

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07287

研究課題名（和文）T細胞皮質下アクチンの形成分子機構及びTCRシグナルにおける役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of T cell subcortical actin formation and its role in TCR signaling

研究代表者

Thumkeo Dean (Thumkeo, Dean)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：40372594

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではforminタンパクが免疫シナプスにおいて、アクチンの再編成を介してTCRシグナルに促進的に働くことを明らかにしてきた(Thumkeo et al., Science Advances, 2020). さらに、生理活性リン脂質LPAが抗原刺激依存的なformin分子mDia1の局在と活性化を阻害し、アクチン細胞骨格の構造に異常をきたすことを報告した(Kremer, Buser, Thumkeo et al., PNAS 2022). また、F-actinの超解像度ライブイメージングを行い、formin阻害剤に加えて、Arp2/3阻害剤を加えた時の構造変化についても観察を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はCD8 T細胞のTCRシグナル伝達にformin familyアクチン重合因子mDiaが重要であることを見出した。さらに、生理活性リン脂質LPAが抗原刺激依存的なmDiaの活性化と局在を阻害することを明らかにした。また、forminに加えて、Arp2/3 family重合因子も不可欠であるという所見を見出しており、これらの知見を統合させることにより、さらにTCRシグナル伝達の理解を深めることができると考えている。これまで、TCRシグナル伝達に関わる分子は免疫抑制剤など自己免疫疾患などの薬物の標的になっており、今後本研究で得られた知見の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：T cell-mediated immune responses are induced upon the recognition of non-self peptides presented by antigen-presenting cells through T cell receptors (TCR). It is known that T cells form a structure called immune synapse (IS) upon antigen stimulation. During this process, cytoskeleton actin undergoes large-scale reorganization. In this work, I have shown that the linear actin polymerizers, formin family proteins, promote TCR signaling through actin rearrangement in IS (Thumkeo et al., Science Advances, 2020). Moreover, in collaboration with the University of Colorado, we have further demonstrated that bioactive phospholipid LPA inhibited the localization and activation of the formin molecule mDia1 in antigen-stimulated T cells, resulting in abnormalities in the actin cytoskeleton structure. (Kremer, Buser, Thumkeo et al., PNAS 2022). Finally, we performed live imaging of F-actin using a super-resolution microscope and examined the effects of formins and Arp2/3 inhibitors.

研究分野：薬理学

キーワード：T細胞 アクチン formin

1. 研究開始当初の背景

T細胞は獲得免疫の中心を担う細胞である。これまでの研究により、T細胞の表面に存在するT細胞受容体(TCR)は抗原提示細胞によって提示されるMHC(Major Histocompatibility Complex)-抗原複合体を認識することにより活性化され、TCRシグナルを細胞内に伝搬することが知られている。免疫薬理学の分野においては、TCRシグナル伝達はシクロスポリンやタクロリムスなどの免疫抑制薬の標的であることが知られており、薬理的に極めて重要なシグナル伝達経路の一つである。そのため、TCRシグナルの分子メカニズム解析は新しい免疫抑制薬あるいは免疫反応を制御する薬の開発につながる可能性があり、学術的にも臨床応用的にも注目すべき研究領域の一つである。

TCRが抗原提示細胞によって提示されたMHC-抗原複合体に結合すると、TCR複合体の中に含まれているチロシンキナーゼLckが活性化されることが報告されている。活性化されたLckはさらにTCR複合体に動員された細胞質タンパクであるZap70をチロシンリン酸化し、リン酸化されたZap70はシグナルのハブである細胞膜一回貫通型タンパクLATをリン酸化することによって細胞内にTCRシグナルが伝搬される。TCR刺激によって細胞質タンパクであるZap70がどのようにして細胞膜の近辺にとどまり、細胞膜タンパクLATをリン酸化するのかという問題は多くの議論がなされているものの、不明であった。

一般的に、細胞骨格アクチンはアクチン重合因子formin familyタンパクとArp2/3が協調的に働き、その形成・維持に働くことが知られている。申請者は本研究開始時に、formin阻害剤を用いた急性処理実験により、抗原刺激はLckによるZap70のリン酸化を引き起こすと同時に、Zap70の細胞質への拡散を防ぐmDia1/3依存的なアクチン重合も誘導することを見出した(*Thumkeo et al., Science Advances, 2020*)。その結果、細胞膜直下でZap70とLATの相互作用が安定化され、LATが効率よくZap70によってリン酸化されることが明らかになった。

ところで、細胞の様々な機能発現には刺激依存的に形成される新しいアクチン細胞骨格のみならず、定常状態の細胞のアクチン細胞骨格、とくに細胞膜を裏打ちする皮質下アクチンも深く関わっていることもよく知られている。様々な細胞において、皮質下アクチン細胞骨格は細胞膜受容体や細胞接着分子などの細胞膜上の拡散を制限することにより、細胞内シグナル伝達や細胞間接着などの細胞機能に不可欠であることが報告されている。しかし、細胞種によってそれぞれの寄与度が大きく異なることも知られている。本研究開始当初、T細胞の皮質下アクチンについては、forminとArp2/3のそれぞれの寄与度は明らかではなかったため、本研究で取り組むことにした。

2. 研究の目的

本研究では、(1)T細胞の皮質下アクチンはどのような構築をしているのか?(2)T細胞の皮質下のアクチン繊維はどのような分子メカニズムによって形成・維持されているのか?(3)T細胞のformin依存性の皮質下のアクチン繊維とArp2/3依存性の皮質下アクチン繊維は抗原刺激依存的なT細胞受容体シグナル伝達に対して、機能的にどのように異なるのか?(4)リン脂質LPAの刺激がformin依存的なアクチン重合とTCRシグナル伝達にどのような影響を与えるのか?を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では 平常状態の T 細胞の皮質下アクチン繊維の構築の観察を行なうために、高解像

度 spinning disk confocal 蛍光顕微鏡を用いた。、formin 依存的皮質下アクチン繊維と Arp2/3 依存的皮質下アクチン繊維を同定するために、F-actin の高解像度 spinning disk confocal 蛍光イメージングと formin 及び Arp2/3 の阻害薬を用いた実験を組み合わせた。 TCR シグナルにおける formin 依存的皮質下のアクチン繊維と Arp2/3 依存的皮質下アクチン繊維の役割を Western Blot 法で検討した。コロラド大学との共同研究により、リン脂質 LPA の刺激が formin 依存的なアクチン重合と TCR シグナル伝達にどのような影響を与えるのかを検討するために T 細胞 抗原提示細胞の conjugation assay を行なった。

4 . 研究成果

本研究では CD8 T 細胞の皮質下アクチンの構築・分子制御メカニズムと役割を明らかにすることを旨とし、研究を行った。これまで得られた主な成果として、1) CD8 T 細胞に F-アクチンの蛍光プローブである EGFP-Lifeact を発現させ、TCR 刺激前後の細胞皮質下の構築を高解像度 spinning disk confocal 蛍光顕微鏡で観察した。その結果、TCR 刺激前の状態の CD8 T 細胞表面に数多くの microvilli が存在し、非常に早い dynamics で伸長と退縮を繰り返していることが分かった。2) TCR 刺激を行っていない CD8 T 細胞に formin 阻害剤の長期間処理は平均で約 3 割の皮質下アクチンが減弱し、microvilli の数も減少することを見出した。一方、Arp2/3 阻害剤の長期間処理は皮質下アクチンを平均で約 4 割減弱させることを見出した。3) CD8 T 細胞に formin 阻害剤の長期間処理により、formin 依存的な皮質下アクチンを阻害した場合に、急性処理の実験で得られた結果 (*Thumkeo et al.*, **Science Advances**, 2020) とは違い、TCR 刺激依存的な Zap70 のリン酸化も減弱することを明らかにした。そのため、TCR 刺激依存的に急速に重合されるアクチンに加えて、定常状態の皮質下アクチンも TCR シグナル伝達に寄与していることが明らかになった。4) ヒトおよびマウスの初代 CD8 T 細胞において、LPA が formin タンパクである mDia1 による細胞骨格制御の競合を介して、抗原特異的 CD8 T 細胞：標的細胞免疫シナプス (IS) 形成を妨害することを明らかにした。具体的には、抗原特異的 T 細胞：標的細胞の形成時に、TCR 刺激依存的な mDia1 と F-アクチンの IS 局在が LPA 刺激により、細胞質全体に無秩序に分布することを見出した (*Kremer, Buser, Thumkeo et al.*, **PNAS**, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Wongchang T, Pluangnooch P, Hongeng S, Wongkajornsilp A, Thumkeo D, Soontrapa K | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Inhibition of DYRK1B suppresses inflammation in allergic contact dermatitis model and Th1/Th17 immune response | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 7058 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-34211-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Siriwach R, Ngo AQ, Narumiya S, Thumkeo D | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 An optimized protocol to identify keratinocyte subpopulations in vitro by single-cell RNA sequencing analysis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 STAR Protocols | 6. 最初と最後の頁 101906 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101906 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Thumkeo D, Punyawatthanakool S, Prasongtanakij S, Matsuura R, Arima K, Nie H, Yamamoto R, Aoyama N, Hamaguchi H, Sugahara S, Takeda S, Charoensawan V, Tanaka A, Sakaguchi S, Narumiya S | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 PGE2-EP2/EP4 signaling elicits immunosuppression by driving the mregDC-Treg axis in inflammatory tumor microenvironment | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 110914 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110914 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kremer KN, Buser A, Thumkeo D, Narumiya S, Jacobelli J, Pelanda R, Torres RM | 4. 巻 119 |
| 2. 論文標題 LPA suppresses T cell function by altering the cytoskeleton and disrupting immune synapse formation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 PNAS | 6. 最初と最後の頁 e2118816119 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2118816119 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Siriwach R, Ngo AQ, Higuchi M, Arima K, Sakamoto S, Watanabe A, Narumiya S, Thumkeo D | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing identifies a migratory keratinocyte subpopulation expressing THBS1 in epidermal wound healing | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 104130 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104130 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Kundishora AJ, Peters S, Pinard A, Duran D, Panchagnula S, Barak T, Miyagishima DF, Dong W, Dunbar A, Smith H, Ocken J, Nelson-Williams C, Haider S, Walker RL, Li B, Zhao H, Thumkeo D, その他29名 | 4. 巻 未定 |
| 2. 論文標題 DIAPH1 mutations in sporadic moyamoya disease implicate impaired vascular cell actin remodeling in disease pathogenesis. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 JAMA Neurology | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaneurol.2021.1681 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Abe I, Terabayashi T, Hanada K, Kondo H, Teshima Y, Ishii Y, Miyoshi M, Kira S, Saito S, Tsuchimochi H, Shirai M, Yufu K, Arakane M, Daa T, Thumkeo D, Narumiya S, Takahashi N, Ishizaki T. | 4. 巻 117 |
| 2. 論文標題 Disruption of actin dynamics regulated by Rho effector mDia1 attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophic responses and exacerbates dysfunction. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cardiovascular Research | 6. 最初と最後の頁 1103-1117 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvaa206 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Thumkeo D, Narumiya S | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Opening the door to better aspirin | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Structure | 6. 最初と最後の頁 200-202 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2021.02.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Schneider R, Deutsch K, Hoeprich GJ, Marquez J, Hermle T, Braun DA, Seltzsa S, Kitzler TM, Mao Y, Buerger F, Majmudar AJ, Onuchic-Whitford AC, Kolvenbach CM, Schierbaum L, Schneider S, Halawi AA, Nakayama M, Mann N, Connaughton DM, Klambt V, Wagner M, Riedhammer KM, Renders L, Katsura Y, Thumkeo D, その他8名 | 4. 巻 107 |
| 2. 論文標題 DAAM2 variants cause nephrotic syndrome via actin dysregulation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 American Journal of Human Genetics | 6. 最初と最後の頁 1113-1128 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2020.11.008 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dean Thumkeo |
| 2. 発表標題 Open up the next generation pharmacology with scRNA-seq technology ~elucidation of the role of PGE2-EP2/4 pathway in cancer immunity as an example- |
| 3. 学会等名 The 24th Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology, Yokohama, Japan (Symposium) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dean Thumkeo, Siwakorn Punyawatthanakool, Shuh Narumiya |
| 2. 発表標題 Inhibition of PGE2-EP2/EP4 signaling elicits anti-tumor immunity through the suppression of mregDC-Treg axis in inflammatory tumor microenvironment |
| 3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会, 横浜、シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ryuma Matsuura, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya |
| 2. 発表標題 Activation of regulatory T cells through PGE2-EP4 signaling |
| 3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会, 横浜、口頭発表 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dean Thumkeo, Siwakorn Punyawatthanakool, Varodom Charoensawan, Shuh Narumiya |
| 2. 発表標題 Elucidation of the role of PGE2-EP2/4 pathway in cancer immunity utilizing scRNA-seq technology |
| 3. 学会等名 The Human Cell Atlas 2022 Asia meeting, Bangkok, Thailand, Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松浦 竜真、Thumkeo Dean、成宮 周 |
| 2. 発表標題 制御性T細胞に対するプロスタグランジンE2 の作用および分子制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Thumkeo Dean, 成宮 周 |
| 2. 発表標題 PGE2-EP2/EP4 signaling mediates immunosuppression in tumor microenvironment through the facilitation of mregDC-Treg axis |
| 3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Anh Quynh Ngo, Ratklao Siriwach, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya |
| 2. 発表標題 Single cell RNA sequencing identifies a novel LPA-induced THBS1-positive keratinocyte subpopulation that is involved in wound healing |
| 3. 学会等名 第138回日本薬理学会近畿支部会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Makio Higuchi, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya |
| 2. 発表標題 New compounds for atopic dermatitis promote selective AHR-induced Filaggrin transcription in NHEK cells |
| 3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿支部会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dean Thumkeo |
| 2. 発表標題 Molecular mechanism of the formin proteins, mDia1/3, in TCR signaling |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|---------|--|--|
| 米国 | コロラド大学 | | |