

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790382
研究課題名（和文）
リソソーム蛋白LAPTM5によるTCR発現レベルの制御機構の解明
研究課題名（英文）
Analysis of TCR regulation by a lysosomal protein LAPTM5
研究代表者
大内田 理佳 (Ouchida Rika)
独立行政法人理化学研究所・免疫多様性研究チーム・研究員
研究者番号：80391887

研究成果の概要（和文）：細胞表面上のT細胞抗原レセプター(TCR)の発現制御は、T細胞の活性化のみならず、過剰な活性化による自己応答性の抑制にも極めて重要である。抗原刺激後、細胞表面のTCRの発現量は細胞内への取り込みや分解などの経路を経て巧みに調節されているが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。我々は、リソソーム蛋白LAPTM5が、TCRの分解を介してT細胞の過剰活性化を抑制していることを明らかにした。本研究により、TCRを制御する新しい調節メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Modulation of surface T cell antigen receptor (TCR) expression is an important mechanism for the regulation of immune responses and the prevention of T cell hyperactivation and autoimmunity. After antigen stimulation, TCR are internalized and degraded in lysosomes. However, few of the molecules involved in this process have been identified. We demonstrate that the lysosomal protein LAPTM5 negatively regulated surface TCR expression by promoting its degradation. These results identify a lysosomal protein illustrate a unique mechanism for the control of surface TCR expression and T cell activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：リソソーム T細胞抗原受容体 T細胞活性化 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

細胞表面上のT細胞抗原レセプター (TCR) の発現制御は、T細胞の活性化を調節する重要な機構である。TCRは恒常的に細胞内へ取り込まれ(internalization)、取り込まれたTCRは細胞表面への再発現(recycling)と、リソソームでの分解(degradation)というプロセスを介し、細胞表面のTCRレベルが一定に保たれている。さらに、抗原刺激が入ると細胞表面のTCRが急速に細胞内へと取り込まれ、リソソームにて分解されることにより、一過性に細胞表面上のTCR発現量が減少する。これは、TCRから入るシグナルを調節し、過剰な免疫応答を回避するための極めて重要なシステムである。これまでに、TCR internalizationに関わる分子群およびそのメカニズムは明らかにされつつあるが、一方で、取り込まれたTCRがどのような機構で蛋白分解の場であるリソソームに認識および輸送され、分解されるかはまったく不明のままである。本研究では、リソソーム蛋白LAPTM5によるTCR発現制御機構およびその生理的意義について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、LAPTM5が細胞表面のTCR発現量を制御する詳細な分子機構を明らかにすることを目的とする。すでにTCRと鎖の分解を介してTCR発現量を制御していることを明らかにしたが、さらに(1)TCRと鎖の分解促進に必要なLAPTM5の機能ドメインの同定、(2)TCR発現量を制御する既知のメカニズムとの機能的相互関係の解明、(3)LAPTM5と相互作用する蛋白の同定、(4)自己免疫

性脳脊髄炎(EAE)の誘発実験を行い、LAPTM5欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症亢進の有無あるいは加齢に伴う抗DNA抗体をはじめとする自己抗体の蓄積および自己免疫疾患を検討する。

3. 研究の方法

平成20年度

LAPTM5によるTCRと鎖の分解機構について解析する。

(1)TCRと鎖の分解促進に必要なLAPTM5の機能ドメインを同定する。LAPTM5全長蛋白ならびに種々の欠失変異蛋白をT細胞株2B4で強制発現させ、内在性TCRと鎖の蛋白レベルを調べる。

(2)既知のTCRと鎖分解に関わる分子群との機能的相互関係を明らかにするため、Cb1/SLAP欠損マウスとLAPTM5欠損マウスを掛け合わせたマウスを作出する。

(3)Cb1/SLAPとの機能的相互関係を、T細胞株2B4を用いて解析する。すなわち、それぞれの発現ベクターを作製し、既に作製したLAPTM5の安定発現T細胞株に外来性に導入したときの相乗効果の有無を検討する。

(4)LAPTM5と物理的および機能的に相互作用する蛋白を同定する。すでに作製したLAPTM5を認識する3種類のモノクロー抗体およびウサギポリクロー抗体を用いて、LAPTM5を免疫沈降したあと、共沈蛋白について、ウエスタンブロットさらにマスペクトルを用いて同定する。

(5)Lckのdistal promoterを用いて、T細胞特異的にLAPTM5を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製する。

平成21年度

LAPTM5の生理的機能を個体レベルで解析する。

(6)Tリンパ球の過剰な活性化はしばしば自己

免疫疾患を誘発することが知られている。自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の誘発実験を行い、LAPTM5 欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症亢進の有無を解析する。

(7) 長期飼育下での LAPTM5 欠損マウスにおける自己抗体産生および自己免疫疾患発症の有無を観察する。

(8) LAPTM5/Cb1/SLAP のトリプル欠損マウスにおける T 細胞の活性化ならびに TCR 発現量の変化を、それぞれの単独欠損マウスと比較検討する。

(9) LAPTM5 欠損マウスと自己免疫疾患を自然発症する *lpr* あるいは NOD マウスとのかけ合わせマウスを樹立し、自己免疫疾患の発症促進に果たす LAPTM5 の役割を明らかにする。

(10) *Lck*-LAPTM5-Tg マウスにおける T 細胞の活性化ならびに免疫応答の異常について解析を行う。

4. 研究成果

LAPTM5 の免疫システムにおける生理的機能を解明するために、我々は LAPTM5 欠損マウスを作製し解析を行った。その結果、LAPTM5 欠損 T 細胞では野生型 T 細胞と比較して、抗 CD3 抗体や抗原刺激に対する細胞増殖、IL-2 等のサイトカイン産生が強く誘導されることが *in vitro* および *ex vivo* の解析で明らかとなった。また、T 細胞が直接組織損傷を引き起こす遅延型過敏症反応では、野生型マウスと比較して LAPTM5 欠損マウスで足の腫大が持続する傾向が観察された。LAPTM5 欠損 T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激したときに誘導される、チロシンリン酸化およびカルシウム流入量など、初期のシグナルにはほとんど違いが認められなかったのに対し、刺激後 2 時間から徐々に観察されはじめる細胞表面からの TCR 消失が、LAPTM5 欠損 T 細胞では弱いことが判明した。TCR の発現に影響を与えうる CD3 と

鎖の蛋白量を調べたところ、刺激に伴って誘導される CD3 と 鎖の蛋白分解が、LAPTM5 欠損 T 細胞では弱くなっていた。逆に、T 細胞株で LAPTM5 を強制発現させると内在性の CD3 と 鎖の蛋白量が低下し、それに伴い抗 CD3 刺激による IL-2 の産生量が激減することを見出した。種々の LAPTM5 点変異体を用いた解析から、LAPTM5 の 3 箇所の PY モチーフのうち、2 番目および 3 番目の PY モチーフと ユビキチン結合領域が、TCR の発現制御に重要であることを見出した。さらに、抗 CD3 刺激後、CD3 と 鎖と LAPTM5 がリソソームで共局在し、物理的に相互作用することを細胞内免疫染色および免疫沈降実験で明らかにした。

T 細胞の活性化および活性化抑制の制御は適切な免疫応答に必須なだけでなく、過剰な免疫応答による自己免疫疾患を回避するためにも極めて重要である。そこで、LAPTM5 の欠失による T 細胞活性化抑制の破綻が、自己免疫疾患につながる可能性について検討を行った。SPF 環境下で長期的に飼育した LAPTM5 欠損マウスにおける自己免疫疾患の自然発症の有無を、血中の抗体価および抗 dsDNA 抗体を ELISA 法で測定し評価した。その結果、野生型に比して LAPTM5 欠損マウスでは、血中の IgM レベルが有意に上昇し、IgM および IgG 型抗 dsDNA 抗体の蓄積が観察された。さらに、IgG 型抗核抗体が、LAPTM5 欠損マウスで観察された。また、組織化学的な解析において、いくつかの LAPTM5 欠損マウスでは、腎糸球体における自己抗体沈着を認めた。

我々は、リソソーム蛋白 LAPTM5 が、TCR の発現制御を介して T 細胞活性化の調節に関わることを明らかにした。すなわち、LAPTM5 欠損による TCR 制御の破綻が、T 細胞の過剰活性化を誘発し、重篤な自己免疫疾患ではないが、自己抗体の産生などを促進することを示した。TCR の発現制御に関しては、細胞内への取り込みの制御を中心に数少ない報告があるのみで、分解を介した制御に関しては知られていない。また、既知のリソソーム蛋白で、免疫疾患をコントロールする分子は全く

知られていない。従って、本研究は、T 細胞活性化を制御する新たな調節経路を明示するものである。我々は、LAPTM5 が、リソソームで TCR 複合体の CD3ζ 鎖と共局在し、直接結合していることを示した。すなわち、リソソームに局在する LAPTM5 が CD3ζ 鎖と物理的に相互作用し、リソソームでの TCR 分解を促進することにより TCR シグナルを負に制御する可能性が強く示唆された。さらに最近、予備的解析から、LAPTM5 が、B 細胞抗原レセプターの発現制御にも関わる可能性が示唆された。従って、LAPTM5 が抗原レセプターの発現制御を介して T 細胞および B 細胞の機能を制御している可能性がある。LAPTM5 の機能解析を通して、蛋白分解システムを介した免疫細胞の機能調節の重要性を提示できると考えられることから、LAPTM5 による抗原レセプター発現制御の詳細なメカニズムを含め、今後さらなる追が必要とされる。

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 1 件)

大内田理佳 (15 名中 1 番目)、A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation. *Immunity*, 29, 33-43 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

王 継揚、A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation. *Federation of Immunology Societies of Asia-Oceania* 2008 年 10 月 19 日、台湾

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大内田 理佳 (Ouchida Rika)

独立行政法人理化学研究所・免疫多様性研究チーム・研究員

研究者番号：80391887

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし