

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590548

研究課題名（和文） 抑制性マイクロクラスターによるT細胞活性化制御機構の研究

研究課題名（英文） Mechanisms of T cell activation regulation by inhibitory 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（和文）：負の補助刺激受容体 CTLA-4 のイメージング解析を行うことよって、CTLA-4 がクラスターを形成し、免疫シナプスに中心にある正の補助刺激受容体 CD28 とその下流のキナーゼと足場蛋白から構成される活性中心を破壊、T 細胞活性化シグナルを遮断する分子機構を明らかにした。T 細胞活性化を担う T 細胞受容体-CD28 マイクロクラスターに対し、活性化を弱める抑制性マイクロクラスターの存在が示された。

研究成果の概要（英文）：Imaging analysis of the negative costimulatory receptor, CTLA-4, revealed the novel mechanism of T cell activation regulation. CTLA-4 formed clusters at the center of the immunological synapse and interfered the formation of the signaling molecule complex, which is composed by the positive costimulatory receptor CD28, kinases, and scaffold proteins. These results suggest that T cell activation is cooperatively regulated by both T cell receptor-CD28 microclusters and the CTLA-4-mediated inhibitory microclusters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、分子イメージング、T細胞受容体、補助刺激受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) は T 細胞の活性化を負に制御する補助刺激受容体として知られている。

(2) CTLA-4 は、T 細胞の活性化を正に制御する補助刺激受容体 CD28 とリガンド CD80/CD86 が同じであるため、CD28 とリガンドとの結合を阻害することが、T 細胞活性化抑制の一つ

のメカニズムと考えられている。

(3) CTLA-4 の下流のチロシン残基には、フォスファターゼである Src homology 2 (SH2)-domain-containing tyrosine phosphatase 1 (SHP1) と SHP2 が会合するため、T 細胞受容体 (TCR: T cell receptor) 下流のシグナル伝達分子を脱リン酸化することが、CTLA-4 による T 細胞活性化抑制のもう一つメカニズムと考えられている。

(4) T細胞の活性化は、T細胞上のTCRと、抗原提示細胞上の抗原ペプチド+Major histocompatibility complex (MHC)との結合を介して行われ、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」が形成される。

(5) 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 とから構成される同心円構造である

(6) T細胞シグナルの分子イメージング解析から、当研究代表者は、免疫シナプスの中に、TCR数十個とその下流の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、マイクロクラスターがT細胞活性化ユニットとして機能していることを明らかにした (Yokosuka et al., *Nat. Immunol.*, 2005)。

(7) 当研究代表者は、T細胞の十分な活性化に必須であるCD28が、非典型的プロテインキナーゼの一つProtein kinase C $\theta$  (PKC $\theta$ )と会合し、c-SMACに新たな活性中心を作ること、このCD28-PKC $\theta$ の活性中心がTCRマイクロクラスターと協調的に働くことで、T細胞の活性化を増強・遷延させていることを明らかにした (Yokosuka et al., *Immunity*, 2008)。

(8) CTLA-4遺伝子欠損マウスの実験から、CTLA-4は、制御性T細胞の免疫制御機能に重要であると考えられている。

(9) 抗CTLA-4中和抗体は、T細胞の活性化抑制を解除し免疫系を賦活化できるため、がん治療などへの臨床応用が進んでいるが、メカニズムの詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

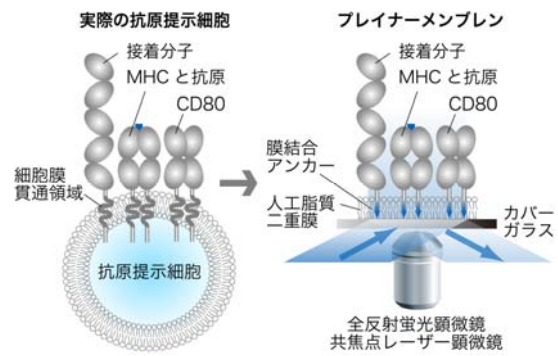
(1) TCR、CD28、CTLA-4の3つの受容体による、マイクロクラスターを介した時間的・空間的なT細胞活性化の制御機構を明らかにする。

