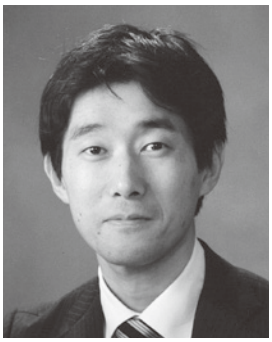
東医大誌　**74**(1)：3-13, 2016

特 別 講 演



分子イメージングが拓く免疫細胞の時空間的制御機構
――T 細胞シグナルユニット「TCR マイクロクラスター」の発見――

Imaging unveils spatiotemporal regulation of lymphocyte activation
—— Discovery of the T cell signaling units "TCR microclusters" ——

横須賀　　忠
Tadashi YOKOSUKA

東京医科大学免疫学分野
Department of Immunology, Tokyo Medical University, School of Medicine

【要旨】　免疫系は、多種多様な細胞が複雑にコミュニケーションを取りながら、体の隅々まで網羅している高次機能系であり、自己と非自己、病原体と非病原体を識別し、体の恒常性を維持している。中でも T 細胞は免疫系の中枢として働き、自己免疫疾患やアレルギー発症の抑制、移植片の拒絶やがんの認識と排除など、臨床的にも非常に重要な機能を担っている。T 細胞は抗原を認識する際、たった 1 種類の受容体＝T 細胞受容を介して行い、細胞増殖、機能分化、細胞死など、さまざまな応答をする。ゆえにマルチタスク受容体と称され、その多様な抗原認識機構と生理機能を解明するため、生化学的解析や結晶構造解析などあらゆる方面からの研究がなされてきた。一方、近年のイメージング技術の進歩と共に、生化学や生理学の統合的理解によって、T 細胞の活性化には「免疫シナプス」という T 細胞と抗原提示細胞との接着面にできるシグナル伝達の "場" が重要であることが分かってきた。さらにわれわれは、免疫シナプスが、20〜30 個の T 細胞受容体とその下流のシグナル伝達分子の集合体「マイクロクラスター」によって構築されていること、マイクロクラスターは T 細胞活性化のシグナルユニットとして T 細胞の抗原認識と活性化を担っていることを明らかにした。また、活性型や抑制性の補助刺激受容体や、フォスファターゼ（脱リン酸化酵素）、ユビキチンなどのタンパク分解制御分子など、正と負のさまざまなシグナル伝達分子がマイクロクラスターを形成し、時間的空間的に T 細胞の活性化を制御していることを解明した。マイクロクラスターは、B 細胞や NK 細胞、NKT 細胞など抗原認識受容体を持つ免疫細胞に共通した概念として、免疫細胞のシグナル伝達研究における世界基準となっている。

2015 年 11 月 7 日　第 176 回東京医科大学医学会総会における特別講演
キーワード：T 細胞受容体、細胞内シグナル伝達、分子イメージング、免疫シナプス、免疫チェックポイント
（別冊請求先：〒 260-8402　東京都新宿区新宿 6-1-1　東京医科大学免疫学分野）
E-mail：yokosuka@tokyo-med.ac.jp

はじめに

免疫系は、神経系や内分泌系と同じ高次機能系として知られ、さまざまな細胞が複雑なネットワークを構築しながら一つの生体系を作り上げている。その中で、自己と非自己、病原体と非病原体を識別し、外界からの侵入を防ぐことで、体の内部環境を維持している。免疫学が敬遠される理由の一つは、あまりに多くの細胞種が登場し、臓器の違いや感染の有無など、つまり置かれている外部環境によって別の細胞に分化する点や、身体中の随所に移動し、コミュニケーションをとりながらもダイナミックに変化し続けることであろう。その中でT細胞は、さまざまな細胞を制御する司令塔として働く。そのためT細胞の機能異常は、自己免疫疾患やアレルギー、臓器移植後の拒絶反応、がんに対する免疫監視の破綻などの臨床症状として直接現れる。T細胞応答自身も、細胞増殖、エフェクターサブセットへの機能分化、不応答や細胞死など多様であるが、T細胞が抗原＋主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex ; MHC）を認識するための受容体は、たった1種類＝T細胞受容体（T cell receptor ; TCR）しかない。ゆえに、TCRはマルチタスク受容体といわれ、その機能の差がどこから生まれるのか、生化学的なシグナル伝達研究や抗原認識の結晶構造解析など、あらゆる方面からの研究がなされてきた。

TCRシグナルはやはり、サイトカイン受容体などのそれとは比較にならないほど複雑である。下流のシグナル伝達分子だけでも100種類以上あり、それだけたくさんの分子が集まると、シグナル伝達の制御効率を上げるための何らかの基盤が必要になってくる。1990年代に、それらシグナル伝達分子が集まる“場”として不飽和脂肪酸がリッチな膜マイクロドメイン「リピッドラフト」が概念化された。1998年には、顕微鏡技術の進歩と共に、「免疫シナプス」と呼ばれる免疫細胞同士が作るシナプス類似構造が明らかとなった。われわれはさらに、免疫シナプスがもっと小さな活性化ドメイン「TCRマイクロクラスター」で構成され、これがシグナル伝達の最小ユニットとしてT細胞の活性化を調節していることを明らかにした。本稿では、普段見慣れているシグナル伝達のカスケードマップも、“場”の概念を加えることで生理的意義を持ち、より単純化できること、また疾患のメカニズム解明や治療法開発のヒントに繋がることを概説したい。

