

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590590

研究課題名(和文) TCRマイクロクラスターと補助刺激受容体ネットワークによるT細胞活性調節の解明

研究課題名(英文) Mechanism of T cell activation regulation by TCR microclusters and the costimulation network.

研究代表者

横須賀 忠 (Yokosuka, Tadashi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10359599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子イメージング研究から、抑制性補助刺激受容体PD-1が、リガンド結合を機に、T細胞シグナルソームTCRマイクロクラスターに集まり、脱リン酸化酵素SHP2をリクルートすることで、T細胞活性を抑制することが分かった。また、免疫チェックポイント分子治療薬抗PD-1抗体は、PD-1のTCRマイクロクラスターへの凝集を阻害した。活性化補助刺激受容体ICOSは、リガンドとの結合を機に、フォスファチジルイノシトール3リン酸キナーゼPI3Kのリクルートを増強していた。T細胞活性化は活性化および抑制性補助刺激受容体シグナルソームの時空間的制御を受けていた。

研究成果の概要(英文)：The imaging analysis revealed a new insight that a negative costimulatory receptor, PD-1, accumulated at a T cell signalosome, the TCR microcluster, and recruited a phosphatase, SHP2, to suppress T cell activation in a ligand-binding manner. The anti-PD-1 antibody, whose an advantage in the immune check-point therapy, blocked the aggregation of PD-1 at the TCR microclusters, resulting in the recovery of T cell activation. An activating costimulatory receptor, ICOS, increased the translocation of PI3K at TCR microclusters through the binding to its ligands. These data demonstrate that T cell activation is spatiotemporally regulated by both activating and suppressive costimulation signalosomes.

研究分野：医歯薬学・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) 自己免疫やアレルギー疾患の発症機序の中で、T細胞活性化の不均衡に起因するところは大きい。T細胞はT細胞受容体(TCR)だけからの刺激を受けると無反応(アナジー)となるが、補助刺激受容体からのシグナルが存在すると至適はT細胞の活性化が誘導される。補助刺激状態には活性化と抑制性とが存在し、そのバランスによってT細胞活性が制御される。前者には、CD28やInducible costimulator(ICOS)が、後者にはCytotoxic T-lymphocyte associated protein 4(CTLA-4)やProgrammed cell death-1(PD-1)が含まれる。

(2) TCRや補助刺激受容体が、それぞれのリガンド(抗原ペプチド+MHCや副刺激受容体リガンド)との結合するためには、T細胞と抗原提示細胞が接着する必要がある。二つの細胞の間には、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、「免疫シナプス」が形成される。我々は、T細胞シグナルの分子イメージング解析から、免疫シナプスは、TCR数十個とその下流のシグナル伝達分子が集合体したシグナルソーム「TCRマイクロクラスター」によって構成され、この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)。

(3) よって、これらシグナル伝達ユニットのイメージング解析という新たな見地からT細胞活性化のメカニズムを明らかにすることで、補助刺激受容体の均衡の破綻が導く自己免疫・アレルギー疾患発症の分子機構の解明が課題となる。また、近年の免疫チェックポイント療法として注目されている抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体の抗腫瘍効果の詳細なメカニズムの解明も必要とされており、副作用の発生機序や治療対象患者の選択の観点からの研究が重要視されてきた。

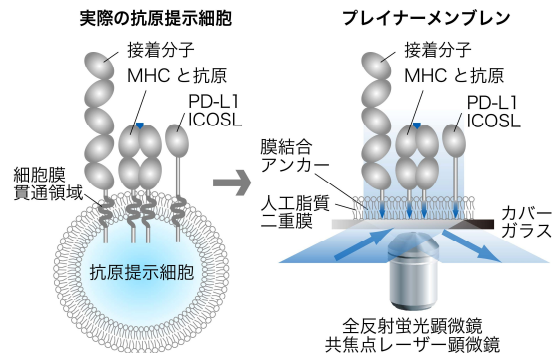
2. 研究の目的

(1) TCR、PD-1、ICOS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) PD-1がTCRシグナルを抑制するメカニズムを、イメージングから明らかにし、これまで生化学的に提唱されていたフォスファターゼとの会合やその脱リン酸化される基質との関連性を証明する。

(3) 抗PD-1抗体がPD-1にどのように作用しているか、可視化を行うことで、PD-1によるT細胞抑制がどのように解除されるか、受容体とシグナル伝達分子の双方から解明する。
 (4) ICOSとCD28の挙動を比較検討しながら、ICOSが形成する受容体の挙動(クラスター形成の有無など)とシグナル伝達分子の選択的凝集およびシグナルソーム形成を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PD-1とICOSの詳細なイメージング解析を行うため、PD-1のリガンドであるPD-L1のGPIアンカー型蛋白およびICOSのリガンドであるICOSL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) PD-1下流のSHP1、SHP2の蛍光蛋白キメラ分子を作製する。ICOS下流のPI3K(p85α p110δ)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。

(4) 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、PD-1、SHP1、SHP2、ICOS、ICOSLの挙動を、共焦点レーザー顕微鏡および全反射蛍光顕微鏡を用いて、経時的に観察する。

(5) PD-1のイメージングと同時に、上記実験系に抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体を添加し、PD-1およびSHP1/SHP2の挙動の変化を観察し、抗体なしのデータと比較検討する。

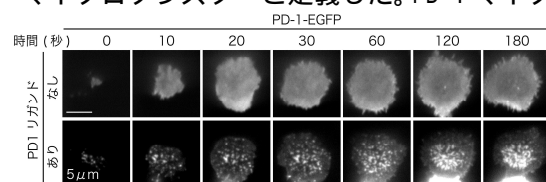
(6) 慢性炎症や老化の際に出現するPD-1を高発現するT細胞PD-1^{hi}T細胞のモデルとしてCD8陽性T細胞とMHCクラスIのイメージングシステムを構築する。

(7) 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。

(8) 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。

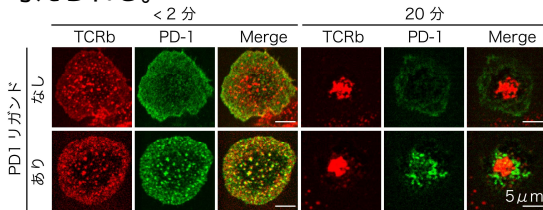
4. 研究成果

(1) 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PD-1の挙動を、全反射蛍光顕微鏡で観察した。PD-1はリガンドPD-L1があるときにのみクラスターとなり、接着面の中央に向かって移動・集積した。これをPD-1マイクロクラスターと定義した。PD-1マイク

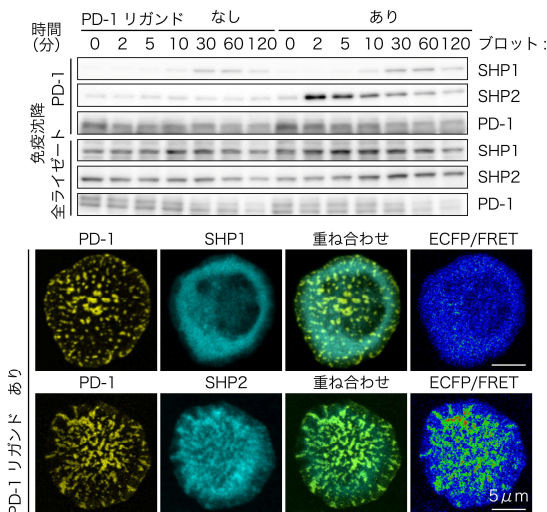


ロクラスターの形成過程は、TCR マイクロクラスターおよび CD28 マイクロクラスターとほぼ同じであった。TCR と MHC ペプチドとの結合がない場合は、十分な PD-1 のクラスター形成は見られなかった。よって、PD-1 マイクロクラスターの形成は TCR 刺激依存的である。

(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 PD-1 (緑) の挙動を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(1)で示した通り、PD-1 は TCR とほぼ同じ挙動を示し、TCR マイクロクラスターに局在するのが観察される。しかし、TCR が免疫シナプスの中心分に移行するのに伴い、TCR マイクロクラスターから逸脱し、TCR とは別のクラスターとして凝集することがわかった。この挙動は、TCR が中心部でインターナリゼーション・分解を受けるのに対し、別のシグナル伝達機構を有することを示唆する。CD28 は PD-1 と同じ様に TCR 別の PD-1 に酷似したシグナルソーム形成を示し、両者の関連性が考えられる。

