

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 :

リスクファクターとなっている疾患群を対象にして、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を進めた。初年度の計画はほぼ順調に進捗し、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。

セリアック病モデルでの自己免疫様組織障害 : 免疫応答および病態形成における役割を検討するべく、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細胞や樹状細胞でのLnk/Sh2b3発現が確認され、Lnk欠損により活性化CD8⁺ T細胞が増加すること、この増加がIL-15反応性亢進に因ることを見出した。組織障害に着目し検討したところ、腸管組織でも活性化CD8⁺T細胞の割合が増加しており、回腸の絨毛萎縮を自然発症することがわかった。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/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。

腸管粘膜組織で産生されるIL-15 : セリアック病では、腸管組織におけるIL-15の産生が亢進しており、腸管にホーミングしIL-15刺激を受けたCD8⁺T細胞がNKG2Dを介した細胞障害を引き起こすことが病態形成の一因となるとの報告がある。Lnk欠損マウスでは、CD8⁺T細胞のIL-15反応性が過剰になっていることが判明した。腸管組織でのIL-15産生量についてRT-PCRにより検討したところ、IL-15産生量は正常マウスとほぼ同程度であった。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、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。

IL-15反応性の病態形成への関与 : 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高陽性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。これらの結果から、Lnk欠損によるCD8⁺T細胞のIL-15反応性の亢進、それによる正常量IL-15存在下でも生じるCD8⁺T細胞の活性化、が活性化CD8⁺T細胞の蓄積、腸管組織障害の主因となっており、IL-15やそのシグナル伝達系が治療標的の主候補となることが明らかとなった。

今後は、上記の腸炎モデルに加え糖尿病、関節炎、脳脊髄炎の疾患モデルによる解析を推進するとともに、Lnk/Sh2b3依存性制御系の標的と思われる細胞群での機能を明らかにする。樹状細胞やTh細胞での機能に注目してLnk/Sh2b3欠損や変異の影響を明らかにする。

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, an intracellular adaptor regulates cytokine signals that control lymphohematopoiesis, and Lnk^{-/-} mice show overproduction of B cells, megakaryocytes and hematopoietic stem cells. In human, 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 by genome-wide association studies. However, no data linking Lnk/Sh2b3 function with a risk for autoimmune-mediated inflammation have been reported so far.

We generated an Lnk-Venus knock-in mouse and investigated expression of Lnk/Sh2b3 in cell development and immune responses. In the B cell development, Lnk/Sh2b3 expression greatly diminished at pre-B cells and recovered in mature B cells. We found low but apparent expression of Lnk/Sh2b3 in mature T cells in periphery while Lnk/Sh2b3 gene was almost shut off in thymocytes. We re-evaluated T cells in the Lnk^{-/-} mice, and found 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. Lnk^{-/-} CD8⁺ T cells survived longer in vitro and showed enhanced STAT5 phosphorylation in response to IL-15. Experiments using adoptive transfer of Lnk^{-/-} CD8⁺ T cells demonstrated that these T cells proliferate abnormally even in non-lymphopenic hosts, and that they contribute to development of intestinal villous abnormality in Rag2^{-/-} recipient animals. In Il15^{-/-} host animals, Lnk^{-/-} CD8⁺ T cells did not divide at all during 3 weeks of observation after transfer. Expansion of CD44^{hi} IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells as well as intestinal villi abnormalities were not observed in Lnk-Il15-double-deficient mice.

A key pathologic event in celiac disease is cell death in the epithelial compartment and gut infiltration by IL-15-activated cytotoxic T cells, suggesting the contribution of aberrant T cell receptor (TCR)-independent natural killer (NK)-like killing. Dysregulated IL-15 expression in patients with celiac disease, result in a NKG2D signaling-dependent cytolytic activity of effector CD8⁺ T cells that is independent of TCR specificity. IL-15-mediated hyperreactivity of Lnk^{-/-} CD8⁺ T cells might involve a partly similar mechanism to disrupt intestinal homeostasis. Although villous abnormality found in Lnk^{-/-} mice did not require additional immunization or exposure to exogenous antigens, Lnk^{-/-} CD8⁺ T cells showed augmented sensitivity against normal physiological concentrations of IL-15, and expanded in *Il15*-sufficient mice or in Rag2^{-/-} host animals. 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. Taken together, our results indicate that 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.