1. T細胞活性化の“場”＝免疫シナプス

T細胞が他の免疫細胞とコミュニケーションをとるには、① サイトカインによる遠隔操作、② 細胞－細胞の直接の接着、の2つの方法があり、特に、抗原提示細胞が提示している抗原＋MHCの情報を伝達するには、② 接着が重要である。既にTCRとMHCとの結合が明らかになった30年前、T細胞－抗原提示細胞間には機能的にニューロンのシナプスに似た構造が必要である、とその存在が予想されていたが、1998年、共焦点レーザー顕微鏡の観察によって「免疫シナプス」として実証された[1)2)]（図1）。免疫シナプスは、細胞表面にある受容体とそのリガンド、接着分子、細胞内シグナル伝達分子などが同心円状に配列した直径10～20 μmの二次元構造である。中心部より、① TCRの凝集＝central-supramolecular activation cluster（c-SMAC）、② 中心の

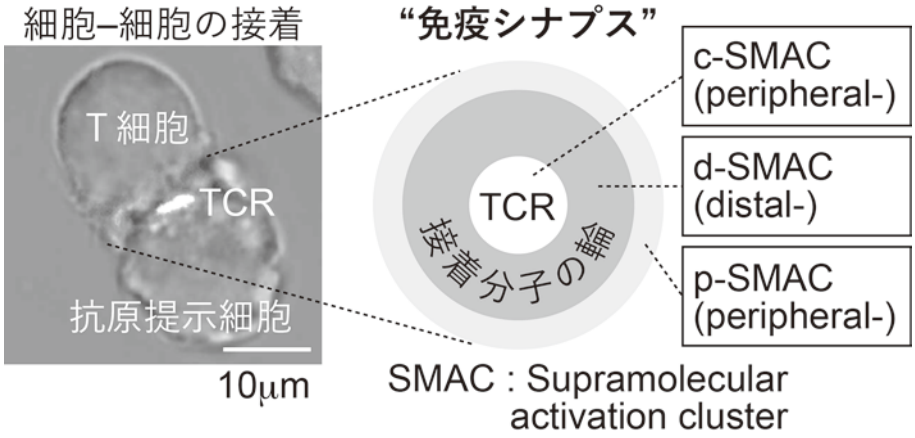


図1　免疫シナプスの構造

TCR を取り巻く接着分子の輪＝peripheral-SMAC（p-SMAC）、③ 細胞外領域が大きいためシナプス外周へ排除された分子の集まり＝ distal-SMAC（d-SMAC）の三重構造を呈している[3]。T 細胞の活性化と、この同心円の構築がパラレルに起こることから、免疫シナプス、特に ① c-SMAC は TCR シグナルの “場” であり、T 細胞活性化に必須な構造であると考えられた。しかし、免疫シナプスができるまでには T 細胞と抗原提示細胞との接着後 5 分を要するのに対し、チロシンリン酸化やカルシウム流入といったシグナル伝達は既に接着後 1 分以内に始まるため、より早い段階での何らかの変化を見つける必要があった。

2.　T 細胞活性化ユニット「TCR マイクロクラスター」

免疫シナプスができる前の、より早期で微細な構造を観察するため、われわれは、抗原提示が可能な人工脂質二重膜を平面的に作る方法（プレイナーメンブレン法）と全反射蛍光顕微鏡との融合システムを構築した。免疫シナプスができる T 細胞と抗原提示細胞との接着面は凹凸が強く、顕微鏡観察には適していない。その凹凸をなくすため、抗原提示細胞をプレイナーメンブレンに代えた（図 2）。この方法では、ガラス平面上に人工脂質二重膜を作成し、抗原提示細胞が発現している MHC や接着分子をリガンドとして混ぜ込む。この膜を抗原提示細胞に見立て、その上に T 細胞を落下させると、T 細胞はメンブレンに接着し、T 細胞表面＝平面で起きている現象を詳細に観察できる。あらかじめ観たい分子を抗体で染色したり、緑色蛍光タンパク（Green fluorescent protein ; GFP）を付けたキメラ分子を遺伝子導入したりすることで、標的分子の観察が可能になる。通常の蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡での観察の他に、エバネセント光（全反射するまで入射角を大きくし、漏れ出た弱い光で蛍光を観察する）を用いた全反射蛍光顕微鏡[4] では、細胞膜から 200〜300 nm の距離の（細胞膜で起きている現象として考えることができる）一分子観察が可能である。

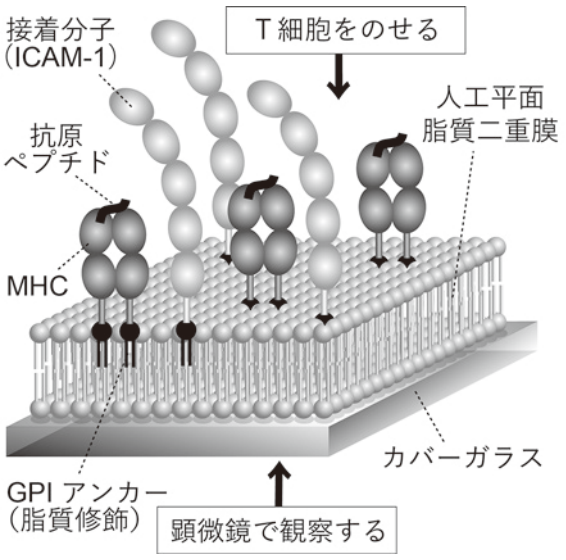


図 2　抗原提示人工平面脂質二重膜（プレイナーメンブレン）の原理

この融合実験系から明らかにできたことは、免疫シナプスができる前に、既に TCR シグナルを伝えるシグナルソーム（シグナル伝達を行う分子の集合体）が存在することである。T 細胞がプレイナーメンブレンに接着した直後より、20〜30 個の TCR/CD3 複合体が集まって 1 つのクラスターとなる。このクラスターは接着面に次から次へと T 細胞 1 個当たり 100〜200 個できては接着面の中心部に移動し、5 分後には c-SMAC となる[5-7]（図 3）。強い抗原刺激では大きなクラスターとなり、一方、弱い抗原刺激では小さく、TCR 刺激の強さとクラスター形成とに相関もある。また、TCR の下で働く重要なリン酸化酵素＝キナーゼ Zap70（Zeta-associated protein 70 kDa）も、キナーゼが細胞膜に留まるために必要なアダプター分子 SLP-76（SH2 domain-containing leukocyte protein 76 kDa）も TCR と共に凝集し（図 4a）、それと同時にカルシウム流入も起こった。これらの結果から、この TCR を核としたシグナル伝達分子の複合体は単独でシグナル活性を有していると考え、T 細胞の活性化を司る最小シグナルユニット「TCR マイクロクラスター」と命名した[5]。面白いことに、キナーゼやアダプター分子がクラスターとして集まるのは 20〜30 秒であり、シグナル伝達分子を失った TCR/CD3 複合体だけが中心部 c-SMAC に集まることである（図 4b）。c-SMAC は使い終わった TCR が分解・再利用される前のゴミ処理場のような機能も有している。しかし、接着面の辺縁部（d-SMAC）ではシグナル伝達分子を持った新たな TCR マイクロクラスターが連続的に生まれ、これが T 細胞活性化を持続させるシグナルとなっている[5]。

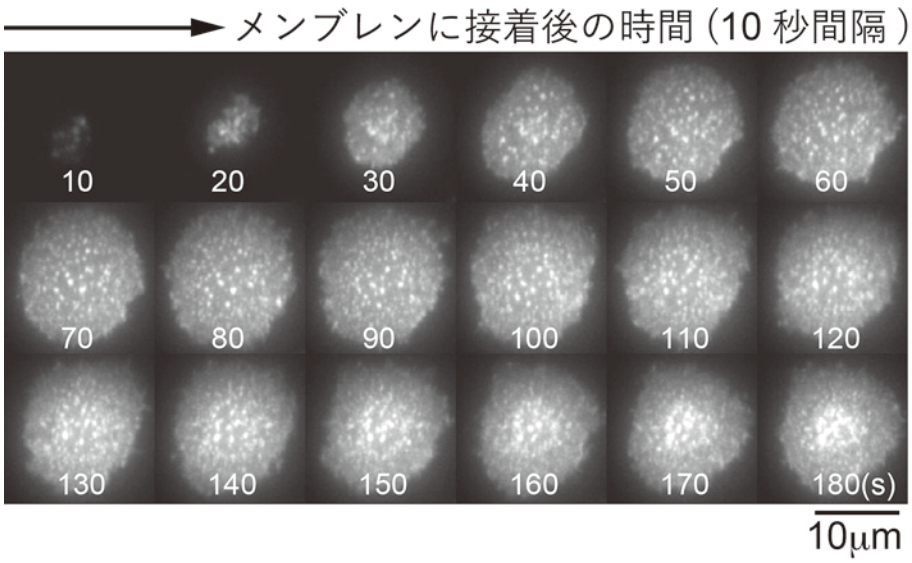


図 3　TCR/CD3 複合体のクラスター形成
マウス脾臓 $CD4^+$ T 細胞に CD3ζ-GFP キメラ分子を導入し、T 細胞とプレイナーメンブレン（図 2）との接着面で起こる TCR/CD3 複合体のクラスター形成を、全反射蛍光顕微鏡にて経時的に観察した。（文献[5] より改変して引用。）

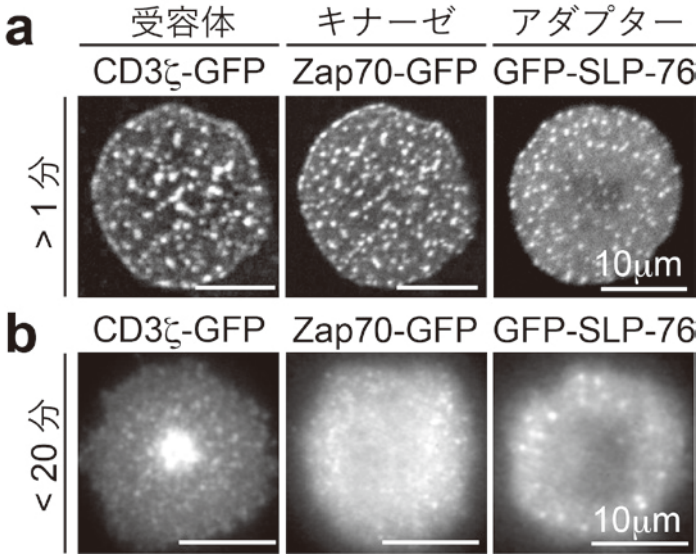


図 4　シグナルソームとしての TCR マイクロクラスター
（a）T 細胞とプレイナーメンブレンとの接着直後に観察される受容体 TCR/CD3 複合体、キナーゼ Zap70、アダプター SLP-76 のクラスター。（b）c-SMAC 形成後、免疫シナプスの新たな接着面（d-SMAC）で観察される Zap70 と SLP-76 のクラスター。（文献[5] より改変して引用。）

3.　CD28 補助刺激受容体

T 細胞が十分に活性化し、病原体の排除などに役立つヘルパー T 細胞やキラー T 細胞に分化するためには、TCR 刺激の他に、補助刺激受容体やサイトカイン受容体などの補助刺激が必須であり、それらのシグナルが協調的に働きながら T 細胞の運命を決めている。T 細胞の補助刺激受容体には、CD28 や inducible T cell costimulator（ICOS）などの活性型と、cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4（CTLA-4）や programmed death 1（PD-1）などの抑制型とがある[8]。補助刺激受容体は単独では機能しないが、TCR と共に働くと劇的な効果を示す。ゆえに、シグナル伝達経路は TCR とオーバーラップするところが多く、明確なシグナル伝達経路の区別は難しかった。イメージングの視点から TCR と補助刺激受容体を解析すると、それぞれの受容体ではっきりとした違いがあることが分かってきた。