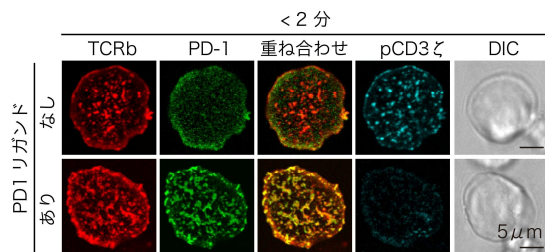


(3) PD-1 へのフォスファターゼの会合は、生化学的手法とイメージングとの両方からのアプローチで実験を行った結果、どちらもこれまで報告されてきた SHP1 の会合はみられず、SHP2 単独の会合が示された。Western blot では、SHP2 は、PD-1 と TCR とのクロスリンク後、非常に早期に、恐らく 1 分以内に最大値を持つように会合することが分かった。このキネティクスは、TCR に TCR 下流のシグナル伝達分子キナーゼやアダプターが会合してくる現象と、ほぼおなじであった。また、PD-1 への SHP2 の会合時間は、一過性であり、キナーゼやアダプターの挙動に準じていた。Western で示された会合と同様、SHP2 のイメ



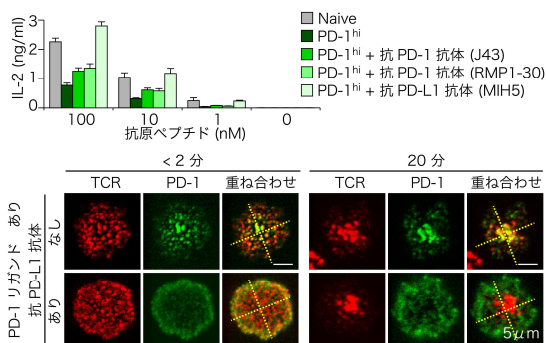
ージングでも、SHP2 が TCR マイクロクラスター形成の早期に同クラスターに共局在する現象が観察された。このことから、PD-1 が誘導する SHP2 クラスターの基質は、TCR およびその下流のシグナル伝達分子である可能性が高い。

(4) TCR 下流のシグナル伝達分子のリン酸化状態を、イメージングおよび生化学的手法によって解析した。イメージングによる受容体 TCR/CD3 複合体のリン酸化を評価するため、抗リン酸化 CD3 ζ 抗体にて TCR マイクロクラスターを染色したところ、PD-1 存在下に PD-1 マイクロクラスターが形成されたときのみ、CD3 ζ 鎖の脱リン酸化が起きていることが分かった。また、Western blot では、同様に PD-1 存在下のみ、TCR 下流のグアニンヌクレオチド変換酵素 Vav1、フォスホリパーゼ PLC γ 1、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ ERK など、一様に脱リン酸化が起きていることが分かった。これらの結果から、PD-1 が誘導する SHP2 マイクロクラスターは、受容体レベルから TCR シグナル伝達を脱リン酸化、シグナル抑制へ誘導すると考えられる。



(5) PD-1^{hi} CD8⁺ T 細胞を実験的に作出するため、MHC クラス I 拘束性 OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスに少量の OVA ペプチドを 7 日間連続投与し、その後 7 日間レストイングさせ、PD-1^{hi} となった CD8⁺ T 細胞を調整し、抗原提示細胞による OVA ペプチド刺激を行った。この *in vitro* 刺激実験系に抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体を添加し、PD-1^{hi} CD8⁺ T 細胞の OVA 特異的 T 細胞応答のリカバリーを IL-2 産生にて確認した。このリカバリーの機序をイメージングの見地から検討するため、同 PD-1^{hi} CD8⁺ T 細胞細胞を Alexa488 標識抗 PD-1 抗体 (緑) および Alexa647 標識抗 TCR β 抗体 Fab (赤) にて染色し、プレイナーメンブレンと T 細胞との接着面に形成される PD-1 および TCR マイクロクラスターの形成を観察した。その結果 PD-1^{hi} CD8⁺ T 細胞は PD-L1 との結合を機に PD-1 マイクロクラスターを形成すること、また抗 PD-1 抗体もしくは抗 PD-L1 抗体添加にて PD-1 マイクロクラスターの形成不全が生じることが分かった。一方、これらの抗体添加によっても、TCR マイクロクラスターの形成には変化がなく、PD-1^{hi} CD8⁺ T 細胞の免疫応答のリカバリーは、これらの抗体添加においてもシグナルソームとして機能し続ける TCR マイクロクラスターに起因し、一方 PD-1 による抑制性マイクロクラスターの解除が T 細胞応答復活の原因

