

Title	Rolling of Th1 Cells Via PSGL-1 Stimulates LFA-1-Mediated Cell Binding to ICAM-1
Author(s)	新, 和之
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45433">https://hdl.handle.net/11094/45433</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	新 和 之
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19344 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Rolling of Th1 Cells Via PSGL-1 Stimulates LFA-1-Mediated Cell Binding to ICAM-1 (PSGL-1 を介した Th1 細胞のローリングは LFA-1 を介した ICAM-1 への細胞接着を誘導する)
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之  (副査) 教授 平野 俊夫 教授 菊谷 仁

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

炎症局所において、白血球はまずセレクチンとそのリガンドを介して血管内皮細胞上をローリングし、次に血管内皮細胞上に提示されたケモカインの刺激を受けてインテグリンが活性化されることにより血管内皮細胞に強固に接着し、組織に浸潤する。PSGL-1 は白血球広範に発現する P-セレクチンの主要なリガンドであり、骨髄球系の細胞や Th1 細胞など一部のリンパ球サブセットのローリングを媒介する。私は、ローリングを媒介する分子が細胞内にシグナルを伝達するか明らかにするため、マウス Th1 細胞を用い、PSGL-1 を可溶性の抗体で架橋することにより、もしくは固相化した P-セレクチン上をローリングさせることにより、LFA-1 が活性化されるか検討した。さらに PSGL-1 を架橋することにより、どのようなシグナル伝達分子が活性化されるか検討した。

#### 【方法ならびに成績】

Th1 細胞は、C57BL/6 マウス脾臓より分離した CD4 T 細胞を *in vitro* で分化させて得た。Th1 細胞の PSGL-1 を抗 PSGL-1 モノクローナル抗体 (2PH1) および二次抗体により架橋し、静止条件下における ICAM-1 への接着を検討した。その結果、二次抗体依存的に ICAM-1-IgG キメラタンパク質 (ICAM-1-IgG) への接着細胞数が約 10 倍増加した。接着細胞数の増加は抗 LFA-1 抗体により阻害されたことから、LFA-1 を介することが明らかとなった。さらに PSGL-1 の架橋がフロー条件下における ICAM-1 との接着に影響するか検討した結果、接着細胞数・ずり応力抵抗性ともに増強した。また、静止条件下において PSGL-1 の架橋と炎症性ケモカイン CXCL10 または CCL5 との共刺激をすると、短時間の PSGL-1 架橋により ICAM-1 への接着性が 70% 増強し、さらにケモカインを加えることにより 175% に増強した。インテグリンの活性化には 2 つの機構が報告されている。一つはインテグリンの立体構造の変化による affinity の上昇による活性化、もう一方はインテグリンの凝集による avidity の上昇による活性化である。まず、PSGL-1 の架橋が LFA-1 の affinity に影響するか、可溶性 ICAM-1-IgG を用いたフローサイトメトリーにより検討した。その結果、PSGL-1 の架橋では ICAM-1-IgG の結合が検出されなかったことから、LFA-1 の affinity には大きな影響を与えないことが明らかになった。次に、PSGL-1 の架橋が LFA-1 の avidity に影響するか調べるため、

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて細胞表面上の分子の局在を解析した。その結果、PSGL-1の架橋は細胞表面上におけるLFA-1の凝集を誘導し、CXCL10またはCCL5との共刺激でさらに凝集が亢進した。これらの結果より、PSGL-1の架橋はLFA-1のavidityを上昇させることが示唆された。さらに、Th1細胞がP-セレクトリン上をローリングするとICAM-1への接着性が変化するか調べるため、P-セレクトリン-IgGキメラタンパク質を固相化した微小ガラス管とICAM-1-IgGを固相化した微小ガラス管を直列につなぎ、フロー条件下におけるICAM-1への接着を解析した。その結果、P-セレクトリン上をローリングしたTh1細胞はICAM-1への接着がローリングしない時と比べ約6倍増強し、接着亢進はPSGL-1に対する阻害抗体で抑制された。これらの結果より、PSGL-1を介したローリングにより、ICAM-1への接着が亢進することが示された。最後にPSGL-1を介したLFA-1の活性化に関するシグナル伝達分子を解析した。PSGL-1の架橋やPSGL-1を介するローリングによるICAM-1への接着亢進は、プロテインキナーゼC (PKC) 阻害剤により抑制された。また、PSGL-1の架橋によりPKC $\alpha/\beta$ IIのリン酸化の亢進がウエスタンブロット法により検出された。これらの結果より、PSGL-1を介した刺激がPKCを活性化し、LFA-1を介する接着を活性化することが示唆された。

#### 【総括】

抗体によるPSGL-1の架橋、またはPSGL-1を介したローリングはTh1細胞のLFA-1を活性化してICAM-1への接着亢進を誘導した。さらにPSGL-1からの刺激は、ケモカインの刺激と協調的に働きLFA-1を活性化することが示された。また、PSGL-1を介したローリングにより惹起されるLFA-1活性化にはPKCが関与することが明らかになった。PSGL-1を介したLFA-1活性化におけるシグナル伝達経路の解明は、炎症性疾患における白血球浸潤の制御に寄与するものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

好中球やTh1細胞などの白血球表面に発現するPSGL-1は炎症局所の血管内皮細胞に発現誘導されるP-selectinやE-selectinと結合し、白血球のローリングを媒介する。白血球の血管外遊走の過程において、白血球は血管内皮細胞上に提示されたケモカインにより刺激を受け、インテグリンを活性化することで血管内皮細胞に強固に接着し浸潤する。演者はTh1細胞に発現するPSGL-1を介したローリングによる刺激がインテグリンの活性化にどのように関与するか検討した。Th1細胞のPSGL-1を刺激すると、LFA-1の細胞表面での凝集を促進し、静止条件下においてTh1細胞のICAM-1に対する接着性を亢進した。さらにフロー条件下において、Th1細胞がPSGL-1を介してP-selectin上をローリングすることで、LFA-1を活性化しICAM-1に対する接着性を亢進した。これらのことから、Th1細胞の炎症局所への浸潤過程において、PSGL-1を介したローリングもLFA-1を活性化し、標的組織への浸潤に関与することが示され、学位の授与に値するものと考えられる。