

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790486

研究課題名（和文） 生理的環境下で形成された免疫シナプスの解析

研究課題名（英文） Analysis of immunological synapse in physiological condition

研究代表者

多根 彰子（橋本 彰子）(TANE AKIKO)

独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・研究員

研究者番号：10415226

研究成果の概要（和文）：体内を循環する T 細胞は樹状細胞などの抗原提示を認識すると停止し接着する。T 細胞抗原受容体 (TCR) は接着面にマイクロクラスターと呼ばれる集合体を形成して活性化を開始し、マイクロクラスターの移動により特殊な分子配置である免疫シナプスを形成する。本研究では生理的な刺激条件下で形成したマイクロクラスターの定量測定を元に、マイクロクラスターは微小管分子モーターであるダイニンに依存して移動し細胞活性を抑える方向に調節する事を発見し、論文として発表した。

研究成果の概要（英文）：When T cells recognize antigen on antigen-presenting cells, they start adhere and generate T cell antigen receptors (TCR) microclusters (TCR-MCs) which is a unit for starting T cell activation. The TCR-MCs move toward the center of the interface and form immunological synapse. We revealed and published that the transportation of TCR-MCs depends on microtubule motor, dynein and negatively regulate T cell activation. These observation were based on the quantitative analysis of TCR-MCs generated under physiological stimulus conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：免疫シナプス、T細胞抗原受容体、蛍光イメージング、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫に必要なヘルパーT細胞が活性化する時、抗原提示細胞との間に免疫シナプスを作る。免疫シナプスとは、T細胞とAPCの接触面中央にT細胞抗原受容体(TCR)が集積してcSMAC(central supramolecular activation cluster)を形成し、その周りに接着分子が円状に配置した構造である

(*Nature*. **395**, 82-86 (1998))。我々のグループでは、抗原提示細胞の細胞膜を見立てた人工脂質膜を用いてT細胞活性化部位の分子の動きを詳細に観察する事により、免疫シナプス形成の過程を明らかにした(図1)。

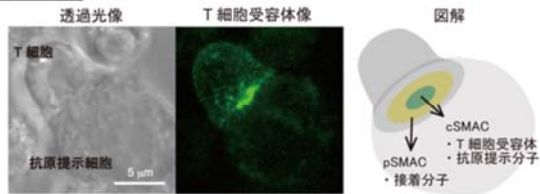
CD3zeta-GFP を過剰発現させた T 細胞を観察すると、抗原との接触直後に TCR ミクロクラスターが形成され、リン酸化、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇等の活性化が始まり、TCR ミクロクラスターが接着面の中心に集まる事によって cSMAC が形成されることを明らかにした (*Nat. Immunol.* **6**, 1253-1262 (2005))。しかし使用した細胞が TCR を過剰発現している点や抗原ペプチドが高濃度であった点が必ずしも生理的とは言えない条件であった。

当時の免疫シナプス研究は国内外を問わず、様々な分子の配置、クラスター移動と細胞骨格の関係、細胞障害性 T 細胞、ナチュラルキラー T 細胞のシナプス等に興味が広がっていたが、一方で cSMAC の意義など基本的な構造に関する議論も依然止まない状況にあった。また、免疫シナプス研究のほとんどが in vitro の研究であり、in vivo では材料が特殊な cSMAC の報告が 1 報あるのみであった (*J. Exp. Med.* **203**, 2095-2107 (2006))。したがって、刺激強度によって数や大きさが変わる cSMAC や TCR ミクロクラスターが生体内免疫反応におよぼす影響に関しては調べられていなかった。

また、ヘルパー T 細胞には Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、制御性 T 細胞 (Treg) などのサブセットが知られているが、機能が違うこれらの細胞の cSMAC や TCR ミクロクラスターはほとんど解析されていなかった。

申請者は TCR ミクロクラスター形成におけるラフトの役割を調べてきた中で (平成 18 年度科研費 (若手 (B)) : 18790344) (*Mol. Cell. Biol.* **30**, 3421-3429 (2010))、細胞間シナプスの cSMAC が観察しやすい実験条件を整えながら、in vivo でも T 細胞サブセットや刺激強度によって性質の違う cSMAC や TCR ミクロクラスターが現われるだろうと考え、本研究を計画するに至った。

