

課題番号 : 29指1008

研究課題名 : 自己免疫、心血管障害、耐糖能異常にまたがる疾患関連遺伝子の新機能解明と制御法開発

主任研究者名 : 高木 智

分担研究者名 : 河村 由紀

キーワード : 疾患関連遺伝子、自己免疫、耐糖能異常、慢性炎症、心血管障害

研究成果 :

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。グルテン不耐症、糖尿病、高血圧等について、疾患関連遺伝子Lnk/Sh2b3を介する病態形成機構、生体防御での意義を解明する。新たな治療標的の同定及び克服法の開発と検証を行う。高リスク群及び治療反応群の同定に応用する。1) 脂肪炎症、インスリン抵抗性の獲得における責任細胞、標的制御系を明らかにし、糖尿病病態形成を解明する。2) 高血圧、心血管障害につながる機構を明らかにし、治療標的を同定する。3) 腸管組織障害の二次的影響等を検討する。腸炎への感受性や病状の変化及び腸内細菌叢への影響を明らかにする。4) 腸管組織障害、耐糖能異常、高血圧疾患モデルでの治療効果を検討する。5) 日本人では、血小板増加とLNK/SH2B3遺伝子のSNPsとの関連が報告されている。血小板増加傾向を伴う糖尿病、円形脱毛症、高血圧、グルテン不耐症との関連を検討する。これらの疾患に対し、LNK/SH2B3遺伝子のSNPsや血小板数によるJAK3阻害剤の適応判断の妥当性を検証する。本年度の研究推進により以下の成果が得られた。

#### 1) 脂肪炎症と耐糖能制御におけるLnk/Sh2b3機能と標的細胞 :

Lnk欠損マウスではグルコース負荷に対する耐糖能が低下していることを見出した。インスリン抵抗性も生じており、脂肪組織の慢性炎症が見られた。骨髄キメラでの検討を進めたところ、耐糖能低下は造血系細胞に依存することがわかった。先行研究によりLnk欠損で自然発症する腸管上皮萎縮はCD8+T細胞のIL-15への過剰反応性に起因することを明らかにしている。脂肪もIL-15産生組織であることが報告されていることから、IL15欠損と交配したところ耐糖能異常はほぼ改善し、IL-15依存性細胞が脂肪炎症の増悪ループを担うことが示唆された。IL-15依存性であるNK細胞に着目し解析を進めた結果、従来のNK細胞を含む1型自然リンパ球群group1-ILCs(G1-ILCs)が脂肪組織にて増加蓄積しており、IFN- $\gamma$ を過剰産生し脂肪組織の慢性炎症から耐糖能異常及びインスリン抵抗性を引き起こすことを明らかにした。内臓脂肪組織から非脂肪細胞を分離し、細胞分画の解析、またBrd-Uを投与して非脂肪細胞群の脂肪組織内での増殖を調べた。Lnk欠損によるG1-ILCsのIL-15への過剰反応性が生じていること、組織内での増殖が亢進し増加すること、除去抗体の投与によりG1-ILCs細胞分画を除いた場合耐糖能の改善が見られることを明らかにした。

#### 2) 高血圧における標的細胞及び分子機構 :

少量のアンギオテンシンIIを持続的に負荷したところ、野生型では血圧上昇が認められない量でもLnk欠損マウスには高血圧が誘導された。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た結果、CD8+T細胞の増加、IFN- $\gamma$ 産生細胞の増加が見られ、軽度の炎症像を示すことを明らかにした。Rag2欠損、IFN- $\gamma$ 欠損マウスと交配して高血圧感受性への影響を検討した結果、T細胞由来のIFN- $\gamma$ が高血圧病態形成の主要メディエーターであることを明らかにした。大動脈の外周組織の炎症性変化を解析し、IFN- $\gamma$ 産生細胞の浸潤増加及び血管内皮によるNO産生の低下も生じていることを解明した。

さらに病態形成機構の解明を進め、腸管組織障害、耐糖能異常、高血圧疾患モデルでの病態形成機構に基づいた治療手法の開発および探索し効果を検討する。

Subject No. : 29-1008

Title : Functions of a gene associated with autoimmune, cardiovascular and metabolic diseases and their manipulation.

