Mst1 欠損による増強された細胞障害性 T 細胞の機能と 腫瘍発達の抑制

安田 鐘樹^{1)*}, 植田 祥啓²⁾, 小澤まどか²⁾, 松田 公志¹⁾, 木梨 達雄²⁾

¹⁾ 関西医科大学腎泌尿器外科

²⁾ 関西医科大学生命医学研究所分子遺伝学

Enhanced cytotoxic T cell function and suppression of tumor development by Mst1 deficiency

Kaneki Yasuda^{1)*}, Yoshihiro Ueda²⁾, Madoka Ozawa²⁾,
Tadashi Matsuda¹⁾, Tatsuo Kinashi²⁾

¹⁾ Department of Urology and Andrology, Kansai Medical University

²⁾ Department of Molecular Genetics, Kansai Medical University

Received 3 October, 2017 / Accepted 3 October, 2017

Abstract:

Cytotoxic CD8 T lymphocytes are the major cells of the immune response to viral infection and tumor rejection. Differentiated CTLs have a large number of modified lysosomes including perforin and granzyme B.

Mammalian ste-20 like kinase Mst1 is abundantly expressed on lymphocytes and plays important roles during apoptosis, proliferation, cell polarity, and migration.

Here, we report the new role of Mst1 for cytotoxic T-cell responses and tumor reduction.

Mst1^{-/-} cytotoxic T cells also showed enhanced T-bet expression associated with elevated expression levels of IFN γ and granzyme B.

In addition, *Mst1*^{-/-} cytotoxic T cells suppressed tumor growth and prolonged overall survival of tumor bearing mice *in vivo*. Thus, Mst1 is a potential therapeutic target for tumor immunotherapy.

Key words: cytotoxic T cells, Mst1, FoxO

要旨:

細胞傷害性 CD8 T リンパ球は、ウイルス感染および腫瘍排除に対する免疫応答の主要な細胞である。分化した CTL は、パーフォリンおよびグランザイム B を含む多数の改変されたリソソームを有する。Mammalian ste-20 like kinase である Mst1 はリンパ球に豊富に発現しており、アポトーシス、増殖、細胞極性および細胞移動に重要な役割を果たす。

ここで私たちは、細胞傷害性 T 細胞応答および腫瘍抑制のための Mst1 の新しい役割を報告する。

Mst1 欠損細胞傷害性 T 細胞は、IFN γ およびグランザイム B の発現レベル上昇に関連する増強した T-bet 発現を示した。

さらに、Mst1 欠損細胞傷害性 T 細胞は *in vivo* で腫瘍増殖を抑制し、担癌マウスの overall survival を延長した。

このように Mst1 は、腫瘍免疫療法のための潜在的な治療標的である。

キーワード: 細胞障害性 T 細胞, Mst1, FoxO

Schema 1. 細胞障害性 T 細胞 (CTL)

- リンパ球 T 細胞のうち、宿主にとって異物になる細胞（移植細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞など）を認識して破壊する
1. 樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞（APC）が抗原ペプチドを取り込む
  2. 細胞内で分解し、生成されたペプチド断片を MHC class I 分子上に提示する
  3. ナイーブ CD8 陽性 T 細胞が TCR を介してペプチド / MHC class I 分子を認識し、CTL として増幅・活性化する

はじめに

細胞傷害性 CD8 T リンパ球（CTL）は、ウイルス感染や腫瘍排除に対する免疫応答の主要な細胞である。樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が抗原を取り込んで MHC 上に抗原ペプチドを提示するとナイーブ CD8 T 細胞が TCR により抗原を認識して活性化する。活性化した CD8 T 細胞は IL-2, IFN γ などのサイトカインにより T-bet, Blimp1 などの転写因子の発現が上昇し、CTL へと分化する¹⁾。分化した CTL は、腫瘍細胞の細胞表面に発現する腫瘍抗原 / MHC class I 分子を、TCR を介して認識し腫瘍細胞に対して細胞傷害物質であるパーフォリン、グランザイム B を放出して腫瘍細胞を破壊する。つまり CD8 T 細胞が CTL へ分化すると顕著に IFN- γ , グランザイム B およびパーフォリンの発現が誘導される（Schema 1）。

Mammalian ste-20 like kinase である Mst1 は哺乳類の免疫系においてリンパ球の接着を調節制御している。ケモカイン刺激または抗原刺激によって活性化した Rap1 は、Rap1-GTP 結合タンパクである RARL と結合し、さらに Mst1/2 と複合体を形成する。この複合体は接着分子であるインテグリン LFA-1 に結合して親和性亢進を誘導し、さらに接着面への凝集を引き起こして、ICAM-1 などのリガンドに対する結合力を増強する。この経路は、インテグリン依存性のリンパ球ホーミングや免疫シナプス形成を制御している²⁻⁴⁾。また Mst1 は、アポトーシス、細胞増殖、生体内のストレス応答なども制御している。Mst1 欠損マウスは、WT マウスと比較してリンパ球の移動、抗原認識、お