免疫シナプス



TCR ミクロクラスターと cSMAC

接着面に形成された TCR ミクロクラスターは中央に集合して cSMAC になる

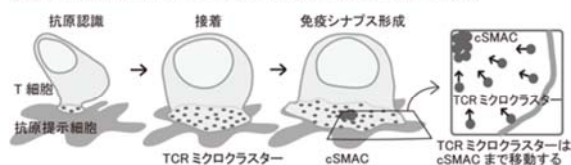


図1、免疫シナプスの形成

2. 研究の目的

本研究では、機能が異なる T 細胞サブセット (Naïve, Th1, Th2, Th17, Treg) に関して (1) in vivo で生成された cSMAC や TCR ミクロクラスターの観察を行い、生体内免疫反応との相関をみる。更に (2) 人工脂質膜を用いた cSMAC や TCR ミクロクラスターの動態の定量的な解析から、TCR 動態と細胞機能の相関を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vivo で生成された cSMAC や TCR ミクロクラスターの観察

(1)-1 まずは in vitro で作った細胞間免疫シナプスを共焦点顕微鏡で 3 次元観察する。生理的な TCR の発現量を維持するために TCR の構成分子 CD3zeta に GFP が付くよう表的遺伝子組み換えを行った (zGFP KI) T 細胞を使用したいが、zGFP KI の GFP は過剰発現よりも 10 から 100 倍程度暗いので、検出の条件を慎重に合わせる必要がある。

DsRed 遺伝子導入マウスの骨髄細胞から誘導し抗原を負荷した抗原提示細胞をマウス足裏に移植し、抗原提示細胞がリンパ節へ移動し終えた 36-48 時間後に zGFP KI T 細胞を尾静脈から移入する。移入した T 細胞と抗原提示細胞が接触し、免疫シナプスを形成するであろうマウス膺のリンパ節を生きたまま多光子励起レーザー顕微鏡で、あるいは、固定スライスにして共焦点顕微鏡で観察する。

(2) 人工脂質膜を用いた cSMAC や TCR ミクロクラスター動態の定量的な解析

免疫シナプスは細胞間接着面に形成されるため、そのままでは、ダイナミックな分子の動きを詳細に捉える事が難しい。我々は、抗原提示分子 MHC や接着分子インテグリンなどを埋め込み抗原提示機能をもった人工脂質膜をガラス表面上に敷き、上から T 細胞を反応させる事により平面状のシナプスを形成させ、接着面をガラス越しに詳細に観察する方法を用いる。

4. 研究成果

(1) 免疫シナプスの観察に関して、予想通りに zGFP KI 発現が低く検出しにくいことから、当初予定していたスライス観察よりも、組織を崩して FACS と顕微鏡の昨日を兼ね備え

たImage streamで効率と感度を上げて観察した。しかしそれでも、cSMACは観察できたがTCRマイクロクラスターは検出できなかった。またcSMACに関しては、抗原強度、濃度に依存した変化の解析や、多光子励起顕微鏡観察による生体内でのcSMACの観察など、内容が酷似した論文が発表されてしまったので、(*J. Exp. Med.* **207**, 2733-2749 (2010))プロジェクトの軌道修正を余儀なくされた。

(2)人工脂質膜を用いたcSMACやTCRマイクロクラスター動態の定量的な解析から、抗原親和性に依存してTCRマイクロクラスターに集まる分子の数、密度が変化する事が分かったが、その中でTCRマイクロクラスターの速度が抗原濃度に依存しない事に注目した。刺激強度に依存しない仕組みを考え、調べた結果、微小管を伝うダイニンモーターがTCRマイクロクラスターをcSMACに運ぶ事を突き止め、論文発表した。

これまでマイクロクラスターが動く仕組みについては、T細胞が抗原提示細胞との接着面の縁に形成されるラミナポディアにおいて観察されるレトログレードアクチンフローによるものと示唆されていた。しかし申請者はアクチンフィラメントが接着面の辺縁部にしか観察されないこと、活性化後の微小管の位置から、中心まで運ぶためには別の機構が働くと考えた(図2)。

そこで、別の細胞骨格系である微小管について解析した。T細胞の微小管に関しては、抗原刺激に伴って中心体が活性化部位に近づき、接着面では中心体を中心にして放射状に伸びる微小管が観察されることが知られている(図2)。微小管をGFPで標識したチューブリンの発現、TCRは赤色蛍光分子で標識した抗体染色で可視化し、全反射蛍光顕微鏡で同時観察を行ったところ、微小管に沿って動くマイクロクラスターが観察された。微小管自身もダイナミック動くことから、マイクロクラスターは2-3本の微小管を乗り換えながら中心に向かって進むことが観察でき、やが

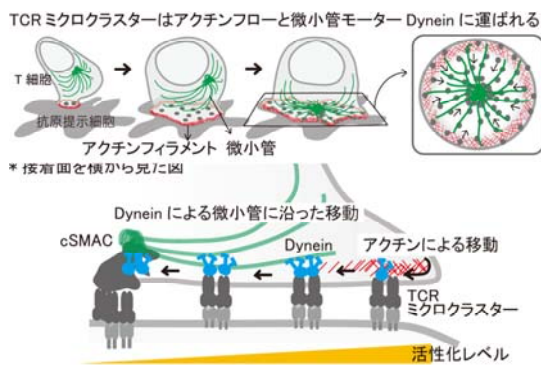


図2. 細胞骨格によるTCRマイクロクラスター動態制御

て中心体の周りに集まってcSMACを形成する様子を捉えた。また、中心体の活性化部位への移動は、必ずcSMAC形成よりも早いタイミングで誘導されることから、まず中心体の移動があり、cSMAC形成はその微小管構造に依存していると考えられた(図2)。

次に細胞膜の分子であるTCRが微小管を伝って動くことが物理的に可能である事を示唆するため電子顕微鏡観察を行った。細胞膜と微小管の距離を測った所、活性化部位の側では細胞膜から50 nm以内の場所に多くの微小管が観察された。ダイニン複合体、TCR複合体の大きさ考慮しても、細胞膜の表面分子を運ぶために十分近い距離である事を確認した。

微小管をマイナス方向に伝う動きからダイニン分子モーターの関与が示唆される。ダイニンは複数の分子が複合体を作る事によりモーターとして機能している7)。ダイニン複合体構成分子であるダイニン軽鎖(Dynein light chain 1)、中間鎖(Dynein intermediate chain 2)およびダイナクチン(p150(Glud))を緑色蛍光タンパク質GFPで標識してT細胞に発現し、人工脂質膜上で観察した所、すべての分子がTCRマイクロクラスターおよびcSMACと共局在した。ダイニン軽鎖-GFPに関しては赤色蛍光分子で染めたT細胞受容体との同時イメージングを行った所、TCRマイクロクラスターが現われるとすぐに(2.5秒以内)ダイニン軽鎖-GFPも集まり、一緒にcSMACまで移動する様子が観察された。生化学的に免疫沈降によっても、TCRおよびシグナル分子ZAP70などとダイニンのモーター部分である重鎖(cytoplasmic dynein heavy chain 1)やダイナクチンがTCR刺激に伴って共沈降した事から、驚くべきことに、TCRシグナル複合体とダイニン複合体は刺激に応じて何らかの形で結合していることが明らかになった。

ダイニンによるTCRマイクロクラスターの移動がT細胞機能の制御にどう関与しているかを調べるために、ダイニン阻害薬(EHNA)、微小管阻害薬ノコダソール、コルヒチンによる処理、そしてsiRNAによるダイニン重鎖の発現低下の影響を調べた。マイクロクラスターの数や大きさはこれらの阻害薬やsiRNAの影響を受けなかったが、マイクロクラスターの移動速度は低下し、cSMAC形成が有意に阻害された。アクチンフィラメントの形成量、アクチンの動き、中心体の移動、微小管の形状に変化は見られなかった事から、細胞骨格の障害ではなく、ダイニンのモーターとしての働きが阻害された事による結果だと考えられた。また、シグナル分子のチロシンリン酸化、イ

ンターロイキン2産生など、T細胞活性化が増幅された。以上の結果から、cSMAC形成に繋がるマイクロクラスターの移動はダイニンおよび微小管に依存しており、T細胞活性化を負に調節していることが明らかになった。

免疫シナプスにおけるT細胞受容体マイクロクラスターの形成や移動のダイナミックな制御は、美しいばかりでなく、刺激強度をアナログ的に調節する合理的な機能である。本研究では、その鍵となるT細胞受容体マイクロクラスターの移動が微小管分子モーターのダイニンによる事を突き止めた。これは抗原受容体を介した活性化がモーター分子の調節を受ける初めての知見である。また、我々と同時にイギリスのグループからB細胞受容体の抗原クラスターもダイニンに依存して動く事が明らかにされ、ダイニンによる抗原受容体の運搬はリンパ球に共通するメカニズムであることが強く示唆された。

以上は申請時の研究内容の一部が膨らみ大きな成果を上げたものである。本研究で行われた解析からは他にも多くの追究すべきデータが得られているが、期間内に終わらず残している。例えば、この結果に基づいたダイニンキックマウスの免疫応答の解析や、刺激強度に依存したマイクロクラスター動態の変化に続く細胞内シグナル分子の解析などである。また、異なるサブセット間の比較も、Naïve phaseとEffector phaseの比較は行ったが、他のサブセットに関してはまだ残している。これらは新たなプロジェクトとして練り直し、他の予算を用いて進めて行く予定である。

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4件)

①Akiko Hashimoto-Tane, Tadashi Yokosuka, Kumiko Sakata-Sogawa, Machie Sakuma, Chitose Ishihara, Makio Tokunaga, Takashi Saito
Dynein-Driven Transport of T Cell Receptor Microclusters Regulates Immune Synapse Formation and T Cell Activation
Immunity 34 2011, 919-931 (査読有)

②Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Ishihara C, Sakuma M, Kobayashi W and Saito, T
T cell receptor-microclusters critical for T-cell activation are formed

independently of lipid raft clustering.

Molecular and Cellular Biology 30 (14) 2010, 3421-3429 (査読有)

③Yokosuka, T, Kobayashi, W, Takamatsu, M, Sakata-Sogawa, K, Zeng, 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) 2010, 326-339 (査読有)

④Saito, T, Yokosuka, T. and Hashimoto-Tane, A
Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters.
FEBS Letters 584 2010, 4865-4871 (査読有)

[学会発表] (計9件)

①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
2012年3月16日、京都

②多根(橋本) 彰子
モーター分子ダイニンによるT細胞受容体マイクロクラスター輸送を介した活性化制御
第21回東京免疫フォーラム
2012年3月8日、東京

③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回日本免疫学会学術集会
2011年11月29日、千葉

④Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Sakuma, M. and Saito, T.
Dynein-driven transport of TCR microclusters forms Immune synapse and regulates T cell activation.
The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacology Society
2011年3月22日-24日, on line

⑤Hashimoto-Tane, A., Saito, T.
Dynein-driven transport of TCR microclusters forms Immune synapse and regulates T cell activation
The 16th Takeda Science Foundation

Symposium on Bioscience
2010年12月1日, 東京

⑥ Hashimoto-Tane, Yokosuka, T., Machie Sakuma, Takashi Saito
Dynein-mediated translocation of TCR microclusters along microtubules to form csmac during T cell activation
14th International Congress of Immunology
2010年8月24日, 神戸

⑦ Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Saito, T
Dynein-mediated translocation of TCR microclusters along microtubules to form cSMAC
Keystone Symposia
Lymphocyte Activation and Gene Expression
2010年3月1日 Breckenridge (USA)

⑧ 橋本彰子 (多根)、横須賀忠、斉藤隆
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
2009年12月3日大阪

⑨ Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Ishihara, C. and Saito, T.
TCR microclusters move along microtubules in early T cell activation
The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference
2009年6月1日 Kyoto

[その他]
ホームページ等

Immunity preview
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761311002354>

理化学研究所プレスリリース
http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2011/110624_2/detail.html

ライフサイエンス 新着論文レビュー
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/3201>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
多根 彰子 (橋本彰子) (TANE AKIKO)
独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・研究員
研究者番号: 10415226

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし