フラクタルカイン

梅原久範・合田征司・堂前尚親*

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

Fractalkine

Leukocyte adhesion and trafficking at the endothelium requires both cellular adhesion molecules and chemotactic factors. A newly identified CX₃C-chemokine, fractalkine, expressed on activated endothelial cells, plays an important role in leukocyte adhesion and migration. We found that THP-1 cells, expressing mRNA for fractalkine receptor, CX₃CR 1 efficiently adhered to the membrane-bound form of fractalkine expressed on ECV 304 cells or TNF- α -activated HUVECs. Soluble-fractalkine also enhanced adhesion of THP-1 cells to fibronectin and ICAM-1 in a dose-dependent manner.

However, soluble fractalkine induced little chemotaxis in THP-1 cells in comparison to MCP-1 which induced a strong chemotactic response. Moreover, the membrane form of fractalkine expressed on ECV 304 cells reduced MCP-1-mediated chemotaxis of THP-1 cells. Furthermore, soluble fractalkine enhanced NK cell cytolytic activity against K 562 target cells by enhancing granular exocytosis. Transfection of fractalkine cDNA into ECV 304 cells or HUVECs resulted in increased susceptibility to NK cell-mediated cytotoxicity compared to control transfection. Together, these results indicate that fractalkine plays an important role not only in the binding of monocytes and NK cells to endothelial cells by enhancing integrin avidity, but also in NK cell-mediated endothelium damage, which may result in vascular injury.

Rec. 9/4/2000, Acc. 9/25/2000, pp 49~54

Hisanori Umehara・Seiji Goda・Naochika Domae*

key words : fractalkine, THP-1 cell, NK cells, endothelial cells, vascular injury

急性および慢性の感染症、自己免疫疾患、アレルギー性疾患などの炎症性疾患では、T細胞やマクロファージを中心とするリンパ系細胞の集簇的浸潤が認められる。また、腫瘍周囲や移植臓器拒絶片においても同様の細胞浸潤が認められる。近年、接着分子やケモカインに関する膨大な研究成果によって、免疫担当細胞の流血中から組織中への移行のメカニズムが急速に解明されつつある。免疫担当細胞は接着カスケードというステップを

経て組織中へ移行するが、免疫担当細胞が最初に接触するのが血管内皮細胞である¹⁾。新たに発見されたフラクタルカインは、活性化血管内皮細胞上に発現し、ケモカインとしての遊走活性と接着分子としての機能を合わせもつユニークなケモカインである^{2~4)}。

本稿では接着性ケモカインであるフラクタルカインについて紹介し、単球と血管内皮細胞との接着⁵⁾やNK細胞による血管内皮細胞傷害におけるフラクタルカインの関与⁶⁾について筆者らの最新の結果を交えながら概説したい。

* Department of Internal Medicine, Osaka Dental University 大阪歯科大学内科学講座

Offprint requests to : Hisanori Umehara, Department of Internal Medicine, Osaka Dental University, 8-1 Kuzuha Hanazono-cho, Hirakata-shi, Osaka 573-1121, Japan

図1 フラクタルカインの分子構造

図2 接着カスケードとフラクタルカイン

一般に血流中のリンパ球は、① セレクチンを介したローリング(rolling, tethering), ② プロテオグリカン上に提示されたケモカインによるインテグリンの活性化(triggering), ③ 活性化インテグリンによる強固な接着(firm adhesion), ④ ケモカイン濃度に応じた細胞浸潤(transmigration)という一連のステップで組織中へ移行する(上段)。一方、膜結合型フラクタルカイン(FKN)は、①～③のステップをバイパスし単独で強固な接着を誘導する(下段)(文献⁹⁾より改編)。

フラクタルカインとフラクタルカイン receptor(CX₃CR1)

細胞遊走活性を有するケモカインは、特徴的な cystein 配列を有する塩基性でヘパリン結合性の強い蛋白質である。一般的にケモカインは最初の二つの cystein 残基の形式により CXC-, CC-, C-, CX₃C-サブファミリーに分類されている。フラクタルカインははじめの二つの cystein の間に

三つのアミノ酸残基をもつ CX₃C-ケモカインで、分子量は可溶性型で 95 kDa である。また、ほかのケモカインが分泌型として産生されるのに対して、フラクタルカインは巨大なムチン領域とそれにつづく細胞膜貫通領域、細胞内領域をもち、細胞表面に膜蛋白質として存在するというまったく新しいタイプのケモカインである²⁻⁴⁾(図1)。

フラクタルカイン receptor である CX₃CR1 は

図3 血管内皮細胞におけるフラクタルカインの発現

血管内皮細胞株 ECV 304 にフラクタルカインを遺伝子導入(A-C:太線),あるいはヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)をTNF- α (100 ng/ml)で16時間刺激(D-F:太線)し,細胞表面のICAM-1, VCAM-1およびfractalkineの発現をFACS解析した(文献⁵⁾より引用).

ほかのケモカインレセプターと同様に7回膜貫通G蛋白結合型で,リンパ球では主にNK細胞,単球,CD8陽性T細胞の一部にその発現が認められる⁷⁾.フラクタルカインはTNF- α やIL-1などで活性化された血管内皮細胞で発現が認められ,リンパ球の組織中への移行に深く関与している(後述).

接着能と遊走能

可溶性フラクタルカインがNK細胞や単球に遊走活性を示すことはすでに報告されていたが^{2,3)}, Imaiらは, CX₃CR1発現細胞がインテグリンやセレクトイン非存在下に固層化フラクタルカインに接着することを示した⁷⁾.すなわち,これまでの分泌型ケモカインがプロテオグリカン上に結合してはじめてリンパ球に提示されるのに対して,フラクタルカインは自己のムチン領域上にケモカイン領域が結合しているためにリンパ球へ直接に提示されることが明らかとなった.

これまで流血中のリンパ球の血管外への浸潤には,①E-,L-selectinを介したrollingやtethering,②ケモカインによるインテグリンの活性化(triggering),③活性化インテグリンを介した強固な接着(firm adhesion),④ケモカイン濃度に応じたtransmigrationという一連の接着カスケードが存在すると報告されていた⁸⁾.しかし,フラクタルカインは上述の①~③のステップを大きくバイパスし,セレクトインやインテグリンの関与なしに速やかに接着を誘導することが確認されている^{4,7)}(図2).

しかしながら,血管内皮細胞のTNF- α やIL-1などの炎症性サイトカインによる活性化の際には,フラクタルカインの発現と同時に,LFA-1やVLAのリガンドであるICAM-1やVCAM-1の発現も著明に増強している(図3).したがって,実際の細胞接着においてはフラクタルカイン/CX₃CR1の結合に加え,LFA-1/ICAM-1やVLA/VCAM-1の結合が複雑に作用していると考えら

図4 THP-1細胞のTNF- α 刺激HUVECに対する接着

Calcein 標識 THP-1 細胞を非刺激および TNF- α (100 ng/ml) で 16 時間刺激後の HUVEC に加え、細胞接着を算出した。THP-1 細胞を抗インテグリン抗体および可溶性フラクタルカインで 30 分前処理し、細胞接着に及ぼす抑制効果を検討した。THP-1 細胞は、TNF- α 活性化 HUVEC に過剰に接着した。この細胞接着の増強は、抗インテグリン抗体や可溶性フラクタルカインにより部分的に抑制されたが、すべてを加えることによりもっとも強い抑制効果が認められた(文献⁵⁾より引用)。

れる。

筆者らは、単球系細胞株である THP-1 細胞がインテグリン分子と同時に CX₃CR1 を発現していることを見出し、フラクタルカインとインテグリンとの相互作用について検討を行った⁵⁾。THP-1 細胞は固相化フラクタルカインに対して単独でも接着するが、可溶性フラクタルカインはほかのケモカインと同様に THP-1 細胞の ICAM-1 やファイブロネクチンに対する接着能をも増強した。この接着増強が、G 蛋白阻害剤である百日咳毒素によって完全に抑制されることより、フラクタルカインによる G 蛋白を介したインテグリンの活性化の結果であることが明らかになった。

さらに、フラクタルカインと ICAM-1 やファイブロネクチンなどのインテグリンのリガンドを同時に固相化すると、相乗的な細胞接着が誘導される。実際に、TNF- α 刺激の有無により臍胎血管内

図5 フラクタルカインの遊走能

(A) THP-1 細胞の遊走に及ぼす MCP-1 およびフラクタルカインの効果、chemotaxis chamber を用いて検討した。下層に段階希釈した MCP-1 およびフラクタルカインを加え、4 時間で遊走してくる細胞数を測定した。MCP-1 (100 nM) で強い遊走活性が認められたのに比べ、フラクタルカインでは遊走増強効果は認められなかった。(B) THP-1 細胞の ECV 細胞とフラクタルカイン遺伝子発現 ECV 細胞に対する細胞通過性(transmigration)を検討した。上層でコントロール ECV 細胞とフラクタルカイン遺伝子発現 ECV 細胞を 48 時間培養し、下層に 100 nM の MCP-1 とフラクタルカインを加え、THP-1 細胞の遊走活性を比較した。フラクタルカイン発現 ECV 細胞上では、THP-1 細胞の細胞通過性はむしろ減弱していた(文献⁹⁾より引用)。

皮細胞(HUVEC)と THP-1 細胞との接着を検討すると、両者の細胞接着は TNF- α 刺激により著明に増強した。この接着は抗インテグリン抗体や

可溶型フラクタルカインにより部分的に抑制されるが、両者の組み合わせにより著明に抑制された(図4)。興味深いことに、フラクタルカインのTHP-1細胞に対する遊走活性はMCP-1やRANTESなどほかのケモカインに比べ非常に弱く、ECV 304細胞にフラクタルカインを発現させるとTHP-1細胞のtransmigrationはむしろ低下していた(図5)。これは、フラクタルカインが自身の接着能とさらにインテグリン活性化能により強固にECV細胞と接着した結果、MCP-1による細胞遊走を抑制したためと考えられる。

以上の事実より、フラクタルカインは遊走因子というよりはむしろ接着分子として機能している可能性がある(論文投稿中)⁹⁾。もちろん、細胞種による相違を考慮にいれねばならないが、IL-8においても同様の接着増強作用が単球と血管内皮細胞との接着において報告されている¹⁰⁾。

NK細胞に対する作用と血管傷害

NK細胞が抗腫瘍活性を発揮するためには、腫瘍細胞との接着によるNK活性化レセプターの架橋刺激が必要である^{11,12)}。そのためには、NK細胞が流血中から効率よく腫瘍周囲へ集積していかねばならない。NK細胞やLAK(lymphokine activated killer)細胞を用いた現在までの養子免疫療法が十分に臨床効果を発揮できていない原因は、エフェクター細胞が完全に腫瘍細胞を殺傷しえないことによるが、血管内皮細胞自身の傷害による血管漏出症候群(vascular leak syndrome)とよばれる副作用のためでもある。

そこで筆者らは、フラクタルカインのNK活性に及ぼす影響と、血管内皮細胞傷害との関係について検討を行った⁶⁾。Negative selection法で分離したNK細胞は、CX₃CR1を強く発現し、固相化フラクタルカインに対して著明な接着能を示した。可溶型フラクタルカインはNK細胞からの顆粒放出を濃度依存性に増強し、K 562腫瘍細胞に対するNK活性をも増強することが明らかになった。さらに、フラクタルカイン遺伝子導入ECV細胞やHUVECをtargetにNK活性を調べてみると、全例においてフラクタルカイン発現

細胞はコントロール細胞に比べ著明に傷害された。しかも、この傷害は可溶性フラクタルカインによってNK細胞と内皮細胞との接着を阻止することによりほぼ完全に抑制された。

これらの結果は、フラクタルカインが接着分子としてNK細胞と血管内皮細胞とを結合させているだけではなく、NK細胞上のCX₃CR1がNK活性化receptorとして機能していることを示している^{6,13,14)}。実験動物においては、TNF- α やIL-1による心臓の冠血管や心内膜でのフラクタルカインの発現が報告されており¹⁵⁾、ヒトにおいても正常の肺と胸腺の血管内皮でフラクタルカインの発現が確認されている¹⁶⁾。養子免疫療法に伴う血管漏出症候群では、IL-2によるNK活性の増強と2次的な炎症性サイトカインの産生によるフラクタルカインの過剰発現が起こり、血管内皮細胞が傷害されている可能性がある。同様に、膠原病などの慢性炎症における血管炎や臓器移植拒絶反応時の栄養血管への細胞浸潤、shear stressによる内皮細胞の変成と単球浸潤を伴う動脈硬化などの病変部にフラクタルカインが関与している可能性も考えられる。

今後、フラクタルカインに関するさらなる解析により、疾患の病因解明のみならず治療法に結びつく研究成果が得られることを望んで止まない。

文 献

- 1) Montovani A, Bussolino F, Introna M: Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 18: 231-240, 1997.
- 2) Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Ross D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature* 385: 640-644, 1997.
- 3) Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo J-A, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D: Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387: 611-617, 1997.
- 4) 今井俊夫: フラクタルカイン、ケモカインと細胞接着分子の性質をもつハイブリッド分子. *細胞工学* 17: 1046-1053, 1998.
- 5) Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H: CX₃C-chemokine, fractalkine en-

- hanced adhesion of THP cells to endothelial cells through integrin-dependent and independent mechanisms. *J Immunol* 164 : 4313-4320, 2000.
- 6) Yoneda O, Imai T, Gouda S, Inoue H, Yamauchi A, Okazaki T, Yoshie O, Domae N, Umehara H : NK cell-mediated vascular injury. *J Immunol* 164 : 4055-4062, 2000.
 - 7) Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O : Identification and molecular characterization of Fractalkine receptor CX₃CR 1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91 : 521-530, 1997.
 - 8) Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S : T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 361 : 79-82, 1993.
 - 9) Umehara H, Imai T, Goda S, Yoneda O, Inoue H, Minami Y, Tanaka Y, Okazaki T, Bloom ET, Domae N : CX₃C-chemokine, fractalkine predominantly functions as an adhesion molecule in monocytic cell line, THP-1 cells. paper submitted.
 - 10) Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y-C, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone Jr MA, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A : MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398 : 718-723, 1999.
 - 11) Umehara H, Huang J-Y, Kono T, Tabassam FH, Okazaki T, Bloom ET, Domae N : Involvement of protein tyrosine kinase p72^{syk} and phosphatidylinositol 3-kinase in CD2-mediated granular exocytosis in natural killer cell line. *J Immunol* 159 : 1200-1207, 1997.
 - 12) 梅原久範, 米田 修, 堂前尚親 : NK 活性と CD2. *臨床免疫* 31 : 32-39, 1999.
 - 13) 梅原久範 : 接着性ケモカイン, フラクタルカイン. *日本臨床免疫学会会誌* 23 : 90-102, 2000.
 - 14) 梅原久範 : NK 細胞とケモカイン. *医学のあゆみ* 190 : 821-822, 1999.
 - 15) Harrison JK, Jiang Y, Wees EA, Salafrance MN, Liang H-X, Feng L, Belardinelli L : Inflammatory agents regulate in vivo expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart. *J Leukoc Biol* 66 : 937-944, 1999.
 - 16) Foussat A, Coulomb-L'Hermine A, Gosling J, Krzysiek R, Durand-Gosselin I, Schall T, Balian A, Richard Y, Galanaud P, Emilie D : Fractalkine receptor expression by T lymphocyte subpopulations and in vivo production of fractalkine in human. *Eur J Immunol* 30 : 87-87, 2000.