

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860188

研究課題名(和文) T細胞活性化におけるmDiaの機能とその分子作用機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of mDia function in T cell activation

研究代表者

Thumkeo Dean (THUMKEO, DEAN)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40372594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではmDia1/3欠損マウスでは末梢リンパ球の数が著明に減少していることを見出し、その原因は胸腺内でのT細胞産生の障害にあるということが判明した。これまで、T前駆細胞からT細胞が産生される過程はTCRシグナル依存的な過程であることが知られているが、解析の結果、mDia1/3 DKO T前駆細胞のTCR刺激依存的な反応は著しく減弱していることが分かった。さらに、分子イメージング実験を行った結果、TCRシグナル伝達にはmDia1/3によって生成される細胞膜の裏打ちF-actinが不可欠であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：T cell receptor (TCR) signaling is triggered by binding of TCR to the cognate antigen presented by major histocompatibility (MHC) complex and mediated by microclusters of multiprotein complex. While the critical role of actin cytoskeleton in these processes has been suggested, the molecular mechanisms therein have yet to be characterized. In this work, we show that combined loss of mDia1 and mDia3, the formin family actin nucleators, impairs the TCR signaling and consequently blocks positive selection of thymocytes. Imaging experiments revealed impairment of TCR microcluster dynamics and large fluctuation of polymerized actin in mDia1/3-deficient thymocytes. Therefore, F-actin reorganization mediated by mDia1 and 3 is required for thymocyte TCR signaling and function.

研究分野：薬理学、細胞生物学

キーワード：TCRシグナル mDia F-actin T細胞 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

生体防御の中心を司る T 細胞は、ウイルス・細菌をはじめ、無数の抗原に対する特異的な免疫応答を誘導する。T 細胞は胸腺において T 前駆細胞が T 細胞抗原レセプター (TCR) によるシグナル伝達機構を利用して作られることが知られている。また、成熟した T 細胞は同じ TCR シグナル伝達によって活性化し、同じ特異性を持つクローンを増殖させ、種々の機能を発現する細胞に分化して、免疫応答を制御していることも知られている。これまでの研究により、T 細胞の抗原認識から活性化と機能発現までの制御機構に関与する分子が多数単離・同定されている。しかし、TCR がクローニングされてから 25 年が経過した現在でも、TCR の活性化に関わる新規の分子が次々と見つかり、TCR シグナル伝達に関わるこれら因子の働きはまだ不明なことが多い。

一方、TCRシグナル伝達に関わる因子の同定と平行して、イメージング技術の進歩により、TCR活性化の初期に関わる分子のライブイメージング研究が盛んに行われた。これまで、カバーガラス上に、抗原提示細胞を模した脂質二重膜を置き、上から T 細胞を落として接触させることで TCR 刺激を起こさせる実験を行い、T 細胞のレセプターの全反射顕微鏡による分子イメージングが行われ、T 細胞表面上にはマイクロクラスターと呼ばれる小さな分子の集合体が存在し、一つのマイクロクラスターは T 細胞レセプター、キナーゼ、アダプターを持ち合わせ、TCR 活性化の場であることが明らかになった。抗原認識後、各マイクロクラスターは T 細胞の外縁に広がっていくが、その後レセプターは互いに融合しながら細胞の中心に集まっていき、免疫シナプスと呼ばれる構造を形成する。このようなマイクロクラスターの動態はアクチン細胞骨格の重合ないし脱重合を阻害する薬剤を用いた実験の結果により、アクチン細胞骨格の関与が示唆されたものの、その分子機構の詳細についてはほとんど不明のままである。

2. 研究の目的

本研究は TCR シグナル伝達および T 細胞の活性化におけるアクチン重合・核化因子 mDia の役割についてその分子作用機序に着目し、TCR シグナル伝達における mDia の動態、T 細胞の活性化に寄与する分子作用機序、そしてアクチン細胞骨格との関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、mDia がどのような分子作用機序を介して、アクチン細胞骨格を制御し、TCR シグナルの活性化に関与しているのかを解明するために、mDia1/3 二重欠損 (DKO) マウスを用いた。まず、mDia1/3 DKO マウスより mDia1/3 ダブル欠損 T 前駆細胞や T 細胞を単離し、TCR 刺激による TCR と F-actin の動態について異常はないかを検討した。具体的にはカバーガラス上に、抗原提示細胞を模した脂質二重膜を置き、上から T 前駆細胞または T 細胞を落として接触させることで TCR 刺激を行い、

