

GeneChip による鼻ポリープ由来の線維芽細胞から 産生される fractalkine の同定

東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科学講座

飯田 誠 吉川 衛 森山 寛

国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部

中島 敏治 齋藤 博久

(受付 平成 15 年 3 月 6 日)

IDENTIFICATION OF FRACTALKINE PRODUCTION BY FIBROBLASTS DERIVED FROM NASAL POLYP USING GENECHIP

Makoto IIDA, Mamoru YOSHIKAWA, and Hiroshi MORIYAMA

Department of Otorhinolaryngology, The Jikei University School of Medicine

Toshiharu NAKAJIMA and Hirohisa SAITO

Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development

We investigated genome-wide gene expression by cultured-fibroblast derived from nasal polyp using the high-density oligonucleotide probe-array system (GeneChip). Eleven Chemokines, i.e., RANTES, MCP-3, eotaxin, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , CKA-3, IL-8, IP-10, I-TAC, and SDF-1 were upregulated at detectable messenger RNA levels in cultured-fibroblast after simulation with tumor necrosis factor α and interleukin 4. We also found that fractalkine (FKN), a newly found unique chemokine that combines properties of both chemoattractants and adhesion molecules, were produced by the fibroblasts at high mRNA levels, and confirmed it at protein levels. Genome-wide gene expression screening should be useful for detecting unexpected but potentially important molecules.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2003; 118: 253-60)

Key words: fractalkine, chemokine, fibroblast, sinusitis, nasal polyp

I. 緒 言

慢性副鼻腔炎は、マクロライド少量長期療法¹⁾²⁾や内視鏡下鼻内副鼻腔手術の導入³⁾⁴⁾により治療成績は上がったが、以前細菌感染性中心の疾患であった病態が近年のアレルギー疾患の増加により複雑化しており、とくに喘息を合併している症例等の難治例が問題視されている⁵⁾⁶⁾。

ヒトゲノム配列ドラフト解析が終了し⁷⁾⁸⁾、それを応用したポスト・ゲノム配列解析研究が加速している。ヒトゲノム配列解読は、純粋科学としての真理追究の達成という点以外に、その応用が医学の発展に貢献することが予測され、将来の医療や産業の構造、生物としてのヒトの生命に対する考え方に大きな影響を与えうることが注目されている。事実、全ゲノムにわたり存在する一塩基多

型をありふれた疾患発症と結びつけて解析していく計画は、ゲノム配列解析以上の激しい国際競争となっている。一方、ゲノム配列の理解により、一つの細胞に存在する全発現遺伝子 (mRNA) 定量 (トランスクリプトーム) や全タンパク質分子 (プロテオーム) についての包括的、網羅的解析が可能になりつつある。慢性副鼻腔炎やアレルギー疾患は、多くの環境因子の影響を受けて発症する疾患であり、ゲノム配列解析よりは、変動する mRNA を定量する遺伝子発現解析が重要である。Affymetrix 社の商品名 GeneChip は約 1.4 cm 四方のガラス盤の上で 12,000 種類のヒト遺伝子発現を定量することができる装置である。このような最新遺伝子発現解析装置の開発により、ゲノム研究を医療や研究に応用することが可能になってきている⁹⁾。われわれは慢性副鼻腔炎病態で重要な働きを示すと考えられ、近年、種々のサイトカイン、ケモカインを産生すると考えられるようになってきた線維芽細胞に着目し、炎症性サイトカインの代表である腫瘍壊死因子 α (TNF- α) およびインターロイキン 4 (IL-4) による刺激前後において、GeneChip をもちいてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、すでに多くの報告がある RANTES, eotaxin, IL-8¹⁰⁾⁻¹³⁾ や今まで報告のなかった Fractalkine (FKN) など数種類のケモカインが刺激により著しく増強することを見出した。

