

|           |                                                                                                                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | しもなか よし い み か<br>下 中 (吉 井) 美 香                                                                                                                                                                |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                     |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2703 号                                                                                                                                                                                  |
| 学位授与の日付   | 平成 16 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 内 科 系 専 攻                                                                                                                                                                           |
| 学位論文題目    | Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow<br>(Rap1はケモカインのシグナルを変換し、インテグリンの活性化、細胞極性形成、フロー下での経血管内皮遊走を起こす) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 成 宮 周 教 授 北 徹 教 授 宮 地 良 樹                                                                                                                                                        |

### 論 文 内 容 の 要 旨

リンパ球の炎症部位への遊走やリンパ節へのホーミングには、血管内皮への接着が重要であり、基本的にはローリング、強固な接着、経血管内皮遊走の3つの過程からなる。ローリングは、セレクチンファミリーが関与する低親和性の接触であり、リンパ球の停止にはLFA-1やVLA-4のインテグリンを介する高親和性の強固な接着が必要となる。また、経血管内皮遊走には、血流によるずり応力 (shear stress) が必要であるとされている。血管内皮に提示されたケモカインは、リンパ球のインテグリンを活性化して血管内皮への接着を亢進することが知られている。しかし、これらを制御する細胞内シグナル伝達因子については未だ不明な点が多い。Rasファミリー低分子量G蛋白質Rap1は、インテグリンLFA-1やVLA-4の接着を亢進することが明らかになり、本研究はRap1がケモカインからインテグリンへ活性化シグナルを伝える重要な分子である可能性を検討した。

マウス末梢リンパ節由来のリンパ球をケモカインSLC (CCL21) やSDF-1 (CXCL4) で刺激すると、30秒後にはRap1の活性化が一過性に認められた。この活性化は百日咳毒素で完全に抑制されたことから、ケモカイン受容体を介して活性化されるGi蛋白が関与する反応である。また、ケモカイン刺激により、リンパ球のICAM-1やVCAM-1への接着が、刺激1分後から亢進し、10分後に最大になり、その後すみやかに低下した。この接着は、抗体による阻害実験により、LFA-1やVLA-4を介するものであった。リンパ球にアデノウィルスを用いて、Rap1特異的GTPase活性化蛋白であるSpa1を発現させたところ、ケモカインによるRap1の活性化は抑制され、ICAM-1への接着も阻害された。しかし、PMAによる接着亢進はSpa1によって影響を受けなかった。このことからSpa1は特異的にケモカインによるRap1の活性を抑制し、LFA-1の接着亢進を阻害したと考えられる。さらに、Spa1は血管内皮上をローリングしているリンパ球のケモカインによる接着を阻害した。したがってケモカインによるRap1の活性化はリンパ球のインテグリンを介した血管内皮との強固な接着に必要であることが分かった。一方、活性化型Rap1V12をリンパ球に発現させると、ICAM-1やVCAM-1上での活発な遊走や、血管内皮への shear stress 下での接着と経血管内皮遊走が、ケモカイン刺激なしで誘導された。これらの接着と遊走の亢進は、Ras/Rhoファミリーの中でもRap1に特異的であった。さらに、リンパ球にRap1V12を発現させると、リンパ球に形態変化が生じ leading edge と uropod が形成され、同時にCXCR4やCD44がそれぞれ leading edge と uropod に集積した。ケモカイン刺激をするとリンパ球でも同様の現象が見られ、遊走に適した変化と考えられるが、Spa1を発現させると阻害された。このことからRap1によって前後軸の細胞極性が生じたと考えられる。

これらの結果からRap1はケモカインのシグナルを変換することにより、インテグリンを活性化して血管内皮への接着性を起こし、リンパ球に極性を持たせて血管内皮上での遊走を促進し、それに続く shear stress を受けての経血管内皮遊走を引き起こすことが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

リンパ球の炎症部位への遊走やリンパ節へのホーミングにおいて、ケモカインはリンパ球の血管内皮への接着性を亢進し、それに続く経血管内皮遊走を引き起こす。これを制御する細胞内シグナル伝達分子として、Rasファミリー低分子量G蛋白質 Rap1が検討された。

リンパ球をケモカイン刺激すると、Rap1の活性化と ICAM-1 への接着性亢進を認めたが、アデノウイルスを用いて Rap1 特異的 GTPase 活性化蛋白である Spa1 を発現させると、ケモカインによる Rap1 の活性化や ICAM-1 への接着が阻害された。一方、活性化型 Rap1 V12 を発現させると、ICAM-1 上での活発な遊走や、shear stress 下での血管内皮への接着と経血管内皮遊走が、ケモカイン刺激なしで誘導された。さらに、Rap1 V12 を発現させたリンパ球には形態変化が生じ leading edge と uropod が形成され、CXCR4 や CD44 がそれぞれの極に集積した。ケモカイン刺激によっても同様の極性が見られたが、Spa1 を発現させると阻害された。

以上の研究は、Rap1 はケモカインのシグナルを変換することにより、インテグリンを活性化して血管内皮への接着を起こし、リンパ球に極性を持たせて血管内皮上での遊走を促進し、それに続く経血管内皮遊走を引き起こすことを明らかにしたもので、炎症のメカニズム解明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16年1月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。