

課題番号 : 25指107

研究課題名 : 自己免疫疾患関連遺伝子の機能解明による新規治療標的の探索と制御法開発

主任研究者名 : 高木 智

分担研究者名 : 土肥多恵子、鈴木 春巳

キーワード : 自己免疫疾患、疾患関連遺伝子、サイトカイン、シグナル伝達、慢性炎症

研究成果 :

複数の自己免疫疾患の疾患関連遺伝子として注目されるLnk/Sh2b3の免疫応答における作用、標的細胞および制御系を明らかにすることにより自己免疫疾患の新たな治療標的の探索を進めた。リスクファクターとなっている疾患群を対象とした疾患動物モデル系を導入し、Lnk欠損が病態形成や維持にどのように影響するか検討した。自然発症する小腸絨毛萎縮について解析を行い、Lnk/Sh2b3機能障害が活性化CD8⁺T細胞のIL-15反応性亢進による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。腸管組織でのIL-15産生量は正常マウスとほぼ同程度であり、CD8⁺T細胞の質的な変化による病態形成関与の検証としてIL-15欠損との交配を行った。IL-15^{-/-}Lnk^{-/-}重複欠損マウスでは、CD44^{hi}CD8⁺T細胞の増加が軽減しており正常マウスと同程度になっていた。Lnk^{-/-}でみられた腸管組織の絨毛萎縮もIL-15^{-/-}Lnk^{-/-}重複欠損マウスではみられなくなった。Lnk欠損によるCD8⁺T細胞のIL-15反応性の亢進は正常量IL-15存在下でも生じるCD8⁺T細胞の活性化と蓄積をもたらした腸管組織障害の主因となることが示唆された。

多発性硬化症においてもLNK/SH2B3遺伝子多型と疾患関連性があることが新たに報告されている。またナイーブCD4⁺T細胞の試験管内培養によるヘルパーT(Th)細胞の分化誘導では、Lnk欠損細胞からIFN- γ 産生性Th細胞、GM-CSF産生性Th細胞の誘導性が亢進する傾向が見られた。モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)への影響を検討したところ、Lnk欠損マウスでは重症度がやや軽減することがわかった。関節炎モデルとしてコラゲン誘導性関節炎をLnk欠損マウスに誘導し正常マウスの病状と比較した。Lnk欠損マウスにおいても追加免疫から発症するまでの時期、初期の炎症反応に明らかな違いは観察されなかった。また、病状の経過や重症度においてもLnk欠損による変化は観察できなかった。関節リウマチ患者でLNK/SH2B3のSNPsとの関連が存在することが報告されているが、本マウス疾患モデルではLnk欠損の影響は観察されなかった。関節部の構造や性状を含め動物種間の違いによるものか、本関節炎モデルの病態形成機構に依存したものか、現時点では判断不能である。

Lnk欠損マウスでは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への反応性亢進が原因であることを明らかにした。さらに、Lnk欠損樹状細胞は、CD8⁺T細胞でみられたのと同様にIL-15に対しても感受性が亢進することが判ってきた。これらの炎症性サイトカインに対する反応性の変化とそのT細胞分化への影響、T細胞の蓄積との関連を明らかにした。腸管リンパ節のLnk欠損樹状細胞と野生型脾臓ナイーブT細胞を共培養すると、IFN- γ 産生が亢進し、さらにIL-15の刺激に依存してその割合が増加する。この現象のメカニズムについて明らかにした。さらに、Lnk欠損マウスではクロスプレゼンテーションを行うCD103⁺CD8⁺樹状細胞の増加がみられた。これらの樹状細胞の表現型が内因性のものか体内環境の影響によるものか、CD45.1/45.2アロタイプ系を利用し野生型とLnk欠損の混合骨髄キメラを作製し同一個体内の機能相違を調べ、内因性の異常に因ることを解明した。

Subject No. : 25-107

Title : Functional analysis of autoimmune disease-associated gene for the identification of therapy targets and immune modulation.

