

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：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19059013
 研究課題名（和文） 自己識別と活性化制御

研究課題名（英文） Self recognition and activation regulation

研究代表者

齊藤 隆 (SAITO TAKASHI)
 独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・グループディレクター
 研究者番号：50205655

研究成果の概要（和文）：

T細胞は抗原認識して TCR ミクロクラスター(MC)を形成して活性化する。自己ペプチドでは TCR-MC はできず、自己とアゴニストの mix でも、TCR-MC にはアゴニストだけが集積した。胸腺細胞では、自己を認識して TCR-MC が形成されるが、TCR シグナルの強い、負の選択ペプチドでのみ cSMAC も形成された。正 (CD28) と負 (CTLA4) の副刺激、細胞骨格による TCR-MC シグナルの時空間的制御を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

T cells are activated through forming TCR-microclusters (MC) upon antigen recognition. Self-peptides cannot induce TCR-MCs, and only the agonist peptides are accumulated into TCR-MCs when agonist and self-peptides are mixed. Thymocytes form TCR-MCs upon self-peptide recognition, and only the strong-stimulus of negative selecting peptides induces cSMAC formation. We clarified spatiotemporal regulation by positive (CD28) and negative (CTLA-4) costimulation and cytoskeletal regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	25,200,000	0	25,200,000
2008年度	25,200,000	0	25,200,000
2009年度	25,200,000	0	25,200,000
2010年度	15,000,000	0	15,000,000
2011年度	15,000,000	0	15,000,000
総計	105,600,000	0	105,600,000

研究分野：医歯薬学 研究費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自己抗原 自己認識、T細胞、活性化シグナル、獲得免疫、ミクロクラスター、planar bilayer、

1. 研究開始当初の背景

免疫系は自己認識の上に病原体を含む抗原と反応して免疫応答を起し、その調節の破綻は、自己の攻撃・自己免疫疾患に陥る。特に T細胞は、自己 MHC と共に抗原を認識するの

が原則であり、自己抗原ペプチドに対しても反応するため、その自己反応性を持ちつつ恒常性を維持してゆくために種々のメカニズムで制御されている。しかし、その調節系が破綻すると自己組織に反応して自己免疫疾

患を誘導することになる。T 細胞の活性化は TCR を介して抗原認識によって起こるが、自己成分の認識では通常活性化は起こらないが、ホメオスタティック増殖や、疾病などでは自己成分に対しても活性化が誘導される。T 細胞の活性化は、抗原認識に伴って TCR ミクロクラスターを形成し、そこを介して活性化シグナルが伝達されることが判明した。活性化シグナルの制御は、TCR ミクロクラスター (MC) との関係で再び新たに解析し直す必要がある段階になっている。特に自己認識に伴う活性化やトニックシグナルにおける MC との関連および必要なシグナル系は不明である。

2. 研究の目的

T 細胞が抗原認識とそれに伴って細胞活性化を誘導する際に、自己ペプチドの認識(自己反応性)がどのように影響するのか、自己認識はどのような T 細胞活性化状態をつくるのか、について調べることで、T 細胞が本来有する自己成分反応性が機能制御にどのように関与するかを解明する。そのために、T 細胞による抗原認識と活性化を担う TCR-MC の形成とそれを介した活性化シグナルを解析する。

3. 研究の方法

T 細胞の自己認識にともなう構造と機能変化を解析するために、分子感度の高い TCR-MC 形成とシグナルを解析した。そのため、種々の GFP 融合蛋白 (CD3 ζ , ZAP70, CD28, CTLA-4, PD-1, など) を発現させた AND-TCR Tg マウス由来 T 細胞を用い、GPI 型 MHC I-E^k または K^b に MCC ペプチドまたは OVA ペプチドを発現させた人工脂質膜 planar bilayer を作製して pseudo APC として用いた。ペプチド会合 MHC として、MCC または I-E^k 結合自己ペプチドをスパーサーで covalent に結合させた MHC を作製し、MCC 対自己ペプチドの量比を変えた MHCp を含む Planar membrane を作り解析した。

4. 研究成果

T 細胞の自己抗原認識と活性化について、活性化を担う TCR-MC の制御を、(1) 自己抗原認識の機能 (2) 副刺激シグナルと細胞骨格による制御、について解析した。

(1) TCR-MC 形成と自己認識：

T 細胞の抗原認識に伴う TCR-MC 形成は planar bilayer の系では、MC に含まれる抗原はほとんど全てがアゴニストである。T 細胞認識の Pseudo-dimer モデルでは、1 TCR はアゴニストペプチドを、隣の TCR は自己抗原を認識して、活性化を誘導する。TCR を 100 分子程含む TCR-MC は果たして、アゴニスト/MHC だけか、自己ペプチド/MHC を同様に含むのか、を解析するために、I-E^k に結合する MCC (Moth cytochrome c) と種々の自己抗原ペプチドをスパーサーで繋いだ MHC I-E^k を作製し、それを含む planar bilayer を用いて、AND-T 細胞の MC 形成を解析した。MCC-MHC と MHC だけ(内在性ペプチドのみを含む)の量比を変えても、MCC-MHC のみが TCR-MC を形成し、MHC だけは入り込まない。同様に、数種の I-E^k 結合自己ペプチド-MHC の量比を変えて、MCC-MHC の 1000 倍まで増やしても、MCC-MHC のみと会合する TCR がクラスターを作り、自己ペプチド-MHC はクラスターに関与していなかった。即ち高親和性ペプチドでは、自己ペプチドは、TCR-MC 形成には、ミックスされないことが判明した。

(2) T 細胞の抗原認識と活性化における自己成分認識の役割：T 細胞分化・機能解析に広く使われ、種々の変異ペプチド (altered peptide ligand) が知られている OVA ペプチド/OT-1 T 細胞を用いて、Planar bilayer で刺激・解析できる系を開発した。これを用いて、胸腺でポジティブ選択とネガティブ選択を誘導することが解っている種々の親和性の異なる OVA ペプチドによる胸腺細胞分化や活性化シグナルを解析した。ネガティブ選択を誘導する OVA ペプチドでの刺激では、TCR-MC が形成され、ZAP70 リン酸化や NFAT の核内移行など細胞内シグナル伝達が起こり、cSMAC が形成されたのに対して、ポジティブ選択を誘導する OVA ペプチドでは、MC はできるが、cSMAC は形成されなかった。cSMAC 形成はネガティブ選択を誘導する強い活性化でのみ誘導された。活性化シグナルの強度による cSMAC 形成は、ポジティブ・ネガティブ選択で、前者の強いシグナルによることを示した。この関係は、末梢 T 細胞でも同様で、親和性に寄らず TCR-MC は創られるが、強いペプチドでのみ cSMAC 形成が誘導された。胸腺分化と T 細胞活性化におけるペプチド親和性とシグナル制御の共通性が明らかになった。

(3) 副刺激による活性化制御: T細胞の活性化には副刺激シグナルが不可欠で、その主要受容体 CD28 を介した副刺激による、TCR-MC を介する活性化シグナルの時空間的な制御機構を解析した。CD28 は活性化に伴って TCR-MC と共存した後、cSMAC 領域に集積し、PKC θ と会合し CARMA1 もリクルートし、NF κ B を活性化させる副刺激を誘導する。一方、CD28 とリガンドが同じで、抑制性副刺激を誘導する CTLA-4 は、TCR ミクロクラスターではなく直接 cSMAC に集積して、CD28 とリガンド結合を競合して、CD28-PKC θ を排除して、活性化を抑制することが判明した。更に、もう一つの抑制性副刺激受容体 PD-1 による制御を解析し、PD-1 は CTLA-4 とは異なり、TCR-MC に共存し、SHP2 をリクルートして会合し、MC 内で TCR 上流シグナル分子を脱リン酸化して、T細胞の活性化を抑制することが判明した。

(4) 細胞骨格による活性化制御: TCR-MC は T細胞-樹状細胞間に形成され、その中心 cSMAC に集まり TCR は分解されて活性化を抑制するが、この動態の機構を解明した。活性化に伴って、初期はアクチンの逆流に沿った後、TCR 複合体とダイニンが会合して微小管を伝わり中心に移動する。強い抗原刺激の場合のみ会合が誘導され、cSMAC 形成に至り、細胞骨格制御による活性化制御が判明した。

(5) 生体内での自己反応性細胞の活性化制御の解析: 抗原特異的 T細胞が、生体内で樹状細胞 (DC) と相互作用して、自己ペプチドを認識することによって誘導される活性化状態とシグナル制御を解析した。in vivo で CD11c-toxin マウスを用いて、樹状細胞を除去すると、自己反応性と考えられる CD69+ 細胞が消失し、リン酸化が抑制され、活性化刺激に応答なくなる事から、恒常的な自己ペプチドとの相互作用により、准活性化状態になっていることが判明した。

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]

齊藤 隆 (計 46 件)

1. 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.* in press. 査読有

2. Kong K-F et al. (6 人中 5 番目): A motif in the V3 domain of the kinase PKC θ determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat. Immunol.* 12:1105-12, 2011. 査読有
3. Saito T.: Nanocluster formation: More with memory. *Immunity*, 35: 318-320 2011. 査読無
4. Kometani K, Yamada T, Sasaki Y, Yokosuka T, Saito T., Rajewsky K, Ishiai M, Hikida M, Kurosaki T.: CIN85 regulates the canonical NF- κ B pathway and subsequent B cell responses. *J. Exp. Med.* 208:1447-1457, 2011. 査読有
5. 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*, 34:919-931, 2011. 査読有
6. Atarashi K et al. (17 人中 9 番目): Induction of colonic regulatory T cells by indigenous clostridium species. *Science*, 331:337-341, 2011. 査読有
7. 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. 査読有
8. Ishikawa E et al. (5 人中 4 番目): Germ-line elimination of electric charge on pre-T-cell receptor (TCR) impairs autonomous signaling for beta-selection and TCR repertoire formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 19979-19984, 2010. 査読有
9. Yokosuka 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*, 33:326-339, 2010. 査読有
10. Hashimoto-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. *Mol. Cell. Biol.* 30:3421-3429, 2010. 査読有
 11. Saijo S et al. (21人中19番目): Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32: 681-691, 2010. 査読有
 12. Takeuchi A, Itoh Y, Takumi A, Ishihara C, Arase N, Yokosuka T, Koseki H, Yamasaki S, Takai Y, Miyoshi J, Ogasawara K, and Saito T.: CRTAM confers late-stage activation of CD8⁺ T cells to regulate retention within lymph node. *J. Immunol.* 183: 4220-4228, 2009. 査読有
 13. Yokosuka T and Saito T.: Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol. Rev.* 229: 27-40, 2009. 査読有
 14. Hara H and Saito T.: CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 30: 234-242, 2009. 査読有
 15. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, Tateno H, Uno J, Hirabayashi J, Mikami Y, Takeda K, Akira S, Saito T.: C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 10: 1897-1902, 2009. 査読有
 16. Hida S et al. (10人中9番目): Fc receptor γ -chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils. *Nat Immunol.* 10: 214-222, 2009. 査読有
 17. Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa, K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M, Saito T.: Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters through protein kinase C θ translocation. *Immunity.* 29: 589-601, 2008. 査読有
 18. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T.: Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat. Immunol.* 9: 1179-1188, 2008. 査読有
 19. Jensen KD, et al. (12人中8番目): Thymic selection determines $\gamma\delta$ T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon γ . *Immunity.* 29: 90-100, 2008. 査読有
 20. Ouchida R, et al. (15人中13番目): A lysosomal protein negatively regulate surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3 ζ -chain degradation. *Immunity.* 29: 33-43, 2008. 査読有
 21. Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S, Saito T.: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J. Immunol.* 178:6715-6719, 2007. 査読有
 22. Hara H, et al. (16人中16番目): The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 8: 619-629, 2007. 査読有
 23. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Kanagawa O, Cheng AM, Malissen B, Saito T.: LAT and NTAL mediate immunoglobulin E-induced sustained extracellular signal-regulated kinase activation critical for mast cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 27:4406-4415, 2007. 査読有
- 黒崎 知博(2007-2009)(計31件)
1. Hikida M, Casola S, Takahashi N, Kaji T, Takemori T, Rajewsky K, Kurosaki T.: PLC- γ 2 is essential for

formation and maintenance of memory B cells. *J. Exp. Med.* 206:681-9. 2009. 査読有

2. Yasuda T, Sanjo H, Pages G, Kawano Y, Karasuyama H, Pouyssegur J, Ogata M, Kurosaki T. Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity* 28:499-508, 2008. 査読有
3. Baba Y, Nishida K, Fujii Y, Hirano T, Hikida M, Kurosaki T.: Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol.* 9:81-8, 2008. 査読有
4. Aiba Y, Kameyama M, Yamazaki T, Tedder TF, Kurosaki T.: Regulation of B- cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 111:1497-1503, 2008. 査読有
5. Shinohara H, Maeda S, Watarai H, Kurosaki T.: I \cdot B kinase γ -induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1-Bcl10-MALT1 complex formation in B cells. *J Exp Med.* 204:3285-3293, 2007. 査読有

[学会発表] (計 124 件)

1. Yokosuka, T. and Saito, T. Negative regulation of TCR signaling by PD-1 microcluster. Keystone Symposia-Regulation of Lymphocyte Signaling. (Keystone, CO. USA. 3.15, 2012)
2. 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, 6.23, 2011)
3. Saito, T. Immune cell activation under the microscope. World Immune Regulation Meeting-V (WIRM) "Innate and Adaptive Immune Response and Role of Tissue in Immune Regulation" (Davos, Switzerland, 3.25, 2011)

4. Saito, T. Spatio-temporal regulation of T cell activation. 14th International Congress of Immunology(Kobe, 8.25, 2010)
5. Saito, T. Molecular dynamics for T cell activation and costimulation. Keystone Symposia, Lymphocyte Activation and Gene Expression (Breckenridge, CO., 3.3, 2010)
6. Saito, T. and Yamasaki, S. Sensing self and non-self danger by ITAM-coupled innate receptor Mincle. FASEB Summer Research Conferences—Signal Transduction in the Immune System (Snowmass Village, CO., 6.23, 2009)
7. Saito, T. Dynamic regulation of TCR- and costimulatory signals via microclusters. Cantoblanco Workshops on Biology-Initiation of Antigen Receptor Signaling. (Madrid, Spain, 10.22, 2008)
8. Saito, T. CRTAM regulates retention of T cells within lymph node and delivery to effector tissues. Keystone Symposia/ Novel Modulators of Leukocyte Traffic (Keystone, CO. USA, 1.16, 2008)
9. Saito, T. Dynamic regulation of T cell activation through TCR microclusters. 13th International Congress of Immunology(Rio de Janeiro, Brazil, 8.24, 2007)
10. Saito, T. TCR microclusters and co-stimulation for T cell activation. EMBO Conference Series on "Signaling in the immune system" Lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling (Siena, Italy, 5.26, 2007)

[図書] (計 1 件)

1. Yokosuka T and Saito T.: The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. In: *Chap. 5, Immunological Synapse, Curr. Top. Microbiol. Immunol. T. Saito and F. D. Batista* (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 340: 81-107, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況

斉藤 隆 (計3件)

1. 名称：T細胞分化調節剤（および細胞表面タンパク質間の細胞外領域における相互作用の検出システム）

発明者：斉藤隆、山崎晶

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2007-539809

出願年月日：2007. 3. 4.

国内外の別：国内、アメリカ、カナダ

2. 名称：糖鎖認識受容体の新規用途

発明者：斉藤隆、山崎晶

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2008-186570

出願年月日：2008. 7. 17.

国内外の別：国内、アメリカ、ヨーロッパ

3. 名称：糖鎖認識受容体の新規用途

発明者：斉藤隆、山崎晶

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2008-285948

出願年月日：2008. 11. 6.

国内外の別：国内

黒崎 知博(2007-1009) (計2件)

1. 名称：肥満細胞の脱顆粒抑制剤

発明者：黒崎知博、馬場義裕

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2007-273055

出願年月日：2007. 10. 19

国内外の別：国内

2. 名称：T細胞受容体機能調節剤及びそのスクリーニング方法

発明者：黒崎知博、篠原久明

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2009-053968

出願年月日：2009. 3. 6.

国内外の別：国内

〔その他〕ホームページ等

<http://www.rcai.riken.go.jp/group/signaling/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 隆 (SAITO TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・グループディレクター

研究者番号：50205655

(2) 研究分担者(2007-2009)

黒崎 知博 (KUROSAKI TOMOHIRO)

独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・グループディレクター

研究者番号：50178125

(3) 連携研究者

なし