

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590504  
 研究課題名 (和文) 副刺激分子による T 細胞受容体マイクロクラスターの正と負の制御機構に関する研究  
 研究課題名 (英文) Positive and negative regulation of T-cell activation by costimulatory molecules through TCR microclusters  
 研究代表者  
 横須賀 忠 (YOKOSUKA TADASHI)  
 独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・上級研究員  
 研究者番号：10359599

研究成果の概要： T 細胞の正の副刺激受容体である CD28 が、T 細胞受容体 (TCR) と共に T 細胞活性化の最小単位である TCR マイクロクラスターを形成すること、CD28 下流のシグナル伝達分子としてプロテインキナーゼ C $\theta$  (PKC $\theta$ ) を特異的にリクルートすること、また、これらマイクロクラスター形成によって T 細胞の増殖やサイトカイン産生が劇的に増強することを明らかにした。この結果から、T 細胞の活性化は、TCR と副刺激受容体からなるシグナルソームが時間的・空間的に形成され、制御されていることが示唆される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) T 細胞の活性化は、T 細胞受容体 (TCR) からのシグナルによって惹起される。
- (2) T 細胞が抗原提示細胞から抗原の情報を得るための“場”として、二つの細胞の間に「免疫シナプス」という構造が形成される。
- (3) 免疫シナプスは TCR が集まる中心部位 central-supra molecular activation cluster (c-SMAC) と、接着分子が集まる周辺部位 peripheral (p-) SMAC を有する同心円構造である。
- (4) 近年我々は、免疫シナプスよりさらに小

さい構造として、TCR を中心としたシグナル伝達分子の集合体「TCR マイクロクラスター」を発見し、T 細胞の活性を制御していることを明らかにした (Yokosuka et al., *Nat. Immunol.*, 2005)。

(3) T 細胞が細胞分裂やサイトカイン分泌などのエフェクター機能を獲得するためには、TCR の他に副刺激受容体からのシグナルが必須である。

(4) CD28 は T 細胞副刺激受容体として最初に発見され、免疫アレルギー疾患や癌の免疫療法などへの臨床応用が試みられている一方、

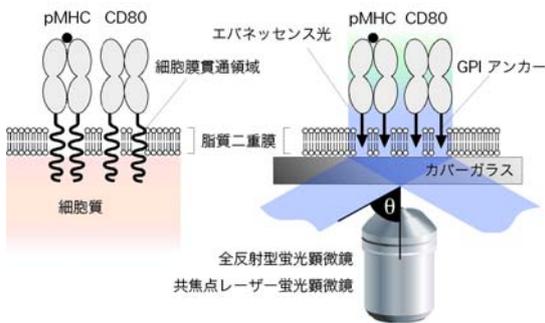
そのシグナル伝達系は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

- (1) TCR のシグナル伝達が TCR マイクロクラスターの形成を伴うように、CD28 もクラスター形成を必要とするのか明らかにする。
- (2) TCR マイクロクラスターと CD28 により、時間的かつ空間的に制御される T 細胞活性化のメカニズムを明らかにする。
- (3) マイクロクラスター形成を基に、CD28 下流で特異的に働くシグナル伝達分子を、イメージング解析から明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) CD28 の細胞表面での詳細なイメージング解析を行うため、CD28 のリガンドである CD80 の GPI アンカー型蛋白を精製し、平面上の抗原刺激人工脂質膜 (プレイナーメンブレン) に導入する。



- (2) CD28 および予想される下流のシグナル伝達分子と蛍光蛋白キメラ分子との融合蛋白を作製し、抗原特異的 T 細胞 (正常細胞および腫瘍細胞株) を樹立する。蛍光蛋白として、CFP、GFP、YFP を導入し、さらに蛍光標識抗体での染色を行うことで、マルチカラーでの観察が可能となる。

- (3) 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、T 細胞活性化における上記蛍光キメラ分子の複数の挙動を、経時的に観察する。

- (4) 一分子レベルでの観察が可能な全反射型蛍光顕微鏡を用いて、上記蛍光キメラ分子の挙動をナノスケールで観察する。

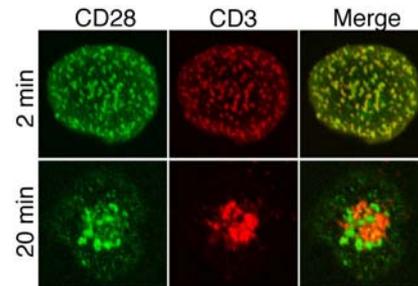
- (5) プレイナーメンブレンで得られた結果を、実際の T 細胞と抗原提示細胞との接合面に形成される細胞表面分子やシグナル伝達分子のクラスターと照合する。

- (6) イメージングにより得られたデータの正当性を確認するため、生化学的な手法を用いて、裏付けの証明を行う。

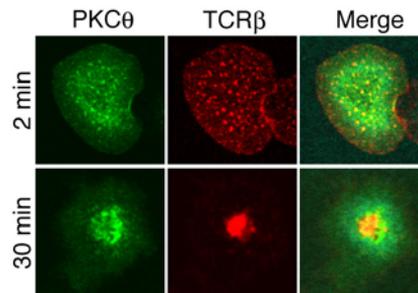
## 4. 研究成果

- (1) T 細胞は抗原提示細胞や抗原提示能力のあるプレイナーメンブレンと接触すると、メンブレン上を這うように伸展し、数分の内に収縮しある一定の接触面を維持する。この間、

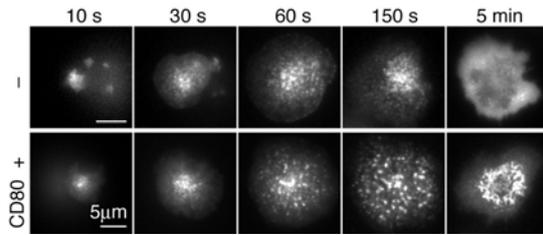
TCR を介するシグナルが惹起・維持され、T 細胞の活性化が起こる (Yokosuka et al., *Nat. Immunol.* 2005)。TCR 刺激初期 (2min)、CD28 (緑) はリガンドである CD80 存在する時のみクラスターを形成した。CD28 マイクロクラスターの形成の程度は、プレイナーメンブレン上の CD80 の密度に比例した。また、CD28 マイクロクラスターは TCR マイクロクラスター (赤) と同じ局在を示した。一方、TCR 刺激維持期 (20min) には、TCR および CD28 マイクロクラスターは T 細胞の中心部へと移動し、c-SMAC を形成するが、TCR と CD28 は c-SMAC の中で解離し、CD28 は TCR とは別のコンパートメントを形成することが分かった。



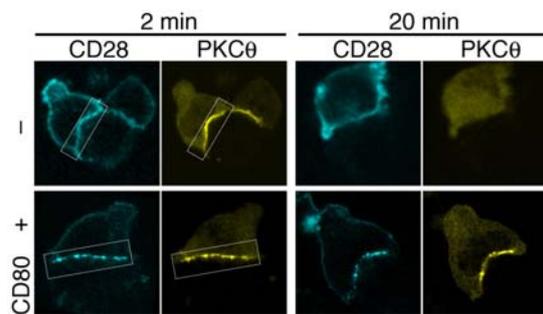
- (2) 蛍光キメラ分子を用いた解析にて、これまで報告されている CD28 下流のシグナル伝達分子は、TCR 刺激初期でのみ CD28 マイクロクラスターとの共局在を示した。一方、これまで直接会合が示されていなかったにもかかわらず、PKC $\theta$  (緑) は CD28 マイクロクラスターと共局在し、TCR 刺激初期 (2min) において TCR-CD28-PKC $\theta$  マイクロクラスターを形成した。また、TCR 刺激維持期 (20min) は、TCR (赤) から解離し、c-SMAC の中に CD28-PKC $\theta$  の新たなコンパートメントを形成した。



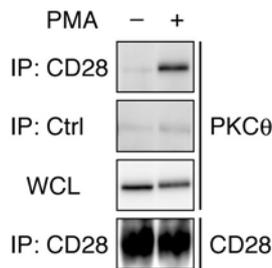
- (3) PKC $\theta$  の蛍光蛋白キメラ分子を一分子レベルでの観察が可能な全反射型蛍光顕微鏡を用いて解析を行うと、CD28 のリガンドである CD80 の存在する場合のみ、明瞭な PKC $\theta$  のクラスター形成が経時的に観察される。PKC $\theta$  は、TCR 刺激初期 (2min) には TCR や CD28 と同様の接触面全体に散在するクラスター形成を、また、TCR 刺激維持期 (20min) には、接触面の中央に輪状の構造体形成を示した。



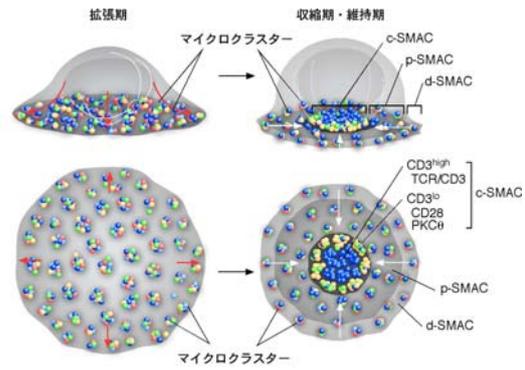
(4) CD28 (水色) と PKC $\theta$  (黄色) を発現する T 細胞腫瘍株と抗原提示細胞とを混合培養し、細胞-細胞間の接着を促した。PKC $\theta$ は、抗原提示細胞上に CD80 が無い場合 (上図) においても、接触直後 (2min)、一過性に T 細胞-抗原提示細胞間に集まる。しかし、PKC $\theta$ が継続的に (20min) 接触面に維持されるには、CD28-CD80 の結合が不可欠であることが分かった (下図)。



(5) ウェスタンブロッティングにより、CD28 と PKC $\theta$ との生化学的な会合も示された。この会合はジギトニンを界面活性剤として用いた場合のみ認められたことより、通常の結合より弱い会合と考えられる。



(4) T 細胞活性化のメカニズムを説明するモデルとして、「TCR-CD28 マイクロクラスターモデル」を提唱した。TCR および CD28 とその下流のシグナル伝達分子は TCR-CD28 マイクロクラスターとして T 細胞活性化を惹起し、後に、TCR は中心部の c-SMAC で活性化の終焉を迎える一方、CD28 は c-SMAC において TCR とは別のコンパートメントを形成し、PKC $\theta$ と会合することで、T 細胞活性化を維持すると考えられる。



## 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 5 件)

- ① Yokosuka T. and Saito T.: Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol. Rev.* 229: 27-40, 2009 (査読なし)
- ② Yokosuka T., Kobayashi, W., Sakata-Sogawa K., Hashimoto-Tane, A., Dustin, M.L., Tokunaga, M., Saito, T.: Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters through protein kinase C  $\theta$  translocation. *Immunity* 29: 589-301, 2008. (査読あり)
- ③ Wang Y, Shibuya K, Yamashita Y, Shirakawa J, Shibata K, Kai H, Yokosuka T., Saito T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A.: LFA-1 decreases the antigen dose for T cell activation in vivo. *Int. Immunol.* 20: 1119-1127, 2008 (査読あり)
- ④ Ouchida R, Ukai A, Mori H, Kawamura K, Dollé ME, Tagawa M, Sakamoto A, Tokuhisa T, Yokosuka T., Saito T, Yokoi M, Hanaoka F, Vijg J, Wang JY.: Genetic analysis reveals an intrinsic property of the germinal center B cells to generate A:T mutations. *DNA Repair* 7: 1392-1398, 2008. (査読あり)
- ⑤ Suenaga T, Arase H, Yamasaki S, Kohno M, Yokosuka T., Takeuchi A, Hattori T, Saito T.: Cloning of B cell-specific membrane tetraspanning molecule BTS possessing B cell proliferation-inhibitory function. *Eur. J. Immunol.* 37:3197-3207, 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Yokosuka, T., Sogawa-Sakata, K., Tane-Hashimoto, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., Saito, T.: T細胞の副刺激を制御する免疫シナプスの領域の同定/ Identification

of a region in immunological synapse critical for T cell co-stimulation. 第38回日本免疫学会総会・学術集会(京都、12.1-3, 2008)

② Yokosuka, T. : Visualization of signaling complex upon T cell activation. The 2nd joint symposium between immunology and imaging, WIP-iFReC, (大阪、2008年8月28日)

③ Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L. and Saito, T.: TCR-CD28 マイクロクラスターとc-SMACによるT細胞活性化の時空間的制御 Spatiotemporal regulations of T cell activation by a c-SMAC and TCR-CD28-microclusters. 第37回日本免疫学会総会・学術集会(東京、11.20-22, 2007)

④ Yokosuka, T.: Spatiotemporal regulation of lymphocyte activation: Signalsome, TCR-microcluster. National Academy of Engineering 2007 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium 第7回日米先端工学シンポジウム(パロアルト、2007年11月5-7日)

⑤ Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K. Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin M.L. and Saito, T. (Minisymposium) (8/21) Spatiotemporal regulation of T cell activation by TCR-CD28-microclusters. 13th International Congress of Immunology (リオデジャネイロ、2007年8月21-25日)

⑥ 横須賀忠: TCR-CD28-マイクロクラスターによるT細胞活性化の時空間的制御 第7回日本蛋白質科学会年会(仙台、2007年5月24-26日)

⑦ Yokosuka, T. : Spatiotemporal regulation of T cell activation by TCR-CD28-microclusters. 第10回国際細胞膜研究フォーラム(京都、2007年2月27日-3月1日)

[図書] (計3件)

① 横須賀忠: T細胞活性化時のTCRとシグナル伝達分子の動態: 臨床免疫・アレルギー科 2008年9月号 50巻3号 (科学評論社)

② 横須賀忠: 免疫シナプスを構成するTCRマイクロクラスターとT細胞活性化機構: Annual Review 2008 2007年11月20日 (中外医学社)

③ 横須賀忠: T細胞受容体マイクロクラスター-T細胞活性化を制御するシグナルソームの発見-: 感染炎症免疫 2007年37巻2号 (医薬の門社)

[その他]

ホームページ等

<http://web.rcai.riken.jp/en/labosignaling/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横須賀 忠 (YOKOSUKA TADASHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・上級研究員

研究者番号: 10359599