

2007(8085A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

細胞を血行性脳実質内動員する機序の解析および
そのアルツハイマー病治療への応用に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 内村 健治

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
細胞を血行性脳実質内動員する機序の解析および そのアルツハイマー病治療への応用に関する研究 内村 健治	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 6
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 7

別添3

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業) 総括研究報告書

細胞を血行性脳実質内動員する機序の解析および
そのアルツハイマー病治療への応用に関する研究

主任研究者 内村 健治 国立長寿医療センター 研究所 室長

研究要旨: アルツハイマー病を含む神経変性疾患の予防・治療法は、血液脳関門の存在などにより大きく制限されている。本研究は血液および骨髄由来細胞の脳血管外遊走と脳内への移入機構を単球由来ミクログリア、マウスホーミングアッセイおよびマウス生体内ビデオ蛍光顕微鏡法により明らかにする。さらに、遺伝子・薬剤等を搬送する細胞を脳内へ送り込む機序を開発することにより、アルツハイマー病の新しい予防・治療法技術基盤を提供することを目的とする。本研究者は本研究一年目に全く新規な血管外遊走分子機序を発見した(Veerman et al, Nature Immunol, 2007)。また、本研究者はマウスミクログリア細胞株(MG5)および骨髄単球細胞のマウス個体内における脳移行性を検討するアッセイ法を確立した。フローサイトメリーによりMG5が血管外遊走時に働くと予想される細胞表面分子やセレクチンリガンド糖鎖の発現を明らかにした。蛍光標識MG5またはGFP発現骨髄単球細胞を野生型マウスの静脈より注入しその脳内における動態を生体内ビデオ蛍光顕微鏡により観察するシステムを設置した。その結果、MG5は注入後1時間以内で脳内血管内腔でローリングし血管内腔に強く接着することが明らかになった。今後、当該結果をアルツハイマー病モデルマウスを使用した解析へ展開する。また、全く別の観点からA β 沈着体の凝集部位に多硫酸化されたヘパラン硫酸構造が選択的に発現することを本研究者は発見した。この構造を分解する細胞外スルファターゼをアルツハイマー病発症の物質的基盤であるA β の重合・沈着を停滞させる分子の候補として解析を進めている。

A. 研究目的

高齢化社会を迎えた我が国においてアルツハイマー病は増加の一途をたどっており、その治療法の確立は国民が強く求めるものとなっている。アルツハイマー病の予防・治療法の開発は複数の介入点から様々な試みがなされている。しかしながら、その妨げになっている問題の一つは薬剤や遺伝子等の中枢神経組織内への効率的な動員法が

確立していないことである。三年を通じた本研究目的は脳移行性細胞を利用した細胞医薬によりこの問題を解決し、アルツハイマー病新規治療法の開発を目指すことである。血行性に細胞が末梢組織へ移入する現象は細胞間分子作用で厳密に制御されている(von Andrian & Mempel, Nat Rev Immunol 2003)。本研究者は以前、白血球の一種であるリンパ球細胞の血管から組織

内へ移入する際の分子メカニズムを解明した実績をもつ。本研究は本研究者がこれまでに得た知識および技術を発展させ、未だ不明な中枢神経組織である脳内への血行性細胞移入の分子機序を明らかにすること、さらに得られた技術をアルツハイマー病の新規治療技術の開発へ応用することを目的とする。

B. 研究方法

これまでに、脳内免疫担当細胞であるマイクログリアや骨髄単球由来細胞が中枢神経系に特異的な血液脳関門を通過することが報告されている(Simard et al., *Neuron*, 2006)。これらの細胞は、動脈投与または静脈投与により脳内へ浸潤・生着する。詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究は、以前本研究者が全身の免疫担当細胞であるリンパ球が血管から標的末梢組織内へ血管外遊走する際の分子メカニズムを免疫学的立場から明らかにした実績(Uchimura et al., *Nature immunol* 2005)をもとに未だ不明な脳血管外遊走と脳内移行分子機序を個体レベルで解析する。本研究では末梢組織細胞浸潤解析において既に確立したホーミングアッセイと生体内ビデオ蛍光顕微鏡法を脳内に応用する。

本研究は主任研究者である内村が研究総括、実験計画の立案および遂行を行う。研究協力者である細野友美博士研究員リサーチレジデントは生体内ビデオ蛍光顕微鏡を用いた解析を行う。ホサインモトラブ博士研究員リサーチレジデントは生化学的解析、フローサイトメトリーを用いた解析、脳内搬送遺伝子の解析を担当する。

