Lewis X and Sialyl Lewis X Glycosphingolipids

ルイス X およびシアリルルイス X スフィンゴ糖脂質

Cooling, Laura L.W.^{1,*}; Zhang, De-Sheng¹; and Koerner, Theodore A.W.^{1,2}Department of Pathology¹ and Biochemistry^{1,2}, University of Iowa College of Medicine
145 MRC, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA 52242-1182, USA
FAX:1-319- 335-6555, E-mail: laura-cooling@uiowa.edu**Key Words:** *adhesion, glycosphingolipids, LewisX, selectins, sialyl LewisX***Abstract**

Lewis X (Le^x) and sialyl Lewis X (sLe^x) are carbohydrate blood group antigens important in cell adhesion. On cell membranes, Le^x and sLe^x may be expressed on glycoproteins or glycosphingolipids (GSLs). The latter are complex macromolecules consisting of an oligosaccharide moiety covalently linked to a ceramide lipid tail. Similar to glycoproteins, Le^x and sLe^x glycans expressed on GSLs can be either simple or multifucosylated, complex, branched, long-chain oligosaccharides. Developmental changes in Le^x and sLe^x GSL expression may play a role in embryonic development and organogenesis. On neutrophils and platelets, sLe^x GSLs may function as the physiologic ligand for endothelial E-selectin, mediating rolling of platelets and neutrophils along activated endothelium. Likewise, endothelial sLe^x GSLs may function as ligands for L-selectin on lymphocytes. In lens, the age-dependent increase in Le^x GSL expression may contribute to cataractogenesis via Le^x-Le^x homotypic adhesion, leading to spatial rearrangement of lens fibers and lens opacification. In malignancy, neoexpression of Le^x and sLe^x GSLs by many tumors may contribute to tumor metastasis *via* increased adherence to vascular endothelium and platelets. In hematopoietic cells, biosynthesis of Le^x and sLe^x GSLs reflects the action of multiple glycosyltransferases. Lewis^x and sLe^x GSLs may also be chemically synthesized where they have been very useful in structure-function studies of selectin recognition and binding.

要 約

ルイス X (Le^x) とシアリルルイス X (sLe^x) は、細胞接着に重要な血液型糖鎖抗原である。細胞膜において、Le^x と sLe^x は糖タンパク質やスフィンゴ糖脂質 (GSLs) 上に発現されていると思われる。糖脂質は、オリゴ糖鎖分子がセラミドという脂質の末端に共有結合で結ばれた複雑な高分子である。糖脂質に発現された Le^x と sLe^x 糖鎖は、糖タンパク質と同様に、単純なもの、高度にフコシル化されたもの、複合型のもの、分枝したもの、あるいは長鎖のものが存在する。Le^x と sLe^x の発現の発生段階における変化は、胎児の発達や器官形成に重要であると考えられる。好中球や血小板上の sLe^x 抗原を持つスフィンゴ糖脂質は、血小板や好中球のローリングを制御していると思われる活性化された血管の内皮細胞に発現される E-セレクトインの生理的なリガンドとして機能していると考えられる。また、内皮細胞の sLe^x 糖脂質は、リンパ球の L-セレクトインに対するリガンドとして機能している。水晶体においては、sLe^x 抗原を持つスフィンゴ糖脂質の年齢に伴った増加が、Le^x-Le^x 相互の接着により水晶体繊維の空間的な再配列と水晶体の混濁を起こし、白内障の原因になっている可能性がある。悪性腫瘍においては、多くの腫瘍での Le^x と sLe^x 糖脂質の新たな発現が、血管内皮や血小板への接着性の増加による腫瘍の転移に関わっているかもしれない。造血細胞においては、Le^x と sLe^x 抗原を持つスフィンゴ糖脂質の生合成は、多様な糖転移酵素の作用を反映している。Le^x と sLe^x 糖脂質は化学的に合成されることで、セレクトインの認識と結合における機能構造の研究にたいへん有用であった。

A. Introduction

Lewis X (Le^x) and its sialylated derivative, sialyl Lewis X (sLe^x), are carbohydrate blood group antigens expressed by neutrophils, monocytes and other cell membranes (1, 2). The

A. はじめに

ルイス X (Le^x) とそのシアリ酸誘導体であるシアリルルイス X (sLe^x) は、好中球や単球およびその他の細胞膜にある血液型糖鎖抗原である (1, 2)。Le^x 抗原は、フコースがラクトサミン

* To whom correspondence should be addressed.

The abbreviations used were: α1-3 FucT, α1-3 fucosyltransferase; α2-3 sialylT, α2-3 sialyltransferase; β1-4GalT, β1-4 galactosyltransferase; β1-3GlcNAcT, β1-3 N-acetylglucosaminyltransferase; Fuc, fucose; Gal, galactose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GSL(s), glycosphingolipid(s); HPTLC, high performance thin layer chromatography; KDN, 3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulonsonic acid; lactosamine, (Galβ1-4GlcNAcβ1-R); Le^a, Lewis A [Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3-R]; Le^x, Lewis X [Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3-R]; Le^y, Lewis Y [Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3-R]; mAb(s), monoclonal antibody(s); NeuAc, N-acetyl neuraminic acid; NeuGc, N-glycolyl neuraminic acid; PDMP, D-Threo-1-phenyl-2-decanolylamino-3-morpholino-1-propanol; PSGL-1; P-selectin glycoprotein ligand-1; sLe^a, sialyl Lewis A [NeuAcα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3-R]; sLe^x, sialyl Lewis X (NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3-R); VIM-2, [NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3-R].

Table I. Structures of sialyl Lewis X, Lewis X and related glycosphingolipids.

Code	Name*	Structure	Refs
Lewis X (Le^x) and Related Neutral Glycosphingolipids			
A	III ³ -α-Fuc-nLc ₄ OseCer (Le ^x -5):	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	2,42-49
B	IV ² , III ³ -(α-Fuc) ₂ -nLc ₄ OseCer (Le ^x -6):	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	50,51-53
C	IV ³ -β-GlcNAc, III ³ -α-Fuc-nLc ₄ OseCer (GlcNAc-Le ^x -5):	GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	44
D	V ³ -α-Fuc-nLc ₆ OseCer (Le ^x -7):	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	43,47-50
E	VI ² , V ³ -(α-Fuc) ₂ -nLc ₆ OseCer (Le ^x -8):	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	50,52,53
F	V ³ , III ³ -(α-Fuc) ₂ -nLc ₆ OseCer (dimeric Le ^x -8):	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	43,44,48,49,54
G	IV ³ -β-Gal, IV ⁶ -β-Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-Gb ₄ OseCer (globo-Le ^x -9):	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	55
H	VI ² , V ³ , III ³ -(α-Fuc) ₃ -nLc ₆ OseCer (trimeric Le ^x -9):	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	53,56
I	VI ² , V ³ , III ⁴ -(α-Fuc) ₃ -nLc ₆ OseCer (Le ^x -A-9):	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	52
J	VII ³ -α-Fuc-nLc ₈ OseCer (Le ^x -9):	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	43,47
K	VII ³ , V ³ -(α-Fuc) ₂ -nLc ₈ OseCer (dimeric Le ^x -10):	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	43,47
L	VII ³ , V ³ , III ³ -(α-Fuc) ₃ -nLc ₈ OseCer (trimeric Le ^x -11):	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	48,49,54
Sialyl Lewis X (sLe^x) Gangliosides			
M	IV ³ -α-NeuAc, III ³ -α-Fuc-nLc ₄ OseCer (sLe ^x -6):	NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	2,44,57,58
N	VI ³ -α-NeuAc, V ³ -α-Fuc-nLc ₆ OseCer (X0 ganglioside, sLe ^x -8):	NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	48,59,60
O	VI ³ -α-NeuAc, V ³ , III ³ -(α-Fuc) ₂ -nLc ₆ OseCer (sialyl dimeric Le ^x):	NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	14,48,60
P	VIII ³ -α-NeuAc, VII ³ , V ³ -(α-Fuc) ₂ -nLc ₈ OseCer (X3 ganglioside):	NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	59
Q	VIII ³ -α-NeuAc, VII ³ , III ³ -(α-Fuc) ₂ -nLc ₈ OseCer (X3 ganglioside):	NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	59
R	VIII ³ -α-NeuAc, VII ³ , V ³ , III ³ -(α-Fuc) ₃ -nLc ₈ OseCer (X4 ganglioside):	NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	59
<div style="text-align: center;"> <u>mAb MC480</u> <u>mAb CSLEX-1</u> NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1- </div>			
S	Band 14	<div style="text-align: center;"> <u>NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-</u> <u>mAb 1B2</u> </div> > (Galβ1-4GlcNAcβ1-3) _n Galβ1-4Glcβ1-1'Cer	61

*Glycolipids are designated according to the recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Pure and Applied Chemistry (45).

Le^x antigen is a trisaccharide epitope consisting of a fucose linked α1-3 glycosidically to the *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) of lactosamine [Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-R]. The sLe^x antigen is a tetrasaccharide, in which the Le^x epitope has been modified by the addition of a sialic acid to the terminal galactose [NeuAc-Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-R]. On cell membranes, Le^x and sLe^x determinants may be expressed on either membrane glycoproteins, mucins or glycosphingolipids (GSLs) (3–11).

Biologically, Le^x and sLe^x are important during both

中の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に α1-3 グリコシド結合した三糖のエピトープ構造 [Galβ1-4 (Fucα1-3) GlcNAc-R] からなっている。sLe^x抗原は、Le^x抗原糖鎖の末端のガラクトースにシアル酸が付加された四糖構造をなす [NeuAc-Galβ1-4 (Fucα1-3) GlcNAc-R]。細胞膜上において、Le^xとsLe^x抗原は、膜糖蛋白質やムチンあるいはスフィンゴ糖脂質 (GSLs) 上に発現されている (3–11)。

Le^xとsLe^x抗原は、生理学と病理学の面から脊椎動物の初期

Table I. *continued.*

		mAb FH4, FH5	
		mAb MC480	
T	Band 6	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3) _n Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	61
		mAb CSLEX-1	
		mAb FH4, FH5	
		mAb MC480	
		mAb CSLEX-1	
U	Band 3	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-(3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-) _n > (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3) _n Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	61
		NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β - mAb 1B2	
		mAb FH6	
V	2H5 Antigen	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1- > (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3) _n Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	62
		NeuAc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1- mAb Ma	
Hybrid Lewis X-Lewis A Glycosphingolipids			
W	IV ³ - β -Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, III ³ - α -Fuc-nLc ₄ OseCer (Le ^{α} -X):	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	63
X	IV ³ - β -NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, III ³ - α -Fuc-nLc ₄ OseCer (sLe ^{α} -X):	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	64
Y	IV ³ - α -NeuAc, III ⁴ - α -Fuc, II ⁶ - β -Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-Lc ₄ OseCer (sLe ^{α} -Le ^{α}):	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3 [Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6] Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	64
Synthetic Sialyl Lewis X Gangliosides and Analogues			
Z	IV ³ - α -NeuAc, III ³ - α -Fuc-nLc ₄ OseCer (sLe ^{α} -6):	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer	65,66
AA	IV ⁶ - α -NeuAc, III ³ - α -Fuc-nLc ₄ OseCer	NeuAc α 2-6Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer	65,66
BB	sLe ^{α} -5:	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	66,67
Neuraminic Acid Derivatives:			
CC	N-glycolyl neuraminic acid (NeuGc)-sLe ^{α} -5:	NeuGc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	68
DD	3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulonsonic acid (KDN)-sLe ^{α} -5:	KDN α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4Gal-Cer	69
EE	C8-sLe ^{α} -5:	C8-NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	70
FF	C8- <i>epi</i> -sLe ^{α} -5:	C8- <i>epi</i> -NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	70
GG	C7-sLe ^{α} -5:	C7-NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	70
Fucose Derivatives:			
HH	2-deoxy-sLe ^{α} -5:	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(2-deoxy-Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	71
II	3-deoxy-sLe ^{α} -5:	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(3-deoxy-Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	71
JJ	4-deoxy-sLe ^{α} -5:	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(4-deoxy-Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-Cer	71

early and mature stages of vertebrate physiology and pathology. Lewis^x and sLe^x serve as oncofetal antigens which may play a role in embryonic development and organogenesis (12–17). Neoexpression of Le^x and sLe^x frequently accompany neoplastic transformation and may be associated with a poor prognosis (13–15, 18–28). Sialyl Le^x has also been shown to be a receptor for cell surface selectins, a recently described class of cell adhesion molecules (29–33). On leukocytes, L-selectin mediates lymphocyte recirculation and homing *via* recognition

と成熟期の両段階において生物学的に重要である。Le^xとsLe^x抗原は、胚の発達や器官形成に関わる癌胎児性抗原である。Le^xとsLe^x抗原の新たな発現は、しばしば癌の形質転換と予後不良を伴う (13–15, 18–28)。sLe^x抗原は、近年、細胞表面の細胞接着分子として知られているセレクトリンに対する受容体でもあることが示された (29–33)。白血球において、L-セレクトリンはリンパ球の再循環やリンパ節の高内皮細静脈上のsLe^x抗原に似た糖

of sLe^x-like glycans on the high endothelial venules of lymph nodes. E- and P-selectin on activated endothelium mediate neutrophil adhesion and rolling via recognition of sLe^x on neutrophils, a critical first step in the inflammatory response. E-selectin may also play a role in tumor metastasis via recognition of sLe^x on tumors (34-37). On activated platelets, P-selectin recognition of sLe^x epitopes on leukocytes may promote clot formation through formation of platelet-leukocyte aggregates. These complexes may then adhere to endothelium to form a ternary endothelial-leukocyte-platelet complex which has been shown to promote fibrin deposition (38, 39). P-selectin recognition of sLe^x on tumors may promote tumor metastasis through formation of platelet-tumor microthrombi (40).

