

免疫応答を抑える新たな分子メカニズムを解明

—補助刺激受容体 PD-1 がマイクロクラスターを形成することを発見—

本研究成果のポイント

- PD-1 ミクロクラスターがT細胞の過剰な活性化を直接制御
- PD-1 ミクロクラスターが、シグナル伝達分子群を直接脱リン酸化
- 免疫抑制メカニズムに基づいた新たな免疫治療や創薬の可能性に期待

1. 背景

免疫応答は、ウイルスや花粉などの抗原が体内へ侵入したことを察知し、生体を防御するための仕組みです。T 細胞は、これらの抗原を感知して活性化し、増殖、細胞傷害活性、情報伝達物質の産生などを行い、特に長期的な免疫応答を制御しています。抗原が侵入すると、T 細胞は抗原を取り込んだ抗原提示細胞^{*3}と接着し、その接着面に「免疫シナプス^{*4}」を形成することで、抗原の情報を受け取ります。研究グループはこれまでに、免疫シナプスの中に、T 細胞受容体を核としたさまざまなシグナル伝達分子から成る集合体「マイクロクラスター」を発見、これが T 細胞の抗原認識に重要であることを明らかにしてきました(以下参考)。

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2005/051107/index.html>

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2008/081010/index.html>

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2010/100924/index.html>

近年、負の補助刺激受容体^{*1} PD-1^{*2} が、より広範に T 細胞の活性化を抑制する分子として注目されています。PD-1 の遺伝子を欠損したマウスが、ループス腎炎や関節炎、拡張型心筋症などの全身性自己免疫疾患により死亡することから、PD-1 は長期的な T 細胞の活性化抑制に重要であると考えられています。慢性 C 型肝炎やエイズウイルス感染などの慢性炎症の際に出現する消耗 T 細胞^{*6}も PD-1 を高発現しており、PD-1 のリガンド^{*7}への結合を阻止することで消耗 T 細胞の機能が回復することから、PD-1 の中和抗体も臨床応用されつつあります。また、PD-1 は、加齢に伴う T 細胞免疫応答性の低下を示す「免疫老化」のマーカー分子であることも示されました。しかし、臨床的有用性が先行しているのに対し、PD-1 を介する T 細胞抑制メカニズムの解明は進んでいません。これまでは、マウスによる個体レベルでの解析や細胞を用いた生化学的解析が中心で、分子レベルの解析は行われていませんでした。そこで共同研究グループは、PD-1 が T 細胞の活性化をどのように抑制するか、分子レベルの解析に挑みました。

2. 研究手法と成果

T 細胞での PD-1 分子のリアルタイムな動きを、分子イメージング^{*5}技術を用いて解析するため、まず、T 細胞受容体のリガンドである主要組織適合抗原複合体と PD-1 のリガンドである PD-L1 をガラス平面上の人工脂質二重膜に載せた、疑似的な抗原提示細胞膜「プレイナーメンブレン」を開発しました(図 2)。次に、このプレイナーメンブレン上に T 細胞を置き、T 細胞とプレイナーメンブレンとの接着面で起きる現象を、緑色蛍光タンパク質などを付加させた PD-1 を指標にし、全反射蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察しました。

観察の結果、T 細胞がプレイナーメンブレンに接着すると直ちに、T 細胞受容体はマイクロクラスターとして集まり、集まった T 細胞受容体マイクロクラスターは数分のうちに免疫シナプスの中心に移動、凝集しました。同時に、PD-1 もマイクロクラスターを形成し、免疫シナプスの中心に移動し、凝集しました(図 3)。また、PD-1 はマイクロクラスターを

形成する際、数十秒という短時間で、SHP2 という脱リン酸化酵素^{*8} をマイクロクラスターに呼び込み会合すること(図 4)、この SHP2 が、マイクロクラスターに集まるシグナル伝達分子を、直接脱リン酸化して、T 細胞受容体からの活性化シグナルを抑制することが分かりました。