平成19年度はトランスウェルアッセイを発

展させマウス脳血管内皮細胞株bEnd.3の細胞層をマイクログリア細胞株(MG5)を対照とし、マイクログリアと同じ造血細胞種由来のマウス骨髄単球が通過するかどうかをin vitroで確認した。骨髄単球はGFPトランスジェニックマウスの骨髄より調整した。一方、MG5および骨髄単球が野生型マウスの脳実質内へ動員されるかどうかをホーミングアッセイを用いてin vivoで検討した。脳移行時に働くと予想される分子(セレクチンリガンド糖鎖、PSGL-1、ケモカイン受容体、インテグリン)の生化学的解析をそれら分子に対する抗体やフローサイトメトリーを使用し検討した。生体内ビデオ蛍光顕微鏡を本研究室に設置し脳移行性マイクログリアおよび骨髄単球細胞のマウス脳内におけるライブイメージング解析を行った。

平成20年度は脳移行性を示す骨髄細胞のマウス脳内での動態を生体内ビデオ蛍光顕微鏡法で観察・解析する。他の末梢組織でみられるローリングや接着の機構が中枢神経系でも観察されるか、または全く新規な様式を脳移行性細胞が示すのかを明らかにする。中枢神経組織の血管にみられる血液脳関門(BBB)の機能はマウスに百日咳毒素(PT)やマンニトールを投与しその機能を低下させる。脳移行性の違いを成体マウスと加齢マウスとの間で比較し老化と移行性の関連を検討する。血液中を流れる脳移行性細胞をBBBの機能低下を付随させ脳血管内で効率よく接着、血管外遊走させる方法を確立する。上記解析結果より得られた知見をもとにマウス脳内移行のための最適な条件を確立する。PTやマンニトール以外の分子(TNF- α など)の有用性を検討する。また、脳移行性

細胞がアルツハイマー病発症モデル加齢マウスの脳内においてどのような動態を示すかを野生型加齢マウスと比較し検討する。使用するモデルマウスはTg2576ヒトアミロイド前駆体タンパク質遺伝子トランスジェニックマウスおよびJ20アルツハイマー病モデルマウスである。

平成21年度は神経毒性をもつ重合A β の除去を亢進させる遺伝子を発現する脳移行性細胞を血行性にアルツハイマー病モデルマウス脳内へ送り込む。脳内へ移入する細胞(骨髄単球を候補)にウィルスベクター発現システムを用いてA β 重合を阻止する可能性がある細胞外スルファターゼ遺伝子(我々が発見し平成19年度より平行して解析している)、またはA β 沈着分解酵素(アンギオテンシン変換酵素が候補)遺伝子を恒常的に発現させ、アルツハイマー病モデルマウスに血行性に投与する。投与後経時的に脳内における重合A β の沈着を観察する。アルツハイマー病の病因の一つとして考えられる神経毒性をもった重合A β の沈着を阻止または除去することがこの方法により可能であるかどうかを検討する。酵素遺伝子DNAおよびウィルス発現システムは本研究部で使用可能である。

(倫理面への配慮)

本申請研究で実施する研究はすべて当該研究施設の倫理委員会の承認を受けて行われた。動物を用いる際には動物愛護に努め当該研究施設の実験動物委員会の承認を得て、その定める規則に則って行われた。遺伝子組み替え生物の使用に当たっては、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守した。

C. 研究結果

平成19年度は新規血管外遊走の分子機序を発見することに成功した(Veerman et al, Nature Immunol, 2007)。この際に用いたトランスウェルアッセイを発展させマウス脳血管内皮細胞株bEnd.3の細胞層をMG5ミクログリア細胞株およびマウス骨髄単球が通過するかどうかを検討した。このアッセイはさらに詳細な実験結果を解析中である。一方、ミクログリアおよび骨髄単球が野生型マウスの脳実質内へ動員されるかどうかをホーミングアッセイを用いて検討した。PTで処理した野生型マウスの脳内へMG5および骨髄単球が良い移行性を示す知見を得た。マンニトールによる前処理は効果が見られなかった。MG5は血管外遊走時に働くと予想される細胞表面分子、L-セレクトリンやP-、E-セレクトリンリガンドを発現していることが明らかになった。CFSE蛍光色素ラベルしたMG5を野生型マウスの静脈より移植し1時間後の脳、脾臓、リンパ節における分布をホーミングアッセイにより検討した結果、脳および脾臓内に組織動員されるがリンパ節には動員されないことが明らかとなった。生体内ビデオ蛍光顕微鏡解析の結果、蛍光標識MG5の脳血管内腔における強固な接着が移植後1時間で観察され、一部のMG5は血管内ローリングを示した。現在、さらに骨髄単球を対象として生体内ビデオ蛍光顕微鏡解析の最適条件の検討をしている。

また平成19年度には我々のアルツハイマー病モデルマウス脳の組織化学解析からヘパラン硫酸糖鎖の多硫酸化ドメインが選択的にA β 沈着部位に局在していることが明らかとなった。