Because of the biologic importance of Le^x and sLe^x antigens in cell adhesion, there is a great deal of interest in elucidating the structure and function of the Le^x/sLe^x glycans on cell membranes. Most work to date has focused on the nature of the Le^x/sLe^x epitope on membrane glycoproteins (3-10), however, Le^x/sLe^x are also expressed on membrane GSLs (41). As shown in Table I, a large number of Le^x and sLe^x active GSLs have been identified in normal and neoplastic human tissues (2, 14, 41-64). Recent studies have suggested a role for Le^x and sLe^x GSLs in cataractogenesis (45) and in rolling adhesion of platelets and leukocytes along activated endothelium (61, 72-74). As a consequence of the increasing role of Le^x/sLe^x GSLs in cell adhesion and disease, we will summarize the nature of the Le^x/sLe^x GSLs identified to date, their role in cell adhesion and disease, as well as the synthesis of Le^x/sLe^x GSLs *in vivo* and *in vitro*.

B. Le^x and sLe^x Glycosphingolipids of Myeloid Cells

Previous studies have shown expression of Le^x and sLe^x epitopes on hematopoietic stem cells (75), myeloid precursors, monocytes and neutrophils (1, 2, 76, 77). Both Le^x and sLe^x GSLs have been reported in myeloblastic leukemia (58, 77), suggesting that Le^x and sLe^x GSLs may be expressed by early myeloid precursors (Table II). Le^x and sLe^x GSLs may also be expressed on early marrow erythroblasts and megakaryoblasts. Le^x and/or sLe^x GSLs were detected in the GSL fraction of the erythroblastic cell line HEL (58, 83) and the megakaryoblastic cell line UT-7*. Le^x, but not sLe^x, was also reported in the GSL fraction of K526 cells (58, 83), a pluripotent cell line capable of erythrocytic, monocytic, granulocytic and megakaryocytic differentiation (84-86). As with mature neutrophils, Le^x and sLe^x GSL expression by early myeloid and stem cell progenitors could play a role in hematopoietic development and leukocyte trafficking. Recent studies have shown constitutive expression of E-selectin on marrow endothelial cells (87).

Mature neutrophils express a number of Le^x-active GSLs in their neutral GSL fraction (43, 50). As shown in Table I, these

鎖の認識によるホーミングに関わっている。活性化された血管内皮上のE-およびP-セレクトインは、炎症反応の重要な最初の段階である好中球の接着と好中球上のsLe^x抗原を介したローリングに関わっている。E-セレクトインは、また腫瘍細胞上のsLe^x抗原を介したがん転移に関わっていると思われる(34-37)。活性化した血小板においては、P-セレクトインによるリンパ球上のsLe^x抗原の認識が、血小板とリンパ球の凝集塊の形成による血餅形成を促進しているらしい。この凝集塊は、さらにフィブリン沈着を促進する内皮-リンパ球-血小板の複合体を形成するために内皮に接着するらしい(38, 39)。癌細胞上のsLe^x抗原のP-セレクトインによる認識は、血小板と腫瘍細胞の微小血栓の形成を経て癌転移を促進しているらしい(40)。

細胞接着におけるLe^xとsLe^x抗原の生物学的な重要性故に、細胞膜上のLe^xとsLe^x糖鎖抗原の構造と機能を明らかにすることは、たいへん興味深いことである。これまでのほとんどの研究は、細胞膜糖タンパク質上のLe^xとsLe^x抗原糖鎖の性質に向けられていた。しかしながら、Le^xとsLe^x抗原糖鎖は、細胞膜スフィンゴ糖脂質上にも発現されている(41)。表Iに示したように、非常に多くのLe^xとsLe^x抗原活性を示すスフィンゴ糖脂質が、ヒトの正常組織や癌組織に見出されている(2, 14, 41-64)。最近の研究によって、白内障発生(45)におけるLe^xとsLe^xスフィンゴ糖脂質の役割や、血小板と白血球の活性化した内皮細胞に沿ったローリング吸着におけるLe^xとsLe^xスフィンゴ糖脂質の役割が明らかになってきた(61, 72-74)。細胞接着と疾病におけるLe^x/sLe^xスフィンゴ糖脂質の役割が次々と増えているため、ここでは、これまでに同定されているLe^x/sLe^xスフィンゴ糖脂質の本質や、細胞接着と疾病におけるそれらの役割を、*in vivo*と*in vitro*におけるLe^x/sLe^xスフィンゴ糖脂質の合成と共に要約しようと思う。

B. 骨髓系細胞のLe^xとsLe^xスフィンゴ糖脂質

今までの研究で、造血幹細胞(75)、骨髓系前駆細胞、単球、好中球上のLe^xとsLe^xエピトープの発現が示されてきた(1, 2, 76, 77)。Le^xとsLe^xスフィンゴ糖脂質の両方は骨髓芽球形白血病に報告されてきているが(58, 77)、このことはLe^xとsLe^xスフィンゴ糖脂質が、早期の骨髓系前駆細胞に発現している可能性を示唆している(表II)。Le^xとsLe^xスフィンゴ糖脂質はまた、早期の骨髓系赤芽球と巨核芽球上にも発現している可能性がある。Le^xあるいはsLe^xスフィンゴ糖脂質は赤芽球系細胞株であるHEL細胞(58, 83)と巨核芽球系細胞株であるUT-73細胞のスフィンゴ糖脂質画分に検出された。Le^xスフィンゴ糖脂質はまた、赤血球、単球、好中球、巨核芽球へと分化可能な多能性細胞株であるK526細胞(58, 83)のスフィンゴ糖脂質画分にも報告されたが、sLe^xスフィンゴ糖脂質は報告されなかった(84-86)。成熟した好中球にも見られるように、早期の骨髓系幹細胞に発現したLe^xとsLe^xスフィンゴ糖脂質は血液生成と白血球交渉における役割を演ずることができる。最近の研究では、骨髓内皮細胞上にはE-セレクトインが恒常的に発現されていると報告されている(87)。

成熟した好中球は、それらの中性スフィンゴ糖脂質画分の中に、幾らかのLe^x-activeスフィンゴ糖脂質を発現している

* Cooling, L.W., unpublished observations.

include the monofucosylated, *neolacto*-series GSLs Le^x-5 (A), Le^x-7 (D), and Le^x-9 (J). Neutrophils also express several difucosylated Le^x-related GSLs. These include the dimeric Le^x structures, dimeric Le^x-8 (F) and dimeric Le^x-10 (K) (43). Other difucosylated Le^x-related GSLs include two Le^y-active GSLs, Le^y-6 (B) and Le^y-8 (E), in which the Le^x epitope has been modified by the addition of an α 1-2 fucose to the terminal galactose (50). Le^x, Le^y and dimeric Le^x neutral GSLs are also expressed by the promyelocytic leukemia cell line, HL-60 (60). Previous studies suggest that each neutrophil expresses at least 10⁸ GSL molecules with Le^x and Le^y activity (60).

Neutrophils also express a plethora of sLe^x-active gangliosides. Estimates suggest that the average neutrophil possesses at least 2×10^7 molecules of sLe^x ganglioside (60). Based on the size of the average neutrophil, this equates to an average density of 44,000 sLe^x ganglioside molecules/ μm^2 (73). On neutrophils, sLe^x epitopes on GSLs may exceed sLe^x epitopes on glycoproteins by a factor of two hundred and may account for the majority of sLe^x expressed on neutrophil membranes (73). Evidence for the latter includes the inability of protease digestion to diminish the binding of anti-sLe^x monoclonal antibodies (mAbs) to neutrophils (72). As a consequence, sLe^x ganglioside expression by neutrophils may play a critical role in neutrophil-endothelial interactions during inflammation.

At least ten sLe^x species can be detected by high performance thin layer chromatography (HPTLC) of neutrophil gangliosides followed by immunostaining with mAbs against sLe^x (59–61). Sialyl Le^x gangliosides may also be detected after desialylation of neutrophil gangliosides to expose cryptic Le^x epitopes, followed by HPTLC-immunostaining with mAbs against Le^x (59–61). To date, only one sLe^x neutrophil ganglioside, the X0 ganglioside or sLe^x-8 (N), has been isolated and characterized (59).

In addition to sLe^x-8, two other neutrophil sLe^x GSLs, X3 and X4, have been isolated and partially characterized by HPTLC-immunostaining, methylation analysis and mass spectroscopy (59). Both X3 and X4 were positive with mAb CSLEX-1, indicating that both X3 and X4 terminate in a sLe^x epitope in which the neuraminic acid is in an α 2-3 glycosidic linkage (2, 59). Mass spectroscopy and methylation analysis of ganglioside X4 showed it to be a monosialo, trifucosylated, *neolacto*-series dodecaosylceramide. Ganglioside X4, therefore, was proposed to be a sialyl trimeric Le^x ganglioside (R). Sialyl trimeric Le^x neutrophil gangliosides have also been detected immunologically. HPTLC-immunostaining of desialylated neutrophil gangliosides with mAb FH5, a mAb specific for trimeric Le^x epitopes (88), identified at least three sialyl trimeric Le^x bands (61). Furthermore, at least one neuraminidase/FH5+ neutrophil ganglioside has a mobility consistent with ganglioside X4 (59, 61).

Unlike the X4 ganglioside, there are two possible GSL

(43, 50). 表Iに示すように、これらはフコースが1つ付加したネオラクト系列のスフィンゴ糖脂質であるLe^x-5 (A)、Le^x-7 (D)、Le^x-9 (J)を含む。好中球はまた、幾らかのフコースが2つ付加したLe^x-関連スフィンゴ糖脂質を発現している。これらは二量体Le^x構造である二量体Le^x-8 (F)と二量体Le^x-10 (K)を含む(43)。他のフコースが2つ付加したLe^x-関連スフィンゴ糖脂質は2つのLe^y-活性スフィンゴ糖脂質であるLe^y-6 (B)とLe^y-8 (E)を含み、これらのLe^xエピトープは末端ガラクトースにフコースが α 1-2結合で付加されている(50)。Le^x、Le^y、二量体Le^x中性スフィンゴ糖脂質はまた、前骨髄球系細胞株であるHL-60細胞にも発現している(60)。先の研究で、それぞれの好中球は少なくとも10⁸分子のLe^xとLe^yの活性を持ったスフィンゴ糖脂質を発現していることが示唆された(60)。

好中球はまた、過剰のsLe^x-活性ガングリオシドを発現している。見積ると、平均的な好中球1つ当たりになくとも 2×10^7 分子のsLe^xガングリオシドが発現していることが示唆される(60)。平均的な好中球の大きさに基づいて、計算するとこれは平均44,000分子/ μm^2 のsLe^xガングリオシド濃度に匹敵する(73)。好中球上では、スフィンゴ糖脂質上のsLe^xエピトープはおそらく糖タンパク質上のsLe^xエピトープよりも200倍多く、そして大部分のsLe^xは膜上に発現しているだろう(73)。このことは、好中球をプロテアーゼ処理してもsLe^xに対するモノクローナル抗体の結合性が減少しないことからもうかがえる(72)。以上の結果から、好中球上のsLe^xは炎症時における好中球と内皮細胞との相互作用に重要な役割を果たしているといえる。

好中球のガングリオシドを高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)により分離し、sLe^xに対するモノクローナル抗体で染色すると(HPTLC-免疫染色法)、少なくとも10種類のsLe^xが検出される(59–61)。また好中球のガングリオシドをシアリダーゼ処理してLe^xを露出させた後、Le^xのモノクローナル抗体を用いてHPTLC-免疫染色法を行っても、sLe^xを検出することができる(59–61)。今日までに、X0またはsLe^x-8 (N)とよばれるたった一つの好中球sLe^xガングリオシドのみが単離・同定された(59)。

sLe^x-8に加え、X3およびX4の2つのsLe^xスフィンゴ糖脂質が単離され、またその性質の一部がHPTLC-免疫染色法、メチル化分析、質量分析を用いて解析されている(59)。まずX3およびX4ともCSLEX-1抗体で検出されることから、これらのsLe^x末端にノイラミン酸が α 2 $\rightarrow$ 3結合していることがわかった(2, 59)。またメチル化分析や質量分析を用いた結果、X4はMonosialo trifucosylated *neolacto*-series dodecaosylceramideであることがわかった。つまり、X4はシアリル三量体Le^x (R)ガングリオシドである。この好中球上に存在するシアリル三量体Le^xは免疫学的な方法を用いても検出できた。シアリダーゼ処理した好中球ガングリオシドを三量体Le^xに対するモノクローナル抗体であるFH5 (88)を用いたHPTLC-免疫染色法で調べると、少なくとも3本のシアリル三量体Le^xのバンドが検出され、さらに同様の方法でX4と同じ移動度のものが最低一つ存在することが確認された(59, 61)。

X4と異なり、X3は二通りのスフィンゴ糖脂質構造が考え

structures for the X3 ganglioside. Mass spectroscopy, methylation analysis and mAb studies showed ganglioside X3 to be a monosialo, difucosylated, *neolacto*-series undecaosylceramide. Because ganglioside X3 was positive with mAb CSLEX-1, one fucose could be assigned to residue seven (VII³-Fuc), however, the assignment of the second fucose was uncertain. Linkage of the second fucose to the GlcNAc closest to the reducing end of the molecule would result in the sLe^x ganglioside: VIII³- α -NeuAc-VII³, III³-(α -Fuc)₂-nLc₈OseCer (**Q**). In contrast, assignment of the second fucose to residue five (V³) would result in the sialyl dimeric Le^x ganglioside: VIII³- α -NeuAc-VII³, V³-(α -Fuc)₂-nLc₈OseCer (**P**). Although Mülthing *et al.* (59) were unable to differentiate between these two structures, immunologic studies by others support a sialyl dimeric Le^x structure for ganglioside X3. Specifically, HPTLC-immunostaining of desialylated neutrophil gangliosides with mAb FH4, which recognizes multimeric Le^x epitopes (88), revealed between six and eight FH4+ bands (60, 61), including two bands with a mobility similar to that of ganglioside X3. Furthermore, neutrophils express multiple dimeric Le^x GSLs (**F**, **K**) in their neutral GSL fraction (43, 60). Sialyl dimeric Le^x GSLs were also detected in the ganglioside fraction of HL-60 cells on HPTLC-immunostaining (60).

