

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08802

研究課題名(和文)疾患関連遺伝子Lnk/Sh2b3を介する病態形成機構と生体防御

研究課題名(英文)Roles of disease associated gene Lnk/Sh2b3 in inflammation.

研究代表者

高木 智 (Takaki, Satoshi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・免疫制御研究部長

研究者番号：10242116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性腸炎や1型糖尿病、円形脱毛症、リウマチなどの免疫疾患群に加えて高血圧及び心血管障害にも共通する疾患関連遺伝子としてLnk/Sh2b3の多型が報告され、その作用が注目されている。これまでに骨髄増殖性疾患につながる造血系の知見は蓄積されてきたものの、免疫応答や炎症病態形成での役割については世界的に十分な解析が進んでいない。本研究では、脂肪組織内のNK細胞を含む1型自然リンパ球(Group 1 innate lymphoid cells、G1-ILC)の活性化制御にLnk/SH2B3が機能しており、脂肪組織の炎症抑制および耐糖能の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lnk欠損あるいは機能低下は、脂肪組織の免疫細胞活性化による脂肪組織炎症を誘発して耐糖能異常を呈すること、糖尿病発病の閾値を低下させ病態形成に寄与することが考えられる。標的細胞は脂肪組織のG1-ILCであり、今回の知見は、脂肪組織の恒常性維持における新しい制御機構、Lnk/SH2B3依存性のG1-ILC機能と脂肪炎症との関連を明らかにするものである。

研究成果の概要(英文)：Lymphocyte-specific adaptor protein, Lnk (also known as Sh2b3), is primarily expressed in hematopoietic cells where it functions as a negative regulator of cytokine signaling and cell proliferation. Single nucleotide polymorphisms in Lnk are associated with autoimmune and cardiovascular disorders, but the mechanism by which Lnk contributes to those diseases is unknown. We found that Lnk^{-/-} mice showed glucose intolerance and insulin resistance, and the expansion and activation of group 1-innate lymphoid cells (G1-ILCs) in adipose tissues. The results delineate a primary mechanism by which Lnk/Sh2b3 regulates homeostatic processes in adipose tissues and also how it affects the risk of diabetes by regulating the expansion and activation of adipose G1-ILCs and their contribution to insulin resistance.

研究分野：免疫学 実験病理学

キーワード：アダプター蛋白質 疾患関連遺伝子 耐糖能異常 慢性炎症 サイトカイン リンパ球

1. 研究開始当初の背景

遷延する免疫応答による慢性炎症、過剰な免疫応答による自己免疫疾患は、難治性でありその克服は大きな課題である。生物学的製剤を始め免疫疾患治療の進歩は著しいが、治療に反応しない例や有効な治療法がない自己免疫疾患は多数あり、新しい治療標的の同定が必要である。ゲノムワイド関連解析から自己免疫性糖尿病において LNK/SH2B3 のアミノ酸置換 (R262W) を伴う一塩基多型 SNP が疾患関連多型として報告されている。セリアック病、心筋梗塞や高血圧症例からも同 SNP (R262W) との有意な連関が報告されており病態形成機構の解明が期待されている。これまでに、Lnk/Sh2b3 の遺伝子クローニングから欠損マウス樹立と解析を一貫して行い、1) 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こと、2) 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、3) 巨核球の増殖及び成熟を抑制し血小板産生量を制御すること等、造血細胞の産生・維持に重要な制御機構を担う細胞内アダプター分子であることを明らかにしてきた。また、血小板の解析からサイトカインとインテグリンシグナルのクロストークに関与する分子であることを解明した。骨髄増殖性疾患群では LNK/SH2B3 欠損やアミノ酸変異例が JAK2 チロシンキナーゼの変異を持たない症例で見つかり、造血前駆細胞の制御異常に起因する増殖性疾患において LNK/SH2B3 依存性経路の破綻が関与することがわかってきた。この面については、Lnk 欠損造血幹細胞で TPO 反応性亢進からアポトーシス阻害に働く Bcl-xL の発現亢進が起こっていること、放射線を始めとするアポトーシス誘導刺激に対し抵抗性が增大していることを明らかにしている。