TCR または F-actin 動態を全反射顕微鏡 TIRF による分子イメージングにより観察した。また、正常 T 細胞を用いて TCR 刺激依存的 mDia の局在の観察も行った。さらには別の mDia アイソフォームである mDia2 の T 細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成し、TCR シグナル伝達における mDia2 の関与についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) mDia1/3 ダブル欠損による抗原刺激依存的 TCR 動態の阻害

mDia1/3 DKO マウスより mDia1/3 ダブル欠損 T 前駆細胞や T 細胞を単離し、TCR 刺激による TCR 動態について検討を行った。その結果、TCR 刺激依存的な TCR 動態の異常を認めた (図 1)。

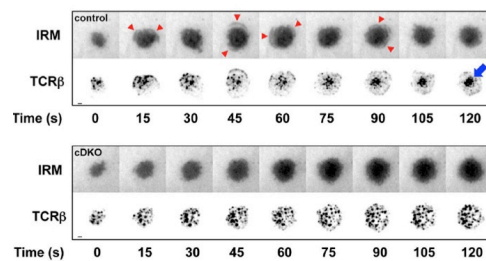


図 1 mDia1/3 二重欠損による抗原刺激依存的 TCR 動態の阻害

2) mDia1/3 ダブル欠損による抗原刺激依存的 F-actin 動態の阻害

mDia1/3 DKO マウスより mDia1/3 ダブル欠損 T 前駆細胞や T 細胞を単離し、F-actin の蛍光プローブである lifeact-EGFP 発現 vector を retrovirus により導入し、TCR 刺激による F-actin 動態について観察を行った。その結果、mDia1/3 二重欠損 T 前駆細胞は野生型で見られるような辺縁での F-actin のリング構造を形成せず、不定形の F-actin 塊がランダムに存在していることが明らかになった (図 2)。

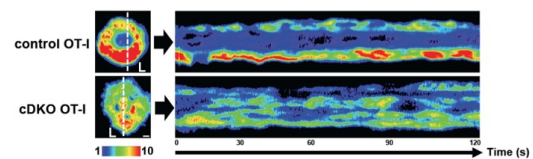


図 2 mDia1/3 二重欠損による抗原刺激依存的 F-actin のリング構造形成の阻害

3) T細胞における mDia1 の局在検討

これまでの解析から、mDia1 は T 前駆細胞に発現していることが分かっているが、その局在は不明であった。そこで、TCR 刺激した T 前駆細胞を用いて mDia1 の免疫染色による検討を行った。その結果、mDia1 は T 前駆細胞の細胞膜の裏打ちアクチンの近傍に存在することが分かった (図 3)。

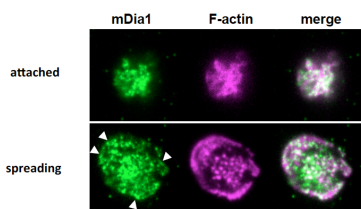


図 3 T細胞における mDia1 の細胞内局在

4) T細胞特異的 mDia2 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し及び表現型解析

mDia1/3 DKO マウスで見られた T 細胞の表現型における mDia2 アイソフォームの関与を検討するために、さらには T 細胞特異的 mDia2 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、表現型解析を行った。その結果、mDia2 の欠損は T 細胞の発生や活性化に影響を及ぼさないことが分かった (図 4)。

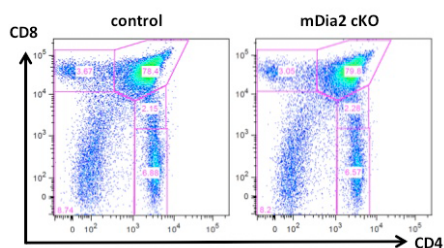


図 4 mDia2 の欠損は胸腺における T 細胞の発生に影響を及ぼさない

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 3 件)

- 1) Dean Thumkeo, Sadanori Watanabe and Shuh Narumiya. Physiological roles of Rho GTPase and Rho effectors in mammalian. **Eur. J. Cell Bio.** 92, 303-315 (2013).
- 2) Yosuke Toyoda*, Ryota Shinohara*, Dean Thumkeo*, Kamijo H, Nishimaru H, Hioki H, Kaneko T, Ishizaki T, Furuyashiki T and Narumiya S. (*equal contribution) Impaired EphA4-induced axon

retraction and disrupted midline localization of Ephrin-B3 in the spinal cord in mice deficient in mDia1 and mDia3 in combination. **Genes to Cells** 18, 873-885 (2013)

- 3) Nomachi A, Yoshinaga M, Liu J, Kanchanawong P, Thumkeo D, Watanabe T, Narumiya S, and Hirata T. Moesin Controls Clathrin-Mediated S1PR1 Internalization in T Cells. **PLoS ONE** 8: e82590 (2013).

[学会発表] (計 11 件)

- 1) Dean Thumkeo, Akira Nomachi, Kiyoshi Tohyama and Shuh Narumiya Formin family actin nucleators, mDia1 and mDia3, mediate TCR microcluster dynamics and signaling critical for positive selection of thymocytes. The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Nagoya, Japan, 20th March 2015, **Poster presentation.**
- 2) Satoko Sakamoto, Dean Thumkeo, Hiroshi Ohta, Masahito Ikawa, Yoshitaka Fujiwara, Sadanori Watanabe and Shuh Narumiya. Loss of mDia1/3 in mice results in male infertility. The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Nagoya, Japan, 20th March 2015, **Oral presentation.**
- 3) Kiyoshi Tohyama, Dean Thumkeo and Shuh Narumiya. T cell cortical F-actin is mediated by mDia and critical for TCR signaling. The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Nagoya, Japan, 19th March 2015, **Poster presentation.**
- 4) Dean Thumkeo, Peter Beemiller, Akira Nomachi, Matthew F. Krummel and Shuh Narumiya. Indispensable role of formin family actin nucleator, mDia1 and mDia3, in TCR microcluster dynamics and signaling critical for positive selection of thymocytes. The 37th Naito Conference "Bioimaging-a paradigm shift for the life science". Niseko, Hokkaido, Japan, 16th July 2014, Poster presentation.
- 5) Dean Thumkeo, Akira Nomachi, Kiyoshi Tohyama and Shuh Narumiya The formin protein mDia is indispensable for TCR signaling dependent T cell development through actin nucleation activity. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. Nara, Japan, 12th June 2014, Oral presentation.

- 6) Satoko Sakamoto, Dean Thumkeo and Shuh Narumiya. Role of mDia in spermatogenesis. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. Nara, Japan, 11th June 2014, Poster presentation.
- 7) Dean Thumkeo, Akira Nomachi, Kiyoshi Tohyama, Takako Hirata, Toshimasa Ishizaki and Shuh Narumiya. Actin nucleator mDia1 and mDia3, cooperatively function in T cell receptor signaling-dependent T cell development in thymus. The 87th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Sendai, Japan, 20th March 2014, **Oral presentation.**
- 8) Kiyoshi Tohyama, Dean Thumkeo and Shuh Narumiya. mDia, an actin nucleator of formin family, functions in T cell activation. The 87th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Sendai, Japan, 21th March 2014, **Poster presentation.**
- 9) Dean Thumkeo, Sadanori Watanabe and Shuh Narumiya. Physiological roles of mDia, a Rho effector and actin nucleator, in mammals. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemistry Society, Yokohama, Japan. 11th September 2013, **Symposium [invited speaker].**
- 10) Dean Thumkeo and Shuh Narumiya. Roles of mDia in TCR signaling and its potential as a novel target for immunoregulation drugs. The 2nd International Conference in Medicine and Public Health, Bangkok, Thailand, 26th June 2013, Symposium [invited speaker].
- 11) Dean Thumkeo and Yoshiki Arakawa. Immunotherapy for cancer: challenges and approach. The 2nd International Conference in Medicine and Public Health, Bangkok, Thailand, 27th June 2013, Symposium [invited speaker].

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

タムケオ ディーン (THUMKEO DEAN)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：40372594

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし