

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461126

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Mst1 promotes progression of dilated cardiomyopathy by modulating immune system

研究代表者

前嶋 康浩 (MAEJIMA, YASUHIRO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40401393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回、私たちは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いだした。また、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。これらの結果から、Mst1が心筋炎が拡張型心筋症に移行するのを予防する新しい治療標的になるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that Mst1 phosphorylates FoxO1, a forkhead transcription factor, thereby modulating cell survival of cardiomyocytes through induction of nuclear translocation of FoxO1. In this study, based on this finding, we explored that the role of Mst1 on Foxp3, another forkhead transcription factor which regulates the function of regulatory T cell (Treg), and found that Mst1 modulates the progression of post-myocarditis dilated cardiomyopathy through phosphorylating Foxp3 through modulating Treg-mediated immune system.

研究分野：循環器内科学

キーワード：制御性T細胞 自己免疫性心筋炎 リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

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 遺伝子異常、 ウイルス感染、 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<sup>1</sup>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<sup>2</sup>。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<sup>3</sup>。

最近、Mst1 の先天性欠失が原発性免疫不全症の原因であること<sup>4</sup>や、Mst1 欠損マウスでは自己免疫疾患様症状を呈すること<sup>5</sup>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<sup>6</sup>、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<sup>7</sup>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。

## 2. 研究の目的

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。

## 3. 研究の方法

- (1) Mst1 による Foxp3 のリン酸化部位の確定:  
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。  
キナーゼアッセイ: 活性化型 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。  
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。  
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

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。

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<sup>8</sup>。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

(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

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。

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  $\alpha$ MHC 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。

#### 4. 研究成果

(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: <sup>32</sup>P-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ト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  $\alpha$ 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。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Watanabe R, Suzuki JI, Wakayama K, Maejima Y, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Morishita R, Komuro I, Isobe M. A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017 Mar 7;7:43920. (査読有り)  
Nakamura M, Zhai P, Del Re DP, Maejima Y, Sadoshima J. Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury. *JCI Insight*. 2016 Apr 21;1(5). (査読有り)  
Shiheido Y, Maejima Y, Suzuki JI, Aoyama N, Kaneko M, Watanabe R, Sakamaki Y, Wakayama K, Ikeda Y, Akazawa H, Ichinose S, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Oct;99:123-137. (査読有り)  
Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, Saito T, Maejima Y, Hsu CP, Nomura M, Egashira K, Levine B, Sadoshima J. Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload-Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure. *Circulation*. 2016 Mar 29;133(13):1249-63. (査読有り)  
Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Jun;95:19-25. (査読有り)  
Sciarretta S, Zhai P, Maejima Y, Del Re DP, Nagarajan N, Yee D, Liu T, Magnuson MA, Volpe M, Frati G, Li H, Sadoshima J. mTORC2 regulates cardiac response to stress by inhibiting MST1. *Cell Rep*. 2015 Apr 7;11(1):125-36. (査読有り)  
Maejima Y, Chen Y, Isobe M, Gustafsson ÅB, Kitsis RN, Sadoshima J. Recent progress in research on molecular mechanisms of autophagy in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Feb 15;308(4):H259-68. (査読有り)  
Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, Zhai P, Sciarretta S, Toli J, Nomura M, Mihara K, Egashira K, Ohishi M, Abdellatif M,

Sadoshima J. Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circ Res.* 2015 Jan 16;116(2):264-78. (査読有り)  
Maejima Y, Sadoshima J. SUMOylation: a novel protein quality control modifier in the heart. *Circ Res.* 2014 Sep 26;115(8):686-9. (査読有り)

〔学会発表〕(計 13 件)

前嶋康浩. The Critical Role of Autophagy in the Progression of Heart Failure. 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017.03.18. 石川県立音楽堂(石川県金沢市)  
前嶋康浩. オートファジーの制御異常による心不全発症機構の解明. 第 90 回日本薬理学会年会 2017.03.15. 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)  
前嶋康浩, 磯部光章. 炎症を基盤とした拡張型心筋症に対するリナグリプチンの発症および病状進展抑制効果に関する機序についての研究. 第 20 回日本適応医学会学術集会 2016.12.17. 東京コンベンションホール(東京都中央区)  
Yasuhiro Maejima, Narayani Nagarajan, Peiyong Zhai, Mitsuaki Isobe, Junichi Sadoshima. GSK-3 $\beta$  inhibits cardiac hypertrophy by phosphorylating FoxO1. American Heart Association Scientific Sessions 2016, 2016.11.15. New Orleans, USA.  
Yasuhiro Maejima, Yusuke Ito, Natsuko Tamura, Ryo Watanabe, Mitsuaki Isobe. Suppression of dipeptidyl peptidase-4 activity attenuates cardiac dysfunction during autoimmune myocarditis by suppressing cathepsin-G activity. 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016.03.18. 仙台国際センター(宮城県仙台市)  
Yasuhiro Maejima, Yusuke Ito, Natsuko Tamura, Ryo Watanabe, Mitsuaki Isobe. Dipeptidyl peptidase-4 deteriorates cardiac function during autoimmune myocarditis by facilitating cathepsin-G activity. American Heart Association Scientific Sessions 2015, 2015.11.9. Orlando, USA.  
Yasuhiro Maejima, Yusuke Ito, Natsuko Tamura, Ryo Watanabe, Mitsuaki Isobe. Dipeptidyl peptidase-4 suppression leads to attenuation of cardiac dysfunction caused by autoimmune myocarditis through inhibiting cathepsin-G activity. 第 19 回日本心不全学会学術集会 2015.10.24. グランフロント大阪(大阪府大阪市)  
Yasuhiro Maejima, Junichi Sadoshima, Mitsuaki Isobe. Mammalian sterile 20-like kinase-1 inhibits autophagy, thereby compromising protein quality control in the heart. 第 79 回日本循環器学会学術集会 2015.4.24. 大阪国際会議場(大阪府大阪

市)  
Yasuhiro Maejima, Junichi Sadoshima, Mitsuaki Isobe. Suppression of autophagy by Mst1 exacerbates cardiac dysfunction by deteriorating protein quality control in the Heart. 第 31 回国際心臓研究学会日本部会 2014.11.29. ウィンクあいち(愛知県名古屋市)  
Yasuhiro Maejima, Akihiro Shirakabe, Yoshiyuki Ikeda, Peiyong Zhai and Junichi Sadoshima. Dynamin-related protein 1 (Drp1) accumulates in mitochondria and plays a protective role in the heart in response to pressure overload. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014.11.25. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
Yasuhiro Maejima, Narayani Nagarajan, Peiyong Zhai, Mitsuaki Isobe, Junichi Sadoshima. Mst1 plays a protective role in response to ischemia in the heart by promoting C/EBP- activation. American Heart Association Scientific Sessions 2014 2014.11.17 Chicago, USA.  
Yasuhiro Maejima, Junichi Sadoshima, Mitsuaki Isobe. Mst1 plays a cell-protective role in the heart through FoxO1 and C/EBP- phosphorylation. 第 18 回日本心不全学会学術集会 2014.10.10. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)  
前嶋康浩. オートファジー機能異常による心不全発症機構の解明. 第 35 回日本循環制御医学会総会 2014.7.4. 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前嶋 康浩 (MAEJIMA YASUHIRO)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・  
講師  
研究者番号：40401393

(2) 研究分担者

磯部 光章 (ISOBE MITSUAKI)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・  
教授  
研究者番号：80176263

(3) 連携研究者

鈴木 淳一 (SUZUKI JUNICHI)  
東京大学・医学系研究科・特任准教授  
研究者番号：90313858