(2) CTLA-4がCD28とリガンドとの結合を物理的に阻害する部位を同定し、効果的なT細胞活性化の抑制の方法を明らかにする。

(3) CTLA-4下流のフォスファターゼと、マイクロクラスターとの関わりを明らかにし、CTLA-4を介するシグナル伝達からのT細胞活性化抑制機構の存在を示す。

## 3. 研究の方法

(1) CTLA-4の詳細なイメージング解析を行うため、CTLA-4のリガンドであるCD80のGPIアンカー型蛋白を精製し、ガラス平面上の人工脂質二重膜(プレイナーメンブレン)に導入する。



(2) CTLA-4、CD28および下流のSHP1、SHP2の蛍光蛋白キメラ分子を作製する。マルチカラーに対応するため、蛍光蛋白はEGFP、ECFP、EYFPを用いる。TCRは蛍光標識した抗TCR Fab抗体にて染色する。

(3) 上記キメラ分子を抗原特異的T細胞(正常細胞および腫瘍細胞株)に導入する。

(3) 上記細胞とプレイナーメンブレンとを用い、T細胞活性化におけるTCR、CTLA-4、CD28、SHP1、SHP2の挙動を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、経時的に観察する。

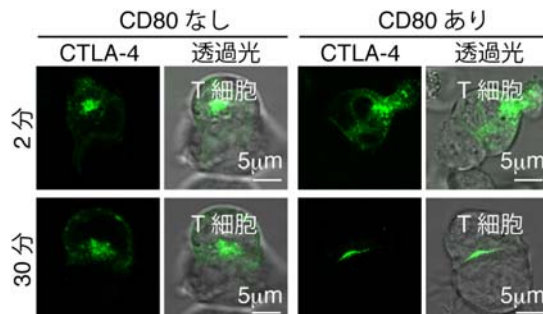
(4) 一分子レベルでの観察が可能な全反射蛍光顕微鏡を用いて、上記蛍光蛋白キメラ分子の挙動をナノスケールで観察する。

(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着面に形成される受容体やシグナル伝達分子のクラスターと照合する。

(6) 分子イメージングと同じ条件で生化学的な実験を行い、分子イメージングから得られたデータの生理的意義を考察する。

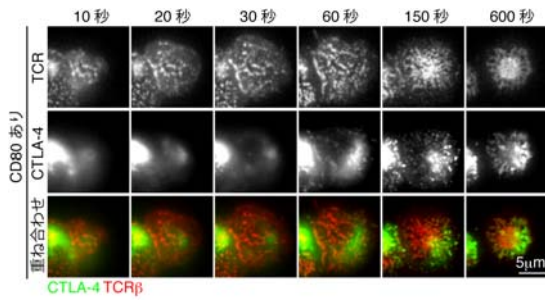
## 4. 研究成果

(1) T細胞と抗原提示細胞との接着面を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。分泌性リソソームに蓄積していたCTLA-4(下図、緑)は、接着開始数分以内に、二細胞間の接着面に移動し、CTLA-4のリガンドであるCD80が抗原提示細胞に発現しているときに限り、その接着面に留まった。

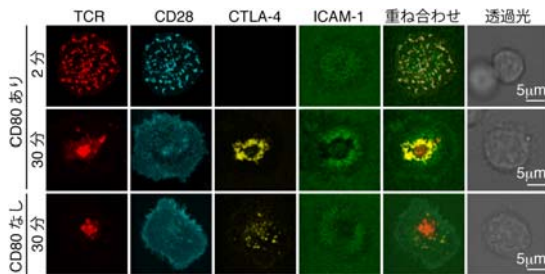


(2) プレイナーメンブレンと接着したT細胞に発現している、TCR(下図、赤)とCTLA-4(緑)の挙動を、全反射蛍光顕微鏡で観察した。CTLA-4は分泌性リソソームから放出されると同時にCTLA-4マイクロクラスターとな

