

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293097

研究課題名(和文) 免疫・造血・心血管系疾患関連遺伝子Lnk/Sh2b3による制御破綻と病態形成機構

研究課題名(英文) Immunoregulatory function of Lnk/Sh2b3, a common risk factor gene for immune, hematopoietic and cardiovascular diseases

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・研究所・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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系・造血系・心血管系疾患に共通する疾患関連遺伝子としてLnk/Sh2b3が注目されており、Lnk/Sh2b3を介する制御系の標的細胞及び細胞機能の解明が課題となっている。リスクファクターとなることが報告されている疾患群を考慮したモデル系を用い病態形成機構を解析した。Lnk欠損では樹状細胞の変化からTh1応答が起きやすく易炎症性が獲得されること、IL-15反応性亢進による活性化CD8+T細胞の蓄積から腸管障害を起こすこと、IFN- $\gamma$ を産生するCD8+T細胞の腎臓や血管内皮への浸潤により高血圧誘導への感受性が亢進すること、血球細胞に依存する耐糖能異常が生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the LNK/SH2B3 gene are found in myeloproliferative disease patients, and LNK/SH2B3 polymorphisms have been reported to be associated with several autoimmune diseases and cardiovascular diseases. The intracellular adaptor Lnk/Sh2b3 regulates cytokine signals that control lymphohematopoiesis. However, the functions of Lnk/Sh2b3 related to autoimmune inflammation or cardiovascular dysfunction have not been understood. We have revealed that the ability of DCs to support Th1 response was altered by Lnk-deficiency. We have shown that Lnk/Sh2b3 plays a role in preventing pathogenic expansion and activation of CD8+ T cells leading to intestinal tissue damage in Lnk-/- mice. IFN- $\gamma$ -producing CD8+ T cells were increased in kidney and arteries, resulting in increased susceptibility for hypertension. We also found that Lnk-/- mice showed impaired glucose tolerance that was largely depend on the abnormality of hematopoietic cells.

研究分野：免疫学

キーワード：疾患関連遺伝子 自己免疫 高血圧 糖尿病 シグナル伝達 骨髄増殖性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系・造血系を構築する細胞群は、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・造血細胞の分化・活性化は、抗原やサイトカイン、細胞接着や遊走因子など諸々の細胞外からの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、細胞の増殖・分化決定機構という生物学の基本命題、免疫系の作動・維持機構の理解、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重要なきをすることがわかってきた。

Lnk/Sh2b3 は、主に造血系細胞及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。申請者らは、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)、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)、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、血小板を中心とした解析から、サイトカインシグナルと細胞接着系のクロストークに關与する制御系として Lnk/Sh2b3 を介した分子機構を解明した (J Clin Invest, 2010)。

一方、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った複数のグループから、自己免疫疾患である 1 型糖尿病において LNK/SH2B3 遺伝子のアミノ酸置換を伴う SNP (R262W) が疾患関連多型として報告された (Nat Genet, 2007)。さらに、セリアック病患者群の解析からも同じ SNP との連関が相次いで報告された (Nat Genet, 2008) (N Engl J Med, 2008)。心筋梗塞、高血圧の症例の GWAS から、同 SNP (R262W) との有意な連関が報告され、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。さらに、骨髄増殖性疾患群の解析からは、LNK/SH2B3 遺伝子の欠損やアミノ酸変異例が JAK2 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発症において LNK/SH2B3 依存性経路の破綻が關与することがわかってきた。

我々は、骨髄増殖性疾患発症の分子機序の一つとして、Lnk を欠損する造血幹細胞では、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、Lnk 欠損造血幹細胞は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増大して

いることを明らかにした (Exp Hematol, 2012)。これがセカンドヒット等による遺伝子異常が蓄積する確率を上昇させ、増殖性疾患の発症に至る可能性が考えられる。

以上のように、申請者ら及び海外複数のグループにより、Lnk 欠損ないし機能阻害が B 細胞及び血小板の過剰産生や造血幹細胞の増幅及び機能亢進に繋がるということが明らかにされてきた。しかし、現在明らかになっている Lnk/Sh2b3 の作用点や機能からは、GWAS で関連が示された自己免疫応答や心血管障害の危険性が高まるメカニズムは未だ不明である。免疫系・造血系・心血管系疾患に共通する疾患関連遺伝子として、Lnk/Sh2b3 の機能異常と疾患感受性、免疫寛容維持に与える影響、動脈硬化や血圧への關与のメカニズム、Lnk/Sh2b3 を介する制御系の標的細胞及び細胞機能等の解明が重要な検討課題として浮かんできている。