Researchers : Satoshi Takaki, Taeko Dohi, Harumi Suzuki

Key word : autoimmunity, disease-associated gene, cytokine, signal transduction, chronic inflammation

Abstract :

Lnk/Sh2b3 is an adaptor protein that regulates cytokine signaling in lymphohematopoiesis. In human, a nonsynonymous SNP in LNK/SH2B3 gene has been reported as a risk variant for several autoimmune diseases including diabetes. However, the functions of Lnk/Sh2b3 related to autoimmune inflammation have been largely unrevealed. We found that CD44^{hi}IFN- γ ⁺CD8⁺ effector/memory T cells were increased in Lnk^{-/-} mice, and that many mice exhibited signs of villous atrophy in the small intestine. We found Lnk^{-/-}CD8⁺ T cells survived longer in response to IL-15 and proliferated even in non-lymphopenic host animals. Transfer of Lnk^{-/-}CD8⁺ T cells together with wild-type CD4⁺ T cells into RAG2-deficient mice recapitulated villous atrophy. In Il15^{-/-} host animals, Lnk^{-/-}CD8⁺ T cells did not divide at all during 3 weeks of observation after transfer. The basal levels of IL-15 that are constitutively produced in intestinal tissues seem to be sufficient for the accumulation of IFN- γ producing CD8⁺ T cells in ileum, where villous abnormality is observed. Expansion of CD44^{hi}IFN- γ ⁺CD8⁺ effector/memory T cells as well as intestinal villi abnormalities were not observed in Lnk^{-/-}Il15^{-/-} double-deficient mice. Thus, Lnk/Sh2b3 plays a role in limiting pathogenic expansion and activation of CD8⁺ T cells in the physiological levels of IL-15 produced in non-inflammatory conditions that could lead to intestinal tissue damage. We are also evaluating the susceptibility of Lnk^{-/-} mice against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and collagen-induced arthritis, because associations of SNPs in LNK/SH2B3 with multiple sclerosis (MS) or rheumatoid arthritis (RA) have been reported too.

We revealed that Lnk/Sh2b3 regulates DC production, and that the ability of dendritic cells (DCs) to support Th1 or Treg cells was altered by Lnk-deficiency in response to GM-CSF and IL-15. We confirmed Lnk/Sh2b3 expression in DC-lineage cells, and found DCs were increased in Lnk^{-/-} mice. We evaluated DC progenitors in Lnk^{-/-} mice and found that myeloid dendritic precursors (MDPs) were increased. In BrdU incorporation assay, most of DC progenitors in BM rapidly incorporated BrdU, and BrdU⁺ fractions in splenic pre-cDC and cDCs were increased in Lnk^{-/-} mice compared to WT mice. CD8⁺CD103⁺ DCs in spleen and lymph nodes were increased due to increased sensitivity to GM-CSF, whereas the percentage of CD4⁺ cDCs, CD8 α ⁺ cDCs and pDCs was not changed. Next, we inquired whether any of the functions of mature cDCs were altered in the absence of Lnk/Sh2b3. GM-CSF-mediated induction of enzyme activity essential for retinoic acid production was enhanced. In addition, IFN- γ production was significantly increased by the stimulation of IL-15 from Lnk^{-/-} DCs. Lnk^{-/-} DCs supported more efficient production of IFN- γ ⁺CD4⁺ T cells by IL-15 and GM-CSF even in the presence of TGF- β . Finally we directly added IFN- γ to CD4⁺ T cells and showed the appearance of IFN- γ ⁺ Foxp3⁻ Th1 cells in the presence of TGF- β and retinoic acid. Thus, the ability of DCs to support Th1 or Treg cells was altered by Lnk deficiency in response to inflammatory cytokines GM-CSF and IL-15. We generated BM chimeric mice in which nearly half of the myeloid lineage cells was derived from Lnk^{-/-}CD45.2⁺ precursors and the remainder was derived from normal CD45.1⁺ precursors, and confirmed that the enhanced responses of Lnk^{-/-} DCs were due to cell intrinsic changes. These results indicate that Lnk/Sh2b3 plays a role in regulating production of DCs, and contributes to control of immune responses against inflammation or infection.

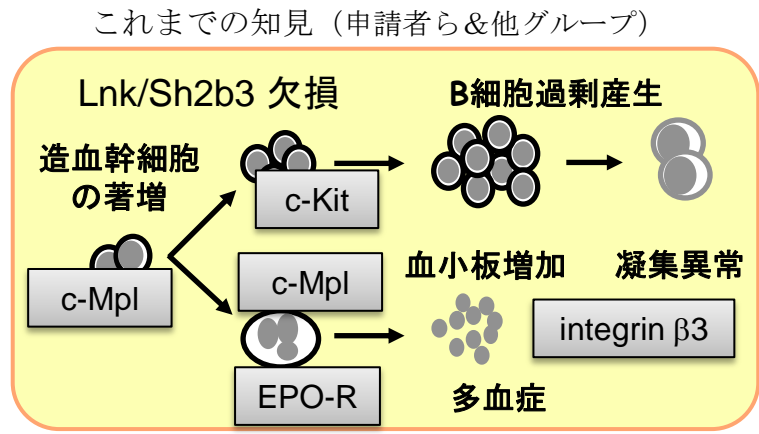
25指107 自己免疫疾患関連遺伝子の機能解明による新規治療標的の探索と制御法開発

<H26年度 研究報告>

(主任研究者) 高木 智

Lnk/Sh2b3
1型糖尿病、セリアック病、
関節リウマチ、に共通する
自己免疫疾患関連遺伝子

課題: 自己免疫・炎症にどのように
関係するか全く不明・・・



心血管障害とも関連 (GWAS)
骨髄増殖性症候群の原因 (変異)

対応する疾患モデルで検討

新開発Lnk-Venus発現モニター動物
炎症部や造血器官での発現細胞、標的細胞の同定
発現変化の把握

【H25年度 達成】 自然発症絨毛萎縮
腸炎

【H26 終了】 コラゲン誘発性関節炎

【H26年度 達成】
炎症と造血誘導の関係
樹状細胞への影響を解明

【進行中】 耐糖能異常, 糖尿病

腸管感染抵抗性
との関連を検証

知られていない免疫応答制御系や標的の組合せを同定

**新しい治療標的の創出
制御に資する生物製剤の開発**

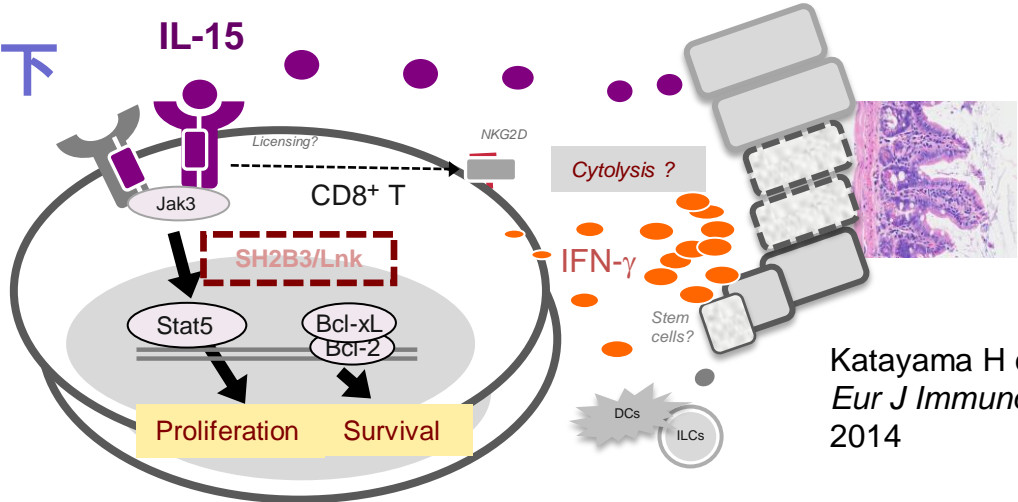


炎症性組織障害と SH2B3/Lnk欠損・機能低下

成果1

自然発症性小腸絨毛萎縮
(対象疾患: セリアック病?)

