The Hyaluronate Receptor(CD44)

ヒアルロン酸レセプター(CD44)

Alejandro ARUFFO¹ and Ivan STAMENKOVIC²

¹Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Seattle WA 98121 and

²Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Boston MA 02114, USA, FAX:1-206-728-0543

Abstract

CD44 is a polymorphic family of cell surface glycoproteins expressed by a variety of cells. The CD44 proteins mediate cell-cell and cell-substrate adhesion as well as lymphocyte activation. Here we review the recent isolation and characterization of cDNAs encoding two CD44 proteins, CD44H and CD44E. CD44H is an 80-90 kD glycoprotein expressed by cells of both mesodermal and neuro-ectodermal origin. Adhesion studies have shown that CD44H specifically binds hyaluronan. This observation, in conjunction with the finding that the hamster CD44H protein reacts with a monoclonal antibody directed against the hamster hyaluronan receptor indicates that CD44H and the hyaluronan receptor are the same molecule. CD44E is a 150 kD glycoprotein expressed by a subset of epithelial cells and contains an additional segment of 134 amino acids intercalated within the extracellular domain of CD44H. Adhesion studies indicate that unlike CD44H, CD44E does not mediate attachment to surface bound hyaluronate.

Key Words: *hyaluronate receptor/CD44H/CD44E/adhesion*

要 旨

CD44は多型の分子族で、種々の細胞に発現している細胞表面糖タンパクである。CD44タンパクは、リンパ球の活性化のような細胞-細胞及び細胞-基質の接着を媒介する。本稿で私達は、2つのCD44タンパク、CD44H及びCD44EをコードするcDNAを分離し性状解析を行なった最近の仕事を紹介する。CD44Hは80-90 kDの糖タンパクで中胚葉性及び神経-外胚葉性由来細胞のどちらにも発現している。接着実験によるとCD44Hはヒアルロン酸に特異的に結合する。この観察と、ハムスターのCD44Hタンパクはハムスターヒアルロン酸レセプターに対する単クローン抗体と反応するという発見とを併せ考えると、CD44Hとヒアルロン酸レセプターは同一の分子であることがわかる。CD44Eは160 kDの糖タンパクで上皮細胞の一つのサブセットに発現しており、CD44Hの細胞外ドメインに134アミノ酸からなる断片が余分に挿入されている。接着実験によれば、CD44Hとは異なり、CD44Eは表面結合性ヒアルロン酸への接着を媒介しない。

A. Introduction

The role of glycosaminoglycans in cell biology has solicited increasing interest in the past several years. Glycosaminoglycans are large carbohydrates composed of repeating disaccharide units and are present in four principal forms: heparin and heparan sulfate, chondroitin sulphate and dermatan sulfate, keratan sulfate and hyaluronate. The first three forms are sulfated and invariably bound to a protein core, the protein-glycosaminoglycan ensemble forming a proteoglycan. Hyaluronate, however, is produced as a free glycosaminoglycan and is devoid of sulfate groups. Excellent reviews of the structure and function of glycosaminoglycans can be found elsewhere(1). This review will focus on the cell surface receptor for hyaluronate and its possible roles in various sectors of biology.

Hyaluronate is a linear polysaccharide with the structure $[\beta(1-4)\text{-D-glucuronic acid } \beta(1-3) \text{ N-acetyl-D-glucosamine}]_n$. It is synthesized by both procaryotic and eukaryotic cells with the aid of hyaluronate synthetase, an enzyme located in eukaryotic plasma membrane which synthesizes hyaluronate directly in the extracellular environment(2). Chains are elongated at the reducing end by alternate transfer to the substrates UDP-glucu-

A. はじめに

ここ数年来グリコサミノグリカンの細胞生物学的な役割は何か、ということについて興味が増してきている。グリコサミノグリカンは二糖を単位とし、そのくり返しからなっている高分子糖質で4つの基本型がある。すなわちヘパリンとヘパラン硫酸；コンドロイチン硫酸とデルマタン硫酸；ケラタン硫酸、およびヒアルロン酸である。始めの3つは硫酸基をもち、常にタンパク質のコアにくっついていて、タンバク-グリコサミノグリカン複合体としてプロテオグリカンを形成している。これに対してヒアルロン酸は遊離のグリコサミノグリカンとして作られ、硫酸基をもたない。グリコサミノグリカンの構造と機能については他にすぐれた総説がある(1)。この総説では細胞表面のヒアルロン酸レセプターとその生物学の様々な領域で果たし得る役割という点に焦点をあてたい。

ヒアルロン酸は直鎖状の多糖で、 $[\beta(1-4)\text{-D-グルクロン酸 } \beta(1-3)\text{N-アセチル-D-グルコサミン}]_n$ という構造をもっている。原核、および真核細胞のどちらでも、ヒアルロン酸合成酵素のはたらきにより合成される。この酵素は真核細胞の細胞膜に局在していて、その細胞膜だけでも直接ヒアルロン酸を合成できる(2)。糖鎖は還元末端に基質のUDP-グルクロン酸とUDP-N-ア

ronic acid and UDP-*N*-acetylglucosamine. Because fibroblasts produce hyaluronate abundantly, hyaluronate is one of the principal glycosaminoglycan in the extracellular matrix (ECM) of most mammalian organs (3, 4).

Hardly any of the ECM hyaluronate is found in free form. Rather, hyaluronate has been proposed to be bound to link proteins and proteoglycans thus helping create a stable macromolecular lattice (5, 6). Because of its physical properties, hyaluronate was initially believed to regulate cell trafficking through tissues by creating a highly hydrated, low resistance matrix (7, 8). Although this view is still valid, cumulating evidence suggests that hyaluronate may have a more complex role which includes regulation of cell mitosis, growth, adhesion and locomotion.

Increased hyaluronate production has been observed in several settings related to cellular proliferation and migration. These include embryogenesis and limb development, tumor invasion and metastasis and inflammation. That hyaluronate interacts with the surface of a variety of cell types has been suggested for some time (9), but the nature of the interaction was initially unclear. Further studies presented evidence that fibroblasts express a high affinity receptor for hyaluronate which appeared to be an 85 kD glycoprotein (10, 11). Recently, the human cell surface molecule, CD44, has been shown to be the cell surface receptor for hyaluronate (12-14). The functional importance of CD44 has been demonstrated in several areas. The presence of the hyaluronate receptor on the surface of macrophages has been shown to mediate both macrophage aggregation (15) and macrophage disappearance reaction (15-17). Consistent with these observations is the finding that cells transfected with CD44 acquire new adhesive properties (18). Anti-CD44 monoclonal antibodies (mAb) have been shown to partially block erythrocyte rosetting and stimulate T cell activation in conjunction with other anti-T cell antibodies (19-21). Expression of CD44 has been found to increase in malignancies (22) and proliferating cells (23).