Researchers : Satoshi TAKAKI, Yuki KAWAMURA

Key word : Disease associated gene, Autoimmune disease, Glucose intolerance, Chronic inflammation, Cardiovascular disorders

Abstract :

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 are going to reveal Lnk functions as they related to autoimmune, cardiovascular and metabolic diseases, and try to develop methods for their manipulation for disease treatment.

1) Loss of Lnk triggers adipose inflammation and glucose intolerance :

We found that Lnk<sup>-/-</sup> mice showed glucose intolerance and insulin resistance, and the expansion and activation of group 1-innate lymphoid cells (G1-ILCs) in adipose tissues. We investigated whether those phenotypes stemmed from the functional changes in hematopoietic cells or non-hematopoietic adipose tissues. We transplanted bone marrow (BM) cells from Lnk<sup>-/-</sup> or wild-type (WT) mice into lethally irradiated WT or Lnk<sup>-/-</sup> mice. WT recipient mice transplanted with Lnk<sup>-/-</sup> BM cells manifested impaired glucose tolerance whereas recipients of WT BM cells showed normal responses. Conversely, Lnk<sup>-/-</sup> recipients transplanted with WT BM cells showed improved glucose tolerance compared to mice transplanted with Lnk<sup>-/-</sup> BM cells. Thus the predominant effect of Lnk on glucose tolerance is through the hematopoietic compartment. Lnk played a role in controlling the expansion and function of IL-15-dependent cells. Il15-deficiency or G1-ILC depletion relieved impaired glucose tolerance in Lnk<sup>-/-</sup> mice. Thus, loss of Lnk triggered impaired glucose tolerance, which was caused by adipose inflammation mediated by hematopoietic cells. The results delineate a primary mechanism by which Lnk regulates homeostasis in adipose tissues and affects the risk for diabetes by regulating the expansion and activation of adipose G1-ILCs leading to insulin resistance.

2) Lnk functions in the development of hypertension :

We revealed that loss of Lnk exacerbated angiotensin II (Ang II)-induced hypertension and its associated renal and vascular dysfunction. Lnk<sup>-/-</sup> mice had increased splenic T cell production of IFN $\gamma$  and markedly increased numbers of IFN $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen and kidney in response to low-dose of Ang II administration. IFN $\gamma$ -deficiency protected against Ang II-induced hypertension. Aortas from Lnk<sup>-/-</sup> mice exhibited enhanced inflammation, reduced nitric oxide levels, and impaired endothelial-dependent relaxation. These data demonstrated that Lnk might serve as a novel therapeutic target for hypertension and its associated renal and vascular dysfunction.

29指1008

## 自己免疫、心血管障害、耐糖能異常に またがる疾患関連遺伝子の新機能解明 と制御法開発

(主任研究者) 高木 智

自己免疫性腸炎、糖尿病、心血管障害に  
共通する疾患関連遺伝子 Lnk/SH2B3

脂肪炎症、インスリン抵抗性  
糖尿病病態形成機構の解明

高血圧、心血管障害  
病態形成機構の解明

自己免疫性腸炎  
組織障害  
(これまでの成果)

新しい治療標的の同定  
治療効果検討

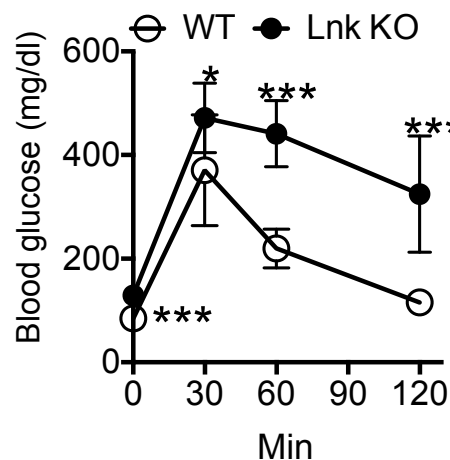
疾患リスク多型選択の意義検  
証

感染防御におけるインパクト

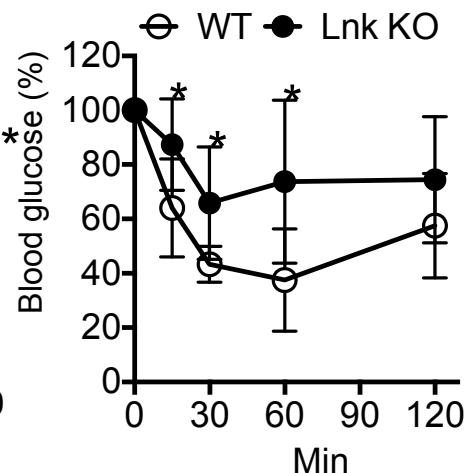
H29年度  
成果

## Lnk/Sh2b3欠損により耐糖能低下 インスリン抵抗性が生じる

グルコース負荷試験

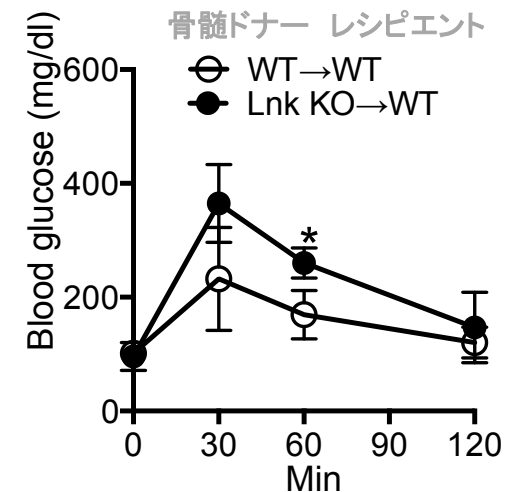


インスリン負荷試験

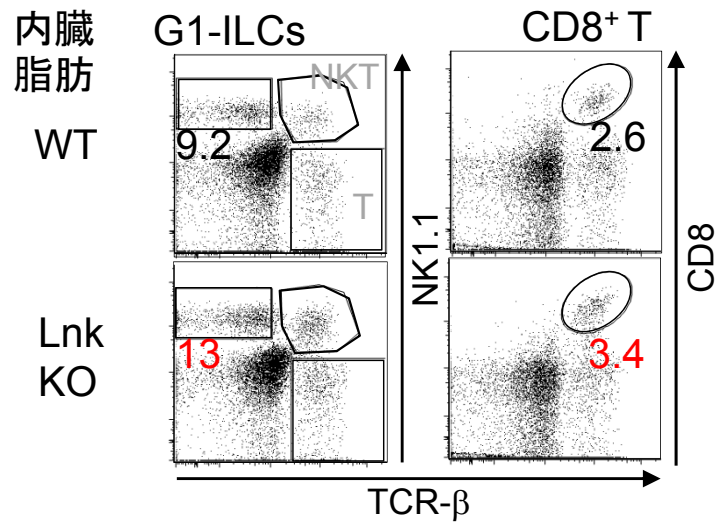


## 造血系細胞でのLnk欠損が 耐糖能異常の原因である

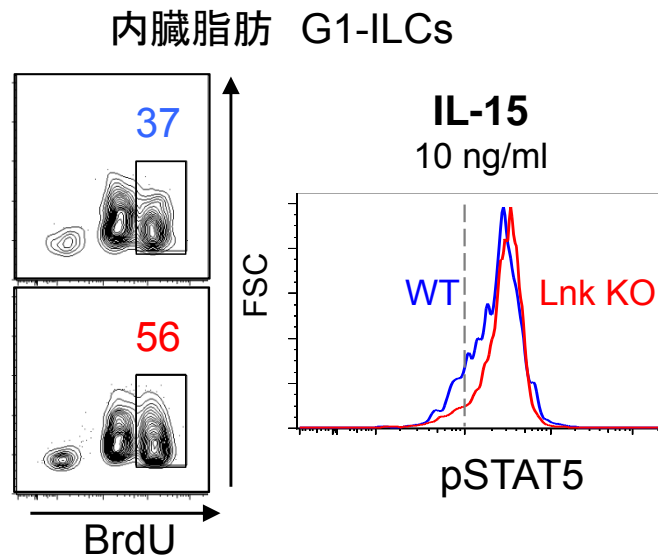
骨髄移植キメラへのグルコース負荷



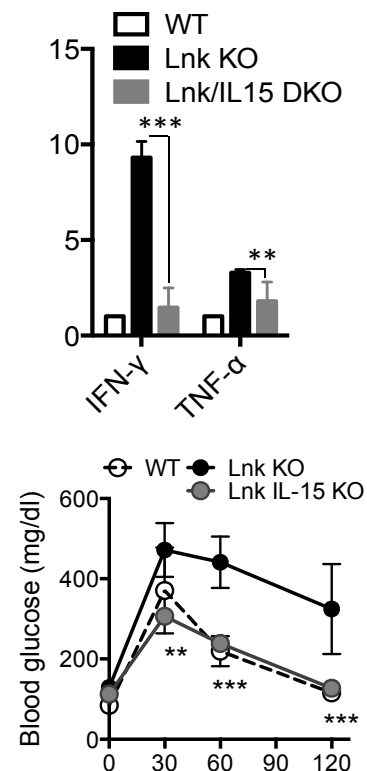
# Lnk欠損では自然リンパ球の増加による脂肪炎症が生じる



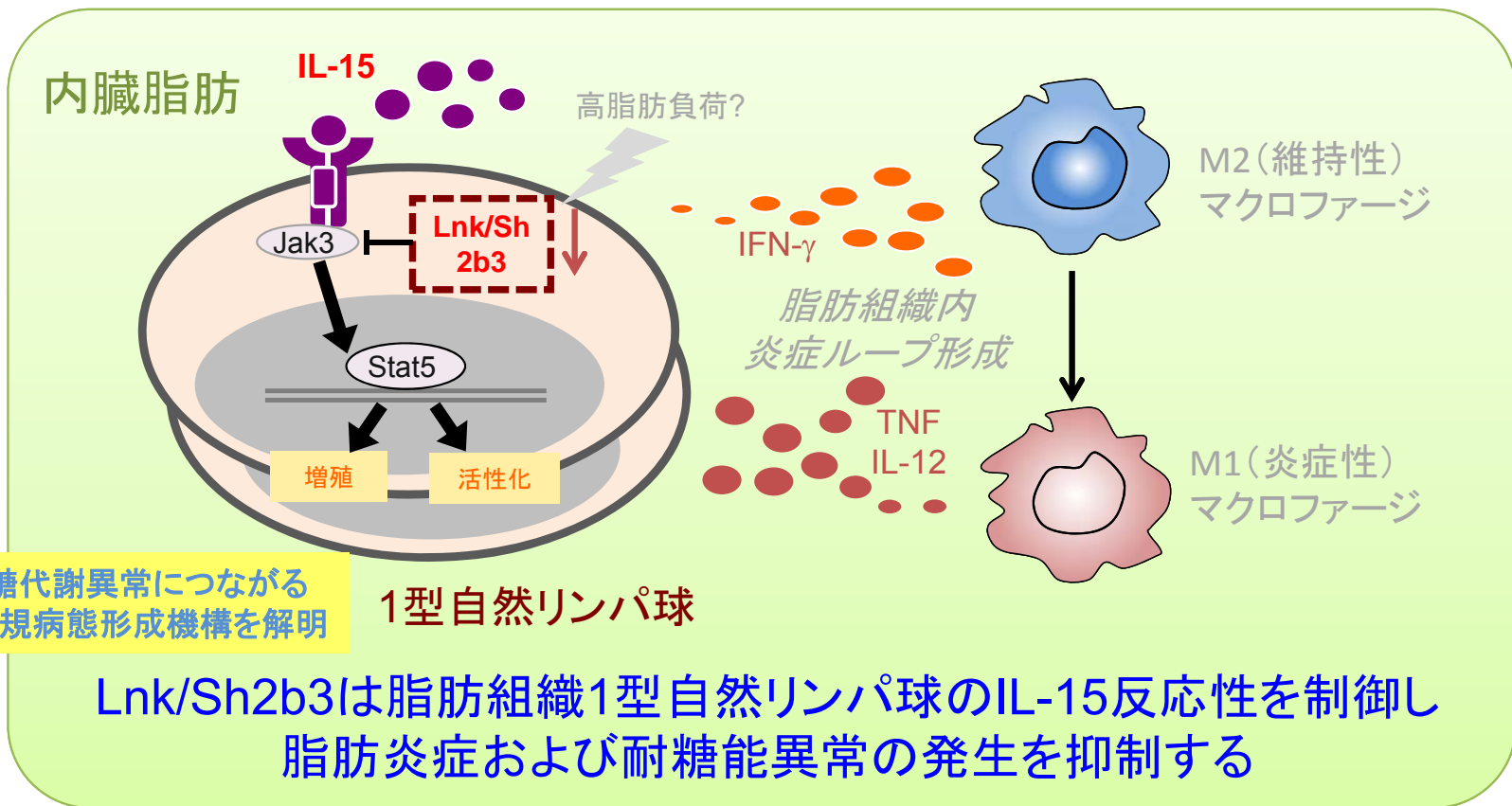
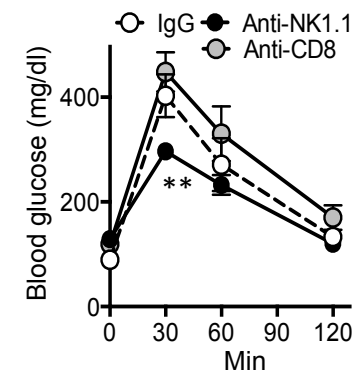
# Lnk欠損自然リンパ球の増殖能とIL-15反応性が亢進する