As stated earlier, the presence of Le^x, sLe^x and particularly, sialyl dimeric and trimeric Le^x GSLs may play an important role in neutrophil-endothelial interactions. Sialyl Le^x gangliosides can support E-selectin-mediated binding under both static (31, 89, 90) and physiologic flow conditions (73). Furthermore, several recent studies have shown that rolling of neutrophils along activated endothelium is mediated via E-selectin and a protease-resistant sLe^x ligand on neutrophils (72, 91). Although the latter was not identified, its resistance to chymotrypsin and other proteases suggests that the E-selectin ligand on neutrophils are sLe^x gangliosides.

Future experiments which could clarify the role of neutrophil sLe^x GSLs in selectin-mediated rolling adhesion might include adhesion assays using HL-60 cells treated with either inhibitors of GSL synthesis or endoglycoceramidase, a GSL hydrolase capable of cleaving the glycosidic linkage between ceramide and its oligosaccharide head group (92). HL-60 cells express essentially the same complement of Le^x/sLe^x GSLs as mature neutrophils (60) and would serve as a reasonable *in vitro* model of ganglioside-deficient neutrophils. Based on previous studies with erythrocytes (93, 94), digestion of HL-60 cells with endoglycoceramidase could result in a 50-70% loss of membrane GSLs. Alternatively, HL-60 cells could be incubated with D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinol-propanol (PDMP) or gluco-4-epoxy-4-C-methyleneglycosylceramide which are competitive inhibitors of UDP-glucose: ceramide glucosyltransferase and UDP-galactose: glucosylceramide galactosyltransferase, respectively (95,

られる。質量分析やメチル化分析、モノクローナル抗体を用いた実験から、X3はMonosialo difucosylated neolacto-series undecaosylceramideであることがわかった。さらに、X3がCSLEX 1抗体で検出されることから一つ目のフコースが7残基目に結合している (VII³-Fuc)ことは確認されたが、二つ目のフコースの位置はまだ不明である。もし二つ目のフコースが還元末端に最も近いGlcNAcに結合しているのなら、その構造はVII³- α -NeuAc-VII³, VII³-(α -Fuc)₂-nLc₈OseCer (**Q**)ということになるだろう。対照的に、2つ目のフコースが5残基目に結合しているもの (V³)は、シアリル二量体Le^xガングリオシド: VII³- α -NeuAc-VII³, V³-(α -Fuc)₂-nLc₈OseCer (**P**)ということになるであろう。Multhingら (59)は、これら2つの構造を区別することができなかったが、他の者による免疫学的研究によってガングリオシドX3はシアリル二量体Le^x構造であるとされた。特に、シアリダーゼ処理した好中球ガングリオシドを多価Le^xエピトープを認識するモノクローナル抗体FH4を用いたHPTLC-免疫染色法で調べると、ガングリオシドX3と同様の移動度を持つバンド2つを含む6つから8つのFH4+バンドが検出された。その上好中球は、中性糖脂質分画中に (43, 60) multiple二量体Le^x糖脂質 (**F**, **K**)を発現していた。シアリル二量体Le^x糖脂質は、HPTLC-免疫染色法で調べると、HL-60細胞のガングリオシド分画中にも検出された (60)。

先に述べたように、Le^x、sLe^x、特にシアリル二量体と三量体Le^x糖脂質の存在は好中球-内皮細胞相互作用において重要な役割をしているだろう。シアリルLe^xガングリオシドは、静的な (31, 89, 90)そして生理的な (73) 流れの状態E-セレクトインを介した結合をする。さらに最近のいくつかの研究は、活性化された内皮細胞にそった好中球のローリングがE-セレクトインと好中球上のプロテアーゼ耐性sLe^xリガンドを介して媒介されるということを示した (72, 91)。キモトリプシンと他のプロテアーゼに耐性であることで、好中球上のE-セレクトインリガンドはsLe^xガングリオシドであると示された。

今後、セレクトインを介したローリング接着における好中球上のsLe^x糖脂質の役割を明らかにするために、糖脂質合成の阻害剤や、エンドグリコセラミダーゼのいずれかで、セラミドとオリゴ糖末端糖グループとの間のグリコシド結合を開裂することのできる糖脂質ハイドrolラーゼで処理したHL-60細胞を用いた結合実験が必要である (92)。HL-60細胞は成熟好中球と本質的に同量のLe^x/sLe^x糖脂質を発現し、またガングリオシドを欠く好中球の*in vitro*モデルとして有効に用いることができる。赤血球を用いた以前の研究 (95, 96)はHL-60細胞をエンドグリコセラミダーゼで処理すると膜糖脂質の50~70%が消失することを示した。これに代わる方法としてそれぞれUDP-glucose: ceramide glucosyltransferaseおよびUDP-galactose: glucosylceramide galactosyltransferaseの競合的阻害剤であるD-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinol-propanol (PDMP)またはgluco-4-epoxy-4-C-ethyleneglycosylceramideとHL-60細胞をインキュベートすることができる (95, 96)。PDMPでHL-60

96). Treatment of HL-60 cells with PDMP was previously shown to selectively inhibit adherence of HL-60 cells during phorbol ester-induced macrophage differentiation (97).

C. Le^x and sLe^x Expression on Human Lymphocytes

In general, lymphocytes lack Le^x and sLe^x antigens (1, 2). However, recent studies have reported sLe^x expression by certain subpopulations of lymphocytes. Specifically, sLe^x was reported on membranes of NK cells (98, 99), early lymphoid cells (98, 100), activated lymphocytes (100) and a subset of helper memory T cells (101). Sialyl Le^x expression may also play a role in the epidermotropism of certain T-cell malignancies such as mycosis fungoides (102, 103). In acute lymphoblastic lymphoma, Le^x expression is associated with an increased risk of relapse following bone marrow transplantation (28).

Membrane structures which may express sLe^x antigen on lymphocytes include the LFA molecule (CD11/CD18) and leukosialin (CD43) which are expressed on all leukocytes (3,9). GSLs with sLe^x activity have been reported in T-lymphoblastic cell lines (58, 78) such as CEM and the B-lymphocyte cell line, RPMI 8226 (Fig. 1). Like neutrophils, sLe^x GSL expression by subpopulations of lymphocytes may play a role in lymphocyte-endothelial interactions. Studies of the E-selectin ligand on NK cells have shown it to be protease-resistant (99). Further work is required in elucidating the structure, differentiation and possible role of sLe^x GSLs in lymphoid development.

D. sLe^x Gangliosides in Platelet Adhesion

Although it was well known that platelets can express P-selectin on their cell membranes upon activation (104), it was believed that platelets lacked ligands for P- or E-selectin on their cell membranes (29-33). This belief was based on studies reporting that platelets stained negatively with mAbs against Le^x and sLe^x on direct immunofluorescence (105). In addition, platelets failed to appreciably bind isolated P-selectin on radio-immunoassay (106).

Other studies, however, have provided evidence for the existence of carbohydrate ligands on platelets capable of interacting with P- and E-selectin. At least three studies have shown evidence of P-selectin mediated homotypic platelet adhesion. First, Lyp20, an anti-P-selectin mAb, was shown to inhibit platelet aggregation in response to thrombin, ADP and collagen (107). Likewise, Yen *et al.* (108) showed that cisplatin-induced platelet aggregation was an agglutination phenomena inhibitable by both fluid phase P-selectin and Fab fragments directed against the P-selectin molecule. In electron microscopic studies of thrombin-induced platelet aggregates, P-selectin, but not fibrinogen, GPIIb/IIIa, GPIb, von Willebrand factor, thrombospondin, or fibrinogen, was specifically localized along the long cell-cell contact zones of aggregated platelets,

細胞を処理すると、phorbolエステルで誘導されたマクロファージの分化時に、HL-60細胞の接着が選択的に阻害されることが示されている (97)。

C. ヒトのリンパ球におけるLe^xとsLe^x

一般に、リンパ球にはLe^x、sLe^x抗原がない。しかし、最近の研究では、リンパ球の一部の系列にsLe^xが発現することが報告された (1, 2)。これは、特に、NK細胞 (98, 99)、初期リンパ細胞 (98, 100)、活性化されたリンパ球 (100)、ヘルパーメモリーT細胞サブセットなどの細胞膜上に報告された。シアリルLe^xの発現は、例えばMycosis fungoidesのようなT細胞悪性腫瘍の表皮親和性にも関係する (102, 103)。急性リンパ芽球リンパ腫では、Le^xの発現が骨髄移植後におこる再発を増加させるのに関係する (28)。

sLe^x 抗原が発現したリンパ球の膜構造には、LFA 分子 (CD11/CD18) や全ての白血球上に発現している leukosialin (CD43) が含まれている (3, 9)。sLe^x 活性を持つ糖脂質は、CEM のようなTリンパ細胞系やRPMI 8266 のようなBリンパ細胞系で報告されている (図1)。好中球と同様に、リンパ球におけるsLe^x 糖脂質の発現は、リンパ球-内皮相互作用に関係する。NK細胞上のE-セレクトインリガンドの研究では、それがプロテアーゼ耐性を持つことが示された (99)。今後はリンパ球の発生におけるsLe^x 糖脂質の構造、相違、可能な役割等を明らかにしていくことが必要である。

D. 血小板接着におけるsLe^x ガングリオシド

血小板が活性化した時、その細胞膜上にP-セレクトインを発現することはよく知られている (104) が、血小板膜上にはP- または、E-セレクトインに対するリガンドはないと考えられている。この考え方は、直接免疫蛍光法において、Le^x と sLe^x に対するmAbで血小板が染色されなかったことに基づいている (29-33)。加えて、ラジオイムノアッセイにおいても、血小板は分離されたP-セレクトインに対して目立って結合はしなかった。

しかし、他の研究ではP-、E-セレクトインと反応し得る血小板上の糖鎖リガンドの存在が証明されている。P-セレクトインが血小板同志の接着に関与している証拠が少なくとも3つ示されている。まず、抗P-セレクトインmAbであるLyp20が、トロンビン、ADP、コラーゲンによる血小板凝集を阻害することが示された。同様に、Yenら (108) は、シスプラチン誘導血小板凝集が、可溶性P-セレクトインやP-セレクトイン分子に対する抗体のFab断片により阻害されることを示した。トロンビン誘導性の血小板凝集に関する電子顕微鏡を用いた研究では、P-セレクトインが凝集した血小板が細胞-細胞間で接触した領域に沿って長く特異的に局在していることが示された。しかし、フィブリノーゲン、GPII/IIIa、GPIb、von Willebrand 因子、トロンボスポ

leading to the speculation that P-selectin may play a role in stabilization of platelet aggregates (109). Platelets may also participate in selectin-mediated heterotypic adhesion with vascular endothelium. A recent study demonstrated rolling of platelets along vascular endothelium *in vivo* (74). Platelet rolling was independent of platelet activation and was mediated *via* endothelial E-selectin and a constitutively expressed ligand on platelet membranes.

Direct evidence of P- or E-selectin ligands on human platelet membranes was initially reported by Weinfeld *et al.* (110) and were later confirmed by Cooling *et al.* (61) who reported a total of eight platelet gangliosides with sLe^x activity. In the latter study, only a preliminary characterization of platelet sLe^x gangliosides was possible due to the small quantity of sLe^x gangliosides in platelets. The three major platelet sLe^x-active gangliosides (Bands 3, 6, and 14) were isolated by high performance liquid chromatography (HPLC) and partially characterized by HPTLC-immunostaining with monoclonal antibodies directed against sLe^x (mAb CSLEX-1), Le^x (mAb MC480), dimeric Le^x (mAb FH4), trimeric Le^x (mAb FH5) and lactosamine or blood group iI antigen (mAb 1B2). Most antibodies were tested before and after *in situ* digestion of platelet gangliosides with neuraminidase.

A summary of mAb staining and the preliminary structures of bands 14, 6 and 3 are shown in Table I. Band 14 was proposed to be a branched, disialo-fucoganglioside, at least nine oligosaccharides in size, with both sLe^x and sialo-I activity (S). Band 6 (T) appeared to be a monosialo, multifucosylated ganglioside with sialyl dimeric Le^x- or perhaps sialyl trimeric Le^x activity similar to those previously identified in granulocytes (59, 60) and adenocarcinoma (14). Band 3 appeared to represent a ganglioside with elements of both band 14 and band 6. Based on mAb activity, band 3 was suggested to be a complex, long-chain disialofucoganglioside, possessing both a terminal sLe^x and sialylated blood group I epitope (U).