CD8⁺T細胞のIL-15応答性亢進によりIFN- γ 産生が増加。
小腸組織異常の原因となる。



Katayama H et al.
Eur J Immunol,
2014

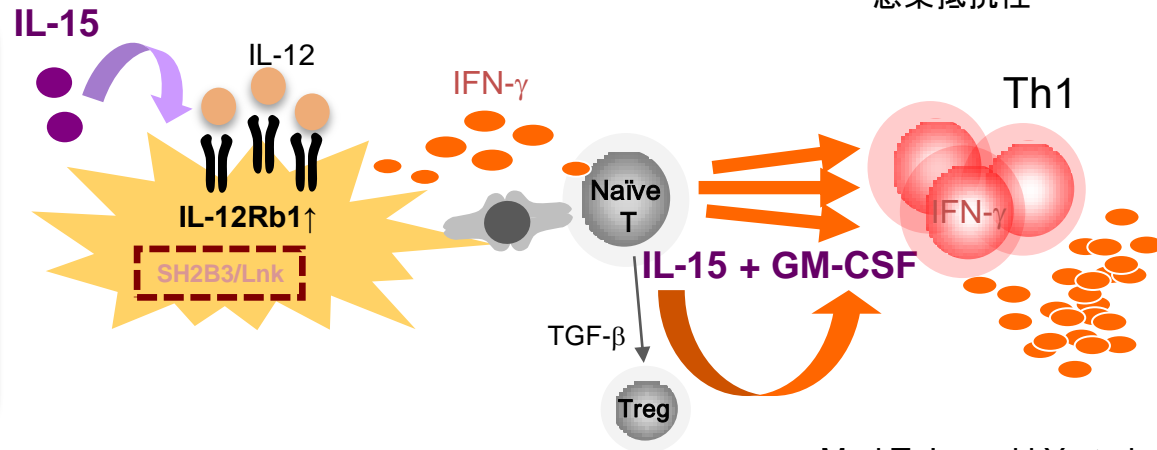
課題:
・抗IL-15抗体, Jak3
阻害剤投与の効果
・糖尿病, 腸炎,
感染抵抗性

治療標的 → IL-15, Jak3

成果2

樹状細胞における機能と
免疫応答への影響

GM-CSF応答性亢進により
生存やレチノイン酸産生が上昇。
IL-15応答性も亢進し、Th1誘
導能が上昇する。



Mori T, Iwasaki Y et al.
J Immunol, 2014

課題番号 : 25指107

研究課題名 : 自己免疫疾患関連遺伝子の標的探索と制御法開発

主任研究者名 : 高木 智

分担研究者名 : 高木 智

キーワード : 自己免疫疾患、疾患関連遺伝子、サイトカイン、シグナル伝達

研究成果 :

これまでセリアック病病態の一部を反映すると考えられる自然発症性の小腸絨毛萎縮について解析を行った。Lnk/Sh2b3機能障害が活性化CD8⁺T細胞のIL-15反応性亢進による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。腸管組織でのIL-15産生量は正常マウスとほぼ同程度であり、Lnk/Sh2b3の機能異常は、CD8⁺T細胞の質的な変化すなわちIL-15への反応性亢進をもたらし、定常状態レベルのIL-15にも反応して活性化して腸管組織障害の増悪因子、危険因子となることが考えられる。本年度は、上記仮説の検証の一つとしてIL-15欠損との交配を行った。IL-15^{-/-}/Lnk^{-/-}重複欠損マウスでは、CD44^{hi}CD8⁺T細胞の増加が軽減しており正常マウスと同程度になっていた。Lnk^{-/-}でみられた腸管組織の絨毛萎縮もIL-15^{-/-}/Lnk^{-/-}重複欠損マウスではみられなくなった。Lnk欠損によるCD8⁺T細胞のIL-15反応性の亢進は正常量IL-15存在下でも生じるCD8⁺T細胞の活性化と蓄積をもたらす腸管組織障害の主因となることが示唆された。

GWAS 解析から多発性硬化症においてもLNK/SH2B3遺伝子多型と疾患関連性があることが報告されている。またナイーブCD4⁺T細胞の試験管内培養によるヘルパーT(Th)細胞の分化誘導では、Lnk欠損細胞からIFN- γ 産生性Th細胞、GM-CSF産生性Th細胞の誘導性が亢進する傾向が見られた。ミエリン由来ペプチドを免疫することによりモデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)発症の経過、重症度を検討したところ、予想に反してLnk欠損マウスでは重症度が軽減し、症状が一旦軽快する度合いも大きいことがわかった。

