

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590446

研究課題名（和文）自己免疫疾患と生活習慣病を結ぶリスクファクター遺伝子の生理機能と病態

研究課題名（英文）Function of a risk factor gene common to autoimmune diseases and life-style related diseases

研究代表者

高木 智（TAKAKI SATOSHI）

独立行政法人国立国際医療研究センター・研究所 免疫制御研究部・部長

研究者番号：10242116

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患、生活習慣病に共通した疾患関連遺伝子として注目される細胞内アダプター蛋白質 Lnk/Sh2b3 について、機能異常の標的となる細胞や細胞間相互作用の解明を目指した。Lnk/Sh2b3 発現をモニターできるレポーターマウスを樹立し、成熟 T 細胞や樹状細胞においても発現することを確認した。Lnk 欠損マウスでは CD44<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞が増加すること、この増加は IL-15 への反応性亢進に因ること、小腸で自然発症する絨毛萎縮の責任細胞となることを見出した。Lnk 機能障害が自己免疫性組織障害の病態形成に繋がる可能性を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The intracellular adaptor Lnk/Sh2b3 regulates cytokine signals that control lymphohematopoiesis. In humans, mutations in the LNK/SH2B3 gene are found in myeloproliferative disease patients, and LNK/SH2B3 polymorphisms have been demonstrated to be associated with celiac disease and autoimmune diabetes. In this study, we revealed a previously unrecognized function of Lnk/Sh2b3 in preventing the accumulation of inflammatory CD8<sup>+</sup> T cells and intestinal villous atrophy. Generation of an Lnk-Venus reporter mouse revealed expression of Lnk/Sh2b3 in mature T cells and dendritic cells. CD44<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were increased in Lnk<sup>-/-</sup> mice, and many mice exhibited signs of villous atrophy in the small intestine. Lnk<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells survived longer and proliferated even in non-lymphopenic host animals in response to IL-15. Transfer of Lnk<sup>-/-</sup> CD44<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> T cells together with wild-type CD4<sup>+</sup> T cells into RAG2-deficient mice recapitulated villous atrophy in ileum. Our results provide for the first time a missing link between Lnk/Sh2b3 and autoimmune-like tissue destruction responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

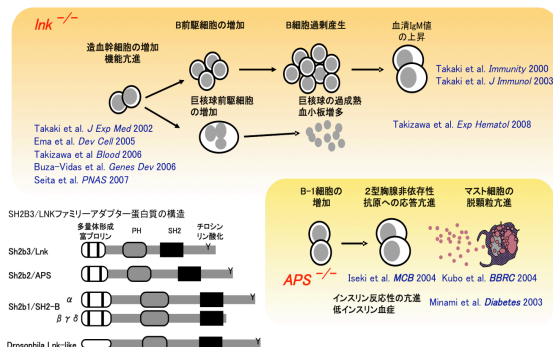
キーワード：(1)自己免疫 (2)免疫寛容 (3)疾患関連遺伝子 (4)アダプター蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムを構築する細胞は、造血幹細胞から前駆細胞を経て分化し生体の生涯にわたって供給され続ける。恒常性維持のため、免疫担当細胞の分化・活性化は、抗原やサイトカイン、細胞接着や遊走因子など細胞外からの様々な情報の受容機構を介して厳密な制御機構の下に置かれており、これらの制御機構の解明は、免疫システムの作動・維持機構の理解、細胞の増殖・分化決定機構という生物学の基本命題、さらに免疫異常状態の制御や修復に向けて多くの知見を提供し非常に重要である。細胞外情報が受容され核へと伝達される過程においては、受容体やそれらに結合する酵素群とともに酵素活性は持たないものの蛋白質相互作用を担うアダプター蛋白質群がシグナルの増幅や抑制、修飾やクロストーク等に重要な働きをすることがわかってきた。

Lnk/Sh2b3 は、SH2-B/Sh2b1 や Aps/Sh2b2 とともにアダプター蛋白質ファミリーを形成し、各種造血系細胞におけるサイトカインおよびインテグリンを介するシグナル制御分子として機能する。我々は、遺伝子改変マウスの樹立及び解析から、Lnk/Sh2b3 が、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 (Immunity 2000) (J Immunol 2003)、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 (J Exp Med 2002, Dev Cell 2005, PNAS 2007)、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 (Exp Hematol 2008) 等、造血細胞の産生・維持に重要な制御機構を担う分子であることを明らかにしてきた。また、Lnk/Sh2b3 欠損で他に例をみない程の造血幹細胞の増加が起こることから、その機能ドメインを同定してドミナントネガティブ変異体を開発し、移植による免疫系再構築に有用であることを示した (Blood 2006)。加えて、サイトカインシグナルと細胞接着系のクロストークに関する制御系としての作用機構を明らかにしつつある (J Clin Invest 2010)。