よび免疫寛容に対して障害を示す。

次に、FoxO 転写因子は、一般的にストレスやインスリン応答において細胞の増殖・生存・老化を制御する分子として知られており、免疫系においては、ナイーブ T 細胞の移動・形質の維持や制御性 T 細胞の分化の促進を制御していると考えられている。

また CD8 T 細胞の分化制御においては、FoxO1 は転写因子である T-bet の抑制を介して CTL の分化を抑制し、メモリー T 細胞への分化を促進する^{5,6)}。FoxO3a はアポトーシス促進タンパクである Bim, puma の誘導を介して活性化した CD8 T 細胞の増殖を制限している⁷⁾。Choi らによると Mst1 欠損 T 細胞の細胞死は酸化ストレスによるものであり、FoxO1/3 の活性化とタンパク質発現レベルの減少と関連していると言われている⁸⁾。また FoxO 分子は、Mst1 によりリン酸化されることによりタンパク量が安定化し、また核移行が促進されることが知られている。

しかしながら現在まで、Mst1 と FoxO 軸による CD8 T 細胞の分化・機能に関する報告はなく、Mst1 欠損の細胞傷害性 T 細胞における FoxO タンパク質の発現についての報告もない。

そこで今回、私たちは Mst1 の細胞傷害性 T 細胞の FoxO1, FoxO3a タンパク質発現と細胞障害性及び腫瘍免疫の役割を研究した。

材料と方法

マウス及び細胞障害性 T 細胞の作製方法

オボアルブミン（OVA）特異的 TCR を発現する

Schema 2. 細胞障害性 T 細胞の誘導方法

1. 野生型または、Mst1 欠損した OVA 特異的 TCR を持つ OT-I トランスジェニックマウス使用
2. 脾臓細胞から Vβ5 陽性 CD8 陽性 T 細胞をセルソーターで単離
3. 抗 CD3 抗体, 抗 CD28 抗体, サイトカイン IL-2 含有 RPMI 培地で 3 日間培養する
4. CD8 T 細胞が CTL へ分化すると顕著に IFN- γ , グランザイム B およびパーフォリンの発現が誘導される

OT-1/Mst1 欠損 C57BL/6 マウスと OT-1/WT C57BL/6 マウスを使用し、これらのマウスの脾臓細胞からセルソーターを用いて Vβ5+ CD8 T 細胞を単離しナイーブ CD8 T 細胞とした。細胞障害性 T 細胞の生成のために、単離された Vβ5+ CD8 T 細胞は、抗 CD3 抗体, 抗 CD28 抗体, IL-2 含有 complete RPMI medium で 3 日間培養した。CD8 T 細胞が CTL へ分化すると顕著に IFN- γ , グランザイム B およびパーフォリンの発現が誘導される (Schema 2)。

細胞障害性 T 細胞の細胞質内染色

3 日間培養した OT-1/Mst1 欠損及び OT-1/WT マウスの細胞障害性 T 細胞を PMA, イオノマイシンで刺激し、細胞内の IFN- γ , granzyme B, perforin, T-bet, PD-1 発現を細胞質内染色にてフローサイトメトリーにより測定した。

免疫プロットティング

OT-1/Mst1 欠損及び OT-1/WT マウスのナイーブ及び細胞障害性 T 細胞の細胞内での Mst1, FoxO1, FoxO3a タンパクレベルを免疫プロット法により測定した。

TCR 誘導性細胞増殖実験

Mst1 欠損は増殖, 生存に影響する可能性があるため、CD8 T 細胞内の Mst1 欠損が、TCR 誘導性増殖に影響を与えるかどうかを検討した。Mst1 欠損及び WT CD8 T 細胞を刺激し 48 から 96 時間のチミジンの取り込みを使用して細胞増殖能を評価した。

がん細胞株と細胞障害性分析

Mst1 による CTL の細胞障害活性への影響をがん細胞株に対する細胞障害試験により検討した。

レンチウイルスを用いてオボアルブミンを発現するマウス前立腺癌細胞株である TRAMP-C1-OVA 細胞を作製した。この TRAMP-C1-OVA 細胞を 48 時間マウス IFN- γ で培養し、新たに TRAMP-C1-OVA (1×10^4 個) をプレートに播種し 30 分間培養する。その後、OT-1/Mst1 欠損及び OT-1/WT マウスの細胞障害性 T 細胞 (3×10^4 個) を播種し 5%CO₂, 37°C で 8 時間共培養する。殺傷効率は、細胞障害により破壊された標的細胞から放出される LDH の量を CytoTox96® 非放射性細胞毒性アッセイキットを用いて測定した。

in vivo での CTL による腫瘍抑制実験

6～12 週齢の C57BL/6 マウスの左側腹部に、オボアルブミン (OVA) を発現するマウス悪性リンパ腫細胞株である E.G7-OVA 細胞 (1×10^6 個) を皮下に移植し、腫瘍体積は 2 日ごとに (長さ, 幅, および高さ) を測定する。9～10 日後、腫瘍は 500～1000 mm³ に腫瘍形成する。Mst1 欠損及び WT/OT-1 の細胞障害性 T 細胞 (5×10^5 個) は、この担癌マウスに静脈内移入し、腫瘍サイズおよび全生存率を 35 日間測定した。

結 果

1. FoxO3a の発現は、ナイーブ Mst1 欠損 CD8 T 細胞では、有意に WT と比較して約 60% に減少した。また FoxO1 の発現は Mst1 欠損細胞障害性 T 細胞で、WT と比較して有意に減少した (Fig. 1)。
2. Mst1 欠損細胞障害性 T 細胞において WT と比較して、IFN- γ , グランザイム B が有意に増加し、細胞傷害性 T 細胞のエフェクター機能を促進した。し

Fig. 1. 免疫プロット法

OT-1/Mst1 欠損及び OT-1/WT マウスのナイーブ及び細胞障害性 T 細胞の細胞内での Mst1, FoxO1, FoxO3a タンパクレベルを免疫プロット法により測定. (n=4 from four independent experiments). FoxO1 and FoxO3a expression normalized to β -actin (mean $\pm$ SD) in Mst1^{-/-} cells were compared to those of Mst1^{+/+} as a standard.

かしパーフォリンは変化がなかった.

Mst1 欠損細胞傷害性 T 細胞において WT と比較して, T-bet 発現レベルが増加した (Fig. 2A, B, C).

3. Mst1 欠損と WT の間で, チミジン取り込みによる細胞増殖は DNA 合成に有意差はなかった (Fig. 3).
4. OT-1/Mst1 欠損細胞障害性 T 細胞は, 野生型の CTL 比べて TRAMP-C1-OVA 細胞に対して有意に高い細胞傷害活性を示した (Fig. 4A, B, C).
5. 野生型マウスの皮下の腫瘍形成の様子 (Fig. 5A, B).
6. 腫瘍抑制効果

野生型 CTL を移入したマウスでは, 移入していないマウスに比べて若干の腫瘍増大の抑制効果しか認められなかったが, Mst1 欠損 CTL を移入したマウスにおいて, 明らかな腫瘍増大の抑制が認められた.

Fig. 2. 細胞障害性 T 細胞の細胞質内染色

3 日間培養した OT-1/Mst1 欠損及び OT-1/WT マウスの細胞障害性 T 細胞を PMA, イオノマイシンで刺激し, 細胞内の IFN- γ , granzyme B, perforin 発現を細胞質内染色にてフローサイトメトリーにより測定.

A: flow cytometry

B: Mean fluorescent intensity ($\pm$ SD) of IFN γ (n=6), granzyme B (n=5), and perforin (n=3) Data were collected from 3 to 6 independent experiments.

C: CTL の細胞内の転写因子である T-bet, Blimp-1 の発現. Mst1 欠損細胞傷害性 T 細胞において WT と比較して, T-bet 発現レベルの増加を認めた. ** P<0.01

T-bet は IFN- γ granzyme B の転写因子であり, これによって CTL の機能が増強している可能性が示唆される.

FoxO は, 転写因子 T-bet, Blimp-1 の発現を抑制することで CTL の分化を抑制する.

Fig. 3. TCR 誘導性細胞増殖実験

Mst1 欠損及び WT CD8 T 細胞を刺激し 48 から 96 時間のチミジンの取り込みを使用して細胞増殖能を評価

全生存期間

CTL を移入していないマウス、野生型の CTL を移入したマウスに比べて Mst1 欠損 CTL を移入したマウスでは明らかな生存期間延長を認めた。したがって、*in vivo* においても Mst1 欠損による CTL の細胞障害活性は増強することが確認された (Fig. 5C, D)。

考 察

Mst1 欠損が、細胞障害性 T 細胞における IFN γ およびグランザイム B の発現をアップレギュレーションする T-bet 発現を増加させることを示唆し、CD8 T 細胞

の分化を促進する。Mst1 はおそらく FoxO3a の活性化を介して、T-bet 発現を抑制する。Mst1 は、FoxO1 および FoxO3a を調節することにより、CD8 T 細胞のエフェクター機能を抑制するだろう。