D. 考察

マウスミクログリア細胞株(MG5)に発現する細胞表面L-セレクトリンやP-, E-セレクトリンリガンドが実際脳内でも機能していることが強く予想された。脳内血管ではL-セレクトリンのリガンドを認識する抗体により染色されなかったことからMG5細胞のローリングに働く分子はL-セレクトリンではなく、P-, E-セレクトリンリガンドであると予想された。これらの認識分子であるP-セレクトリン、E-セレクトリンの脳内血管における発現を組織染色で検討する必要がある。ホーミングアッセイの結果MG5や骨髄単球が脳内に蓄積することは明らかとなったが血管外遊走を効率良く検討するため移植する野生型レシピエントマウスの最適条件検討をさらに行う必要があると思われる。移植前にマウスをPTで前処理することにより血液脳関門機能を低下させる方法を改良しTNF- α などの有用性も検討する。ミクログリア細胞株蛍光色素代謝ラベルする方法を確立することに成功し、また生体内ビデオ蛍光顕微鏡法で生きたままのマウス脳内における細胞動態の観察が可能になったことは非常に大きな研究の進展である。また、ヘパラン硫酸糖鎖多硫酸化ドメインのA β 沈着部位における局在を明らかにした結果は、この糖鎖の構造変化によりA β の重合が制御できる可能性を示唆する発展性のある重要な知見である。

E. 結論

マウスミクログリア細胞株および骨髄単球を用いて本解析技術をさらに最適化することにより詳細な血行性脳実質内細胞動員メカニズムを解析することが可能であることが明

らかになった。この成果をさらに老齢マウス、アルツハイマー病モデルマウスを対象とした研究へ今後応用する。一方、A β 重合とヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの相互関係を詳細に解析する事も今後継続する。

H. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Veerman, K.M., Williams M.J., Uchimura, K., Singer, M.S., Merzaban, J.S., Naus S., Carlow, D.A., Owen, P., Rivera-Nieves, J., Rosen, S.D. and Ziltener, H.J. Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs. *Nature Immunol.*, 8, 532-539 (2007)

内村健治 (2007) リンパ球ホーミングとセレクトリンリガンド糖鎖 *実験医学* 25巻、7(増刊)、57-63

2. 学会発表

Kenji Uchimura; Md. Motarab Hossain; Durwin Tsay; Guido J. Jenniskens; Steven D. Rosen
Cell surface expression of heparan sulfate epitope regulated by Sulfs, extracellular endosulfatases

Annual meeting of Glycobiology 2007, Boston, USA, Nov 13, 2007

Hanayo Arata-Kawai; Kenji Uchimura;

Steven D Rosen

Role of the sulfotransferase, GlcNAc6ST-2,
in a mouse model of rheumatoid arthritis

Annual meeting of Glycobiology 2007,
Boston , USA, Nov 14, 2007

Hanayo Arata-Kawai; Kenji Uchimura; David
M Lee; Steven D Rosen

The role of sulfotransferases in autoimmune
inflammatory arthritis

2007 Annual Scientific Meeting of American
College of Reumatology, Boston , USA, Nov
10, 2007

内村健治

「リンパ球ホーミングにおける血管外遊走メ
カニズム:細胞表面セレクトインリガンド糖鎖」
平成19年度名古屋大学医学部分子生物学
セミナー

名古屋大学医学部、名古屋、2008年1月2
4日

内村健治

「セレクトインリガンド糖鎖とリンパ球血管外遊
走メカニズム」

第12回Nagoyaアポトーシス研究会

名古屋大学医学部、名古屋、2008年2月2
8日

内村健治

「Cells Exploit Sugar」

第2回ミッドカイン研究会

名古屋大学医学部、名古屋、2008年3月1
3日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含
む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

新聞報道等

内村健治

「細胞移動仕組み解明、毒性物質排除 白
血球治療に期待」

中日新聞 2007年4月3日朝刊

別添4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
内村健治	リンパ球ホーミングとセレクチンリガンド糖鎖	実験医学 (増刊)	25	57-63	2007
Krystle M Veerman, Michael J Williams, Kenji Uchimura, Mark S Singer, Jasmeen S Merzaban, Silvia Naus, Douglas A Carlow, Philip Owen,	Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs	Nature Immunology	8	532-539	2007

研究成果の刊行物・別刷

EXPERIMENTAL MEDICINE

実験医学 増刊

別 刷

羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1 神田三和ビル

TEL 03(5282)1211 FAX 03(5282)1212

E-mail : eigyo@yodosha.co.jp

5. リンパ球ホーミングとセレクトインリガンド糖鎖

内村健治

血液/骨髄液由来の細胞が血行性に末梢組織へ移入するとき、ターゲットとなる組織の血管内において流速を減速することが第一のステップである。この場合、セレクトインとよばれる細胞表面分子とそのリガンド糖鎖の分子相互作用が重要である。リンパ球のリンパ節へのホーミングにおいてはリンパ球表面のL-セレクトインと高内皮細静脈(HEV)内皮細胞に発現するシアリル6-スルホリスX硫酸化糖鎖の分子相互作用が必要であり、炎症部位への白血球の動員には内皮細胞表面上のP-セレクトインおよびE-セレクトインとそれらの白血球表面リガンドが重要である。本稿では、これらセレクトインとそのリガンド糖鎖の最近の知見を紹介する。

はじめに

白血球の一種であるリンパ球にはさまざまな種類が知られている。抗原による感作を受けていないナイーブリンパ球は恒常的にリンパ節や脾臓といった二次リンパ組織へ血行性に動員され、その後リンパ管および胸管を経て再び血液を介して二次リンパ組織へ戻ってくる。この現象はリンパ球ホーミングとして知られ¹⁾、

限られた数のナイーブリンパ球が二次リンパ組織内で効率よく抗原に出会う機会を増やしている。リンパ球のリンパ節ホーミングおよび炎症時における白血球の末梢炎症部位への血行性移入は、多段階の分子シグナルによって厳密に制御されていることが知られている^{2) 3)}。以下に記す多段階モデルは1991年に提唱され現在広く研究者に受け入れられている。すなわち、ターゲットとなる組織の血管内で、血液中を流れる細胞の表面分子はセレクトインとその認識リガンドである血管内皮細胞表面の糖鎖がタンパク質-糖/糖鎖^{*1}の比較的弱い相互作用を利用し血管内皮細胞上でローリングとよばれる現象を示すことで流速を減少させる。

【キーワード&略語】

ホーミング、リンパ球、セレクトイン、糖鎖、硫酸化

GlcNAc6ST : N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase (N-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素)

GlyCAM-1 : glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1

HEV : high endothelial venule (高内皮細静脈)

PNAAd : peripheral node addressin (末梢節アドレスイン)

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

※1 糖/糖鎖修飾

タンパク質の翻訳後修飾の一つである。糖/糖鎖修飾には、加齢やアルツハイマー病などの病気で増加すると言われていた“glycation”とよばれる非酵素的糖化反応(メイラード反応)と“glycosylation”とよばれる酵素的糖鎖付加反応が存在する。本稿で述べる糖/糖鎖は後者の酵素的付加反応によるものであり、それらを担う糖鎖合成酵素、糖鎖修飾酵素は主に細胞のゴルジ体に局在する。

Lymphocyte homing and carbohydrate ligands for selectins

Kenji Uchimura : Section of Pathophysiology and Neurobiology, Department of Alzheimer's Disease Research, National Institute for Longevity Sciences (国立長寿医療センター研究所アルツハイマー病研究部発症機序解析研究室)



図1 MECA-79抗体で染色されたマウスリンパ節のHEV（高内皮細静脈）

成体マウスの末梢リンパ節の凍結切片をMECA-79抗体で染色し蛍光赤（Cy3）で標識した二次抗体で検出した結果、MECA-79抗体は硫酸化されたL-セレクチンリガンド糖鎖を認識する。本文参照。スケールバー：50 μm （巻頭カラー図5参照、文献15より転載）

その後内皮細胞上に提示されたケモカインとローリング細胞上のケモカイン受容体が結合しローリング細胞に活性化シグナルが入る。このシグナルがローリング細胞上のインテグリンを活性化する。インテグリンと内皮細胞上の細胞接着分子とのタンパク質-タンパク質の結合が誘導され、その結果ローリング細胞は内皮細胞に強固に接着する。最終的に細胞は血管内皮細胞層をすり抜けて血管外遊走し組織内へ移入する。本稿ではこの多段階モデルの最初のステップであるセレクチンとそのリガンド糖鎖の相互作用について述べる。ケモカインのシグナル機構およびインテグリンの活性化については総説⁴⁾を読まれることを強く推薦する。

① セレクチン

セレクチンファミリーにはL-セレクチン（CD62L）、P-セレクチン（CD62P）、E-セレクチン（CD62E）の3つのメンバーが存在する。これらセレクチン分子はN末端細胞外領域にカルシウム依存性レクチン様ドメインをもつ。L-セレクチンは多くの白血球の細胞表面で発現され、リンパ球のリンパ節へのホーミングに重要である。P-セレクチンは血小板の顆粒および

内皮細胞のバイベル・パラデー小体^{※2}に存在し、炎症性刺激により数分でそれぞれ細胞表面へ発現される。P-セレクチンのリガンドとして多くの白血球に発現されるPSGL-1が知られている。PSGL-1分子中の硫酸化チロシン残基とそのシアリルルイスX^{※3}構造をもつ糖鎖の複合体をP-セレクチンは認識する⁶⁾。E-セレクチンは炎症性サイトカインにより内皮細胞での発現が誘導されその細胞表面に提示される。E-セレクチンの主な認識決定構造はシアリルルイスX様糖鎖であると考えられる。この糖鎖構造をもつ細胞表面分子は多く報告されており、PSGL-1⁷⁾、CD44⁸⁾が生体内でE-セレクチンリガンド分子として働くことが知られている。

※2 バイベル・パラデー小体

Weibel-Palade Body：血管内皮細胞に観られる細長い顆粒。細胞内小器官の一つ。

※3 シアリルルイスX

ルイスX構造 [Gal β 1-4 (α 1-3Fuc) GlcNAc] とよばれるオリゴ糖にシアリ酸が付加された構造。Sia α 2-3Gal β 1-4 (α 1-3Fuc) GlcNAc⁹⁾。

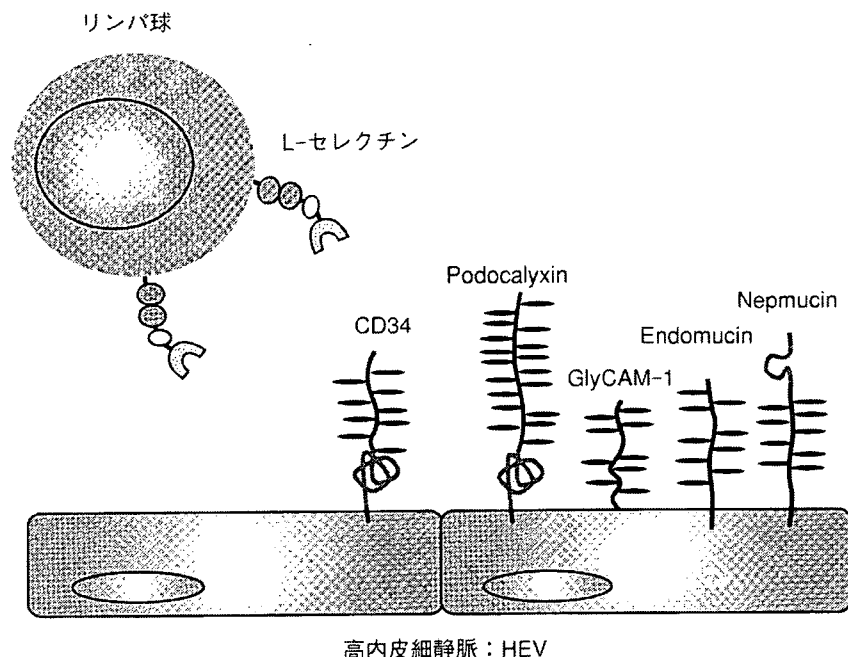


図2 リンパ節のHEVに発現されるL-セレクチンリガンド分子

HEVにおけるL-セレクチンリガンド分子はシアル酸や硫酸基で修飾された糖鎖(—)をもつシアロムチン糖タンパク質である。リンパ球に発現されるL-セレクチンはN末端のレクチンドメイン(∩)を介してこれら分子内のリガンド糖鎖を認識しリンパ球のローリングを媒介する。ここには示さないが腸間膜リンパ節やパイエル板のHEVではMAdCAM-1がL-セレクチンリガンドとして働き、急性炎症の炎症部位血管ではヘパラン硫酸プロテオグリカンが好中球のL-セレクチンリガンドとして作用する

2 セレクチンとリンパ球のローリング

ナイーブリンパ球が末梢のリンパ節へホーミングする際、リンパ球表面のL-セレクチンとリンパ節内の高内皮細静脈 (high endothelial venules: HEV)⁹⁾ (図1) に発現されるその糖鎖リガンドとの分子相互作用によりローリングが媒介される。ナイーブリンパ球はmicrovilli^{※4}を細胞表面に多数保持する。L-セレクチンはmicrovilliに高密度に分布している。血液中を流れるリンパ球はこの突起を介してHEV内皮細胞表面上に繋がろうとする。このリンパ球が血管内で引っかかるような現象はtetheringとよばれる。tetheringの結果、血管内でのローリングが開始され、血流速度(～4,000 μm/秒)で流れるリンパ球は血管内で流速を減速(～10～50 μm/秒)する。一方、炎症時に炎症局所へ白血球が動員される場合、白血球表面上のP-セレクチンリガンド分子/E-セレクチンリガ

ド分子と内皮細胞上のP-セレクチン/E-セレクチンの分子相互作用が起こる。このほかに、白血球-白血球の相互作用が生じる場合があり、この現象は二次的tetheringとよばれL-セレクチンと白血球上に発現するL-セレクチンリガンドが分子相互作用する¹⁰⁾。二次的tetheringではP-セレクチンおよびE-セレクチンのリガンドとして働くPSGL-1がさらにL-セレクチンリガンドとしても機能することが示されている¹¹⁾。最近、ヒトの末梢血に存在するヘルパーメモリーT細胞およびNK細胞が次節で述べるシアリル6-スルホリスX糖鎖構造を細胞表面に発現することが報告された¹²⁾。これらの細胞が末梢組織へ血行性に移入する際、二次的tetheringがL-セレクチンを介して起こるのかもしれない。炎症部位への白血球の動員に深く関与するE-セレクチンおよびP-セレクチンの作用機序および生理機能についてさらに詳しく知りたい方は総説¹³⁾を参考にすることを薦める。以下にナイーブリンパ球のリンパ節ホーミングに関わるL-セレクチン認識糖鎖およびその生合成酵素についてさらに詳しく解説する。

※4 microvilli

微小絨毛とよばれる細胞表面小突起。

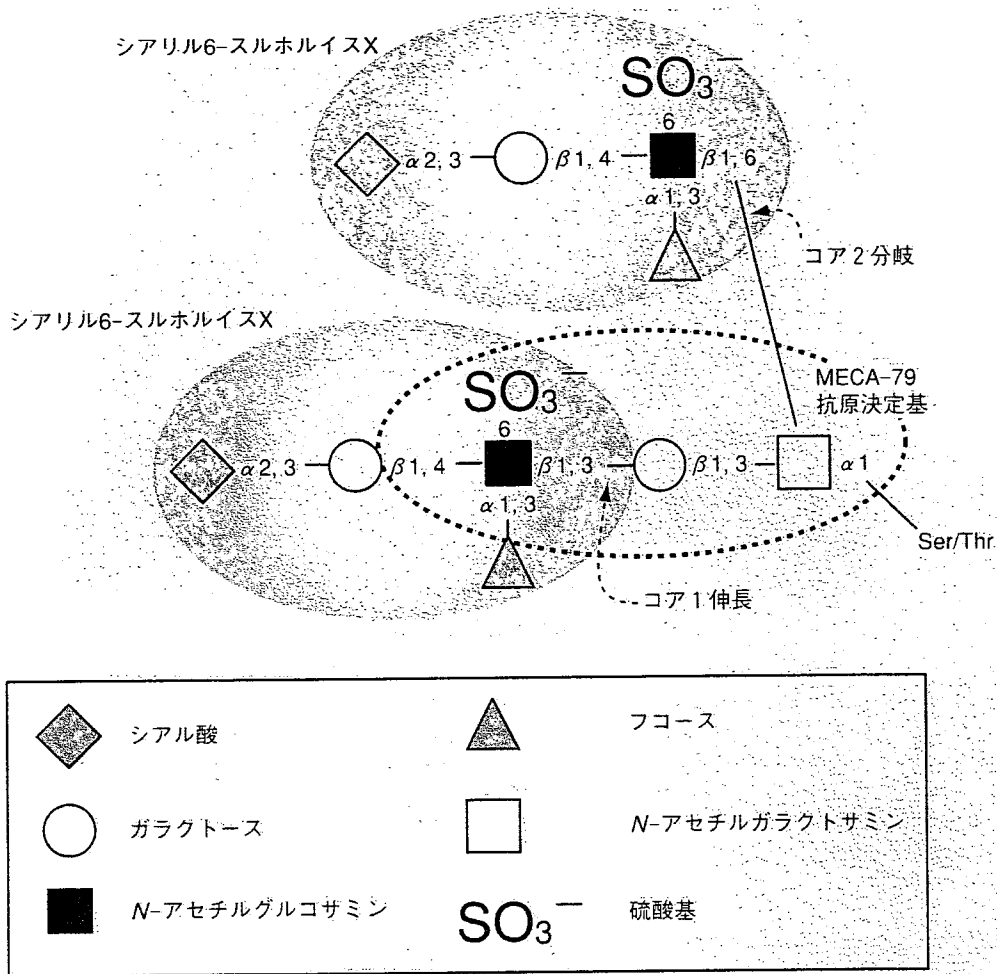


図3 L-セレクチンが認識するシアリル6-スルホルイスX糖鎖

シアリル6-スルホルイスX糖鎖はコア2分岐鎖およびコア1伸長鎖に生合成される。図1で示すMECA-79抗体の抗原決定基は点線で囲まれた部分である。N-アセチルグルコサミン残基の6位の硫酸化はL-セレクチンによる認識およびMECA-79抗体の認識に重要である。

3 HEVに発現するL-セレクチンリガンド糖鎖分子

現在までに明らかにされているリンパ節HEVに発現するL-セレクチンリガンド分子はCD34、Podocalyxin、GlyCAM-1、Endomucin、Nepmucin¹⁴⁾があげられる¹⁵⁾(図2)。これらHEVリガンドは多数のO-結合型糖鎖で修飾され、シアル酸や硫酸基で修飾された糖鎖を多く保持することからシアロムチンタンパク質ともよばれる。これらの分子の糖鎖に含まれるL-セレクチンの認識構造はシアル酸、フコース、硫酸基を含むN-アセチラクトサミン構造(Galβ1-4GlcNAc)を基本骨格とするシアリル6-スルホルイスX^{※5)}構造である(図3)。シアリル6-スルホルイスX構造はコ

ア1伸長構造およびコア2分岐構造の両分岐鎖のキャッピング構造として存在しうる。コア1伸長構造上のシアリル6-スルホルイスX構造はリンパ節HEVを特異的に認識するMECA-79抗体の認識エピトープと重なる(図3)。このことからMECA-79がリンパ球ホーミングを*in vivo*で阻害する“function-blocking”抗体であることが理解できる。MECA-79で認識される分子は伝統的にPNAd(peripheral node addressin, 末梢節アドレッシン)とよばれている。しかしながら、

※5 シアリル6-スルホルイスX

シアリルルイスX構造のGlcNAc残基の6位に硫酸基が付加された構造はシアリル6-スルホルイスXとよばれ、Gal残基の6位に硫酸基が付加された構造はシアリル6'-スルホルイスXとよばれる⁵⁾。

表1 N-アセチルグルコサミン 6-硫酸転移酵素ファミリー¹⁵⁾

酵素名	他の文献における酵素名	遺伝子名	HEVにおける発現	L-セレクチンリガンド合成能
GlcNAc6ST-1	N-アセチルグルコサミン6-硫酸転移酵素 (GlcNAc6ST)	CHST2	++	Yes
GlcNAc6ST-2	高内皮細静脈内皮細胞 N-アセチルグルコサミン 6-硫酸転移酵素 (HEC-GlcNAc6ST), L-セレクチンリガンド硫酸転移酵素 (LSST)	CHST4	+++	Yes
GlcNAc6ST-3	腸管 N-アセチルグルコサミン6-硫酸転移酵素 (I-GlcNAc6ST)	CHST5	-	-
GlcNAc6ST-4	コンドロイチン-6-硫酸転移酵素-2 (C6ST-2)	CHST7	+/-	?
GlcNAc6ST-5	角膜 N-アセチルグルコサミン6-硫酸転移酵素 (C-GlcNAc6ST)	CHST6	-	-

コア2分岐鎖にのみシアリル6-スルホリスX構造をもつL-セレクチンリガンド分子は機能的にはPNAdではあるがMECA-79で認識されないためPNAdと記述することができず、PNAdという用語の使用に関して注意する場合がある。一方、シアリルルイスXを認識せずシアリル6-スルホリスXを特異的に認識するG72およびG152モノクローナル抗体が作製されており¹⁶⁾ 今後これらの抗体の臨床応用が期待される。

4 L-セレクチンリガンド糖鎖合成酵素

1) コア2 N-アセチルグルコサミン転移酵素 (Core 2 GlcNAcT)

O-結合型糖鎖のコア1構造にβ1-6結合でN-アセチルグルコサミンを転移し、コア2分岐を産生するCore 2 GlcNAcTは現在までに3種報告されているが¹⁷⁾、Core 2 GlcNAcT-IがHEVに発現しL-セレクチンリガンド糖鎖の生合成に関わっていることが明らかにされている¹⁸⁾。Core 2 GlcNAcT-I遺伝子欠損マウスではリンパ節GlyCAM-1はコア2分岐型の糖鎖がほぼ消失する¹⁸⁾。

2) コア1伸長 N-アセチルグルコサミン転移酵素 (Core 1 β1-3GlcNAcT)

O-結合型糖鎖のコア1構造にβ1-3結合でN-アセチルグルコサミンを転移しコア1構造を伸長させる酵素はCore1 β1-3GlcNAcTである。この酵素はリンパ節HEVでの発現が確認されている¹⁷⁾。この酵素遺伝子の欠損マウスはMECA-79抗原の発現が消失するこ

とから、生体内では唯一この酵素がHEVのL-セレクチンリガンド糖鎖生合成においてコア1伸長に関わる酵素である可能性が高い¹⁹⁾。

3) シアル酸転移酵素

N-アセチルラクトサミン構造のガラクトース残基にα2-3結合でシアル酸を転移する酵素はST3Gal-III, ST3Gal-IVとST3Gal-VIである²⁰⁾。これら3種の酵素はHEVにおいてL-セレクチンリガンド糖鎖の合成に関わることが予想される。ST3Gal-IVの遺伝子欠損マウスにおいてパイエル板のHEVにおけるL-セレクチンリガンドの機能は変化しないことが報告された²¹⁾。この遺伝子欠損マウスの二次リンパ節は正常であることから、リンパ節HEVでのL-セレクチンリガンド糖鎖のシアル酸合成はST3Gal-VIが補償作用を示しているのではないかと議論されている²¹⁾。

