

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590591

研究課題名(和文) 抗原受容体による刺激強度翻訳のメカニズム

研究課題名(英文) The microsynapse is an essential structure for T cell activation

## 研究代表者

多根 彰子(橋本彰子)(Hashimoto-Tane, Akiko)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：10415226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではT細胞抗原受容体が刺激強度を翻訳する仕組みに、T細胞受容体(TCR)活性化の最小単位であるTCRマイクロクラスターの形状や動態からアプローチした。プロテオーム解析や蛍光イメージング実験から、活性化直後のアクチンを伴うTCRマイクロクラスターは、接着分子の輪に囲まれ、小さな免疫シナプス様構造“マイクロシナプス”を形成する事を発見した。マイクロシナプスは(1)一時的に形成され(2)刺激が弱い時には遅く形成個数が増え(3)接着分子インテグリンやミオシンII活性を必要とし(4) SLP76などシグナル分子を留める作用があり、TCRマイクロクラスターの機能発揮に重要な構造であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to reveal the mechanism for translation of TCR stimulation strength through quantitative imaging analysis of TCR microcluster (TCR-MC), which is a minimum assemble to start T cell activation. We performed proteome analysis and fluorescent imaging, and found that each TCR-MC was transiently bordered by a ring of focal adhesion molecules during the initial stage of T cell activation. The ring structure, which we named the microsynapse, is composed of LFA-1 and focal adhesion molecules such as paxillin, Pyk2 and the core structure of the TCR-MC. The microsynapse is supported by integrin outside-in signals, F-actin and myosin II activity. Perturbation of the microsynapse induced impairment of TCR-MC formation, reduced SLP76 recruitment, and resulted in impaired cellular signaling and function in vitro and in vivo. Thus, the microsynapse supports weak TCR response through integrin outside-in signals and is a critical structure for T cell activation.

研究分野：免疫

キーワード：T細胞 免疫シナプス T細胞受容体 受容体クラスター インテグリン ミオシン 蛍光イメージング  
全反射顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

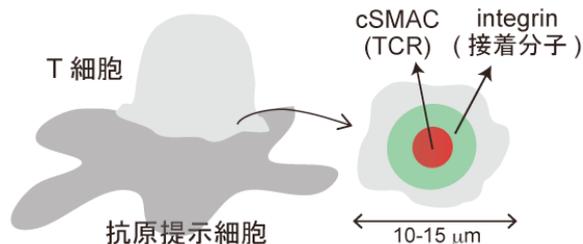
免疫とは体内の異物、侵入物、細菌やウイルスを認識して排除し、身体を外敵から守るシステムである。免疫システムは大きく分けて、即効性の高い自然免疫と異物特異性の高い獲得免疫から成る。特に獲得免疫による特異的な免疫記憶は高度なシステムであり、ワクチンの作用に見られるように、2度目以降の侵入異物の速やか且つ穏やかな排除を可能にする。しかし一方で、制御を失い異物を誤認識するとアレルギーや自己免疫反応を引き起こすことから、免疫疾患の予防や治療の観点からも、獲得免疫の制御機構は解明されるべき課題である。獲得免疫を担う主な細胞はT細胞とB細胞であり、それらが持つ受容体に結合し細胞を活性化する異物を抗原と言う。一般的に、抗原の量や受容体との親和性によって細胞の活性化、サイトカイン放出、増殖が調節され、結果的に惹起される免疫反応の規模が調節されるが、その仕組みは複雑で不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、獲得免疫を担うT細胞が、抗原の強さを認識する仕組みを明らかにすることを目的とした。

T細胞の活性化は、樹状細胞など抗原提示細胞に接着し、提示された抗原を認識することによって開始する。T細胞抗原受容体(TCR)はTCRマイクロクラスターと呼ばれる小さな集合体を接着面に複数作り、サイトカイン放出や増殖に繋がる活性化シグナルを送る。TCRマイクロクラスターはやがて接着面中心に集まり

図1, 免疫シナプス

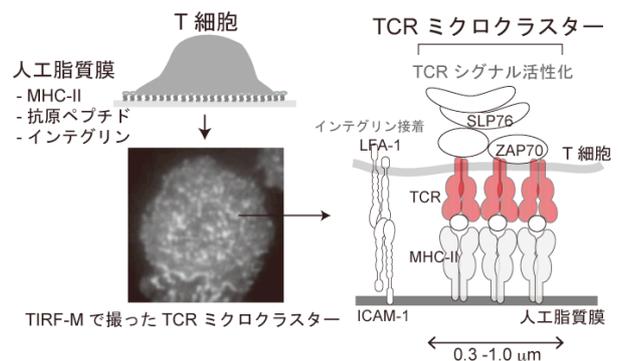


## cSMAC (central supramolecular activation

cluster)を形成し、細胞内に取り込まれ活性を終了する。cSMACの周りには同心円状に接着分子が配置し、免疫シナプスと呼ばれる構造が形成される (図1)。

TCRマイクロクラスターの挙動は抗原提示細胞を模した人工脂質膜を用いた蛍光イメージングの実験系を用いて明らかにされた (*Nature Immunology* (6) p1253-62, 2005)。研究開始時、TCRマイクロクラスター形成によりリン酸化やカルシウム濃度上昇などが始まる事、辺縁部で順次形成される新しいTCRマイクロクラスターから持続的な活性化シグナルが作り出されている事、TCRマイクロクラスターの移動はモーター分子・ダイニンに依存しており、移動も細胞活性化の強弱を制御する仕組みである事 (*Immunity* (34) p919-31, 2011)、が明らかにされていた (図2)。

図2, TCR (T細胞受容体) マイクロクラスター



TCRマイクロクラスター動態の発見は、抗原受容体シグナルの動的制御という新しい概念を提供すると同時に、多くの疑問を投げかけるものであった。特に、刺激に応じてリン酸化されシグナルを伝えるキナーゼ・ZAP70とアダプター分子・SLP76は、TCRマイクロクラスターに集合し同様のクラスターとして動的制御を受けていたが、その挙動は分子によって少しずつ異なり、受容体下流のシグナル分子についても動態の観点から解析する必要が生じた。また、TCRマイクロクラスターの動態が

ダイニンに依存することは示されたが、両者を結ぶ分子機構は全く不明であった。

そこで本研究では、TCRミクロクラスター、シグナル分子のクラスター、本研究で同定するTCRミクロクラスターとダイニンを結ぶ分子について、抗原刺激条件に依存した変化を定量解析することにより、抗原刺激の強弱を伝える仕組みの解明に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

#### 【TCR ミクロクラスターの定量】

本研究では人工脂質膜による抗原提示の実験系を用いて抗原の濃度、親和性を変化させ、TCR ミクロクラスターを定量的に解析した。具体的には、AND(TCR)トランスジェニックマウス由来 T 細胞の TCR を蛍光付き抗体 H57(Fab)-Dy549 で染めて可視化し、AND(TCR)と反応する主要組織適合抗原分子 MHC-II である I-Ek、AND(TCR)の抗原である MCC ペプチド、および接着分子インテグリンである ICAM-1 を含む脂質膜を敷いたガラスに乗せ、接着面で形成される TCR ミクロクラスターの様子を全反射蛍光顕微鏡 (TIRF-M) で観察した。得られた動画データから、TCR ミクロクラスター数、TCR ミクロクラスターサイズ(輝度)、TCR ミクロクラスター寿命などを専用のソフトウェア(IMARIS)を用いて測定した。

抗原の濃度、親和性は、抗原ペプチドの濃度変化や親和性の低いペプチドである MCC(K99A)や、MCC に対する親和性が低い TCR を持つ 5c.c7(TCR)トランスジェニックマウス由来 T 細胞を使用することによって変化させた。

#### 【会合したシグナル分子の定量】

TCR ミクロクラスターに会合する主なキナーゼである ZAP70 や、ZAP70 の下流であるアダプター分子 SLP76 は GFP タグを付けて T 細胞に発現し、同様に TIRF-M を用いて蛍光定量解析を行った。

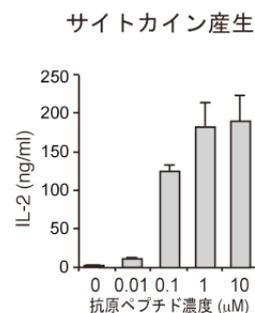
#### 【新規関連分子の同定】

ダイニンは TCR 特異的に働く分子ではないため、TCR 刺激時特異的にダイニンと結合する分子を解析した。GFP ラベルしたダイニン軽鎖を発現した T 細胞株を作成し、抗原提示細胞による活性化前後の細胞溶解液について GFP の免疫沈降を行い、2 次元電気泳動で解析し、共沈殿量に差があったスポットについてマスマスペクトルを用いて同定を行った。同定した分子は GFP タグを付けて T 細胞に発現し、同様に TIRF-M を用いて蛍光定量解析を行った。

### 4. 研究成果

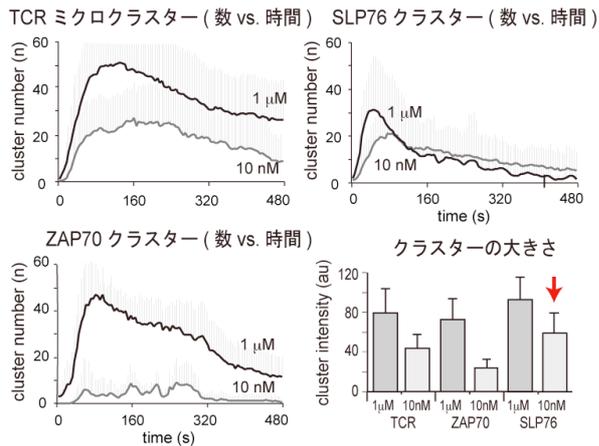
【抗原濃度の検討】 T 細胞活性化開始点と考えられる TCR ミクロクラスターについて、細胞応答との相関を見るために細胞活性化の指標であるサイトカイン産生量を測った。ガラスに本研究で使用するリポソームを再構成して T 細胞を刺激し、24 時間後の IL-2 を測定した(図 3)。この結果から、サイトカインを十分に産生する抗原濃度として 1  $\mu$ M、有意に産生される最低の濃度として 10 nM 抗原を用いて、クラスター定量等を進めることにした。

図 3, 抗原濃度依存性



【クラスター定量の定量】 TCR、ZAP70 および SLP76 のクラスターについて定量解析を行った所、高い抗原濃度(1 $\mu$ M)の場合、TCR ミクロクラスターと ZAP70 クラスター同様の速度で形成され移動するが、SLP76 クラスターは活性化初期に一過的に現れ、TCR ミクロクラスターが cSMAC に到達する頃には観察されず、少なくとも TIRF-M で検出できる細胞膜近くには存在しない事が明らかにな

図 4, 抗原濃度依存性 (シグナル分子)



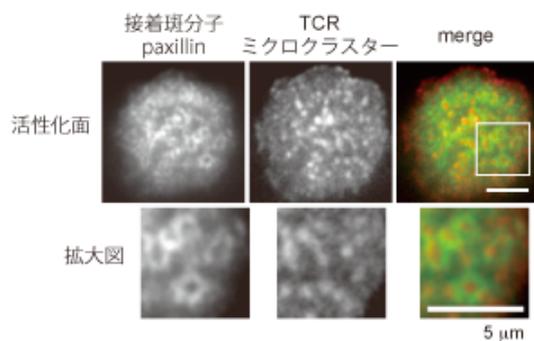
った。また、TCR ミクロクラスターと ZAP70 のクラスターは抗原量の低下(10nM) によって数が減り輝度も下がった。特に ZAP70 クラスターの輝度の減少は TCR ミクロクラスターの輝度の減少よりも著しく、シグナルの弱さを示していると考えられた。一方、ZAP70 の下流であるはずの SLP76 クラスターは抗原量の低下によってあまり数が減らず輝度も下がらなかった (図 4)。親和性の低い MCC(K99A)抗原や、5c.c7(TCR) T 細胞を使用した場合にも、ZAP70 クラスターが著しく小さくなったが SLP76 クラスターは変化しなかった。これらの結果は予想外であり疑問を生じたが、以下の解析から原因と意義を明らかにすることが出来た。

【新規関連分子の同定】 TCR 刺激特異的にダイニンと結合する分子として、アクチン、アクチンキャッピングプロテイン(CapZ)、Arp2/3 複合体など複数のアクチン重合関連分子が同定された。CapZ、Arp3 と Arp2/3 複合体形成を促す WASP に GFP タグを付けて T 細胞に発現し、人工脂質膜上で蛍光定量解析を行った所、SLP76 同様に、高い抗原量時にはクラスターが一過的に形成され、抗原量を下げてもクラスター数が減らず輝度も下がらない結果を得た。

【マイクロシナプスの発見】 SLP76 とアクチン関連分子のクラスター形成は、TCR シグナルではなく接着分子インテグリンからのシグナルが関わっていることが報告されていた。

そこで、接着分子インテグリン、接着斑分子 paxillin や接着斑キナーゼ Pyk2 を調べた所、SLP76 とアクチン関連分子が TCR ミクロクラスターと共局在するクラスターを形成する時に、そのクラスターを囲うリング状に局在することが明らかになった。TCR クラスターを接着分子が囲うという構造があたかも小さな免疫シナプスのようであったので、我々はこれを「マイクロシナプス」を呼ぶことにした(図 5)。

図 5, ミクロシナプス



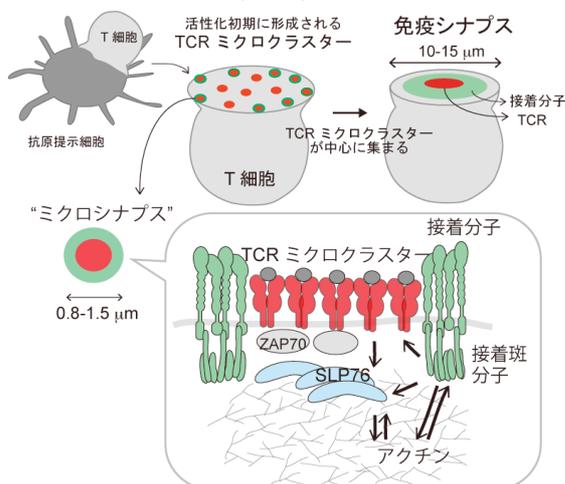
【マイクロシナプスの性質】 ミクロシナプスの形成は SLP76 やアクチンと同様に一過的であり、インテグリンが外部のリガンドと結合した時に送られる outside-in signal を絶対的に必要とした。Arp2/3 インヒビターCK666 やアクチン重合阻害薬 CytochalasinD、の添加によって paxillin や Pyk2 のリングが消失したことから、インテグリン活性によって形成されるアクチンフィラメントを必要とすることが示された。シグナル分子を調べると興味深いことに、CytochalasinD 添加後に SLP76 クラスターは消失したが TCR ミクロクラスターや ZAP70 クラスターは存在し続けた。この結果は、SLP76 クラスターにアクチンフィラメント依存性があることを示しており、抗原濃度が低い場合に観察された SLP76 クラスターが接着によるアクチンフィラメントに助けられていた事を示唆した。更にはアクチンモーター分子ミオシン II の 阻害薬である Blebbistatin の添加によってもマイクロシナプスが消失したことから、ミオシン II の活性も

必要とすることが解った。これらの形状や性状は、樹状細胞、がん細胞、破骨細胞などに見られる浸潤突起ポドソームに類似点多く形成の過程に共通点があると考えられる。

【マイクロシナプスの必要性】マイクロシナプスの意義を検証するため、リング部分の構成成分である paxillin と Pyk2 の発現タンパク量を RNA 干渉で著しく低下させた。paxillin と Pyk2 が不足した状態では、マイクロシナプス形成が阻害され、細胞接着が変化し、TCR ミクロクラスターが小さくなり、SLP76 クラスタが小さく少なくなり、弱い TCR 刺激に反応できなくなった。結果として安定した免疫シナプスが形成されず、サイトカイン産生量が減少し、in vitro および in vivo で細胞増殖が阻害された。従って、活性化初期に一過的に形成されるマイクロシナプスは、TCR ミクロクラスター成長を促し、特に弱い刺激に補助的に働いた(図 6)。

【まとめ】T 細胞活性化の程度は抗原の量や親和性に従うが、単純な比例関係には無かった。特に弱い抗原刺激の際には接着分子インテグリンによるバイアス作用が働き、その実態は TCR クラスタが接着分子で囲まれた小さな免疫シナプスのような構造体マイクロシナプスであることが解った。マイクロシナプスの形成は一過的であるが、活性化開始の重要な時期のシグナルクラスタの成長に欠かせない重要な構造体であった。

図 6, ミクロシナプス (図解)



## 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 2 件)

- ① Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T.

Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation.

Nat Commun. 5: 3566, 2014,

doi:10.1038/ncomms4566 査読あり

- ② Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi, 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,

doi: 10.1084/jem.20112741, 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① Hashimoto-Tane, A., Sakuma, M., Yokosuka, T., Saito, T.

“Microsynapse” composed of focal adhesion molecules surrounding TCR microcluster is essential for T cell activation,

2015 Keystone Symposia Conference

D3: T Cells: Regulation and Effector Function

3.30, 2015 「SnowBird resort, (Utah・USA)」

- ② 多根-橋本 彰子、横須賀忠、斉藤隆

T細胞活性化開始点であるT細胞受容体ミクロクラスターを支える構造体マイクロシナプスの解析

88回日本薬理学会年会 3.19, 2015

「名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)」

③ Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Saito, T.  
“Microsynapse” structure supporting TCR  
microclusters augments T cell activation,  
第43回日本免疫学会 2014年12月11日  
「京都国際会館 (京都府・京都市)」

④ Yokosuka, T., Hashimoto-Tane, A., Saito, T.  
Subcellular imaging of the E3 ubiquitin  
ligases, c-Cbl and Cbl-b, to control T cell  
activation signals through ubiquitin  
clustering at TCR microclusters,  
第43回日本免疫学会 2014年12月11日  
「京都国際会館 (京都府・京都市)」

⑤ Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Saito, T.  
Arp2/3 complex-mediated actin-nucleation  
supports T cell receptor microcluster,  
第42回日本免疫学会 2013年12月12日  
「幕張メッセ (千葉県・千葉市)」

⑥ Yokosuka, T., Hashimoto-Tane, A., Saito, T.  
Distinct signalosome formation by two Ras-GEFs  
to activate the Ras-MAPK pathway in T cell  
signaling,  
第42回日本免疫学会 2013年12月12日  
「幕張メッセ (千葉県・千葉市)」

⑦ Yokosuka, T., Hashimoto-Tane, A., Saito, T.  
Negative costimulatory microclusters inhibiting  
T cell-mediated inflammation,  
JST-CREST International Symposium “Frontiers  
in Immunology and Inflammation: from  
Molecules to Disease” 2013年2月11-12日  
「一橋記念講堂 (東京都・千代田区)」

⑧ Hashimoto-Tane, A., Sakuma, M., Yokosuka,  
T., Saito, T.  
Regulation of T cell receptor signaling by  
cytoskeletal dynamics,  
The 5th Biennale RIKEN Joint Retreat “Behavior

– from Molecules, Cells to Organisms –“ 2013  
年2月4-5日

「ヤマハリゾートつま恋 (静岡県・掛川市)」

⑨ Saito, T., Yokosuka, T., Hashimoto-Tane, A.  
Dynamic and cytoskeletal regulation of T cell  
activation,  
Michigan-RCAI Joint Workshop  
1.16-17, 2013 「Detroit, (Michigan・USA)」

⑩ 多根(橋本)彰子  
The movement of T cell receptor signaling  
molecules,  
実験研究者のための数理生物学サマーレク  
チャーコース第1回 2012年7月9-12日  
「理化学研究所 (神戸市・兵庫県)」

〔図書〕 (計 2件)

① 多根(橋本)彰子、齊藤 隆  
羊土社「感染・炎症・免疫」  
2012, Vol.42(2), pp67-70

② 多根(橋本)彰子  
科学評論社「臨床免疫・アレルギー科」  
2013, vol.59(5).pp636-641

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 隆 (SAITO, Takashi)  
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