Lnk/Sh2b3 の生理機能について知見が蓄積されつつあるが、自己免疫疾患に繋がる免疫寛容破綻や炎症とどのように関連するかについては世界的にまだ解析が進んでいない。これまでに、Lnk 欠損では、IFN 産生性活性化 CD8+T 細胞が有意に増加すること、この増加は IL-15 への反応性亢進によること、回腸遠位部において絨毛萎縮が自然発症の原因となることを明らかにし、セリアック病の病態形成機構を部分的に反映する腸炎モデルとなることを明らかにしている。Lnk 欠損による CD8+T 細胞の IL-15 反応性の亢進、それによる正常量 IL-15 存在下でも生じる CD8+T 細胞の活性化、が活性化 CD8+T 細胞の蓄積、腸管組織障害の主因となることを示した。また、Lnk 欠損樹状細胞は様々な環境下において IFN- 産生性 Th1 細胞分化を誘導する機能が亢進していること、制御性 T 細胞誘導条件下でも Th1 分化を誘導できることを明らかにしている。LNK/SH2B3 の SNP が、糖尿病関連遺伝子としても報告されていることから、本研究ではこの Lnk/Sh2b3 の機能変化がどのように糖尿病の病態形成に関わるのか、責任細胞及び分子機構を明らかにする。標的制御系を解明し治療標的としての可能性を検討する。

2. 研究の目的

自己免疫疾患、骨髄増殖性疾患、心血管障害の共通のリスクファクターとして、細胞内アダプター蛋白質 Lnk/Sh2b3 の多型や変異が同定され注目されているが、免疫寛容破綻や慢性炎症との関連は不明である。自己免疫性腸炎を引き起こす責任細胞及びその活性化機構を解明してきた。本研究では、さらに糖尿病、耐糖能異常について Lnk/Sh2b3 依存性制御系の破綻からどのように波及し病態形成に至るのかを明らかにする。Lnk/Sh2b3 機能異常の標的となる細胞や細胞間相互作用を明らかにし疾患克服に向けての基盤を確立する。新たな治療標的の創出及び修復法の確立に資する。疾患関連遺伝子として多型が蓄積し受け継がれてきた意義を検証する。

3. 研究の方法

Lnk 欠損マウスでは耐糖能が低下していることを見出した。インスリン負荷への抵抗性もありインスリン標的組織の異常によると考えられ、責任細胞及び分子機構を解明する。内臓脂肪、皮下脂肪から非脂肪細胞を分離し細胞分画を調べる。特に NK 細胞、樹状細胞及び IL-12 依存性に増幅し IFN- を産生する ILC1 の増加やそれぞれの細胞の活性化マーカー発現に注目する。脂肪組織内での増殖を調べる。分離精製したのち IFN-、TNF、IL-12 等の炎症性サイトカイン発現及び産生を検討する。除去抗体の投与によりそれぞれの細胞分画を除いた場合の耐糖能の改善について検討する。近年、腸内細菌が耐糖能異常に深く関与することがわかってきている。Lnk 欠損と野生型マウスを同一ケージで飼育 (co-housing) した場合、あるいは抗生剤を投与した場合の耐糖能への影響を調べる。

Lnk-Venus ノックインマウスを用いて、脂肪組織内に存在する細胞群での Lnk 発現を Venus 輝度により比較検討したところ、高脂肪食負荷開始から 1~2 週間程で脂肪組織に集積してくる CD8+T 細胞で発現が低下することがわかった。腸管免疫系における Lnk 欠損 CD8+T 細胞は、IL-15 反応性亢進によって腸管絨毛萎縮の主な担い手となる。高脂肪食負荷時に脂肪に流入する

CD8+T 細胞が Lnk 発現低下により脂肪由来 IL-15 に過剰に反応することが初期の IFN- γ 産生を誘導し、脂肪組織の慢性炎症のイニシエーターあるいはアンプリファイヤーとなる可能性が考えられ、これを検証する。Lnk 発現を低下させる液性因子あるいは環境因子は、脂肪炎症の制御に重要な標的となる可能性がある。

