白血球接着分子 CD44 と新しいリガンド serglycin

反町典子*¹⁾, 宮坂昌之*^{1,2)}

A leukocyte adhesion molecule CD44 and its new ligand serglycin

We have identified a novel ligand for CD44, a cell surface glycoprotein implicated in tumor metastasis and lymphocyte homing. When a mouse T cell line CTLL-2 was transfected with cDNA encoding a hemopoietic form of mouse CD44, CTLL-2 cells exhibited a new self-abhesive phenotype, forming large aggregates. The aggregation was blocked by neutralizing antiCD44 monoclonal antibody but unaffected by hyaluronidase, indicating the involvement of CD44 and its non-hyaluronate ligand in the cell aggregation. The ability to induce CD44-dependent aggregation was found in culture supernatants of CTLL-2 and its CD44 transfectants. The use of soluble CD44 chimeric protein revealed that CTLL-2 and its transfectants synthesized a large-molecular weight protein (gp600) which bound specifically to CD44.

Biochemical analyses revealed that the gp600 is a non-hyaluronate proteoglycan termed serglycin which is stored in and shed from secretory granules of NK and myeloid cells.

Noriko Toyama-Sorimachi*¹⁾, Masayuki Miyasaka*²⁾

key words : CD44, serglycin, adhesion molecule

免疫系ではさまざまな接着分子の関与が知られているが、特に CD44 はヒアルロン酸のレセプターとして知られ、炎症反応への関与が推測されている。また、リンパ球ホーミングへの関与とともに、T細胞の活性化に関連した分子としても注目されている。さらに、CD44 は悪性腫瘍の転移に関与することが報告され、その構造と機能について研究が進みつつある。

本稿では、CD44 分子の構造と機能、機能調節機構について概説するとともに、最近筆者らが同定した CD44 の新しいリガンド serglycin について述べる。

CD44 の構造と機能

CD44 は、Pgp-1, Hermes 抗原, ECMR III, In (Lu)-related antigen とよばれる膜貫通型の糖蛋白質である^{1,2)}。白血球、赤血球、線維芽細胞、

上皮細胞、血管内皮細胞などに発現され、その分布は広範である^{1,2)}。

CD44 はヒアルロン酸に対する細胞表面レセプターであるが、コラーゲン、フィブロンectin に対しても結合性を示し、細胞外基質への接着を仲介する接着分子である。N 末端には軟骨リンク蛋白質 (cartilage link protein) に相同性を示す領域があり、ここにヒアルロン酸が結合する (図 1)³⁾。ヒアルロン酸結合には、特に 41 番目のアルギニンが重要で、リンク蛋白質相同ドメインより細胞膜側に存在する 152 番目のリジン、162 番目のアルギニンも重要であることが報告されている⁴⁾。

細胞内領域はアクチン線維に結合していると考えられるが⁵⁾、アイソフォームおよび発現している細胞の種類によって界面活性剤での抽出効率が異なり⁶⁾、CD44 の細胞骨格への会合状態には多様性があると考えられる。さらに、細胞内領域に PKC 様キナーゼ、および GTP が会合するという報告がある^{7,8)}。

CD44 の機能として、ヒアルロン酸を結合することによりその周囲にプロテオグリカンを集め、マトリクスを構築することが示唆されている⁹⁾。

*¹⁾ Department of Immunology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science 東京都臨床医学総合研究所免疫研究部門

*²⁾ Department of Bioregulation, Biomedical Research Center, Osaka University Medical School 大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター臓器制御学研究部

図1 CD44の分子構造

膜貫通型の糖蛋白質で、N末端に軟骨リンク蛋白質に相同性を示すドメインが存在する。コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸が付加する分子種も存在することから、細胞表面プロテオグリカンとしても分類される。■ 軟骨リンク蛋白質に相同性を示す部分、▨ アイソフォームによって異なる配列をもつ部分、▮ 膜貫通領域、●— N型糖鎖修飾部位、○— O型糖鎖修飾部位、(GAG)— グリコサミノグリカン鎖修飾部位、(P) リン酸化を受けるセリン残基、◀ 挿入配列が認められる部位。

