免疫異常を基盤とした拡張型心筋症の発症における Mst1 キナーゼの役割の解明

前嶋康浩

東京医科歯科大学医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

近年、本邦において拡張型心筋症を原疾患とした心不全の死亡率が顕著に増加している。本症は①遺伝子異常、②ウイルス感染、③自己免疫異常、の 3 つが主たる原因と考えられているが、いまだに自己免疫異常に基づく心筋の炎症から拡張型心筋症へ至る機序についてはほとんど解明されていない。

Mst1 は様々な基質をリン酸化して細胞内シグナルを制御し様々な細胞の機能を調節している。我々はこれまでに Mst1 を心筋特異的に過剰発現させると心筋細胞のアポトーシスが亢進し、拡張型心筋症に類似した表現型を示すこと¹や、虚血などのストレスにより活性化した Mst1 がオートファジーを抑制して心筋細胞内の蛋白品質管理を低下させ、心機能を悪化させていることを明らかにしてきた²。その一方、Mst1 の活性化分子 RASSF1A の心筋特異的欠損マウスでは心臓の圧負荷に対して心筋保護的な表現型を示すのに対し、RASSF1A の全身欠損マウスでは正反対の表現型を示すことから、申請者らは Mst1 の機能は細胞の種類に応じて異なった作用を有している可能性を見いだした³。

最近、Mst1 の先天的欠失が原発性免疫不全症の原因であること⁴や、Mst1 欠損マウスでは自己免疫疾患様症状を呈すること⁵が示されるなど、Mst1 が免疫反応を制御する重要な因子のひとつであることが示唆されるようになった。しかし、その詳細な分子機序については不明のままである。

自己免疫性心筋炎をはじめとする自己免疫異常による疾患では制御性 T 細胞の機能異常を認めるが、制御性 T 細胞のマスター転写因子である Foxp3 の活性低下に起因していることが多い。フォークヘッド型転写因子のひとつである Foxp3 は、免疫系の過剰な反応に伴う疾患の進展を抑制するのに重要な働きを有している制御性 T 細胞の主要制御因子であるが⁶、この Foxp3 がどのように活性化されて制御性 T 細胞の機能を調節しているのか、その上流にある機序に関してもほとんど分っていない。

我々は Mst1 がフォークヘッド型転写因子 FoxO1/3 をリン酸化して細胞死や寿命を制御しているとの報告⁷と、Foxp3 と FoxO1/3 の間には相同性の高い配列があることに着目し、Foxp3 も Mst1 のリン酸化による制御を受けている可能性が高いことを見いだした。

【目 的】

本研究計画は、Mst1 が心不全の病態と自己免疫異常の両方に関わっていることと、Foxp3 が Mst1 によってリン酸化される可能性が高いことを踏まえて、自己免疫異常を基盤とする拡張型心筋症の発症および病状進展機序に Mst1 による Foxp3 のリン酸化を介した機能制御が重要な働きを担っているのではないかという仮説を検証するための研究を行う。

【方 法】

1. Mst1 による Foxp3 のリン酸化部位の確定:

- ① リコンビナント蛋白の作製:pCold-GST ベクターにマウス Foxp3 cDNA をインサートしてコンピテントセル(BL21)にてリコンビナント蛋白を発現させ、グルタチオンアガロースビーズを用いて精製した。
- ② キナーゼアッセイ:活性型 Mst1 キナーゼと GST-Foxp3 をバッファーと混合した上で 30 分間 30°C にて反応させた。
- ③ SDS-PAGE・ゲル切り出し:リン酸化反応終了後、サンプルバッファーと kinase reaction mix を混合して 95°C、10 分間ボイルした。ネガティブコントロールとして、無反応の GST-Foxp3 と Mst1 をサンプルバッファーと混合して 95°C、10 分

間ボイルした。10%ゲルにサンプルをアプライして電気泳動を行った。泳動終了後にゲル染色を行い、ゲル切り出しを行った。

- ④ 質量分析:質量分析装置による解析スペクトルのピークの高さの比でリン酸化/非リン酸化を比較した。
2. Mst1 による Foxp3 のリン酸化部位を特異的に認識するリン酸化抗体の作成:上記で得られたリン酸化部位を含む 10 アミノ酸から成るリン酸化 Foxp3 ペプチドを合成し、ウサギに 4 回免疫を行い、7 週間後に採血して抗体の精製を行った。
3. 内在性の Foxp3 が Mst1 によりリン酸化されるかどうかの検討:上記 2 で作成した Mst1 による Foxp3 のリン酸化部位を特異的に認識するリン酸化抗体を用い、内在性の Mst1 が実際に Foxp3 をリン酸化するかどうかについて検討する。
4. Foxp3 の転写活性および制御性 T 細胞の細胞機能に対して Mst1 のリン酸化が与える影響についての検討
  - ① Mst1 による Foxp3 のリン酸化が生体内の細胞機能に与える影響を検討するため、Mst1 による Foxp3 のリン酸化部位をアラニンに変異させたリン酸化抵抗性の Foxp3 変異体(A-変異体)、グルタミン酸に変異させた恒常的リン酸化模倣性の Foxp3 変異体(E-変異体)、ならびに野生型 Foxp3 をコードしたレンチウイルスを作成する。
  - ② Jurkat 細胞に Foxp3 を強制発現させると制御性 T 細胞に類似した表現型を有する T 細胞に分化する⁸。このことを踏まえ、擬似制御性 T 細胞を作成する目的で野生型ならびに変異体の Foxp3 レンチウイルスを Jurkat 細胞に感染させる。活性化した制御性 T 細胞では Foxp3 は IL-2 の産生を抑制するため、これらの細胞における Foxp3 のリン酸化の IL-2 転写活性に対する影響を IL-2 promoter reporter assay で検討する。
5. Mst1 欠損マウスを用いた実験的自己免疫心筋炎後に拡張型心筋症へ進行する過程における Mst1 - Foxp3 経路の関与についての検証
  - ① 遺伝子組換え動物の作成:Mst1-floxed マウスと YFP-Cre Foxp3 ノックインマウスを交配することによって、制御性 T 細胞特異的 Mst1 欠損マウスを作成する。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて、上記方法 1 にて同定した Mst1 による Foxp3 のリン酸化部位をアスパラギン酸に置換することにより、Foxp3 ノックインマウス(Mst1 によるリン酸化模倣型、Foxp3-KI-pMst1)を作成する。
  - ② 実験的自己免疫性心筋炎→拡張型心筋症モデルの作成:マウスの実験的自己免疫性心筋炎モデルは 7 週齢の野生型 BALB/c マウスに 0.2mg の Freund アジュバントでエマルジョン化した αMHC ペプチドを皮下注射して作成する。このモデルでは、発症から 8 週間以上経過すると拡張型心筋症に類似した表現型を示す。8 週間後に血圧・脈拍・心機能評価を行い屠殺し、心筋の病理学的変化につき免疫染色法などを用いて検討する。

【結 果】

1. Mst1 による Foxp3 のリン酸化が Foxp3 の転写活性および制御性 T 細胞の細胞機能に与える影響およびその機序の解明:³²P-ATP、GST-Foxp3 リコンビナント蛋白と Mst1 リコンビナント蛋白を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを施行したところ、Foxp3 は Mst1 によってリン酸化されることが明らかとなった。この結果を受けて、質量分析法を用いた Foxp3 の Mst1 によるリン酸化部位の同定を試みたところ、複数の候補が認められた。その中で、種間を越えて保存されているリン酸化部位を探索したところ、1 箇所の有力な候補(以降"Foxp3-pX"とする)を見いだした。
2. HEK293 細胞に GFP-Foxp3 プラスミドを遺伝子導入し、shRNA-Mst1 の共導入を行った群と行っていない群との間で、Mst1 による Foxp3 のリン酸化について評価を行った。上述した方法で作成した Mst1 による Foxp3 のリン酸化部位 Foxp3-pX を特異的に認識するリン酸化抗体を用いてウェスタンブロッティング法を施行したところ、GFP-Foxp3 プラスミドを遺伝子導入した HEK293 細胞では、内在性の Mst1 依存性に Foxp3-pX のバンドの発現増加が認められた。
3. マウス Foxp3 cDNA(野生型、Foxp3-pX の A-変異体および E-変異体)を RV4 ベクターにインサートし、4 種類のパッケージプラスミドと共に 292T 細胞へ共導入して 3 種類のレンチウイルスを作成した。これら野生型ならびに変異体の Foxp3 レンチウイルスを Jurkat 細胞に感染させて擬似制御性 T 細胞を作成した。野生型 Foxp3 を導入した Jurkat 細胞では Mst1 依存性に IL-2 転写活性が抑制された。A-変異体 Foxp3 を導入した Jurkat 細胞では Mst1 の有無にかかわらず IL-2 転写活性が抑制されなかった一方で、E-変異体 Foxp3 を導入した Jurkat 細胞では Mst1 の有無にかかわらず恒常的に IL-2 転写活性が抑制されていた。

4. Jackson Laboratory 株式会社から Mst1/Mst2-floxed マウスおよび YFP-Cre Foxp3 ノックインマウスを購入し、制御性 T 細胞特異的 Mst1 欠損マウスを作成している。現在、BALB/c との戻し交配を行っている最中 (F4) である。
5. pX330 ベクターに、Foxp3-pX の D 変異をコードした guide RNA にインサートして Cas9 発現ベクターを作製した。その上で、Cas9 発現ベクターを受精卵にインジェクションした。ファウンダーマウスをダイレクトシーケンスによってスクリーニングして、目的通りの変異が導入されている個体を選択し、次世代 (F1) マウスを作成した。現時点で F2 まで得られている。
6. 野生型 BALB/c マウスに α MHC ペプチドを皮下注射することによって実験的自己免疫性心筋炎マウスモデルを作成した。8 週間後に心エコー検査にて心機能評価を行ったところ、著明な左室収縮能の低下を認めた。また、病理学的検討により、心室筋の脱落・壊死や心室壁の著明な線維化など拡張型心筋症に類似した表現型を認めた。

【考 察】

今回の検討で、Mst1 が制御性 T 細胞のマスター転写因子である Foxp3 をリン酸化することを見だし、質量分析法にてリン酸化部位を特定することができた。特異的リン酸化抗体を用いて実際の生体内で Mst1 が Foxp3 をリン酸化することを確認し、リン酸化部位の変異体を遺伝子導入する実験を通して Mst1 によるリン酸化が Foxp3 の機能を制御していることも示すことができた。さらに、実験的自己免疫性心筋炎マウスモデルの慢性期には拡張型心筋症の表現型を示すことも確認できた。

今後の課題としては、以下のことが挙げられる。まず、*in vitro* の実験において Mst1 による Foxp3 のリン酸化が Foxp3 の細胞内局在に与える影響について精査する必要がある。そのために、免疫染色と細胞内蛋白分画を用いたウェスタンブロッティング法にて野生型と変異型の Foxp3 レンチウイルスを感染させた Jurkat 細胞を比較検討していく予定である。次いで、現在作成中の遺伝子組換えマウスにおける自己免疫心筋炎後の拡張型心筋症モデルの表現型および機能解析を行っていく必要がある。制御性 T 細胞特異的 Mst1 欠損マウスおよび Foxp3-KI-pMst1 マウスを用いて実験的自己免疫性心筋炎モデルを作成し、8 週間後に野生型マウス的心筋炎モデルとの表現型の違いを比較検討する予定である。これらの研究計画を遂行することによって、本研究課題の目的を達成することができるものと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回我々が用いている実験的自己免疫性心筋炎から拡張型心筋症に移行するマウスモデルは、心筋由来の抗原によって惹起される心筋炎を基盤として発症する心不全モデルであり、これまで類似のモデルを用いた Mst1 に関わる研究はなされていない。これまでの検討から、本モデルにおいて Mst1 のリン酸化による Foxp3 の転写制御は病態発現に深く関わっていることが示唆される。もし、治療標的としての役割が確定すれば、臨床での検討に値する基礎データになると考えられる。拡張型心筋症は難治性であり、有効な治療手段が知られていないことからこの研究の意義は高いと考えられる。

【参考・引用文献】

1. Yamamoto S, Yang G, Zablocki D, Liu J, Hong C, Kim SJ, Soler S, Odashima M, Thaisz J, Yehia G, Molina CA, Yatani A, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J. Activation of Mst1 causes dilated cardiomyopathy by stimulating apoptosis without compensatory ventricular myocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2003;111:1463-1474
2. Maejima Y, Kyoji S, Zhai P, Liu T, Li H, Ivessa A, Sciarretta S, Del Re DP, Zablocki DK, Hsu CP, Lim DS, Isobe M, Sadoshima J. Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nat Med.* 2013;19:1478-1488
3. Del Re DP, Matsuda T, Zhai P, Gao S, Clark GJ, Van Der Weyden L, Sadoshima J. Proapoptotic Rassf1A/Mst1 signaling in cardiac fibroblasts is protective against pressure overload in mice. *J Clin Invest.* 2010;120:3555-3567
4. Abdollahpour H, Appaswamy G, Kotlarz D, Diestelhorst J, Beier R, Schaffer AA, Gertz EM, Schambach A,

- Kreipe HH, Pfeifer D, Engelhardt KR, Rezaei N, Grimbacher B, Lohrmann S, Sherkat R, Klein C. The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood*. 2012;119:3450-3457
5. Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T, Ikehara S, Matsumoto M, Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. *Nature communications*. 2012;3:1098
6. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*. 2003;299:1057-1061
7. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*. 2006;125:987-1001
8. Kim JY, Kim HJ, Hurt EM, Chen X, Howard OM, Farrar WL. Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;362:44-50