研究の背景: SH2B3/LNKに関するこれまでの研究成果

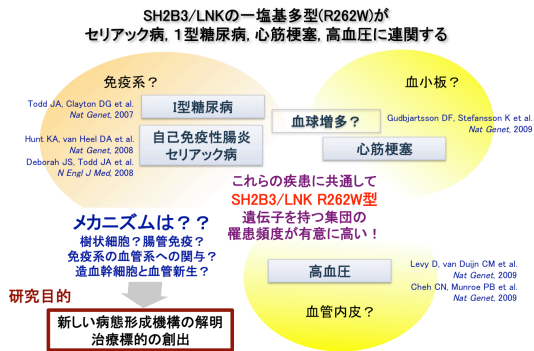


さらに、Sh2b1/SH2B 欠損 (Mol Cell Biol 2002) や Sh2b2/APS 欠損 (Diabetes 2003, Mol Cell Biol 2004) など全てのファミリー遺伝子改変マウスを揃え、世界をリードする知見を収集してきた。

一方、近年ゲノムワイド関連解析 (GWAS) が盛んに行われており、各種疾患と関連する一塩基多型 SNPs 及び疾患関連遺伝子の同定が進んでいる。1 型糖尿病に対する GWAS から、LNK/SH2B3 遺伝子のアミノ酸置換を伴う SNP (R262W) が疾患と高い関連を示すことが報告された (Nat Genet 2007)。さらに、セリアック病患者群の解析からも同じ SNP との関連が相次いで報告された (Nat Genet 2008) (N Engl J Med 2008)。生活習慣病である心筋梗塞、高血圧の症例の GWAS から、同 SNP (R262W) との有意な関連が報告され、Lnk/Sh2b3 の機能及び多型による機能変化が注目を集めている。セリアック病は、麦類の摂取で発症する腸管アレルギーと自己免疫疾患の組み合わせさったものである。本邦では主食が米であり重症化する頻度が少なかった可能性や HLA 型の違い等の理由で患者数は少ないとみられてきた。しかし、麦類を除いた食事は近年困難になってきており症例が散見されるようになってきている。1 型糖尿病は、インスリン産生  $\beta$  細胞に対する自己免疫応答によりおこる疾患である。自己抗体が認められるものも多く他の自己免疫疾患を合併しやすいが、 $\beta$  細胞に対する免疫応答が誘発される機構は不明である。これらを含め自己免疫疾患の克服において、寛容破綻から免疫応答異常が維持されるメカニズム解明が非常に重要であり、動物モデルを用いた個体レベルの解析が精力的に進められている。一方、メタボリック症候群で注目を集める動脈硬化、高血圧、心血管障害は患者数も多く、リスクファクター及び遺伝的素因の把握は非常に重要である。

## 2. 研究の目的

セリアック病や I 型糖尿病等の自己免疫疾患、心筋梗塞、血圧異常に共通した疾患関連遺伝子として細胞内アダプター蛋白質 LNK/SH2B3 の多型が相次いで報告されているが、免疫寛容の破綻や慢性炎症と関連する生理機能についてはほとんど知見がなく不明である。本研究では、Lnk/Sh2b3 の欠損や機能障害の標的となる細胞や細胞間相互作用を明らかにし、自己免疫疾患及び心血管障害の克服へ向けての基盤を確立する。免疫寛容維持や慢性炎症に関わる未知の制御機構を明らかにして、病態形成過程の理解と新たな治療標的の創出に資する。



### 3. 研究の方法

(1) Lnk/Sh2b3の発現とその制御: Lnk/Sh2b3 遺伝子座に改変型 GFP をノックインしたマウスを新たに作成し、非造血組織や少数の免疫細胞における発現、各種刺激や環境による発現変化を明らかにする。骨髄を始めとし、末梢リンパ器官や腸管粘膜組織、非免疫組織における Lnk/Sh2b3 発現細胞の同定、組織内分布を検討する。骨髄抑制剤投与や放射線照射により造血を誘導した際、様々な免疫操作を施した際の骨髄や二次リンパ組織における発現細胞の分布や発現レベルの変化を蛍光発現によりモニターする。

