

氏 名	菅 耕 二
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2337 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	CD98 induces LFA-1-mediated cell adhesion in lymphoid cells via activation of Rap1 (CD98は Rap1 の活性化を経由して、リンパ球の LFA-1 による細胞接着を誘導する。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 桂 義 元 教 授 本 庶 佑 教 授 飯 塚 忠 彦

論 文 内 容 の 要 旨

CD98/4F2 抗原は1981年に Haynes らによって活性化したリンパ球上に強発現する膜蛋白質として単離された。その後の解析によってこの抗原は多くの癌細胞、ほとんどの cell line、及び活性化したリンパ球にも発現している事が明らかとなった。またその構造は 85kDa の重鎖と 37kDa の軽鎖により構成されるヘテロダイマーであり、重鎖は細胞膜を一回貫通する II 型膜蛋白で rBAT などの陽イオン性及び中性アミノ酸トランスポーターと相同性をもつ。一方軽鎖は細胞膜を12回貫通する膜蛋白で APC スーパーファミリーに属するアミノ酸トランスポーターである。その構造から推測されとうり CD98/4F2 抗原はアミノ酸トランスポーター活性をもつが、その他にも細胞接着・融合誘導活性、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンの活性化活性、細胞増殖抑制活性などが報告されている。

我々も CD98/4F2 抗原重鎖に対するモノクローラル抗体14.37を加えることにより、Balb/c マウスの primary T cell が強く凝集し、その凝集が抗 LFA-1 抗体および抗 ICAM-1 抗体により特異的に抑制されることをみだした。そこで実際に CD98/4F2 抗原が LFA-1 の制御能を有するか否かを調べるために、マウスの pro B cell line の Ba/F3 にヒト LFA-1 をトランスフェクションした BaF/hLFA-1 細胞をもちいて同様の細胞凝集実験を行った。その結果マウス及びヒトの LFA-1 を発現していない野生型 Ba/F3 では細胞凝集は見られなかったが、ヒトの LFA-1 を発現している BaF/hLFA-1 は primary T cell 同様の細胞凝集が見られた。またこの細胞凝集も抗ヒト LFA-1 抗体と抗マウス ICAM-1 抗体により特異的に阻害された。また細胞凝集の前後ではヒト LFA-1 の細胞内での分布に変化がみられた。以上の結果より抗 CD98 重鎖抗体14.37により誘導される細胞凝集は、LFA-1 と ICAM-1 の接着によるものであることが判明した。

一方 LFA-1 を活性化し、強い細胞凝集をひき起こす inside out signal として低分子量 G 蛋白質 Rap1 が報告されている。そこで次に抗 CD98 重鎖抗体14.37で刺激したとき内因性の Rap1 が活性化されるか否かを調べた。Ba/F3 と BaF/hLFA-1 に14.37抗体を加えた後、細胞を溶解させ細胞抽出液を Rap1 の活性型 Rap1GTP と特異的に結合する GST-RBD (RalGDS の Rap1 結合部分) を用いて pull down し、Western blot 法により解析した。その結果 Ba/F3 では抗体を加えても Rap1 は活性化されなかったが、BaF/hLFA-1 では抗体を加える事により Rap1 が活性化された。またこの時、Ba/F3 および BaF/hLFA-1 両方とも ERK はリン酸化されるが、BaF/hLFA-1 では Ba/F3 に比べるとその量は少ないこと、AKT のリン酸化は両方の細胞でおこなうことが分かった。一方この Rap1 の活性化は LFA-1 の阻止抗体を加えると阻害された。また LFA-1 の $\beta 2$ 鎖活性化抗体を加えるだけで Rap1 の活性化が起こる事が分かった。

内因性の Rap1 が本当に細胞凝集に関わっているか否かを知るために、Rap1GAP 活性をもつ Spa-1 を retro virus vector LXS-N を用いて BaF/hLFA-1 に導入した BaF/hLFA-1/Spa-1 細胞を樹立したところ、14.37抗体を加える事により起こる内因性の Rap1 の活性化、LFA-1 の活性化そして細胞凝集も抑制された。

次に CD98/4F2 のシグナル伝達に関わる分子を同定するために各種のシグナル伝達分子阻害剤で BaF/hLFA-1 を処理した後、14.37抗体を加え LFA-1 の活性化、Rap1 の活性化、細胞凝集を解析したところ、PI3-K 阻害剤で特異的にこれらの

現象が抑制された。CD98/4F2 のシグナル伝達に PI3-K が含まれる事が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

CD98 (4F2 抗原) は、1980年に同定された最も歴史の古いリンパ球活性化抗原の一つであるが、その機能は長い間不明であった。申請者らは、CD98 モノクローナル抗体を作製し、これを用い、同抗原の架橋刺激によってTリンパ球の強い細胞凝集が誘導される事、この細胞接着は $\beta 2$ インテグリン・LFA-1の活性化によることを初めて明らかにした。さらに、CD98 を介する刺激は、PI3キナーゼ依存性に低分子G蛋白 Rap1 が活性化すること、また Rap1 特異的 GTPase 活性化因子 Sap-1 の過剰発現による Rap1 活性化阻害により、CD98 による細胞接着誘導が完全に抑制されることを明らかにした。すなわち CD98 は低分子G蛋白 Rap1 を介するシグナル伝達系によって LFA-1 を活性化し細胞接着を誘導することが強く示唆された。

以上の研究は CD98 抗原が、免疫細胞における $\beta 2$ インテグリン・LFA-1 の活性化と機能発現の重要な制御因子であることを初めて明らかにしたものであり免疫学・炎症学の進展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成13年2月7日実施の論文内容とそれに関連した試問をうけ、合格と認められたものである。