II. 対象と方法

1. 細胞培養

鼻由来の線維芽細胞は、手術前当大学倫理委員会の審査に則りインフォームドコンセントを得た慢性副鼻腔炎患者 4 名より、手術時に鼻ポリープを採取し、その細胞から樹立した。すなわち、鼻ポリープを細断して細胞懸濁液を調製した後、リン酸緩衝食塩水 (以下 PBS) で洗浄した。この細胞を、非働化した 10% 牛胎児血清 (FCS, JRH bioscience, Lenexa, KS), ペニシリン 100 単位/ml ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO BRL, Grand Island, NY) と amphotericin B 3 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, St. Louis, MO) を添加した RPMI1640 で 37°C, 5 mmCO₂ の CO₂ インキュベーターで培養した。実験には 3 から 10 継代の細

胞を使用した。また、ヒト胎児肺線維芽細胞株 MRC-5-30 (Health Science Research Resources Bank, Osaka) も同様に培養した 31 から 34 継代の細胞を使用した。ヒト皮膚線維芽細胞株 NHDF7555 (Clonetics, Walkersville, MD) は、10%FCS, 1 $\mu\text{g/ml}$ human recombinant fibroblast growth factor (hFGF), 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (Clonetics), 50 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B (Clonetics) を添加した Fibroblast Basal Medium (Clonetics) で培養した 3 から 5 継代の線維芽細胞を使用した。

2. 線維芽細胞のサイトカインによる刺激

細胞は 6 穴培養プレート (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) で FCS 非添加の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO BRL) と Ham's F12 medium (F12, GIBCO BRL) を等量混和した培養液を使用した。サイトカインによる細胞の刺激はプレートの約 80% まで細胞が増殖した時点で、IL-4 (R & D systems, Minneapolis, MN), TNF- α (R & D systems) の単独または両者を添加して行った。

3. 線維芽細胞の遺伝子発現解析

TNF- α (50 ng/ml) と IL-4 (10 ng/ml) の存在下で 24 時間培養した線維芽細胞の遺伝子発現は GeneChip (Human Genome U95A, Affymetrix Inc, Santa Clara, CA) を用いて検出した。GeneChip 用の試料は細胞より total RNA を精製し、Affymetrix 社のプロトコルにしたがって調製した。調整したビオチン化 cRNA を GeneChip とハイブリダイズさせた後、ストレプトアビジン-フィコエリスリンを反応させ、GeneChip に結合したフィコエリスリンをレーザーキャナーで測定し、GeneChip 用ソフト Suite4.0 (Affymetrix) で解析した。

4. RT-PCR による Fractalkine (FKN)-mRNA の検出

細胞からの mRNA の調製は Rneasy kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) を用いた。cDNA 合成は、Ready-To-Go kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて行った。PCR は、AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて GeneAmp PCR system 9600 (Applied

Biosystems) で反応させた。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の oligo primer は forward primer として 5'-GTC TTC ACC ACC ATG GAG AAG GCT-3', reverse primer は 5'-CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA-3' を使用し, FKN の oligo primer は forward primer として 5'-ATG GCT CCG ATA TCT CTG TCG T-3', reverse primer は 5'-AAA AGC TCC GTG CCC ACA-3' を使用した。PCR は, 94°C 1分, 55°C 1分, 72°C 2分の反応を 37 サイクル行った。PCR 産物は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) で測定し GAPDH と比較した。

5. ELISA による FKN タンパク質の検出

ELISA は, Nunc immunoplate MAXISORP F96 CRET (Nunc, Roskilde, Denmark) にポリクローナル抗ヒト FKN 抗体 (5 µg/ml R & D systems) を 100 µl 添加し 4°C で一晩インキュベートしてコートした後, 400 µl のブロッキング試薬 (Boehringer, Cat. No. 1112589) を添加し 1 時間室温で反応させた後, 0.1% Brij, PBS で 3 回洗浄し, 0.1% BSA, PBS で希釈した FKN 標準液 (0.14~100 µg/ml) または試料 100 µl を添加して 4°C で一晩反応させた。続いて洗浄後, 各穴に 100 µl のビオチン化抗ヒト FKN 抗体 0.8 µg/ml (R & D systems) を添加して 3 時間室温で反応させた。反応後, 100 µl の horseradish peroxidase-labeled Streptavidin (GIBCO BRL) を添加してさらに室温で 30 分反応させ, 100 µl の Tetramethyl benzidine (TMB Microwell Peroxidase Substrate System, KPL) を添加して室温で発色させた。発色反応は 50 µl の 1 M H₃PO₄ で停止した。発色は ELISA 測定機器 (Dynatech Laboratories Inc.) を用い吸光度 450 nm (対照 630 nm) で測定した。

6. 統計解析

結果はすべて Student's *t*-test をおこない, $p < 0.05$ を有意と判定した。

III. 結 果

1. GeneChip による線維芽細胞におけるケモカイン遺伝子発現の検出

TNF- α と IL-4 の存在下で培養した鼻ポリ-

ープ由来の線維芽細胞における各種ケモカインの発現について GeneChip を用いて検討した。その結果, GeneChip で検出可能な 35 種類のケモカイン中, 2 種類の CC ケモカイン (RANTES, eotaxin), 5 種類の CXC ケモカイン (GRO- α , GRO- β , GRO- γ , CKA-3, IL-8) において著しい発現増強が認められた (Table 1)。この他, 興味あることに CX3C ケモカインである FKN も約 9 倍の発現増強が認められた。

2. RT-PCR による FKN mRNA の検出

GeneChip を用いたケモカインの遺伝子発現解析から FKN の発現増強が認められたので, RT-PCR を用いて詳細に検討した。鼻ポリープ由来線維芽細胞は IL-4 と TNF- α の単独または両者の存在下で 12 時間から 48 時間培養した。Fig. 1A に示すように, TNF- α 単独または TNF- α と IL-4 の存在下で線維芽細胞での FKN の発現が確認された。また, この FKN の発現は 12 時間にピークを認め, TNF- α と IL-4 の存在下では, 48 時間までその発現が持続していた (Fig. 1B)。

3. FKN タンパク質の検出

鼻ポリープ由来線維芽細胞を IL-4, TNF- α 単独または両者の存在下で培養して FKN タンパク質の産生を経時的に検討した。その結果, IL-4, TNF- α 単独とその両者の刺激で時間経過とともに FKN の産生が認められた (Fig. 2A)。つぎに鼻ポリープ由来線維芽細胞を種々濃度の IL-4 と TNF- α 存在下で 24 時間培養して培養上清中の FKN 産生を検討した。その結果, FKN の産生は IL-4 と TNF- α の両者の濃度依存的に増強した (Fig. 2B)。

さらに, ヒト胎児肺線維芽細胞株 (MRC-5-30) とヒト皮膚線維芽細胞株 (NHDF 7555) についても IL-4 と TNF- α の存在下, 72 時間における FKN 産生を検討したところ, 鼻ポリープ由来線維芽細胞と同様に FKN のタンパク質の産生が認められた (Fig. 3)。

IV. 考 察

今回我々は, 鼻茸由来の線維芽細胞において発現変動する遺伝子について GeneChip を用い包括的に測定した。その結果, すでに報告されている RANTES, eotaxin などのケモカイン遺伝子の発

Table 1. The expression of chemokine transcripts in human nasal polyp derived fibroblasts. The fibroblast was cultured in the presence of TNF- α (50 ng/ml) and IL-4 (10 ng/ml) for 12 hr. The chemokine transcripts were detected by Human genome U95A GeneChip. The expression level is the percentage of the mean of housekeeping genes (beta-actin and GAPDH).

	chemokine	GeneBank accessin #	medium	TNF- α + IL-4
C-chemokine	CL1, Lymphotactin	AL031736	<0.1	<0.1
	CL2, SCM-1 β	D63789	0.3	<0.1
CC-chemokine	CCL1, I-309	M57506	<0.1	<0.1
	CCL2, MCP-1	M26683	0.7	1.1
	CCL3, LD78a	D90144	0.2	0.1
	CCL4, Act-2	J04130	<0.1	<0.1
	CCL5, RANTES	M21121	<0.1	70.0
	CCL7, MCP-3	X72308	<0.1	0.9
	CCL8, MCP-2	Y16645	<0.1	0.8
	CCL11, eotaxin	U46573	3.0	104.1
	CCL13, MCP-4	AJ001634	0.3	0.7
	CCL14, HCC-1	AF088219	0.6	0.2
	CCL16, LEC	AB018249	0.6	0.4
	CCL17, TARC	D43767	<0.1	<0.1
	CCL18, PARC	Y13710	0.6	0.3
	CCL19, ELC	AB000887	<0.1	<0.1
	CCL20, LARC	U64197	<0.1	<0.1
	CCL21, SLC	AB002409	<0.1	<0.1
	CCL22, MDC	U83171	<0.1	<0.1
	CCL23, MIP-3	AF088219	0.8	0.5
	CCL25, TECK	U86358	1.6	1.4
	CCL27, ALP	AJ243542	<0.1	<0.1
CXC-chemokine	CXCL1, GRO- α	X54489	0.2	12.9
	CXCL2, GRO- β	M36820	0.2	2.3
	CXCL3, GRO- γ	M36821	<0.1	1.7
	CXCL4, PF4	M25897	0.4	0.3
	CXCL5, ENA-78	X78686	0.2	0.5
	CXCL6, CKA-3	U81234	0.1	20.0
	CXCL8, IL-8	M28130	<0.1	38.9
	CXCL9, MIG	X72755	<0.1	<0.1
	CXCL10, IP-10	X02530	<0.1	0.4
	CXCL11, I-TAC	AF030514	<0.1	0.4
	CXCL12, SDF-1	L36033	13.8	3.3
	CXCL13, BLC	AF044197	<0.1	<0.1
	CX3C-chemokine	CX3CL1, fractalkine	U84487	0.9

現が認められた。さらに、線維芽細胞から FKN の発現を確認した。この線維芽細胞からの FKN は TNF- α により産生され、また IL-4 の存在下で産生増強を認めた。その反応は継代培養をおこなっており手術前の薬剤や線維芽細胞周囲の環境の影響はほぼないと思われる。また、ヒト胎児肺線維

芽細胞株 (MRC-5-30) とヒト皮膚線維芽細胞株 (NHDF 7555) についても IL-4 と TNF- α の存在下、鼻ポリープ由来線維芽細胞と同様に FKN のタンパク質の産生が認められ、FKN の産生は鼻ポリープ中の線維芽細胞特有の反応ではないことが示された。近年、慢性副鼻腔炎において感染

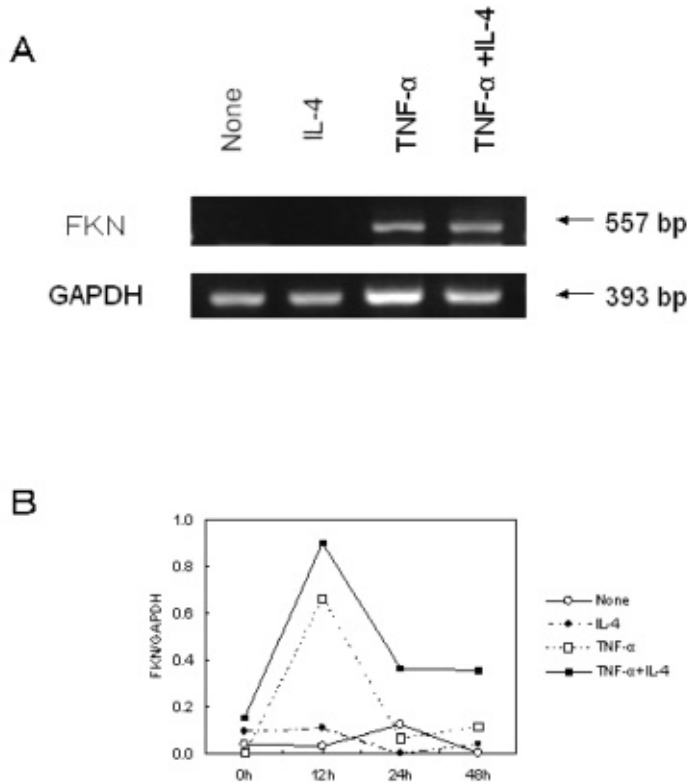


Fig. 1. The expression of FKN mRNA in human nasal polyp derived fibroblasts.

A. The fibroblasts were incubated with TNF- α (50 ng/ml) and/or IL-4 (10 ng/ml) for 12 hr. The FKN mRNA was detected by RT-PCR. B. The kinetics of FKN expression was determined up to 48 hr by RT-PCR. The expression levels were quantified by Agilent 2100 Bioanalyzer.

性の炎症だけでなくアレルギーの強い関与が考えられており TNF- α , IL-4 などのサイトカインが存在する炎症局所では様々な炎症細胞の集積が認められている。その炎症細胞の集積にケモカインが強く関与しており、今回我々が報告した FKN も関与していることが示唆された。

近年免疫細胞の流血中より組織への移行メカニズムが接着分子やケモカインに関する研究により解明が進んでいる。一般に感染、アレルギー等によって引き起こされる局所の炎症に様々な細胞が血管内より集積する。流血中の細胞が組織に遊走する過程には血管内のローリング、活性化、接着、細胞浸潤があり、接着分子や遊走分子であるケモカインが関与している。ケモカインは、その濃度勾配により細胞を遊走させる特徴的なシステイン配列を持つタンパク質である。その種類は現在同定されているもので約 50 種類を数え、その標的細

胞が決まっている。一般的にケモカインは最初の 2 つのシステイン残基配列により CXC, CC, C, CX3C のサブクラスに分類されている。またそれぞれのケモカインについてそのレセプターが決まっている¹⁴⁾。

FKN は、近年発見され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両方を有する CX3C ケモカインである¹⁵⁾。その分子量は 95 kDa であり、他のケモカインと比べ非常に大きな分子である。また、従来の CXC, CC, C ケモカインが可溶性の分泌タンパク質であるのに対し、FKN は巨大なムチン領域、細胞膜貫通領域と細胞内領域を有する。その産生細胞は、活性化血管内皮細胞、ニューロン、樹状細胞、腸管上皮細胞、活性化アストロサイト、濾胞樹状細胞、活性化 B 細胞とランゲルハンス細胞が報告されている。TNF- α converting enzyme

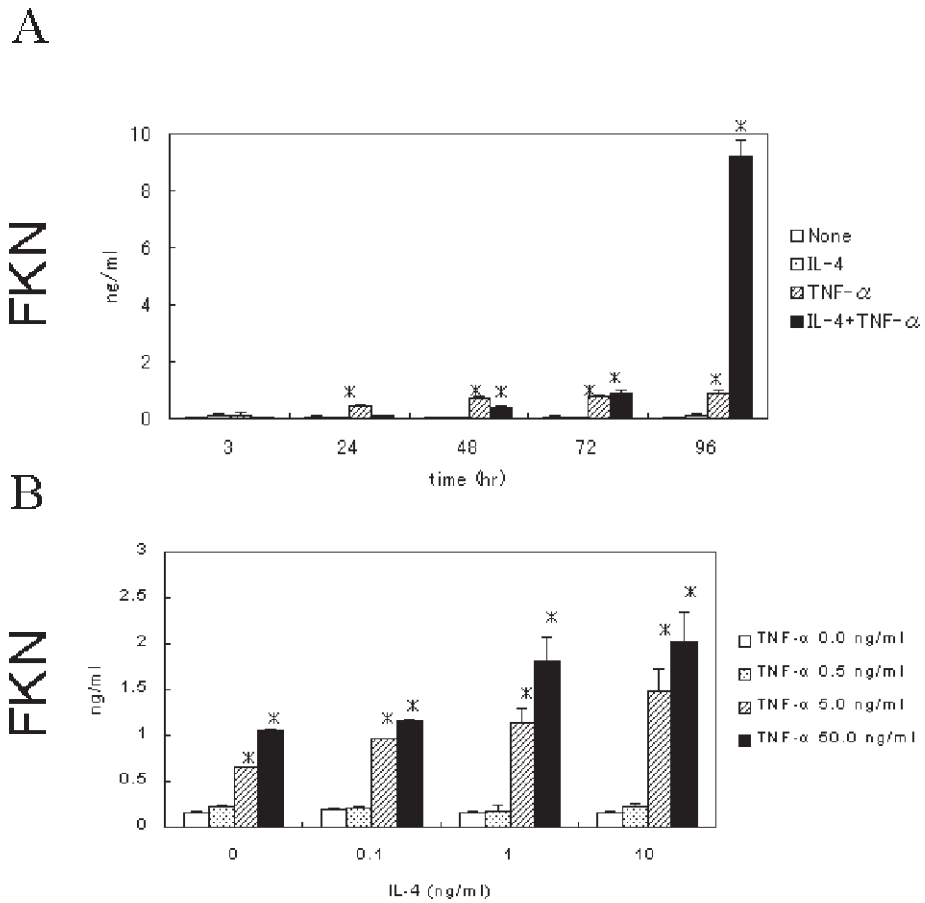


Fig. 2 The expression of FKN protein in the culture supernatant from human nasal polyp derived fibroblasts.

A. Human fibroblast was incubated with TNF- α (50 ng/ml) and/or IL-4 (10 ng/ml) from 3 to 96 hr. Fractalkine protein in the culture supernatant was detected by ELISA. B. The dose-dependency of TNF- α and IL-4 for the FKN induction. The fibroblasts were cultured with TNF- α and/or IL-4 for 72 hr. (**P* value < 0.05)

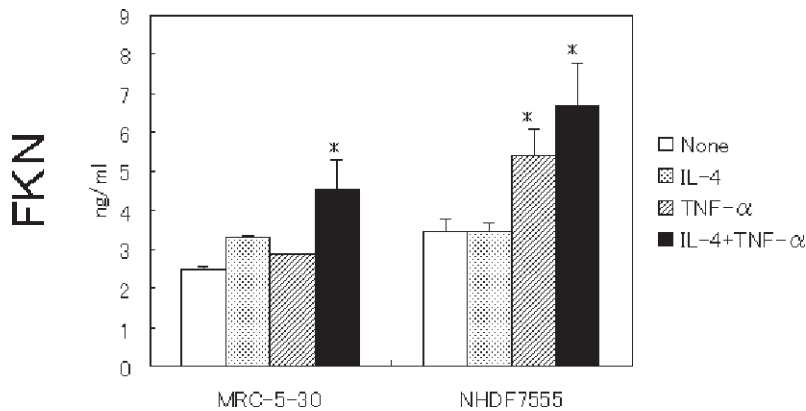


Fig. 3. The expression of FKN protein in the culture supernatant from human fetal lung derived-fibroblasts (MRC-5-30) and human skin-derived fibroblasts (NHDF7555). These fibroblasts were incubated with TNF- α (50 ng/ml) and/or IL-4 (10 ng/ml) for 72 hr. (**P* value < 0.05)

(ADAM17)により切断され、可溶性の FKN となると考えられている。また、FKN のレセプター (CX3CR1) は、1995 年レセプター V28 として報告されているものと同一であることを Imai, Yoshie らは報告し¹⁶⁾、CX3C レセプターを有する単球、NK 細胞および CD8 陽性の細胞傷害性の T 細胞が FKN の標的細胞とされている。FKN の機能として、NK 細胞、T 細胞、単球の接着活性と遊走活性、NK 細胞傷害活性の増強、脱顆粒、HIV-1 (human immunodeficiency virus-1) 感染阻害が報告されている。

今回、GeneChip をもちいたスクリーニングにより発見された線維芽細胞からの FKN 遺伝子発現はタンパク量としても同定することが可能であった。しかしながら、mRNA 発現量のピークが 12 時間であるのに対し、上清中のタンパク質濃度のピークは 96 時間以降であった。このことは少なくともアレルギー炎症が生じてから 3 日以内では、FKN は線維芽細胞内もしくは細胞膜上に存在していることを示している。膜結合型 FKN は白血球に対する接着分子として作用することが知られている¹⁷⁻¹⁹⁾。したがって、FKN のアレルギー炎症における生物学的な意義としてはこの接着分子としての作用、つまり局所に集積した白血球をとどめておく作用にあると想定される。

GeneChip などの網羅的分子解析手法の登場により、今までは偶然の出来事であった新発見が、必然的な成果として得られるようになってきた。今回、われわれは線維芽細胞の炎症性刺激を加えた際の遺伝子発現を網羅的に解析し、FKN の著しい発現の増強を発見した。今回線維芽細胞の TNF- α と IL-4 の刺激実験から既製の限られた種類の GeneChip を用いた検索結果でも新たに FKN の発現を検出できた。今後 GeneChip の追加、改良によりさらに予想もしない新たなケモカインの関与、あるいは分子相互作用の発現なども考えられ、将来、これら網羅的解析手法により、ある細胞のみならず、疾患全体を総合的に理解することが可能になっていくと予想される。

V. 結 語

GeneChip を用い線維芽細胞からの包括的な mRNA の発現を、ケモカインに着目し測定した。

既に報告のあるケモカインに加え今まで報告のない FKN の mRNA の発現を認め、タンパク質の産生について ELISA 法を用い確認した。線維芽細胞からの FKN の mRNA 発現は、TNF- α 刺激後 12 時間でピークを認め、IL-4 の共存で増強し、さらに 24 時間、48 時間後においても発現が持続していた。また、タンパク質レベルにおいて TNF- α 刺激後 48 時間でプラトーとなるが、IL-4 の共存では、96 時間後まで産生が継続していた。

文 献

- 1) 森山 寛, 柳 清, 鴻 信義, 金田健作, 深見雅也. 内視鏡下鼻腔整復術の術後成績: エリスロマイシン (術後少量長期) 投与例と非投与例の比較. 耳展 1992; 35: 351-6.
- 2) 柳 清. 術後のマクロライド使用. J Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 12: 229-34.
- 3) 森山 寛, 小沢 仁, 青木 基, 本多芳男. 内視鏡下の鼻腔整復術: 手技とその評価. 耳展 1989; 32: 429-36.
- 4) 森山 寛. 内視鏡下鼻内副鼻腔手術: 進歩と定着. 耳喉頭頸 1996; 68: 287-98.
- 5) 柳 清. 喘息合併症. 森山 寛 編. 耳鼻咽喉科外来シリーズ 1. 鼻副鼻腔外来. 東京: メジカルビュー社. 1999. p. 196-9.
- 6) 柳 清. 喘息を合併する慢性副鼻腔炎と鼻副鼻腔手術. J Otolaryngol Head Neck Surg 2002; 18: 1574-8.
- 7) Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Zhu X, et al. The sequence of the human genome. Science 2001; 291: 1304-51.
- 8) International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860-921.
- 9) Iida M, Matsumoto K, Tomita H, Nakajima T, Akasawa A, Saito H, et al. Selective down-regulation of high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) α -chain messenger RNA among transcriptome in cord blood-derived in comparison with adult peripheral blood-derived cultured human mast cells. Blood 2001; 97: 1016-22.
- 10) Van Damme J, Decock B, Conings R, Lenaerts JP, Opdenakker G, Billiau A. The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin 8. Eur

- J Immunol 1989; 19: 1189-94.
- 11) Rathanaswami P, Hachicha M, Sadick M, Schall TJ, McColl SR. Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. J Biol Chem 1993; 268: 5834-9.
 - 12) Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. J Immunol 1998; 160: 60-8.
 - 13) 飯田 誠, 深見雅也, 鴻 信義, 吉川 衛, 浅井和康, 森山 寛ほか. 鼻茸線維芽細胞における Eotaxin 産生. 耳展 42: 317-9.
 - 14) Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 2000; 12: 121-7.
 - 15) Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Schall TJ, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. Nature 1997; 385: 640-4.
 - 16) Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Yoshie O, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. Cell 1997; 91: 521-30.
 - 17) Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Umehara H, et al. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. J Immunol 2000; 164: 4313-20.
 - 18) Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction: rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. J Biol Chem 1999; 274: 10053-8.
 - 19) Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Patel DD, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. J Exp Med 1998; 188: 1413-9.