4. 研究成果

LNK/SH2B3 が糖尿病関連遺伝子としても報告されていることから糖代謝制御への関与を検討した。Lnk 欠損マウスは通常の給餌下において肥満は示さないが、血糖値を測定したところ定常時の血糖値が野生型に比べ高いことがわかった。そこでグルコース負荷試験を行うと耐糖能の低下、有意な血糖上昇が観察された。血中インスリン値は高く保たれ分泌不全はなく、インスリン負荷試験で標的組織のインスリン反応性低下が考えられた。Lnk/Sh2b3 は造血系細胞に高発現するが、血管内皮や肝細胞などの非造血系細胞にも発現する。骨髄キメラマウスを作成し検討したところ、Lnk 欠損骨髄を移植したマウスでは耐糖能低下が再現され、正常骨髄を移植した Lnk 欠損マウスの耐糖能異常は改善したことから(図1)造血系細胞に依存することがわかった。また、リンパ球を欠損する Rag2 欠損マウスと交配した Rag2/Lnk 重複欠損マウスでも耐糖能低下が認められたことから、T 細胞や B 細胞の関与は耐糖能異常の確立に必須ではなく補助的と考えられた。近年、腸内細菌叢の変化が耐糖能異常に関与することがわかってきている。Lnk 欠損と野生型マウスを同一ケージ内で共同飼育 (co-housing) したところ、Lnk 欠損マウスの耐糖能異常は改善せず、また野生型マウスにも耐糖能異常の伝搬は見られなかったことから、腸内細菌叢の変化による耐糖能異常への関与は少ないものと考えられた(図1)。

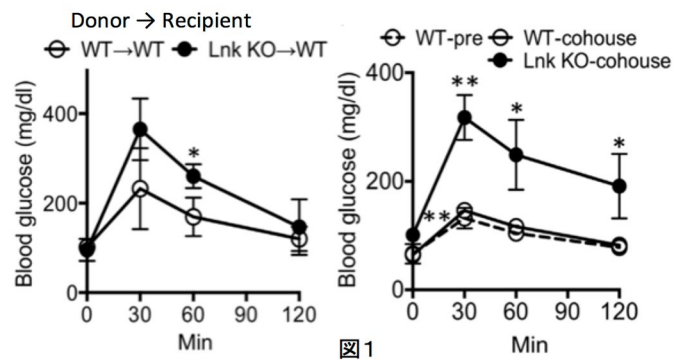


図1

脂肪組織には脂肪細胞に加えて血管内皮細胞、造血系細胞、各種前駆細胞等が存在する。脂肪細胞以外の分画を分離し、耐糖能異常をもたらす造血系細胞に注目して解析した。Lnk 欠損マウスの内蔵脂肪組織(精巣上体脂肪組織)では CD45 陽性の血球系細胞が増加していることがわかった。増加している細胞分画は、M1 マクロファージ、NK 細胞を含む 1 型自然リンパ球 (G1-ILC) NKT 細胞、CD8+T 細胞であり(図2) IL-12、TNF- α 、INF- γ 等の炎症性サイトカインの産生が亢進し、脂肪炎症が生じていることが確認された。チミジンアナログである BrdU を投与して4時間後に脂肪組織から細胞を回収し、それぞれの細胞分画における増殖を検討したところ、Lnk 欠損では脂肪組織内 G1-ILC の増殖が亢進していることがわかった(図2)。また KLRG-1 等の活性化マーカーを発現しており、G1-ILC が活性化状態にあることがわかった。

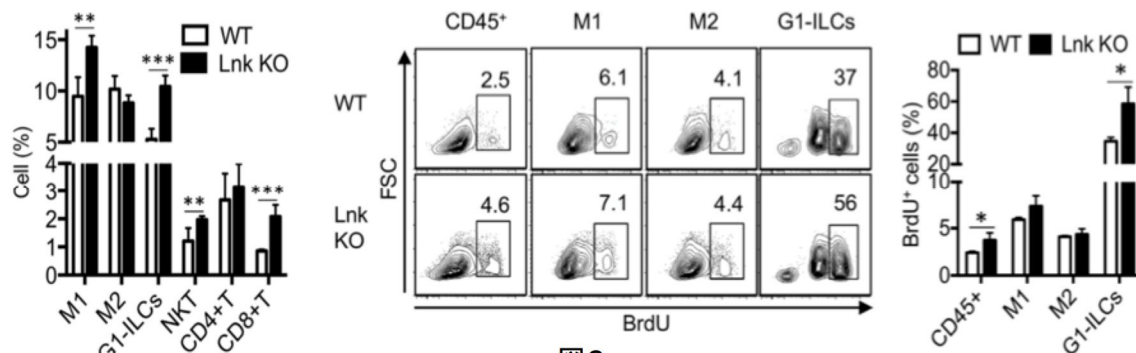


図2

先行研究にて Lnk 欠損では IL-15 反応性亢進による CD8+T 細胞活性化から小腸遠位部の絨毛萎縮が生じることを報告している。脂肪も IL-15 産生組織であることから、IL-15 欠損マウスと交配したところ、G1-ILC、CD8+T 細胞数が正常化し耐糖能異常も改善した(図3)。IL-15 依存性を示す G1-ILC および CD8+T 細胞のどちらが原因か検討した。抗 NK1.1 抗体投与により G1-ILC を除去すると耐糖能が改善することから、G1-ILC が脂肪炎症の責任細胞であることがわかった(図3)。