関節炎モデルとしてコラゲン誘導性関節炎をLnk欠損マウスに誘導し正常マウスの病状と比較した。Lnk欠損マウスにおいても追加免疫から発症するまでの時期、初期の炎症反応に明らかな違いは観察されなかった。また、病状の経過や重症度においてもLnk欠損による変化は観察できなかった。関節リウマチ患者でLNK/SH2B3のSNPsとの関連が存在することが報告されているが、本マウス疾患モデルではLnk欠損の影響は観察されなかった。関節部の構造や性状を含め動物種間の違いによるものか、本関節炎モデルの病態形成機構に依存したものか、現時点では判断不能である。

研究期間を考え対象疾患を明らかに関与のある疾患群に絞るべきであるとの評価コメントをふまえて、今後は腸管障害モデル、高血圧モデルに集中して解析を進める。また、解析から浮かび上がってきた標的細胞や標的制御系に対する抗体や試薬を用いて疾患モデルでの治療効果を検討する。

課題番号 : 25指107

研究課題名 : ヘルパーT細胞分化における自己免疫疾患関連遺伝子の機能解析

主任研究者名 : 高木 智

分担研究者名 : 鈴木 春巳

キーワード : 疾患関連遺伝子、サイトカイン、ヘルパーT細胞、樹状細胞

研究成果 :

骨髄増殖性疾患や造血系腫瘍におけるLnk/Sh2b3機能については知見がかなり集まってきているが、自己免疫疾患に繋がる免疫寛容の破綻や慢性炎症とどのように関連するかは現在のところ全く不明であり急ぎ解明が待たれるところである。ヘルパーT細胞は産生するサイトカインによりいくつかの亜集団に分けられ、その分化の促進や障害あるいは偏りにより免疫疾患病態形成に大きな影響をもたらす。本研究では、ヘルパーT細胞分化におけるSh2b3自己免疫疾患関連遺伝子の機能解析を進めた。

初年度に、Lnk欠損マウスでは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への反応性亢進が原因であることを明らかにした。本年度は、樹状細胞における機能と免疫応答への影響、T細胞プライミングやクロスプレゼンテーションについて検討を推進した。Lnk欠損樹状細胞は、CD8+T細胞でみられたのと同様にIL-15に対しても感受性が亢進することが判ってきた。これらの炎症性サイトカインに対する反応性の変化とそのT細胞分化への影響、T細胞の蓄積との関連を明らかにした。腸管リンパ節のLnk欠損樹状細胞と野生型脾臓ナイーブT細胞を共培養すると、IFN- γ 産生が亢進し、さらにIL-15の刺激に依存してその割合が増加する。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 γ 供給が増強していることを明らかにした。Lnk欠損マウスではクロスプレゼンテーションを行うCD103+CD8+樹状細胞の増加がみられた。これらの樹状細胞の表現型が内因性のものか体内環境の影響によるものか、CD45.1/45.2アロタイプ系を利用し野生型とLnk欠損の混合骨髄キメラを作製し同一個体内の機能相違を調べ、内因性の異常に因ることを解明した。

今後は、樹状細胞の機能変化によるナイーブCD4+T細胞のTh分化への影響について検討を進める。Lnk欠損T細胞のサイトカインシグナル、インテグリンシグナルにおける影響を検討する。特にIL-23, IL-21, IL-6に対する反応に注目して、炎症性Th1, Th17細胞の分化へのLnk欠損ならびに機能変化の影響を明らかにする。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25-107

