

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19128

研究課題名(和文) CD4陽性T細胞の確率的な活性化によって制御される抗原特異的な細胞増殖

研究課題名(英文) Regulation of antigen-specific immune responses by stoichiometric activated individual CD4 T cells

研究代表者

町山 裕亮 (Machiyama, Hiroaki)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40704606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体防御機構の免疫系は抗原特異的な免疫応答が動作機構の基本であり、個々の免疫細胞も保持すると思われてきた。本研究では、CD4陽性ナイーブT細胞の抗原特異性や応答性は極めて乏しいことを見出した。さらに、免疫応答を亢進する活性化T細胞がAPCと相互作用しているとナイーブT細胞の抗原特異性は顕著になり、一方で、免疫応答に抑制的に機能する制御性T細胞が相互作用しているとナイーブT細胞の応答性は低く保たれた。T細胞の抗原特異的な免疫応答はAPCに相互作用する細胞により大きく変動することを発見した。

研究成果の概要(英文)：Adaptive immunity is involved in the specific antigen recognition between T lymphocytes (T cells) and antigen presenting cells (APCs). It has been believed that T cells show antigen-specific response even at single cell level. In this study, using single cell manipulation and live cell imaging, we developed a single cell assay system that can monitor T cell activation by T cell-APC interaction. We found that the responsibility and the antigen-specificity of T cells were quite poor. When APCs interact with activated T cells, the antigen-specificity of T cells were increases. On the other hand, interaction with regulatory T cells that function inhibitory in T cell response did not enhance T cell response. We suggest that, for T cells, to sense the surrounding condition of APCs is essential for antigen-specific immune responses.

研究分野：生物物理

キーワード：獲得免疫 一細胞操作 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

生体防御機構の免疫系は機能的に自然免疫系と獲得免疫系に大別される。獲得免疫系は「抗原特異性」がキーファクターとなっており、特異的な抗原を認識することで細胞増殖や抗体産生などの免疫応答が引き起こされることが知られている。このような応答を維持するために多種多様な免疫細胞が自己組織的に運動しており、その運動性の破綻は免疫不全、アレルギー、自己免疫疾患などの多くの免疫疾患を引き起こすと考えられている。抗原の認識は単一細胞レベルで行っており、個々の免疫細胞の挙動が免疫系の運動性に及ぼす影響や、逆に免疫系の運動性の破綻による個々の細胞への影響について総合的な理解が求められている。

2. 研究の目的

(1) 獲得免疫系の司令塔である CD4 陽性 (CD4+) T 細胞を用いて個々の細胞と細胞集団がどのように運動して1つのシステムを構築するかを調べる。CD4+T 細胞は抗原提示細胞 (APC) の表面に支持されている特異的な抗原を認識して活性化 (免疫シナプスの形成やカルシウム濃度の上昇など) すると、サイトカインを産生するなどして、同一クローンの CD4+T 細胞の増殖が亢進する。CD4+T 細胞の増殖により、他の免疫細胞に抗原の攻撃性や抗体産生を増強することで免疫系全体の制御が行われている。CD4+T 細胞の増殖は特異抗原の存在によって全か無かの制御されており、CD4+T 細胞の活性化についても同様に全か無かの制御されていると考えられている。そのために、個別の CD4+T 細胞の細胞応答を調べる実験系を構築して、1細胞レベルでも抗原特異性が維持されているか調べる。さらに抗原特異性を変調される条件があるか検討する。

(2) 得られた定量的データをもとに、CD4+T 細胞の抗原特異的な免疫応答の理論的モデルを構築する。同様なモデルは数多く提案されているが、多様な条件下における単一細胞の状態遷移の情報も組み込めるため、より複雑な状況にも対応が可能となる。この理論モデルから CD4+T 細胞による免疫恒常性が維持される条件などを予測する

3. 研究の方法

(1) CD4+T 細胞は抗原提示細胞 (APC) 表面にある特異抗原と接触して、さらに抗原非特異的な補助刺激が加わることで活性化する。活性化の際には一過的に細胞内カルシウム濃度が上昇することが知られている。本研究では、個々の CD4+T 細胞の抗原特異性を定量化するために、単一の CD4+T 細胞をガラスピペットで捕捉して、APC と直接接触させる。CD4+T 細胞は OVA ペプチド特異的免疫応答を示す D011.10 トランスジェニックマウスから単離してカルシウム指示薬 Rhod-2 でラベル

する。APC は BALB/c マウスの樹状細胞を単離して OVA ペプチドをロードする。ポリ L リンコートしたスライドガラスに APC を固定して、その後 T 細胞を加えてガラスキャピラリーで捕捉する。T 細胞と APC を接触させて Rhod-2 の蛍光輝度を計測する (図 1)。蛍光輝度の上昇により T 細胞の活性化とみなし、その活性化頻度を記録する。OVA ペプチドの有無、接触回数を変化させることで T 細胞の活性化頻度が変調する環境があるか調べる。

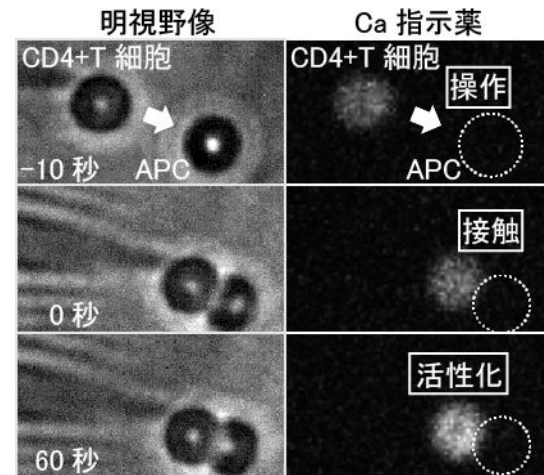


図 1、本研究で用いた実験系

(2) 顕微鏡観察下で区別できるサブセットや細胞数は多くて 3 種類、10 細胞程度だが、脾臓やリンパ節の中には CD4+T 細胞だけで 106 個以上いるので、生体内の現象を理解するためには個々の状況で得られた実験結果を基に理論モデル系を構築する。

4. 研究成果

(1) 当初は個別の CD4+T 細胞についても OVA ペプチド特異的活性化すると予想されたが、ペプチドと接触しても活性化頻度は 20% 程度で、特異性も 2 倍程度応答性が上昇するだけで、個々の CD4+T 細胞では抗原特異性や応答性は極めて低いことが明らかになった。

(2) 獲得免疫系のシステムは抗原特異的に応答するので、確率的な応答を示す個々の CD4+T 細胞がどのようにして抗原特異的なシステムを形成するかを調べた。

実際の生体内では抗原との接触は一度だけでなく、複数の APC と何度も接触を繰り返している。最初は乏しい CD4+T 細胞の抗原特異に対する応答能が複数回の抗体刺激によって上昇していくと考え、一度活性化した CD4+T 細胞を複数回 APC と接触させた時の活性化頻度を記録した。しかし、活性化頻度は上昇せず、一度活性化した CD4+T 細胞は 1 時間程度再び活性化を示すことはなかった。CD4+T 細胞は活性化すると抗原受容体をエンドサイトーシスして過剰な応答を抑えるこ

とが知られており、本研究の結果はこのよう
な機能を反映していると示唆される。

特異抗原をもつ APC と CD4+T 細胞が接触
して、その接触面に免疫シナプスと呼ばれる
接着点が形成されると APC と CD4+T 細胞は強
固に相互作用する。複数の細胞間で免疫シナ
プスが形成されることでコロニーが形成さ
れ、活性化や増殖シグナルが増強されると考
えられる。上項で調べた通り短時間における
CD4+T 細胞の活性化状態が特異抗原の有無に
大きく依存しない結果を受けて、APC 周囲の
環境を変化させることで T 細胞の活性化頻度
が上昇するか調べた。複数の APC が相互作用
している細胞塊と接触しても CD4+T 細胞の活
性化頻度に影響はなかった。しかし、CD4+T
細胞を事前に APC と接触させて活性化させ、
APC との相互作用を持続させておき、活性化
CD4+T 細胞が相互作用している APC と接触さ
せると CD4+T 細胞の活性化頻度は著しく上昇
する (~ 50%) ことが分かった。

CD4+T 細胞は胸腺で造血幹細胞から分
化した後、リンパ節や脾臓に移動して抗原刺
激によりさらにヘルパー T 細胞や細胞障害性
T 細胞などエフェクター T 細胞に成熟、分化
する。特に免疫応答に対して抑制的に機能す
ることが知られている制御性 CD4+T 細胞
(Treg) は過剰な免疫応答を抑えることで自
己免疫疾患の発症を抑えるキープレイヤー
として近年注目されている。そこで、活性化
CD4+T 細胞ではなく、Treg を相互作用させた
APC と CD4+T 細胞が接触した時の活性化頻度
を調べた。その結果、CD4+T 細胞の活性化頻
度の上昇は観察されなかった。さらに、活性
化 CD4+T 細胞と Treg を同じ APC に相互作用
させた場合の CD4+T 細胞の活性化頻度を調べ
たところ、APC 上に一つでも Treg が結合し
ていると、CD4+T 細胞の活性化は有意に抑え
られることが分かった。接触させる CD4+T 細胞
は同じであるにも関わらず、接触する APC 周
囲の環境を変化させるだけで、CD4+T 細胞の
活性化頻度を制御しているという驚くべき
知見が得られた。

(3) 実験が行える試行回数には限りがある
一方で、リンパ節の中には 10^{4-6} 程の CD4+T 細胞
が存在するので、得られた定量データをも
とに理論モデルを構築して理論的裏付けを
示した。

CD4+T 細胞と APC をそれぞれ 10000 細胞
入れた閉鎖系空間の中でランダムに接触す
るようにした。実験で得られた CD4+T 細胞の
活性化頻度に加えて、1 時間は 2 度目の活
性化をしないこと、活性化により 2 時間は APC
と結合することを条件に加えた。CD4+T 細胞
は活性化することで活性化インデックスが
増加して特異抗原の有無によって、そのイン
デックスに閾値ができるか理論計算を行っ

た。獲得免疫系における CD4+T 細胞は 18 時
間以内には活性化状態に入るので 18 時間の
時点の状態を解析した。この条件下で特異抗
原の有無により個々の CD4+T 細胞の活性化は
確率的であっても、システムとして抗原特異
的な応答を示すことを明らかにした。

上記の条件では数日経つと特異抗原が
非存在下であっても免疫応答の亢進される
ことになるので、生体恒常性を維持するシス
テムとしては不十分である。CD4+T 細胞は恒
常的に抗原刺激を加えていないと活性化状
態が維持されないことが知られているので、
一度活性化した CD4+T 細胞が 2 時間以上再活
性化されないで活性化インデックスが減少
する条件を加えた。その結果、特異抗原存在
下では免疫応答が亢進され、非存在下では不
活性化状態に維持されることが示された(図 2)。

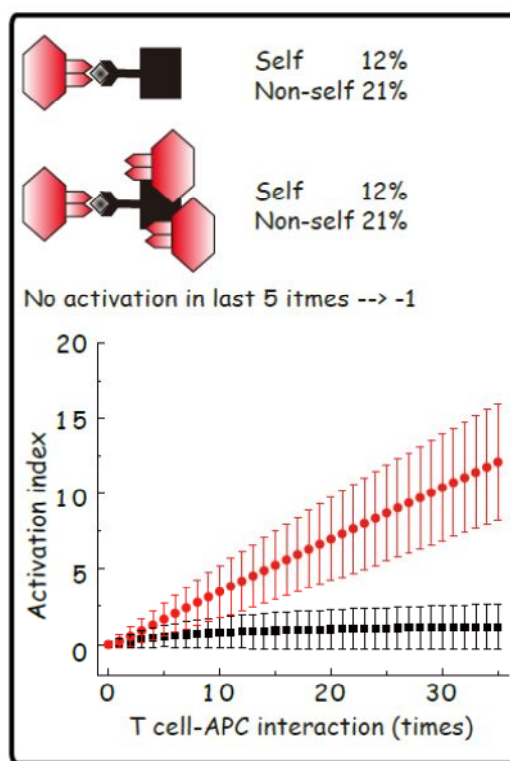


図 2、理論モデルのシミュレーション結果

(4) 本研究では、当初の達成目標をこえて、
CD4+T 細胞活性化の現象論だけでなく、シグ
ナル伝達経路の分子メカニズムに関する実
験も行った。CD4+T 細胞の活性化は抗原受容
体と抗原と相互作用して抗原受容体の細胞
内ドメインがリン酸化させることが引き金
となる。Src ファミリーキナーゼがその役割
を果たすことが知られていたが、分子内ド
メインの機能やリクルートされる経路などは
不明な点が多かった。一分子イメージングや
FRAP 法などの蛍光イメージングの手法を駆
使して、SH3 ドメインは細胞膜内のダイナ
ミクスに重要であること、N 末端の膜結合修
飾をしなくても機能部位に局在できること
を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Hiroaki Machiyama, Tomoyuki Yamaguchi, Tomonobu M. Watanabe and Hideaki Fujita. A novel c-Src recruitment pathway from cytosol to focal adhesions. FEBS Letters, 査読有、591(13), (2017) doi: 10.1002/1873-3468.12696.

Hiroaki Machiyama, Tomoyuki Yamaguchi, Yasuhiro Sawada, Tomonobu M. Watanabe and Hideaki Fujita. SH3 domain of c-Src governs its dynamics at focal adhesion and the cell membrane. FEBS Journal, 査読有、282(20), (2015)

〔学会発表〕(計5件)

Hiroaki Machiyama et al., Molecular mechanism of T cell signaling termination. 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2017.

町山裕亮、他。ナイーブT細胞の抗原応答性は相互作用する細胞組成により調節される。第6回日本生物物理学会関東支部会、2017。

Hiroaki Machiyama et al., Development of a single cell assay for T lymphocytes in adaptive immunity. 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2016.

Hiroaki Machiyama et al., SH3 domain of c-Src regulates its dynamic behavior in the cell membrane. ASCB annual meeting 2015, 2015.

Hiroaki Machiyama et al., SH3 domain of c-Src regulates its dynamic behavior in the cell membrane. Biophysical Society 59th Annual Meeting 2015.

〔図書〕(計2件)

横須賀忠、古畑昌枝、豊田博子、秦喜久美、矢那瀬紀子、町山裕亮、臨床免疫・アレルギー科、細胞膜脂質成分によるT細胞シグナルソームの活性化と制御機構、2017、321-328

横須賀忠、古畑昌枝、豊田博子、秦喜久美、矢那瀬紀子、町山裕亮、臨床免疫・アレルギー科、最先端イメージング技術によるTCRシグナル研究の進歩、2016、169-176

〔その他〕

ホームページ等

<https://tokyo-med-imm.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

町山 裕亮 (MACHIYAMA, Hiroaki)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：40704606