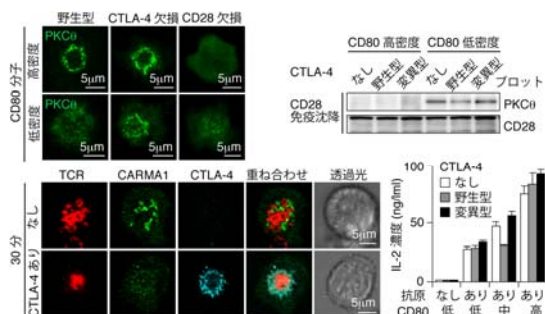
り、接着面の中央に位置する c-SMAC に向かって移動、集積した。



(3) プレイナーメンブレンと接着した T 細胞の TCR (下図、赤)、CD28 (水色)、CTLA-4 (黄色) の挙動を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。c-SMAC が形成される接着後 30 分では、CTLA-4 が c-SMAC に集積する代わりに、c-SMAC に形成されるべき CD28 の活性中心は消失していた。

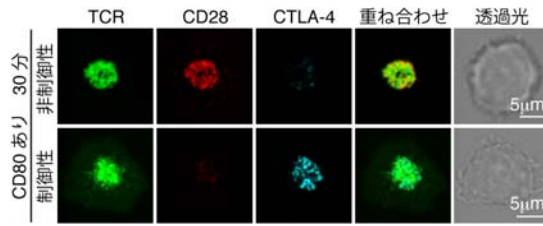


(4) 野生型、CTLA-4 欠損、CD28 欠損 T 細胞での CD28-PKCθ (下図、左上、緑) からなる活性中心の形成を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。CTLA-4 欠損 T 細胞では PKCθ の輪状構造が明瞭となり、CTLA-4 が CD28-PKCθ 活性中心形成に抑制的に働いていることが示唆された。CD28 と PKCθ の会合に対する CTLA-4 の阻害は、生化学的解析 (右上) と生理学的解析 (右下) によっても明らかであった。PKCθ の下流の足場タンパク CARMA-1 (左下、緑) の CD28-PKCθ 活性中心への集積を、同様に観察した。CTLA-4 は CARMA1 の集積に対しても抑制的に働いていた。

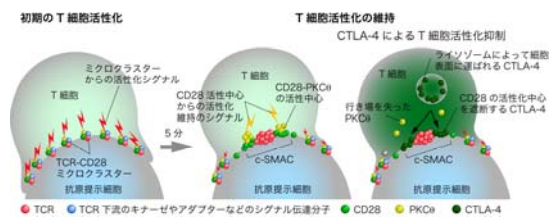


(5) 制御性 T 細胞の TCR (下図、緑)、CD28 (赤)、CTLA-4 (水色) を抗体で染色し、プレイナーメンブレンと接着した際の各々の分子の挙動を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。制御性 T 細胞では、CTLA-4 が c-SMAC

に集まる一方、CD28 の活性中心は形成されず、制御性 T 細胞の in vitro アナジーのメカニズムの一つと考えられた。



(6) T 細胞活性化の惹起と維持、それに対する CTLA-4 による活性化抑制のメカニズムを示す。T 細胞と抗原提示細胞との接着直後、接着面全面に TCR を核とするシグナル伝達分子の集合体「TCR-CD28 マイクロクラスター」が形成され、初期の活性化シグナルを伝える。やがて CD28 は PKCθ、CARMA1 と共に c-SMAC に集まり、CD28 活性中心として T 細胞活性化の維持を行う。活性化した T 細胞や制御性 T 細胞の様に T 細胞が CTLA-4 を発現している場合、CTLA-4 はリソソームから接着面へ放出され、c-SMAC の CD28 活性中心を破壊。T 細胞活性化を維持するシグナルを遮断し、過剰な活性化を回避する。このように、T 細胞の活性化は、免疫シグナルの中で時間的空間的に変化しながら形成される TCR、CD28、CTLA-4 各マイクロクラスターによって制御されている。



## 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 8 件)

1. Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Sakuma M, Ishihara C, Tokunaga M, Saito T.: Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. *Immunity*, 34(6):919-931, 2011. (査読あり)
2. Kometani K, Yamada T, Sasaki Y, Yokosuka T, Saito T, Rajewsky K, Ishiai M, Hikida M, Kurosaki T.: CIN85 regulates the canonical NF- $\kappa$ B pathway and subsequent B cell responses. *J Exp Med*. 208(7):1447-1457, 2011. (査読あり)