The presence of branched, disialo sLe^x gangliosides in platelets differs sharply from sLe^x expression in granulocytes, which is characterized by monosialo, unbranched sLe^x ganglioside structures. Furthermore, the biantennary structure of bands 14 and 3 is very similar to the sLe^x oligosaccharides expressed on N- and O-linked glycans (3, 5). Band 3, in particular, shares multiple features of the O-glycan expressed on PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), a homodimeric glycoprotein on myeloid cells which serves as a high affinity ligand for P-selectin (4, 5). Like band 3, the PSGL-1 O-linked glycan is a disialo, branched, long-chain, fucosylated *neolacto*-series oligosaccharide possessing a sLe^x epitope and a sialylated blood group I-like epitope (5). Because of its similarity to the PSGL-1 O-glycan, as well as the importance of multivalency for selectin-mediated binding (111), platelet sLe^x bands 3 and 14 may play an important role in platelet homotypic and heterotypic adhe-

ンディン、またはフィブリノーゲンによる誘導ではこのような局在はみられなかった。これらの結果は、P-セレクトリンが血小板の安定化に働いている可能性を推測させる(109)。血小板はセレクトリンを介した血管内皮細胞との接着にも働いているらしい。最近の研究では*in vivo*において血管内皮細胞に沿って血小板がローリングすることが示された(74)。血小板のローリングは血小板の活性化には依存せず、血管内皮細胞のE-セレクトリンと血小板膜に常時発現されているリガンドを介して行われる。

血小板膜上のP-、またはE-セレクトリンリガンドの存在についての直接的な証拠は、Weinfeldら(110)によって初めて報告され、後にこの報告はsLe^x活性を持つ全部で8つの血小板ガングリオシドを報告したCoolingら(61)によって確定された。含量が少ないため血小板sLe^xガングリオシドのその後の研究は進んでいない。3つの主要な血小板sLe^x活性型ガングリオシド(バンド3、6、14)が高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で単離され、sLe^x (mAb CSLEX-1)、Le^x (mAb MC480)、二量体Le^x (mAb FH4)、三量体Le^x (mAb FH5)、およびラクトサミンまたは血液型iI抗原に対するモノクローナル抗体(mAb 1B2)を用いたHPTLC免疫染色により部分的に性状解析された。多くの抗体は血小板の*in situ* ノイラミニダーゼ処理前後でテストされた。

モノクローナル抗体による染色性とバンド14、8、3の推定構造を表Iに示す。バンド14はsLe^xとシアロ-I活性を有し、少なくとも9糖からなる分枝ジシアロ-フコガングリオシド(S)であると提示された。バンド6(T)は顆粒球(59、60)や腺癌(14)で以前同定されたものと同じシアリル二量体型Le^x、または、おそらくシアリル三量体型Le^x活性を有するモノシアロ、マルチフコシル化ガングリオシドであると考えられた。バンド3はバンド14と6の両方の構造的要素を持つガングリオシドであると予想された。モノクローナル抗体染色をもとに、バンド3は複雑な長鎖ジシアロフコガングリオシドであることが示唆された。このガングリオシドは末端にsLe^xとシアリル化された血液型。エピトープ(U)を有している。

血小板上には分枝型ジシアロsLe^xガングリオシドが存在することが、また、顆粒球上にはモノシアロ型で分枝をもたないsLe^xガングリオシド構造が存在することが特徴である。更に、バンド14と3でみられるバイアンテナリー構造はN-、O-結合型グリカンに発現されているsLe^xオリゴ糖によく似ている。特に、バンド3はP-セレクトリンに対する高親和性リガンドとして働く骨髄性細胞上のホモ二量体型糖タンパク質であるPSGL-1(P-selectin glycoprotein ligand-1)上に発現されるO-グリカンの特徴を持っている(4、5)。バンド3と同様に、PSGL-1のO-結合型グリカンはsLe^xエピトープとシアリル化された血液型。エピトープを持つジシアロ、分枝型、長鎖フコシル化ネオラクト系オリゴ糖である(5)。セレクトリンを介する結合に多価性(multivalency)が重要である(111)のと同様、血小板sLe^xのバンド3と14は、PSGL-1のO-結合型グリカンに似ているために、血小板どおし、および血小板と他細胞との接着に重要な役割を

sion.

E. Endothelial sLe^x Gangliosides

L-selectin, a leukocyte adhesion molecule present on all leukocytes, also recognizes sLe^x (31). Physiologically, L-selectin plays a role in lymphocyte recirculation and homing to lymph nodes *via* recognition of sLe^x and related glycans expressed on high endothelial venules (29-33). Recent work has identified GlyCAM-1(6) and CD34 (7) as major L-selectin receptors. Like PSGL-1, the L-selectin ligand is a disialo, branched, polylactosaminyl *O*-linked glycan with a sLe^x and sialo-blood group I-like epitope (8). Unlike the PSGL-1 *O*-glycan, the sLe^x on GlyCAM-1 and CD34 is also sulfated (6-8).

Although GlyCAM-1 and CD34 constitute the major L-selectin ligand on venous endothelium, endothelial sLe^x gangliosides may also play a role. Like E-selectin, L-selectin can also bind sLe^x GSLs under physiologic flow conditions (73). In addition, multiple sLe^x gangliosides were identified on HPTLC-immunostaining of human umbilical vein endothelial gangliosides (112), including the possibility of long-chain, branched sLe^x gangliosides (V). The mAb 2H5, which was raised against long-chain, multifucosylated GSLs with sialyl dimeric Le^x (mAb FH6 positive) and blood group I (mAb Ma positive) activity, was shown to react strongly with endothelial cells of lymphoid tissue (62). MAb 2H5 was also shown to inhibit L-selectin mediated adhesion to lymphoid endothelial cells (62).

F. Le^x and sLe^x Glycosphingolipids in Human Cataracts

The first report of fucolipids in human lens was reported by Tao *et al.*, (113, 114). These findings were subsequently confirmed by Ogiso *et al.* (45, 115-117) and Ariga *et al.* (44) who definitively characterized multiple Le^x and sLe^x GSLs in human lens. Le^x and sLe^x glycolipids have also been identified in lens GSL extracts of various animals, including dog and monkey (118). Interestingly, no Le^x or sLe^x epitopes were identified on lens glycoproteins (45, 118).

To date, four Le^x/sLe^x GSLs have been isolated and characterized (44,45, 116): Le^x-5 (A), dimeric Le^x-8 (F), a Le^x-Le^y biosynthetic intermediate, GlcNAc-Le^x-5 (C), and one sLe^x ganglioside, (sLe^x-6, M). Human lens may also express sialyl dimeric Le^x gangliosides (117); at least one lens ganglioside was positive with mAb FH6, a mAb specific for sialyl dimeric-Le^x epitopes (14). Although sLe^x expression is relatively constant over time, Le^x expression is developmentally regulated in an age dependent manner and can constitute up to one third of the total neutral GSL present (44, 45, 115, 117).

The physiologic role of sLe^x or Le^x glycolipids in human lens is unclear: Neither E or P-selectin were identified on immunoblotting of lens proteins (116). Lewis^x and sLe^x GSL expression may be associated with the differentiation and matu-

果たしていると思われる。

E. 内皮細胞の sLe^x ガングリオシド

すべての白血球上に存在する白血球接着分子、L-セレクトリン、もまた sLe^x を認識する (31)。生理学的には、L-セレクトリンはリンパ球の再循環と高内皮細静脈に発現されている sLe^x 及び関連グリカンの認識を介したリンパ節へのリンパ球のホーミングに働いている (29-33)。最近 L-セレクトリンの主要なリガンドとして GlyCAM-1 (6) と CD34 (7) が同定された。PSGL-1 のように、L-セレクトリンリガンドは sLe^x とシアロ血液型 I 様のエピソードを持つジシアロ、分枝型、ポリラクトサミニル *O*-結合型グリカンである (8)。PSGL-1 *O*-グリカンとは異なり、GlyCAM-1 と CD34 上の sLe^x は硫酸化されている (6-8)。

GlyCAM-1 と CD34 は静脈系血管系における L-セレクトリンの主要なリガンドを構成しているが、内皮細胞上の sLe^x ガングリオシドも一役を担っている。E-セレクトリンと同様に生理学的血流条件下で、L-セレクトリンは sLe^x 糖脂質と結合する (73)。加えて、臍帯動脈内皮ガングリオシド (112) を HPTLC-免疫染色すると多価 sLe^x ガングリオシドが同定され、この中には長鎖で枝分れした sLe^x ガングリオシド (V) も含まれる可能性が示された。シアリル二量体 Le^x (mAb FH6 陽性) と血液型 (mAbs Ma 陽性) 活性を持つ長鎖型、多価フコシル化糖脂質に対するモノクローナル抗体 2H5 はリンパ組織の内皮細胞と強く反応することが示された (62)。モノクローナル抗体 2H5 もまたリンパ管内皮細胞への L-セレクトリンを介する接着を阻害することが示された。

F. ヒト白内障での Le^x および sLe^x スフィンゴ糖脂質

ヒト水晶体中のフコリピドに関する最初の報告は Tao ら (113, 114) によってなされた。続いて、これらの知見はヒト水晶体の多価 Le^x と sLe^x 糖脂質について決定的な性状解析をした Ogiso ら (45, 115-117) と Ariga ら (44) によって確認された。イヌやサルを含む様々な動物の水晶体糖脂質抽出物中に Le^x と sLe^x 糖脂質が同定された (118)。興味深いことに、いかなる Le^x または sLe^x エピソードも水晶体糖タンパク質上には同定されていない (45, 118)。

現在までに、4つの Le^x/sLe^x 糖脂質が単離され性状解析されている (44, 45, 116)。すなわち、Le^x-5 (A)、二量体型 Le^x-8 (F)、Le^x-Le^y 生合成中間体、GlcNAc-Le^x-5 (C)、そして1つの sLe^x ガングリオシド (sLe^x-6、M) である。ヒト水晶体もおそらくシアリル二量体 Le^x ガングリオシドを発現しているようである (117)。少なくとも1つの水晶体ガングリオシドはシアリル二量体 Le^x エピソード特異的なモノクローナル抗体、FH6 に陽性であった (14)。sLe^x の発現は相対的にみて経時的にずっと一定であるが、Le^x の発現は年齢依存的に発生学的に調節されていて、全中性糖脂質の3分の1までに達する (44, 45, 115, 117)。

ヒト水晶体での Le^x または sLe^x 糖脂質の生理的役割は不明である。E-、P-セレクトリンはいずれも水晶体タンパクのイムノブロットングでは検出されなかった (116)。Lewis X や sLe^x 糖脂質発現は水晶体繊維への上皮細胞の分化や成熟と関連してい

ration of epithelial cells to lens fibers (118). Lewis^x GSL may also play a role in the formation of cataracts, possibly through Le^x-Le^x homotypic adhesion, leading to a spatial disorder in lens fiber alignment and lens opacification (45, 115, 119). Because mature lens fibers are acellular and therefore biosynthetically inert, the increase in Le^x GSL observed with aging and cataracts (45) is felt to reflect desialylation of sLe^x ganglioside (115, 117).

G. Le^x and sLe^x Glycosphingolipids in Neoplasia

G-1. Le^x and sLe^x Glycosphingolipids in Colon Cancer

Le^x and sLe^x determinants are expressed on gastrointestinal epithelia early in fetal development, with expression decreasing with increasing gestational age (15). In adults, Le^x epitopes are detected in intestinal crypts (1). Sialyl Le^x determinants are generally not expressed on adult gastrointestinal mucosa (15) although weak staining was reported to intestinal glands and goblet cells with the anti-sLe^x mAb, KM-93, (76) on immunohistochemistry.

In contrast, Le^x and sLe^x antigens are frequently expressed on gastrointestinal neoplasms (1, 2, 13, 15, 21-25, 76). Retrospective studies have identified sLe^x in up to 76% of colorectal adenocarcinomas (2). Neoexpression of Le^x and sLe^x on colon polyps is regarded as a sign of intestinal dysplasia, with Le^x/sLe^x positivity correlating with increasing polyp size, villous histology and increasing cellular atypia (22, 24, 25). Expression of sLe^x, and particularly sialyl dimeric Le^x, in colorectal carcinoma may also play a role in tumor metastasis via E-selectin on activated endothelium (34-37). Sialyl dimeric Le^x expression has been associated with more invasive local and metastatic disease (23).

Multiple Le^x and sLe^x GSLs have been isolated and identified from colorectal adenocarcinomas, although the expression and relative distribution of individual Le^x (and Le^y) species may vary between different tumors (21, 53, 54, 56). In the neutral GSL fraction (42, 54), Le^x species include Le^x-5 (A), dimeric Le^x-8 (F) and trimeric Le^x-11 (L). Le^y GSLs (51, 52, 56) include Le^y-6 (B), Le^y-8 (E), and trimeric Le^y-9 (H). In colorectal cancer, levels of Le^x- and Le^y-active GSLs can approach 50 µg/gm tissue, a 250-fold increase over normal colonic mucosa (54).

Sialyl Le^x gangliosides isolated from colon carcinoma (2, 14) include sLe^x-6 (M) and sialyl dimeric Le^x (O). Complex, branched sLe^x gangliosides, with both sLe^x and I activity (V), can also be found (62). Because human intestine normally synthesizes many fucosylated lacto-series GSLs with Lewis A (Le^a) and Lewis B (Le^b) activity (120), unusual *lacto-neolacto* hybrid GSLs with Le^a and Le^x activity have also been identified in colorectal carcinoma (64). These include a sLe^a-X active ganglioside (X) as well as a branched monosialoganglioside with sLe^a and Le^x activity (Y). Both sLe^a-X and sLe^a-Le^x GSLs

るのかもしれない (118). Lewis^x 糖脂質もおそらくは Le^x-Le^x 相互の接着を通じて、結果として水晶体繊維配列の空間的障害と水晶体の混濁化を引き起こし、白内障の形成に働いているのかもしれない (45, 115, 119)。成熟した水晶体繊維は無細胞であり、従って生合成的には不活性だから、加齢や白内障で観察される Le^x 糖脂質の増加 (45) は sLe^x ガングリオシドの脱シアル化を反映すると思われる (115, 117)。

G. 新生癌における Le^x および sLe^x 糖スフィンゴ脂質

G-1. 大腸癌の Le^x および sLe^x スフィンゴ糖脂質

Le^x と sLe^x 決定基は胎児発生初期に消化管上皮に発現され、妊娠時になると発現は減少する (15)。成人では Le^x エピトープは腸陰窩 (1) に検出される。シアルル Le^x 決定基は免疫組織化学上、抗-sLe^x モノクローナル抗体、KM-93 (76) を用いて腸腺や杯状細胞に弱い染色があることが報告されていたが、一般には成人の腸間粘膜には発現されていない。

対照的に、Le^x と sLe^x 抗原は消化管癌にしばしば発現されている (1, 2, 13, 15, 21-25, 76)。過去の研究では大腸腺癌の最大 76% に sLe^x が同定された (2)。結腸ポリープにおける Le^x と sLe^x の新生発現は、ポリープの大きさ、絨毛組織学および細胞異形性の増加と Le^x/sLe^x の発現は正相関するので、結腸の異形成の兆候と認められている (22, 24, 25)。大腸癌における sLe^x、特にシアルル二量体型 Le^x の発現も活性化された内皮細胞上の、E-セレクトインを介した癌転移で、働いているらしい (34-37)。シアルル二量体型 Le^x 発現は、さらに侵襲性のある局在的で転移性疾患と関連している (23)。

個々の Le^x (および Le^y) 系統の発現と分布は、腫瘍間で、さまざまに異なっているが、多様な Le^x と sLe^x 糖脂質が大腸腺癌から分離、同定されている (21, 53, 54, 56)。中性糖脂質分画 (42, 54) 中には、Le^x 系列として Le^x-5 (A)、二量体型 Le^x-8 (F) また、三量体型 Le^x-11 (L) が含まれている。Le^y 糖脂質 (51, 52, 56) には、Le^y-6 (B)、Le^y-8 (E) と三量体 Le^y-9 (H) が含まれている。大腸癌では、Le^x- と Le^y- 活性糖脂質のレベルは、50 µg/gm tissue に到達しており、これは、正常大腸粘膜の 250 倍以上の増加である (54)。

大腸癌から分離されたシアルル Le^x ガングリオシドは sLe^x-6 (M) とシアルル二量体型 Le^x (O) を含んでいる (2, 14)。sLe^x と I 活性 (V) の両方を持ち、複雑で分枝型の sLe^x ガングリオシドも見つけられている (62)。ヒト小腸は、Lewis A (Le^a) と Lewis B (Le^b) の活性を持った多くのフコシル化ラクト-シリ-ズ糖脂質を通常合成している (120) から、大腸癌では Le^a と Le^x 活性を持つ異常なラクト-ネオラクト混成型糖脂質も同定されている (64)。これらは、sLe^a と Le^x 活性 (Y) を持った分枝型モノシアロガングリオシドだけでなく sLe^a-X 活性型ガングリオシド (X) を含んでいる。sLe^a-X と sLe^a-Le^x 糖脂質の両者は異常な構

may be useful tumor-specific antigens for colorectal carcinoma due to their unusual structures (64).