このような機能は特に間質細胞上のCD44にとり重要かもしれない。一方、リンパ球系においてはCD44の細胞内情報伝達分子としての機能が重視されている。CD44からの刺激は、細胞内 Ca^{2+} 濃

度を上昇させる。抗CD44抗体で休止期リンパ球を処理すると急速にLFA-1が活性化され、LFA-1-ICAM-1依存性同種細胞凝集が誘導される¹⁰⁾。さらに、抗CD2抗体によるT細胞の増殖が抗CD44抗体によって増強されること¹¹⁾、細胞傷害性T細胞クローンの細胞傷害活性が誘導されることなどが報告されている¹²⁾。さらに、CD44からの刺激は複数の蛋白質をリン酸化し、 $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$ T細胞においては、グランザイムの放出を誘導することによってCTL活性を上昇させる¹³⁾。

これらの現象においてCD44が認識するリガンドは必ずしも明らかにされていない。造血系においては、ミエロイド系細胞の分化にCD44とヒアルロン酸を介した接着経路の重要性が明らかにされている^{14,15)}。さらに最近、T細胞の活性化に関与する細胞表面上の新しいCD44のリガンドとしてクラスIIのinvariant chainが示唆されている。

CD44はリンパ球ホーミングレセプターのひとつとされるが、これに関しても不明な点が多い。凍結切片上でリンパ球はCD44依存性が高内皮細静脈に結合するが¹⁷⁾、この結合はヒアルロン酸結合を阻害しない抗体により阻害される。このことは、CD44が認識する高内皮細静脈上のリガンドがヒアルロン酸でないことを示唆する。それでは、この場合のCD44のリガンドの性状は、あるいはCD44のように広範な組織分布をもつ接着分子がホーミングのような特異性の高い現象をどのように担うのか、などは未解決の問題として残されている¹²⁾。

CD44のアイソフォーム

CD44には、alternative splicingによって生じる多数のアイソフォームが存在する(図2)¹⁾。組織、細胞種などによって発現しているアイソフォームは異なり、もっとも広範に存在するアイソフォームの分子量は80~90 kDaのいわゆるhematopoietic formである。現在、ヒトにおいてはすでにアイソフォーム特異的なモノクローナル抗体が入手可能となり、その組織、あるいは細胞種における局在が解析できるようになっている²⁰⁾。末梢T細胞では、抗CD3抗体、PMA、抗原などの刺激でV6エクソンの発現が認められるようになる^{21,22)}。このときV6エクソンを含む複

図 2 種々の CD44 アイソフォーム

CD44 には 10 個のエクソンの組合わせによって生じる複数のアイソフォームが存在する。特に variant exon 6 (矢印) はある種の癌細胞に高率に発現している。

数のアイソフォームが発現誘導される²³⁾。

CD44 の機能調節機構

CD44 はかなり広範に発現されていることから、発現量の調節よりも、質的な活性化機構が重要であると考えられている。しかし、量的な調節機構も存在する。V6 エクソンは抗原刺激によって正常細胞の一部にも発現誘導されるようになる^{21,22)}、ある種のアイソフォームは特定の活性化刺激によって量的な発現調節を受けるのかもしれない。

質的な機能変換あるいは活性化は、hematopoietic form でよく解析されている。末梢リンパ球上の CD44 は、通常ヒアルロン酸結合能をもたないが、PMA などで刺激すると、CD44 の発現量が増加することなしに速やかにヒアルロン酸に結合するようになる²³⁾。この結果は、CD44 のヒアルロン酸結合能が細胞内からのシグナルによって調節されていることを示唆しているが、その分子機序は明らかではない。ある特定のエピトープを認識する抗 CD44 抗体 IRAWB14 は、CD44 のヒアルロン酸への結合を誘導することができる²⁴⁾。この抗体による活性化は、CD44 の細胞内領域を必要とせず、4°C でも起こる。これらの事実は、CD44 の機能を調節するようななんらかのリガンドが存在し、立体構造の変化が CD44 の活性化に重要であることを推測させる。このような調節機構は、

複数のリガンドに結合しうる接着分子が特定のリガンドを識別するのに役立っているのかもしれない。

CD44 に未知のリガンドは存在するのか

CD44 はヒアルロン酸のレセプターとしてのみ考えられがちである。しかしながら、多数の CD44 アイソフォームの存在と、CD44 の多彩な機能を考え合わせると、ヒアルロン酸のみが natural ligand であるとは考えにくい。アイソフォーム特異的なリガンドの存在が推測されているとともに、リンパ球ホーミングレセプターとして CD44 が認識するリガンドはヒアルロン酸ではないことが示唆されている²⁵⁾。

CD44 の新しいリガンド serglycin

筆者らは、当初 CD44 の機能調節機構を解析する目的で、CD44 陰性マウス CTL 細胞株 CTLL-2 にマウス CD44 cDNA (hematopoietic form) を導入し、数種類のトランスフェクタントを得た。得られたトランスフェクタントでは Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 非存在下で強い同種細胞凝集を示した。この細胞凝集は抗 CD44 抗体の添加で完全に阻害されることから、導入した CD44 が関与していると考えられた。しかし、ヒアルロニダーゼ処理では細胞凝集はまったく影響を受けず、非ヒアルロン酸性のリガンドが関与していることが示唆された。また、

gp600 **BMMC** (83) S N Y D D Y G X G X G X G X G X G X G S G S G S (106)
RBL (84) P I S D D Y - S G S G S G S G S G S G S G S G S (106)
HL60 (88) P L S E D Y - S G S G F G S G S G S G S G S - - (108)

図 3 gp600 のアミノ酸配列と既知の各種 serglycin アミノ酸配列との比較

BMMC : mouse bone marrow derived mast cells. RBL : rat basophilic leukemia-1 cells.

HL-60 : human myeloid cell line HL-60. 黒枠がかかっているところは相同配列。Ser-Gly の繰り返し配列が見られるのが serglycin の特徴である。

コラーゲン、フィブロネクチンもトランスフェクタントの同種細胞凝集には影響を与えないことから、新しい CD44 リガンドが関与していることが予想された。

そこで、CD44 の細胞外領域と免疫グロブリン定常領域を連結して作製した可溶性 CD44(CD44-Ig)をプローブとして CD44 のリガンド検索を行った。CD44-Ig を用いたフローサイトメトリーでは、CTLL-2 およびトランスフェクタントの細胞表面には CD44 が結合しうる分子は検出されなかった。そこで CTLL-2 およびトランスフェクタントを ^{35}S -メチオニンで標識し、その培養上清を用いて CD44-Ig で免疫沈降を行ったところ、CD44-Ig で特異的に免疫沈降される高分子量の蛋白質(gp600)が認められた。CTLL-2 およびトランスフェクタントの培養上清を CD44 陽性 BW5147 細胞に添加すると、BW5147 細胞の同種細胞凝集が誘導され、この細胞凝集は抗 CD44 抗体によって阻害された。このことから、培養上清中に存在する gp600 が CD44 結合蛋白質として CD44 依存性同種細胞凝集に関与していることが示唆された。gp600 にヒアルロン酸が含まれていないことを確認するために、 ^{35}S -メチオニンで培養上清を標識したあと、ヒアルロニダーゼで処理し、CD44-Ig で免疫沈降される gp600 の放射活性を測定した。免疫沈降物の放射活性はヒアルロニダーゼでまったく影響を受けないことから、gp600 へのヒアルロン酸の混入は否定され、この結果からも gp600 が新しい CD44 のリガンドである可能性が示唆された。

最近、種々の硫酸化糖が接着分子のリガンドであることが明らかとなっていることから、gp600が硫酸化糖を含むかどうかを調べてみた。³⁵S-sul-

fate で CTLL-2 を標識し, CD44-Ig で免疫沈降を行ったところ, gp600 が特異的に免疫沈降された. gp600 は硫酸化糖を持つ糖蛋白質であることから, 種々の酵素に対する感受性を調べてみると, コンドロイチナーゼ ABC および ACII 処理によって gp600 は低分子化し, コア蛋白質と考えられる 18~22 kDa のバンドが出現した. コンドロイチナーゼ ABC の阻害剤である Zn^{2+} およびデルマタン硫酸の存在下では gp600 は分解されないことから, gp600 は約 18~22 kDa のコア蛋白質とコンドロイチナーゼ感受性のグリコサミノグリカン側鎖からなるプロテオグリカンである可能性が強く示唆された.

Aruffo らによって、CD44 がコンドロイチン硫酸に結合することが示唆されているが、筆者らの実験では精製コンドロイチン、およびコンドロイチン 4 硫酸、コンドロイチン 6 硫酸への CD44-Ig の結合はほとんど認められなかった。したがって CD44 は、gp600 コア蛋白質そのものあるいは上記のコンドロイチン硫酸とは構造的に異なるタイプのコンドロイチン硫酸を認識している可能性が考えられる。gp600 を精製し、コア蛋白質のアミノ酸配列を同定した結果、gp600 は CTL, NK 細胞、肥満細胞をはじめとする免疫系細胞の分泌顆粒内に存在する、serglycin であることが明らかになった(図 3)。

構成二糖を解析した結果、コンドロイチナーゼ感受性の糖鎖のうち、95%以上がコンドロイチン4硫酸であることが明らかになった。serglycin は細胞内に貯蔵されている物質であるが、さまざまな刺激により細胞外に放出される。興味深いことに、CD44 細胞を用いた CTL アッセイにおいて gp600 を共存させると細胞傷害性を亢進させる

図4 CD44 と serglycin の相互作用

serglycin は、免疫系、造血系の一部の細胞の細胞内顆粒に存在するが、細胞の活性化とともに細胞外に放出される。そして、同種細胞凝集、異種細胞間の接着強化、CD44 陽性細胞の活性化などに関与するのかもしれない。

が、ヒアルロン酸はこの機能をもたない。このことは CTL が用いる CD44 の natural ligand が serglycin である可能性を示唆している。興味深いことに、ヒアルロン酸の局在が広範であるのにくらべ、serglycin は主に免疫系、造血系に存在し、このことから免疫細胞上の CD44 の natural ligand の候補として serglycin は注目される。また、通常細胞内に貯蔵され、刺激とともに細胞外に放出されたため“有事”にのみ使用されるリガンドなのかもしれない(図4)。

癌転移と CD44

CD44 が癌の転移に関与する接着分子であると考えられるようになったのは、ラット膀胱癌の高転移株の cDNA から低転移株の cDNA をサブトラクトし、転移に関与する遺伝子として単離したものが CD44 のアイソフォームの一つであったためである¹⁹⁾。V6 エクソンの発現は転移能と相関するという報告も多いが^{19,20)}。リンパ腫の場合、悪性腫瘍化で V6 エクソンが消失するものもある²⁰⁾。ヒ

ト大腸癌では他のエクソンの優先的な発現が報告されている²⁸⁾。

マウスでは組換え可溶性 CD44 でリンパ腫の増殖が阻害されることが報告されている。ヒトバークリットリンパ腫 Namalwa 細胞に hematopoietic form, epithelial form の CD44 cDNA をそれぞれ遺伝子導入し、ヌードマウスでの転移能を比較すると、増殖、転移能とも hematopoietic form CD44 のトランスフェクタントで増強しており、このトランスフェクタントのヌードマウスにおける増殖が可溶性 CD44 で阻害される²⁹⁾。さらに、リンパ腫が増殖している組織でヒアルロン酸の産生が増加していることも報告された。しかし、そのメカニズムは不明である。ras の活性化は CD44 の発現量を増加させるが、V6 エクソンの選択的 alternative splicing を引き起こすものではない³⁰⁾。V6 がどのように転移に関与するのか、V6 エクソンと他のエクソンの組み合わせの特異性はあるのかどうか、また、V6 エクソンの特異的 splicing を規定する因子が存在するのかなどは興