研究課題名：自己免疫疾患関連遺伝子の機能解明による新規治療標的の探索と制御法開発

主任研究者名：高木 智

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Lnk/Sh2b3 controls the production and function of dendritic cells and regulates the induction of IFN- γ -producing T cells.	Mori T, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Katayama H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S.	J Immunol	193	2014
Lnk prevents inflammatory CD8+ T-cell proliferation and contributes to intestinal homeostasis.	Katayama H, Mori T, Seki Y, Anraku M, Iseki M, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S	Eur J Immunol	44	2014
Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha\beta3$	Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T	Int J Hematol	99	2014
Retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 is associated with colitis but not tumors in a murine colitic cancer model	Otsubo T, Hagiwara T, Okamura T, Ishizaka Y, Kawamura YI, Dohi T	PLoS One	10	2015
Pathological activation of canonical nuclear-factor κ B by synergy of tumor necrosis factor α and TNF-like weak inducer of apoptosis in mouse acute colitis.	Dohi T, Kawashima R, Kawamura YI, Otsubo T, Hagiwara T, Amatucci A, Michaelson J, Burkly LC.	Cytokine	69	2014
Chemokine receptor CCR8 is required for lipopolysaccharide-triggered cytokine production in mouse peritoneal macrophages	Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Hagiwara T, Mizutani N, Okada T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Matsukawa A, Haga T, Kakuta S, Iwakura Y, Hosokawa S and Dohi T	PLoS One	9	2014
The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates functional expansion of colonic regulatory T cells.	Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K.	Nature Immunology	15	2014
Therapeutic adenoviral gene transfer of a glycosyltransferase for prevention of peritoneal dissemination and metastasis of gastric cancer.	Kawamura YI, Adachi Y, Curiel DT, Kawashima R, Kannagi R, Nishimoto N and Dohi T.	Cancer Gene Ther	21	2014
The thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells.	Nitta T, Muro R, Shimizu Y, Nitta S, Oda H, Ohte Y, T Goto M, Yanobu R, Narita T, Takayanagi H, Yasuda H, Okamura T, Murata S, Suzuki H.	EMBO Rep	16	2015
The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naive T cells.	Muro R, Nitta T, Okada T, Ideta H, Tsubata T, Suzuki H.	PLoS One	10	2015
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development.	Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS, Suzuki H.	PLoS One	9	2014

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Lnk/Sh2b3 adaptor protein controls cytokine responses of dendritic cells, and regulates the induction of IFN- γ -producing T cells .	Mori T, Iseki M, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
IgM+ plasma cells contribute to the sufficient production of IgG by secreting IL-10 and IL-13.	Yamazaki N, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
Lnk/Sh2b family adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells contributes to germinal center B cell survival and optimal IgE production in vivo.	Iseki M, Kudo F, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
Suppression of cytokine production from group 2 innate lymphoid cells by interferon- γ .	Kudo F, Seki Y, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
Sialic-acid-binding Ig-like lectins, potential peripheral markers for mucosal damage of inflammatory bowel disease.	Kawamura YI, Maeyashiki C, Hagiwara T, Otsubo T, Akiyama J, Dohi T.	United European Gastroenterology	Vienna	2014年10月
食道扁平上皮癌におけるデスモゾーム関連分子のDNAメチル化異常.	萩原輝記, 大坪武史, 中野(田村)美和, 山田和彦, 日野原千速, 三宅大, 清水利夫, 土肥多恵子, 河村由紀.	第87回日本生化学会大会	京都	2014年9月
Intestinal mucosal injury induced by anti-cancer agents is mediated by TWEAK/Fn14 and IL-13.	Sezaki T, Hirata Y, Kawamura YI, Dohi T.	第43回日本免疫学会総会	京都	2014年12月
Themis regulates cytokine production in mature naive T cells	Okada T, Nitta T, Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Suzuki H	7th ThymOZ meeting	Helon Island, Australia	2014年4月
胸腺皮質上皮細胞による $\gamma\delta$ T細胞の分化制御	新田 剛、室 龍之介、新田幸子、小田 浩代、鈴木 春巳	第24回 KTCC	京都	2014年6月
RhoH欠損マウスで認められる乾癬様皮膚炎の解析	爲廣紀正、小田浩代、鈴木春巳	第24回 KTCC	京都	2014年6月
Rasal3, a newly identified Ras GTPase activating protein is important for survival of naive T cells in the periphery	Muro R, Nitta T, Okada T, Tubata T, Suzuki H	第43回日本免疫学会総会	京都	2014年12月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。