Researchers には、分担研究者を記載する。

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

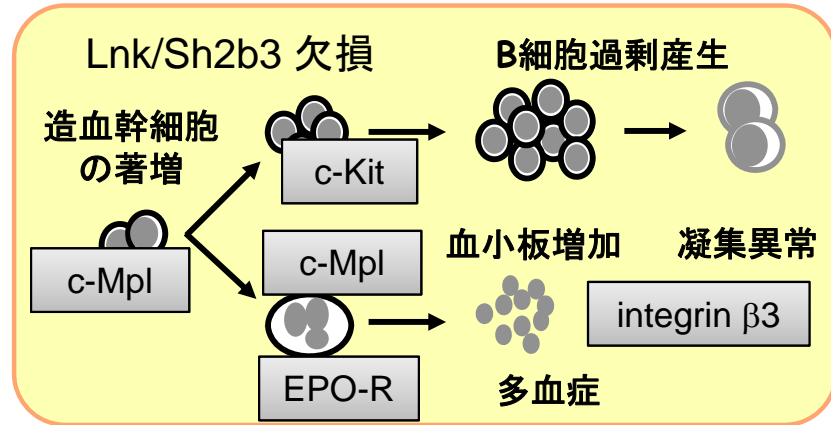
〈H25年度 研究報告〉

(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...

これまでの知見 (申請者ら&他グループ)



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
DSS誘導性腸炎

薬剤誘発性/遺伝性
1型糖尿病 【進行中】

コラーゲン誘発性関節炎 【進行中】

炎症と造血誘導の関係
造血器官を合わせた知見収集

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

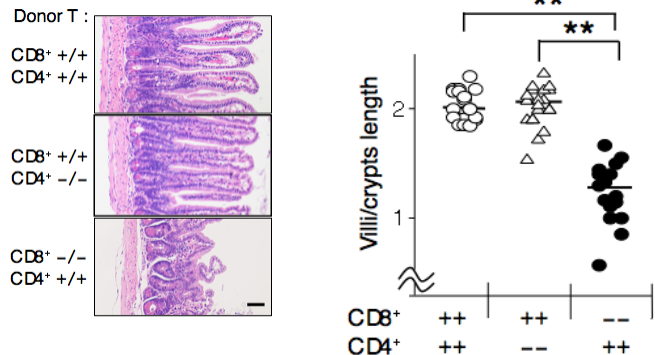
新しい治療標的の創出
制御に資する生物製剤の開発

年次計画

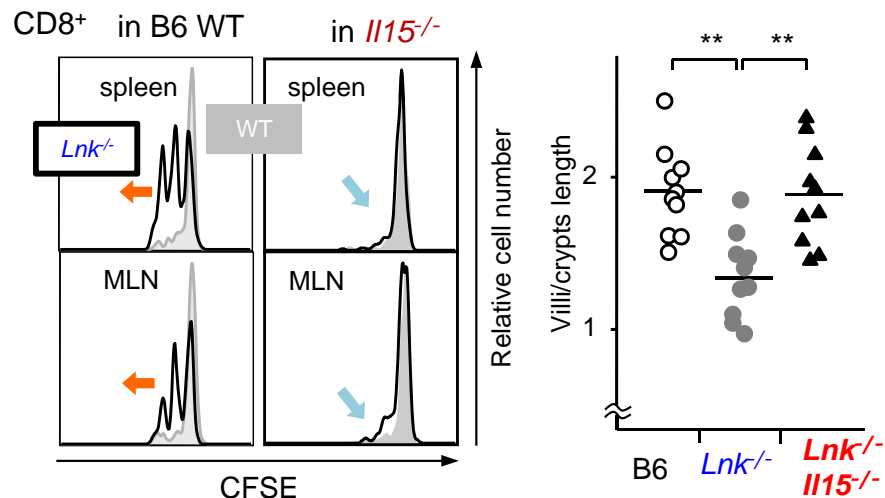
平成25年度
～平成26年度

平成27年度

自然発症性の小腸絨毛萎縮
(対象疾患: セリアック病)



Lnk欠損により活性化CD8+T細胞が増加すること、この増加がIL-15反応性亢進に因ることを見出した。腸管組織でも活性化CD8+T細胞の割合が増加しており、回腸遠位部の絨毛萎縮を自然発症することがわかった。Lnk欠損CD8+T細胞を移入することでレシピエントに絨毛萎縮が再現された。

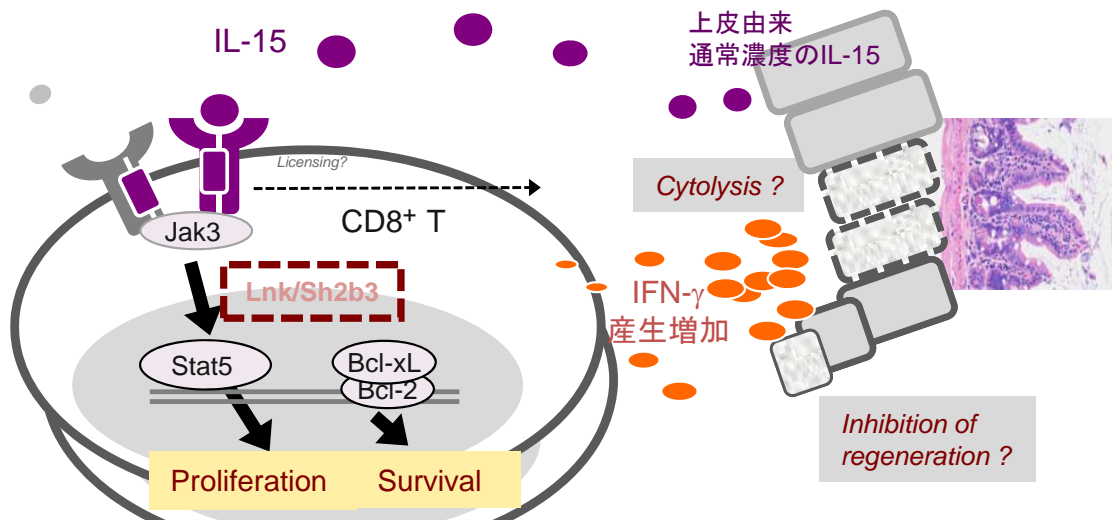


Lnk制御系の破綻はCD8+T細胞の質的な変化、IL-15への反応性亢進をもたらし、定常状態レベルのIL-15にも反応して増殖した。IL-15欠損環境としたIl15/Lnk重複欠損マウスでは活性化CD8+T細胞の増加が軽減し、回腸遠位部の絨毛萎縮も生じなくなった。

Lnk/SH2B3欠損・機能低下...

CD8+ T cell

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。



IL-15とそのシグナル系が治療標的候補となることを同定

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 :

免疫応答および病態形成における役割を検討するべく、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細胞や樹状細胞でのLnk/Sh2b3発現が確認され、Lnk欠損により活性化CD8+ T細胞が増加すること、この増加がIL-15反応性亢進に因ることを見出した。組織障害に着目し検討したところ、腸管組織でも活性化CD8+T細胞の割合が増加しており、回腸の絨毛萎縮を自然発症することがわかった。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/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。

セリアック病では、腸管組織におけるIL-15の産生が亢進しており、腸管にホーミングしIL-15刺激を受けたCD8+T細胞がNKG2Dを介した細胞障害を引き起こすことが病態形成の一因となるとの報告がある。Lnk欠損マウスでは、CD8+T細胞のIL-15反応性が過剰になっていることが判明した。腸管組織でのIL-15産生量についてRT-PCRにより検討したところ、IL-15産生量は正常マウスとほぼ同程度であった。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、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。こ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高陽性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。これらの結果は、Lnk欠損によるCD8+T細胞のIL-15反応性の亢進、それによる正常量IL-15存在下でも生じるCD8+T細胞の活性化、が活性化CD8+T細胞の蓄積、腸管組織障害の主因となることを示唆する。

今後は、上記の腸炎モデルに加え糖尿病、関節炎、脳脊髄炎の疾患モデルによる解析を推進するとともに、Lnk/Sh2b3依存性制御系の標的と思われる細胞群での機能を明らかにする。

課題番号 : 25指107

研究課題名 : 腸炎モデルにおける自己免疫疾患関連遺伝子の発現と機能

主任研究者名 : 高木 智

分担研究者名 : 土肥多恵子

キーワード : 自己免疫疾患、疾患関連遺伝子、サイトカイン、慢性炎症

研究成果 :

リスクファクターとなっている疾患群を対象にして、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を進めた。本研究では、腸炎における自己免疫疾患関連遺伝子の発現と機能について、自然発症性の小腸絨毛萎縮、デキストラン (DSS) 腸炎モデルでの検討を行った。

自己免疫様の腸管組織障害： 組織障害に着目し検討したところ、腸管組織でも活性化CD8+T細胞の割合が増加しており、回腸の絨毛萎縮を自然発症することがわかった。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/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。

腸炎モデルでの炎症性組織障害： デキストラン負荷による腸炎モデルのパイロット実験では、予想に反しLnk欠損マウスは抵抗性を持つこと、B細胞欠損Lnk欠損マウスでは抵抗性が失われること、Lnk欠損骨髄を野生型に移植した骨髄キメラマウスでは症状が重症化する傾向が見られた。

今後はさらに上記の腸炎モデルによる解析を推進するとともに、Lnk/Sh2b3依存性制御系の標的と思われる細胞群での機能を明らかにする。デキストラン (DSS) 負荷による腸炎モデルの検討を推進する。腸管上皮（放射線抵抗性細胞）及びB細胞はprotectiveに働き、non-B細胞は炎症促進性に働くことが考えられ、これを検証する。Lnk/Sh2b3遺伝子が正常及び欠損タイプの野生型、B細胞欠損 (Igh6^{-/-})、RAG欠損マウスを作成して比較検討する。IL-15やIL-21の作用を念頭において、Lnk欠損制御性B細胞、CD8+T細胞、CD4+T細胞、NK細胞の機能を養子移入や培養系を用いて検討する。腸管上皮幹細胞の増殖能を再生誘導や培養により検討する。

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。

樹状細胞における機能と免疫応答への影響とT細胞プライミング： 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。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ることを明らかにした。

今後は、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を検討する。樹状細胞におけるLnk欠損による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する。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する。CD103+CD8+樹状細胞の増加の生理的意義を検討する。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
Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation.	Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R.	Cell Metabolism.	18	2013
Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha v\beta 3$	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
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
Microbiota derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice.	Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H, Dohi T.	Nature Communications	4	2013
TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice.	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.	Mucosal Immunology	6	2013
Oral treatment with a novel small molecule alpha 4 integrin antagonist, AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice.	Sugiura T, Kageyama S, Andou A, Miyazawa T, Ejima C, Nakayama A, Dohi T, Eda H.	J Crohns Colitis	7	2013
Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers.	Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S, Morita H, Dohi T, Oota H, Hattori M.	DNA Research	21	2014
Zfat-deficiency results in a loss of CD3 ζ phosphorylation with dysregulation of ERK and Egr activities leading to impaired positive selection.	Ogawa M, Okamura T, Ishikura S, Doi K, Matsuzaki H, Tanaka Y, Ota T, Hayakawa K, Suzuki H, Tsunoda T, Sasazuki T, Shirasawa S.	PLoS One	8	2013
Differential requirement for RhoH in development of TCRab CD8aa IELs and other types of T cells.	Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Hayamakwa K, Suzuki H.	Immunol. Lett	151	2013
Complete genomic DNA sequence of the East Asian spotted fever disease agent Rickettsia japonica.	Matsutani M, Ogawa M, Takaoka N, Hanaoka N, Toh H, Yamashita A, Oshima K, Hirakawa H, Kuhara S, Suzuki H, Hattori M, Kishimoto T, Ando S, Azuma Y, Shirai M.	PLoS One	9	2013
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

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Lnk/Sh2b3, an intracellular adaptor associated with celiac disease and autoimmune diabetes, regulates accumulation of inflammatory T cells and prevents intestinal villous atrophy.	Mori T, Katayama H, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Ikutani M, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S.	The 15th International Congress of Immunology	Milan	2013年8月
An autoimmune disease-associated gene, Lnk/SH2B3 controls production and functions of DC subsets and regulates inflammatory T cell differentiation.	Mori T, Seki Y, Iwasaki Y, Yamazaki-Suzuki N, Iseki M, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月

研究発表及び特許取得報告について

IgE production and germinal center formation are regulated by the adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells.	Iseki M, Kudo F, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Lnk/Sh2b3 adaptor protein prevents the accumulation of inflammatory CD8+ T cells and intestinal villous atrophy.	Seki Y, Katayama H, Mori T, Iseki M, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Involvement of L1 retrotransposition in murine experimental colitis-cancer model.	Otusbo T, Kawamura YI, Ishizaka Y, Dohi T.	DDW2013	Orlando	2013年5月
TWEAK/Fn14 pathway promotes chronic colitis and fibrosis mediated by IL-13-TSLP axis.	Dohi T, Kawamura YI, Kawashima R, Son A, Oshio T, Wu P, Burkly LC.	Immunology 2013	Honolulu	2013年5月
消化管炎症の重症化・慢性化機構を担う因子.	土肥多恵子	第50回日本消化器免疫学会	東京	2013年8月
メタボロミクスの医療応用.	吉田 優	第61回 日本質量分析総合討論会	茨城	2013年9月
Cell type-specific, genome-wide epigenetic analysis for lamina propria cells isolated from the colon with ulcerative colitis.	Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T.	第42回日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Novel mutant mice lacking cortical thymic epithelial cells.	Nitta T, Muro R, Nitta S, Murata S, Suzuki H.	The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference	京都	2013年6月
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development.	Okada T, Nitta T, Kaji K, Oda H, Patrick MS, Suzuki H.	The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference	京都	2013年6月
Themis CABIT domains exert distinct functions in thymocyte positive selection.	Okada T, Nitta T, Kaji K, Oda H, Patrick MS, Suzuki H.	The 15th International Congress of Immunology	Milan	2013年8月
A missense mutation in Psmb11 impairs thymoproteasome assembly and T cell development.	Nitta T, Muro R, Nitta S, Murata S, Suzuki H.	The 35th Naito Conference	札幌	2013年9月
Cortical thymic epithelial cells control conventional and innate T cell development.	Nitta T, Muro R, Oda H, Murata S, Suzuki H.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
An altered T cell repertoire in mice lacking cortical thymic epithelial cells.	Muro R, Nitta T, Suzuki H.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Differential function of two CABIT domains in Themis.	Okada T, Nitta T, Oda H, Patrick MS, Suzuki H.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
A non-synonymous SNP variant of RhoH reduces TCR mediated signal transduction via proteasomal degradation.	Tamehiro N, Oda H, Suzuki H.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013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。