## 2. 研究の目的

自己免疫疾患、骨髄増殖性疾患、高血圧及び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。Lnk/Sh2b3 は B 細胞や造血幹細胞の産生・維持における抑制制御系を担うが、免疫寛容破綻や慢性炎症との関連は全く不明である。本研究では、セリアック病や 1 型糖尿病などの自己免疫疾患、血管内皮や血小板の機能異常とも関連する心血管障害、さらに糖代謝異常が、Lnk/Sh2b3 依存性制御系の破綻から、どのように波及し病態の形成に至るのかを明らかにする。Lnk/Sh2b3 変異による機能変化ならびに機能異常の標的となる細胞や細胞間相互作用を解明し、疾患克服に向けての基盤を確立する。慢性炎症に関わる新規制御機構をあぶり出す有用な疾患モデルであり、その解析により新たな治療標的の創出及び修復法の確立に資することを目的とした。

## 3. 研究の方法

リスクファクターとなることが報告されている疾患群を考慮し、Lnk/Sh2b3 欠損マウスで自然発症する腸管組織障害の病態形成機構を解析する。高血圧誘導モデル、糖尿病モデルを用い、Lnk/Sh2b3 の欠損ないし機能障害が免疫寛容破綻や慢性炎症の修飾にどのように關連するか、障害の標的となるのはいかなる細胞集団のどのような細胞機能なのかを明らかにする。機能変化が疑われる T 細胞、樹状細胞に特に注目し異常を明らかにするとともに、病態形成への關与を RAG 欠損マウスとの交配、それらへの養子移入、骨髄キメラマウスの作成等により検証する。

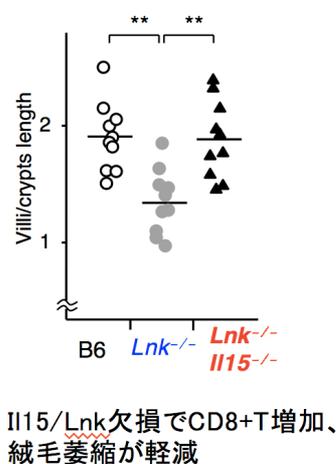
一方、Lnk/Sh2b3 発現をモニターできる Lnk-Venus ノックインレポーターマウスを樹立する。病態形成時の Lnk 発現細胞の動態、Lnk 発現の差による機能変化を自己免疫の標的臓器や骨髄組織、末梢リンパ関連組織で明らかにする。病態形成過程や病態の維持における発現変化やその病態形成への関与、分子機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

初年度は、Lnk/Sh2b3 遺伝子座に改良型 GFP である Venus をノックインしたレポーターマウスの作成により、各組織の生細胞で Lnk/Sh2b3 発現をモニターできるシステムを樹立した。腸管での自己免疫様組織障害機構を明らかにし、新しいセリアック病モデルとしての可能性を提示した。

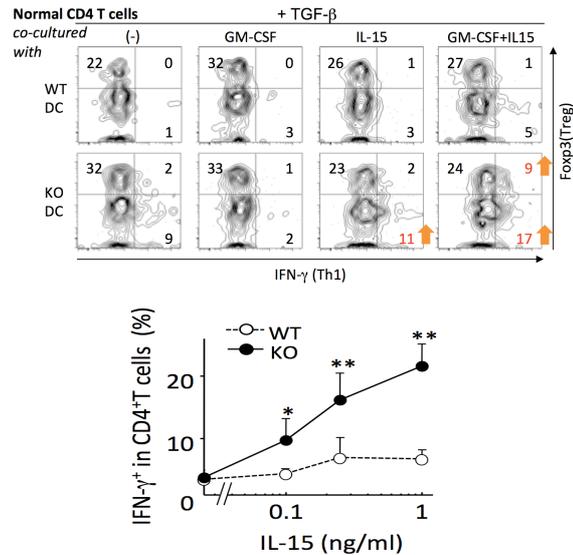
改良型 GFP である Venus を Lnk/Sh2b3 遺伝子座にノックインし、Lnk/Sh2b3 発現をモニターできるレポーターマウスを樹立し、これまでに報告がなされていた B 細胞や造血前駆細胞以外に末梢 T 細胞や樹状細胞でも Lnk/Sh2b3 が発現することを確認した。T 細胞における Lnk/Sh2b3 欠損の影響を解析し、欠損マウスでは活性化 CD8+T 細胞が増加すること、この増加は IL-15 反応性亢進に因ることを見出した。組織障害に着目して検討し、腸管組織でも活性化 CD8+T 細胞が増加し、小腸遠位部の絨毛萎縮を自然発症することがわかった。この絨毛萎縮は、Lnk 欠損 CD8+T 細胞を野生型 CD4+T 細胞とともにリンパ球欠損 (RAG 欠損) マウスに移入する事により再現され、絨毛萎縮に CD8+T 細胞が大きな役割を果たしていることがわかった。IL-15 欠損との交配により検討したところ、Lnk 欠損で観察された活性化 CD8+T 細胞の蓄積はほぼ正常化し、Lnk 欠損 IL-15 欠損マウスでは腸管絨毛の萎縮はみられなくなった。Lnk/Sh2b3 機能障害

が IL-15 反応性亢進による活性化 CD8+T 細胞の蓄積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。



Lnk-Venus レポーターマウスの解析から、免疫応答の初動から制御に重要な機能を果

たす樹状細胞においても Lnk/Sh2b3 が高発現することを確認した。平成 26 年度は、樹状細胞における炎症性サイトカインに対する反応性の変化の詳細を検討した。Lnk 欠損マウスでは樹状細胞が増加しており GM-CSF や IL-15 に対して感受性が亢進することがわかった。さらに樹状細胞における Lnk/Sh2b3 の機能と樹状細胞機能の変化による T 細胞分化誘導や活性化・維持への影響を明らかにした。様々な環境下、特に制御性 T 細胞を誘導するような環境下においても IFN- $\gamma$  産生性ヘルパー T (Th1) 細胞分化を誘導する機能が Lnk 欠損樹状細胞では亢進していることが明らかになった。



この現象のメカニズムについて、IL-15 反応性亢進により樹状細胞上の IL-12R $\beta$  鎖の発現上昇が生じており、IL-12 のオートクライン的な作用によりナイーブ T 細胞への IFN- $\gamma$  供給が増強していることを明らかにした。さらに、GM-CSF 反応性亢進によってレチノイン酸産生能が増強する。その結果、TGF- $\beta$  存在下に制御性 T 細胞が誘導される環境下においても IL-15 と GM-CSF によって IFN- $\gamma$  産生性ヘルパー T 細胞が誘導されることがわかった。Lnk 欠損個体では Th1 応答が起きやすくなっており、易炎症性が獲得されていることが考えられた。

平成 27 年度は、高血圧及び糖尿病病態の解析を推進した。LNK/SH2B3 の多型は心血管障害のリスクファクターでもあると報告されているが、心血管系での機能は未だ不明である。少量のアンギオテンシン II を持続的に負荷したところ、野生型マウスでは血圧上昇が認められない量でも Lnk 欠損マウスでは高血圧が誘導されることがわかった。この高血圧感受性亢進のメカニズムを検討し明らかにした。心血管組織やアンギオテンシン産生に関わる腎臓に浸潤する免疫細胞群を解析し、サイトカイン産生能、血管内皮の応答

性変化について詳細に検討した。定常状態で、Lnk 欠損マウスの腎臓には野生型に比して CD8+T 細胞の浸潤が多く起こっており、これらは IFN- $\gamma$  を産生する活性化状態にあること、腎臓が慢性炎症状態に陥っていることがわかった。これに加えて、大動脈の外周組織にも細胞浸潤が観察され、内皮から産生される NO レベルが低下していた。これらの変化による動脈の弛緩障害が高血圧の感受性亢進に寄与していることを見出した。

さらに、糖尿病の病態形成における Lnk 依存性制御の破綻の影響と細胞標的を解析した。1 型糖尿病と LNK/SH2B3 遺伝子の SNP との関連が報告されているが、どの細胞のどのような反応性に影響し膵島障害のリスクとなるのか全くわかっていない。Lnk 欠損マウスでは定常状態の血糖値が高く、グルコース負荷試験で耐糖能が低下していることを新たに見出した。インスリン血中濃度は正常であり、インスリン負荷試験ではインスリン抵抗性が認められた。インスリン標的組織の異常による耐糖能異常は耐糖能低下であり、Lnk/Sh2b3 欠損骨髄を野生型レシピエントに移植した骨髄キメラマウスでも耐糖能異常が観察されることから、血球細胞に依存する耐糖能異常であると考えられた。リンパ球の関与について RAG 欠損マウスと Lnk/Sh2b3 マウスを交配し重複欠損マウスを作成したが、依然として耐糖能異常は観察されたことから、T 細胞や B 細胞の関与は補助的であると結論した。Lnk/Sh2b3 欠損により IL-15 への反応性亢進が生じることから、IL-15 欠損マウス、MyD88 欠損マウスとの交配により、血糖値上昇の変化について解析を進めている。

今後は、作成したマウスをドナーやレシピエントとして用いた骨髄移植マウスを作製し、免疫系細胞が再構成された後にグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行い、耐糖能及びインスリン抵抗性を評価する。骨髄球系細胞、NK 及び NKT 細胞の関与について検討する。これらの解析により血糖値上昇をもたらす責任細胞を同定する。Lnk-Venus ノックインマウスを用いた解析からはリンパ球以外にも、NK 細胞、樹状細胞、マクロファージ等の細胞集団にも Lnk 発現が観察されている。それらの細胞集団についてもサイトカイン産生や活性化の変化を解析する。交配に血糖値改善がみられる群、血糖値上昇がみられる群に分類し、腸内細菌叢の変化について検討する。Lnk 機能変化と腸管感染抵抗性に関係がみられるか検討することも課題である。