G-2. Le^x and sLe^x GSLs in Lung Cancer

As with human intestine, Le^x is not normally expressed on adult human lung (1). In contrast, some sLe^x antigen can be detected on normal bronchial epithelium and bronchial glands (76) as well as whole lung tissue extracts (27). Sialyl Le^x and sialyl dimeric Le^x are also expressed during fetal lung development (13, 15).

In malignancy, Le^x and sLe^x neoexpression is observed in up to 90% of lung adenocarcinomas (18, 21, 76). Sialyl Le^x determinants are also expressed by other primary lung cancers (76), including squamous cell (77% of cases), small cell (66.7%) and large cell carcinoma (60%). Expression of sLe^x and sialyl dimeric Le^x antigen in lung adenocarcinoma is associated with poor survival and increased metastatic potential (19, 20), possibly through increased selectin-mediated endothelial adherence (36).

Both Le^x and sLe^x GSLs have been identified in lung cancer. In a study of sixteen immortalized human lung cancer cell lines, Spitalnik *et al.* (121) demonstrated multiple Le^x-active GSLs in lung mesothelioma, small cell, large cell and adenocarcinoma. The expression and relative distribution of Le^x GSL species varied between individual cell lines with Le^x GSL expression inversely related to the expression of the oncogene, c-myc. Specific Le^x GSLs identified in lung cancer (48, 49) were Le^x-5 (A), Le^x-7 (D), dimeric Le^x-8 (F) and trimeric Le^x-11 (L). Higher molecular weight Le^x GSLs, as well as several Le^y-active GSLs, were also identified (48, 49, 121). An unusual Le^a-X GSL (W) was isolated from a squamous cell carcinoma and is the epitope for the tumor-specific mAb, 43-9F (63).

Likewise, sLe^x gangliosides were observed in multiple lung cancer cell lines (19, 48, 49, 121). Among the gangliosides identified were sLe^x-5 (M), sLe^x-8 (N) and sialyl dimeric Le^x (O). Like colorectal carcinoma, unusual Le^x-active gangliosides may also be synthesized in lung neoplasms. Spitalnik *et al.* (121) observed two Le^x-active gangliosides in the ganglioside fraction of NCI-H69 cells. These were postulated to represent branched, monosialo-gangliosides in which a Le^x epitope is expressed on one branch while the other branch terminates in a sialic acid. Such a structure would be similar to the sLe^a-Le^x ganglioside (Y) identified in colorectal carcinoma (64).

G-3. Le^x and sLe^x GSLs in Genitourinary Tract Cancer

Unlike lung and colon, Le^x and sLe^x antigens are normally expressed in kidney and bladder (1, 2, 15, 16). Le^x and sLe^x determinants are expressed early in kidney development and persists on proximal renal tubules and the descending loops of Henle (1, 2, 15, 16). Le^x antigens are also expressed on adult urethral, uretral and bladder epithelium (1, 16). Le^x and dimeric Le^x antigen may also be found on developing, but not adult,

造を持つため、大腸癌の有用な腫瘍-特異的抗原として利用できる (64)。

G-2. 肺癌中の Le^x と sLe^x 糖脂質

ヒト小腸の時と同様に、Le^xは、普通成人ヒト肺上に発現されない (1)。対照的に、いくつかの sLe^x 抗原はすべての肺組織抽出物 (27) だけでなく、正常気管支上皮と気管支腺 (76) にも検出される。シアリル Le^x とシアリル二量体型 Le^x も胎児肺の発生期に発現される (13, 15)。

悪性腫瘍においては、Le^x と sLe^x の新生発現は肺腺癌の最大 90% に観察された (18, 21, 76)。シアリル Le^x 決定基も扁平上皮癌細胞 (77%)、小癌細胞 (66.7%)、および大癌細胞 (60%) を含む、他の初期肺癌で発現している (76)。肺腺癌の sLe^x とシアリル二量体型 Le^x 抗原の発現は、生存率の低下そしておそらくはセレクチンを介した内皮細胞との接着の増大 (36) による転移能の増大 (19, 20) と関連している。

肺癌では Le^x と sLe^x 糖脂質の両者が同定されている。Spitalnik ら (121) は 16 種の固層化されたヒト肺癌細胞株を用いて、肺中皮腫、小細胞、大細胞および腺癌中に多様な Le^x-活性型糖脂質の存在を証明した。Le^x 糖脂質分子種の発現と相対分布は発癌遺伝子 c-myc の発現と逆相関しており、Le^x 糖脂質を発現している個々の細胞株間で異なっていた。肺癌で同定された特異的 Le^x 糖脂質 (48, 49) は Le^x-5 (A)、Le^x-7 (D)、二量体 Le^x-8 (F) と三量体 Le^x-11 (L) であった。いくつかの Le^x-活性型糖脂質と同様に、より高分子量の Le^x 糖脂質も同定された (48, 49, 121)。正常では見られない Le^a-X 糖脂質 (W) が扁平上皮細胞癌から単離された、これは癌特異的のモノクローナル抗体、43-9F に対するエピトープである (63)。

同じく、sLe^x ガングリオシドは多種の肺癌細胞株に観察された (19, 48, 49, 121)。そのガングリオシドのうち sLe^x-5 (M)、sLe^x-8 (N)、及びシアリル二量体型 Le^x (O) が同定された。大腸癌の様に、異質な Le^x-活性型ガングリオシドも肺新生癌で生合成されるらしい。Spitalnik ら (121) は NCI-H69 細胞のガングリオシド画分に 2 つの Le^x-活性型ガングリオシドを観察した。これらは Le^x エピトープを 1 つの分鎖上に発現し、他の分鎖がシアール酸で終わっている分枝型、モノシアロ-ガングリオシドであると推定された。この様な構造は大腸癌で同定された sLe^a-Le^x ガングリオシド (Y) と類似している (64)。

G-3. 性尿器癌での Le^x および sLe^x 糖脂質

肺や大腸とは異なり、Le^x および sLe^x 抗原は通常腎臓や膀胱に発現している (1, 2, 15, 16)。Le^x および sLe^x 決定基は腎臓の発生初期に発現し、近位尿管細管とヘンレループ下行脚に維持される (1, 2, 15, 16)。Le^x 抗原も成人の尿道や膀胱、膀胱上皮に発現される (1, 16)。Le^x および二量体型 Le^x 抗原も発生中の

ovaries (16).

Not surprisingly, many renal, bladder and ovarian cancers express Le^x and/or sLe^x (1, 2, 15-17, 21, 26, 122, 123). In renal cell carcinoma, which arises from the proximal renal tubules, Le^x, dimeric Le^x and sialyl dimeric Le^x are expressed on 68%, 74.5% and 47% of cases, respectively (17). Unlike colorectal or lung cancer, expression of sialyl dimeric Le^x in renal cell carcinoma reflects a well-differentiated tumor and is, therefore, associated with a better clinical prognosis (16, 17). The latter is not true of transitional cell carcinoma of bladder. Like colon and lung cancer, sialyl dimeric Le^x expression in transitional cell carcinoma is a poor prognostic indicator and is associated with an increased metastatic potential (26).

Few studies have examined Le^x and sLe^x GSL expression in genitourinary cancer. In renal cell carcinoma, there appears to be a quantitative and qualitative increase in Le^x GSL species (123). In ovarian cancer, on the other hand, Le^x (and Le^y) determinants appear to be expressed on non-GSL structures. Despite immunochemical evidence showing the presence of Le^x antigen on several ovarian cystadenocarcinomas, no Le^x GSLs were identified in the neutral GSL fraction of the same tumors (122).

H. Biosynthesis of Le^x and sLe^x Glycosphingolipids

Because of the importance of the sLe^x ligand in cell adhesion, there is intense interest in the regulation of Le^x and sLe^x expression *in vivo*. Significant progress has been made in the last decade in isolating and cloning many of the key glycosyl transferases required in the synthesis of Le^x/sLe^x antigens (80, 124-135). Although most studies have not correlated specific glycosyltransferase activity or expression with the synthesis of Le^x or sLe^x-active GSLs *in vivo*, many of the glycosyl-transferases isolated are able to utilize GSL substrates to form Le^x- or sLe^x-active GSLs *in vitro* (48, 49, 79, 135-137). These studies would suggest that the same glycosyltransferases may be capable of synthesizing Le^x/sLe^x antigen on multiple glycan structures including GSLs. Because much of the work to date has focused on regulation of Le^x/sLe^x expression during hematopoiesis, we will summarize what is currently known regarding Le^x/sLe^x synthesis and Le^x/sLe^x GSL expression in myeloid and lymphoid cells.

Following synthesis of glucosylceramide (Fig.1, structure I) and lactosylceramide (II), the first critical glycosyltransferase required for the synthesis of Le^x and sLe^x GSL is an "initiating" β 1-3 *N*-acetylglucosaminyltransferase [β 1-3 GlcNAcT(i)] or Lc₃OseCer synthase. It catalyzes the addition of a GlcNAc in a β 1→3 glycosidic linkage to the terminal galactose of lactosylceramide, resulting in the synthesis of lactotriaosylceramide (Lc₃OseCer; Fig. 1, III). In HL-60 cells, β 1-3GlcNAcT(i) is one of two glycosyltransferases regulating GSL synthesis (138). Decreased levels of β 1-3 GlcNAcT(i) in

卵巣で見い出されるが、成人では見い出されない (16)。

多くの腎、膀胱、卵巣癌がLe^xおよび/またはsLe^xを発現していることは驚くに値しない (1, 2, 15-17, 21, 26, 122, 123)。近位尿管細管から生じる腎細胞癌では、Le^x、二量体型Le^x、及び二量体型sLe^xがそれぞれ68%、74.5%、47%の割合で発現されている (17)。大腸癌または肺癌とは異なり、腎細胞癌での二量体型sLe^xの発現はよく分化した腫瘍を反映しており、それゆえ予後の良さとも相関している (16, 17)。後者は移行性の膀胱癌細胞では当てはまらない。結腸癌や肺癌の様に、移行性の細胞癌におけるシアリル二量体sLe^xの発現は予後の悪さの指標であり、転移能増加と関連している (26)。

性尿器癌においてはLe^xとsLe^x糖脂質の発現はほとんど研究されていなかった。腎細胞癌ではLe^x糖脂質系統の定量的かつ定性的増加がみられる (123)。一方、卵巣癌ではLe^x (Le^y) 決定基が非糖脂質構造上に発現されているようである。数種の卵巣嚢腫癌上にLe^x抗原が存在するという免疫化学的証拠にもかかわらず、Le^x糖脂質は同じ腫瘍の中性糖脂質画分には同定されなかった (122)。

H. Le^xおよびsLe^x スフィンゴ糖脂質の生合成

細胞接着にsLe^xリガンドは重要であるので、*in vivo*におけるLe^xとsLe^xの調節には大きな興味が持たれている。Le^x/sLe^x抗原の合成に必要な不可欠な糖転移酵素の単離やクローニングには過去10年来意義ある進展がなされてきた (80, 124-135)。*in vivo*でのLe^x、またはsLe^x-活性糖脂質の合成と、特異的な糖転移酵素の活性や発現とは、多くの研究において関連性がないのだが、*in vitro*では多くの合成された糖転移酵素はLe^x-やsLe^x-活性糖脂質を合成するための基質として利用することができる (48, 49, 79, 135-137)。これらの研究は同じ糖転移酵素が糖脂質を含む多様なグリカン構造上のLe^x/sLe^x抗原を合成することができることを示唆している。現在までの研究の多くが造血におけるLe^x/sLe^x発現の調節に集中しているので、ここでは骨髓性細胞とリンパ球細胞におけるLe^x/sLe^x合成とLe^x/sLe^x糖脂質発現に関して最近知られていることをまとめることにする。

グルコシルセラミド (図1、構造I) とラクトシルセラミド (II) の合成に続き、Le^xとsLe^x糖脂質の合成に必要なとされる最も重要な糖転移酵素は“最初に関与する” β 1-3 *N*-アセチルグルコサミニル転移酵素 [β 1-3 GlcNAcT (i)] またはLc₃OseCerシンターゼである。この酵素はラクトシルセラミドの末端ガラクトースに β 1-3結合でGlcNAcの付加を触媒し、結果としてラクトトリアシルセラミド (Lc₃OseCer; 図1、III) を合成する。HL-60細胞では、 β 1-3 GlcNAcT (i) は糖脂質合成を調節する2つの糖転移酵素のうちの1つである (138)。正常大腸上皮細胞やB-

Fig. 1. Proposed Synthesis of Lewis^x and sialyl Lewis^x Glycosphingolipids. Following synthesis of glucosylceramide (structure I) and lactosylceramide (II), the synthesis of the first *lacto*-series GSL is catalyzed by an initiating $\beta 1\text{-3 } N\text{-acetylglucosaminyltransferase}$ [$\beta 1\text{-3GlcNAcT (i)}$] or lactotriaosylceramide (Lc_3OseCer) synthase. Lactotriaosylceramide is then converted to paragloboside (IV), the first type 2 chain GSL, by the action of a $\beta 1\text{-4 galactosyltransferase}$ ($\beta 1\text{-4GalT}$). Synthesis of longer type 2 chain GSLs (V) requires the alternating action of a $\beta 1\text{-4GalT}$ and an elongating $\beta 1\text{-3 } N\text{-acetylglucosaminyltransferase}$ [$\beta 1\text{-3GlcNAcT(e)}$] which catalyzes the addition of a $\beta 1\text{-3 GlcNAc}$ to a $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc-R}$ acceptor. To synthesize Le^x GSLs (VI), an $\alpha 1\text{-3 fucose}$ is added to the penultimate GlcNAc residue by $\alpha 1\text{-3 Fucosyltransferase type IV}$ ($\alpha 1\text{-3FucT-IV}$) located on chromosome 11. The latter may also be responsible for the synthesis of VIM-2 active GSLs (VIII). Synthesis of sLe^x requires the terminal sialylation of type 2 chain GSL precursors (IX), followed by fucosylation (X) by the $\alpha 1\text{-3FucT-VII}$ on chromosome 9. Synthesis of sialyl dimeric Le^x (XI) may reflect fucosylation of VIM-2 active GSLs by $\alpha 1\text{-3FucT-VII}$.

normal colonic epithelium and B-lymphocytes (Table II) is reportedly responsible for the absence of Le^x and sLe^x expression in these tissues (79, 137).

To form paragloboside or neolactotetra glycosylceramide ($\text{nLc}_4\text{OseCer}$; Fig. 1, structure IV), the first *neolacto*-series or type 2 chain GSL, a $\beta 1\text{-4 galactosyltransferase}$ ($\beta 1\text{-4GalT}$) catalyzes the addition of a $\beta 1\text{-4 linked galactose}$ to the GlcNAc of Lc_3OseCer . Unlike Lc_3OseCer synthase, $\beta 1\text{-4GalT}$ is constitutively expressed by myeloid and lymphoid cells (Table II) regardless of their ability to express Le^x and sLe^x GSLs (78). To synthesize longer-chain type 2 chain GSLs,

リンパ球 (表 II) の Lc_3OseCer のレベル低下はこれらの組織での Le^x と sLe^x の発現の欠如に対応していると報告されている (79, 137)。

$\beta 1\text{-4}$ ガラクトシルトランスフェラーゼ ($\beta 1\text{-4GalT}$) は、パラグロボシド、またはネオラクト-テトラグルコシルセラミド ($\text{nLc}_4\text{OseCer}$; 図 1、構造 IV)、つまり最初のネオラクト-系列、或いは 2 型糖鎖を持つ糖脂質を形成するために、 Lc_3OseCer の GlcNAc へ $\beta 1\text{-4}$ でガラクトースの付加を触媒する。 Lc_3OseCer シンターゼとは異なり、 $\beta 1\text{-4GalT}$ は、骨髄細胞やリンパ球細胞に Le^x や sLe^x 糖脂質が発現されるにもかかわらず、常時発現されている (表 II) (78)。より長い 2 型鎖糖脂質を合成するため

Table II. Expression of Le^x and sLe^x Glycosphingolipids During Hematopoiesis.

CELLS	GSLs*		Enzyme Activity ¹			α1-3FucT mRNA expression ²					Refs
	Le ^x	sLe ^x	β1-3GlcNAcT	β1-4GalT	α1-3 <u>F</u> ucT	III	IV	TV	VI	VII	
<i>Myeloid Lineage</i>											
K526 (Pleuripotent)	-/+	-	+	+	+		+				58,77-79
ML1 (Myeloblast)	+	+									58
KG1 (Myeloblast)	-/+	+	+	+	+		+				58,77-79
HL-60 (Promyelocyte)	+	+	+	+	+	-	+	-/+	+	+	58,60,77-82
HL-60 (Differentiated) ³	+	+				-	+			+	60,82
U937 (Histiocytic)	+	+				-	+	-	-/+	+	58,60,80-82
HEL (Erythroblast)	-/+	+									58,82
Blood Neutrophils	+	+			+	-	+	-	-	+	43,58-61 80,82
<i>Lymphoid Lineage</i>											
Reh (Pro-Pre B-cell)	-	-	-	+	-		-				78,79
Raji (Burkitt lymphoma)	-	-		+	-		-				58,78
Daudi (Burkitt)	-	-		+	-		-				58,78
BL-1 (B-lymphoblast)	-	-									58
RPMI 8226 (B cell)		+	-	+	+		+				58,78,79
CEM (T-lymphoblast)	-	-/+	-	+	+		+				58,78,79
MOLT-3 (T-lymphoblast)	-	-				+	+	+	+		58,81

* As determined by HPTLC-immunostaining.

¹ Enzyme activity of cell lysates.² Presence of α 1-3 fucosyltransferase (α 1-3FucT) mRNA determined by northern blotting or reverse transcriptase-PCR (RT-PCR).³ Granulocytic differentiation of HL-60 cells by dimethyl sulfoxide (82) or retinoic acid (60).

paragloboside may serve as a substrate for an elongating β 1-3GlcNAcT(e) which catalyzes the addition of a GlcNAc residue to a Gal β 1-4GlcNAc-R acceptor (79, 138). This elongating β 1-3GlcNAcT(e) is present in myeloid and lymphoid cells (79, 138) and is distinct from the β 1-3GlcNAcT(i) which catalyzes the synthesis of Lc₃OseCer (II). As a consequence of the alternating action of both β 1-4GalT and β 1-3GlcNAcT(e), myeloid cells are able to express a series of type 2 chain GSLs of increasing size as shown in Fig. I, structure V (43, 79, 139).

Another essential enzyme required for Le^x/sLe^x GSLs synthesis is an α 1-3 fucosyltransferase (α 1-3FucT) which adds a fucose in an α 1-3 glycosidic linkage to a GlcNAc. At least five distinct α 1-3 FucTs have been cloned to date: FucT-III (127), FucT-IV (128-130), FucT-V (131), FucT-VI (132, 133) and FucT-VII (80, 134). Both FucT-IV and FucT-VII are expressed by human myeloid cells (80-82, 128-130, 134). FucT-IV, located on chromosome 11, prefers asialo-oligosaccharides

に、Gal β 1-4GlcNAc-RアクセプターへGlcNAc残基の付加を触媒する伸長性 β 1-3GlcNAcT(e)の基質としてパラグロボシドが働くらしい(79, 138)。この糖鎖伸長性 β 1-3GlcNAcT(e)は骨髄細胞やリンパ球細胞に存在しており(79, 138)、Lc₃OseCer(II)の合成を触媒する β 1-3GlcNAcT(i)とは異なっている。 β 1-4GalTと β 1-3GlcNAcT(e)とが交互に作用することにより、骨髄細胞は図1、構造Vに示すようなさらに大きいサイズの一連の2型鎖糖脂質を発現することができる(43, 79, 139)。

Le^x/sLe^x糖脂質合成に必要なもう一つの本質的な酵素はGlcNAcに α 1 $\rightarrow$ 3グリコシド結合でフコースを付加する α 1-3フコシルトランスフェラーゼ(α 1-3FucT)である。少なくとも5つの異なる α 1-3FucT、すなわちFucT-III(127)、FucT-IV(128-130)、FucT-V(131)、FucT-VI(132, 133)およびFucT-VII(80, 134)が今日までにクローン化されている。FucT-IVとFucT-VIIの2つはヒト骨髄細胞に発現している(80-82, 128-130, 134)。FucT-IVはクロモソーム11に局在しており、基質としてアシア

as substrates and is most likely the α 1-3FucT responsible for the synthesis of Le^x epitopes (VI) (82, 128, 130).

FucT-IV may also be responsible for the synthesis of VIM-2-active GSLs. These are sialylated, fucosylated *neolacto*-series GSLs (140) immunologically distinct from sLe^x (Fig. 1, structure VIII). Transfection of COS cells, a normally Le^x/sLe^x/VIM-2 negative cell line, with plasmids containing FucT-IV cDNA results in the expression of both Le^x and VIM-2 epitopes on transfected cells (125, 128). In addition to fucosylating the penultimate GlcNAc to give rise to a Le^x-active GSL (VI), FucT-IV may also fucosylate internal GlcNAc residues (141), resulting in an asialo-VIM-2 GSL structure (VII). The latter may then be sialylated by the action of an α 2-3 sialyltransferase (α 2-3 sialylT) to form a VIM-2-active GSL (VIII). Synthesis of an asialo-VIM-2 active GSL by FucT-IV may also be the first step in the synthesis of multimeric Le^x GSLs such as dimeric Le^x.

Unlike Le^x and VIM-2, synthesis of sLe^x GSL is under the control of FucT-VII located on chromosome 9. In contrast to FucT-IV, FucT-VII has a strict requirement for sialylated *neolacto*-series oligosaccharides (80, 82, 134). As a consequence, paragloboside (Fig. 1, IV) and longer-chain *neolacto*-series GSLs (V) must be initially sialylated to form the sialo-oligoglycosylceramide (IX). The latter may then serve as a substrate for FucT-VII, resulting in the synthesis of a sLe^x-active GSL (X). FucT-VII could also act on VIM-2 active gangliosides (VIII) to form sialyl dimeric Le^x-active gangliosides (XI). As shown in Table II, there is a relatively good correlation between FucT-VII mRNA expression and sLe^x ganglioside expression in most leukemic cell lines examined.

As shown in Table II, there is a reasonably good correlation between FucT-IV and FucT-VII mRNA expression and the presence of Le^x and sLe^x GSLs in both myeloid and lymphoid cell lines. The single exception was MOLT-3, a T-lymphoblastic leukemia line. Despite expression of FucT-IV mRNA transcripts (81), MOLT-3 is negative for Le^x GSL on HPTLC-immunostaining (58). The apparent lack of Le^x GSL in MOLT-3 cells is also not due to a decrease in β 1-3 GlcNAcT(i) activity: Both paragloboside and sialoparagloboside were identified in the GSL fraction of MOLT-3 cells (142). These results indicate that additional, unknown factors must also contribute to the regulation of Le^x/sLe^x GSL expression.

1. *In vitro* Synthesis of sLe^x Ganglioside Analogues

In addition to natural sources, sLe^x gangliosides may also be prepared chemically. Because such material may be obtained in much larger quantities than that available from natural sources, synthetic sLe^x GSLs have been very useful in elucidating the structural requirements for selectin-mediated binding. The laboratory of Akira Hasegawa (65-71) has successfully synthesized not only sLe^x (Table I; Z, AA, BB) but also sLe^x

ロ-オリゴ糖を好み、Le^x エピトープ (VI) の合成に関わる可能性が最も高い α 1-3FucT である (82, 128, 130)。

FucT-IV はまた VIM-2-活性糖脂質の合成を担っているらしい。これらは免疫学的に sLe^x (図 1、構造 VIII) とは異なるシアリル化、さらにフコシル化されたネオラクト-系列の糖脂質 (140) である。Le^x/sLe^x/VIM-2 陰性の細胞株である COS 細胞へ FucT-IV cDNA を含むプラスミドを導入した結果、導入細胞上に Le^x と VIM-2 の 2 つのエピトープが発現された (125, 128)。FucT-IV は内部にある GlcNAc 残基もさらにフコシル化してアシアロ VIM-2 糖脂質構造 (VII) を作る。後者は α 2-3 シアリルトランスフェラーゼ (α 2-3sialylT) の働きでシアリル化され VIM-2-活性糖脂質 (VIII) を形成すると考えられる。FucT-IV によるアシアロ-VIM-2 活性糖脂質の合成も、二量体 Le^x のような多価 Le^x 糖脂質合成の第 1 段階であると思われる。

Le^x や VIM-2 とは異なり、sLe^x 糖脂質の合成はクロモゾーム 9 上に局在する FucT-VII の制御下にある。FucT-IV とは対照的に、FucT-VII はシアリル化されたネオラクト-系列を厳密に要求する (80, 82, 134)。パラグロボシド (図 1、IV) およびより長鎖の糖脂質 (V) は最初にシアリル酸が付加され、その結果シアロオリゴグリコシルセラミド (IX) を形成する。後者は FucT-VII の基質として働き、その結果 sLe^x 活性糖脂質 (X) が合成される。FucT-VII は VIM-2 活性gangリオリシド (VIII) にも作用し、シアリル化された二量体 Le^x 活性gangリオリシド (XI) を形成する。表 II に示すように、多くの白血病様細胞において調べられた結果より、FucT-VII mRNA の発現と sLe^x gangリオリシドの発現は比較的によく相関することが見出された。

また、表 II より、ミエロイド細胞およびリンパ系細胞においても、FucT-IV mRNA および FucT-VII mRNA の発現と、Le^x および sLe^x の存在はよく相関することが見いだされた。唯一の例外は T 細胞系白血病細胞の MOLT-3 である。MOLT-3 は FucT-VII が転写され発現する (81) にもかかわらず、HPTLC 免疫染色の結果、Le^x 糖脂質は検出されなかった (58)。MOLT-3 細胞における Le^x 糖脂質の欠落は β 1-3GlcNAcT (i) 活性の低下のためではない。なぜなら、MOLT-3 細胞中の糖脂質画分からパラグロボシド及びシアリルパラグロボシド両者が検出されているからである (142)。これらの結果は FucT-IV mRNA のほかに、Le^x/sLe^x 糖脂質の発現を調節する未知の因子の存在を暗示するものである。

1. sLe^x Ganglioside 類縁体の *in vitro* 合成

sLe^x gangリオリシドは天然由来の原料に加えて、化学合成的に調製することができる。化学合成品は天然原料よりも大量に入手できるので、合成 sLe^x 糖脂質はセレクトインを介する結合に対する構造要求性を明らかにする上で極めて有効である。長谷川明 (65-71) の研究室では、sLe^x (表 I、Z、AA、BB) だけでなく、sLe^x のフコース (HH-JJ) およびノイラミン酸残基修飾体

gangliosides with modified fucose (**HH-JJ**) and neuraminic acid (**CC-GG**) residues. The latter include sLe^x GSLs containing the glycolyl form of neuraminic acid (**CC**, ref. 68) or 3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulononic acid (**KDN**; **DD**, ref. 69), a deaminated neuraminic acid recently described in fish (143). Other sialic acid variants of sLe^x include the C7, C8 and C8-*epi* forms of *N*-acetylneuraminic acid (**EE-GG**) (70). In solid phase assays, all the sLe^x neuraminic acid variants tested were as effective as sLe^x-6 (**Z**) or sLe^x-5 (**BB**) in binding L, P and E-selectin, suggesting that only the C1 carboxyl group of neuraminic acid is necessary for selectin recognition (68, 70, 90).

In contrast to neuraminic acid, any modification of the hydroxyl groups of the sLe^x fucose residue profoundly effect the ability of sLe^x gangliosides to bind selectins. Three sLe^x GSL fucose variants have been tested so far (71, 90): 2-deoxy-fucose sLe^x (**HH**), 3-deoxyfucose sLe^x (**II**) and 4-deoxyfucose sLe^x (**JJ**). Although P-selectin was able to bind the 2-deoxy- and 4-deoxy-fucose sLe^x GSLs, no binding was noted to any fucose-sLe^x variant by either L or E-selectin. These findings suggest that L- and E-selectin require the C-2, C-3 and C-4 fucose hydroxyl groups for recognition whereas P-selectin requires only the C-3 hydroxyl (90). To further explore the importance of the fucose hydroxyl groups in selectin binding, Hasegawa and coworkers have recently synthesized several methyl thioglycosides derivatives of fucose. Specifically, the methyl 1-thioglycoside derivative of 2-*epi*, 2,4, di-*epi*, 3-*epi*, 4-*epi* and a 2-*O*-methyl-L-fucopyranose were synthesized to serve as future glycosyl donors in the synthesis of additional sLe^x gangliosides (145). It will be interesting to see what effect these modifications have on selectin recognition and binding.

J. Summary

A number of normal and neoplastic human tissues express GSLs with Le^x and sLe^x activity. In neutrophils, platelets and possibly NK cells, sLe^x gangliosides may serve as the physiologic ligand for E-selectin on vascular endothelium. In malignancy, sLe^x gangliosides may serve as ligands for E- and P-selectin on endothelium and platelets, facilitating tumor metastasis. To assess the contribution of sLe^x gangliosides in cell adhesion, future studies might include the effect of endoglycoceramidase or PDMP on leukocyte and tumor cell adhesion to activated endothelium. In addition to their scientific value, the results of such experiments may have therapeutic applications in the treatment of neoplastic, inflammatory and thrombotic disorders. Other avenues to be explored may also include the expression of Le^x and sLe^x GSLs during early hematopoietic differentiation. Differential expression of sLe^x gangliosides may play an important role in leukocyte maturation and trafficking from marrow.

This work was supported by grants from the National

(**CC-GG**) の合成にも成功した。後者には、最近魚類において構造が決定された (143)、グリコリル型のノイラミン酸 (**CC**, ref.68) および 3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulononic acid (**KDN**; **DD**, ref.69) を含有する sLe^x 糖脂質が含まれる。sLe^x 中のシアル酸類縁体には他に C7, C8 及び C8-*epi* 型の *N*-アセチルノイラミン酸 (**EE-GG**) が存在する (70)。固層の実験系を用いて、すべてのノイラミン酸類縁体含有 sLe^x について sLe^x-6 (**Z**) および sLe^x-5 (**BB**) における L, P 及び E-セレクトインとの結合を調べた結果、ノイラミン酸中の C1 のカルボキシルグループのみがセレクトインの認識に必要なことが明らかになった (68, 70, 90)。

ノイラミン酸に比べ、sLe^x のフコース残基の水酸基を修飾すると、sLe^x ガングリオシドの、L-セレクトインへの結合性が著しく影響される。これまでに、3 種類の sLe^x 糖脂質フコース類縁体 (71, 90) 2-deoxy-fucosesLe^x (**HH**)、3-deoxy-fucosesLe^x (**II**)、4-deoxy-fucose sLe^x (**JJ**) が研究された。2-deoxy-、および 4-deoxy-fucose sLe^x 糖脂質に P-セレクトインは結合したが、E-、L-セレクトインには、どのフコース類縁体も結合しなかった。この結果から、E-、L-セレクトインは、認識にフコースの C-2 位、C-3 位、C-4 位の水酸基を必要とし、また、P-セレクトインは、C-3 位の水酸基のみを必要とするといえる (90)。セレクトインとの結合における、フコース水酸基の重要性をさらに研究するために、最近、長谷川と彼の共同研究者達は、いくつかのフコースのメチルチオグリコシド誘導体を合成した。これらのうち、特に、2-*epi*、2、4、di-*epi*、3-*epi*、4-*epi*、および 2-*O*-methyl-L-fucopyranose のメチル-1-チオグリコシド誘導体は、付加的な sLe^x ガングリオシドの合成におけるグリコシル供与体として合成された。これらの誘導体が、セレクトインとの認識と結合に対してどのような効果をもたらすのか非常に興味深いところである。

J. 概要

ヒトの正常組織や腫瘍組織の多くは、Le^x と sLe^x 活性をもった糖脂質を発現する。好中球、血小板、そしておそらく NK 細胞においても、sLe^x ガングリオシドは、血管内皮上で E-セレクトインの生理的受容体として機能しているのかもしれない。また、悪性腫瘍において、sLe^x ガングリオシドは、内皮や血小板上の E-、および P-セレクトインのリガンドとして癌の転移をうながしている可能性がある。sLe^x ガングリオシドの細胞接着における役割を評価するためには、将来の研究として、白血球や活性化された血管内皮への癌細胞の接着に及ぼすエンドグリコセラミダーゼや PDMP の効果の研究が必要となるだろう。これらの研究の結果は、科学的な価値に加えて、癌、炎症、血栓症障害の治療に応用することができるだろう。また、造血分化における Le^x や sLe^x の発現に関する研究も開拓されるべきであろう。sLe^x ガングリオシドの異なる発現は、白血球の成熟や、骨髄から白血球への移動において重要な役割を果たしているかもしれない。

Heart, Lung and Blood Institute of the NIH (No. R29 HL42395) and the College of American Pathology Foundation. 静岡県立大学薬学部・生化学教室
鈴木 康夫 訳

References

1. Fox, N., Damjanov, I., Knowles, B.B., and Solter, D. (1983) *Cancer Res.* **43**, 669–678
2. Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P.I., Wakisaka, A., Togashi, H., Chia, D., Suyama, N., Fukushi, Y., Nudelman, E., and Hakomori, S.-I. (1984) *Cancer Res.* **44**, 5279–5285
3. Asada, M., Furukawa, K., Kantor, C., Gahmberg, C.G., and Kobata, A. (1991) *Biochemistry* **30**, 1561–1571
4. Norgard, K.E., Moore, K.L., Diaz, S., Stults, N.L., Ushiyama, S., McEver, R.P., Cummings, R.D., and Varki, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12764–12774
5. Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., and McEver, R.P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23318–23327
6. Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, E.J., Fennie, C., Gillet, N., Watson, S.R., and Rosen, S.D. (1992) *Cell* **69**, 927–938
7. Baumhueter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D., and Lasky, L.A. (1993) *Science* **262**, 436–438
8. Hemmerich, S., Leffler, H., and Rosen, S.D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12035–12047
9. Maemura, K. and Fukuda, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24379–24386
10. Yuen, C.-T., Lawson, A.M., Chai, W., Larkin, M., Stoll, M.S., Stuart, A.C., Sullivan, F.X., Ahern, T.J., and Feizi, T. (1992) *Biochemistry* **31**, 9126–9131
11. Ho, J.J.L., Siddiki, B., and Kim, Y.S. (1995) *Cancer Res.* **55**, 3659–3663
12. Solter, D., and Knowles, B.B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5565–5569
13. Fukushi, Y., Hakomori, S.-I., and Shepard, T. (1984) *J. Exp. Med.* **159**, 506–520
14. Fukushi, Y., Nudelman, E., Levery, S.B., Hakomori, S.I., and Rauvala, H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10511–10517
15. Fukushi, T., Kannagi, R., Hakomori, S.-I., Shepard, T., Kulander, B.G., and Singer, J.W. (1985) *Cancer Res.* **45**, 3711–3717
16. Fukushi, Y., Orikasa, S., Shepard, T., and Hakomori, S.-I. (1986) *J. Urol.* **135**, 1048–1056
17. Fukushi, Y., Ohtani, H., and Orikasa, S. (1989) *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 352–358
18. Zenita, K., Kirihata, Y., Kitahara, A., Shigeta, K., Higuchi, K., Hirashima, K., Murachi, T., Miyake, M., Takeda, T., and Kannagi, R. (1988) *Int. J. Cancer* **41**, 344–349
19. Inufusa, H., Kojima, N., Yasutomi, M., and Hakomori, S. (1991) *Clin. Expl. Metastasis* **9**, 245–257
20. Ogawa, J.-I., Sano, A., Koide, S., and Shohtsu, A. (1994) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **108**, 329–336
21. Sakamoto, M., Furukawa, K., Cordon-Cardo, C., Yin, B.W.T., Rettig, W.J., Oeitgen, H.F., Old, L.J., and Lloyd, K.O. (1986) *Cancer Res.* **46**, 1553–1561
22. Yuan, M., Itzkowitz, S.H., Ferrell, L.D., Fukushi, Y., Palekar, A., Hakomori, S.-I., and Kim, Y.S. (1987) *J. Natl. Cancer Inst.* **78**, 479–488
23. Hoff, S.D., Matsushita, Y., Ota, D.M., Cleary, K.R., Yamori, T., Hakomori, S. and Irimura, T. (1989) *Cancer Res.* **49**, 6883–6888
24. Hanisch, F.-G., Hanski, C., and Hasegawa, A. (1992) *Cancer Res.* **52**, 3138–3144
25. Hanski, C., Bornhoeft, G., Topf, N., Hermann, U., Stein, H., and Riecken, E.O. (1990) *J. Clin. Pathol.* **43**, 379–385
26. Matsusako, T., Muramatsu, H., Shirahama, T., Muramatsu, T., and Ohi, Y. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1218–1222
27. Nishida, K., Yamamoto, H., Ohtsuki, T., Matsuba, M., Mukai, S., Naito, Y., Yoshikawa, T., and Kondo, M. (1991) *Cancer* **68**, 111–117
28. Lenkei, R., Björk, O., Öst, Å., and Biberfeld, P. (1991) *Leukemia Res.* **15**, 189–194
29. Springer, T.A., and Lasky, L.A. (1991) *Nature* **349**, 196–197
30. McEver, R.P. (1991) *Thromb. Haemostasis* **66**, 80–87
31. Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., and Brandley, B.K. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 895–902
32. Rosen, S.D., and Bertozzi, C.R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 663–673
33. McEver, R.P., Moore, K.L., and Cummings, R.D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11025–11028
34. Lauri, D., Needham, L., Martin-Padura, I. and Dejana, E. (1991) *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 1321–1324
35. Zaifert, K. and Cohen, M.C. (1993) *Clin. Immun. Immunopathol.* **68**, 51–56
36. Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., and Kannagi, R. (1993) *Cancer Res.* **53**, 354–361
37. Sawada, R., Tsuboi, S., and Fukuda, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1425–1431
38. Ware, J.A., and Heistad, D.D. (1993) *N. Engl. J. Med.* **328**, 628–635
39. Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y.-M., Sajer, S.A., and Furie, B. (1992) *Nature* **359**, 848–851
40. Nicolson, G.L. (1989) *Curr. Opinion Cell Biol.* **1**, 1009–1019
41. Stults, C.L.M., Sweeley, C.C., and Macher, B.A. (1989) *Methods Enz.* **179**, 167–214
42. Yang, H.-J. and Hakomori, S.-I. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1192–1200
43. Fukuda, M.N., Dell, A., Oates, J.E., Wu, P., Klock, J.C., and Fukuda, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 1067–1082
44. Ariga, T., Tao, R.V., Lee, B.-C., Yamawaki, M., Yoshino, H., Scarsdale, N.J., Kasama, T., Kushi, Y., and Yu, R.K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2667–2675
45. Ogiso, M., Irie, A., Kubo, H., Hoshi, M., and Komoto, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6467–6470
46. Breimer, M.E., and Karlsson, K.-A. (1983) *Biochem. Biophysic. Acta* **755**, 170–177
47. Kannagi, R., Nudelman, E., Levery, S.B., and Hakomori, S.-I. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14865–14874
48. Holmes, E.H., Ostrander, G.K., and Hakomori, S.-I. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 3737–3743
49. Holmes, E.H., Ostrander, G.K., and Hakomori, S.-I. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7619–7627
50. Kong, R.K.M., Barrios, A., Knapp, W., and Macher, B.A. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 677–683
51. Abe, K., McKibben, J.M., and Hakomori, S.-I. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11793–11797
52. Karlsson, K.-A., and Larson, G. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 3512–3524

53. Nudelman, E., Levery, S.B., Kaizu, T., and Hakomori, S.-I. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11247–11253
54. Hakomori, S.-I., Nudelman, E., Levery, S.B., and Kannagi, R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 4672–4680
55. Sekine, M., Suzuki, M., Inagaki, F., Suzuki, A., and Yamakawa, T. (1987) *J. Biochem.* **101**, 553–5562
56. Kaizu, T., Levery, S.B., Nudelman, E., Stenkamp, R.E., and Hakomori, S.-I. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11254–11258
57. Rauvala, H. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 7517–7520
58. Spitalnik, S.L., Spitalnik, P.F., Civin, C.I., Ball, E.D., Schwartz, J.F., and Ginsburg, V. (1986) *Exp. Hematol.* **14**, 643–647
59. Multhing, J., Spanbroek, R., Peter-Katalinic, J., Hanisch, F.-G., Hanski, C., Hasegawa, A., Unland, F., Lehmann, J., Tschesche, H., and Egge, H. (1996) *Glycobiology* **6**, 147–156
60. Symington, F.W., Hedges, D.L., and Hakomori, S.-I. (1985) *J. Immunol.* **134**, 2498–2506
61. Cooling, L.L.W., Zhang, D.-Z., Walker, K.E., and Koerner, T.A.W. (1995) *Glycobiology* **5**, 571–581
62. Sawada, M., Takada, A., Ohwaki, I., Takahashi, N., Tateno, H., Sakamoto, J., and Kannagi, R. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 337–347
63. Martensson, S., Due, C., Pahlsson, P., Nilsson, B., Eriksson, H., Zopf, D., Olsson, L., and Lundblad, A. (1988) *Cancer Res.* **48**, 2125–2131
64. Kitagawa, H., Nakada, H., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Tate, S., Inagaki, F., and Yamashina, I. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26541–26545
65. Hasegawa, A., and Kiso, M. (1994) *Methods Enzymol.* **242**, 158–173
66. Kameyama, A., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1991) *J. Carbohydr. Chem.* **10**, 549–560
67. Hasegawa, A., Ando, T., Kameyama, A., and Kiso, M. (1992) *J. Carbohydr. Chem.* **11**, 645–658
68. Hasegawa, A., Uchimura, A., Ishida, H., and Kiso, M. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1091–1094
69. Terada, T., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1994) *Carbohydr. Res.* **259**, 201–218
70. Yoshida, M., Uchimura, A., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1993) *Glycoconjugate J.* **10**, 3–15
71. Hasegawa, A., Ando, T., Kato, M., Ishida, H., and Kiso, M. (1994) *Carbohydr. Res.* **257**, 67–80
72. Lawrence, M.B., Bainton, D.F., and Springer, T.A. (1994) *Immunity* **1**, 137–145
73. Alon, R., Feizi, T., Yuen, C.-T., Fuhlbrigge, R.C., and Springer, T.A. (1995) *J. Immunol.* **154**, 5356–5366
74. Frenette, P.S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7450–7454
75. Karakantza, M., Gibson, F.M., Cavenagh, J.D., Ball, S.E., Gordon, M.Y., and Gordon-Smith, E.C. (1994) *Br. J. Haematol.* **86**, 883–886
76. Shitara, K., Hanai, N., and Yoshida, H. (1987) *Cancer Res.* **47**, 1267–1272
77. Macher, B.A. and Beckstead, J.H. (1990) *Leukemia Res.* **14**, 119–130
78. Robinson, N.E., de Vries, T., Davis, R.E., Stults, C.L.M., Watson, S.R., van den Eijnden, D.H., and Macher, B.A. (1994) *Glycobiology* **4**, 317–326
79. Stults, C.L.M., and Macher, B.A. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 125–133
80. Sasaki, K., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hannai, N., and Nishi, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14730–14737
81. Yago, K., Zenita, K., Ginya, H., Sawada, M., Ohmori, K., Okuma, M., Kannagi, R., and Lowe, J.B. (1993) *Cancer Res.* **53**, 5559–5565
82. Clarke, J.L., and Watkins, W.M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10317–10328
83. Kannagi, R., Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Cochran, N.A., Yokochi, T., Stamatoyannopoulos, G., and Hakomori, S.-I. (1983) *Blood* **62**, 1230–1241
84. Andersson, L.C., Milsson, K., and Gahmberg, C.G. (1979) *Int. J. Cancer* **23**, 143–147
85. Lozzio, B.B., Lozzio, C.B., Bamberger, E.G., and Feliu, A.S. (1981) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **166**, 546–550
86. Tetteroo, P.A.T., Massaro, F., Mulder, A., Shreuder-van Gelder, R., and von dem Borne, A.E.G.Jr. (1984) *Leukemia Res.* **8**, 197–206
87. Schweitzer, K.M., Drager, A.M., van der Valk, P., Thijsen, S.F.T., Zevenbergen, A., Theijssmeijer, A.P., van der Schoot, C.E., and Langenhuijsen, M.M.A.C. (1996) *Am. J. Pathol.* **148**, 165–175
88. Fukushi, Y., Nudelman, E., Levery, S.B., and Hakomori, S.-I. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 4681–4685
89. Tyrell, D., James, P., Rao, N., Foxall, C., Abbas, S., Dasgupta, F., Nashed, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Asa, D., Kidd, J., and Brandley, B.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10372–10376
90. Brandley, B.K., Kiso, M., Abbas, S., Nikrad, P., Srivasatava, O., Foxall, C., Oda, Y., and Hasegawa, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 633–639
91. Larsen, G.R., Sako, D., Ahern, T.J., Shaffer, M., Erban, J., Sajer, S.A., Gibson, R.M., Wagner, D.D., Furie, B.C., and Furie, B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11104–11110
92. Ito, M., and Yamagata, T. (1989) *Methods Enzymol.* **179**, 448–496
93. Ito, M., Ikegami, Y., Tai, T., and Yamagata, T. (1993a) *Eur. J. Biochem.* **218**, 637–643
94. Ito, M., Ikegami, Y., and Yamagata, T. (1993b) *Eur. J. Biochem.* **218**, 645–649
95. Inokuchi, J. and Radin, N.S. (1987) *J. Lipid Res.* **28**, 565–571
96. Zacharias, C., van Echten-Deckert, G., Plewe, M., Schmidt, R.R., and Sandhoff, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13313–13317
97. Kan, C.-C. and Kolesnick, R.N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9663–9667
98. Ohmori, K., Yoneda, T., Ishihara, G., Shigeta, K., Hirashima, K., Kanai, M., Itai, S., Sasaoki, T., Arii, S., Arita, H., and Kannagi, R. (1989) *Blood*, **74**, 225–261
99. Pinola, M., Renkonen, R., Majuri, M.-L., Tiisala, S., and Saksela, E. (1994) *J. Immun.* **152**, 3586–3594
100. Ohmori, K., Takada, A., Yoneda, T., Buma, Y., Hirashima, K., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., and Kannagi, R. (1993a) *Blood* **81**, 101–111
101. Ohmori, K., Takada, A., Ohwaki, I., Takahashi, N., Furukawa, Y., Maeda, M., Kiso, M., Hasegawa, A., Kannagi, M. and Kannagi, R. (1993b) *Blood* **82**, 2797–2805
102. Picker, L.J., Michie, S.A., Rott, L.S., and Butcher, E.C. (1990) *Am. J. Pathol.* **136**, 1053–1068
103. Picker, L.J., Kishimoto, T.K., Smith, C.W., Warnock, R.A., and Butcher, E.C. (1991) *Nature* **349**, 796–799
104. Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., and Bainton, D.F. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 880–886
105. Mollicone, R., Caillard, T., LePendu, J., Francois, A., Sansonetti, N., Villaroya, H., and Oriol, R. (1988) *Blood* **71**, 1113–1119
106. Moore, K.L., Varki, A., and McEver, R.P. (1991) *J. Cell Biol.* **112**, 491–499
107. Parmentier, S., McGregor, L., Catimel, B., Leung, L.L.K., and McGregor, J.L. (1991) *Blood* **77**, 1734–1739

108. Yen, T., Walsh, J.D., Pejler, G., Berndt, M.C., and Geczy, C.L. (1993) *Br. J. Haematol.* **83**,259-269
109. Isenberg, W.M., McEver, R.P., and Bainton, D.F. (1987) *Blood* **70**, 351a (abstract)
110. Weinfeld, H.M., Koerner, T.A.W. and Spitalnik, S.L. (1985) *Transfusion* **25**, 460 (abstract)
111. DeFrees, S.A., and Gaeta, F.C.A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7549-7550
112. Gillard, B.K., Jones, M.A., and Marcus, D.M. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 435-445
113. Tao, R.V.P., Kovathana, N., and Shen, Y.W. (1983a) *Curr. Eye Res.* **2**, 427-434
114. Tao, R.V.P., Shen, Y.W., Kovathana, N., and Cotlier, E. (1983b) *Biochim. Biophys. Acta* **753**, 89-96
115. Ogiso, M., Irie, A. Kubo, Komoto, M., Matsuno, T., Koide, Y., and Hoshi, M. (1993) *J. Biol.Chem.* **268**, 13242-13247
116. Ogiso, M., Okinaga, T., Ohta, M., Komoto, M., and Hoshi, M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1256**, 166-174
117. Ogiso, M., Komoto, M., Okinaga, T., Koyota, S., and Hoshi, M. (1995) *Exp. Eye Res.* **60**, 317- 323
118. Ogiso, M., Ohta, M., Okinaga, T., Hoshi, M., Komoto, M., Asano, K., and Takehana, M. (1994) *Glycobiology* **4**, 375-382
119. Eggens, I., Fenderson, B., Toyokuni, T., Dean, B., Stroud, M., Hakomori, S.-I. (1989) *J. Biol.Chem.* **264**, 9476-9484
120. Holgersson, J., Jovall, P.-A., and Breimer, M.E. (1991) *J. Biochem.* **110**, 120-131
121. Spitalnik, S.L., Spitalnik, P.F., Dubois, C., Mulshine, J., Magnani, J.L., Cuttitta, F., Civin, C.I., Minna, J.D., Ginsburg, V. (1986) *Cancer Res.* **46**, 4751-4755
122. Kiguchi, K., Takamatsu, K., Tanaka, J., Nozawa, S., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1992) *Cancer Res.* **52**, 416-421
123. Saito, S., Orikasa, S., Ohyama, C., Satoh, M., and Fukushima, Y. (1991) *Int. J. Cancer* **49**, 329- 334
124. Narimatsu, H. (1994) *Microbiol. Immunol.* **38**, 489-504
125. Macher, B.A., Holmes, E.H., Swiedler, S.J., Stults, C.L.M., and Srnka, C.A. (1991) *Glycobiology* **1**, 577-574
126. Field, M.C., and Wainwright, L.J. (1995) *Glycobiology* **5**, 463-472
127. Kukowska-Latallo, J.F., Larsen, R.D., Nair, R.P., and Lowe, J.B. (1990) *Genes Dev.* **4**, 1288-1303
128. Lowe, J.B., Kukowska-Latallo, J.F., Nair, R.P., Larsen, R.D., Marks, R.M., Macher, B.A., Kelly, R.J., and Ernst, L.K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17467-17477
129. Goeltz, S.E., Hession, C., Goff, D., Griffiths, B., Tizard, R., Newman, B., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1990) *Cell* **63**, 1349-1356
130. Kumar, R., Potvin, B., Muller, W.A., and Stanley, P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21777-21783
131. Weston, B.W., Nair, R.P., Larsen, R.D., and Lowe, J.B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4152-4160
132. Koszdin, K.L., and Bowen, B.R. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 152-157
133. Weston, B.W., Smith, P.L., Kelly, R.J., and Lowe, J.B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24575-24584
134. Natsuka, S., Gersten, K.M., Zenita, K., Kannagi, R., and Lowe, J.B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16789-16794
135. Kitagawa, H. and Paulson, J.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1394-1401
136. Basu, M., Hawes, J.W., Li, Z., Ghosh, S., Khan, F.A., Zhang, B.-J., and Basu, S. (1991) *Glycobiology* **1**, 527-535
137. Holmes, E.H., Hakomori, S.-T., and Ostrander, G.K. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15649-15658
138. Nakamura, M., Tsunoda, A., Sakoe, K., Gu, J., Nishikawa, A., Taniguchi, N., and Saito, M.(1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 23507-23514
139. Hu, J., Stults, C.L.M., Holmes, E.H., and Macher, B.A. (1994) *Glycobiology* **4**, 251-257
140. Macher, B.A., Buehler, J., Scudder, P., Knapp, W., and Feizi, T. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10186-10191
141. Easton, E., Schiphorst, W.E.C.M., van Drunen, E., van der Schoot, E., and van den Eijnden, D.H. (1993) *Blood* **81**, 2978-2986
142. Akashi, M., Takaku, Nojiri, H., Miura, Y., Nagai, Y. and Saito, M. (1988) *Blood* **72**, 469-479
143. Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S. and Inoue, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11550-11557
144. Hasegawa, A., Kato, M., Ando, T., Ishida, H., and Kiso, M. (1995) *Carbohydr. Res.* **274**, 155-163
145. International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry: Commission on Biochemical Nomenclature (1978) *Biochem. J.* **171**, 21-35

Received on July 24, 1996, accepted on January 10, 1997

Profile of Author

Laura Cooling

An Iowa native, Dr. Cooling studied and received a B.S. in Microbiology and later, an M.D. degree from the University of Iowa. Following graduation from medical school, Dr. Cooling completed a residency in clinical pathology and a fellowship in transfusion medicine/blood banking at the University of Iowa Hospitals and Clinics. Recently, Dr. Cooling completed a masters degree studying the glyco-

sphingolipids of human blood platelets. Active research efforts at this time include studies of glycosphingolipid polymorphisms in normal platelet donors and their effect on the platelet transfusion response, immune and nonimmune thrombocytopenia; changes in platelet glycoconjugates in myeloproliferative disorders; and glycosphingolipid differentiation during thrombopoiesis and myelo-poiesis. The laboratory is also involved in research pertaining to *E. coli*-associated HUS and parvovirus B 19. Dr. Cooling is currently a clinical associate at the Univ. of Iowa Hospitals and spends her spare time studying for boards (and looking for a job!).