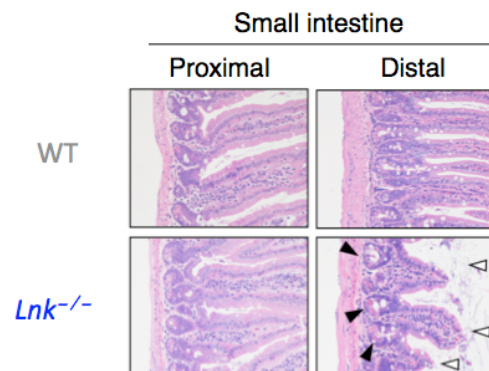
(2) 粘膜免疫、腸管リンパ球における Lnk/Sh2b3の機能: Lnk/Sh2b3 欠損による免疫応答の変化、粘膜免疫応答への影響を検討する。Lnk/Sh2b3 がセリアック病の危険因子として同定されていることを鑑み、これまで解析が進められていない腸管粘膜免疫応答への関与について解析する。細胞移植時の腸管組織依存的な Lnk/Sh2b3 発現変化、発現を抑制する因子や刺激の検索を行う。予備実験の結果、Lnk 欠損マウスの小腸遠位部で絨毛萎縮が自然発症することがわかった。この絨毛萎縮の性状について IEL 及び LPL の細胞分画の変化、サイトカイン産生能を検討する。養子リンパ球移入実験等により、免疫細胞あるいは腸管上皮細胞の関与を検討し、責任細胞を明らかにする。

(3) 樹状細胞における Lnk/Sh2b3の機能と免疫応答: Lnk/Sh2b3 欠損マウスで樹状細胞が増加しており、樹状細胞前駆細胞からの分化過程及び分化後の増殖に関与する GM-CSF や Flt-3L 等のサイトカイン反応性の亢進が原因であることが明らかになってきた。樹状細胞は GM-CSF 依存性にレチノイン酸産生性を獲得し、腸管指向性のリンパ球生成に関与する。Lnk/Sh2b3 欠損が樹状細胞の機能にどのように影響するのか調べる。GM-CSF 反応性亢進がみられる Lnk 欠損樹状細胞の免疫応答誘導能の変化を明らかにする。

### 4. 研究成果

Lnk/Sh2b3 の発現低下は造血系及び免疫系細胞の産生に大きな影響を及ぼす。各種刺激や環境による発現の変化、組織内での発現細胞の分布について、また免疫応答および病態形成における発現変化を検討するため、改良型 GFP である Venus を Lnk/Sh2b3 遺伝子座にノックインし生細胞で Lnk/Sh2b3 発現をモニターできるレポーターマウスを樹立した。一次、二次リンパ器官や腸管粘膜組織における Lnk/Sh2b3 発現細胞の組織内分布、Lnk/Sh2b3 発現量の変化を検討した。B 細胞、樹状細胞で発現が高いこと、B 細胞系では骨髄 B 前駆細胞で一旦低下し分化成熟に伴って発現が回復することが確認された。骨髄抑制剤である 5-FU の投与では、造血前駆細胞群における Lnk/Sh2b3 発現が数日にわたって一過性に低下し、緊急の造血誘導に対して有利に働くことが示された。造血前駆細胞でみられた Lnk/Sh2b3 発現は、胸腺細胞で一旦消失するものの成熟に伴い末梢 T 細胞で回復した。成熟 T 細胞でも B 細胞には及ばないものの発現することが確認された。腸管関連組織の T 細胞では脾臓や末梢血の T 細胞に比べ発現が低下することがわかった。そこで T 細胞分画を詳細に解析し、Lnk/Sh2b3 欠損により CD44 を高発現するメモリー型 CD8+T 細胞が有意に増加することを新たに見出した。この増加は IL-15 への反応性が Lnk/Sh2b3 欠損により亢進するためであることを明らかにした。野生型マウスに CD8+T 細胞を移入しても恒常性維持増殖が誘導されない環境のため増殖しないが、Lnk 欠損 CD8+T 細胞を移入すると数週のうちに増殖した。IL-15 欠損マウスに移入した場合この増殖はみられず IL-15 依存性であった。

セリアック病の危険因子として Lnk/Sh2b3 の一塩基多型が同定されていることを鑑み、これまで解析が進められていない腸管粘膜免疫応答への関与について解析した。腸管粘膜でも IFN- $\gamma$  産生性 CD8+T 細胞が増加しており、回腸部の絨毛萎縮が自然発症することがわかった。この絨毛萎縮の性状について、



