

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24229004

研究課題名(和文) T細胞活性化制御の時空間的構造的解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal and structural analysis of T cell activation regulation

研究代表者

斉藤 隆 (Saito, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：50205655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,700,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞は抗原認識に伴い、TCRマイクロクラスターを形成し、種々シグナル分子をリクルートして活性化することを明らかにした。この活性化は、正と負の副刺激や自然免疫シグナル、細胞骨格によって制御され、その時空間的制御を解明した。抑制性マイクロクラスターや新たな細胞内シグナル伝達の間を見いだした。TCR-CD3複合体による抗原認識とそれに伴う活性化への構造的基盤の理解のために、細胞内領域を含むTCR-CD3複合体の構造解析を行った。生体内での恒常的なT細胞活性化として、自己認識によって部分的に活性化されるT細胞の活性化状態とシグナル制御系を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：T cell activation upon antigen recognition is found to be mediated by recruiting various signal molecules to TCR microclusters. The activation is regulated by several signals; positive and negative co-stimulation signals, innate signals, and cytoskeletal signals. We then analyzed spatiotemporal aspects of these regulations. Among them, we found the generation of inhibitory microclusters by inhibitory receptors PD-1 and new intracellular signaling sites for Ras activation. The structural basis of antigen recognition and activation through the TCR-CD3 complex has been tried to analyze by synthesis and structural analysis of whole molecules of the TCR-CD3 complex including intracellular domains. We have also clarified T cell activation status and their regulation of activation upon self-recognition by T cells in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 TCR-CD3複合体 ミクロクラスター シグナル伝達 細胞活性化 イメージング解析

1. 研究開始当初の背景

T細胞は抗原を特異的に認識して活性化され、免疫応答を中心的に制御すると共に、一方、過剰な活性化によって自己免疫・アレルギー疾患を誘導する。そのため、T細胞の活性化とその制御機構の解明は、免疫応答の制御への橋頭堡であり、本研究は、T細胞の抗原認識に伴う細胞活性化の時空間的な制御の分子機構の全容を、イメージング・機能解析および構造解析によって明らかにする。

2. 研究の目的

我々の発見したT細胞活性化ユニット「TCRミクロクラスター」(TCR-MC)による活性化のシグナル伝達における種々の細胞内シグナル経路の空間的制御、膜貫通領域を含むTCR複合体の構造解析により抗原認識・活性化の分子基盤の解明、副刺激や自然免疫シグナルによるT細胞活性化と機能の制御、細胞接着によるT細胞活性化の制御、自己反応性T細胞の活性化制御の解析、を進めることを目的とする。これらによってT細胞活性化の制御機構を包括的に解明し、人為的調節への応用を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 構造を明らかにするために、細胞膜分子をリボソームの形で再構成させる技術を応用して、TCR-CD3複合体の各分子の膜・細胞内領域を含む全長を合成し、各ダイマー、全複合体の結晶化を目指した。
- (2) TCR-MCとそれを介するシグナル伝達、および副刺激による制御などは、pMHC, ICAM1をGPI型として発現させた人工脂質二重膜にT細胞を反応させて、TIRF顕微鏡でイメージング解析を行った。
- (3) CD11c-DTR発現マウスを用いDC除去マウス、または抗MHCクラスII抗体投与マウスを用いて、T細胞の*in vivo*での自己認識に伴う活性化シグナルを解析した。

4. 研究成果

(1)TCR-MCを介する活性化制御
TCR-MCにリクルートされて会合する分子群を解析してきたが、その下流で種々の異なるシグナル経路の制御、特にNF-κBとRas活性化の制御の解析を行った。NF-κB活性化に重要なCBM複合体(CARMA1-Bcl10-MALT1)のCARMA1の動態を解析し、

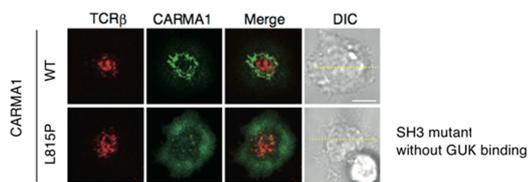


図1 T細胞活性化に伴うCARMA1のcSMACへの集積と副刺激活性化。変異CARMA1はクラスターを作らず副刺激活性化は持たない。

CARMA1は休止期ではGUK-SH3領域の分子内結合によって閉鎖型だが、活性化によって開放型になり、分子間凝集が起こることが判明した。T細胞活性化によってCARMA1はCD28やPKCθと同様なcSMACに集合してクラスターを形成し活性化シグナルを誘導する。一方腫瘍誘導活性のある変異CARMA1では刺激なしに凝集体を形成して、過剰なNF-κB活性化を誘導した。

Ras活性化に重要な2つのGEF; SOSとRasGRP1の動態を解析し、SOSはTCR-MCおよび引き続いてcSMACに集まる一方、RasGRP1は細胞骨格分子プレクチンと会合して、特殊なER様メッシュ構造を形成し、T細胞活性化に伴って細胞膜に移動してRasと会合し活性化すると考えられた。T細胞でRas活性化における新たな細胞内シグナルコンパートメントを明らかになった。

(2)副刺激・自然免疫シグナルによる制御

CD28, CTLA4の制御に続き、抑制性副刺激受容体PD-1による制御を解析した。T細胞活性化に伴ってPD-1はTCR-MC, cSMACに集積し、

PD-1の細胞内のITSMおよびITIM領域にフォスファタ

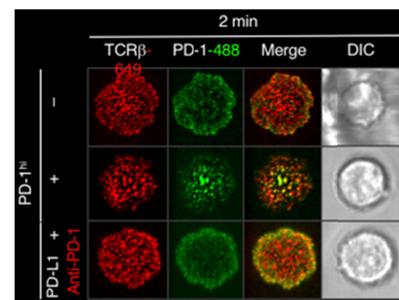


図2 T細胞活性化に伴ってPD-1はTCR-MCと共局在して抑制クラスターを形成する。抗PD-1抗体によってPD-1クラスター形成は阻害され、抑制活性が阻害された

ゼ SHP2 を特異的に一過性にリクルートし

て、TCR シグナル上流分子(CD3 ζ , PLC γ , Erk など)を脱リン酸化させて、T細胞の活性化を抑制することが判明した。PD-1 の細胞外領域の変異分子の解析から、PD-1 による T細胞活性化の抑制には、PD-1 が TCR-MC と共局在して、抑制性マイクロクラスターを形成することが必須であることが分かった。

自然免疫シグナルの T細胞活性化の制御として、まず TLR を介する T細胞活性化制御を調べた。TCR 刺激と共に、TLR2,3,9 のリガンドで刺激すると T細胞に共刺激を誘導した。Th1 のようなエフェクター細胞では TCR 刺激がなく TLR2 リガンドのみで活性化されて IFN γ 産生が誘導された。しかし、核酸は、TLR 非依存的に T細胞を刺激して、NF- κ B, NFAT を活性化させた。自己 DNA でも LL37、ヒスト

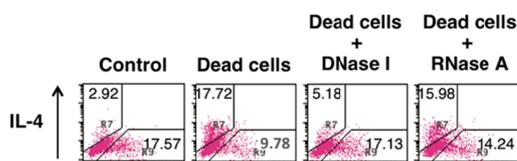


図3. 核酸による T細胞活性化は、Th2 分化を誘導する。死細胞由来の DNA によって Th2 への分化が促進された。

ンなどと複合体を作ると T細胞を活性化した。核酸刺激は T細胞の機能分化に影響し、Th2 への機能分化を誘導した。実際、死細胞由来の DNA が Th2 を誘導することから生体内で感染などに伴う死細胞由来 DNA で Th2 が誘導されることが判明した。

(3)細胞骨格による T細胞活性化制御

T細胞活性化には抗原提示細胞との強い接着が不可欠で、この接着は主にインテグリン LFA1 を介して行われる。LFA1 が高親和性接着をするためには、TCR からの inside-out シグナルと LFA1 からの outside-in シグナルの両者によって初めて可能となる。LFA-1 は、TCR-MC の周りに一過性に接着分子によるリング構造を作ることを見だし、マイクロシナプスと命名した。マイクロシナプスは、TCR-MC を中心に、LFA1, Paxillin, Pyk2 など接着分子群が取囲み、F-アクチンに支えられた構造であり、一過性に形成された。マイクロシナプス形成を阻害すると、TCR-MC 形成、増殖、IL-2 産生が抑制された。特に弱い刺激の時に、シナプス形成が長く、接着シグナルに依存してより

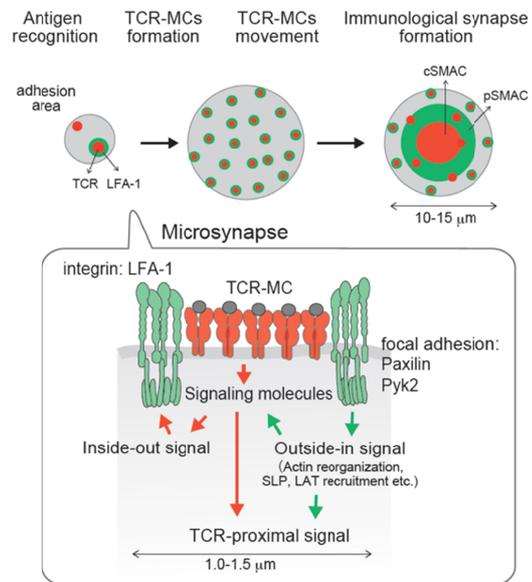


図4. ミクロシナプスの構造。TCR ミクロクラスターを LFA1, Paxillin, Pyk2 などの接着分子がリング状に取り囲みマイクロシナプスを作り、シナプス形成・T細胞活性化を促進する。

重要であり活性化を昂進させることが判明した。

(4)TCR-CD3 複合体の構造解析

無細胞系を用いて TCR-CD3 複合体の各々の鎖の合成を行い、TCR $\alpha\beta$, CD3 $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, $\zeta\zeta$ のダイマーの形成を行った。この内 CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\zeta$ は精製に成功した。特に CD3 $\zeta\zeta$ ダイマーに関しては、結晶化にも成功した。リボソームの形の CD3 $\zeta\zeta$ ダイマーを CD3 ζ 欠損 T細胞株に加えると、細胞表面 TCR-CD3 発現が誘導され、機能的な CD3 $\zeta\zeta$ ダイマーが形成されていることが示された。

(5)自己認識による T細胞活性化の制御

生体内で T細胞が常に樹状細胞との相互作用によって自己認識シグナルを誘導し、セミ活性化状態であることを解析した。自己認識に伴って TCR 下流のシグナル分子 Erk や S6 などのリン酸化、NFAT-1, 2 の活性化など、活性化シグナルが誘導されていた。Chip-Seq から、幾つかの転写因子が活性化されていることが判明した。T細胞は *in vivo* で常に樹状細胞との相互作用で自己認識に基づくシグナルを誘導して、キナーゼ、シグナル分子、転写因子の活性化状態にあり、このセミ活性化状態は抗原特異的な活性化に必要であり、これ

がないと T 細胞は低応答性(あるいはアナジ-状態)に陥ることが判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24 件)

Hashimoto-Tane A., Sakuma M., Ike H., Yokosuka T., Kimura Y., Ohara O and Saito T.: Micro-adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential for T cell activation. *J. Exp. Med.* 213(8): 1609-1625, 2016. 査読有
DOI: 10.1084/jem.20151088

Takeuchi A., Badr, M.E.S.G., Miyachi, K., Ishihara C., Onishi R., Guo Z., Sasaki, T., Ike H., Takumi, A., Tsuji N.M., Murakami, Y., Katakai, T., Kubo M. and Saito, T.: CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J. Exp. Med.*, 213(1): 123-138, 2016. 査読有
DOI: 10.1084/jem.20150519.

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

Imanishi T., Ishihara C., Badr Mel S., Hashimoto-Tane A., Kimura Y., Kawai T., Takeuchi O., Ishii K.J., Taniguchi S., Noda T., Hirano H., Brombacher F., Barber G.N., Akira S. and Saito T.: Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat. Commun.* 5:3566, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms4566.

Kong K.F., Fu G., Zhang Y., Yokosuka T., Casas J., Canonigo-Balancio A.J., Becart S., Kim G, Yates J.R. 3rd, Kronenberg M., Saito T., Gascoigne N.R. and Altman A.: Protein kinase C- η controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function. *Nat Immunol.* 15(5): 465-472, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/ni.2866.

Liang Y., Cucchetti M., Roncagalli R., Yokosuka T., Malzac A., Bertosio E., Imbert J., Nijman I.J., Suchanek M., Saito T., Wulfing C., Malissen B. and Malissen M.: The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 14(8): 858-866, 2013. 査読有
DOI: 10.1038/ni.2634.

Yokosuka T., Takamatsu M., Kobayashi-Imanishi W., Hashimoto-Tane A., Azuma M. and Saito T.: Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that

directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* 209(6): 1201-1217, 2012. 査読有
DOI: 10.1084/jem.20112741.

〔学会発表〕(計 118 件)

Saito T. Microsynapse composed of micro-adhesion ring surrounding TCR microcluster is essential for T cell activation. EMBO conference, Siena, Italy, September 5th, 2016.

Saito T. Microsynaps is an essential structure for T cell activation. FASEB Science Research Conference, Big Sky, Montana, USA, June 10th, 2015.

Saito T. Spacial regulation of T cell activation at Immune synapse. The Fourth Bizan Immunology Symposium (BISUT4), University of Tokushima, Tokushima, Japan, January 29th, 2015.

Saito T. Imaging of lymphocyte activation. The 37th Naito Conference, Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan, July 17th, 2014.

Saito T. Direct sensing of nucleotides by T cells induces Th2 differentiation. FASEB Science Research Conference, Snowmass, Colorado, USA, June 30th, 2014.

Saito T. Nucleic acids sensing by T cells induces co-stimulation to initiate Th2 cell differentiation. EMBO Conference, Lymphocyte Signaling, Bertinoro, Italy, May 20th, 2014.

Saito T. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation. 43rd Annual Scientific Meeting Australasian Society for Immunology (ASI ASM 2013), Wellington, New Zealand, December 2nd, 2013.

〔図書〕(計 1 件)

Saito T. Mechanisms of T-lymphocyte signaling and activation. In Section IV, *Fundamental Immunology, 7th ed.*, Paul, W.(ed) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 306-324, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 免疫細胞の制御技術
発明者: 齊藤 隆、今西 貴之
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2017-028244
出願年月日: 2017 年 2 月 17 日

国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：糖鎖認識受容体の新規用途
発明者：齋藤 隆、山崎 晶
権利者：同上
種類：特許
番号：米国特許番号:8440187,日本特許番号:5413915, 欧州出願番号:2009798008.0
取得年月日：2013年5月14日（米国） 2013年11月22日（日本）
国内外の別：国外、国内

〔その他〕

プレス発表(理化学研究所ホームページ)
「免疫を活性化させるマイクロシナプス構造を発見」(2016年6月27日)
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160627_1/

「悪性リンパ腫の増殖を阻止できる可能性を見いだす」(2015年1月30日)
http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150130_2/

「アレルギー反応を引き起こす新たな誘導因子を発見」(2014年4月10日)
http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140410_1/digest/

「炎症や自己免疫疾患に関わる遺伝子の機能を解明」(2013年6月11日)
http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130611_1/digest/

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 隆 (SAITO, Takashi)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター
研究者番号：50205655

(2)研究分担者

多根 彰子 (橋本 彰子)(TANE, Akiko)
(HASHIMOTO, Akiko)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員
研究者番号：10415226