さらに、活性化シグナルを失った T 細胞は、免疫シナプスを保持できず、プレイナーメンブレン上を無作為に動き回り始め、その結果、T 細胞の活性化が中断されることが分かりました。慢性炎症が続くと体内に現れる消耗 T 細胞も、PD-1 を高発現しています。この消耗 T 細胞も PD-1 のマイクロクラスターを作ること、PD-1 のリガンドへの結合を阻害すると、PD-1 のマイクロクラスターは消失し、消耗 T 細胞の機能が回復することも分かりました。

これまで、PD-1 も CTLA-4 も、T 細胞の活性化を抑制する負の補助刺激受容体であることは知られていましたが、先行研究と今回の成果により初めて両者の T 細胞活性化抑制メカニズムの違いを明らかにすることができました(図 5)。

以上から、T 細胞の活性化だけでなく、T 細胞を抑制するマイクロクラスターがあることが分かりました。本研究は、T 細胞活性化を調節する分子の挙動を観察することで、免疫応答の亢進と抑制の新たな分子メカニズムを解明したものといたします。

3. 今後の期待

今回、PD-1 マイクロクラスターの存在を明らかにし、その抑制のメカニズムが分かりました。CTLA-4 をはじめ負の補助刺激受容体はいくつか存在しますが、それぞれが異なった調節機構を持ち、多方面から T 細胞の過剰な活性化を効率良く制御していることが示唆されます。

現在、慢性 C 型肝炎やエイズウイルス感染を排除する、また、がん患者での免疫系を活性化するために、抗 PD-1 抗体や抗 PD-1 リガンド抗体が臨床応用され始めており、同様に臨床応用されている抗 CTLA-4 抗体よりも効果が顕著であると報告されています。しかし、免疫系の全身的な活性化による二次的な自己免疫疾患の発症など、阻害抗体使用による副作用も危惧されています。今回の成果は、PD-1 の動態を制御するなど新しい観点からの創薬とともに、より選択的な免疫抑制剤や免疫活性剤の開発への可能性を示しており、安全で効果的な免疫治療の進歩につながると期待できます。

掲載論文

Tadashi Yokosuka, Masako Takamatsu, Wakana Kobayashi-Imanishi, Akiko Hashimoto-Tane, Miyuki Azuma, and Takashi Saito. "Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2".

Journal of Experimental Medicine 2012.doi:10.1084/jem.20112741

<補足説明>

※1 補助刺激受容体

T 細胞は、T 細胞受容体からの刺激で活性化するが、それ単独の刺激だけでは、T 細胞は細胞死や不応答を起こす。T 細胞には、T 細胞受容体以外にさまざまな補助刺激受容体が発現しており、T 細胞受容体からのシグナルと協力し、T 細胞の活性化、分化、増殖を調節している。補助刺激受容体には、T 細胞の活性化に対し正の働きをするものと、負の働きをするものが知られている。

※2 PD-1 (Programmed Cell Death-1)

細胞死誘導時に発現が増強されるタンパク質として、1992 年に京都大学本庶佑研究室にて単離同定された。I 型膜タンパク、免疫グロブリンスーパーファミリー分子の 1 つ。活性化した T 細胞、B 細胞、マクロファージに発現しており、リガンドには PD-1 ligand 1 (PD-L1) と PD-L2 との 2 つが知られている。

※3 抗原提示細胞

外から侵入した病原体や体内で生じた死細胞などを貪食し、抗原として自らの細胞表面上に提示する能力を持つ免疫細胞を示す。マクロファージや樹状細胞など抗原提示細胞は、外来抗原によって自らも活性化（自然免疫）とともに、T 細胞や B 細胞を活性化し、より特異的で高度な免疫応答（獲得免疫）を誘導する。

※4 免疫シナプス

T 細胞と抗原提示細胞とが接着した際、その接着面に構築される、細胞表面の受容体と接着分子、細胞内シグナル伝達分子からなる同心円状の構造を示す。直径約 10 μ m で、中心部を Central-supramolecular activating cluster (c-SMAC)、接着分子からなる周辺部を Peripheral-SMAC (p-SMAC) と呼ぶ。神経細胞のシナプスに似ていることから「免疫シナプス」と名付けられた。B 細胞やナチュラルキラー細胞など、細胞間相互作用を行う免疫細胞の接着面に広く見られる(図 1 参照)。

※5 分子イメージング

蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡で細胞内や生体内の分子を可視化する技術。着目している分子と蛍光タンパク質との融合タンパク質を細胞内で発現させたり、蛍光物質で標識した抗体を用いたりするため、細胞内外の分子の動きを、細胞が生きのまま観察することも可能。蛍光タンパク質は緑色蛍光タンパク GFP (Green Fluorescence Protein) が基本になるが、複数の色を組み合わせ多数の分子の同時観察もできる。

※6 消耗 T 細胞

長期的な感染やがんを体内に持っている状態のように抗原刺激が慢性的に及んだ場合、本来反応すべき外来抗原に対して無反応になった T 細胞を示す。消耗 T 細胞は PD-1 を高発現しており、PD-1 のリガンドへの結合を阻害すると、T 細胞の反応性が回復することが知られている。

※7 リガンド

受容体(レセプター)と結合し、受容体から細胞質や核にある次の分子への情報伝達を担う分子。

※8 脱リン酸化酵素

リン酸化されたチロシン残基、スレオニン残基、セリン残基などからリン酸基を外す酵素。リン酸基を取り除くことは、シグナルの遮断を意味する。

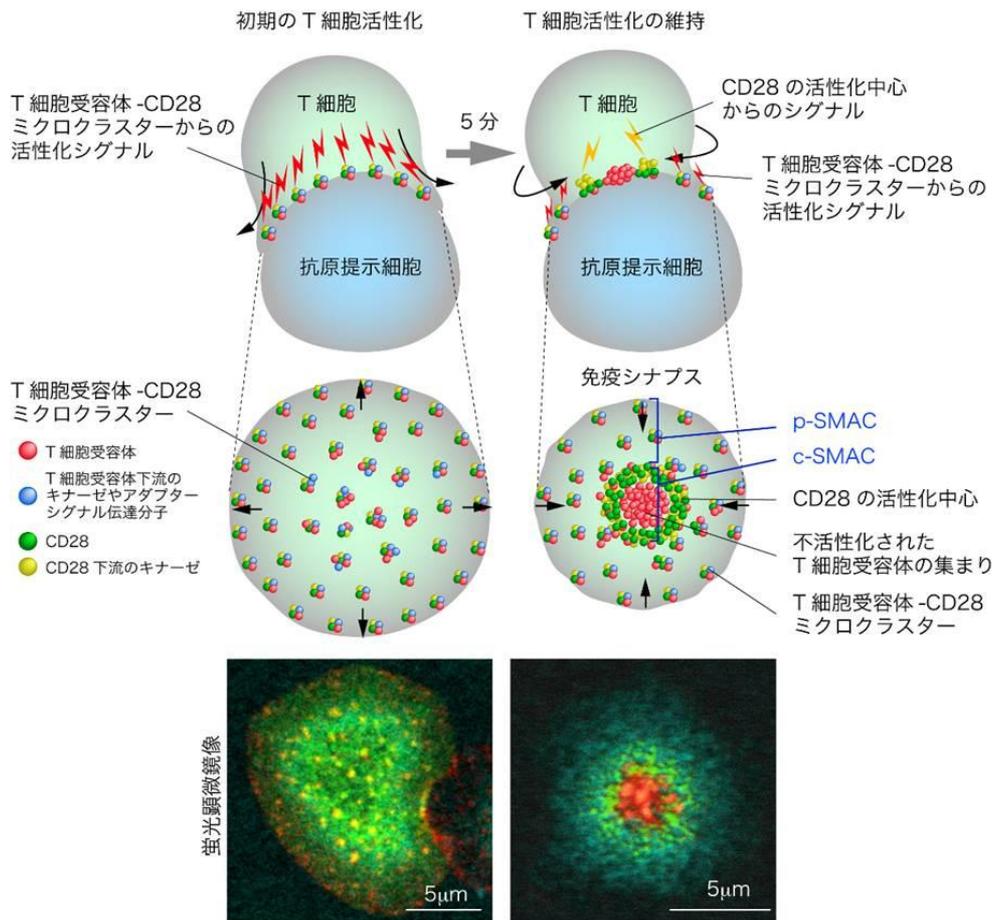


図 1 免疫シナプスの構造とマイクロクラスター

左上:

