

# 論 文 要 旨

Enhanced cytotoxic T-cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency

(Mst1 欠損による増強された細胞傷害性 T 細胞の機能と腫瘍発達の抑制)

関西医科大学腎泌尿器外科学講座  
(指導：松田 公志 教授)

安田 鐘樹

## 【研究目的】

細胞傷害性 CD8 T リンパ球は、ウイルス感染や腫瘍拒絶に対する免疫応答の主要な細胞である。FoxO 転写因子は、CD8 T 細胞の移動、活性化および機能の重要な調節因子である。FoxO1 は、メモリーT 細胞への分化を促進する転写因子である T-bet の抑制を介して、エフェクターT 細胞の分化をブロックする。

Ste20-like kinase である Mst1 は豊富にリンパ球に発現し、アポトーシス、増殖、ストレス応答、および移動を制御している。Mst1 欠損マウスは、WT 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。Choi 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。

今回、私たちは Mst1 の細胞傷害性 T 細胞の細胞障害性と腫瘍免疫の役割を研究した。

## 【研究方法】

オボアルブミン(OVA)特異的 TCR を発現する 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 V $\beta$ 5+ 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 V $\beta$ 5+ 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。

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ブロット法により測定した。

3 日間培養した細胞障害性 T 細胞を PMA、イオノマイシンで刺激し細胞内の IFN- $\gamma$ , granzyme B, perforin, T-bet の発現を測定した。

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 欠損と WT CD8 T 細胞を刺激し 48 から 96 時間のチミジン取り込みを使用し細胞増殖能を評価した。

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- $\gamma$  で培養し、新たに TRAMP-C1-OVA ( $1 \times 10^4$  個) をプレートに播種し 30 分間培養する。その後、細胞障害性 T 細胞 ( $3 \times 10^4$  個) を播種し 5%CO<sub>2</sub>, 37°C で 8 時間共培養する。殺傷効率は CytoTox96®非放射性細胞毒性アッセイキットを用いて測定した。

6~12 週齢の C57BL6/J 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 ( $1 \times 10^6$  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 mm<sup>3</sup> に腫瘍形成する。Mst1 欠損及び WT/OT-I の細胞障害性 T 細胞 ( $5 \times 10^5$  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。また死亡したマウスからの腫瘍組織の凍結切片を用いて抗 V $\beta$ 5 抗体と DAPI で染色し細胞障害性 T 細胞を免疫染色した。

## 【結果】

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 細胞では、WT と比較して減少した。

Mst1 欠損細胞障害性 T 細胞において WT と比較して、IFN- $\gamma$ , granzyme 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。

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。WT と Mst1 欠損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。

OT-1/Mst1 欠損細胞障害性 T 細胞は、WT と比較して TRAMP-C1-OVA 細胞に対して有意に高い細胞傷害活性を示した。

Mst1 欠損細胞傷害性 T 細胞は、*in vivo* において WT と比較して腫瘍の成長をより効率的に抑制し、全生存期間を延長させた。

## 【考察】

Mst1 欠損が、細胞障害性 T 細胞における IFN $\gamma$  および granzyme 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。

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。

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。