

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06960

研究課題名（和文）Lnk/sh2b3を用いた自己免疫性肝炎モデルマウスの樹立と制御機構の解明

研究課題名（英文）Establishment of an autoimmune hepatitis model mouse using Lnk/sh2b3 and elucidation of novel regulatory mechanisms

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・その他部局等・上級研究員

研究者番号：40625307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトNASH患者およびマウスモデルにおけるLnk発現低下を明らかにした。Lnk欠損マウスでは高脂肪食給餌により肝重量が増加し、肝障害マーカーが上昇した。Lnk欠損マウスは肝脂肪の蓄積および線維化亢進を認め、NAFLD病態増悪を呈した。NAFLD病態増悪は免疫細胞特異的Lnk欠損マウスにおいても再現された。肝免疫細胞の解析より、メモリーCD8陽性T細胞への分化および細胞障害経路の活性化がLnk欠損により亢進した。Lnk欠損マウスにおけるCD8の枯渇、IL-15シグナル欠損は病態増悪を抑制した。LnkはNASHにおける肝臓の脂肪化－炎症－線維化の経路を抑制する因子である事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）における本邦の有病率は近年30%にまで増加してきており、終末病態である肝硬変は寛解させる薬剤が存在しないことから、代謝性肝疾患の発症および進行を抑制することは生命予後の改善に重要な課題といえる。本研究の推進により、Lnkを介した新たな病態制御機構の理解と、その制御の破綻が病態に与える重要性が明らかとなった。NASH病態増悪におけるLnkの作用点として同定されたIL-15シグナルの制御がNAFLDの治療ターゲットとして有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Lnk expression was downregulated in human NASH patients and mouse models. Lnk-deficient mice showed increased liver weight and elevated markers of liver injury after high-fat diet feedings. Lnk-deficient mice showed hepatic steatosis and increased fibrosis, exacerbating NAFLD pathology. NAFLD exacerbation was also recapitulated in immune cell-specific Lnk-deficient mice. Analysis of hepatic immune cells revealed that Lnk deficiency enhanced differentiation of effector memory CD8-positive T cells and activation of cytotoxic pathways. Depletion of CD8 and IL-15 signaling in Lnk-deficient mice suppressed exacerbation of NAFLD disease, indicating that Lnk is a factor that suppresses the lipogenesis-inflammation-fibrosis pathway in NASH.

研究分野：実験病理学

キーワード：NAFLD NASH 肝臓免疫 サイトカインシグナル CD8T細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝炎 (AIH) は中年以降の女性に好発する原因不明の肝疾患である。臨床的には AST、ALT の持続的上昇、抗核抗体、抗平滑筋抗体などの自己抗体陽性、血清 IgG 高値、の 3 点を特徴とする。症状を伴わないまま AST、ALT の上昇を契機として発見されることが多いが、診断がつかないまま急激に進展し、肝硬変、肝不全へと進行する場合がある。また、NASH/NAFLD などの代謝性肝疾患を合併する病態 (NASH-AIH) も稀ではなく、判別には病理診断が必須とされている。組織学的には、典型例な慢性肝炎像を呈し、門脈域の線維性拡大を示す。AIH 発症の原因は不明であるが、免疫寛容システムの破綻による自己免疫機序の関与が想定されている。肝内浸潤リンパ球は T 細胞優位であり、肝細胞に対する自己反応性 T 細胞の活性化とそれを抑制すべき免疫制御性 T 細胞の機能異常による細胞性免疫異常が肝細胞障害の主因と考えられている。AIH は特定の遺伝因子を持つ個体 (遺伝要因) に、何らかの誘因 (環境要因) が加わって発症すると推定されているが、肝細胞における自己免疫応答の標的抗原や特異的な自己抗体も同定されていない。病態の制御機構における理解が進まない原因として、病態を解析する適切なマウスモデルが存在しない事が問題点として考えられる。

2. 研究の目的

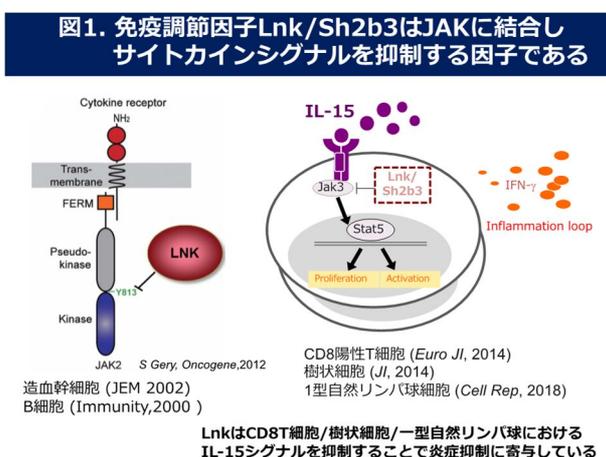
近年の GWAS における先行研究において、特定の遺伝子変異が自己免疫性肝炎の発症に重要であることが明らかになってきている。Lnk の SNP の一つである rs3184504 は欧米における自己免疫性肝炎患者群 649 人中約 53% に変異を持ち、メタ解析より $p=7.7 \times 10^{-8}$ の連関を示した (*Gastroenterology*, 2014)。この SNP は自己免疫性肝炎だけではなく、1 型糖尿病 (*Nat genetics*, 2007)、セリアック病 (*Nat genetics*, 2008)、関節リウマチ (*Hum mol genetics*, 2009) 等、様々な自己免疫疾患との関連が報告されてきている多型であり、特に IFN- γ pathway の制御に密接に関与していると考えられている (*Nature genetics*, 2013)。

Lnk は免疫細胞および造血幹細胞において発現するアダプタータンパク質であり、様々なサイトカインレセプター下流の JAK 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増殖を調節するブレーキの様な機能を持つ因子である (図 1 左)。申請者らは Lnk 欠損マウスを用いた解析より、IL-15 の反応性を制御することで IFN- γ を中心とした炎症反応の抑制に働く因子であることを明らかにしてきた (図 1 右)。CD8 陽性 T 細胞における腸管の恒常性の維持への関与 (*Eur J Immunol*, 2014)、樹状細胞における IFN- γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞の制御 (*J Immunol*, 2014)、脂肪内の NK 細胞における脂肪内炎症を介した耐糖能の調節機構 (*Cell Rep*, 2018) などを見いだしてきた。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、緻密な調節機構が破綻すると過剰な活性化を誘引し、組織における恒常性を破壊することで自己免疫疾患などの難治性疾患の原因となりうる。GWAS 解析より、免疫細胞のサイトカインシグナル調節因子である Lnk の変異はこれまで同定されてこなかった AIH の発症に関わる遺伝要因である可能性が予想されたが、現在までに病態や制御機構との関連を報告した研究はなく、それらの連関関係を明らかにすることは学術的独自性に富む研究になり得ると考えられる。また、これまで AIH の病態については明らかになりつつあるものの、その制御機構が明らかにならない原因として、病態を反映したマウスモデルが存在しないことが挙げられる。Lnk 変異マウスあるいは変異マウスに対する何らかの環境要因の負荷が、AIH の臨床上的特徴とされている肝障害の誘導、抗核抗体の出現、IgG の上昇、肝臓への免疫細胞浸潤等を満たした表現系であれば、AIH モデルマウスとして病態の制御機構を詳細に解析することが可能となり、ヒトの病態の理解を深める上で非常に有用なツールになり得ると考えられる。

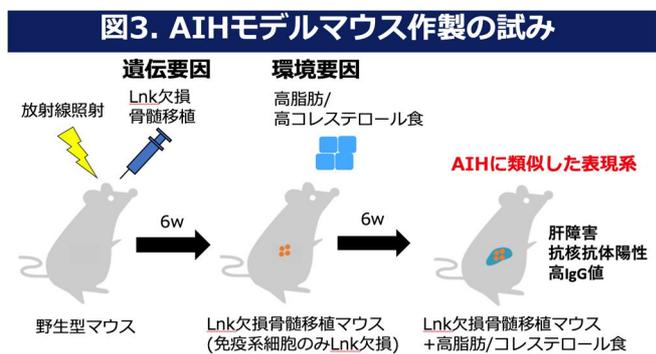
3. 研究の方法

本研究では Lnk 欠損マウスモデルを用い、Lnk 変異の遺伝的素因を有する患者は自己免疫性肝炎の発症リスクを増加させるという仮説の検証を行いたいと考えている。さらに、自己免疫性肝炎の発症機序および制御機構を解明することで、病態形成への基礎的な理解を深めると同時に治療標的となりうるかについて検証していく。研究期間内において、以下の事を明らかにする。

1) Lnk 欠損骨髄キメラマウスにおける自己免疫性肝疾患の病態評価



本研究の着想に至った経緯などの項で記載しているが、免疫細胞のみを特異的に Lnk 欠損にするために、Lnk 欠損骨髄を放射線照射した野生型マウスに移植し骨髄移植マウスを作製した (図 3)。定常状態の Lnk 欠損骨髄移植マウスでは AIH の表現系は再現されなかったが、軽度の脂肪蓄積が生じる高脂肪/高コレステロール食を約 6 週間程度負荷すると、野生型骨髄を移植した群と比較して有意に肝障害マーカー AST/ALT の増加が生じ、血清中における IgM/IgG の上昇を認めた。さらに Lnk 欠損骨髄移植マウスに高脂肪食を付加したマウスの血清にのみ自己免疫性肝炎の特徴的な表現系である自己抗体の出現が誘導された。以上の結果より、Lnk の変異という遺伝的要因に、軽度の脂質蓄積という環境要因が合併すると、AIH の表現系に類似した病態を示すことがわかってきた。本マウスにおける肝臓の病理学的解析を行い、特徴的な病理学的所見である免疫細胞浸潤 (Interface hepatitis) が生じているかどうかを HE 染色より検討していく。同時に肝臓の線維化や脂肪の蓄積の程度をシリウスレッド染色やマッソントリクローム染色より明らかにする。定量的 PCR により線維化や代謝関連遺伝子を定量化する。ヒトの病態では T 細胞や形質細胞の浸潤が認められているが、マウスモデルにおいてどのような細胞集団の浸潤が強く認められるかについて免疫染色により同定する。現在までに AIH 類似モデルとして使用されているコンカナバリン A の投与マウス等と比較する事で病態を評価し、ヒトの病態を反映しているモデルかどうかを総合的に評価していく。仮に、組織像がヒトの AIH 像と大きくかけ離れている場合、脂肪負荷期間を軽度な脂肪蓄積が起きる 6 週から NASH モデルが作製される 20 週に延長し、NASH の増悪に対して Lnk の変異が影響するかどうかについての検討に研究計画を変更し、同様に以下の実験を行う。



生じ、血清中における IgM/IgG の上昇を認めた。さらに Lnk 欠損骨髄移植マウスに高脂肪食を付加したマウスの血清にのみ自己免疫性肝炎の特徴的な表現系である自己抗体の出現が誘導された。以上の結果より、Lnk の変異という遺伝的要因に、軽度の脂質蓄積という環境要因が合併すると、AIH の表現系に類似した病態を示すことがわかってきた。本マウスにおける肝臓の病理学的解析を行い、特徴的な病理学的所見である免疫細胞浸潤 (Interface hepatitis) が生じているかどうかを HE 染色より検討していく。同時に肝臓の線維化や脂肪の蓄積の程度をシリウスレッド染色やマッソントリクローム染色より明らかにする。定量的 PCR により線維化や代謝関連遺伝子を定量化する。ヒトの病態では T 細胞や形質細胞の浸潤が認められているが、マウスモデルにおいてどのような細胞集団の浸潤が強く認められるかについて免疫染色により同定する。現在までに AIH 類似モデルとして使用されているコンカナバリン A の投与マウス等と比較する事で病態を評価し、ヒトの病態を反映しているモデルかどうかを総合的に評価していく。仮に、組織像がヒトの AIH 像と大きくかけ離れている場合、脂肪負荷期間を軽度な脂肪蓄積が起きる 6 週から NASH モデルが作製される 20 週に延長し、NASH の増悪に対して Lnk の変異が影響するかどうかについての検討に研究計画を変更し、同様に以下の実験を行う。

2) 肝臓における炎症像およびそれに関わる免疫細胞の解析

Lnk 欠損マウスの肝臓組織内における免疫細胞集団についてフローサイトメトリーを用いて解析する。代謝変化と合わせて継時的に増大が見られる細胞集団に着目し、活性化状態について各種細胞表面マーカーを中心に解析する。さらに、肝臓全体における自己免疫性肝炎患の炎症像を明確にするために、どのような遺伝子発現が変化しているかについて RNA-Seq や定量的 PCR を用い、炎症性サイトカインや代謝マーカー等を網羅的に解析する。どのようなシグナルの反応性亢進が Lnk の欠損によって誘導されているかを同定する。

3) 病態増悪に関わる責任細胞および反応の起点となる因子の同定

ヒトにおける AIH の病態形成には T/B 細胞系の関与が報告されている。T/B 細胞系の影響を検討するため、RAG2 欠損バックグラウンドにおける Lnk 欠損マウスを用いて骨髄キメラマウスを作製し、高脂肪食を負荷することで自己免疫性肝炎患の病態が再現されるかについて検討を行う。同時に、FACS 解析より Lnk 欠損骨髄キメラマウスの肝内免疫細胞において病態発症のトリガーとなる細胞集団を同定し、それらの細胞集団を抗体により枯渇することで病態が抑制されるかについても検討する。脂肪負荷により、Lnk 変異の影響を受ける IL-15 の産生が増大する報告より、先行研究で示されている CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、樹状細胞については特に着目して解析を行う。責任細胞として絞り込まれた細胞集団を野生型に移植し、病態が再現されるかどうかを評価する。Lnk の欠損によって増幅が生じた細胞集団より、反応性亢進が生じる液性因子を想定し、in vitro で下流シグナルのリン酸化レベル等を解析する。Lnk と炎症の起点を思われる液性因子との二重欠損マウスの作製、あるいは液性因子の阻害抗体を処理し、Lnk 欠損マウスで生じた自己免疫性肝炎様の病態が改善されるかを明らかにする。

4) ヒト AIH および NASH 患者における Lnk 発現変化についての検討

申請者の所属組織には既に多数の肝疾患における臨床検体が収集されており、AIH、NASH 患者についても PBMC および cDNA が保存されている。cDNA を解析し、健常人と比較して Lnk の発現変化について明らかにする。PBMC を分画することでどのような細胞集団の発現変動が起きているかについても明らかにする。また、LNK の SNP の機能的解析を目的とし、CRISPR-CAS9 を用いた Lnk 変異発現細胞を樹立し、マウスで見られた液性因子への反応性亢進がヒトでも生じるかについて in vitro で検討する。

4. 研究成果

1. NAFLD 病態形成における Lnk の関与と制御機構の解明

Lnk 欠損マウスに対して高脂肪食を継続的(0 週、6 週、12 週、18 週間)に付加すると、定常状態(0 週)においては野生型マウスに比して肝重量の変化を認めないものの、6-18 週間の給餌によって肝臓重量が急激に増加し、肝障害マーカーAST/ALT が劇的に上昇する事が明らかになった。肝臓の病理学的解析により、Lnk 欠損マウスは野生型に比して高脂肪食給餌 6 週より肝臓脂肪の蓄積増大が生じており、12 週から線維化の著明な亢進が認め、肝硬変様の表現系を示した。一方で、定常状態および高脂肪食負荷時において AIH に特徴的とされる炎症細胞浸潤を認めず、病理組織像もヒトの AIH 像との剥離が存在したため、計画を変更し、NAFLD/NASH モデルにおける生理的意義の解明を行うこととした(研究計画書に記載済み)。

Lnk 欠損マウスの肝臓では高脂肪食給餌によって脂質合成酵素の遺伝子発現の亢進、脂肪分解酵素の発現抑制を認めており、脂質蓄積が増大する方向に脂質合成酵素遺伝子群が変動している事が明らかとなった。さらに、肝炎症性サイトカインを評価した結果、インターフェロン、グランザイム、パーフォリン等の細胞障害性サイトカインの発現が Lnk 欠損マウスにおいて増加している事を見出した。免疫細胞特異的に Lnk を欠損した骨髓キメラマウスを作成し NAFLD モデルに供した結果、野生型に比して肝脂肪化 肝障害 肝臓線維化の増悪が再現された。免疫細胞のシングルセル解析より、Lnk 欠損は T 細胞クラスターにおける細胞障害性の遺伝子経路が増強することが明らかとなった。またフローサイトメトリー解析より、Lnk 欠損マウスの肝臓においてメモリー CD8 陽性 T 細胞への分化が定常状態より亢進しており、高脂肪食によってそれらの割合が著明に増加する事が明らかになった。肝 CD8 T 細胞の数的増加は免疫染色によっても確認された。病態における責任細胞を明らかにするため、NASH モデルに供した Lnk 欠損マウスに対して CD8 抗体を用いた連続的な阻害を行い、表現系を解析した。その結果、CD8 陽性細胞の抑制は Lnk 欠損マウスにおける NASH 増悪を著明に抑制することが明らかとなった。Lnk 欠損 CD8 T 細胞は *in vitro* において IL-15 のシグナル下流の STAT5 のリン酸化亢進を認め、IL-15 シグナル亢進によってナイーブ T 細胞より NKG2D 陽性のエフェクターメモリーへの分化が増加する事が明らかになった。さらに、Lnk 欠損マウスにおける IL-15 シグナルの抑制は *in vivo* における NASH 病態の増悪をも改善させた。以上の結果より、Lnk 欠損マウスにおいて炎症-脂肪化-線維化の pathway が増幅しており、NAFLD 病態の増悪に強く関与している事が明らかになった。

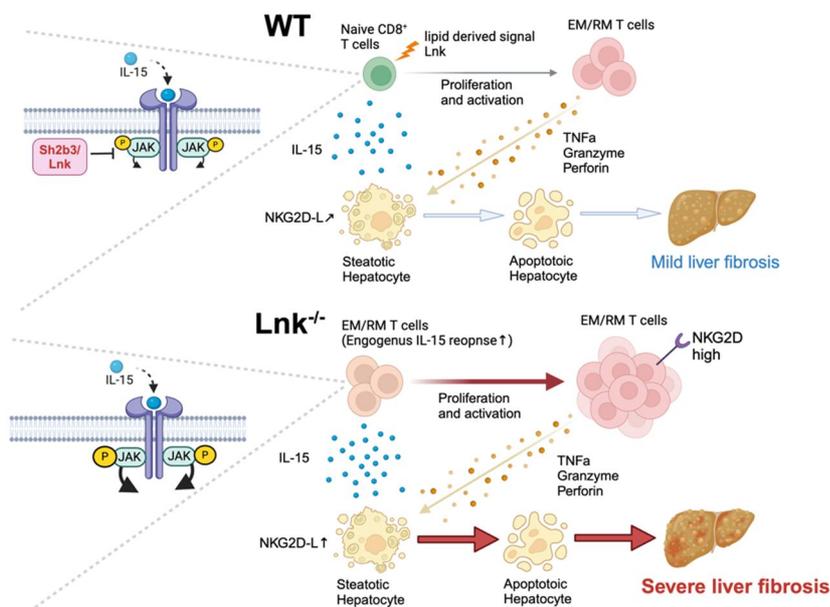
2. NAFLD 患者/モデルマウスにおける Lnk 発現変化の同定

脂肪肝と Lnk 発現の関連を明らかにする目的で Lnk レポーターマウスを NAFLD モデルに供し、免疫/実質細胞集団における Lnk 発現レベルを通常食群と比較した。高脂肪食給餌は CD45⁺CD31⁻の肝細胞と想定される細胞集団において Lnk 発現の減少傾向を示した。さらに、CD45⁺の免疫細胞集団における Lnk 発現を解析した結果、CD8 陽性 T 細胞の Lnk 発現は高脂肪食給餌によって有意に減少しており、NAFLD モデルにおいて増加する CD8 陽性 T 細胞の割合と Lnk 発現は逆相関している事を見出した。この結果より、脂質シグナルが CD8 陽性 T 細胞の Lnk 発現を減少させ、サイトカインシグナルを亢進させる事で肝内増幅に関与している事が推察された。さらに、今後の組織・細胞特異的な Lnk 欠損マウスの解析を目的とし、CRISPR-CAS システムを用いて Lnk-Flox マウスを樹立した。

ヒト NAFLD 患者における PBMC および肝臓組織における Lnk 発現を解析した結果、NAFLD 患者では PBMC において健康成人に比して有意な Lnk 発現低下が確認された。一方で、肝臓組

織においては施設 A より提供された検体では NAFLD 患者にて有意な低下を認めたが、詳細な臨床データと紐づいている施設 B 提供検体では有意な差がなく、病態パラメータとの関連解析を行うことは困難であった。

本研究の遂行により、Lnk を介した新しい NAFLD/NASH の病態制御機構(右図)が明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 森 泰三
2. 発表標題 Lnk/Sh2b3はIL-15シグナル調節を介して肝脂肪化および炎症を制御し、NASHの病態形成に関与する
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 森 泰三
2. 発表標題 Lnk /Sh2b3を介したNAFLD/NASH肝障害性制御機構の解明
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 森 泰三
2. 発表標題 NASH病態形成におけるCD8陽性T細胞の関与－Lnk/Sh2b3とIL-15シグナル
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 森 泰三
2. 発表標題 Lnk/Sh2b3はCD8陽性T細胞のIL-15シグナル制御を介してNASH病態形成に関与する
3. 学会等名 第60回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2023年～2024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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------