

氏名	富永裕一
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第601号
学位授与の日付	平成11年1月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	細胞間接着分子LFA-1とICAM-1の相互作用の親和力および反応速度に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 河合明彦 教授 川寄敏祐 教授 伊藤信行

## 論文内容の要旨

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) は、免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する細胞間接着分子で、5つの免疫グロブリン様細胞外ドメイン (D1~D5)、膜貫通部分および細胞内ドメインで構成されており、炎症局所の血管内皮細胞などで発現が誘導されることが知られている。ICAM-1のリガンドであるLFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) は、 $\beta$ 2インテグリン・ファミリーに属する細胞間接着分子で、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のヘテロダイマーからなる膜貫通型蛋白質である。リンパ球表面に存在しており、抗原刺激などにより活性型へと変換されることが知られている。ICAM-1/LFA-1経路は白血球の炎症局所への浸潤やTリンパ球の活性化に重要な役割を果たしており、この経路を阻害することにより、抗炎症効果あるいは免疫抑制効果が期待される。そこで、ICAM-1/LFA-1接着経路を阻害する物質を見つけるために、ICAM-1およびLFA-1精製蛋白質を用いた結合アッセイ系の構築を試みた。さらに、著者は、ICAM-1に関連した種々の組換え蛋白および可溶性LFA-1を作製し、これらを利用することによりICAM-1/LFA-1相互作用を分子レベルで検討した。また、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーであるBIAcore2000を用いてICAM-1とLFA-1の相互作用を反応速度論的な視点から解析し、ICAM-1とLFA-1の分子間相互作用の親和力について考察した。

## 第1章: ICAM-1/LFA-1接着経路の解析

ICAM-1のドメイン1および2 (D1D2) とIgGを融合させたキメラ分子 (D1D2-IgG) を作製し、固相化したD1D2-IgGに対してTリンパ腫細胞株であるSKW-3細胞表面の活性型LFA-1が結合することを明らかにした。また、SKW-3細胞は、D1D5-IgG [ICAM-1のドメイン1から5 (D1D5) とIgGを融合させたキメラ分子] に対しても同様に結合した。これらの結合は、抗ICAM-1あるいは抗LFA-1モノクローナル抗体を $10\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加することにより完全に抑制された。しかしながら、SKW-3細胞と固相化D1D2-IgGの結合は、D1D2-IgGあるいはD1D5-IgGを $500\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加しても抑制されなかったことからSKW-3細胞表面の活性型LFA-1とICAM-1 (D1D2-IgG) の結合は強固なものである可能性が示唆された。

## 第2章: ICAM-1/LFA-1相互作用の分子レベルでの解析

LFA-1の膜貫通部分と細胞内ドメインを取り除いた可溶性LFA-1 (sLFA-1) のcDNAをPCR法を用いて構築した。これをCHO-K1細胞で発現させ、その培養上清からsLFA-1を精製する方法について検討した。その結果、レクチン (WGAとAAL) および陰イオン交換 (Mono-Q) クロマトグラフィーを用いることにより、sLFA-1を高純度に精製した。さらにこのsLFA-1のリガンド結合活性について検討したところ、ICAM-1のD1D2部分 (D1D2-IgG) に対して結合することが明らかになった。また、sLFA-1とD1D2-IgGの結合は、抗ICAM-1あるいは抗LFA-1モノクローナル抗体により完全に抑制されることから、特異的な結合であることが確認された。さらに、これらの結合はD1D2、D1D5 ( $\text{IC}_{50}=400\text{nM}$ ) あるいはD1D2-IgG、D1D5-IgG ( $\text{IC}_{50}=40\text{nM}$ ) により阻害されることから、D1D2-IgG/sLFA-1結合試験は、ICAM-1あるいはLFA-1のアンタゴニストの探索に有用である可能性が示唆された。著者は、このアッセイ系と同

じ原理に基づいた完全長のLFA-1を用いる系の構築も行った。ICAM-1/LFA-1接着経路に依存したJY細胞（Bリンパ腫細胞株）の自己凝集を抑制することが既に知られている低分子化合物（RWJ50271）を、完全長のLFA-1を用いたアッセイ系で評価したところ、この系で低分子化合物のアンタゴニスト作用がみられることが明らかになった。

### 第3章：ICAM-1/LFA-1相互作用の反応速度論的解析

BIAcore2000を用いてICAM-1/LFA-1相互作用を分子レベルで解析したところ、LFA-1（sLFA-1）とICAM-1（D1D2-IgG）の結合は、結合速度定数 $2 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と解離速度定数 $1 \times 10^3 \text{s}^{-1}$ で構成される反応であることが明らかになった。また、解離定数を計算すると $5 \times 10^{-7} \text{M}$ であった。さらに、全長のLFA-1すなわちmLFA-1を用いてBIAcore2000で解析した結果、mLFA-1とD1D2-IgGの結合も速い結合と速い解離で構成される反応であることが明らかになった。よって、ICAM-1とLFA-1の分子間相互作用は、速い結合と速い解離で構成される反応であることが示唆された。

以上の結果から、LFA-1とD1D2-IgGの2種類の組換え蛋白質を用いることにより、ICAM-1あるいはLFA-1のアンタゴニストの探索に利用可能なアッセイ系を構築できることが証明された。さらに、ICAM-1とLFA-1の分子間相互作用は、セレクトリンなど他の細胞間接着分子と比較して親和力が強い反応であることから、白血球と血管内皮細胞の接着において中心的な役割を担っている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) は、免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する細胞間接着分子で、5つの免疫グロブリン様細胞外ドメイン (D1~D5)、膜貫通部分および細胞内ドメインで構成されており、炎症局所の血管内皮細胞などで発現が誘導されることが知られている。一方、ICAM-1のリガンドであるLFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) は $\beta$ 2インテグリン・ファミリーに属する細胞間接着分子で、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のヘテロダイマーからなる膜貫通型蛋白質である。LFA-1はリンパ球表面に存在しており、抗原刺激などにより活性化へと変換されることが知られている。ICAM-1/LFA-1を介する細胞接着の経路は白血球の炎症局所への浸潤やTリンパ球の活性化に重要な役割を果たしており、従って、この経路を阻害することにより、抗炎症効果あるいは免疫抑制効果が期待される。そこで、ICAM-1/LFA-1接着経路を阻害する物質を見つけることを目的として、ICAM-1およびLFA-1それぞれの精製蛋白質を用いての結合アッセイ系の構築を試みた。

まず、ICAM-1/LFA-1接着経路についての解析を行うために、ICAM-1のドメイン1と2 (D1, D2) およびIgGを融合させたキメラ分子D1D2-IgGを作製した。そして、固相化したD1D2-IgGに対してTリンパ腫細胞株の一つであるSKW-3細胞がその表面の活性化型LFA-1を介して結合することを明らかにした。また、SKW-3細胞はもう一つのキメラ分子D1D5-IgG [即ち、ICAM-1のドメイン1から5 (D1D5) とIgGを融合させたもの] に対しても同様に結合した。一方、これらの結合は、抗ICAM-1または抗LFA-1モノクローナル抗体を $10 \text{mg/ml}$ の濃度で添加することにより完全に抑制された。しかし、SKW-3細胞と固相化D1D2-IgGとの結合は、可溶性のD1D2-IgGあるいはD1D5-IgGを $500 \text{mg/ml}$ の濃度で添加しても抑制されなかったことから、SKW-3細胞表面の活性化型LFA-1とICAM-1 (D1D2-IgG) の結合は強固なものである可能性が示唆された。

また、ICAM-1/LFA-1相互作用を分子レベルで解析するために、LFA-1の膜貫通部分と細胞内ドメインを取り除いた可溶性LFA-1 (sLFA-1) のcDNAをPCR法を用いて構築した。これをCHO-K1細胞で発現させ、その培養上清からsLFA-1を精製する方法について検討した。その結果、レクチン (WGAとAAL) および陰イオン交換 (Mono-Q) クロマトグラフィーを用いて、高純度に精製したsLFA-1を調製することができた。このsLFA-1のリガンド結合活性を検討したところ、ICAM-1のD1D2部分 (D1D2-IgG) にsLFA-1が結合することが明らかになった。また、sLFA-1とD1D2-IgGの結合は、抗ICAM-1または抗LFA-1モノクローナル抗体により完全に抑制されることから、特異的な結合であることが分かった。これらの結合はD1D2, D1D5 ( $\text{IC}_{50}=400 \text{nM}$ ) あるいはD1D2-IgG, D1D5-IgG ( $\text{IC}_{50}=40 \text{nM}$ ) により阻害されることから、D1D2-IgG/sLFA-1結合試験は、ICAM-1あるいはLFA-1のアンタゴニストの探索に有用である可能性が示唆された。

さらに、ICAM-1とLFA-1の分子間相互作用の親和力について考察するために、表面プラズモン共鳴現象を原理とした

バイオセンサーBIAcore2000を用いてICAM-1とLFA-1の相互作用を反応速度論的な視点から解析した。その結果、LFA-1 (sLFA-1)とICAM-1 (D1D2-IgG)の結合は、結合速度定数 $2 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と解離速度定数 $1 \times 10^4 \text{s}^{-1}$ で構成される反応であることが明らかになった。また、解離定数を計算すると $5 \times 10^{-7} \text{M}$ であった。さらに、全長のLFA-1すなわちmLFA-1を用いてBIAcore2000で解析した結果、mLFA-1とD1D2-IgGの結合も速い結合と速い解離で構成される反応であることが明らかになった。よって、ICAM-1とLFA-1の分子間相互作用は、速い結合と速い解離で構成される反応であることが示唆された。

以上の結果から、組換え蛋白質LFA-1とD1D2-IgGの二つを用いれば、ICAM-1あるいはLFA-1のアンタゴニストを探索するのに利用可能なアッセイ系を構築することができることが実証された。さらに、ICAM-1とLFA-1の分子間相互作用は、セレクトリンなど他の細胞間接着分子と比較して親和力が強い反応であることから、白血球と血管内皮細胞の接着において中心的な役割を担っている可能性が強く示唆された。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成10年11月26日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。