Recently, a second isoform of CD44 (CD44E) has been identified in a subset of epithelial cells (24). Although it is structurally related to the hyaluronate receptor isoform (CD44H), its functional characteristics appear to be different, in that unlike CD44H, it fails to display high affinity for surface-bound hyaluronate. In this article we review the identification and characterization of both CD44 isoforms as well as some preliminary data regarding their respective role in tumorigenesis.

B. The CD44 Molecule

Prior to its inclusion into the CD44 cluster designation, CD44 had been identified by a variety of mAb in both murine and human cells. The first mAb to CD44 was developed by Dalchau *et al.* (25) and shown to react with a determinant on cortical thymocytes, lymphocytes, granulocytes and brain cells. Shortly thereafter, a polymorphic murine 80 kD molecule expressed in fibroblasts, macrophages and granulocytes was de-

セチルグルコサミンを交互に転移することで伸長する。線維芽細胞はヒアルロン酸を多量に産生するので、ヒアルロン酸はほとんどの哺乳類の器官の、細胞外マトリックス (ECM) における主要なグリコサミノグリカンの一つである (3, 4)。

ECMのヒアルロン酸はどれをとっても遊離の状態で見出すのはむずかしい。どちらかというとヒアルロン酸はリンクプロテインやプロテオグリカンにくっついていて、安定な高分子格子を形成しやすくしているのだらうと考えられている (5, 6)。ヒアルロン酸は物理的性質から考えて、以前は、高度に水和されて抵抗の少ないマトリックスを作り出すことにより、組織を通して細胞が行ったり来たりするのを調節しているのだと信じられていた (7, 8)。こうした見方は今でも正当だが、いろいろな証拠が蓄積してくると、ヒアルロン酸は細胞分裂、増殖、接着および運動を調節して、もっと複雑な役割を担っているらしいことがわかってきた。

ヒアルロン酸合成量の増加は細胞増殖や移動に関わるいくつかの場面で観察されてきている。これには、胚発生と肢芽形成、腫瘍の浸潤と転移および炎症が含まれる。ヒアルロン酸が種々のタイプの細胞表面と相互作用をすることは時として示唆されるところだが (9)、その相互作用がどんなものかは、初めのうち、あまりはっきりしなかった。その後の研究で線維芽細胞がヒアルロン酸に高親和性のレセプターを発現しており、そのものは85 kDの糖タンパクであることがわかってきた (10, 11)。近年、ヒト細胞表面分子CD44が細胞表面ヒアルロン酸レセプターであることが示された (12-14)。CD44の機能的な重要性がいくつかの領域で示されている。マクロファージ表面にヒアルロン酸レセプターが存在することが、マクロファージの集合 (15) 及び離散 (15-17) のどちらの反応にも関係することがわかって来た。これらの観察に一致しているのは、CD44遺伝子をトランスフェクトした細胞が、新たに接着特性を獲得することである。抗CD44単クローン抗体 (mAb) は赤血球ロゼット形成を部分的に阻害すること、また、他の抗T細胞抗体と共同してT細胞活性化を促進することが示されている。CD44の発現は細胞の悪性度を増加させ、また細胞を増殖させることが見出されている (23)。

最近、CD44の第2の異型 (CD44E) が上皮細胞のサブセットの中の一つから同定されている (24)。このものはヒアルロン酸レセプター異型 (CD44H) と構造的には似ているのだが機能は異なり、CD44Hとちがって表面結合ヒアルロン酸への高親和性を欠いている。この論文では私たちはCD44の両型の同定および性状解析について概説するとともに、腫瘍原性におけるそれぞれの役割に関連した若干の予備的なデータについても述べる。

B. CD44分子

CD44クラスターとして纏められるよりも前に、CD44はマウス及びヒトの細胞で種々の単クローン抗体により同定されていた。CD44に対する最初の単クローン抗体はDalchanら (25) が

scribed(26, 27), and called phagocytic glycoprotein-1, or Pgp-1. The same molecule was found to be expressed in murine lymphoid tissue(28-30), particularly in T cell precursors. Subsequently, Pgp-1 was referred to as Ly-24, and at least two alleles, Ly-24.1 and Ly-24.2 were shown to have a different distribution in different murine strains(31).

In 1982, Carter described an 80-90 kD molecule expressed on the surface of fibroblasts and associated with the cytoskeleton(32). More recent experiments by Carter and Wayner suggested that this molecule has the capacity to bind collagens type I and VI(33). The molecule was called extracellular matrix receptor III(ECMR III) and proposed to play an important role in linking the cytoskeleton to the extracellular matrix.

Using monoclonal antibodies, other groups identified an 80-90 kD cell surface molecule expressed in human erythrocytes and T cells(34) whose expression is regulated by the rare autosomal dominant Lutheran inhibitor [In(lu)] gene(35, 36).

More recently, a group of monoclonal antibodies designated as Hermes, was reported to recognize an 80-90 kD cell surface molecule in human lymphocytes(37). One of these mAb blocked binding of lymphocytes to mucosal lymphoid tissue high endothelial venule(HEV) cells(37-39) and it was suggested that the Hermes antigen may be the human homolog of the murine lymphocyte homing receptor recognized by mAb Mel-14 and having a similar 80-90 kD molecular mass(38).

Comparison of the various monoclonal antibodies by several investigators has revealed that F-10-44-2, Pgp-1, ECMR III and Hermes are in fact a single molecule designated as CD44. The broad distribution of CD44 and its implication in interactions with extracellular matrix, and HEV cells as well as in T cell activation suggested that the physiologic ligands mediate functions common to a wide variety of cells.

C. Isolation and Characterization of CD44H

Initial observations suggested that the 80-90 kD form of CD44 may be characteristic of hematopoietic cells and other cells of mesodermal origin. However, it is now clear that the 80-90 kD form is also expressed in cells of neuro-ectodermal origin, including melanomas(22), some colon carcinomas (Stamenkovic unpublished) and neural cells(40). The "H" in CD44H therefore stands for "hyaluronate" since only the 80-90 kD isoform has been observed to mediate high affinity attachment to surface-bound hyaluronate.

Human cDNA clones encoding the hematopoietic/mesodermal form of CD44(CD44H) were isolated independently by expression cloning(22) and oligonucleotide hybridization methods(41). These cDNAs encode a 360 amino acid long polypeptide having the features of a type I membrane protein: a 19 residue N-terminal hydrophobic signal peptide; a 248 amino acid extracellular domain; a 21 amino acid hydrophobic transmembrane domain; and a 72 residue hydrophilic cytoplasmic anchor. The predicted molecular weight for the 341 amino acid

開発したもので、これは皮質部の胸腺細胞、リンパ球、顆粒球および脳細胞上の抗原決定基と反応した。この少し後で、線維芽細胞、マクロファージ及び顆粒球に発現している多型性のマウスの80 kD分子が見出され(27)、これは食細胞性糖タンパク質-1、つまりPgp-1と名付けられた。同じ分子がマウスのリンパ組織の、特にT前駆細胞に発現しているのが見出された(28-30)。続いて、Pgp-1はLy-24に属するものとされ、少なくとも二つの対立形質Ly-24.1及びLy-24.2が、異なったマウスの系統で異なった分布をしていることが示された(31)。

1982年、Carterは線維芽細胞表面に80-90 kDの分子が発現していて、これが細胞骨格とつながっていることを記述している(32)。CarterとWaynerの最近の実験によると、この分子はI型及びVI型のコラーゲンと結合できることが示唆されている(33)。この分子は細胞間マトリックスレセプターⅢ(ECMRⅢ)と呼ばれ、細胞骨格と細胞間マトリックスとをつなぐ重要な役割を担うものと考えられている。

単クローン抗体を用いて、他の研究グループはヒト赤血球及びT細胞に発現している80-90 kDの細胞表面分子を同定しているが、この発現は稀にしかない常染色体優性のLutheran inhibitor[In(lu)]遺伝子により調節を受けている(35, 36)。

ごく最近、Hermesと命名された一群の単クローン抗体が、ヒトリンパ球の80-90 kDの細胞表面分子を認識することが報告された(37)。これらの単クローン抗体のうちのあるものは、リンパ球が粘膜リンパ組織の高内皮細胞性細静脈(HEV)の細胞に結合するのを阻害する(37-39)。これは、Hermes抗原がマウスで単クローン抗体Mel-14で認識され同じように80-90 kDの分子質量をもつリンパ球ホーミングレセプターの、ヒト版であることを示唆している(38)。

別々の研究者により用いられている種々の単クローン抗体を較べて見ると、F-10-44-2、Pgp-1、ECMRⅢ及びHermesは、事実上CD44と命名される同一の分子であることが判った。CD44の広い分布、細胞間マトリックスやHEV細胞との相互作用が示唆されていること、それにT細胞活性化から考えて、生理的なリガンドが仲立ちして多くの種類の細胞に普遍的な機能を与えているものと思われる。

C. CD44Hの単離と性状解析

初期の観察では、CD44の80-90 kD型は造血細胞及び他の中胚葉由来細胞に特徴的らしいと思われた。しかしながら今では80-90 kD型は神経-外胚葉由来の細胞にも発現していることが明らかになっている。メラノーマ(22)、若干の結腸癌(Stamenkovic、未発表)、および神経細胞(40)もこれに含まれる。それ故CD44Hの"H"は、80-90 kD型のもだけが表層結合性のヒアルロン酸に対して高親和性を示すので、"ヒアルロン酸"を表わしている。

CD44の造血性/中胚葉性細胞型分子をコードするヒトcDNAクローンが、発現クローニング(22)およびオリゴヌクレオ

mature polypeptide is 37.2 kD significantly smaller than the 80-90 kD protein recognized by the anti-CD44 monoclonal antibodies on the surface of leukocytes. This suggests that the mature protein is heavily glycosylated and is supported by the observation the extracellular domain of CD44H contains six potential *N*-linked glycosylation sites and a large number of serine and threonine residues which provide potential sites for *O*-linked glycosylation. Comparison of the CD44 amino acid sequence to other reported sequences showed that the amino-terminal portion of the protein (amino acid 21-110) is 30% homologous to the chicken and rat cartilage link proteins and the link B element of the rat proteoglycan core protein. The ~90 amino acid cartilage link protein-homologous segment can in turn be divided into two related tandem elements.

RNA blot hybridization studies carried out with cDNA derived probes indicate that there are a variety of mRNA species present in cells which encode the CD44 protein. DNA blot hybridization studies with these same probes suggest the presence of multiple exons and/or a multigene family. These results are further corroborated by immunoprecipitation studies carried out on a variety of cells known to react with anti-CD44 monoclonal antibodies. These experiments indicate the existence of at least two different forms of CD44 and 80-90 kD form (described above) expressed by cells of hematopoietic/mesodermal origin and a 160 kD form (described below) expressed by cells of epithelial origin.

D. Isolation and Characterization of CD44E

Although an exhaustive search for expression of the second CD44 isoform has not been performed, the 160 kD isoform has been observed in some epithelial cells only. Accordingly, it will be referred to as CD44E.

Immunoprecipitation studies revealed that certain carcinoma cell lines express a 160 kD glycoprotein which reacts with anti-CD44 mAb(22). Northern blot analysis of RNA derived from these cell lines and from tissues of several primary carcinomas showed transcripts not present in hematopoietic cell-derived RNA, suggesting that CD44E may be generated by cell type-specific differential splicing.

A cDNA clone encoding the epithelial form of CD44 was isolated by expression cloning from a cDNA library prepared from the colon carcinoma cell line HT29(24). DNA sequence analysis of the clone showed that it encodes a type I membrane protein. Removal of a 19 amino acid long *N*-terminal signal sequence results in a 473 residue mature protein with a predicted molecular weight of 51.3 kD. Comparison of the amino acid sequence of CD44E with CD44H revealed that the main difference between these two proteins is the presence of an additional 135 amino acid extracellular domain interposed between the extracellular and transmembrane domains of CD44H (amino acid 221). This domain contains an additional potential *N*-linked glycosylation site and an additional Ser-Gly motif which might represent an attachment site for chondroitin

チドハイブリダイゼーション法(41)によって別々に単離されている。これらのcDNAは、タイプI膜タンパク質の性質をもった3607のアミノ酸からなる長いポリペプチドをコードする。その性質とは、N末19残基は疎水性のシグナルペプチド；248アミノ酸が細胞外ドメイン、21アミノ酸が疎水性の膜貫通ドメイン、そして72残基が親水性の細胞質アンカーである。341アミノ酸を含む完成したポリペプチドの予測される分子量は37.2 kDで、これは高CD44単クローン抗体が認識する白血球表面の80-90 kDタンパク質に較べて極端に小さい。このことは、完成したタンパク質は高度にグリコシル化されていることを示唆しており、CD44Hの細胞外ドメインは、N結合性グリコシル化が可能な部位を6ヶ所、O結合性グリコシル化が可能なセリン及びスレオニン残基を多数もっていることで裏づけられる。CD44のアミノ酸配列を他のタンパク質の既報の配列と比較すると、CD44のアミノ末端部分(アミノ酸21-110)が、トリ及びラット軟骨のリンクプロテイン、並びにラットプロテオグリカンコアタンパク質のリンクBエレメントと30%のホモロジーをもっていることが示された。この約90アミノ酸からなる軟骨のリンクプロテイン類似の断片は、似通った二つの繰り返しから出来ている。

cDNAから作ったプローブでRNAプロットハイブリダイゼーションをして見ると、CD44タンパクを発現している細胞には種々のmRNAが存在していることが示された。同じプローブを用いたDNAプロットハイブリダイゼーションから、多数のエクソン及び/又はマルチジーンファミリーが存在することが示唆される。これらの結果は更に、抗CD44単クローン抗体と反応することがわかっている様々な細胞を使って免疫沈降の実験を行なうことで確認された。これらの実験から、CD44には少なくとも2つの異なった型があり、80-90 kD型(上述)のものは造血/中胚葉由来の細胞が発現しているが、160 kD型(以下に記述)のものは上皮由来である。

D. CD44Eの単離と性状解析

CD44の第2の型の発現を徹底的に研究することはまだ行なわれていないものの、160 kD型のものは若干の上皮細胞でのみ観察されている。このためこのものはCD44Eと名づけたい。

免疫沈降をしてみると、ある種の癌細胞株は抗CD44単クローン抗体と反応する160 kDの糖タンパク質を発現している(22)。これらの細胞株およびいくつかの原発性癌の組織からRNAをとってノーザンブロット解析をして見ると、転写産物は造血細胞由来のRNA中には存在しないので、CD44Eは細胞の型に特異的な、異なったスプライシングを受けて作られるらしい。

上皮細胞型のCD44をコードするcDNAクローンを、結腸癌細胞株HT29から調製したcDNAライブラリーから発現クローニング法で単離した(24)。そのクローンのDNA配列解析をして見ると、そのものはタイプI-膜タンパク質をコードしている。19

sulfate. Comparison of the amino acid sequence of the additional domain with sequences in the protein data base showed no significant homology to any previously reported polypeptides.

E. CD44H Specifically Binds Hyaluronan

In order to identify the ligand of CD44H, chimeric proteins were prepared by fusing a cDNA fragment encoding the extracellular domain of CD44H to a genomic fragment encoding human IgG1(12). This fusion protein which we call CD44 Rg(receptor globulin) is produced as a homodimer and secreted into the media of appropriately transfected cells. CD44 Rg was used to perform immunohistology experiments in order to investigate the distribution of the CD44 ligand. CD44 Rg was found to bind to the extracellular matrix in a variety of tissues, and most prominently to loose connective tissue, typically rich in glycosaminoglycans. In addition, CD44 Rg bound weakly to high endothelial venule(HEV) cells which characterize the endothelium of post capillary venules in lymphoid tissues, where lymphocyte extravasation has been shown to occur.

In order to further characterize the ligand of CD44, rat peripheral node primary cell cultures having some of the characteristics of HEV were prepared by the method originally described by Ise(42) and coworkers, and Ager(43). CD44 Rg was found to bind to these cells and binding could be abolished by pre-treatment of these cells with leech or *Streptomyces* derived hyaluronidase. Similarly, reactivity of CD44 Rg with ECM and HEV in frozen tissue sections could be blocked by pre-incubating the sections with hyaluronidase, but not with heparitinase or keratanase. Taken together these results strongly suggested that CD44H recognized hyaluronan as its principal ligand.

To corroborate the above observations, purified glycosaminoglycans were tested as potential blockers of CD44 Rg with either frozen tissue sections or lymph node stromal cells in culture. Of the glycosaminoglycans tested including heparan sulfate, keratan sulfate, chondroitin 4 sulfate, dermatan sulfate, chondroitin 6 sulfate, and hyaluronan, hyaluronan was found to be the most potent blocker of CD44 Rg binding. However, some blocking was observed with high concentrations of chondroitin 4 and 6 sulfate. Collectively, these results indicate that the primary specificity of CD44H is hyaluronan with a minor specificity for chondroitin 4 and 6 sulfate.

Our findings were confirmed by two other groups. One group(13) used monoclonal antibodies directed against CD44 to: (i) immunoprecipitate a hyaluronan binding activity from both mouse and human cells, (ii) block the binding of radiolabeled hyaluronan, and (iii) block the hyaluronan dependent aggregation of some cell lines. The other group(14) activated B cells with IL-5 thereby inducing the overexpression of the CD44 protein. These IL-5 treated B cells were found to bind very avidly to hyaluronate coated plates. This binding was found to be specifically blocked with anti-CD44 monoclonal antibodies.

アミノ酸からなるN末のシグナル配列をはずすと473残基からなる成熟タンパク質が得られるが、このものの予測分子量は51.3kDである。CD44Eのアミノ酸配列をCD44Hと比較すると、2つのタンパクの主な違いはCD44Hの細胞外ドメインに135アミノ酸がつけ加わっていることである。これは、CD44Hの細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間(アミノ酸221)にはさみ込まれている。このドメインはN-結合性グリコシル化可能な部位を更に1ヶ余分にもっており、またコンドロイチン硫酸に接合する部位と思われるSer-Glyモチーフも余分にもっている。余分に加わったドメインのアミノ酸配列をタンパクデータベースを用いて較べて見ても、既報のポリペプチドのどれとも有意のホモロジーを持っていなかった。

E. CD44Hは特異的にヒアルロン酸と結合する

CD44Hのリガンドを同定するため、CD44Hの細胞外ドメインをコードしているDNA断片をヒトIgG1をコードする遺伝子の断片につなぎ、これを用いてキメラタンパク質を作った(12)。この融合タンパク質を私たちはCD44Rg(レセプターグロブリン)とよんでいるが、これはホモ二量体として産生され、トランスフェクトした細胞培養液中に分泌されてくる。CD44RgはCD44リガンドの分布を調べるために免疫組織学の実験を行なうのに用いた。CD44Rgは種々の組織で細胞間マトリックスと結合することがわかったが、グリコサミノグリカンを典型的に豊富に含む疎性結合組織には最も顕著に結合した。これに加えて、CD44Rgは高内皮細胞性細静脈(HEV)細胞にも弱く結合した。この細胞は、リンパ球の血管外侵入がおこっているリンパ組織で、毛細血管の後の細静脈の内皮細胞として特徴づけられている細胞である。

CD44のリガンドの性状をさらに明らかにするため、HEVのある程度の特徴を持っているラットの末梢リンパ節の初代細胞培養をIse(42)とその共同研究者及びAger(43)によって最初に記述された方法で調製した。CD44Rgはこれらの細胞に結合し、この結合は細胞をヒルヤ*Streptomyces*由来ヒアルロニダーゼで前処理しておくことで阻止される。同様に、凍結組織切片中のECMやHEVとのCD44Rgの反応性は、切片をヒアルロニダーゼで前処理するとブロックすることができるが、ヘパリチナーゼやケラタナーゼではブロックできない。これらの結果は、CD44Hはその主要なリガンドとしてヒアルロン酸を認識することを強く示唆した。

上述の観察を確認するため、凍結組織切片及び培養したリンパ節ストローマ細胞の両者を用いて、精製したグリコサミノグリカンがCD44Rgの反応を阻止できるかどうかを検討した。ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン-4硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン-6硫酸及びヒアルロン酸を調べたが、中ではヒアルロン酸がCD44Rgの結合の最も強力な阻害剤であることがわかった。しかしながら、コンドロイチン4及び6硫酸でも高濃度で用いた場合には若干の阻害が認められた。

F. CD44H and the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronan Are the Same Protein

In order to establish the relationship between CD44H and the hamster hyaluronan receptor recognized by monoclonal antibody K-3(44), cells that normally do not express CD44H were transfected with a human CD44H-specific cDNA clone. However, K-3 mAb reactivity with human CD44H was found to be very weak. Because the K-3 mAb may display only weak cross-species reactivity, a cDNA clone encoding the hamster CD44 antigen was isolated by the polymerase chain reaction method using oligonucleotide primers based on the sequence of a cDNA clone encoding the mouse CD44 gene(45, 46). When the cDNA encoding the hamster CD44 protein was transfected into cells which do not express this gene the cells were found to react with the anti-hyaluronate receptor monoclonal antibody K-3(12).

G. CD44H and CD44E Have Different Binding Affinities for Hyaluronan

In order to establish the functional differences between CD44H and CD44E, cDNAs encoding these two proteins were stably transfected into the human Burkitt lymphoma cell line Namalwa which lacks both these proteins(24). CD44H⁺ and CD44E⁺ Namalwa cells showing equal levels of surface CD44 were tested for their ability to bind to the hyaluronan bearing HEV like cells derived from rat peripheral node stromal elements, described above. CD44H⁺ Namalwas bound significantly more avidly to the HEV like cells than did either Namalwa or CD44E⁺ Namalwa cells. Furthermore, the binding of the CD44H⁺ Namalwa cells to the rat HEV like cells can be blocked by either a polyclonal anti-CD44 serum or with hyaluronan. These results suggest that even though both CD44H and CD44E are able to bind hyaluronan the affinity and/or avidity of CD44H for hyaluronan is greater than that of CD44E.

H. Discussion

The identification of CD44H as the receptor for hyaluronate opens an avenue of research which will enable a better understanding of the nature and consequences of cell-cell and cell-matrix interactions. These interactions are particularly pertinent with respect to development, inflammation and tumor growth.

The abundance of hyaluronate in pericellular areas of developing limbs is well documented. Mesodermal cells from the early, proliferative stage of limb development are surrounded by a prominent coat of hyaluronate both *in vivo* and *in vitro*(47, 48). However, at later stages of development which precede mesodermal differentiation into cartilage and muscle, mesodermal cell hyaluronate production is decreased concomitantly to cell surface hyaluronate receptor expression. The decrease in cell surface hyaluronate may be due to a decrease in production of endogenous hyaluronate or to an increased clearance by endocytosis. However, expression of the hyaluronate

これらの結果をまとめると、CD44Hの主要な特異性はヒアルロン酸だがコンドロイチン4及び6硫酸に対しても二次的な特異性を伴っていることを示している。

私たちの発見は他の2つのグループでも確認された。1つのグループ(13)はCD44に対して作成された単クローン抗体を用いて、i)マウス及びヒトの細胞からヒアルロン酸結合活性を免疫沈降し、ii)放射標識したヒアルロン酸の結合を阻害し、iii)若干の細胞株でのヒアルロン酸依存性の凝集を阻止した。他のグループ(14)はB細胞をIL-5で活性化することでCD44タンパクが過剰発現された。このIL-5処理B細胞はヒアルロン酸で被覆した培養皿に大変良く結合することが見出されている。この結合は高CD44単クローン抗体で特異的に阻止される。

F. CD44Hとヒアルロン酸に対する主要な細胞表面レセプターは同一のタンパクである

単クローン抗体K-3(44)に認識されるハムスターのヒアルロン酸レセプターとCD44Hとの関係を確認するため、正常にはCD44Hを発現していない細胞にヒトCD44H-特異的cDNAクローンをトランスフェクトした。しかしながら、ヒトCD44Hに対するK-3単クローン抗体の反応性は非常に弱いことがわかった。K-3単クローン抗体が種間で弱い交差反応性しか示さないようなので、ハムスターのCD44抗原をコードするcDNAクローンを、マウスCD44遺伝子をコードする一つのcDNAの配列に基いたオリゴヌクレオチドプライマーを用い、ポリメラーゼ連鎖反応法により単離した(45, 46)。ハムスターのCD44タンパクをコードするcDNAを、この遺伝子を発現していない細胞にトランスフェクトすると、その細胞は抗ヒアルロン酸レセプター単クローン抗体K-3と反応することが見出された(12)。

G. CD44HとCD44Eはヒアルロン酸に対して異なる結合親和性を持っている

CD44HとCD44Eの機能的な差異を明らかにするため、どちらのタンパクも欠いているヒトパーキットリンパ腫細胞株Namalwaに、これら二つのタンパクをコードするcDNAを安定にトランスフェクトした(24)。CD44H⁺及びCD44E⁺Namalwa細胞は等しい表面CD44レベルを示し、ラットの末梢節ストローマから上述のように得た担ヒアルロン酸-HEV様細胞との結合能を検討した。CD44H⁺NamalwaはNamalwaやCD44E⁺Namalwa細胞よりもHEV様細胞に有意に強く結合した。その上CD44H⁺Namalwa細胞のラットHEV様細胞への結合は、ポリクローナル抗CD44血清でもヒアルロン酸でも阻止することができる。これらの結果はCD44HもCD44Eもヒアルロン酸に結合することができるが、CD44Hのヒアルロン酸に対する親和性はCD44Eに勝っていることを示している。

H. 考 察

CD44Hをヒアルロン酸のレセプターとして同定したこと

receptor is believed to play a crucial role in mesoderm condensation by utilizing the residual cell surface-associated hyaluronate as a molecule bridge to mediate cell aggregation.

An analogous scenario may provide a role for CD44 in inflammation and tissue repair. By using hyaluronate as a molecular bridge, CD44 may mediate aggregation of lymphocytes, monocytes and macrophages at sites of injury. One result of such aggregation may be a more efficient antigen presentation to T and B cells resulting in an enhancement of immune response. However, aggregation of leukocytes may have two additional important consequences: an enhancement of cytokine production and granuloma formation, as is the case in several types of chronic inflammatory processes. CD44 may also promote adhesion of leukocytes to extracellular matrix components facilitating the diffusion of cytokines required for an appropriate inflammatory response.

The third biological sector in which CD44 expression may play a pivotal role is tumor growth and invasion. Primary and secondary (metastatic) tumor growth depends on interactions between tumor cells and their microenvironment. Several observations have suggested that CD44 may be involved in tumor development and behavior. First, CD44 expression is found to be increased in most malignancies(22) and in proliferating cells in general(23). Second, tumorigenicity of a murine thymoma SL 12 correlates with CD44 expression(49). And third, human non-Hodgkin's lymphomas which express high levels of CD44 appear to behave more aggressively and bear a poorer prognosis than CD44-negative or low expressing variants(50). These observations are in agreement with the notion that hyaluronate production and CD44 expression are directly related to tumor invasiveness(7). Recently, Sy and Stamenkovic(51) have shown that a human Burkitt lymphoma stably transfected with CD44H produces tumors at a much faster rate than the parental cells in nude mice bringing further support to the suggestions that CD44 expression is directly related to tumor aggressiveness.

CD44-mediated tumorigenesis may arise through several possible mechanisms. Because hyaluronate is bound to ECM proteoglycans as well as the surface of stromal cells, it may once again play the role of a molecular bridge allowing attachment of CD44-expressing tumor cells. By adhering to ECM, tumor cells may not only become immobilized, allowing colonies to develop, but may gain access to a variety of growth factors which are sequestered by various ECM proteoglycans (52). Interaction between tumor cells and host tissue stromal cells has been suggested to be required for the production of hyaluronate as well as angiogenesis factors(53). Consequently, by promoting attachment of tumors to stromal cells, CD44 may facilitate both tumor growth and invasiveness. It is also possible that CD44-hyaluronan interactions may facilitate tumor invasiveness by providing a locomotion mechanism. This is supported by the recent experiments of Turley(54) and coworkers who have shown that Ras-transformed cells are more motile

で、細胞-細胞及び細胞-マトリックスの相互作用の性質や重要性をよりよく理解するための研究の途が開けた。これらの相互作用は発生、炎症及び腫瘍の増殖に関して殊に意義深い。

発生途上の胚芽の細胞周縁部において、ヒアルロン酸が豊富にあることはよく知られている。胚芽の発生において初期の増殖性の時期から得た中胚葉性細胞はin vivoでもin vitroでもヒアルロン酸の顕著な皮膜にとり囲まれている(47,48)。しかしながら発生が進み、中胚葉の軟骨や筋肉への分化の始まる直前になると中胚葉性細胞のヒアルロン酸産生は減少し、これと同時に細胞表面のヒアルロン酸レセプターの発現が起こる。細胞表面のヒアルロン酸の減少は内在性のヒアルロン酸の産生の減少又はエンドサイトーシスによるクリアランスの増加に基いている。けれども、ヒアルロン酸レセプターの発現は、残りの細胞表面に付着したヒアルロン酸を細胞の凝集を仲立ちする分子橋として使うことで、中胚葉細胞の凝集がおこるのに決定的な役割を演じているものと信じられている。

類似のシナリオが、炎症や組織の修復においてもCD44に役割を与えているようだ。ヒアルロン酸を分子橋として使うことでCD44はリンパ球や単球、マクロファージの障害部位での凝集を仲立ちしているらしい。このような凝集の一つの結果はT及びB細胞へのより効率の良い抗原提示であり、これが免疫応答の増幅をもたらす。けれども、白血球の凝集は、二つの重要な結果を余分に付け加える。すなわちサイトカイン産生の増幅と肉芽腫の形成で、慢性の炎症の経過のいくつかの型でこのような場合がある。CD44はまた白血球を細胞間マトリックス成分に吸着させることで、特有な炎症反応に必要なサイトカインの拡散を効果的に行なわせている。

CD44の発現が中心的な役割を果たすと思われる第三の生物学的分野は、腫瘍の増殖と浸潤である。原発性及び二次性(転移性)の腫瘍の増殖は腫瘍細胞とその微小環境との相互作用に依存している。いくつかの観察によれば、CD44は腫瘍の発育と挙動に関わっているようだ。第一に、CD44の発現はほとんどの悪性腫瘍(22)及び一般の増殖性細胞(23)において増加していることが見出されている。第二に、マウスの胸腺腫SL-12の造腫瘍性はCD44の発現と相関している(49)。そして第三に、ヒトの非ホジキンリンパ腫は高レベルのCD44を発現しているものの方が、CD44陰性又は低発現の変種に比べ攻撃力が大きくて予後が良くない(50)。これらの観察はヒアルロン酸産生とCD44発現が腫瘍の浸潤性に直接関連しているという指摘(7)に一致している。最近、SyとStamenkovic(51)はCD44Hを安定にトランスフェクトされたヒトパーキットリンパ腫はヌードマウスでその親株よりも速い速度で腫瘍を形成することを示しているが、これもCD44発現が腫瘍の攻撃性に直接関係しているようだという示唆を更に支持するものである。

CD44を介する腫瘍原性の現れ方にはいくつかの可能性が考えられる。ヒアルロン酸はストローマ細胞の表面やECMプロテオグリカンに結合しているので、分子橋の役をしてCD44を

than untransformed cells. This increased locomotion is mediated by an autocrine mechanism involving hyaluronan and a 56 kD fibroblast hyaluronate binding protein.

However, CD44 may also promote tumor growth through a different pathway. Several cell surface proteoglycans have been shown to bind growth factors, including TGF- β and FGF(52). The fact that CD44 binds hyaluronate does not exclude the possibility that it may also bind cytokines in either a specific or non-specific manner. By binding cytokines non-specifically, CD44 may provide a mechanism of concentrating cytokines at the cell surface thereby allowing the cell preferential access to growth factors.

Finally, by interacting with ECM components *via* a hyaluronate bridge, CD44 may be triggered to transmit specific signals to the tumor cells, which may result in enhanced growth. Recently, it has been shown that stimulation by anti-CD44 mAb can augment TNF and IL-1 production by monocytes(55).

Although there are several possible functions for CD44H, the role of CD44E remains obscure. The more restricted expression of CD44E and its inability to attach to cell-surface bound hyaluronate, suggest that it may mediate interactions with different ligands than CD44H, required by a subpopulation of epithelial cells. Whether CD44E expression correlates with degrees of epithelial stratification remains to be determined. Interestingly, Burkitt lymphomas stably transfected with CD44E failed to produce tumors in nude mice(51). The mechanism of this protective effect is not understood at present. However, the regulation of expression of the two CD44 isoforms, the identification of other putative ligands and the elucidation of the role of CD44E in cellular growth will provide a fertile terrain for future research.

Acknowledgments

We thank Diane Horn and Paul Gladstone for critical review of the manuscript and Mary West for her excellent technical help in preparing this manuscript. I. S. is a Special Fellow of the Leukemia Society of America. This work was supported in part by National Institutes of Health grant GM43257(I. S.).

Note Added in Proof

Since the preparation of the manuscript two other articles describing the isolation of cDNAs encoding the human and rat CD44E have appeared. They are: Brown, T. A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E., and Carter, W. G. (1991) *J. Cell Biol.* 113, 207-221 and Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haubmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. (1991) *Cell* 65, 13-24, respectively.

発現している腫瘍細胞の接着ができるようにしているのだろう。ECMへの吸着により腫瘍細胞が動かないようになりコロニーの発育が可能になるだけでなく、種々のECMプロテオグリカンにより保持されている幾種類もの増殖因子に接近しやすくなるのかもしれない(52)。ヒアルロン酸と脈管形成因子の産生の為には、腫瘍細胞と宿主組織のストローマ細胞との相互作用が必要であることが示唆されている(53)。結局、腫瘍をストローマ細胞に接触しやすくすることによって、CD44は腫瘍の増殖と浸潤を容易にしているのだろう。CD44-ヒアルロン酸相互作用は移動の機構を提供することで腫瘍の侵入を容易にしている可能性もある。このことはTurley(54)と共同研究者たちの最近の実験により支持されている。彼らはRasで形質転換した細胞は形質転換していない細胞に較べて運動性が高いことを示した。この移動性の増加はヒアルロン酸と線維芽細胞の56 kDヒアルロン酸結合タンパクを含むオートクライン機構を介している。

けれども、CD44はまた異なった経路をとって腫瘍の増殖を促進している可能性もある。いくつかの細胞表面プロテオグリカンは、TGF- β やEGFなどの増殖因子と結合することが示されている(52)。CD44がヒアルロン酸に結合するという事実は、それが特異的にせよ非特異的な様式にせよ、サイトカインにもまた結合するという可能性を除外するものではない。サイトカインを非特異的に結合することで、CD44が細胞表面にサイトカインを濃縮し、このことで細胞を増殖因子へ接近できるようにしているかも知れない。

最後に、ヒアルロン酸の架橋を通じたECM成分との相互作用によってCD44が腫瘍細胞に特異的なシグナルを伝達する引き金になり、増殖の促進をもたらしているのかも知れない。最近抗CD44単クローン抗体による刺激で単球によるTNFとIL-1の産生を増加させることができることが示された(55)。

CD44Hの果たしている機能というものはいくつかあるのに対し、CD44Eの役割ははっきりしないままである。CD44Eの発現はより限られているし、細胞表面に結合しているヒアルロン酸に対して接着能もないことから、上皮細胞のあるポピュレーションが必要とするCD44Hとは異なるリガンドとの相互作用を仲立ちしているのかも知れない。CD44Eの発現は上皮の層形成の度合に関連するのかが調べられなくてはならない。面白いことに、CD44Eを安定にトランスフェクトしたバーキットリンパ腫はヌードマウスで腫瘍を作る能力がなくなった(51)。この防禦効果の機構は今のところわからない。けれども、CD44の2つの異型の発現の調節、他にもある得るリガンドの同定とCD44Eの細胞増殖における役割の解明は、将来の研究に対し肥沃な大地を提供するものであろう。

日本大学医学部 微生物学教室
長塚 靖子 訳

References

1. Höök, M., Kjellén, L., and Johansson, S. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 847-869
2. Turley, E.A., and Roth, S. (1979) *Cell* **17**, 109-115
3. Prem, P. (1983) *Biochem. J.* **211**, 181-189
4. Prem, P. (1983) *Biochem. J.* **211**, 191-198
5. Hardingham, T.E. (1979) *Biochem. J.* **177**, 237-247
6. Tang, L. H., Rosenberg, L., Reiner, A., and Poole, A. R. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10523-10531
7. Toole, B. P., Biswas, C., and Gross, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6299-6303
8. Laurent, T. C. and Fraser, J. R. E. (1986) *Ciba Foundation Symp.* **124**, 9-29
9. Mikuni-Takagaki, Y., and Toole, B. P. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8463-8469
10. Underhill, C. B., Thurn, A. L., and Lacy, B. E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 8128-8133
11. Underhill, C. B., Green, S. J., Comoglio, P. M., and Tarone, G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13142-13146
12. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., and Seed, B. (1990) *Cell* **61**, 1303-1313
13. Culty, M., Miyake, K., Kincade, P.W., Sikorski, E., Butcher, E.C., and Underhill, C.B. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2765-2774
14. Murakami, S., Miyake, K., June, C.H., Kincade, P. W., and Hodes, R. J. (1990) *J. Immunol.* **145**, 3618-3627
15. Green, S. J., Tarone, G., and Underhill, C.B. (1988) *Exp. Cell Res.* **178**, 224-232
16. Shannon, B. T., Love, S. H., and Myrvik, Q. N. (1980) *Immunol. Commun.* **9**, 357-370.
17. Shannon, B. T. and Love, S. H. (1980) *Immunol. Commun.* **9**, 735-746
18. St. John, T., Meyer, J., Idzerda, R., and Gallatin, W. M. (1990) *Cell* **60**, 45-52
19. Huet, S., Groux, H., Caillou, B., Valentin, H., Prieur, A. M., and Bernard, A. (1989) *J. Immunol.* **143**, 798-801
20. Shimizu, Y., Van Seventer, G. A., Siraganian, R., Wahl, L., and Shaw, S. (1989) *J. Immunol.* **143**, 2457-2463
21. Denning, S. M., Le, P. T., Singer, K. H., and Haynes, B. F. (1990) *J. Immunol.* **144**, 7-15
22. Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M., and Seed, B. (1989) *Cell* **56**, 1057-1062
23. Alho, A. M., and Underhill, C. B. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 1557-1565
24. Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., and Seed, B. (1991) *EMBO J.* **10**, 343-348
25. Dalchau, R., Kirkley, J., and Fabre, J. W. (1980) *Eur. J. Immunol.* **10**, 745-749
26. Hughes, E. N., Mengod, G., and August, J. T. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7023-7027
27. Hughes, E. N., and August, J. T. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 664-671
28. Trowbridge, I. S., Lesley, J., Schulte, R., Hyman, R., and Trotter, J. (1982) *Immunogenetics* **15**, 299-312
29. Trowbridge, I. S., Lesley, J., Trotter, J., and Hyman, R. (1985) *Nature* **315**, 666-669
30. Isacke, C. M., Sauvage, C. A., Hyman, R., Lesley, J., Schulte, R., and Trowbridge, I. S. (1986) *Immunogenetics* **23**, 326-332
31. Lynch, F., and Ceredig, R. (1989) *Eur. J. Immunol.* **19**, 223-229
32. Carter, W. G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3249-3257
33. Carter, W. G., and Wayner, E. A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4193-4201
34. Haynes, B. F., Harden, E. A., Telen, M. J., Hemler, M. E., Strominger, J. L., Palker, T. J., Searce, R. M., and Eisenbarth, G.S. (1983) *J. Immunol.* **131**, 1195-1200
35. Telen, M. J., Palker, T. J., and Haynes, B. F. (1984) *Blood* **64**, 599-606
36. Telen, M. J., Shehata, H., and Haynes, B. F. (1986) *Hum. Immunol.* **17**, 311-324
37. Jalkanen, S.T., Bargatze, R. F., Herron, L. R., and Butcher, E. C. (1986) *Eur. J. Immunol.* **16**, 1195-1202
38. Jalkanen, S., Bargatze, R. F., de los Toyos, J., and Butcher, E. C. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 983-990
39. Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. and Butcher, E. C. (1988) *J. Immunol.* **141**, 1615-1623
40. Quackenbush, E. J., Vera, S., Greaves, A., and Letarte, M. (1990) *Mol. Immunol.* **27**, 947-955
41. Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F., and Butcher, E. C. (1989) *Cell* **56**, 1063-1072
42. Ise, Y., Yamaguchi, K., Sato, K., Yamamura, Y., Kitamura, F., Tamatani, T., and Miyasaka, M. (1988) *Eur. J. Immunol.* **18**, 1235-1244
43. Ager, A. (1987) *J. Cell Sci.* **87**, 133-144
44. Tarone, G., Ferracini, R., Galetto, G., and Comoglio, P. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 512-519
45. Nottenburg, C., Rees, G., and St. John, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8521-8525
46. Zhou, D. F., Ding, J. F., Picker, L. J., Bargatze, R. F., Butcher, E. C., and Goeddel, D.V. (1989) *J. Immunol.* **143**, 3390-3395
47. Toole, B. P. (1981) In: *The Cell Biology of the Extracellular Matrix*. Hay, E.D. (ed) Plenum Press, New York. 259-294
48. Toole, B. P., Munaim, S. I., Welles, S., and Knudson, C. B. (1989) *Ciba Found. Symp.* **143**, 138-149, 281-285
49. MacLeod, C. L., Weinroth, S. E., Streifinger, C., Glaser, S. M., and Hays, E. F. (1985) *J. Natl. Cancer Inst.* **74**, 875-882
50. Horst, E., Meijer, C. J. L. M., Radaszkiewicz, T., Ossekoppele, G. J., Van Krieken, J. H. J. M., and Pals, S. (1990) *Leukemia* **4**, 595-599
51. Sy, M., and Stamenkovic, I. (1991) *J. Exp. Med.* submitted
52. Ruoslahti, E. (1989) *J. Cell Biol.* **105**, 1395-1398
53. West, D. C. and Kumar, S. (1989) *Ciba Found. Symp.* **143**, 187-207, 281-285
54. Turley, E. A., Austen, L., Vandelig, A. K., and Clary, C. (1991) *J. Cell Biol.* **112**, 1041-1047
55. Webb, D. S. A., Shimizu, Y., Van Seventer, G. A., Shaw, S., and Gerrard, T. L. (1990) *Science* **249**, 1295-1297