# IL-15欠損で改善



# 1型自然リンパ球除去により改善



糖代謝異常につながる新規病態形成機構を解明

Lnk/Sh2b3は脂肪組織1型自然リンパ球のIL-15反応性を制御し脂肪炎症および耐糖能異常の発生を抑制する

課題番号 : 29指1008

研究課題名 : 疾患関連遺伝子障害による細胞機能とエピジェネティック変化

分担研究者名 : 河村 由紀

キーワード : 疾患関連遺伝子、自己免疫、耐糖能異常、慢性炎症、心血管障害

研究成果 :

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。グルテン不耐症、糖尿病、高血圧等について、疾患関連遺伝子Lnk/Sh2b3を介する病態形成機構、生体防御での意義を解明する。新たな治療標的の同定及び克服法の開発と検証を行う。高リスク群及び治療反応群の同定に応用する。1) 脂肪炎症、インスリン抵抗性の獲得における責任細胞、標的制御系を明らかにし、糖尿病病態形成を解明する。2) 高血圧、心血管障害につながる機構を明らかにし、治療標的を同定する。3) 腸管組織障害の二次的影響等を検討する。腸炎への感受性や病状の変化及び腸内細菌叢への影響を明らかにする。4) 腸管組織障害、耐糖能異常、高血圧疾患モデルでの治療効果を検討する。5) 日本人では、血小板増加とLNK/SH2B3遺伝子のSNPsとの関連が報告されている。血小板増加傾向を伴う糖尿病、円形脱毛症、高血圧、グルテン不耐症との関連を検討する。これらの疾患に対し、LNK/SH2B3遺伝子のSNPsや血小板数によるJAK3阻害剤の適応判断の妥当性を検証する。

本分担研究では、Lnk/Sh2b3欠損ないし機能低下に起因する腸管組織障害の二次的影響等を検討する。耐糖能異常や腸炎への感受性や病状の変化及び腸内細菌叢への影響について、腸管免疫組織における細胞機能やエピジェネティック変化に注目して解明する。腸管組織障害での治療効果を検討する。

#### 1) Lnk/Sh2b3機能低下に伴う耐糖能異常への腸内細菌叢の関与検討:

Lnk欠損マウスではグルコース負荷に対する耐糖能が低下していることを見出した。インスリン抵抗性も生じており、脂肪組織の慢性炎症が見られた。近年、腸内細菌叢が耐糖能異常にも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、耐糖能異常の発生への腸内細菌叢の変化の関与は少ないものと考えられた。

#### 2) 腸管組織障害の二次的影響:

これまでに、Lnk欠損によってIFN $\gamma$ 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、さらに回腸遠位部における絨毛萎縮が自然発症することの原因細胞であること、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が主任研究者らの検討で示されている。セリアック病では、腸管にホーミングしIL-15刺激を受けたCD8+T細胞がNKG2Dを介し細胞障害を引き起こすことが病態形成の一因となる。Lnk/Sh2b3機能異常は、CD8+T細胞の質的な変化すなわちIL-15反応性亢進をもたらし、定常IL-15レベルでも腸管組織障害の増悪因子となると考えられる。腸管組織障害の二次的影響について、腸炎を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)飲水投与を行い、刺激物負荷による炎症への感受性や病状の修飾について検討した。Lnk欠損マウスにDSS負荷を行ったところ、野生型マウスよりも体重減少が大きく、大腸上皮の剥離や免疫系細胞浸潤が顕著であり、より重度の大腸組織炎症像を示すことがわかった。炎症を重症化させている責任細胞の同定、粘膜上皮バリア能の変化、傷害上皮の再性能、繊維化、癌化にどのような影響を及ぼすか検討を進めている。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指1008

研究課題名： 自己免疫、心血管障害、耐糖能異常にまたがる疾患関連遺伝子の新機能解明と制御法開発

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 regulates adipose inflammation and glucose tolerance through group1-ILCs.	Mori T, Suzuki-Yamazaki N, Takaki S*.	Cell Reports	in press	2018年
Cyclosporin A indirectly attenuates activation of group 2 innate lymphoid cells in papain-induced lung inflammation.	Kudo F, Ikutani M, Iseki M, Takaki S*.	Cellular Immunology	Jan; 323: 33-40.	2018年
Prolonged activation of IL-5-producing ILC2 causes pulmonary arterial hypertrophy.	Ikutani M, Tsuneyama K, Kawaguchi M, Fukuoka J, Kudo F, Nakae S, Arita M, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K.	JCI Insight	Apr 6; 2(7):e90721.	2017年
Clinicopathological significance of cystatin A expression in progression of esophageal squamous cell carcinoma.	Shiba D, Terayama M, Yamada K, Hagiwara T, Oyama C, Tamura-Nakano M, Igari T, Yokoi C, Soma D, Nohara K, Yamashita S, Dohi T, Kawamura YI.	Medicine (Baltimore).	Apr; 97(15):e0357.	2018年
DNA hypermethylation and silencing of PITX1 correlated with advanced stage and poor postoperative prognosis of esophageal squamous cell carcinoma.	Otsubo T, Yamada K, Hagiwara T, Oshima K, Iida K, Nishikata K, Toyoda T, Igari T, Nohara K, Yamashita S, Hattori M, Dohi T, Kawamura YI.	Oncotarget.	Sep 28; 8(48):84434-84448	2017年
Intermittent fasting prompted recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.	Okada T, Otsubo T, Hagiwara T, Inazuka F, Kobayashi E, Fukuda S, Inoue T, Higuchi K, Kawamura YI, Dohi T.	J Clin Biochem Nutr.	Sep; 61(2):100-107	2017年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Chronic IL-33-induced inflammation results in pulmonary arterial hypertrophy.	Ikutani M, Tsuneyama K, Nakae S, Takatsu K, Takaki S.	第46回 日本免疫学会学術集会	仙台	2017年12月
Lnk/Sh2b3 regulates adipose inflammation and glucose tolerance through group1-ILCs.	Mori T, Yamazaki N, Takaki S.	第46回 日本免疫学会学術集会	仙台	2017年12月

研究発表及び特許取得報告について

Disruption of Lnk increases severity of DSS-induced acute colonic inflammation.	Tenno M, Takaki S.	第46回 日本免疫学会学術集会	仙台	2017年12月
Activation of NK/group1-innate lymphoid cells in adipose tissues depends on the composition of fatty acids in high fat diet.	Saito Y, Mori T, Kawamura Y, Dohi T, Takaki S.	第46回 日本免疫学会学術集会	仙台	2017年12月
IL-5-producing ILC2s and eosinophils in the development of pulmonary arteriopathy.	Takaki S.	The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Cytokines 2017.	Kanazawa	2017年10月
IL-33誘発性肺動脈肥厚におけるILC2の機能解析.	生谷尚士、常山幸一、高津聖志、高木智.	第38回 日本炎症・再生医学会	大阪	2017年7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。