

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2007～2011

課題番号：19109005

研究課題名(和文) T細胞の抗原認識と活性化の時空間制御の解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal regulation of antigen recognition and activation of T cells

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

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：獲得免疫、シグナル伝達、T細胞活性化、イメージング解析、抗原認識

1. 研究計画の概要

T細胞は抗原を認識して活性化され、免疫応答が始まる。T細胞活性化を誘導するのは免疫シナプスとは異なるマイクロクラスターであることを発見し、活性化制御機構の再検が必要になった。マイクロクラスターに含まれるシグナル分子群、Lipid raft や co-stimulation シグナルとの関係、抗原ペプチドの量と質による制御、などT細胞活性化のダイナミックな制御系を解明する。

2. 研究の進捗状況

(1) T細胞活性化のシグナル伝達の機構

既に TCR ミクロクラスター(MC)が、レセプター・キナーゼ・アダプターを含むシグナル複合体であることは解析済みであった。活性化シグナル伝達のために、下流シグナル経路の何処まで MC に局在するのか、を解析し、Lck, LAT, Itk, の他、NFAT/Ca 経路:PLC γ , NF κ B 経路:PKC θ , AKT 経路:PI3K, MAPK 経路:Grb2, Actin 経路:Vav, WASP, などがマイクロクラスターに局在した。一方、PIP 結合 PH-domain 分子や DAG-domain 分子などは膜にリクルートされても MC には局在しなかった。MC は、TCR 上流シグナル分子の蛋白相互のクラスターであり、2nd メッセンジャーによるシグナルは MC 内では誘導しないと思われた。

(2) 活性化調節分子による T細胞活性化制御

①Lipid raft による活性化制御

Lipid raft は細胞活性化の platform と考えられてきたが、TCR-MC が活性化の場であることが判明した状況で、両者の異同・関係を解析した。Lck, LAT の細胞内領域を欠失し raft 局在はする種々のラフトマーカーを用いて、TCR-MC 形成と共に解析し

た。どの raft マーカーもクラスターを全く作らなかった。Visible でない範囲であり得る TCR-MC と raft マーカーの相互作用を FRET で調べたが、ポジティブな FRET は検出されず、lipid raft は TCR 活性化に直接関与していないことが判明し、MC は蛋白相互作用でクラスターを形成していることが示唆された。

②副刺激による T細胞活性化制御

副刺激は、T細胞活性化の正負の方向や強度を調節しているもので、とりわけ TCR-MC による抗原認識シグナルの制御で重要である。中心的副刺激を導入すると、CD28 の動態を planar bilayer で解析すると、CD28 も TCR-MC に集まり、その後 cSMAC に集まることを判明した。CD28 と挙動を共にする分子として PKC θ を同定した。実際 CD28 は PKC θ と会合することを初めて示し、cSMAC にリクルートして、副刺激の維持を行う。この CD28-PKC θ は TCR が集まる cSMAC の外側でユニークな副刺激制御領域を作っている。

CD28 とリガンドを共有する負の副刺激受容体 CTLA-4 を解析すると、CTLA-4 も細胞表面に発現するとこの制御領域に集まり、CD28 とリガンド結合を競合して、PKC θ による活性化を抑制させていることが判明した。

制御性 T細胞だけは CTLA-4 を恒常的に発現し、この CTLA-4 は実際に CD28 と PKC θ がこの cSMAC 制御領域にリクルートするのを抑制していて、Treg の無反応を誘導していると考えられた。

即ち、cSMAC は TCR-MC の発見以来、TCR の取り込み、分解など抑制的に働く場と考えられたが、副刺激に関しては活性化の場

であることが判明した。cSMAC は TCRhi と TCRlo に分けられ、TCRhi は取り込みと分解を、TCRlo は副刺激を中心に活性化シグナルを伝達していると思われる。

3. 現在までの達成度

- ② おおむね順調に進展している。
TCR ミクロクラスターの発見に伴う T 細胞活性化の機構の歴史的な見直しを行うのが大きな研究目的であるが、T 細胞活性化の誘導と制御に関して、下流シグナル伝達機構、マイクロドメインとの相関、副刺激による制御、など解析が進み、論文発表についても両者が revision になっている。残りの目標としての、抗原ペプチドによる活性化制御、細胞間相互作用における解析も現在順調に進んでいる。

4. 今後の研究の推進方策

- (1) TCR シグナルが抗原ペプチドでポジティブとネガティブに変化することよく知られている、胸腺細胞の選択の系で、シグナルの強さと TCR-MC/cSMAC 形成の制御を解析する。
(2) TCR-MC が細胞の辺縁から中心に動くことが活性化制御に重要なので、どのように MC が中心に移動するのか、モーター分子を中心に解析する。
(3) CD3 ζ -GFP ノックイン T 細胞を用いて細胞間での TCR-MC, cSMAC の解析が可能な 3D 解析システムを確立し、生理的条件下でのシナプス解析を進める。

5. 代表的な研究成果

(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 29 件)

- (1.) Yokosuka, T. and Saito, T. : Costimulation signals mediated by CD28-microclusters. *Immunol. Rev.* 229: 27-40, 2009. (査読有)
- (2.) Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K and Saito T: Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat. Immunol.* 9: 1179-1188, 2008. (査読有)
- (3.) Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M and 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)

[学会発表] (計 85 件)

Saito, T. Dynamic regulation of T cell activation through TCR microclusters, 13th International Congress of Immunology, 8.21-25, 2007, Rio de Janeiro, Brazil,

[図書] (計 1 件)

Yokosuka T and Saito T.: The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. In: *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 (計 2 件)

名称: 糖鎖認識受容体の新規用途

発明者: 山崎晶、斎藤隆

権利者: (独) 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、国外

名称: 糖鎖認識受容体の新規用途

発明者: 山崎晶、斎藤隆

権利者: (独) 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

[その他]

- (1) 「理化学研究所、免疫応答の強弱を決定する分子メカニズムを解明」(日経プレスリリース, 2008.10.10.)
(2) 「(独) 理化学研究所科学講演会「一分子を追跡し免疫の謎を解き明かす」(2008. 2. 2.)
(3) 日本免疫学会「免疫ふしぎ未来」「なんでも認識できる免疫のしくみ」(東京, 2009. 5. 2-3.)
(4) 理研-エジンバラ大学計算・システム生物学合同ワークショップ「Spatiotemporal regulation of lymphocyte activation」(東京, 2009. 5. 14-15.)
(5) HP: <http://www.rcai.riken.jp/group/signaling/index.html>