TCR シグナルは、① mitogen-activated protein kinase（MAPK）経路（Erk、JNK、p38）、② カルシウム-NFAT 経路、③ nuclear factor-κB（NF-κB）経路、④ phosphatidylinositol 3（PI3）キナーゼ経路、⑤ アクチン重合、⑥ インテグリンシグナルなど、さまざまなカスケードに分岐する。それに対して、CD28 は ③ NF-κB 経路の、ICOS は ④ IP3 キナーゼシグナルのそれぞれ特徴的なクラスターを作ることで、それぞれの経路を特異的に増強することが分かった。CD28 はリガンドである CD80/CD86 と結合すると、c-SMAC を取り囲むように NF-κB 経路の活性中心を作る[9)10)]（図 5a）。NF-κB 経路の活性中心では、CD28 が Src ファミリー分子の Lck を介して非典型キナーゼ protein kinase c θ（PKCθ）を呼び寄せ[11)]、さらに足場タンパク CARD-containing MAGUK protein 1（Carma1）をリクルートする[12)]（図 5b）。Carma1 の点変異は、びまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫の原因と報告されており、この変異を持つ Carma1 は常に凝集し NF-κB 経路の過剰な活性化を引き起こす。クラスター形成と疾患との結びつきを示す 1 例である。一方、ICOS はリガンドである ICOSL と結合すると TCR マイクロクラスターに集まり、マイクロクラスターに大量の PI3 キナーゼを呼び寄せる。

4.　免疫チェックポイント分子

「がん免疫療法の革命」といわれる免疫チェックポイント療法は、実際には T 細胞の抑制性補助刺激受容体を標的にしたがん治療である。抑制性補助刺激受容体を、生物製剤である抗体によって中和し、T 細胞の抑制状態を解除、抗がん作用を復活させることを基礎としている。CTLA-4 は、T 細胞の活性化に伴い細胞内で発現し、抗原提示細胞に発現しているリガンド CD80/CD86（CD28 のリガンドでもある）とより強力に結合することによって、CD28 からリガンドを奪い取り、CD28 シグナルを抑制する（図 5c）。よって CTLA-4 遺伝子欠損マウスは全身性の T 細胞浸潤による重度の自己免疫反応により、

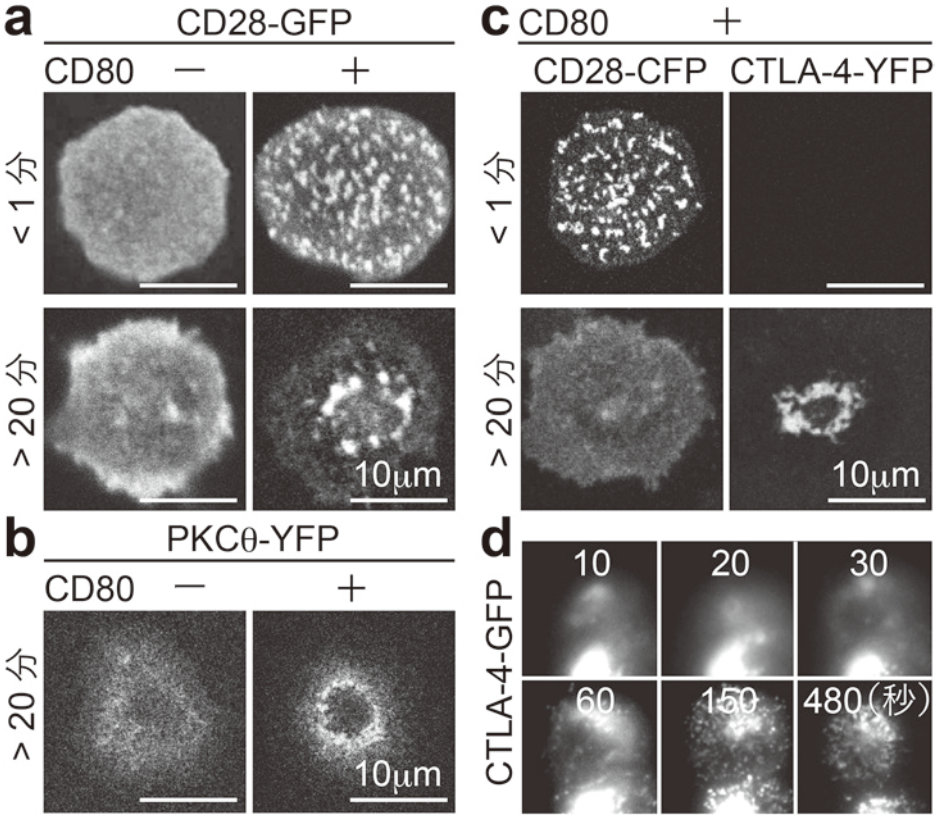


図 5　CD28−NF-B 活性中心と CTLA-4 による破壊
（a）リガンドである CD80 の存在下でマイクロクラスターを形成する CD28。免疫シナプスの形成に伴い中心部に輪状に集まる。（b）CD28 と共に会合し、NF-κB 活性中心を構築する PKCθ。（c）CD80 との強い結合力によって CD28−NF-κB 活性中心を破壊する CTLA-4。分泌性リソソームに蓄積している CTLA-4 は、TCR 刺激に伴い免疫シナプス上に表出する。（文献[9)12)] より改変して引用。）

生後2-3ヶ月で死亡する。第二の負の補助刺激受容体PD-1も、T細胞の活性化に伴って発現するが、CTLA-4とは異なり常に細胞表面に存在している。PD-1遺伝子欠損マウスは、純系マウスの遺伝型によって違った表現型を呈し、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を発症するため、PD-1は長期的なT細胞の活性化抑制にも重要であると考えられている。面白いことに、CTLA-4とPD-1のクラスターは全く異なっている。CTLA-4は分泌性リソソーム内に蓄積され、TCRに刺激が加わると免疫シナプス面に表出し、c-SMACにあるCD28のNF-κB経路活性中心を破壊する（図5d）[12]。PD-1は、リガンドであるPD-1 ligand-1/2（PD-L1/2）と結合すると、脱リン酸化酵素SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2（SHP2）と共にTCRマイクロクラスターに凝集し（図6）、マイクロクラスターに集まるシグナル伝達分子を根こそぎ脱リン酸化する[13]。

免疫チェックポイント療法が実際にどのように機能しているかも、イメージングの視点から考えると理解しやすい。リウマチ治療に使用されているCTLA-4免疫グロブリン製剤（abatacept や balatacept）は、CTLA-4と同様にCD28とCD80/CD86との結合を阻害するため、CD28−NF-κB経路の活性中心を破壊し、リウマチの原因となる行き過ぎたT細胞の活性化を阻止する。また、ヒト化抗CTLA-4モノクローナル抗体（ipilimumab）は転移性悪性メラノーマ、進行性非小細胞肺癌、ホルモン抵抗性前立腺癌などの治療薬として使われており[14]、CTLA-4機能をブロックするため、CD28−NF-B経路の活性中心が増強、T細胞はより活性化する。抗PD-1抗体（nivolumab）や抗PD-1リガンド抗体（MPDL3280A）は、現在、がん免疫療法のトピックとして、がん患者での免疫系を賦活化する目的で大注目されており、また慢性C型肝炎やエイズウイルス感染など慢性感染症治療への応用も期待されている。これらの抗体によって、PD-1−SHP2マイクロクラスターの形成が阻害され、その結果TCR下流のリン酸化が持続し、がんに対するT細胞応答が増強する。PD-1を介する免疫チェックポイント

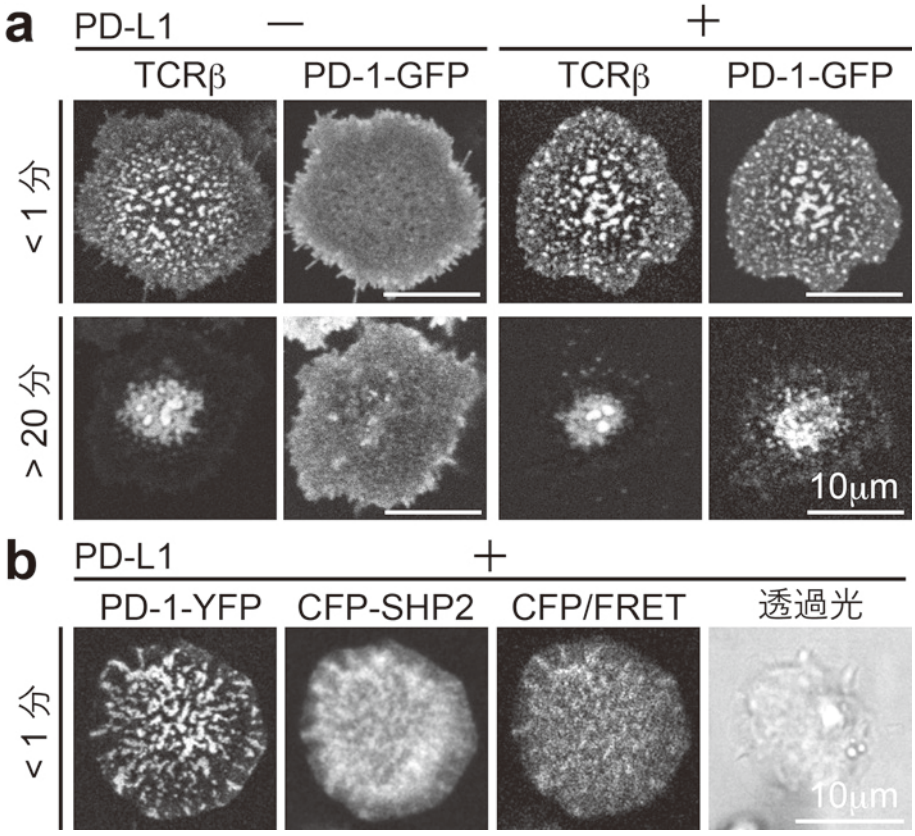


図6 PD-1とTCRマイクロクラスター
（a）リガンドPD-L1との結合によりTCRマイクロクラスターとc-SMACに凝集するPD-1。（b）PD-1マイクロクラスターと共局在を示すSHP2。（文献[13]より改変して引用。）

療法がこれだけ著効を示す理由には、① がん細胞自身がPD-1リガンドを発現し､攻撃してくるキラーT細胞を直接抑制する、② PD-1リガンドはT細胞抑制のみならず、ヘルパーT細胞を制御性T細胞へと変化させ、細胞性のがん抑制を誘導する、などPD-1の生理学的特徴があるからであり、抗PD-1/PD-L1抗体は、これら全ての免疫抑制をキャンセルすることができる。

