりCD8陽性T細胞におけるLnk発現低下が再現された。肥満シグナルによってCD8陽性T細胞が増大し、脂肪内炎症およびインスリン抵抗性が誘導される事が明らかとなっ

ているが、その増殖機構に Lnk の発現低下が関与している可能性を示した。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

Mori T, Yamazaki N, Takaki S. Lnk/Sh2b3, an autoimmune disease-associated gene, prevents adipose tissue inflammation by controlling IL-15-dependent cell functions.

第45回 日本免疫学会学術集会. 沖縄.  
2016年 12月5-7日.

Mori T, Yamazaki N, Takaki S. An autoimmune disease-associated gene, Lnk/Sh2b3 controls inflammation in adipose tissue and reduces the risk for onset of diabetes.

International Congress of Immunology 2016.  
Melbourne. 2016年 8月21-26日.

Mori T, Yamazaki N, Takaki S. An autoimmune disease-associated gene, Lnk/Sh2b3 controls inflammation in adipose tissue and reduces the risk for onset of diabetes.

第44回 日本免疫学会学術集会. 札幌.  
2015年 11月18-20日.

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 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

森 泰三 (TAIZO MORI)

国立国際医療研究センター 免疫制御研究部 研究員

研究者番号 : 40625307