になっていることが分かった。



(6) 次に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 ICOS の挙動を、全反射蛍光顕微鏡で観察した。ICOS はリガンド ICOSL があるときのみクラスターとなり、接着面の中央に向かって移動・集積した。これを ICOS マイクロクラスターと定義した。ICOS マイクロクラスターの形成過程は、TCR マイクロクラスターおよび CD28 マイクロクラスター、PD-1 マイクロクラスターとほぼ同じであった。

(7) ICOS マイクロクラスターのシグナルソームとして機能を検討するため、生化学的 ICOS との会合が示されているフォスフォイノシトール 3 リン酸キナーゼ PI3K の分子イメージングを行った。PI3K p85 α もしくは p110 δ の GFP キメラ分子と、Alexa647 標識抗 TCR β 抗体 Fab で染色される TCR を、ICOSL ありなしの条件下において、共焦点レーザー顕微鏡での二色同時の観察を行った。ICOSL ありのときには、PI3K の TCR マイクロクラスターへの凝集が非常に強く、また、停滞時間も長期に渡ることが分かった。ゆえに、これまで CD28 がリガンドの CD80/CD86 との結合を機に NK- κ B 経路のシグナルソームを形成することと比較し、ICOS は、同じ活性型補助刺激受容体であるが、リガンド ICOSL との結合により PI3K のシグナルソームを形成し、CD28-NF- κ B 経路との差別化があることが示唆された。

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 6 件)

Hashimoto-Tane A, Sakuma M, Ike H, Yokosuka T, Kimura Y, Ohara O, Saito T. Micro adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential for T cell activation. *J Exp Med*. 2016 (in press) (査読あり)

Badr MESHG, Furuhashi M, Toyoda H, Yokosuka T. The multifaced role of PD-1 in health and disease. *Chronic inflammation* 2016 Springer (in press) (査読あり)

Hata K, Yanase N, Sudo K, Kiyonari H, Mukumoto Y, Mizuguchi J, Yokosuka T.

Differential regulation of T-cell dependent and T-cell independent antibody responses through arginine methyltransferase PRMT1 in vivo. *FEBS Lett*. 2016, 590(8):1200-10. (査読あり) DOI:10.1002/1873/3468.12161.

Hara H, Yokosuka T, Hirakawa H, Ishihara C, Yasukawa S, Yamazaki M, Koseki H, Yoshida H, Saito T. Clustering of CARMA1 through SH3-GUK domain interactions is required for its activation of NF- κ B signalling. *Nat Commun*. 2015,6:5555. (査読あり) DOI:10.1038/ncomms6555.

Kong KF, Fu G, Zhang Y, Yokosuka T, Casas J, Canonigo-Balancio AJ, Becart S, Kim G, Yates JR 3rd, Kronenberg M, Saito T, Gascoigne NR, Altman A. Protein kinase C- controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function. *Nat Immunol*. 2014, 15(5):465-72. (査読あり) DOI:10.1038/ni.2866.

Liang Y*, Cucchetti M*, Roncagalli R*, Yokosuka T*, Malzac A, Bertosio E, Imbert J, Nijman IJ, Suchanek M, Saito T, Wülfing C, Malissen B, Malissen M. (* equally contributed authors) The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2013, 14(8):858-66. (査読あり) DOI:10.1038/ni.2634.

Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med*. 2012, 209(6):1201-17. (査読あり) DOI:10.1084/jem.20112741.

〔学会発表〕(計 19 件)

Yokosuka T: Balance of T cell activation and suppression controlled by Cbl-b-mediated ubiquitination of TCR microclusters 新学術領域四次元免疫シンポジウム (2016 年 3 月 2 日、横浜)
横須賀忠: イメージングが拓く免疫チェックポイント分子による時空間的 T 細胞制御メカニズム 第 15 回新宿肺癌サミットミーティング(2016 年 2 月 17 日、東京)
横須賀忠: T 細胞シグナルソーム「TCR 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機構 岡山大学第 10 回免疫学セミナー (2016 年 2 月 4 日、岡山)
 YANASE Noriko, TOYOTA Hiroko, MIZUGUCHI Junichiro, HATA Kikumi, HARADA Mitsunori, YOKOSUKA Tadashi. A novel micellar nanoparticle functions as an

adjuvant to enhance anti-tumor immune responses in vivo. 第44回日本免疫学会総会学術集会(2015年11月20日、札幌)
YOKOSUKA Tadashi, HASHIMOTO-TANE Akiko, FURUHATA Masae, TOYOTA Hiroko, SAITO Takashi. Cytoskeletal regulation of the clustering of a Ras-GEF, RasGRP1, upon T cell activation. 第44回日本免疫学会総会学術集会(2015年11月20日、札幌)
横須賀忠: 分子イメージングが開く免疫細胞の時空間的制御機構 第176回東京医科大学医学部総会(2015年11月7日、東京)
横須賀忠: 分子イメージングが拓くT細胞活性化の時空間的制御機構 第14回国免疫フォーラム(2015年6月20日、松山)
横須賀忠, 古畑昌枝, 豊田博子, 秦喜久美, 永井太朗, 矢那瀬紀子: 分子イメージングによる免疫チェックポイント分子PD-1のT細胞抑制機構と抗PD-1/PD-L抗体の抗腫瘍効果の分子基盤解析 東京医科大学第93回免疫アレルギー研究会(2015年6月2日、東京)
YOKOSUKA Tadashi, HASHIMOTO-TANE Akiko, SAITO Takashi. Cytoskeletal regulation of the clustering of a Ras-GEF, RasGRP1, upon T cell activation. 第25回京都T細胞カンファレンス(2015年5月15日、京都)
YOKOSUKA Tadashi, HASHIMOTO-TANE Akiko, IKE Hiroshi, SAITO Takashi. Subcellular imaging of the E3 ubiquitin ligases, c-Cbl and Cbl-b, to control T cell activation signals through ubiquitin clustering at TCR microclusters. 新学術領域生体イメージング国際シンポジウム(2015年1月26日、京都)
YOKOSUKA Tadashi, HASHIMOTO-TANE Akiko, SAITO Takashi. Subcellular imaging of the E3 ubiquitin ligases, c-Cbl and Cbl-b, to control T cell activation signals through ubiquitin clustering at TCR microclusters 第43回日本免疫学会総会学術集会(2014年12月11日)
Yokosuka T: Molecular imaging unveils the dynamic regulation of T cell activation. 第18回日本がん免疫学会総会(2014年7月30日、松山)
横須賀忠, 多根彰子, 斉藤隆: E3 ユビキチンリガーゼ Cbl のクラスター形成とT細胞活性化制御機構 第24回京都T細胞カンファレンス(2014年5月17日、京都)
YOKOSUKA Tadashi, HASHIMOTO-TANE Akiko, SAITO Takashi. Distinct signalosomes of guanine nucleotide exchange factors, activating the Ras-MAPK pathway in T cell signaling 第42回日本免疫学会総会学術集会(2013年12月11日)
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 岡山大学第6回免

疫学セミナー(2013年10月23日、岡山)
横須賀忠: TCR 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機構 理研シンポジウム「細胞死・無の動態と理論V」(2013年3月21日、和光)
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 愛媛大学分子病態医学セミナー(2013年3月5日、松山)
YOKOSUKA Tadashi, HASHIMOTO-TANE Akiko, SAITO Takashi. Negative costimulatory microclusters inhibiting T cell-mediated inflammation. JST-CREST International Symposium(2013年2月12日、大阪)
YOKOSUKA Tadashi Dynamic regulation of T cell activation by TCR microclusters and a c-SMAC. 京都大学病理学セミナー(2012年11月7日、京都)

〔図書〕(計5件)

横須賀忠, 古畑昌枝, 豊田博子, 畑喜久美, 矢那瀬紀子, 最先端イメージング技術によるTCRシグナル研究の進歩. 臨床免疫・アレルギー 2016 印刷中
T細胞免疫シナプス研究の最新事情. 横須賀忠 臨床免疫・アレルギー 63:1893-2000 2015
T細胞活性化におけるチェックポイント. 横須賀忠 炎症と免疫 23:10-20 2015
T細胞におけるPD-1の生理機能と分子基盤. 横須賀忠 腫瘍内科 14:419-426 2014
リンパ球特異的アクチンアンキャッピング蛋白Rltprは、補助刺激受容体CD28を介するT細胞活性化と制御性T細胞分化に必須である. 横須賀忠, 斉藤隆, Malissen B 新着論文レビュー 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.tokyo-med.ac.jp/faculty/med/course/course18.html>
<http://tokyo-med-imm.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横須賀 忠 (YOKOSUKA TADASHI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10359599

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし