腎における L-セレクトインリガンドの発現とその白血球浸潤への関与

川島博人・李 永菲・宮坂昌之*

mini review

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Expression of L-selectin ligands in the kidney and their involvement in leukocyte infiltration

Here we summarize our biochemical and histochemical characterization of L-selectin ligands in the kidney. The staining pattern with anti-sialyl Le^x antibodies (KM-93, FH-6 and CSLEX-1) was distinct from that with L-selectin-IgG chimera (LEC-IgG), suggesting that sialyl Le^x antigen is not associated with ligands for L-selectin in the kidney, unlike other glycoprotein ligands for L-selectin. Immuno-precipitation analysis with LEC-IgG revealed that a proteoglycan-like molecule from a renal tubule-derived cell line specifically bound to L-selectin. Using sequential column chromatography, we isolated this proteoglycan-like molecule and identified it as versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan. Histochemical examination confirmed that versican is localized in the distal straight tubules of the rat kidney where L-selectin ligands are detected. Interestingly, after ureteral obstruction in the rat, versican disappeared from the renal tubules and appeared in the vascular bundles. Concomitantly, a massive leukocyte infiltration was observed around the vascular bundles, which was significantly inhibited with administration of an anti-L-selectin monoclonal antibody. These results suggest that versican secluded in the renal tubules under physiological conditions may play a role in leukocyte infiltration as an L-selectin ligand by changing its localization under pathological conditions.

Rec. 3/18/1998, Acc. 4/6/1998, pp 419~424

Hiroto Kawashima・Yong-Fei Li・Masayuki Miyasaka*

key words : L-selectin, kidney, proteoglycan, versican, sialyl Le^x

L-セレクトインはリンパ球、顆粒球や単球などの白血球全般に広く発現し、二次リンパ組織へのリンパ球ホーミング現象や、白血球の炎症巣への浸潤過程などに広く関与する。これらの現象を分子レベルでよりよく理解するためには、L-セレクトインリガンドの実体を解明する必要がある。

生理的条件下において常にリンパ球ホーミング

のみられる二次リンパ組織においては、5種類のL-セレクトインリガンドが知られている。末梢リンパ節においては、GlyCAM-1(Sgp50)^{1,2)}、CD34(Sgp90)³⁾、Sgp200⁴⁾およびポドカリキシン様糖蛋白質の4種類の糖蛋白質が特異的リガンドとして同定されている。さらに、粘膜系リンパ組織に存在するMAdCAM-1(mucosal addressin cell adhesion molecule-1)の少なくとも一部もL-セレクトイン結合性の糖鎖を有し、L-セレクトインのリガンドとして機能することが報告されている⁵⁾。

これらのリガンドは、*in vitro* でL-セレクトインと特異的に結合するだけでなく、リンパ球が二次

* Department of Bioregulation, Biomedical Research Center, Osaka University School of Medicine 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

Offprint requests to : Hiroto Kawashima, Department of Bioregulation, Biomedical Research Center, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

図1 LEC-IgG, FH-6, KM-93 を用いた免疫組織染色

薄切した凍結切片(7 μ m)を風乾後、冷アセトンで固定し、(A) LEC-IgG(L-セレクトリン IgG キメラ, 5 μ g/ml) または抗シアリルルイス X 抗体 (B) FH-6 あるいは (C) KM-93(マウス IgM, 5 μ g/ml) と 4°C にて一晩インキュベートした。洗浄後 HRP-標識二次抗体および DAB を用いて陽性部位の検出を行った。M: 髄質外帯, P: 腎乳頭。倍率 10 倍。

リンパ組織へホーミングする際の入り口に相当する高内皮細胞静脈(HEV)に局在することから、*in vivo* において実際に生理的に機能するものと考えられる。

一方、L-セレクトリンがリンパ球のみでなく好中球や単球などの他の白血球にも発現することや、抗 L-セレクトリン抗体の投与が炎症巣への白血球浸潤を強く抑制することなどから、非リンパ組織における L-セレクトリンリガンドの解析も進められている。

肺血管内皮細胞株の細胞内に存在する 50~100 kDa と >200 kDa のヘパラン硫酸様分子は、カルシウムイオン依存性、シアリ酸非依存性に L-セレクトリンと特異的に結合する⁶⁾。また、脳の微小血管に存在する硫酸化グルクロン酸をもつ糖脂質も L-セレクトリンと結合することが報告されている⁷⁾。

また筆者らは、L-セレクトリン-IgG キメラ (LEC-IgG) を用いた組織学的検討から、脳の白質や腎遠位尿細管にも L-セレクトリン結合性をもつ物質が存在することを報告している⁸⁾。これらの

非リンパ組織には生理的条件下では白血球の浸潤がほとんどみられないことから、L-セレクトリン結合性をもつこれらの物質が、正常組織において L-セレクトリンのリガンドとして働くことはないと思われる。しかし多数の白血球浸潤がみられる炎症時には、L-セレクトリンのリガンドとして働く可能性があると考えられる。

本稿では、筆者らの実験結果を中心に、非リンパ組織に存在するリガンドのうち、特に腎における L-セレクトリンリガンドの同定とその意義について述べる。

腎におけるシアリルルイス X 糖鎖と L-セレクトリンリガンドの分布

これまでに知られている L-セレクトリンリガンド(糖蛋白質)はシアリルルイス X 糖鎖をもつ。そこで、腎に存在する L-セレクトリンリガンドがシアリルルイス X 糖鎖を有するか否かを検討する目的で、LEC-IgG および抗シアリルルイス X 抗体 (FH-6, KM-93) を用いた免疫組織染色を行った(図1)。

図2 腎尿管由来 ACHN 細胞より精製した L-セレクトリンリガンドの部分アミノ酸配列
ACHN 細胞より精製した L-セレクトリンリガンドのトリプシン消化断片を HPLC で分画し、気相プロテインシーケンサを用いてアミノ酸配列を解析した。その結果得られたペプチド(ピーク 1~ピーク 4)のアミノ酸配列は、いずれもバーシカン由来のアミノ酸配列と一致した。各ペプチドの下に記した数字は、バーシカンのアミノ酸番号を示す。

その結果、LEC-IgG は髄質外帯(outer medulla; 図中に“M”と記した領域)に存在する遠位尿管直部に選択的に結合したが、FH-6 抗体は皮質(cortex)に存在する近位尿管直部に、また KM-93 抗体は主として腎乳頭(papilla; 図中に“P”と記した領域)に存在する中間尿管に結合した。また、これ以外の抗シアリルルイス X 抗体として 2H5 抗体および CSLEX-1 抗体を用いたところ、前者は髄質外帯の血管束および糸球体に結合したが、後者はどこにも結合せず(データは示さず)、いずれの場合も明らかに LEC-IgG の結合パターンとは異なっていた。

これらのことから、腎における L-セレクトリンのリガンドは、これまでに知られている糖蛋白質リガンドとは異なり、シアリルルイス X 糖鎖をもたないと考えられた。なお、各種の抗シアリルルイス X 抗体の結合部位が多様であるのは、これらの抗体がいずれもシアリルルイス X は認識するものの細かい特異性はお互い異なるためと考えられる。

腎における新しい L-セレクトリンリガンドの同定

つぎに、腎における L-セレクトリンリガンドの同定を目的として、腎尿管由来細胞株を用いた検討を行った。はじめに、LEC-IgG を用いた免疫沈降を行ったところ、腎尿管由来 ACHN 細胞がきわめて高分子サイズの L-セレクトリンリガンドを産生していることが判明した。

つぎにこの物質を、LEC-IgG との結合性を指標として CPC 沈殿, Sepharose CL-4B および Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより均一に精製した。精製標品をトリプシン消化してその

図3 ウェスタンブロットによる L-セレクトリンリガンドの同定

ACHN 細胞より精製した L-セレクトリンリガンドを、抗 L-セレクトリン抗体 HRL 2, 3 あるいは EDTA 存在下・非存在下において LEC-IgG または human IgG により免疫沈降を行った。沈降物を 0.5% アガロースを含む 1.75% ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、抗バーシカン抗体 anti-D, HRP-標識抗ウサギ IgG および ECL キット(アマシャム)を用いたウェスタンブロット解析を行った。バーシカンは約 1600 kDa の分子サイズを示した。

部分アミノ酸配列の解析を行った結果、得られたアミノ酸配列はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン的一种であるバーシカンの配列と完全に一致した(図2)。さらに、精製標品を LEC-IgG により免疫沈降を行った後、抗バーシカン抗体を用いたウェスタンブロット解析を行うことにより、精製

図4 ラット正常腎におけるパーシカンの局在
薄切した凍結切片(7 μ m)を風乾後、冷アセトンで固定し、抗パーシカンポリクローナル抗体 anti-D(ウサギ IgG, 1:200)と4°Cにて一晚インキュベートした。洗浄後、HRP 標識二次抗体およびDABを用いて陽性部位の検出を行った(A:倍率10倍, B:倍率25倍)。M:髄質外帯, P:腎乳頭。パーシカンは矢印で示す遠位尿細管直部、および*で示す腎乳頭(papilla)に存在する中間尿細管を染色した。

したL-セレクトリンリガンドがパーシカンであることをさらに確認した(図3)。

これまで知られているL-セレクトリンリガンドはその糖鎖部分を介してL-セレクトリンのレクチンドメインに結合する。そこで、免疫沈降の際にL-セレクトリンのレクチン活性を阻害する抗L-セレクトリン中和抗体HRL3またはEDTAを共存させたところバンドが消失した(図3)。このことから、パーシカンもそのグリコサミノグリカン鎖を介してL-セレクトリンのレクチンドメインと結合すると考えられる。実際、パーシカンをコンドロイチナーゼ消化するとL-セレクトリンとの結合が阻害された(データは示さず)。一方、コントロールとして用いた抗L-セレクトリン非中和抗体HRL2は予想どおり結合を阻害しなかった。

ラット正常腎におけるパーシカンの局在

つぎに、ラット正常腎凍結切片を用いて抗パーシカン抗体 anti-D による免疫組織染色を行った。図4に示すように、L-セレクトリンリガンドの

局在する遠位尿細管直部(図中の矢印で示した部位)に確かにパーシカンが局在することが明らかになった。また、LEC-IgG および抗パーシカン抗体によるサンドイッチELISAにより、正常腎に存在するパーシカンの少なくとも一部がL-セレクトリンと結合することを確認した(データは示さず)。一方、抗パーシカン抗体 anti-D は腎乳頭に存在する中間尿細管(またはヘンレのわなの細い部分)に強く結合した(図中に“*”で記した領域)。また、パーシカンはさまざまな組織に発現がみられたが、L-セレクトリンリガンドの局在とは必ずしも一致しなかった(データは示さず)。これらのことから、パーシカンにはL-セレクトリンに結合性のものと非結合性のものが存在すると考えられる。これがパーシカンのグリコサミノグリカン鎖の構造の違いによるのか、それともコア蛋白部分のスプライシングの違いによるのかについては、現在解析を進めている。

図5 尿管結紮モデルにおけるパーシカンの役割

正常腎においてパーシカンは尿管に局在するため、白血球と“隔離”されているが、尿管結紮後には尿管の周囲の血管内皮細胞上に発現することから、白血球表面のL-セレクトリンと相互作用する可能性がある。また、パーシカンはケモカインを提示する機能を有することから、サブセット特異的な白血球浸潤に関与する可能性もある。

尿管結紮モデルを用いた検討

つぎに、ラット尿管結紮モデルを用いて、腎におけるL-セレクトリンリガンドが炎症時の白血球浸潤に関与する可能性を検討した。このモデルにおいては、尿管結紮後24時間以内に腎間質に多数の白血球が浸潤するが、尿管結紮後に抗L-セレクトリン中和抗体およびL-セレクトリンのリガンドの一つスルファチドを静脈内投与することにより、この白血球浸潤は有意に抑制された(岡山大学医学部第三内科四方賢一先生らとの共同研究、投稿中)。

つぎに免疫組織染色による検討を行った結果、興味深いことに、正常腎においてみられた遠位尿管直部へのLEC-IgGおよび抗パーシカン抗体の結合が尿管結紮後24時間までにほぼ消失し、逆に正常腎においては結合の認められなかった尿管近傍の血管束(vascular bundle)に陽性反応像が認められた(データは示さず)。このとき、血管束の周囲には多数の白血球浸潤が認められた。新たに血管束に陽性反応像がみられたのが、もともと尿管に局在したパーシカンが血管に移動したためなのか、あるいは血管において新たに発現が誘導されたためなのかについては不明である。

一方、腎乳頭への抗パーシカン抗体の結合は、尿管結紮を行った腎においても正常腎と同様にみられた。なお、ヒト腎においても、尿路閉塞により腎内圧が高まり腎機能が障害されるとともに、腎間質に白血球の浸潤が認められるが、L-セレクトリンの関与は現在までのところ不明である。

以上の結果から、筆者らはつぎのようなモデル

を考えている(図5)。すなわち、白血球浸潤のほとんどみられない正常腎においてはパーシカンは尿管上皮細胞に局在し、白血球から「隠れて」存在しているが、尿管結紮を行となんらかの機序により血管内皮細胞上に発現するようになり、白血球と相互作用する可能性があると考えている。

L-セレクトリンは生理的な条件下では血流の存在下で血管内皮細胞上のリガンドと相互作用を行い、白血球のローリングを司ることが知られている。この現象は*in vivo*では腸間膜細静脈を用いて解析されるとともに、*in vitro*では人工的に流速あるいは応力をかけたflow chamberを用いて解析されている⁹⁾。血管内皮細胞上に発現したパーシカンが実際に白血球のローリングを媒介するか否かについては今後明らかにしていきたいと考えている。

また最近筆者らは、パーシカンが特定のケモカインと特異的に結合することを見出している。このことは、血管内皮細胞上に発現したパーシカンがケモカインを提示し、白血球インテグリンを活性化する可能性を示唆する。またパーシカンは、特定のケモカインのみを提示することからサブセット特異的な白血球浸潤に関与する可能性もある。

近年、L-セレクトリンがシグナル伝達分子として働く可能性が示唆されている。抗L-セレクトリン抗体により好中球表面のL-セレクトリンを架橋することにより、細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇および O_2^- 産生が増強されること¹⁰⁾や、L-セレクトリンのリガンドの一つ

GlyCAM-1 により, リンパ球の $\beta 2$ インテグリンを介した接着能が亢進すること¹¹⁾などが報告されている. パーシカンが L-セレクトインを介して白血球にシグナルを伝えるか否かも白血球浸潤の分子機構を理解するうえで興味ある課題である.

文 献

- 1) Imai Y, Singer MS, Fennie C, Lasky LA, Rosen SD : Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J. Cell Biol.* 113 : 1213-1221, 1991.
- 2) Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD : An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 69 : 927-938, 1992.
- 3) Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA : Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262 : 436-438, 1993.
- 4) Hemmerich S, Butcher EC, Rosen SD : Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, an adhesion-blocking monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 180 : 2219-2226, 1994.
- 5) Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC : L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366 : 695-698, 1993.
- 6) Norgard-Sumnicht KE, Varki NM, Varki A : Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science* 261 : 480-483, 1993.
- 7) Needham LK, Schnaar RL : The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 1359-1363, 1993.
- 8) Tamatani T, Kuida K, Watanabe T, Koike S, Miyasaka M : Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. III. Characterization of the LECAM-1 (L-selectin)-dependent adhesion pathway in rats. *J. Immunol.* 150 : 1735-1745, 1993.
- 9) Ley K, Tedder TF : Leukocyte interactions with vascular endothelium. *J. Immunol.* 155 : 525-528, 1995.
- 10) Waddell TK, Failkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP : Potentiation of oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. *J. Biol. Chem.* 269 : 18485-18491, 1994.
- 11) Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, Yednock TA, Bacon KB, Simon SI, Rosen SD : GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates $\beta 2$ integrins on naive peripheral lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184 : 1343-1348, 1996.