IEL 及び LPL の細胞分画の変化、サイトカイン産生能、反応性を検討した。絨毛萎縮は Lnk 欠損 CD44+CD8+T 細胞を野生型 CD4+T 細胞とともにリンパ球欠損マウスに移入することで再現された。Lnk 機能障害が、CD44+CD8+T 細胞の IL-15 反応性亢進による増幅から腸管障害を起こすこと、セリアック病の病態形成に繋がる可能性を初めて明らかにした。

また、Lnk/Sh2b3 欠損マウスでは樹状細胞数が増加しており、前駆細胞の分化過程や分化後の増殖に関与する GM-CSF や Flt-3L 等への反応性亢進が原因となることが判明した。さらに Lnk/Sh2b3 欠損樹状細胞は、IL-15 に対しても感受性が亢進することがわかり、炎症応答への影響を検討している。

骨髄増殖性疾患症例で LNK/SH2B3 遺伝子の欠損や変異例が見つかった。Lnk 欠損造血幹細胞では TPO 反応性亢進により Bcl-xL 発現が亢進することを明らかにした。放射線照射に対し Lnk 欠損造血幹細胞は正常細胞よりも強い抵抗性を示し骨髄再建能を維持した。Lnk 欠損造血幹細胞の移植時生着能は Bcl-xL のノックダウンによりほぼ正常化した。LNK/SH2B3 変異例では、セカンドヒットによる遺伝子異常の蓄積確率が上昇するという発症機構への関与が考えられる。一方、短鎖アルギニンペプチドを付加した Lnk/Sh2b3 分子を作製し、核酸ベクターを用いない細胞内導入により造血腫瘍細胞株の増殖抑制が可能なことを示した。また、Lnk/Sh2b3 のドミナント阻害変異体の遺伝子導入により iPS 細胞からの造血細胞群の試験管内産生を促進できることを明らかにした。

一方、血管内皮前駆細胞が含まれる骨髄の c-Kit 陽性 Sca-1 陽性分化抗原陰性 (KSL) 分画から血管内皮への分化決定に Lnk/Sh2b3 を介する制御系が機能することを明らかにした。脊髄損傷モデルマウスにおいて、Lnk/Sh2b3 欠損 KSL 細胞の移入は損傷部の血管新生及び神経細胞群の回復を促進することを明らかにした。さらに、骨折時の血管新生や骨形成においても Lnk/Sh2b3 欠損では治癒が促進されることを示し、骨折治療に Lnk/Sh2b3 阻害が有用である可能性を提示した。血管内皮産生への Lnk/Sh2b3 の関与が明らかとなり、心血管障害との関連については血管内皮への影響にも注目して検討を進めることが必要である。

## 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 7 件)

- ① Suzuki N, Yamazaki S, Ema H, Yamaguchi T, Nakauchi H, Takaki S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. **Exp Hematol**. 査読有. 2012; 40:166-174. e3. doi: 10.1016/j.exphem. 2011.11.003.
- ② Tashiro K, Omori M, Kawabata K, Hirata N, Yamaguchi T, Sakurai F, Takaki S, Mizuguchi H. Inhibition of Lnk in mouse induced pluripotent stem cells promotes hematopoietic cell generation. **Stem Cells Dev**. 査読有. 2012; 21:3381-3390. doi: 10.1089/scd.2012.0100.
- ③ Kusano S, Kukimoto-Niino M, Hino N, Ohsawa N, Ikutani M, Takaki S, Sakamoto K, Hara-Yokoyama M, Shirouzu M, Takatsu K, Yokoyama S. Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its  $\alpha$  receptor. **Protein Sci**. 査読有. 2012; 21:850-864. doi: 10.1002/pro.2072.
- ④ Iseki M, Omori-Miyake M, Xu W, Sun X, Takaki S, Rawlings DJ, Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B cell activation and autoimmunity are mediated by CD4+ T cells and IL-4. **Int Immunol**. 査読有. 2012; 24:183-195. doi: 10.1093/intimm/dxr113.
- ⑤ Ikutani M, Yanagibashi T, Ogasawara M, Tsuneyama K, Yamamoto S, Hattori Y, Kouro T, Itakura A, Nagai Y, Takaki S\*, Takatsu K\*. [\*co-corresponding authors] Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. **J Immunol**. 査読有. 2012; 188:703-713. doi: 10.4049/jimmunol.1101270.
- ⑥ Looi CY, Imanishi M, Takaki S, Sato M, Chiba N, Sasahara Y, Futaki S, Tsuchiya S, Kumaki S. Octa-arginine mediated delivery of wild-type Lnk protein inhibits TPO-induced M-MOK megakaryoblastic leukemic cell growth by promoting apoptosis. **PLoS One**. 査読有. 2011; 6(8):e23640. doi: 10.1371/journal.pone.0023640.
- ⑦ Matsumoto T, Ii M, Nishimura H, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Fukui T, Kawakami Y, Kuroda T, Kwon SM, Iwasaki H, Horii M, Yokoyama A,

Oyamada A, Lee SY, Hayashi S, Kurosaka M, Takaki S, Asahara T. Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing. *J Exp Med*. 査読有. 2010; 207:2207-2223.  
doi: 10.1084/jem.20100321.

[学会発表] (計13件)

- ① Mori T, Iwasaki Y, Iseki M, Takaki S. An autoimmune disease-associated gene, Lnk/SH2B3 controls signaling of inflammatory cytokines in dendritic cells and regulates T cell differentiation. 第41回日本免疫学会学術集会. 神戸. 2012年12月.
- ② Iseki M, Takaki S. IgE production is under the control of the Sh2b adaptor protein family, Aps/Sh2b2 and Lnk/Sh2b3 in B cells. 第41回日本免疫学会学術集会. 神戸. 2012年12月.
- ③ Kudo F, Seki Y, Takaki S. Differentiation mechanism for innate response activator (IRA) B cell induced by LPS. 第41回日本免疫学会学術集会. 神戸. 2012年12月.
- ④ Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K. Characterization of innate IL-5-producing non-T cells in the large intestine regarding responsiveness to IL-33 and IgA production. 第41回日本免疫学会学術集会. 神戸. 2012年12月.
- ⑤ Mori T, Anraku M, Iwasaki Y, Katayama H, Iseki M, Takaki S. An autoimmune disease-associated gene, Lnk/SH2B3 controls signaling of inflammatory cytokines in dendritic cells and regulates regulatory T and helper T cell development. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉. 2011年11月.
- ⑥ Suzuki-Yamazaki N, Yamazaki S, Nakauchi H, Takaki S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by myeloproliferative disease associated gene product Lnk/Sh2b3. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉. 2011年11月.
- ⑦ Anraku M, Mori T, Katayama H, Hashimoto K, Iseki M, Takaki S. CD8+ T cells cause inflammation and atrophy of intestinal villi in the absence of Lnk/Sh2b3, a shared risk factor gene associated with type-1 diabetes and celiac disease. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉. 2011年11月.

- ⑧ Yanagibashi T, Ikutani M, Kouro T, Itakura A, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K. The major IL-5-producing cells in the intestine and lung are c-kit+ CD3e- cells. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉. 2011年11月.
- ⑨ Iseki M, Takaki S. IgE-specific impairment in humoral immune responses by the absence of Aps/Sh2b2, a member of Lnk/Sh2b adaptor family. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉. 2011年11月.
- ⑩ Tashiro K, Yamaguchi T, Kawabata K, Takaki S, Mizuguchi H. Enhanced hematopoietic differentiation from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by inhibition of an adaptor protein, Lnk. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉. 2011年11月.
- ⑪ Iwasaki Y, Koyama J, Katayama H, Hamamichi R, Iseki M, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S. Lnk/SH2B3, a gene associated with risk of several autoimmune diseases regulates proliferation and retinoic acid production of dendritic cells. The 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. Aug 2010.
- ⑫ Katayama H, Iwasaki Y, Fujimoto M, Hamamichi R, Iseki M, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. The maintenance of gut-associated lymphoid tissues regulated by Lnk/Sh2B3 adaptor, a shared risk factor gene associated with type 1 diabetes and celiac disease. The 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. Aug 2010.
- ⑬ Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Takaki S, Nakauchi H. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from teratomas formed by an injection of induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research. San Francisco, USA, June 16-19, 2010.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

名称: Lnkの機能が破壊又は抑制されている  
血管内皮細胞

発明者：コン サンモ、浅原 孝之、高木 智  
権利者：学校法人東海大学  
種類：特許  
番号：特許第 4822205 号  
取得年月日：2011 年 9 月 16 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

アウトリーチ活動情報

日本免疫学会主催「免疫ふしぎ未来 2012」  
平成 24 年 8 月 19 日（東京）  
実行委員として企画から参加して日本科学未来館での展示と実演を行った。

日本免疫学会主催「免疫ふしぎ未来 2011」  
平成 23 年 8 月 21 日（東京）  
実行委員として企画から参加して日本科学未来館での展示と実演を行った。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高木 智 (TAKAKI SATOSHI)  
独立行政法人国立国際医療研究センター・研究所 免疫制御研究部・部長  
研究者番号：10242116