

BAY11-7082에 의한 U937 세포의 CD29-매개성 세포간 유착과정 조절 효과

김병훈 · 조재열[#]

강원대학교 BT학부대학 생명공학부

(Received September 19, 2008; Revised October 10, 2008)

Modulatory Effect of BAY11-7082 on CD29-mediated Cell-cell Adhesion in Monocytic U937 Cells

Byung Hun Kim and Jae Youl Cho[#]

School of Bioscience and Biotechnology, and Institute of Bioscience and Biotechnology,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — BAY11-7082 was initially found to be an anti-inflammatory drug with NF- κ B inhibitory property. In this study, we evaluated modulatory function of BAY11-7082 on U937 cell-cell adhesion induced by CD29 (β 1-integrins). BAY11-7082 strongly blocked functional activation of CD29 (β 1-integrins), as assessed by cell-cell adhesion assay. However, this compound did not block a simple activation of CD29, as assessed by cell-fibronectin adhesion assay. In particular, to understand molecular mechanism of BAY11-7082-mediated inhibition, the regulatory roles of CD29-induced actin cytoskeleton rearrangement under cell-cell adhesion and surface level of CD29 were examined using confocal and flow cytometric analysis. Interestingly, this compound strongly suppressed the molecular association of actin cytoskeleton with CD29 at cell-cell adhesion site. Moreover, BAY11-7082 also diminished surface levels of CD29 as well as its-associated adhesion molecule CD147, but not other adhesion molecules such as CD18 and CD43. Therefore, our data suggest that BAY11-7082 may be involved in regulating immune responses managed by CD29-mediated cell-cell adhesion.

Keywords □ BAY11-7082, monocytes, U937 cells, cell-cell adhesion, adhesion molecules, actin cytoskeleton

단핵구 및 대식세포는 내재성 면역반응을 담당하는 대표적인 면역세포다. 이들 세포들은 외부로부터 침입한 세균들에서 유래된 세포구성 성분들이나 체내 다른 면역세포에서 분비한 사이토카인에 의해 활성화되어 종양괴사인자나 일산화질소 등과 같은 독성물질, 그리고 프로스타그란딘류와 같은 염증 매개물질의 분비를 조절한다.¹⁾ 특별히, 이들 세포는 세균이나 암세포 등과 같은 면역유발원을 탐식하고 탐식된 면역원을 펩타이드로 가공하여 구조적 적합성 항원에 공여함으로써, T cell의 분열 및 분화를 촉진시키는 항원제시 세포(Antigen-presenting cell[APC])로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.²⁾ 이때 대식세포 혹은 수지상세포와 T cell간의 세포-세포간 상호작용이 필수적이며 이를 조절하는 단백질을 β 1-integrins(CD29) 혹은 β 2-integrins(CD18)와 같은 adhesion molecule로 알려져 있다.^{3,4)} 이들

단백질의 활성화는 리간드로 알려져 있는 intercellular adhesion molecule(ICAM)-1이나 vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1 등과의 상호작용을 통해 관련 하부 단백질들을 활성화시키는 여러가지 다양한 신호전달과정 (outside-in 혹은 inside-out signaling)을 동반하게 된다. 특별히 이들 신호전달 과정은 액틴 세포골격의 조절을 통해 세포간 상호작용 및 이동성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

BAY11-7082(Fig. 1)는 NF- κ B 억제제로 알려져 있는 합성 화합물이다.⁵⁾ 이 화합물은 LPS 혹은 사이토카인 등과 같은 자극원에 의해 생성된 여러가지 염증 유발 물질(nitric oxide, reactive oxygen species 및 프로스타그란딘 등) 및 adhesion molecule들(ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin 등)의 *in vitro* 생성 및 신합성을 억제하고 *in vivo* 항관절염 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다.⁵⁾

최근 염증 과정이나 암세포의 전이시 요구되는 세포 운동성의 조절인자로서 CD29의 기능이 중요한 것으로 보고되어 지면서,⁶⁾ CD29 활성 억제제 개발이 다양한 측면에서 시도되고 있다.^{7,8)} 따

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6562 (팩스) 033-253-6560
(E-mail) jaecho@kangwon.ac.kr

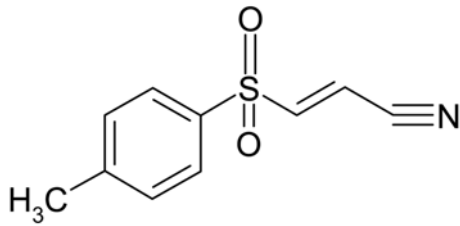


Fig. 1 - Chemical structure of BAY11-7082.