T 細胞が抗原提示細胞に接着すると、T 細胞受容体が抗原提示細胞上の抗原と結合し、T 細胞受容体を核とするシグナル伝達分子の集合体「マイクロクラスター」が形成される。このマイクロクラスターには、T 細胞受容体下流のシグナル伝達分子が会合し、T 細胞活性化シグナルを伝える活性化ドメインとして T 細胞の初期の活性化を引き起こす。正の補助刺激受容体 CD28 は、CD28 のリガンドと結合することでマイクロクラスターに集まり、CD28 の下流に特異的な別のキナーゼを介してより強力なシグナルを伝える。

右上:

初期の接着から 5 分が経過すると、T 細胞受容体は接着面の中央部に移動、T 細胞受容体下流のシグナル伝達分子は解離し、活性を失う。CD28 は T 細胞受容体の周囲に輪状構造を構築し、CD28 下流のキナーゼを留まらせることにより、T 細胞受容体シグナルとは別の活性化シグナルを伝える。また、接着面の周縁部では新たなマイクロクラスターが繰り返し形成され、T 細胞受容体からのシグナルを伝え続ける。T 細胞受容体と CD28 からなる接着面の中心を Central-supramolecular activating cluster (c-SMAC)、接着分子からなる周辺部を Peripheral-SMAC (p-SMAC) といい、この同心円状構造を免疫シナプスと呼ぶ。

下:

プレイナーメンブレンにのせた T 細胞の蛍光顕微鏡像を示す。T 細胞受容体(赤)、(水色)、CD28 下流で働くキナーゼ(緑)。

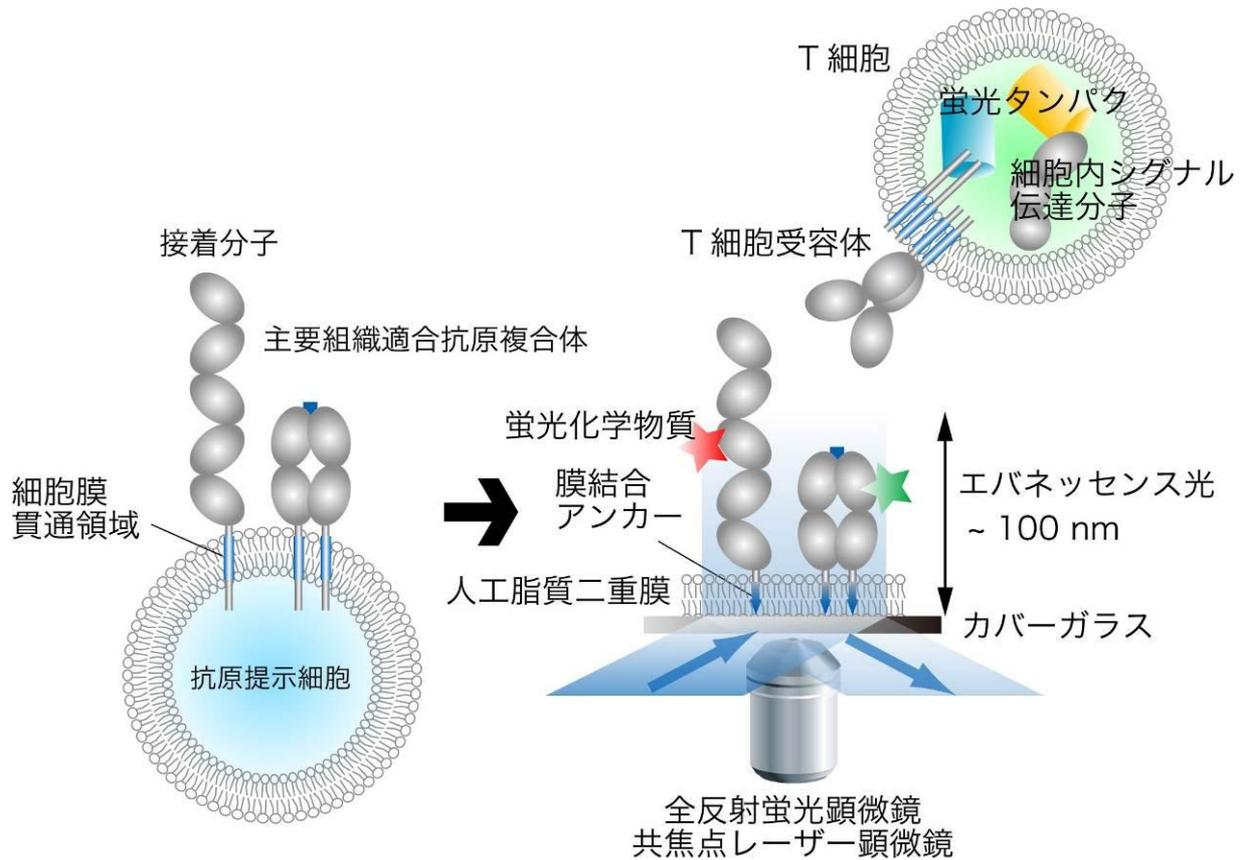


図2 プレイナーメンブレン法による T 細胞受容体および細胞内分子の観察方法

実際の細胞は丸く、また細胞膜には複雑な凸凹がある。プレイナーメンブレン法では、抗原提示細胞に発現している主要組織適合抗原複合体や接着分子などの細胞表面分子に膜結合アンカー配列を付加し、カバーガラス上に作製した平らな人工脂質二重膜に導入する。この抗原提示細胞の細胞膜を疑似したプレイナーメンブレン上に T 細胞を落下させ、蛍光顕微鏡で細胞内外の分子の挙動を観察する。観察したい分子は、蛍光で標識された抗体で染色したり、直接蛍光物質を付加したりする。全反射蛍光顕微鏡はレーザーの入射角を大きくして微妙に漏れ混むエバネッセンス光を利用するため、カバーガラスから 100nm といった細胞膜近傍の分子の観察が可能であり、また、このような弱い光を用いてバックグラウンドを下げることで、1 分子レベルでの解析を可能にしている。また、共焦点レーザー顕微鏡では、細胞表面から細胞内部までの分子の挙動を、幅広い波長の蛍光を用いて観察することができる。

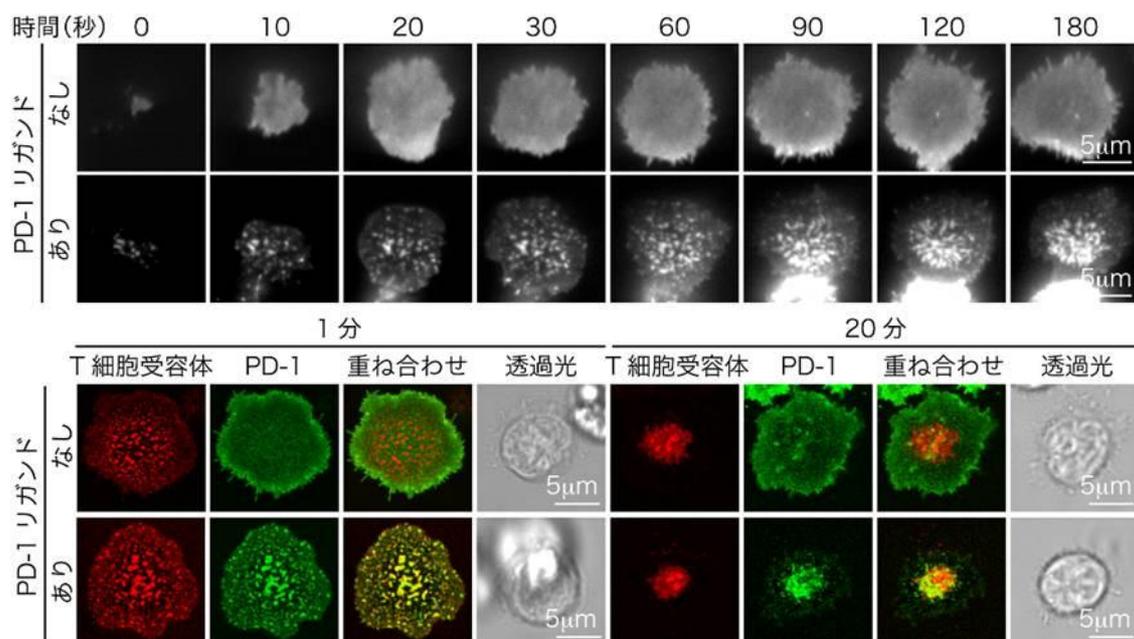


図3 T細胞受容体とPD-1 ミクロクラスターの蛍光顕微鏡観察

上:

蛍光タンパク質を付加したPD-1をT細胞に遺伝子導入後、プレイナーメンブレン上に落下させ、全反射蛍光顕微鏡を用いてリアルタイム観察を行った。PD-1はリガンドがあるとクラスターを形成し、数分以内に中央部(c-SMAC)に集まった。

下:

共焦点レーザー顕微鏡を用いた、T細胞のT細胞受容体(赤)とPD-1(緑)のリアルタイム観察結果。T細胞とプレイナーメンブレンとの接着1分後、T細胞受容体とPD-1のミクロクラスターは同じ場所に形成される(黄)。20分後、T細胞受容体もPD-1も接着面の中央に集まり、c-SMACを形成する。

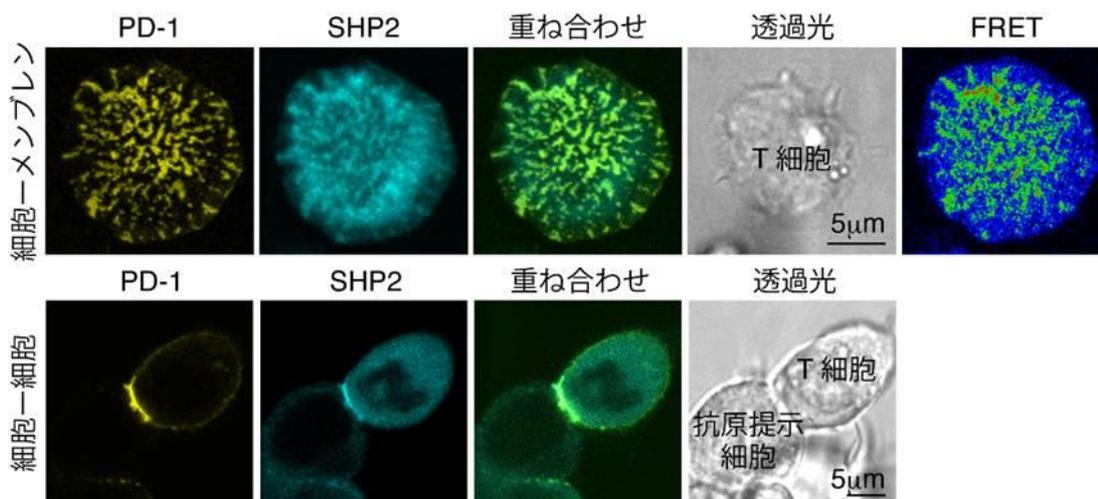


図 4 PD-1 ミクロクラスターに集まる SHP2

上:

蛍光タンパク質を付加した PD-1(黄)と SHP2(水色)を T 細胞に導入後、プレイナーメンブレン上に落下させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてリアルタイム観察を行った。PD-1 と SHP2 のミクロクラスターが同じ部位に存在するのが観察され、蛍光共鳴エネルギー移動※(FRET: Fluorescence resonance energy transfer)においても、SHP2 と PD-1 の会合が示された。

下:

同 T 細胞を抗原提示細胞と接着させ、2 つの細胞の間に集まる PD-1(黄)と SHP2(水色)を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

※蛍光共鳴エネルギー移動(FRET: Fluorescence resonance energy transfer)