味深い問題である。先に述べた serglycin の癌転移への関与の有無は現在のところまったく不明である。

文 献

- 1) Lesley, J., Hyman, R., Kincade, P. : Adv. Immunol. 54 : 271-335, 1993.
- 2) 反町典子, 宮坂昌之 : Medical Immunology 24(5), 564-571, 1992.
- 3) Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M. et al. : Cell 61 : 1303-1313, 1990.
- 4) Peach, R. J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I. et al. : J. Cell Biol. 122 : 257-264, 1993.
- 5) Lacy, B. E., Underhill, C. B. : J. Cell Biol. 105 : 1395-1404, 1987.
- 6) Neame, S. J., Isacke, C. M. : J. Cell Biol. 121 : 1299-1310, 1993.
- 7) Kalomiris, E. L., Bourguignon, L. Y. W. : J. Biol. Chem. 264 : 8113-8119, 1989.
- 8) Lokeshwar, V. B., Bourguignon, L. Y. W. : J. Biol. Chem. 267 : 22073-22078, 1992.
- 9) Knudson, W., Bartnik, E., Knudson, C. B. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 4003-4117, 1993.
- 10) Koopman, G., van Kooyk, Y., de Graaff, M. et al. : J. Biol. Chem. 145 : 3589-3593, 1990.
- 11) Denning, S. M., Le, P. T., Singer, K. H. et al. : J. Immunol. 144 : 7-15, 1990.
- 12) Seth, A., Gote, L., Magarkatti, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 7877-7881, 1991.
- 13) Galandrini, R., Albi, N., Tripodi, G. et al. : J. Immunol. 150 : 4225-4235, 1993.
- 14) Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S-I. et al. : J. Exp. Med. 171 : 477-488, 1990.
- 15) Miyake, K., Underhill, C. B., Lesley, J. et al. : J. Exp. Med. 172 : 69-75, 1990.
- 16) Naujokas, M. F., Morin, M., Anderson, M. S. et al. : Cell 74 : 257-268, 1993.
- 17) Jalkanen, S., Bargatze, R. F., de los Toyos, J. et al. : J. Cell Biol. 105 : 983-990, 1987.
- 18) Toyama-Sorimachi, N., Miyake, K., Miyasaka, M. : Eur. J. Immunol. 23 : 439-446, 1993.
- 19) Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W. et al. : Cell 66 : 13-24, 1991.
- 20) Salmi, M., Gron-Virta, K., Sointu, P. et al. : J. Cell Biol. 122 : 431-442, 1993.
- 21) Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M. et al. : Science 257 : 682-685, 1992.
- 22) Koopman, G., Heider, K.-H., Horst, E. et al. : J. Exp. Med. 177 : 897-904, 1993.
- 23) Hyman, R., Lesley, J., Schulte, R. : Immunogenetics 33 : 392-395, 1991.
- 24) Lesley, J., He, Q., Miyake, K. et al. : J. Exp. Med. 175 : 257-266, 1992.
- 25) Culty, M., Miyake, K., Kincade, P. et al. : J. Cell Biol. 111 : 2765-2774, 1990.
- 26) Toyama-Sorimachi, N., Miyasaka, M. : Molecular Basis of Immune Responses. Academic Press, 1993, p49-57.
- 27) Toyama-Sorimachi, N., Miyasaka, M. : Int. Immunol. 6 : 655-660, 1994.
- 28) Tanabe, K. K., Ellis, L. M., Saya, H. : Lancet 341 : 725-726, 1993.
- 29) Sy, S.-M., Guo, Y.-J., Stamenkovic, I. : J. Exp. Med. 176 : 623-627, 1992.
- 30) Hofmann, M., Ruby, W., Gunthert, U. : Cancer Res. 53 : 1516-1521, 1993.