## 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 Saleh MA, McMaster WG, Wu J, Norlander AE, Funt SA, Thabet SR, Kirabo A, Xiao L, Chen W, Itani HA, Michell D, Huan T, Zhang Y, Takaki S, Titze J, Levy D, Harrison DG, Madhur MS. Lymphocyte adaptor protein LNK deficiency exacerbates hypertension and end-organ inflammation. *J Clin Invest.* 2015; 125:1189-202. doi: 10.1172/JCI76327.
- ② Mori T, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Katayama H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S. Lnk/Sh2b3 controls the production and function of dendritic cells, regulates the Induction of IFN- $\gamma$ -producing T cells. *J Immunol.* 2014; 193: 1728-1736. doi: 10.4049/jimmunol.1303243.
- ③ Katayama H, Mori T, Seki Y, Anraku M, Iseki M, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu T, Takaki S. Lnk/Sh2b3 adaptor protein prevents the accumulation of inflammatory CD8+ T cells and intestinal villous atrophy. *Eur J Immunol.* 2014; 44: 1622-1632. doi: 10.1002/eji.201343883.
- ④ Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T. Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Int J Hematol.* 2014; 99: 393-406. doi: 10.1007/s12185-014-1534-x.
- ⑤ Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki Mi, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R. Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation. *Cell Metabolism.* 2013; 18: 759-66. doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.017.
- ⑥ Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, Otsu M, Nakauchi H. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther.* 2013; 21:1424-31. doi: 10.1038/mt.2013.71.
- ⑦ Son A, Oshio T, Kawamura YI, Hagiwara T, Yamazaki M, Inagaki-Ohara K, Okada T, Wu P, Iseki M, Takaki S, Burkly LC, Dohi T. TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice. *Mucosal Immunol.* 2013; 6:1131-42. doi: 10.1038/mi.2013.10.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Iseki M, Kudo F, Takaki S. Germinal center B cell survival and optimal IgE production are controlled by Lnk/Sh2b family adaptor protein Aps/Sh2b2. 第 44 回 日本免疫学会学術集会. 札幌. 2015 年 11 月 18-20 日.
- ② 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.
- ③ Kudo F, Takaki S. Inhibitory effects of interferon- $\gamma$  on cytokine production in group 2 innate lymphoid cells. 第 44 回 日本免疫学会学術集会. 札幌. 2015 年 11 月 18-20 日.
- ④ Mori T, Iseki M, Takaki S. Lnk/Sh2b3 adaptor protein controls cytokine responses of dendritic cells, and regulates the induction of IFN- $\gamma$ -producing T cells. 第 43 回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014 年 12 月 10-12 日.
- ⑤ Yamazaki N, Takaki S. IgM+ plasma cells contribute to the sufficient production of IgG by secreting IL-10 and IL-13. 第 43 回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014 年 12 月 10-12 日. (Best Presentation Award 受賞)
- ⑥ Iseki M, Kudo F, Takaki S. Lnk/Sh2b family adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells contributes to germinal center B cell survival and optimal IgE production in vivo. 第 43 回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014 年 12 月 10-12 日.
- ⑦ Kudo F, Seki Y, Takaki S. Suppression of cytokine production from group 2 innate lymphoid cells by interferon- $\gamma$ . 第 43 回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014 年 12 月 10-12 日.
- ⑧ Mori T, Katayama H, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Ikutani M, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. Lnk/Sh2b3, an intracellular adaptor associated with celiac disease and autoimmune diabetes, regulates accumulation of inflammatory T cells and prevents intestinal villous atrophy. The 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy. Aug 2013.
- ⑨ Iseki M, Kudo F, Takaki S. IgE production and germinal center formation are regulated by the adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells.

第 42 回 日本免疫学会学術集会. 千葉. 2013 年 12 月 11-13 日.

- ⑩ Seki Y, Katayama H, Mori T, Iseki M, Takaki S. Lnk/Sh2b3 adaptor protein prevents the accumulation of inflammatory CD8+ T cells and intestinal villous atrophy. 第 42 回 日本免疫学会学術集会. 千葉. 2013 年 12 月 11-13 日.
- ⑪ Mori T, Seki Y, Iwasaki Y, Yamazaki-Suzuki N, Iseki M, Takaki S. An autoimmune disease-associated gene, Lnk/SH2B3 controls production and functions of DC subsets and regulates inflammatory T cell differentiation. 第 42 回 日本免疫学会学術集会. 千葉. 2013 年 12 月 11-13 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

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・研究所・免疫制御研究部長  
研究者番号: 10242116

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: