

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06165

研究課題名(和文)細胞膜構造ダイナミクスによるT細胞抗原受容シグナルの時空間的制御機構

研究課題名(英文)Spatiotemporal mechanism in T cell signaling regulated by cell membrane dynamics

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞の抗原認識は免疫系をアクティブにする根幹機能だが、単一細胞レベルでの機能解析は多く行われていない。様々なT細胞シグナル関連分子が同定されてきたが、時空間的にどのように制御されているか不明な点が多く、抗原認識の分子メカニズムを正しく理解しているとは言いがたい。本研究は高解像度分子イメージングを通して分子の局在やダイナミクスに着目した。その結果、T細胞サブセットごとに異なるシグナル伝達様式が存在することを明らかになった。これらの成果は血液がんに対して非常に効果的なキメラ抗原受容体CAR-T細胞治療における分子基盤を支える基礎データとなり今後のさらなる発展が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞の活性化の度合いはT細胞の抗原受容体と標的細胞の抗原との結合力によって決まると考えられている。この結合力は抗原受容体と抗原の親和性だけで議論されてきたが、本研究では共受容体も含めた複合体として考える必要があることを明らかにした。さらに、CD8陽性キラーT細胞ではT細胞内シグナルのトリガーとなるLckを抗原受容体に集積させるために共受容体は必須であるが、CD4陽性T細胞では複合体の結合力依存的に必要性が変化することを見出した。新しいがん治療法のCAR-T細胞療法においても今回発見した原理に基づいて活性化していることが分かり、今後の治療開発への道筋が示されたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Antigen recognition of T cell is essential for activation of acquired immunity. However, the functional analysis of individual T cells has been rarely carried out. Although many of T cell signaling related molecules has been identified, it still unknown what and how these molecules are spatio-temporally regulated upon antigen recognition. In this study, we focused on the localization and the dynamics of signaling molecules by using the combination system of antigen presenting supported membrane and high spatio-temporal resolution molecular imaging. As a result, we found the different molecular mechanism for T cell activation among the T cell subsets. These findings can be applicable for the chimeric antigen receptor (CAR)-T cell immune therapy.

研究分野：1細胞免疫学

キーワード：T細胞 腫瘍免疫 分子イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T 細胞の抗原認識は免疫応答の根幹であり、抗原認識の異常は様々な免疫疾患の原因となるため、分子レベルの理解が求められている。抗原認識に関わる重要な分子は多数同定されており、複雑なシグナル伝達経路も明らかになりつつあるが、現時点においても抗原認識の分子メカニズムを正確に理解できているとは言えないのが現状である。抗原認識時に T 細胞と抗原提示細胞の細胞間で T 細胞の抗原受容体 TCR を中心とした超分子複合体 (免疫シナプス) が形成される。免疫シナプス形成前に小さな TCR 複合体 (マイクロクラスター) が形成されること、マイクロクラスターにキナーゼ (ZAP70) やアダプター (SLP-76, LAT) などの TCR シグナル関連分子が局在することから、マイクロクラスターがシグナル伝達の「場」として機能することが知られている¹。TCR シグナル関連分子のマイクロクラスターに対する時空間的な関わりを明らかにすることで、T 細胞の抗原認識機構の本質に迫ることができる。

引用文献

1. Yokosuka T et al., Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. Nat Immunol. 2005; 6(12):1253-62.

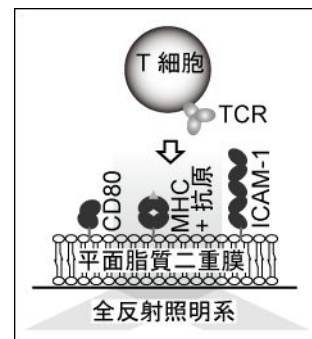
2. 研究の目的

抗原認識やそれに伴う T 細胞の活性化は関連する分子が適時適所に集積することが重要なため、個々の分子がどのような挙動を示し、それがマイクロクラスターとどのように関わるかを可視化する必要がある。本研究では、T 細胞が抗原認識するとき (初期の活性化状態) のシグナル分子の挙動とマイクロクラスターの位置が同時観察できる実験系を構築することを目的とした。さらに、抗原認識は T 細胞-抗原提示細胞間で起きる現象のため、シグナル分子 (たんぱく質) 以外にも細胞膜も抗原認識に関わっているか調べることも目的の 1 つとしている。

3. 研究の方法

抗原提示脂質平面膜法と超解像分子イメージング法を組み合わせた実験系の構築

T 細胞活性化に必要なリガンド (CD80, MHC, ICAM-1) を埋め込んだ平面脂質二重膜をガラス表面に作成し、抗原ペプチドを MHC と結合させる。平面膜に T 細胞を落として接着面を全反射照明顕微鏡を用いて観察する (右図)。マイクロクラスターの位置を特定するために CD3 ζ -GFP を遺伝子導入し、ダイナミクスを観察するシグナル分子は HaloTag を連結して低濃度の STELLA650 ラベルされた HaloTag リガンドで染色することで、個々の分子の挙動を追跡した。T 細胞活性化初期に関連する分子として TCR (CD3 ϵ), 共受容体 (CD4, CD8 α), TCR をリン酸化するキナーゼ Lck を選択した。



4. 研究成果

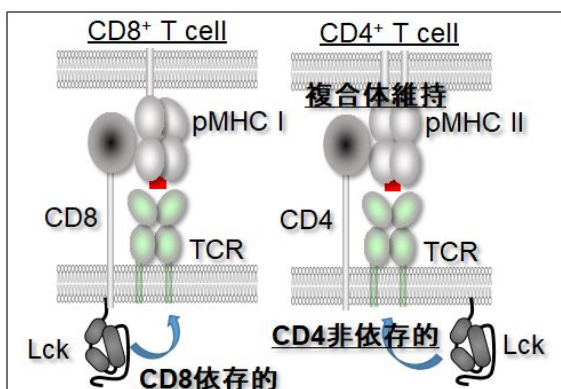
(1) マイクロクラスターの位置と単一分子の振る舞いを同時計測する実験系の構築

マイクロクラスターとシグナル分子をラベルしている蛍光分子を同時に励起し、別々の高感度カメラで画像を取得することで同時観察を可能にした。マイクロクラスターの位置は二値化画像から特定し、単一分子の挙動を単一分子追跡法と平均自乗変位 (MSD) 法により解析することで、クラスター内外、運動の ON/OFF を分類した。その結果、TCR 及び TCR シグナル関連分子はマイクロクラスター外では自由拡散しているが、マイクロクラスター内部で運動 OFF の時間が長くなった。このことはマイクロクラスター内部では TCR を中心とした抗原認識複合体が形成され一定時間維持される必要があることが分かった。また、この運動 OFF の時間が TCR シグナルを ON にすることを示す新規のパラメータとして使用できることが示された。

(2) T 細胞サブセットにより抗原認識様式は異なる

T 細胞は大きく CD4⁺および CD8⁺T 細胞の 2 つのサブセットに大別されるが、サブセット間で活性化に関連する分子ほぼ同じであることから、研究開始当初はこれらのサブセットを区別せずに議論されてきた。Lck は CD3 ζ をリン酸化して TCR シグナルを開始するトリガーとなる分子だが、TCR マイクロクラスターに局在する時間が極端に異なることが分かった。両サブセットにおいて共受容体との結合を介して TCR に集積すると考えられてきたが、CD8⁺T 細胞では既報通りの結果が得られたが、CD4⁺T 細胞では、驚くべきことに、抗原認識に伴い CD4 と Lck は相互作用を解消し独立して機能することが分かった。Lck は CD4 非依存的に確率的に TCR にリクルートした。また、T 細胞活性化に必須であると考えられてきた CD4 は TCR の抗原親和性が高い場合には必要でないことも示された。ただし、抗原親和性が低い場合は CD4 は必要となるが、従来考えられてきた Lck を TCR に集積するためではなく、低い抗原親和性を補うために抗原受容

複合体の構造的安定性を増強する役目があることを新規に見出した(下図)。



(3)キメラ抗原受容体 CAR-T 細胞活性化の分子メカニズムの解明

上述の通りサブセット間で異なる抗原認識様式の存在が示されたが、抗原認識複合体が安定的に維持されることで初期の活性化が起きると考えられる。この考え方をキメラ抗原受容体 CAR-T 細胞の活性化の分子メカニズムに応用した。

CAR-T 細胞療法は血液がんに対して高い奏効率を示すことから新規のがん治療法として注目されている。腫瘍細胞に発現する分子に対する抗体と CD3 ζ など T 細胞活性化に必要な分子のドメインを直列につないだキメラ抗原受容体を T 細胞に遺伝子導入し、腫瘍細胞特異的に殺傷できるようにデザインされた細胞による治療法である。臨床的な成功が次々と報告される一方で初期の活性化メカニズムに関する知見がほとんどなかった。従来、Lck は共受容体依存的に TCR に集積すると考えられてたため、CAR にも CAR の標的分子にも共受容体との結合部位がないにも関わらず、どのようにして Lck が CAR の CD3 ζ ドメインをリン酸化するか長らく不明であった。抗原-抗体反応の親和性は TCR の抗原親和性と比べると 100-1000 倍程度高く、腫瘍細胞上の標的分子は CAR の抗体部位により認識される。従って、TCR の抗原親和性の高い場合の CD4⁺T 細胞の活性化と同様に、CAR-T 細胞の活性化は共受容体非依存的であると考えられる。共受容体が欠失した T 細胞を用いて CAR-T 細胞を作成したところ、期待通り、CAR マイクロクラスターの形成、Lck の CAR マイクロクラスターでも運動停止が観察され、IL-2 サイトカインの産生など CAR-T 細胞の細胞応答も正しく機能していることも示された。

免疫学における重要な課題である「抗原認識」について高解像度分子イメージングを用いて生物物理的にアプローチした結果、T 細胞サブセット間の抗原認識様式の違いを見出し、さらには CAR-T 細胞の分子メカニズムにも迫ることができ、当初考えていた以上の知見が見出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Tomoyuki, Teraguchi Shunsuke, Furusawa Chikara, Machiyama Hiroaki, Watanabe Tomonobu M, Fujita Hideaki, Sakaguchi Shimon, Yanagida Toshio	4. 巻 31
2. 論文標題 Theoretical modeling reveals that regulatory T cells increase T-cell interaction with antigen-presenting cells for stable immune tolerance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 743 ~ 753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 町山裕亮
2. 発表標題 一分子動態解析法を用いたT細胞活性化におけるシグナルソームの時空間的制御機構の解明 ~ 簡単・簡便なキメラ抗原受容体CAR-T細胞療法に向けて~
3. 学会等名 第36回日本DDS学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 町山裕亮
2. 発表標題 Visualizing of neo-self phenomena in Chimeric antigen receptor (CAR)-T cells.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 町山裕亮
2. 発表標題 キメラ抗原受容体（CAR）-T細胞活性化と細胞骨格、Role of cytoskeleton in Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 町山裕亮
2. 発表標題 末梢T細胞ではLckと共受容体CD4/CD8との協調的クラスター形成によって初期のTCRシグナルが惹起される
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference 第29回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Machiyama, Ei Wakamatsu, Kikumi Hata, Noriko Yanase, Masae Furuhata, Hiroko Toyota, Tadashi Yokosuka
2. 発表標題 Different requirement of the coreceptors CD4 and CD8 for initiation of T cell activation.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Machiyama
2. 発表標題 Cell-cell interaction among immune cells regulates T lymphocyte activation
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Machiyama
2. 発表標題 Development of the superresolution imaging in T cell signaling.
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Machiyama
2. 発表標題 Single molecule imaging reveals a distinct difference in Lck-dynamics between CD4+ and CD8+ T cells.
3. 学会等名 47th Annual meeting of the Japanese Society for immunology
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関