라서, 본 연구에서는 BAY11-7082가 CD29 기능 활성화에 미치는 효과를 조사하고자 하였으며, 이를 위해서 단핵구의 CD29 매개성 세포간 유착과정을 실험 파라미터로 설정하여 BAY11-7082의 조절 효능을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

BAY11-7082(Fig. 1), U0126, SB203580 및 SP600125는 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. 인간 단핵구 세포주인 U937 세포는 ATCC(Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 배양용 배지 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS) 그리고 항생제(penicillin/streptomycin)는 Hyclone(Hyclone, South Logan, UT, USA)사 제품을 사용하였다. Human fibronectin은 BD Biosciences(San Jose, CA USA)를 사용했고, 항체들(CD80, CD86, CD62L, CD18, CD29 및 CD43)는 각각 V. Horejsi와 R. Vilella로부터 제공받았거나, Serotec(Kidlington, Oxford, UK)사 제품을 구입하여 사용하였다. Rhodamine-phalloidin은 Cytoskeleton사(Denver, CO, USA)로부터 확보하였다. 그밖에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 포함한 화학시약은 Sigma 제품(St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

세포배양

U937 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 배지는 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin(100 µg/ml)과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다.

세포 생존율 검정

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, BAY11-7082 농도(0, 2.5, 5, 10 및 20 µM)별로 세포생존에 미치는 영향을 MTT assay법을 이용하여 분석하였다.⁹⁾ 96-well plate에 1×10⁶개의 RAW264.7 세포를 plating하고 BAY11-7082를 농도 별로 처리하였다. 37°C에서 3.5시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 10 µl MTT 용액(stock concentration : 5 mg/ml)을 첨가하고 2시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및

formazan crystal의 용해를 위해 각 well에 100 µl MTT stopping solution(10% sodium dodecyl sulfate in 0.01 M HCl)을 분주하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

세포-세포간 유착반응 분석

BAY11-7082를 각 농도로 조제해 96-well plate에 각각 10 µl씩 분주하고, U937 세포(1×10⁶ cells/ml) 용액을 80 µl를 처리하여 37°C에서 30분간 배양하였다.¹⁰⁾ 다시 여기에 10 µl의 CD29 항체(MEM101A: 1 µg/ml)를 분주하여 시간 별로 사진을 촬영하였다. 유착 반응 정량은 round-bottom형태의 96 well plate에 2×10⁶ cells/ml 농도로 조제된 U937 세포용액 20 µl와 10 µl의 BAY11-7082 그리고 10 µl의 MEM101A 항체를 첨가한 후 3시간 동안 배양하였다. 이후 조심스럽게 배양용액을 부유시킨 후, 10 µl를 hemocytometer에 처리하고 single 세포와 clustered 세포의 수를 측정하였다. Cho 등의 보고에 따라, 얻어진 데이터로부터 % of aggregation 및 % of control 값을 계산하였다.

세포-fibronectin간의 유착반응 정량

우선 fibronectin(최종농도 50 µg/ml)을 96-well plate의 해당 well에 100 µl를 분주하고, 나머지 well에는 PBS를 분주 후, 4°C에서 18시간 동안 전배양하였다. RPMI1640 배지로 세척 후 2 mg/ml bovine serum albumin으로 blocking시켰다. 다른 plate에 여러 가지 처리 농도로 희석된 BAY11-7082 11 µl를 분주하고, U937(5.6×10⁶ cells/ml) 세포용액을 99 µl를 처리하여 37°C에서 한 시간 동안 배양하였다. Blocking한 plate를 RPMI1640 배지로 세 번 세척 후, BAY11-7082가 처리된 세포용액 100 µl을 fibronectin-coated plate로 옮겨 넣고, 4시간 추가 배양을 실시하였다. 세포-fibronectin 간 유착 정도는 0.1% crystal violet 용액을 첨가한 후 15분 동안 반응시키고, 10% acetic acid를 처리한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹¹⁾

Confocal microscopy

Confocal microscopic analysis는 Lee 등의 보고에 따라 진행되었다.¹²⁾ 즉, U937 세포(2×10⁴ cells/ml)를 멸균 cover slip을 포함하는 12-well plate의 해당 well에 1 ml씩 분주하고, BAY11-7082를 30분간 전처리하였다. MEM101 항체를 처리한 후 3시간 후에 3.7% formaldehyde에서 세포를 고정하였다. 이후 CD29 항체 및 rhodamine-phalloidin을 처리하였다. FITC-label CD29 및 rhodamine-phalloidin에 의한 형광정도는 Olympus LX70 FV300(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

Adhesion molecule의 발현 정량

U937 세포(1×10⁶ cells/ml)를 12-well plate에 1 ml/well씩 분

주 후 3시간 동안 전배양하였다. 이 후 3.5시간 동안 BAY11-7082를 처리하고 이들 세포를 회수하여 96 well round plate에 일정하게 분주하였다. FACS buffer(2% FBS in PBS)로 세척한 후, 10% rabbit serum(in PBS)으로 blocking하고, 각종 항체를 처리하여 45분간 배양하였다. 이후 FACS buffer로 세척한 후 3.7% formaldehyde로 고정하고 flow cytometry로 형광정도를 측정하였다.

통계처리

각 data는 얻어진 결과는 평균±표준편차로 나타낸 것이며, 그룹 간의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중비교법에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

BAY11-7082의 세포독성에 미치는 효과

우선 BAY11-7082의 세포독성 효과를 알아보기 위해 최대 20 μM 농도까지 단핵구 암세포주인 U937 세포에 3.5시간 동안 처리하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이, BAY11-7082는 3시간 배양시 U937 세포에 전혀 세포독성 효과를 유도하지 않았다. 특별히 약리적으로 효능이 강한 플라보노이드 류에서 강한 세포독성이 나타난다는 것과 비교 시,¹³⁾ 상대적으로 본 화합물이 우수하고 다양한 면역약리 작용을 보일 경우, 세포독성 측면에서 플라보노이드류 보다 약물학적인 장점을 가질 것으로 판단된다. 따라서 면역약리학적 효능 평가 연구의 일환으로, 활성화된 단핵구를 이용하여 단핵구 유착성에 관한 BAY11-7082의 조절능을

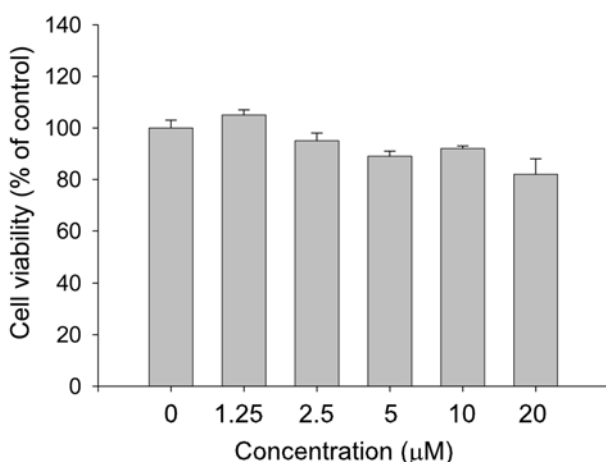


Fig. 2 – Effect of BAY11-7082 on the viability of U937 cells. U937 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with BAY11-7082 for 3.5 h. Cytotoxicity of this drug was determined by conventional MTT assay as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate.

조사하여 보았다.

세포-세포간 및 세포-matrix protein간 유착반응에 미치는 BAY11-7082의 효과

세포-세포간 유착반응은 APC 기능 수행시 보여지는 대표적인 반응중 하나이다. 즉 대식세포 혹은 수지상세포와 T cell간의 상호작용은 T cell의 분열과정 조절시 필수적¹⁴⁾이기 때문이다. 특별히 이들 과정을 조절하는 단백질은 CD18($\beta 2$ -integrins) 및 CD29($\beta 1$ -integrins) 등과 같은 adhesion molecule들로 알려져 있으며, 실제로 이들 단백질의 기능을 선택적으로 저해하는 특이 항체 처리시 APC 기능매개에 의한 T cell 증식과정이 억제된 것으로 보고 되었다.¹⁵⁾ 따라서 BAY11-7082가 adhesion molecule의 활성화에 어떤 영향을 나타내는지 조사하고자 하였다.

본 연구자는 adhesion molecule인 CD29의 기능적 활성을 검증하기 위해서 U937 cell 및 CD29 활성 유도 항체를 이용하여, CD29 활성 매개성 세포-세포간 유착 모델을 확립한 바 있다.¹⁰⁾ 이들 모델은 CD29의 기능 매개에 의한 세포간 상호작용을 확인할 수 있는 실험법이므로, 본 연구에서 BAY11-7082의 효과 검증에 적용하여 보았다. Fig. 3(A 및 B)에서 볼 수 있듯이, BAY11-7082는 농도 의존적으로 CD29 기능을 억제한 것으로 나타났다. 즉 BAY11-7082는 10 및 20 μM 에서 강력히 CD29 매개성 세포간 유착현상을 억제하였다. 기존 논문에서 보고된 것 처럼, 대조 약물로 사용한 ERK 저해제인 U0126은 매우 강력하게 세포-세포간 유착과정을 억제한 반면, JNK 저해제인 SP600125는 저해 효과를 나타내지 않았다(Fig. 3).

특별히 세포간 유착과정은 세포질내 신호전달 과정의 활성화 및 이를 통한 막표면 CD29의 활성화에서 기인된 유착과정 매개 등으로 구성되어 있다.¹⁶⁾ 따라서, BAY11-7082에 의한 세포간 유착과정 억제가 어떤 과정의 간섭에서 기인되는지 확인하기 위해 먼저 CD29 단백질 자체의 활성을 측정할 수 있는 세포-matrix protein(fibronectin)간의 유착실험 모델을 이용하여 연구하였다.⁸⁾ 흥미롭게도, BAY11-7082는 U937 세포가 fibronectin에 유착되는 현상을 억제하지 못한 것으로 나타났다(Fig. 3C). 반면에 CD29 blocking 항체(P5D2)는 강력하게 U937 세포와 fibronectin간의 유착과정을 억제하였다. 즉 본 결과는 BAY11-7082의 세포간 유착현상 억제는 adhesion molecule인 CD29 자체의 단순한 활성화 억제에서 기인되는 것보다는 CD29의 활성을 유도하는 세포내 신호전달 과정 억제에 의해 매개되는 것으로 판단된다.

액틴 세포골격의 활성화에 미치는 BAY11-7082의 효과

액틴 세포골격은 세포의 이동성 및 유착과정시 매우 필수적인 골격 구조로 알려져 있다. 특별히 CD29 매개성 유착과정은 액틴 구조에 의존적인 대표적 반응의 하나이다.¹⁰⁾ 이는 액틴 세포골격 중합과정 저해제인 cytochalasin B 처리시 완벽히 억제되