3. Kong K-F, Yokosuka T, Canonigo-Balancio A. J, Isakov N, Saito T, Altman A.: A motif in the V3 domain of the kinase PKC- $\theta$  determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat. Immunol.* 12(11):1105-12, 2011. (査読あり)
  4. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A.: Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett*, 584:4865-4871, 2010. (査読なし)
  5. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogaw, K, Zen H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T.: Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity*, 33(3):326-339, 2010. (査読あり)
  6. Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Ishihara C, Sakuma M, Kobayashi W, Saito T.: T cell receptor-microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering. *Mol Cell Biol.* 30(14):3421-3429, 2010. (査読あり)
  7. Takeuchi A, Itoh Y, Takumi A, Ishihara C, Arase N, Yokosuka T, Koseki H, Yamasaki S, Takai Y, Miyoshi J, Ogasawara K, Saito T.: CRTAM confers late-stage activation of CD8+ T cells to regulate retention within lymph node. *J Immunol*, 183(7):4220-4228, 2009. (査読あり)
  8. Yokosuka T, Saito T.: Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev*, 229(1):27-40, 2009. (査読なし)
- [学会発表] (計 29 件)
1. Yokosuka T, Saito T.: Negative regulation of TCR signaling by PD-1 microcluster. *Keystone Symposia-Regulation of Lymphocyte Signaling.* (Keystone, CO. USA. 3.11-16, 2012)
  2. 多根 (橋本) 彰子, 横須賀忠, 斉藤隆: 免疫シナプス形成を担うダイニンによる T 細胞抗原受容体運搬の分子機構 第 85 回日本薬理学会年会(京都、3.8, 2012)
  3. Yokosuka T, Saito T.: Negative regulation of TCR signaling by PD-1 microclusters. *The 4th Joint RCAI-LIAI Workshop*(La Jolla, CA. USA, 2.7-8, 2012)
  4. Hara H, Yokosuka T, Ishihara C, Yasukawa S, Hirakawa H, Iizasa E, Yoshida H, Saito T.: SH3-Guk domain regulating Carmal micro-cluster formation is essential for antigen receptor-induced NF- $\kappa$ B activation. 第34回日本分子生物学会年会 (Yokohama, 12.13-16, 2011)
  5. Yokosuka T: Dynamic regulation of T cell activation by TCR microclusters. 2nd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology "Regulation of Immune Responses in Health and Diseases" (Osaka, 12.5-6, 2011)
  6. Yokosuka T, Saito T.: Imaging of T cell activation regulation: - Negative regulation of TCR signaling by PD-1 microcluster -. *University of Michigan-RCAI Joint Workshop* (Yokohama, 12.1-2, 2011)
  7. 多根 (橋本) 彰子, 横須賀忠, 斉藤隆: 免疫シナプスにおけるダイニンによる T 細胞受容体マイクロクラスター運搬の分子機構 第40回日本免疫学会総会学術集会(千葉、11.27-29, 2011)
  8. Yokosuka T, Saito T.: The PD-1 microclusters: negative costimulatory signalosomes directly targeting TCR downstream. 第40回日本免疫学会総会学術集会 (千葉、11.27-29, 2011)
  9. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A.: Spatiotemporal regulation of T cell activation and costimulation. 1st POSTECH International Symposium of Bio-Imaging (Pohang, Korea, 9.29-30 2011)
  10. 横須賀忠: 分子イメージングが拓く T 細胞活性化の制御機構 第 20 回日本バイオイメージング学会学術集会 (千葉、8.31-9.2, 2011)
  11. Saito T, Yokosuka T, Tane-Hashimoto A.: Spatiotemporal regulation of T cell co-stimulation. *FASEB Summer Conferences Signal Transduction in the Immune System* (Snowmass Village, CO, 6.19-24, 2011)
  12. 横須賀忠: PD-1 マイクロクラスターによる T 細胞活性化制御機構の解明 *Kyoto T Cell Conference* (Kyoto, 6.10-11, 2011)
  13. Saito T, Yokosuka T, Tane-Hashimoto A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M.: Visualising the dynamics of immune synapse by TIRF. *XXVI Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (CYTO2011)* (Baltimore, MD, USA, 5.21-25, 2011)

14. Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Sakuma M, Saito T.: Dynein-driven transport of TCR microclusters forms Immune synapse and regulates T cell activation. 第84回日本薬理学会年会 (横浜、3/22-24 2011)
  15. Yokosuka T.: Dynamic regulation of T-cell activation by TCR microclusters. RIKEN 2011 Joint Retreat (Kakegawa, 1/31-2/1, 2011)
  16. Yokosuka T.: Dynamic Regulation of T-cell Activation by TCR Microclusters. 東京理科大学生命科学研究所セミナー (野田、1.11, 2011)
  17. Yokosuka T, Saito T.: Dynamic Regulation of T-cell Activation by TCR Microclusters. 第16回武田科学振興財団生命科学シンポジウム (東京、12/1-2 2010.)
  18. 横須賀忠: 分子イメージングが拓く T 細胞活性化の制御機構 第2回バイオフロンティアセミナー「免疫・疾患制御に向けたイメージング解析」(東京、11/18 2010)
  19. Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Sakuma M, Saito T.: Dynein-mediated translocation of TCR microclusters along microtubules to form c-SMAC during T cell activation. 14th International Congress of Immunology (神戸、8.22-27, 2010)
  20. Takeuchi A, Itoh A, Yokosuka T, Ogasawara K, Saito T.: CRTAM confers late-stage activation of CD8+T cells to regulate retention within lymph node. 14th International Congress of Immunology (神戸、8.22-27, 2010)
  21. Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Saito T.: Dynamic regulation of T-cell costimulation by TCR microclusters and the c-SMAC. 14th International Congress of Immunology (神戸、8.22-27, 2010)
  22. 横須賀忠, 齊藤 隆: T細胞の免疫シナプス形成と胸腺選択性との機能的相関の解析 第20回 Kyoto T Cell Conference (KTCC) 学術集会 (京都、6.4-5, 2010)
  23. Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Saito T.: Dynein-mediated translocation of TCR microclusters along microtubules to form cSMAC. Keystone Symposia (Breckenridge, CO. USA, 2.27-3.4, 2010)
  24. Yokosuka T.: Dynamic regulation of T-cell costimulation by TCR microclusters and the c-SMAC. The 13th International Membrane Research Forum/ The 6th iCeMS International Symposium, Featuring Membrane Meso Mechanisms (Kyoto, 1.27-29, 2010)
  25. 橋本彰子 (多根)、横須賀忠、齊藤隆: T細胞活性化及び cSMAC 形成につながる微小管モーター・ダイニンによる TCR ミクロクラスターの移動 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪、12.2-4, 2009)
  26. Yokosuka T, Saito T.: "Imaging of Immune Responses" Dynamic regulation of T-cell costimulation by TCR microclusters and the c-SMAC. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪、12.2-4, 2009)
  27. Yokosuka T, Saito T.: Dynamic regulation of T-cell costimulation by TCR microclusters. FASEB Summer Research Conferences (Snowmass Village, CO., 6.21-26, 2009)
  28. Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Ishihara C, Saito T.: TCR microclusters move along microtubules in early T cell activation. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009 (Kyoto, 6.1-4 2009)
  29. Yokosuka T and Saito T.: Dynamic assembly of signaling complex for positive and negative costimulation of T cell activation. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009 (Kyoto, 6.1-4 2009)
- [図書] (計4件)
1. 横須賀忠 免疫の辞典 朝倉書店 228, 409, 2011.
  2. 横須賀忠: CTLA-4によるT細胞活性化制御の分子機序 臨床免疫・アレルギー科 57(1):111-118, 2012
  3. 横須賀忠, 齊藤隆: T細胞の活性化に対する補助刺激受容体CTLA-4による時空間的な制御機構の解明 ライフサイエンス新着論文レビュー 2010年10月18日
  4. Yokosuka T, Saito T.: The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. In: Chap. 5, Immunological Synapse, Curr. Top. Microbiol. Immunol. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 340: 81-107, 2010.
- [その他]  
ホームページ  
<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/signaling/>

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし