

## T細胞の抗原認識と活性化の時空間制御の解析

Spatiotemporal regulation of antigen recognition and activation of T cells

齊藤 隆 (SAITO TAKASHI)

(独) 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ミ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。ミ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。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：細胞

### 1. 研究開始当初の背景

免疫応答はT細胞が抗原提示細胞上の抗原/MHCを認識して活性化することから始まる。この活性化の調節が免疫病の制御に重要である。T細胞の活性化はT細胞-APC間に形成される免疫シナプスによると考えられてきたが、我々は、より早期に創られる小さな構造「ミクロクラスター」(MC)によることを明らかにした。T細胞活性化のユニットとしてのミクロクラスターによる活性化がどのように制御されているのか、これまでの理解の全てをreviseする必要が出てきた。

### 2. 研究の目的

T細胞の抗原認識と活性化におけるミクロクラスターと関与するシグナル・制御分子との相互制御系を明らかにする。そのため、ミクロクラスターを形成する分子群を同定し、制御するco-stimulationや脂質raftとの関係、を明らかにし、シグナル伝達系の可視化のシステム樹立も目指す。

### 3. 研究の方法

免疫シナプスを解像度よく解析するために、APCとしてMHC, ICAM1-GPIを持つplanar bilayerのシステムを用い、一分子観察系の可能な全反射顕微鏡を用いて、イメージング解析する。抗原特異的正常T細胞に種々のシグナル分子GFP融合分子を導入して、その動態と相互関係を解析する。

### 4. これまでの成果

(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る。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:PLCg, NFkB経路:PKCq, AKT経路:PI3K, MAPK経路:Grb2, Actin経路:Vav, WASP, などがミ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 [2-1]Lipid 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を用いて、TCR-MC形成と共に解析した。どのraftマーカ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ず、MCは蛋白相互作用でクラスターを形成していること

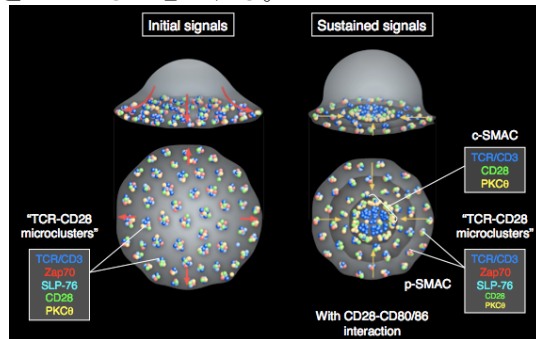
が示唆された。

#### [2-2] 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の、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 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 に集まることが判明した。CD28 と挙動を共にする分子として PKC $\zeta$  を同定し、実際 CD28 は PKC $\zeta$  と会合し cSMAC にリクルートして、副刺激の維持を行う。この CD28-PKC $\zeta$  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。

実際、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 $\zeta$  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 $\zeta$  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 TCR $_{hi}$  と TCR $_{lo}$  に分けられ、TCR $_{hi}$  は取り込みと分解を、TCR $_{lo}$  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) T 細胞の抗原認識様式の解析

TCR-MC の抗原ペプチドによる活性化・制御を知るため、ペプチドの量的な変化、と自己ペプチドを含む質的な違いによる制御を解析した。自己と外来由来の単一ペプチド・MHC を I-Ek の系で作製し、アゴニストと自己ペプチドの量比を変えて T 細胞と反応させたが、アゴニストは自己ペプチドを大量に加えても、TCR-MC 形成に変化なく、アゴニストの MC は自己ペプチドを排除した。CD4+T 細胞では自己ペプチドの関与は顕著でないとわれ、CD8+T 細胞/MHC クラス I のシステムで進めている。

#### 5. 今後の計画

- (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 $\zeta$ -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。

#### 6. これまでの発表論文等

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.
2. Yokosuka T and Saito T: Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol. Rev.* 229(1): 27-40, 2009.
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  $\theta$  translocation. *Immunity.* 29(4): 589-601, 2008.
4. 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(10): 1179-1188, 2008.
5. Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, Inui M, Takai T, Shibuya A, Saijo S, Iwakura Y, Ohno N, Koseki H, Yoshida H, Penninger JM and Saito T: The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 8(6): 619-629, 2007.

ホームページ等

<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/signaling/>