我々の研究は、Mst1-FoxO axis によって細胞傷害性エフェクター機能の新規調節経路を示唆した。FoxO タンパクは、転写因子である T-bet の抑制を介して、メモリー T 細胞への CD8 細胞の分化を促進するか、または負にプライミングされた CD8 T 細胞の生存を調節していると考えられた (Schema 3)。

Mst1 および Mst2 は、細胞周期およびアポトーシスを調節する mammalian hippo kinases である。しかし、Mst1 欠損マウスは、腫瘍の高発現を示さなかった。強化された細胞障害性 T 細胞の機能もおそらく腫瘍形成の防止に貢献するだろう。

まとめると、今回の研究は、Mst1 は過剰な炎症または自己免疫を予防し、CD8 T 細胞応答の調整の役割を果たし、腫瘍免疫療法のための潜在的なターゲットになり得るだろう。

本論文は、学位論文⁹⁾を基に、第 16 回関西医科大学医学賞に応募口演 (2017 年 2 月 17 日) し、奨励賞を受賞した際の発表要旨でもある。

Fig. 4. Mst1 による CTL の細胞障害活性への影響

A: レンチウイルスを用いてオボアルブミンを発現するマウス前立腺癌細胞株である TRAMP-C1-OVA 細胞を作製。

B: TRAMP-C1-OVA 細胞を 48 時間マウス IFN- γ で培養し、新たに TRAMP-C1-OVA (1×10^4 個) をプレートに播種し 30 分間培養。その後、OT-1/Mst1 欠損及び OT-1/WT マウスの細胞障害性 T 細胞 (3×10^4 個) を播種し 5%CO₂, 37°C で 8 時間共培養する。

C: 抗原特異的殺傷能: Data were collected from four independent experiments. * P<0.05

Fig. 5. *In vivo* tumor progression 抑制試験

- A: OVA を発現するマウス悪性リンパ腫細胞株である E.G7-OVA 細胞 (1×10^6 個) を皮下に移植し, 腫瘍体積は 2 日ごとに (長さ, 幅, および高さ) を測定する. 9~10 日後, 腫瘍は $500 \sim 1000 \text{ mm}^3$ に腫瘍形成し, Mst1 欠損及び WT/OT-1 の細胞障害性 T 細胞 (5×10^5 個) を, この担癌マウスに静脈内移入する.
- B: 担癌マウスへ CTL 移入後 15 日目の腫瘍形成状態
- C: 腫瘍サイズの推移 (平均 $\pm$ SEM) (untreated, $n=3$; Mst1^{+/+}, $n=4$; Mst1^{-/-}, $n=4$).
- D: マウスの生存曲線 (data were from two independent experiments)

Schema. 3. FoxO による CTL の制御と Mst1

Mst1 欠損 CTL の細胞障害性が亢進していることから, CTL の分化や機能に関する転写調節因子で且つ Mst1 の下流分子である FoxO 分子に着目.

FoxO1/3 分子は, 転写調節因子である T-bet あるいは blimp-1 を抑制することによって, CTL への分化, 機能を抑制する.

FoxO 分子は, Mst1 によりリン酸化されることによりタンパクが安定化する.

文 献

1. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, Mullen AC, Gasink CR, Kaech SM, Miller J, *et al.* Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6, 1236–1244, 2005.
2. Katagiri K, Katakai T, Ebisuno Y, Ueda Y, Okada T, Kinashi T. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J* 28, 1319–1331, 2009.
3. Tomiyama T, Ueda Y, Katakai T, Kondo N, Okazaki K, Kinashi T. Antigen-specific suppression and immunological synapse formation by regulatory T cells require the Mst1 kinase. *PLoS One* 8, e73874, 2013.
4. 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. *Nat Commun* 3, 1098, 2012.
5. Rao RR, Li Q, Gubbels Bupp MR, Shrikant PA. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8⁺ T cell differentiation. *Immunity* 36, 374–387, 2012.
6. Hess Michelini R, Doedens AL, Goldrath AW, Hedrick SM. Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *J Exp Med* 210, 1189–1200, 2013.
7. Sullivan JA, Kim EH, Plisch EH, Peng SL, Suresh M. FOXO3 regulates CD8 T cell memory by T cell-intrinsic mechanisms. *PLoS Pathog* 8, e1002533, 2012.
8. Choi J, Oh S, Lee D, Oh HJ, Park JY, Lee SB, Lim DS. Mst1-FoxO signaling protects Naive T lymphocytes from cellular oxidative stress in mice. *PLoS One* 4, e8011, 2009.
9. Yasuda K, Ueda Y, Ozawa M, Matsuda T, Kinashi T. Enhanced cytotoxic T-cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency. *FEBS Lett* Jan 590(1): 68–75, 2016.