5. マイクロクラスターのモーター

免疫細胞は、病原体の侵入やがん化した細胞をいち早く発見するため、からだ中をパトロールしている。パトロール中のT細胞も自らのTCRとマッチした抗原を発見すると、移動を止め免疫シナプスを形成し、さらに情報を得ようとしたり、相手が被感染細胞やがん化した細胞なら殺傷したりする。T細胞の移動は、接着分子やケモカインなどの細胞表面分子や、アクチンなどの細胞骨格分子によって制御されており、免疫シナプスにおけるマイクロクラスターの移動も、これら細胞骨格分子がモーターとして働いている（図7)。T細胞はより結合力が強く、抗原の密度が高い方に向かって移動し続けることから、「免疫シナプス」とはT細胞が抗原提示細胞に向かって突き進んでいる状態といえる。TCRシグナルの下流で働く⑤ アクチンのほか、ミオシンの亜型であるミオシンIIAや[15]、微小管に沿った分子輸送を担うダイニンもマイクロクラスターのモーターとして働いている[16]。微小管形成中心（microtubule-organizing center；MTOC）いわゆる中心体は、通常T細胞の進行方向と反対に位置するが、免疫シナプスの形成と共に前方へ移動し、c-SMACの直下に定着する。この移動は、マイクロクラスターのモーターとしてだけでなく、キラーT細胞の溶解性顆粒（内包しているパーフォリンやグランザイムを標的細胞に注入してアポトーシスに導く）の細胞内輸送と細胞外放出も制御する。免疫シナプスの中心部に集まりc-SMACとなったTCR/CD3は､キナーゼやアダプターと同様にTCRマイクロクラスターに集まるE3ユビキチンリガーゼやユビキチンによって、インターナリゼーションされる。E3ユビキチンリガーゼCblはB細胞リンパ腫の原因遺伝子として発見され、そのSNPと骨髄異形成症候群との関連性も示されている。Cblを欠損したT細胞では、TCRマイクロクラスターの処理が停滞し、TCRの活性化が持続することから、この活性化の遷延と白血病化との関連が示唆される。逆に、アクチンキャッピングタンパク（アクチンフィラメントの先端に付着しフィラメントの伸長を妨げる）の制

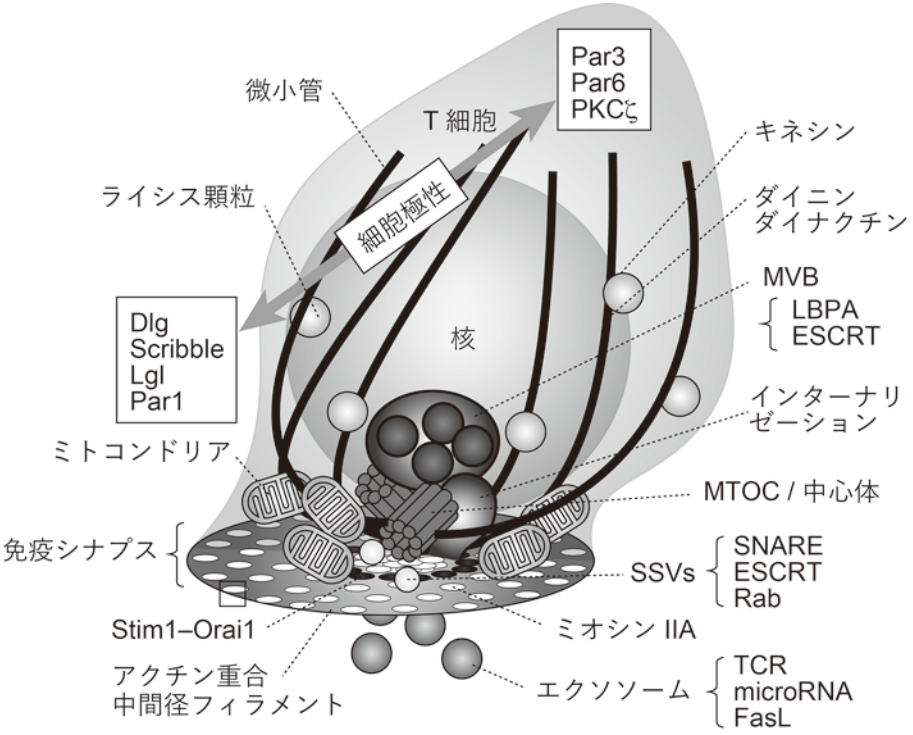


図 7　細胞骨格を含めた免疫シナプスの 3-D 構造

御異常を示すマウスでは、アクチンファラメントの重合が亢進、インターナリゼーションも進み、シグナルは直ちに退縮する[17]。また、B 細胞では、アクチン重合によって c-SMAC での抗原のインターナリゼーションが進み、抗原の貪食や B 細胞受容体の処理と共に、より強力な抗原提示も行われるようになる。

6.　エフェクター T 細胞
― 制御性 T 細胞・疲弊 T 細胞 ―

T 細胞は、臓器の種類や炎症の有無などその周囲の環境、つまり抗原の情報やサイトカインの種類に順応して、その環境に適応したエフェクター T 細胞サブセットに分化する。それぞれのサブセットは分泌するエフェクターサイトカインの種類だけでなく、補助刺激受容体の発現パターンも異なる。Transforming growth factor-β（TGF-β）により誘導され、免疫抑制を司る制御性 T 細胞は恒常的に CTLA-4 を発現している。抑制性補助刺激受容体の項目で述べた通り、CTLA-4 クラスターは CD80/CD86 を CD28 から奪い取り CD28―NF-κB 活性中心を破壊するため、制御性 T 細胞自身の細胞増殖は起きにくい[12]。また近年、制御性 T 細胞の CTLA-4 には、PKCθ のアイソザイム PKCη が会合することが分かった[18]。PKCη は制御性 T 細胞と抗原提示細胞との接着性を高め、CTLA-4 を介して抗原提示細胞上の CD80/CD86 をもぎ取ってしまう（trogocytosis）ため、抗原提示細胞の抗原提示能力を低下させ、それが免疫抑制に繋がると考えられている。この相手方の細胞からリガンドをもぎ取る様式は、さまざまな免疫抑制の場で見つかっている。

PD-1 は、抗体のアフィニティー成熟やクラススイッチに必須な T ヘルパー細胞サブセット濾胞ヘルパー T 細胞や、加齢に伴い免疫応答性が減弱した老化 T 細胞、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現れる疲弊（消耗）T 細胞などに高発現している。前述の通り、免疫チェックポイント療法とは、抗 PD-1 抗体やそのリガンドである PD-L1 に対する抗体を用いて、この PD-1 の抑制機能をキャンセルすることにある。プレイナーメ

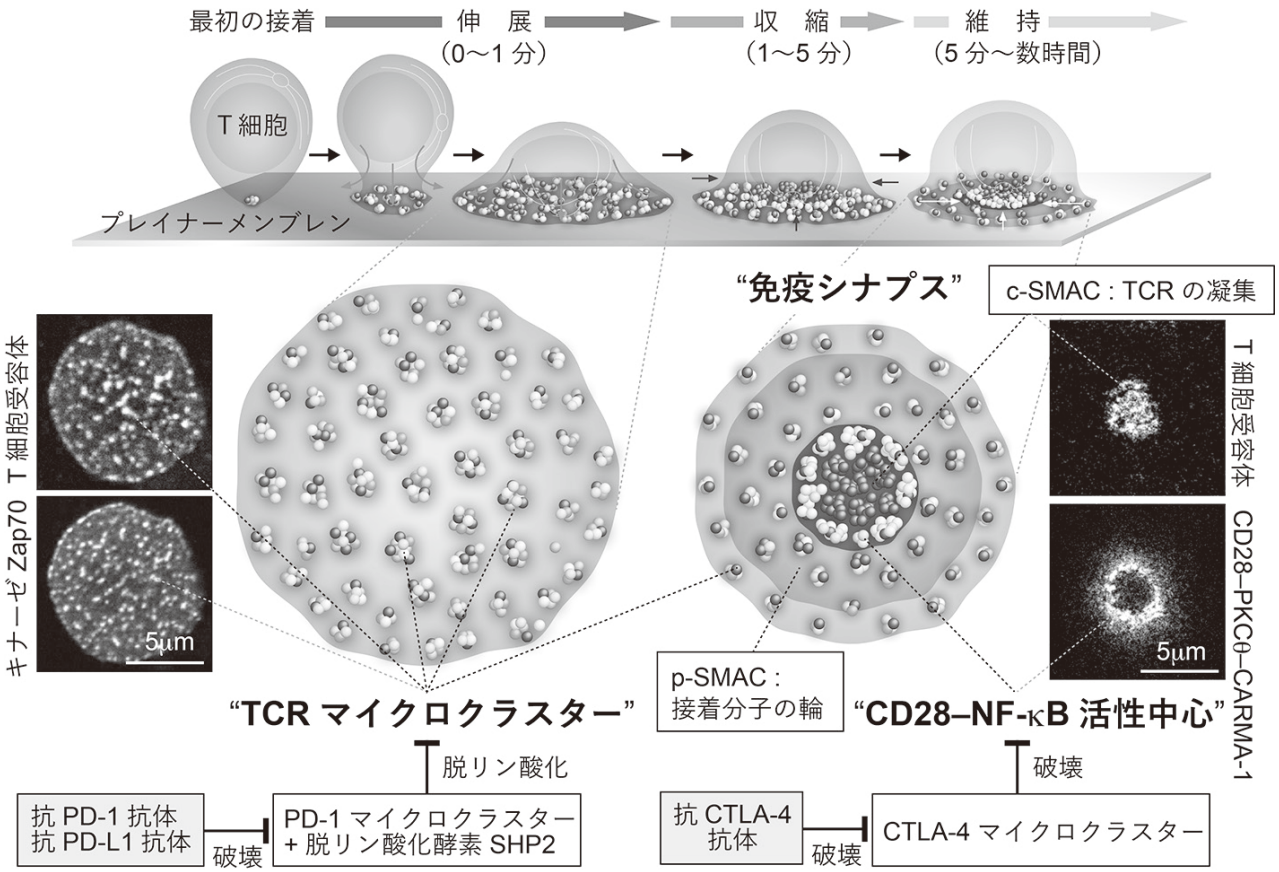


図 8　免疫シナプスでの時空間的 T 細胞活性化制御モデルと免疫チェックポイントの分子制御機構
（文献[7] より改変して引用。）

ンブレンを用いたわれわれの実験からも、疲弊T細胞で発現しているPD-1は、PD-1マイクロクラスターを形成することで疲弊T細胞自らのTCRシグナルを抑えているが、抗PD-1や抗PD-1リガンド抗体の投与によってPD-1マイクロクラスターが解離されると同時に、疲弊T細胞の活性化が回復した[13]。

おわりに

これらのイメージング研究から察しできるように、T細胞の活性化は、T細胞と抗原提示細胞との接着面に形成される免疫シナプスという“場”で、TCRや活性化・抑制性補助刺激受容体のマイクロクラスターが時間的空間的に形成と消褪を繰り返し、調節されている（図8）。TCRと補助刺激受容体は、ほぼオーバーラップしたシグナル伝達経路を持つものの、それぞれの補助刺激受容体はある特異的な経路を増強あるいは抑制するなど、質的・量的にT細胞シグナルに変化を加えている。その結果が、TCRがマルチタスク受容体としてさまざまなアウトプットを出し、T細胞の機能に多様性を与えられる理由である。われわれの研究に続いて、B細胞やnatural killer（NK）細胞、NKT細胞にもマイクロクラスターが存在し、マイクロクラスターという概念が抗原認識受容体に共通のメカニズムであることが分かってきた[19]。また、免疫細胞以外にも、HIVウイルスがCD4やCXCR5ケモカイン受容体を介して$CD4^+$T細胞に感染する際や、HTLV-1感染T細胞から健常T細胞へのウイルス伝搬の際も、シナプス様構造を介して効率的にウイルスの感染・伝搬がおこっていることが明らかにされており、ウイルス感染受容体のマイクロクラスター形成が示唆される。また、抗CTLA-4抗体、CTLA-4免疫ブロブリン製剤、抗PD-1/PD-L1抗体を使った実験から、これら受容体とリガンドとの結合阻害は、実際にはそれぞれのマイクロクラスターを破壊することであり、それによって特異的にそのシグナルだけを遮断できると考えられる。つまり、免疫細胞のシグナルソームを人為的操作できれば、その細胞の特定のシグナルだけを制御することとなり、シグナル伝達標的治療薬などの薬剤開発などにも有用であろう。シグナルを「観る」という少しの観点の違いから、シグナル伝達のカスケードマップの裏側や、未知の機能、疾患のメカニズムや治療法開発のヒントが見つかればと思う。

文　献

1） Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A : Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature **395**（6697）: 82-86, 1998
2） Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML : The immunological synapse : a molecular machine controlling T cell activation. Science **285**（5425）: 221-227, 1999
3） Dustin ML, Depoil D : New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. Nature reviews. Immunology **11**（10）: 672-684, 2011
4） Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K : Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. Nat Methods **5**（2）: 159-161, 2008
5） Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, Dustin ML, Saito T : Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. Nat Immunol **6**（12）: 1253-1262, 2005
6） Saito T, Yokosuka T : Immunological synapse and microclusters : the site for recognition and activation of T cells. Curr Opin Immunol **18**（3）: 305-313, 2006
7） Yokosuka T, Saito T : The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. Curr Top Microbiol Immunol **340** : 81-107, 2010
8） Sharpe AH : Mechanisms of costimulation. Immunol Rev **229**（1）: 5-11, 2009
9） Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M, Saito T : Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. Immunity **29**（4）: 589-601, 2008
10） Yokosuka T, Saito T : Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. Immunol Rev **229** : 27-40, 2009
11） Kong KF, Yokosuka T, Canonigo-Balancio AJ, Isakov N, Saito T, Altman A : A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. Nat Immunol **12**（11）: 1105-1112, 2011
12） Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T : Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. Immunity **33**（3）: 326-339, 2010
13） Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W,

Hashimoto-Tane A, Azuma M, 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

14) Linsley PS, Nadler SG : The clinical utility of inhibiting CD28-mediated costimulation. Immunol Rev **229**(1) : 307-321, 2009

15) Ilani T, Vasiliver-Shamis G, Vardhana S, Bretscher A, Dustin ML : T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. Nat Immunol **10**(5) : 531-539, 2009

16) Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Sakuma M, Ishihara C, Tokunaga M, Saito T : Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. Immunity **34**(6) : 919-931, 2011

17) Liang Y, Cucchetti M, Roncagalli R, Yokosuka T, Malzac A, Bertosio E, Imbert J, Nijman IJ, Suchanek M, Saito T, Wulfing C, Malissen B, Malissen M : The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. Nat Immunol **14**(8) : 858-866, 2013

18) Kong KF, Fu G, Zhang Y, Yokosuka T, Casas J, Canonigo-Balancio AJ, Becart S, Kim G, Yates JR, 3rd, Kronenberg M, Saito T, Gascoigne NR, Altman A : Protein kinase C-eta controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function. Nat Immunol **15**(5) : 465-472, 2014

19) Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, Weber M, Bray D, Batista FD : B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. Science **312**(5774) : 738-741, 2006

Imaging unveils spatiotemporal regulation of lymphocyte activation
—— Discovery of the T cell signaling units “TCR microclusters” ——

Tadashi YOKOSUKA

Department of Immunology, Tokyo Medical University, School of Medicine

Abstract

Immune system is a higher-order network where various cells communicate each other and maintain the homeostasis of internal environments from invaders by identifying self and non-self or pathogenic and non-pathogenic. Among a set of immune cells, T cells are important coordinators in this system to display clinical conditions, such as suppression of autoimmune diseases or allergy, rejection of transplants, and recognition and elimination of cancer cells. T cells recognize antigen peptides on MHCs via a solo receptor, T cell receptors（TCRs）, and introduce proliferation, differentiation, or apoptosis. Although various biochemical approaches and structural analyses can contribute to unveil the mechanisms of antigen recognition and biological functions through a TCR, new imaging technologies remind us that T cells require a particular structure formed at the T cell—antigen presenting cell interface, so called “immunological synapse”, for T cell activation regulation. We furthermore demonstrated that an immunological synapse is constructed by the clusters of several decades of TCRs and their downstream signaling molecules, “TCR microcluster”, which is an essential signaling unit for antigen recognition and T cell activation. Our continuing studies further illustrate the spatiotemporal regulation of T cell activation not only by TCR microclusters but also by the other signaling clusters composed of positive or negative costimulatory receptors, phosphatases, degradation-related molecules, and so forth. Microcluster becomes a commonly known concept for the signaling of lymphocytes bearing antigen-recognition receptors like B cells, NK cells, and NKT cells.

〈**Key words**〉: T cell receptor, signal transduction, molecular imaging, immunological synapse, immune checkpoint