近接した 2 個の色素分子の間で、励起エネルギーが電子の共鳴により直接移動する現象。一方の分子(供与体)に吸収された光のエネルギーによって、他方の分子(受容体)にエネルギーが移動し、受容体から蛍光が放射される。2 つの分子の数 nm 以内の接近を意味する。

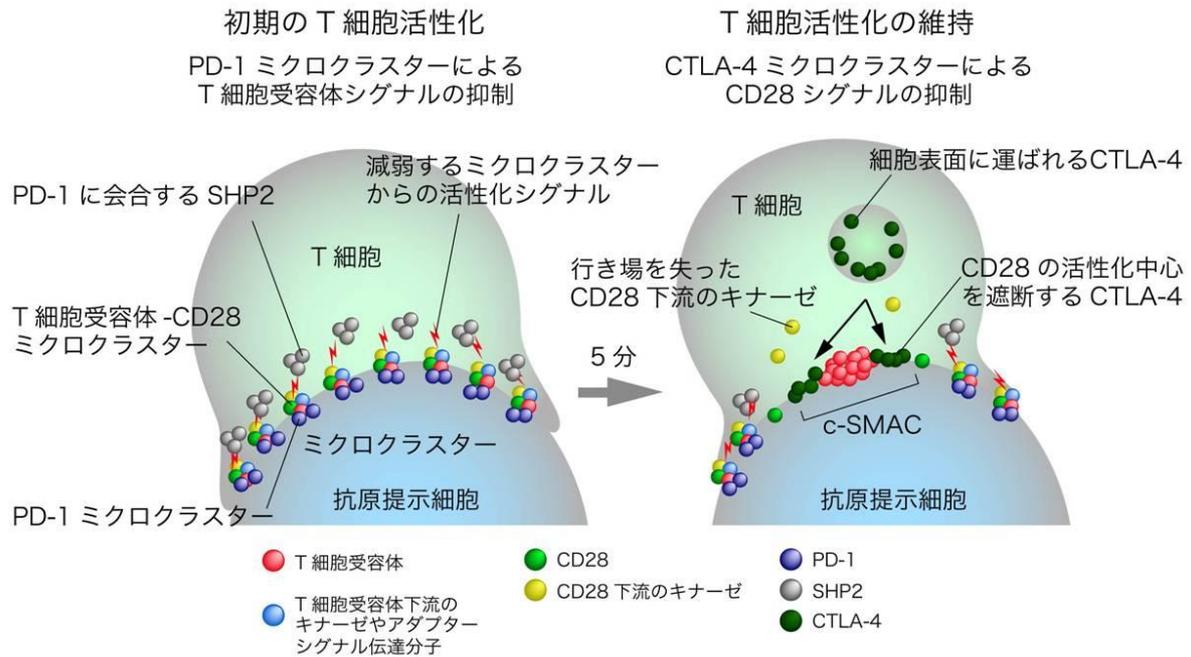


図 5 PD-1 と CTLA-4 ミクロクラスターによる T 細胞活性化抑制

左:

正常な初期の T 細胞活性化は、T 細胞と抗原提示細胞との接着面に形成される T 細胞受容体-CD28 のミクロクラスターにより引き起こされ、主にキナーゼやアダプターなどのシグナル伝達分子が働いている。PD-1 はリガンドと結合することで T 細胞受容体とミクロクラスターを形成し、そこに集まるキナーゼにより PD-1 自身がリン酸化を受け、SHP2 をミクロクラスターに呼び寄せる。次に SHP2 は、T 細胞受容体-CD28 ミクロクラスターに集まるシグナル伝達分子を脱リン酸化し、ミクロクラスターからの活性化シグナルを減弱、つまり最初の活性化反応に対する負の制御を行う。

右:

T 細胞の活性化の維持は、主に c-SMAC に形成される CD28 とその下流のキナーゼからなる活性化中心によって行われる。CTLA-4 は CD28 からリガンドを奪い取ることで、CD28 の活性化中心を破壊し、CD28 シグナルによる T 細胞活性化を抑制する。

PD-1、CTLA-4 の 2 つの負の補助刺激受容体は、時間的、空間的に別の方法で、異なる活性化シグナルを抑え、二重に T 細胞の活性化を制御する。