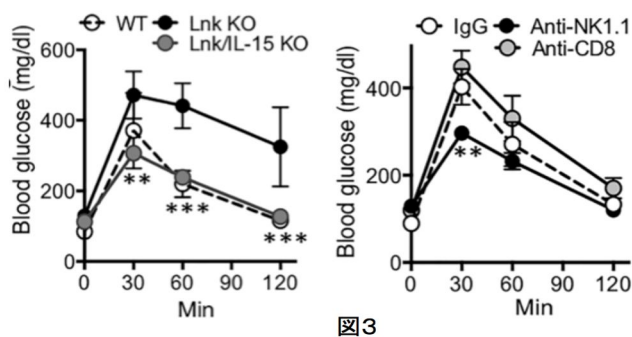
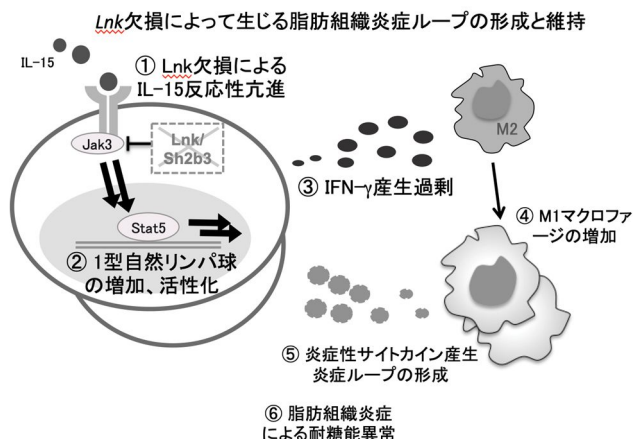


図3

Lnk 欠損あるいは機能低下は、脂肪組織の免疫細胞活性化による脂肪組織炎症を誘発して耐糖能異常を呈すること、糖尿病発病の閾値を低下させ病態形成に寄与することが考えられる。標的細胞は脂肪組織の G1-ILC であり、Lnk 欠損で IL-15 反応性が亢進することにより、

定常レベルの IL-15 によって過剰に増殖し、IFN- γ の過剰産生に寄与する。IFN- γ は M1 マクロファ

ージの増加をもたらし、IL-12、TNF- α によるポジティブループが形成されて脂肪炎症が維持され、耐糖能異常が生じる。今回の知見は、脂肪組織の恒常性維持における新しい制御機構、Lnk/SH2B3 依存性の G1-ILC 機能と脂肪炎症との関連を明らかにするものである。



さらに、世界的に手つかずのままとなっている膵臓における組織障害や炎症形成において Lnk/SH2B3 機能異常の標的細胞や関わる細胞間相互作用の解明を目指した。膵細胞の不可逆的消失につながる病態形成機構の解析を進めるため、膵細胞への障害性を持つストレプトゾトシン(STZ)を用いた糖尿病モデルの誘導を検討した。通常用いられる量の5日間連続投与では差は見られなかったが、STZ 投与量を軽度の膵島障害を起こす量(60%、3日間)にとどめて比較したところ、耐糖能の低下、 β 細胞の消失は野生型では生じないものの Lnk 欠損では明らかであり、CD8+T 細胞や CD103+樹状細胞を含む免疫細胞の膵実質への浸潤亢進が観察された。この膵組織障害への高感受性はリンパ球を欠損する RAG 欠損マウスとの交配で消失しリンパ球の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mori T, Suzuki-Yamazaki N, Takaki S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Lnk/Sh2b3 regulates adipose inflammation and glucose tolerance through group 1 ILCs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 1830-1841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.07.036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tenno M, Takaki S.
2. 発表標題 Lnk/SH2B3 contributes to the initiation and severity of STZ-induced diabetes.
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tenno M, Takaki S.
2. 発表標題 Disruption of Lnk/SH2B3 increases severity of STZ-induced diabetes.
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori T, Yamazaki N, Takaki S.
2. 発表標題 Lnk/Sh2b3 regulates adipose inflammation and glucose tolerance through group1-ILCs.
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tenno M, Takaki S.
2. 発表標題 Disruption of Lnk increases severity of DSS-induced acute colonic inflammation.
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----