Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31): The All-Purpose Adhesion Molecule

血小板／内皮細胞接着分子-1(PECAM-1、CD31): 万能の接着分子

Muller, W.A.

Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, The Rockefeller University, New York, NY 10021, USA,
FAX: 1-212-327-8875

Key Words: *adhesion molecule, CD31, endothelium, leukocyte, PECAM-1*

Abstract

Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31, and henceforth in this review referred to as "PECAM") is a member of the immunoglobulin gene superfamily. This 130 kDa glycoprotein is concentrated in the junctions between vascular endothelial cells and expressed diffusely on the surfaces of platelets and many types of circulating leukocytes. In addition to being expressed on multiple cell types that interact within the bone marrow and vascular system, it is capable of mediating several different adhesion reactions. It can bind like cells to each other (homotypic adhesion), such as at the endothelial junction. It can bind different cells together (heterotypic adhesion), such as leukocyte to endothelium. On a molecular level, PECAM is capable of homophilic (PECAM binding to PECAM) as well as heterophilic adhesion, (for which certain sulfated glycosaminoglycans may be ligands), depending upon the experimental conditions. Moreover, on leukocytes, ligation of PECAM has been shown to activate adhesion molecules of the integrin family on the same cell. PECAM is thus in a position to play many different roles in the physiology and pathophysiology of the vascular system.

要約

血小板／内皮細胞接着分子-1(PECAM-1、CD31、以後ここでは"PECAM"と表すことにする)は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する130 kDaの糖タンパク質である。この糖タンパク質は、血管内皮細胞間の接着部位に集積し、また血小板や末梢に存在する白血球の細胞表面には分散して存在している。また、骨髄や循環系に関係する多くの細胞に発現し、数種の細胞接着反応を仲介することができる。内皮細胞結合のような同じ細胞同士の接着(同種細胞間接着)及び内皮細胞への白血球の結合のような異なる細胞間の接着(異種細胞間接着)に関わっている。分子レベルでは、PECAMは、同一分子同士でも結合(PECAMとPECAMの結合)し、また、実験条件によってはある種の硫酸化グリコサミノグリカンがリガンドと思われる異分子間接着を行う。一方、白血球では、PECAMにリガンドや抗体などが結合すると、同じ細胞上のインテグリンファミリー接着分子が活性化されることが示されている。このように、PECAMは循環系の生理学や病理学において、様々な役割を担っている。

A. Introduction

CD31 was originally reported as a myeloid differentiation antigen (1, 2). A similar molecule expressed by platelets and endothelial cells (3), and initially confused with the β_1 integrin chain platelet GPIIa (4), was subsequently shown to be CD31. Shortly thereafter, Muller and Newman realized that the putative adhesion molecules they had identified in the intercellular junctions of endothelial cells (5) and on platelets (6) were, in fact, the same molecule and immunologically identical to CD31 (6). The molecule was given the name platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, or PECAM-1, after these two cells in which it was identified—not because it played any known role in the adhesion of platelets to endothelium.

A. はじめに

CD31はまず、骨髄分化抗原として報告され(1、2)、次に、当初は血小板上のインテグリン β_1 サブユニットGPIIaと混同されていた(4)血小板や内皮細胞に発現している同様の分子がCD31として示された(3)。その後すぐに、内皮細胞の細胞間結合点(5)及び血小板(6)で確認されていた接着分子が同じ分子であり、免疫学的にCD31と同一であることが、MullerとNewmanにより明らかにされた(6)。この分子は、血小板／内皮細胞接着分子-1あるいはPECAM-1と名付けられた。これは、内皮への血小板接着において何らかの役割を果たしていたからではなく、血小板と内皮細胞で同定されたことにちなんだものである。

Abbreviations: PECAM & PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1; GAG, glycosaminoglycan

B. Cellular Distribution

PECAM is a marker of continuous endothelia. It is expressed by all endothelial cells that make junctions with each other in all vessels in all organs of the body including those comprising the blood-brain barrier (5). It is not expressed by discontinuous endothelia such as those lining the sinusoids of the splenic red pulp or the hepatic cords. This distribution is vessel-specific, not organ specific: Endothelium of splenic arteries expresses PECAM (5); if the liver becomes cirrhotic, the capillaries that grow into the fibrosing area are lined by a continuous endothelium that expresses PECAM (7).

PECAM is also expressed on a variety of cells of bone marrow origin. It is present on bone marrow stromal macrophages (8), platelets and megakaryocytes (6), myeloid precursors, circulating monocytes and neutrophils (1, 2), T lymphocytes (9), and blood dendritic cells (unpublished data). Among T cells, it has been reported to be enriched on circulating CD8⁺ "naive" (CD45RA⁺) T cells (10) and to be a marker for CD4 suppressor cells (11). Although B cell precursors appear to bear PECAM (12), mature circulating B cells and those in lymph nodes do not (5).

PECAM is expressed by certain myelogenous leukemias (1) as well as myeloid cell lines such as KG1, U937, and HL60 (1, 2). It has also been reported as a marker for the malignant spindle cells in Kaposi's sarcoma (13).

PECAM is not expressed by any other normal epithelial cell or mesenchymal cell examined. Despite one report to the contrary (14), it has not been found on carcinomas or sarcomas, other than those noted above. Thus, PECAM has come to be used as a marker for endothelium in tissue. In at least one study (15) anti-PECAM antibody was the most sensitive detector of neovascularization in tumor angiogenesis of all antibodies tested, including one against Factor VIII related antigen. PECAM-1 has an additional advantage over Factor VIII related antigen in being a cell surface protein. Thus, there are now several reports on purification of endothelium from heretofore refractory sources such as the microvasculature of adipose (16) and gastrointestinal (17) tissue by use of anti-PECAM antibodies.

C. Structure of PECAM-1

The cloning of human PECAM-1 was first reported by Newman, *et al.* (6). Shortly thereafter, several other groups published cDNA sequences for CD31 that were essentially identical (9, 18). PECAM is a member of the immunoglobulin gene superfamily with six C-2 type disulfide-linked domains. These domains account for most of the extracellular portion of the molecule, which comprises a total of 574 amino acids. There is a single 19 residue membrane spanning domain and a 118 amino acid cytoplasmic tail (6). The PECAM cDNA sequence predicts nine consensus N-linked glycosylation sites,

B. 細胞分布

PECAMは閉鎖帯を形成している内皮のマーカーであるといえる。脳-血液関門を形成する内皮も含めて、全ての器官及び血管に存在し、お互いに密着結合している内皮細胞全てにPECAMは発現している(5)。赤脾臓あるいは肝索の類洞を裏打ちしている内皮のような密着結合していない内皮にはPECAMは発現されない。この分布は血管特異的であり、器官特異的ではない: 例えば、脾臓大動脈の内皮細胞はPECAMを発現している(5); また、肝臓が肝硬変になると繊維状部位を形成していく毛細血管は、PECAMを発現している連続的な内皮により裏打ちされている(7)。

PECAMはまた、骨髓間質のマクロファージ(8)、血小板と巨核球(9)、骨髓前駆細胞、末梢に存在する単球や好中球(1、2)、Tリンパ球(9)、血中樹状細胞(未発表データ)などの様々な骨髓由来細胞に発現している。T細胞の中では、PECAMは末梢のCD8⁺"ナイーブ"(CD45RA⁺)T細胞に高発現し(10)、また、CD4サプレッサー細胞のマーカーである(11)ことが報告されている。一方、B細胞前駆体はPECAMを発現しているが(12)、末梢の成熟B細胞とリンパ節のB細胞はPECAMを発現していない(5)。

PECAMはKG1、U937、HL60のような骨髓細胞株(1、2)と同様に、ある種の骨髓性白血病細胞にも発現している(1)。また、カポジ肉腫の悪性紡錘細胞のマーカーとしても報告されている(13)。

PECAMは、今までに調べられた正常上皮細胞や間充織細胞には発現されていない。一つだけこれに反する報告があるが(14)、上述した以外のがん腫あるいは肉腫には見いだされない。PECAMは組織中の内皮に対するマーカーとして使われるようになった。第VIII因子関連抗原に対する抗体を含むいくつかの抗体で検査したところ、抗-PECAM抗体が、腫瘍組織の血管形成で新生した血管壁を最も高感度に検出したという報告がある(15)。PECAM-1には、細胞表層タンパク質であるという点で、第VIII因子関連抗原以上の利点がある。脂肪組織(16)や消化管組織(17)の微細血管のようなこれまでは内皮細胞単離が困難であるとされていた部位から、抗-PECAM抗体を用いることにより内皮細胞を単離したという報告がいくつか提出されている。

C. PECAM-1の構造

ヒトPECAM-1のクローニングがNewmanらによって初めて報告された(6)。その後すぐに、他の数グループが本質的にPECAMと同等であるCD31のcDNA配列を発表した(9、18)。PECAMは六つのC-2型ジスルフィド結合ドメイン(免疫グロブリン(Ig)様ドメイン)を持ち、いわゆる免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。これらのIg様ドメインは細胞外部位の大部分を占めており、574個のアミノ酸から成っている。また、19個のアミノ酸から成る膜貫通部位と118個のアミノ酸から成る細胞内部位が存在する(6)。PECAMのcDNA配列からは9個のN-型糖鎖結合部位が予想されたが、実際、PECAMには多くの糖鎖が

Domains of PECAM-1

Fig. 1. Schematic diagram of PECAM-1 protein structure.

There are six C-2 type immunoglobulin domains defined by intrachain disulfide bonds, numbered 1-6 from the amino terminal end toward the plasma membrane. The putative heparin-binding segment (LKREKN) is located in domain 2. Sites of potential *N*-linked glycosylation are indicated by ball-and-stick symbols protruding from the polypeptide backbone. See text for details.

and the molecule is indeed heavily glycosylated (19), accounting for the fact that its apparent molecular weight of 135 kDa on SDS-PAGE is far greater than the predicted molecular weight of approximately 80 kDa.

Goldberger *et al.* (20) have identified a soluble form of PECAM in the culture medium of human umbilical vein endothelial cells and phorbol myristate acetate-treated U937 cells. Perhaps even more significantly, they found soluble PECAM in normal human plasma. Although much of this may derive from proteolysis of cell surface PECAM, a significant fraction bears the cytoplasmic tail and appears to derive from an alternatively spliced mRNA missing the portion encoding the transmembrane domain (20).

The murine homolog of PECAM has been identified (21) and cloned (22). It bears an 80% homology to the human form with all six domain-defining intrachain disulfide bonds conserved, and appears to have similar cell distribution (21) and functions (23). (See next section.)

D. Evidence for Homophilic Adhesion

Subconfluent endothelial cells express PECAM diffusely on their surfaces, but upon contact with each other, they express PECAM strongly at the borders of contact, but not at their free edges (5). This observation suggested that PECAM participates in homophilic, homotypic adhesion, that is, PECAM on one cell binding to a molecule of PECAM on an apposing cell of similar type. In fact, antibodies against bovine (24) and human (25) PECAM can delay the formation of endothelial monolayers. More direct evidence for this type of adhesion comes from experiments with transfected cells. PECAM

結合していた(19)。これは、SDS-PAGEにより求められた分子量が、cDNA配列から推定された約80 kDaよりはるかに大きい135 kDaであった事実を裏付けている。

Goldbergerらは、ヒト臍帯静脈内皮細胞とホルボールミリステートアセテート処理したU937細胞の培養上清から可溶性PECAMを同定した(20)。さらに重要なことに、彼らは正常ヒト血漿中にも可溶性PECAMを見いだした。これらの多くはタンパク質分解を受けた細胞表層のPECAM由来と思われるが、その中に、細胞内ドメインを持つ可溶性PECAMが存在していた(20)。これは、選択的スプライシングを受けて膜貫通ドメインをコードしている部位を持たないmRNAから誘導されたと考えられる。

マウスPECAMの遺伝子が同定(21)、クローニングされ(22)、ヒトPECAMと80%の相同性を持ち、六つのC-2型ジスルフィド結合ドメインが保存されていることが明らかとなった。また、マウスPECAMは、ヒトPECAMと同様の細胞分布(21)と機能(23)を有していると思われる(次章参照)。

D. 同一分子間接着の証明

サブコンフルエントの内皮細胞表面にPECAMは分散して発現されるが、細胞同士が接触するようになると、PECAMは非接触部位には発現されず、接触面に強く発現されるようになる(5)。このことにより、PECAMは同一分子・同種細胞間接着、つまり、ある細胞のPECAMは隣接する同じタイプの細胞に発現しているPECAMと結合することが示唆された。実際、ウシ(24)およびヒト(25)PECAMに対する抗体により内皮細胞の単層形成に遅滞が生じた。トランスフェクタントを用いた実験により、この種の接着に対する直接的な証拠が導かれた。PECAMを発現しているトランスフェクタント同士の接着部位にPECAMの集積

is concentrated in the junctions between transfected cells that express it, but not at junctions made between a transfected and nontransfected cell (19, 25).

Homophilic, *heterotypic* adhesion, that is, PECAM on one cell binding to a molecule of PECAM on an apposing cell of *different* type, was suggested by the observation that PECAM was concentrated in the junctions made between some PECAM-transfected fibroblasts and human endothelial cells when co-cultured (19).

An important interaction between leukocytes and endothelial cells during transendothelial migration appears to be homophilic as well. When leukocytes emigrate from the circulation into a site of inflammation, they migrate in ameboid fashion between tightly apposed endothelial cells of the venular wall. Anti-PECAM antibodies or soluble recombinant PECAM were able to block migration of monocytes and neutrophils across the endothelial monolayer in an *in vitro* assay (26), without affecting the ability of these leukocytes to adhere to the apical surface. Transmigration could be blocked equally well by adding the anti-PECAM reagent to either the leukocytes or the endothelial cell junction (26). It thus appears that interaction of leukocyte PECAM with endothelial cell PECAM is required for transmigration, and this interaction occurs at a distinct phase of the emigration process after the leukocytes have become firmly adherent to the endothelial cells. The importance of PECAM in leukocyte emigration has been borne out *in vivo* (see section H.).

E. Evidence for Heterophilic Adhesion to Heparin-like Glycosaminoglycans

Direct evidence that PECAM can mediate a heterophilic adhesion came from experiments in which PECAM-transfected L cells were demonstrated to bind in a PECAM-dependent manner to nontransfected parent L cells (27). This binding was temperature sensitive, divalent cation dependent, and could be blocked by polyclonal antibody against PECAM, just as the adhesion to other PECAM-transfected L cells (19).

At least one ligand for the heterophilic aggregation is represented by sulfated glycosaminoglycans (GAGs) such as heparin and heparan sulfate (28). Binding was specific, since hyaluronate and dextran sulfate did not block aggregation. Furthermore, aggregation could be blocked by treating the nontransfected cells, but not the PECAM transfectants, with heparinase (28). This demonstrated the requirement for heparin-like GAGs on the nontransfected cells.

The hexapeptide LKREKN, present in the second Ig loop of PECAM, was thought to represent a possible consensus GAG binding domain. Indeed, heterophilic aggregation could be largely blocked by a synthetic LKREKN peptide and L cells expressing a mutated form of PECAM missing the second domain failed to aggregate (28). However, the story may be more

が見られたが、トランスフェクタントとPECAMを発現していない親細胞との接着部位には見られなかったのである(19, 25)。

ある細胞のPECAMが、隣接する異なるタイプの細胞に発現しているPECAMに結合する、いわゆる同一分子・異種細胞間接着の起こることが以下の結果により示唆された。PECAM遺伝子を導入した繊維芽細胞とヒト内皮細胞と一緒に培養すると、それらの細胞間接着部位にPECAMが集中したというものである(19)。

経内皮移動の際の白血球と内皮細胞の相互作用には、同一分子間接着も重要であると思われる。白血球は、血流から炎症部位へ移行する際、血管壁の密着結合した内皮細胞間をアメーバ状に浸潤する。抗-PECAM抗体あるいは可溶性リコンビナントPECAMは、*in vitro*で内皮単層を横切る単球や好中球の移動を阻害したが、白血球の内皮先端への接着能力には影響を与えなかった(26)。また、抗-PECAM抗体を白血球接着部位あるいは内皮細胞接着部位に加えたとき、どちらも同等に白血球の経内皮移動を阻害した(26)。白血球PECAMと内皮細胞PECAMとの相互作用は白血球の内皮すり抜けに必要であり、また、この相互作用は、白血球が内皮細胞に強固に接着するようになった後に起こっていると思われる。白血球移行におけるPECAMの重要性が*in vivo*で実証されたが、これについてはH章で述べる。

E. ヘパリン様グリコサミノグリカンへの異分子間接着の証明

PECAM遺伝子導入L細胞(PECAM発現L細胞)は、遺伝子導入されていない親L細胞にPECAM依存的に結合することが示された(27)が、これは、PECAMが異分子間接着をする直接的証拠である。この結合は温度感受性、二価カチオン依存性であり、PECAM発現L細胞同士の接着と同様に、抗PECAMポリクローナル抗体により阻害された(19)。

ヘパリンやヘパラン硫酸のような硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)が、異分子接着により起こる細胞凝集反応の際の少なくとも一つのリガンドと考えられる(28)。ヒアルロン酸及びデキストラン硫酸は凝集を阻害しなかったことから、この結合は特異的であると思われる。また、遺伝子導入されていない細胞をヘパリナーゼ処理すると凝集反応は阻害され、PECAM発現細胞をヘパリナーゼ処理しても阻害されなかった(28)。この結果は、PECAMを発現していない細胞上のヘパリン様GAGが凝集反応に要求されることを示している。

PECAMの二番目のIg様ドメインに存在するヘキサペプチドLKREKNは、GAG結合部位と考えられた。実際に、異分子間凝集は合成LKREKNペプチドにより阻害され、二番目のIg様ドメインを欠損させたPECAM分子を発現しているL細胞は凝集反応を起こさなかった(28)。しかし、話はもっと複雑かもしれない。

Fig. 2. The multiple adhesive mechanisms mediated by PECAM are outlined here schematically. Homotypic adhesion refers to adhesion of two cells of the same type; homophilic adhesion refers to binding of one adhesion molecule to the same molecule on the apposing cell. Thus, PECAM can participate in homotypic homophilic adhesion, such as the binding of two adjacent endothelial cells to each other at the intercellular junctions; heterotypic, homophilic interaction, such as occurs when PECAM-bearing leukocytes migrate through the PECAM-rich intercellular endothelial junctions at a site of inflammation; and homotypic, heterophilic adhesion, such as described for the aggregation of PECAM-transfected L cells. Heterotypic, heterophilic interactions have not been documented, but are certainly possible. Although adhesion molecules are traditionally thought of as providing a molecular glue to hold cells together or to extracellular matrix, there roles as signal transducers has become appreciated. Thus, engagement of adhesion molecules by their ligands on the cell surface leads to a change in cell function. An adhesion molecule like PECAM, which is concentrated in intercellular junctions, may be able to signal the cell when it is not engaging its ligand, initiating movement by that cell until it contacts another PECAM-bearing cell and is brought back to a state of quiescence. A related phenomenon is the participation of PECAM in an adhesion cascade in which ligation of PECAM on the surface of the leukocyte leads to a rapid increase in that leukocyte's integrin binding activity.

complicated. There may be more than one ligand and one domain involved in this heterophilic adhesion. Aggregation of PECAM-transfected L cells was not completely blocked by heparin and related compounds or the synthetic peptide LKREKN. Two mAb that also inhibit the heterophilic aggregation bind to loop six, located just proximal to the plasma membrane (29).

Direct evidence for heparin binding to PECAM comes from work by Watt *et al.* (12), who reported that PECAM isolated from the lymphomyeloid cell line KG1 as well as soluble recombinant PECAM could bind to heparin-sepharose. However, only a fraction of the PECAM, apparently representing higher molecular weight, differentially glycosylated species, bound to the heparin-sepharose. Therefore, heparin-binding activity of PECAM may be restricted to a subset of posttranslationally modified molecules.

F. The Role of the Cytoplasmic Tail

Tyrosine⁶⁸⁶ of PECAM is located in a favorable site for phosphorylation by tyrosine kinase (6); however, to date phosphorylation of this tyrosine has not been reported. On the other hand, phosphorylation of serine residue(s) on the cytoplasmic tail has been described following activation of platelets with thrombin (30, 31) where it was correlated with an increase in the proportion of Triton X-100 insoluble (presumably cytoskeleton-associated) PECAM and a redistribution of PECAM within the plane of the membrane (30).

The significance of this phosphorylation in the regulation of these events is not yet clear. However, the cytoplasmic tail of PECAM does appear to be crucial to the ability of the molecule to mediate heterophilic aggregation. Delisser *et al.*

例えば、この異分子間接着に関与するリガンドやドメインが一つ以上存在するかもしれない。このことは、PECAM発現L細胞の凝集はヘパリンや関連する物質、あるいは、合成ペプチド LKREKNによっても完全には阻害を受けないこと、また、異分子間凝集を阻害する二つのモノクローナル抗体(mAb)は形質膜近傍に存在する六番目のIg様ドメインに結合することからも推察される(29)。

Wattらは、可溶性リコンビナントPECAMと同様にリンパ性骨髄細胞株KG1から調製したPECAMがヘパリン固定化セファロースに結合することを報告し、ヘパリンがPECAMに結合する直接的な証拠を示した(12)。しかし、明らかに異なる糖鎖を持っていると思われる高分子量のPECAMフラクションのみが、ヘパリン固定化セファロースに結合したことから、PECAMのヘパリン結合活性は翻訳後修飾された分子にのみ見られるのかもしれない。

F. 細胞質ドメインの役割

PECAMの686番目のチロシン残基は、チロシンキナーゼによるリン酸化を受けやすい部位に存在しているが(6)、このチロシンがリン酸化を受けるという報告はされていない。一方、細胞質ドメインにあるセリン残基のリン酸化は、トロンビンによる血小板活性化に続いて起こると言われている(30, 31)。セリンのリン酸化は、PECAMのTriton X-100不溶画分(おそらく細胞骨格に結合している)の増加と膜内でのPECAMの再分布に関連している(30)。

これらの事柄を制御する際のリン酸化の意義はまだ明らかにはされていない。しかし、PECAMの細胞質ドメインは異分子

(29) transfected L cells with a form of human PECAM missing roughly the C-terminal one-third of the cytoplasmic domain. PECAM levels on the surface were normal and anti-PECAM mAb still recognized the molecule. However, aggregation was converted from the divalent cation-dependent, heparin-sensitive, heterophilic aggregation previously observed (27, 28) to a divalent cation independent, heparin-insensitive, homophilic aggregation (29).

G. Activation of Leukocytes by PECAM-1

PECAM is involved in the upregulation of other adhesion molecules. Integrins are a class of heterodimeric transmembrane proteins that bind cells to extracellular matrix components or other cells. Integrins are constitutively expressed on the surface of cells in an inactive form, but can be converted to their active conformation by appropriate stimuli. These stimuli may be received by other molecules in or on the cell which then transmit their activation signal to the integrins—a pathway that has come to be called “inside-out” signalling (32). PECAM has been shown to play this role on various classes of white blood cells. Ligation of PECAM on a subpopulation of T cells using mAbs can increase β_1 and, to a lesser extent, β_2 integrin binding activity (10); a similar process appears to increase the β_2 activity of lymphokine-activated killer cells (33). Ligation of PECAM on neutrophils and monocytes increases the adhesive activity of their β_2 integrins, specifically the CD11b/CD18 complex (38).

Integrin activity is not the only function apparently triggered by cross-linking PECAM on the surfaces of monocytes. Certain anti-PECAM monoclonal antibodies added to monocytes trigger a respiratory burst. The same effect was not seen when these antibodies were added to neutrophils (9). These authors felt that the effects were due to interactions between PECAM and the Fc receptor on the monocyte surface induced by the monoclonal antibodies (9).

H. Possible Biological Roles of PECAM-1

The diverse cells that express PECAM and the multiple adhesion mechanisms suggest a variety of roles in physiology and pathology. Expression by developing hematopoietic cells may allow interactions with stromal macrophages that express PECAM as well as GAGs in the stromal matrix. Such interactions may be important for the normal maturation of these cells and possibly the release of mature forms into the circulation. In this regard it is worth reiterating that B cell precursors, but not circulating B cells bear PECAM (12).

PECAM is expressed on megakaryocytes and platelets. One might speculate that PECAM could play a role in the maturation of platelets. For example, is it realigned into junctions between adjacent platelets as the megakaryocyte breaks up?

Although it is one of several adhesion molecules in the

間凝集を起こすのに必須であると思われる。Delisserらは細胞質ドメインのC末端側の3分の1を欠損させたヒトPECAM分子をL細胞に発現させた(29)。この細胞表面のPECAM発現量は通常のもので変わらず、また、抗PECAM mAbにも認識された。しかし、凝集反応は、以前に観察された二価カチオン依存性、ヘパリン感受性の異分子間凝集(27、28)から、二価カチオン非依存性、ヘパリン非感受性の同一分子間凝集へと変化した(29)。

G. PECAM-1による白血球の活性化

PECAMは他の接着分子のアップレギュレートに関与している。インテグリンはヘテロダイマーを形成している膜貫通タンパク群で、細胞と細胞外マトリックスあるいは細胞同士を結合させている。インテグリンは不活性型で細胞表面に発現されているが、適当な刺激により活性型へと変化する。これらの刺激は、まず細胞内あるいは細胞表面の他の分子に受け取られ、その分子の活性化シグナルがインテグリンへ伝えられる。この経路は“反転(inside-out)”シグナルと呼ばれているが(32)、PECAMは、様々な白血球系の細胞でこの役割を果たしていることが知られている。例えば、リンホカイン活性化キラー細胞による β_2 インテグリン活性増強(33)と同じように、T細胞亜集団のPECAMにmAbを結合させると、 β_1 インテグリンの結合活性が増加し、 β_2 インテグリンの結合活性もある程度増加する(10)。また、好中球や単球をPECAMに対する抗体で処理すると、 β_2 インテグリン特にCD11b/CD18複合体の接着活性が増加する(38)。

単球表層上でPECAMを架橋することにより引き起こされる効果は、インテグリンの活性化だけではない。ある種の抗-PECAMモノクローナル抗体を単球に加えると、呼吸バーストが引き起こされる。これらの抗体を好中球に添加しても、同様の効果は観察されない(9)ことから、この研究者らは、呼吸バースト誘起効果は、モノクローナル抗体によって誘導される単球表層上のPECAMとFcレセプターとの相互作用によるものであると考えている。

H. PECAM-1の生物学的意義

発現する細胞の多様性さと、多価の接着機構を有していることから、PECAMは生理学的あるいは病理学的に様々な役割を担っていると考えられる。PECAMを発現している造血系細胞は、間質マトリックスでGAGと同様にPECAMを発現している間質マクロファージと相互作用するものと考えられる。そのような相互作用は、造血系細胞の正常成熟やおそらく成熟細胞として末梢へ放出されるのに重要なのであろう。このことは、前述したように、B細胞前駆体はPECAMを発現しているが、末梢のB細胞は発現していないという事実(12)と関連しているのかもしれない。

PECAMは、巨核球と血小板の両方に発現しているので、血小板の成熟に関与しているのではないかと考えることができる。例えば、巨核球から血小板が放出されるときにPECAMは血

intercellular junction, PECAM may serve to maintain the integrity of the permeability barrier formed by the endothelial monolayer on the surfaces of blood vessels (5, 19, 25). *In vitro*, transfected fibroblasts bearing PECAM form tighter monolayers and migrate more slowly than the same parental lines transfected with unrelated molecules (34), an observation suggesting that the homophilic adhesion mediated by PECAM may be a stabilization (anti-angiogenic) signal.

The important role of PECAM in the transmigration phase of inflammatory leukocyte emigration was mentioned earlier. These *in vitro* studies have been corroborated by *in vivo* studies in rodent models of acute inflammation. Bogen *et al* (23) demonstrated that a monoclonal antibody against the murine form of PECAM blocked influx of neutrophils as well as mononuclear cells into the peritoneal cavity in thioglycollate-induced peritonitis. Vaporciyan *et al* (35) used a rabbit anti-human PECAM antibody that cross-reacted with rat PECAM to block neutrophil influx in rat models of acute peritonitis and immune complex-induced lung injury; the same antibody blocked influx of leukocytes into human skin transplanted to *scid* mice.

While the importance of PECAM in transendothelial migration has been demonstrated, the mechanism by which PECAM functions in this phenomenon is not known. The interaction of leukocyte PECAM with endothelial PECAM at the junctions may be purely one of homophilic adhesion. On the other hand, engagement of leukocyte PECAM by interaction with the densely concentrated endothelial cell PECAM as the former passes through the junction may serve to activate the β_2 integrins for tight adhesion in the junction. Other signal transduction mechanisms are possible, as well.

The finding of a soluble form of PECAM in human plasma (20) raises the possibility that it could play a modulating role in the vascular system. While the concentrations detected in normal plasma were low (10-25 ng/ml), the concentration could potentially increase in disease states and/or be significantly elevated at local extravascular sites.

Experiments *in vitro* demonstrate that PECAM can mediate heterophilic adhesion to certain sulfated glycosaminoglycans. This expands the potential roles of PECAM in biology, since PECAM-bearing cells can now theoretically interact with glycosaminoglycans in the extracellular matrix and borne on the surfaces of cells that do not express PECAM. The reader is reminded that this heterophilic adhesion has only been demonstrated in the transfected L cell aggregation system. This assay has been extremely useful and predictive when applied to transfected cadherin molecules (36, 37). However, a physiologic function in which PECAM binds heterophilically to glycosaminoglycans remains to be discovered.

血小板同士の結合部位に再配列されていたりするのだろうか?

PECAMは細胞間結合に携わる接着分子の一つではあるが、内皮単層によって形成されている透過性血管内壁を維持するためにも作用している(5、19、25)。PECAM発現繊維芽細胞は、無関係な分子の遺伝子を導入した親繊維芽細胞よりも強固な単層を形成し、しかもゆっくり移動することが*in vitro*の実験で示された(34)。この結果は、PECAMの同一分子間接着は安定化シグナル(抗-血管形成)である可能性を示唆している。

前述したように、炎症部位への白血球移行の際に見られる内皮すり抜けにおいて、PECAMは重要な役割を担っている。これらのことを明らかにした*in vitro*での実験結果は、急性炎症を起こさせたげっ歯類動物を用いた*in vivo*実験により実証された。Bogenらは、チオグリコレートにより誘導された腹膜炎で、マウスPECAMに対するモノクローナル抗体が、単核細胞及び好中球の腹膜腔への流入を阻害したことを示した(23)。Vaporciyanらは、急性腹膜炎または免疫複合体誘導肺炎を起こさせたモデルラットを用いて、ラットPECAMと交差反応するウサギ抗-ヒトPECAM抗体が好中球流入を阻害することを示した(35)。この抗体は、重症複合免疫不全(SCID)マウスに移植したヒト皮膚への白血球の流入も阻害した。

白血球の内皮すり抜けにおけるPECAMの重要性について述べてきたが、この現象におけるPECAMの作用機構は分かっている。内皮細胞接着部位での白血球PECAMと内皮細胞PECAMの相互作用は、真の同一分子間接着の一つである。一方、内皮細胞接着部位を白血球がすり抜けるとき、高密度に集積した内皮細胞PECAMと相互作用する白血球PECAMの役割は、結合部位でのより強固な接着をもたらすために β_2 インテグリンを活性化することにあると思われる。また、他のシグナル伝達も存在するかもしれない。

ヒト血漿中に可溶性PECAMが見いだされた(20)ことは、PECAMが脈管系で制御因子として働いている可能性を示唆している。正常血漿で検出される可溶性PECAMの濃度は低レベル(10-25 ng/ml)だが、この濃度は疾患状態では増加し、また、局所の血管外部位では有意に増大し得ると思われる。

*in vitro*の実験により、PECAMはある種の硫酸化グリコサミノグリカンと異分子間接着することが示され、PECAMの生物学的意義が拡張された。なぜなら、PECAMを発現している細胞は理論的には細胞外マトリックスのグリコサミノグリカンと結合でき、PECAMを発現していない細胞表面とも相互作用できることが証明されたからである。しかし、異分子間接着は、遺伝子導入されたL細胞の凝集実験でしか示されていないことに注意してほしい。この方法はカドヘリンのcDNAを導入して、解析されたときには非常に有用であった(36、37)が、PECAMの場合はどうであろうか? PECAMがグリコサミノグリカンと異分子間接着をする生理学上の機能は未知のままであり、その解明が待たれる。

Acknowledgements

I wish to thank Drs. Amy Goldberger and Peter Newman for allowing me to cite unpublished data, and Dr. Joan Muller for helpful comments on this manuscript. Supported by NIH grants HL46849 and AI24775. W.A. Muller is an Established Investigator of the American Heart Association.

東京工業大学・生命理工学部・生体分子工学科・糖鎖生命科学講座
三浦 りゅう訳

References

- Ohto, H., Maeda, H., Shibata, Y., Chen, R.-F., Ozaki, Y., Higashihara, M., Takeuchi, A., and Tohyama, H. (1985) *Blood* **66**, 873-881
- Goyert, S.M., Ferrero, E.M., Seremetis, S.V., Winchester, R.J., Silver, J., and Mattison, A.C. (1986) *J. Immunol.* **137**, 3909-3914
- Giltay, J.C., Brinkman, H.-J.M., Modderman, P.W., von dem Borne, A.E.G.Kr., and van Mourik, J.A. (1989) *Blood* **73**, 1235-1241
- van Mourik, J.A., Leeksa, O.C., Reinders, J.H., deGroot, P.G., and Zandbergen-Spaargaren, J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11300-11306
- Muller, W.A., Ratti, C.M., McDonnell, S.L., and Cohn, Z.A. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 399-414
- Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White II, G.C., Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. (1990) *Science* **247**, 1219-1222
- Couvelard, A., Scoazec, J.-Y., and Feldman, G. (1993) *Am. J. Pathol.* **143**, 738-752
- Kamada, N., Davies, H.F., and Roser, B.J. (1981) *Transpl. Proc.* **13**, 837-841
- Stockinger, H., Gadd, S.J., Eher, R., Majdic, O., Schreiber, W., Kasinrerck, W., Strass, B., Schnabl, E., and Knapp, W. (1990) *J. Immunol.* **145**, 3889-3897
- Tanaka, Y., Albelda, S.M., Horgan, K.J., Van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Newman, W., Hallam, J., Newman, P.J., Buck, C.A., and Shaw, S. (1992) *J. Exp. Med.* **176**, 245-253
- Torimoto, Y., Rothstein, D.M., Dang, N.H., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1992) *J. Immunol.* **148**, 388-396
- Watt, S.M., Williamson, J., Genevier, H., Fawcett, J., Simmons, D.L., Hatzfeld, A., Nesbitt, S.A., and Coombe, D.R. (1993) *Blood* **82**, 2649-2663
- Nickoloff, B.J. (1993) *Arch. Dermatol.* **129**, 250-251
- Tang, D.G., Chen, Y.Q., Newman, P.J., Shi, L., Gao, X., Diglio, C.A., and Honn, K.V. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22883-22894
- Horak, E.R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K., and Harris, A.L. (1992) *Lancet* **340**, 1120-1124
- Hewett, P.W., and Murray, J.C. (1993) *Eur. J. Cell Biol.* **62**, 451-454
- Haraldsen, G., Rugtveit, J., Scholz, T., Muller, W.A., Hovig, T., Kvale, D., and Brandtzaeg, P. (1994) *Gastroenterology* in press
- Simmons, D.L., Walker, C., Power, C., and Pigott, R. (1990) *J. Exp. Med.* **171**, 2147-2152
- Albelda, S.M., Muller, W.A., Buck, C.A., and Newman, P.J. (1991) *J. Cell Biol.* **114**, 1059-1068
- Goldberger, A., Middleton, K.A., Oliver, J.A., Paddock, C., Yan, H.-C., Delisser, H.M., Albelda, S.M., and Newman, P.J. (1994) *J. Biol. Chem.* in press
- Bogen, S.A., Baldwin, H.S., Watkins, S.C., Albelda, S.M., and Abbas, A.K. (1992) *Am. J. Pathol.* **141**, 843-854
- Matsui, M., Hioe, C., and Frelinger, J.A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 674-678(Abstract)
- Bogen, S., Pak, J., Garifallou, M., Deng, X., and Muller, W.A. (1994) *J. Exp. Med.* **179**, 1059-1064
- Albelda, S., Oliver, P.D., Romer, L.H., and Buck, C.A. (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 1227-1237
- Muller, W.A. (1992) in *Mononuclear Phagocytes. Biology of Monocytes and Macrophages* (van Furth, R., ed) Kluwer Academic Publishers,
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993) *J. Exp. Med.* **178**, 449-460
- Muller, W.A., Berman, M.E., Newman, P.J., Delisser, H.M., and Albelda, S.M. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 1401-1404
- Delisser, H.M., Yan, H.C., Newman, P.J., Muller, W.A., Buck, C.A., and Albelda, S.M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16037-16046
- Delisser, H.M., Chilkotowsky, J., Yan, H.-C., Daise, M.L., Buck, C.A., and Albelda, S.M. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 195-203
- Newman, P.J., Hillery, C.A., Albrecht, R., Parise, L.V., Berndt, M.C., Mazurov, A.V., Dunlop, L.C., Zhang, J., and Rittenhouse, S.E. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 239-246
- Zehnder, J.L., Hirai, K., Shatsky, M., McGregor, J.L., Levitt, L.J., and Leung, L.L.K. (1993) *J. Biol. Chem.* **267**, 5243-5249
- Hynes, R.O. (1992) *Cell* **69**, 11-25
- Piali, L., Albelda, S.M., Baldwin, H.S., Hammel, P., Gisler, R.H., and Imhof, B.A. (1993) *Eur. J. Immunol.* **23**, 2464-2471
- Schimmenti, L.A., Yan, H.-C., Madri, J.A., and Albelda, S.M. (1993) *J. Cell. Physiol.* **153**, 417-428
- Vaporciyan, A.A., Delisser, H.M., Yan, H.-C., Mendiguren, I.I., Thom, S.R., Jones, M.L., Ward, P.A., and Albelda, S.M. (1993) *Science* **262**, 1580-1582
- Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988) *Cell* **54**, 993-1001
- Nose, A., Tsuji, K., and Takeichi, M. (1990) *Cell* **61**, 147-155
- Berman, M.E., and Muller, W.A. (1995) *J. Immunol.* January, in press

Received on June 1, 1994, accepted on June 14, 1994