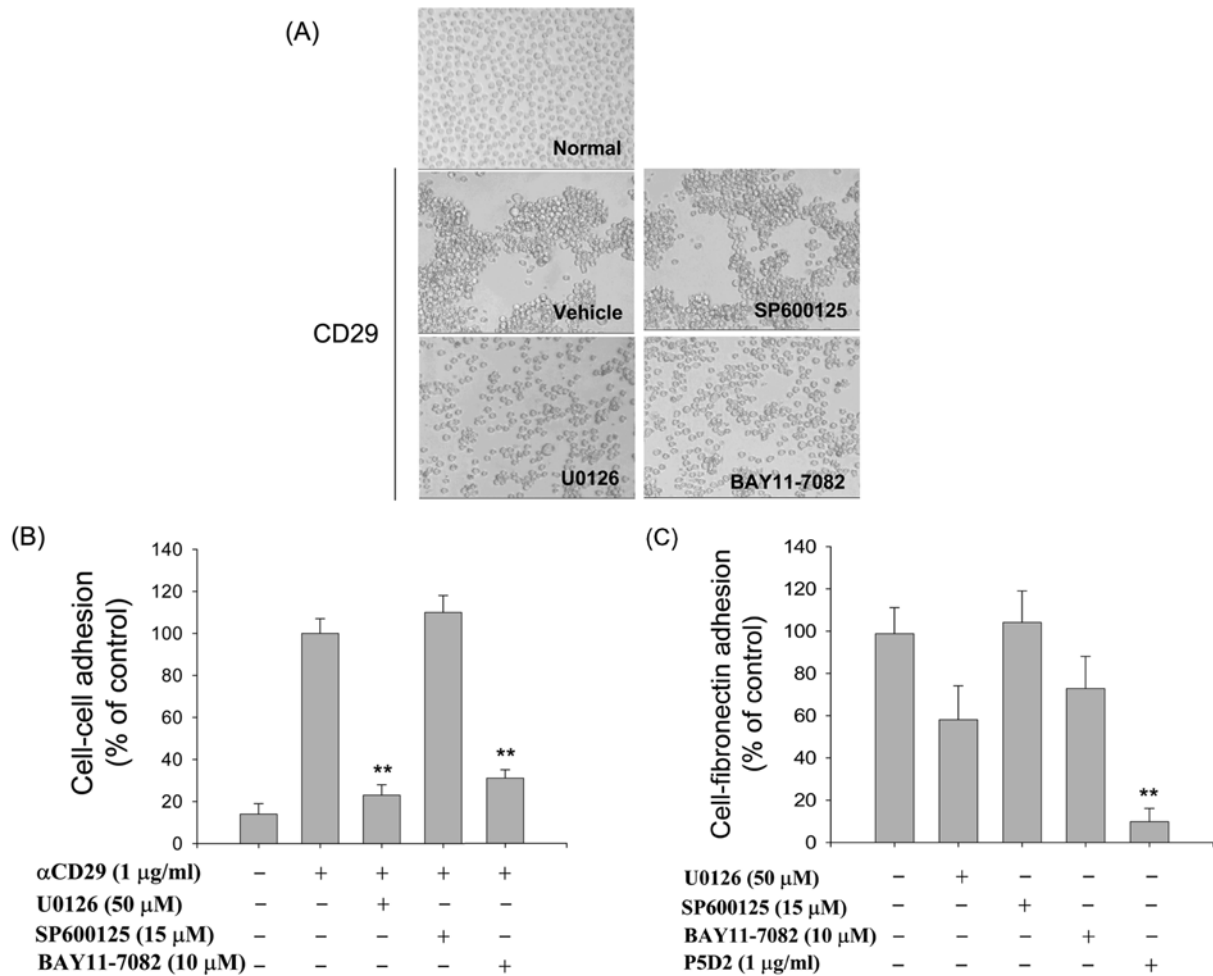


Fig. 3 – Effect of BAY11-7082 on CD29-mediated cell-cell adhesion. (A and B) U937 cells were incubated with BAY11-7082, SP600125 and U0126 in the presence or absence of pro-aggregative (activating) antibody to CD29 (MEM 101A) for 3 h. The images of the cells in culture were obtained using an inverted phase contrast microscope attached to a video camera (A). Quantitative cell-cell adhesion was determined according to Materials and Methods (B). (C) U937 cells (5×10^5 cells/well), pretreated with BAY11-7082, SP600125, U0126 and P5D2, were seeded on fibronectin (50 μ g/ml)-coated plates and further incubated for 3 hours. The attached cells were determined by crystal violet assay, as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. **: $p < 0.01$ compared to control group.

는 것을 통해 증명될 수 있었다.¹⁰⁾ 따라서, BAY11-7082에 의한 CD29 활성화시 동반되는 액틴 세포골격 구조 변화에 관한 조절효과를 조사하여 보았다. Fig. 4에서 확인할 수 있듯이, CD29항체 MEM101을 이용한 CD29의 활성화 유도는 세포-세포간 유착부위에 CD29로 구성된 molecular complex가 형성된다는 것을 확인시켜 주었다. 또한 CD29의 활성화는 이들 단백질과 동일한 부위에 액틴 세포골격이 함께 상호작용을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러나, 흥미롭게도, BAY11-7082는 CD29의 molecular complex 형성은 강하게 억제하지 못하였지만, CD29과 액틴 세포골격 사이에 상호작용은 완벽히 억제된 것으로 보였다. 즉, 본 결과는, BAY11-7082가 액틴 세포골격의 억제를 통한 CD29-매개성 세포유착 반응을 조절할 수 있다는 것을 시사한다고 하겠다.

Surface CD29 발현에 미치는 BAY11-7082의 효과

세포 표면 단백질인 CD29의 발현 정도는 직접적으로 CD29 매개성 유착과정의 조절시 매우 중요한 파라미터로 간주되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 BAY11-7082에 의한 U937 세포의 표면에서 발현되는 CD29의 발현조절 효과를 검증하고자 하였다. Confocal microscopy에서 관찰된 것처럼 CD29의 molecular association을 저해하지는 못하지만, 표면 CD29의 발현정도는 BAY11-7082 처리시 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 그러나, BAY11-7082는 다른 adhesion molecule인 CD18, CD62L 및 CD43의 발현을 저해시키지는 않았다. 반면에, CD29-associated adhesion molecule인 CD147의 발현은 유의적으로 감소되었다. 이는 BAY11-7082에 의한 CD29 기능 활성화는 어느 정도 CD29의 세포막 표면내 발현정도와 관련이 있음을 시사한다고 하겠다.

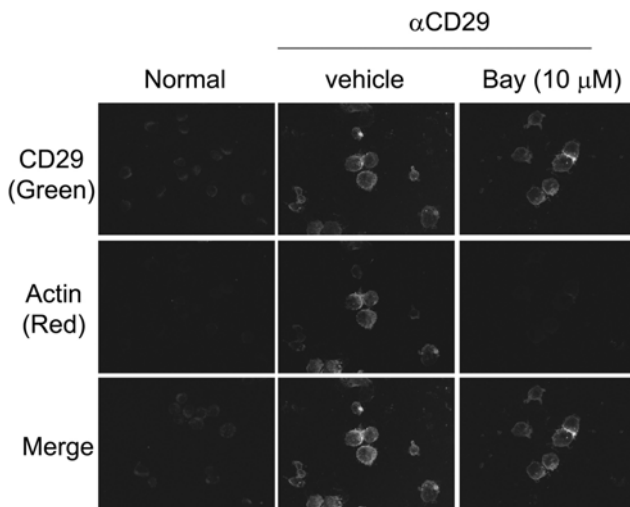


Fig. 4 – Effect of BAY11-7082 on the association of CD29 and actin cytoskeleton induced by CD29 ligation in U937 cells. U937 cells (1×10^6 cells/ml) pre-treated with BAY11-7082 (Bay: $10 \mu\text{M}$) for 30 min were incubated with MEM101A ($1 \mu\text{g/ml}$) for 3 h. Confocal analysis of CD29 and actin cytoskeleton was performed as described in Materials and methods. The results show one experiment out of two.

결론

NF- κ B 억제제로 알려진 BAY11-7082의 단핵구 세포주인 U937 세포의 유착조절능을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BAY11-7082는 CD29에 의해 활성화된 U937 세포간 유착과정을 효과적으로 억제하였다.
2. BAY11-7082는 CD29의 단순한 활성화에 의해 진행되는 세포-fibronectin간 유착과정은 억제하지 못하였다.
3. BAY11-7082는 매우 강력하게 CD29에 의해 유도된 CD29과 액틴 세포골격간의 재배열을 억제하였다.
4. 또한 BAY11-7082는 CD29와 associated adhesion molecule인 CD147

의 세포표면 수준을 감소시켰다. 현재까지 NF- κ B는 CD29-매개성 유착과정과 관련성이 적은 것으로 보고⁷⁾ 되었기 때문에, 기존에 알려진 신호전달 단백질(예, PTK, PKA, Src, 및 PI3K)의 활성화 과정을 중심으로, BAY11-7082의 세포신호전달 과정 억제 기전을 추가적으로 검토하고자 한다. 또한 BAY11-7082의 효과가 생체내 대표적인 세포간 유착과정인 T 세포와 APC 간의 유착과정을 조절하는지에 관한 평가연구가 차후에 계속해서 진행될 예정이다.

감사의 글

본 연구에 기술적인 도움을 준 이지연 연구원에게 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Tetley, T. D. : Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug. Targets Inflamm Allergy* **4**, 607 (2005).
- 2) Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. and Mosser, D. M. : Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1298 (2006).
- 3) Murtaugh, M. P. and Foss, D. L. : Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**, 109 (2002).
- 4) Caulfield, J. J., Fernandez, M. H., Sousa, A. R., Lane, S. J., Lee, T. H. and Hawrylowicz, C. M. : Regulation of major histocompatibility complex class II antigens on human alveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of glucocorticoids. *Immunology* **98**, 104 (1999).
- 5) Pierce, J. W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore,

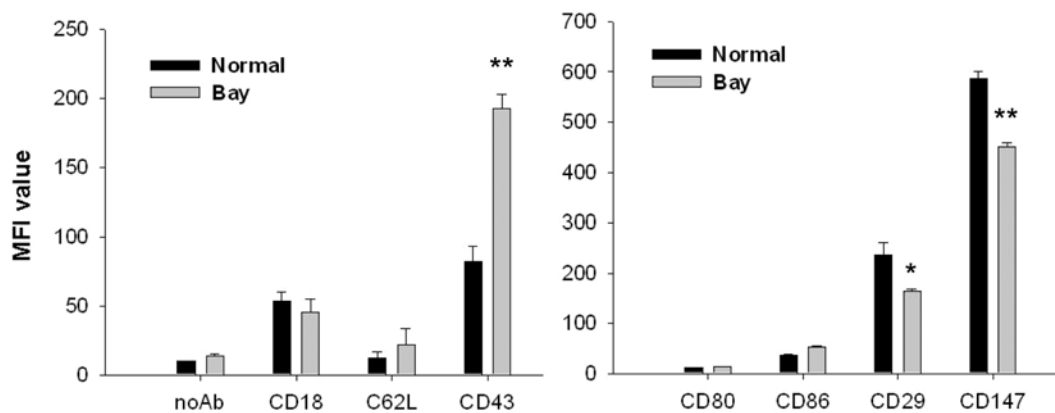


Fig. 5 – Effect of BAY11-7082 on surface levels of adhesion molecules. U937 cells (1×10^6 cells/ml) were treated with BAY11-7082 (Bay: $10 \mu\text{M}$) for 3.5 h. Surface levels of adhesion molecules were analysed by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ compared to normal group.

- S. A., Collins, T. and Gerritsen, M. E. : Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 21096 (1997).
- 6) Cordes, N. and Park, C. C. : beta1 integrin as a molecular therapeutic target. *Int. J. Radiat. Biol.* **83**, 753 (2007).
- 7) Cho, J. Y., Kim, A. R., Joo, H. G., Kim, B. H., Rhee, M. H., Yoo, E. S., Katz, D. R., Chain, B. M. and Jung, J. H. : Cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, as a new strong regulator of CD29 and CD98 functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 954 (2004).
- 8) Cho, J. Y. : Chloroquine, an anti-malarial agent, acts as a novel regulator of beta 1-integrin-mediated cell-cell adhesion. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 726 (2008).
- 9) Cho, J. Y., Baik, K. U., Jung, J. H. and Park, M. H. : *In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* **398**, 399 (2000).
- 10) Cho, J. Y., Fox, D. A., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Katz, D. R. and Chain, B. : The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* **98**, 374 (2001).
- 11) Lee, Y. G., Byeon, S. E., Kim, J. Y., Lee, J. Y., Rhee, M. H., Hong, S., Wu, J. C., Lee, H. S., Kim, M. J., Cho, D. H. and Cho, J. Y. : Immunomodulatory effect of *Hibiscus cannabinus* extract on macrophage functions. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 62 (2007).
- 12) Lee, Y. G., Lee, W. M., Kim, J. Y., Lee, J. Y., Lee, I. K., Yun, B. S., Rhee, M. H. and Cho, J. Y. : Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 852 (2008).
- 13) Kim, A. R., Cho, J. Y., Zou, Y., Choi, J. S. and Chung, H. Y. : Flavonoids differentially modulate nitric oxide production pathways in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 297 (2005).
- 14) Stonehouse, T. J., Woodhead, V. E., Herridge, P. S., Ashrafian, H., George, M., Chain, B. M. and Katz, D. R. : Molecular characterization of U937-dependent T-cell co-stimulation. *Immunology* **96**, 35 (1999).
- 15) Woodhead, V. E., Stonehouse, T. J., Binks, M. H., Speidel, K., Fox, D. A., Gaya, A., Hardie, D., Henniker, A. J., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Taskov, H., Todd, R. F., 3rd van Agthoven, A., Katz, D. R. and Chain, B. M. : Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *Int. Immunol.* **12**, 1051 (2000).
- 16) Longhurst, C. M. and Jennings, L. K. : Integrin-mediated signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 514 (1998).