4) フコース転移酵素

コア2分岐のO-結合型糖鎖にα1-3結合でフコースを転移する酵素はFucT-IVおよびFucT-VIIである。FucT-IVおよびFucT-VIIはともにリンパ節HEVで発現を示す²²⁾。FucT-VII遺伝子欠損マウスではリンパ節へのリンパ球ホーミングがほぼ消失することから、生体内HEVではFucT-VIIがFucT-IVに比べて優位にL-セレクチンリガンド糖鎖の生合成に働いていると思われる²³⁾。

5) 硫酸転移酵素

シアリル6-スルホリスX構造内のN-アセチルグルコサミン残基の6位の硫酸化はN-アセチルグルコ

サミン-6-硫酸転移酵素 (GlcNAc6ST) により担われる。現在までにヒトでは5種、マウスでは4種のGlcNAc6STが報告されている¹⁵⁾ (表1)。この中でGlcNAc6ST-1およびGlcNAc6ST-2はリンパ節HEVでの発現とL-セレクトインリガンド合成能が確認されている^{18) 24) 25)}。遺伝子欠損マウスHEVでのMECA-79抗体染色パターンの違い^{24) 25)} ゴルジ体内での局在部位の違い²⁶⁾ および*in vitro*でのそれぞれの酵素基質特異性²⁷⁾ からGlcNAc6ST-1はコア2分岐鎖上のGlcNAc6-硫酸化を効率よく担い、GlcNAc6ST-2はコア1伸長およびコア2分岐両鎖のGlcNAc6-硫酸化を担うことが示唆される。興味深いことにGlcNAc6ST-1はN-結合型糖鎖由来のオリゴ糖に対する酵素活性が強く²⁷⁾、生体内でN-結合型糖鎖内のGlcNAc6-硫酸化を担い生理機能を発揮している可能性が示唆される。GlcNAc6ST-1とGlcNAc6ST-2の両遺伝子欠損マウスでは末梢リンパ節へのホーミングがTリンパ球Bリンパ球ともに減少する²⁸⁾。生体内ビデオ蛍光顕微鏡を使用した解析より、この両遺伝子欠損マウスのリンパ節HEVではリンパ球のローリングは起こるがローリングの速度の減少が不完全であることがわかった²⁹⁾。対照的にFucT-VIIの遺伝子欠損マウスHEVではローリングがほとんど起こらない²³⁾。このことから、フコースの付加はtetheringに重要であるが、硫酸化の付加はtetheringにはあまり寄与せずリンパ球のHEVからのdetachmentを制御していると思われる^{28) 29)}。ローリング速度の不完全な減速によりその後のステップであるケモカイン刺激が受け取れないために、HEV内での接着不全が起こると思われる^{28) 29)}。GlcNAc6ST-1とGlcNAc6ST-2のHEVにおけるシアリル6-スルホルイスX合成能は両遺伝子欠損マウスのHEVに含まれる糖鎖解析による結果からも確認されている³⁰⁾。

5 L-セレクトインリガンド糖鎖と慢性炎症

HEVに発現するL-セレクトインのリガンド糖鎖および硫酸転移酵素は、慢性関節リウマチの滑膜炎部位血管やぜんそく肺における白血球浸潤部位血管にも発現が認められる¹⁵⁾。L-セレクトインとHEVリガンド糖鎖の分子相互作用はリンパ球ホーミングに限らず、慢性炎症における白血球の炎症部位への動員にも関わることが強く示唆され、新たな治療法開発へ応用が期待されている¹⁵⁾。

おわりに

セレクトインリガンドとして働く糖鎖は本稿で詳しく述べたリンパ球のリンパ節へのホーミングに関わるだけでなく、他の血行性末梢組織ホーミングにも関わる。皮膚へホーミングするT細胞はセレクトインリガンド糖鎖合成酵素を発現しP-, E-セレクトインリガンドを細胞表面に発現するが、腸管へホーミングするT細胞はこれらのリガンド発現が抑制され、ホーミング特異性が厳密に制御される³¹⁾。樹状細胞が胸腺へホーミングし自己反応性クローンの除去に関与する場合にはP-セレクトインが重要であり³²⁾、骨髄へホーミングしセントラルメモリーT細胞に抗原提示する場合にはP-, E-セレクトインが重要である³³⁾。また、制御性T細胞がHEVを介してリンパ節へ移入する場合、制御性T細胞はL-セレクトインを発現し、炎症部位へ血行性に移入する場合はP-, E-セレクトインリガンドを発現する³⁴⁾。このようにセレクトインとその糖鎖リガンドの分子相互作用は生体内で多面的に機能し組織特異的な血行性ホーミングに関与しており、今後のさらなる研究の発展が期待されている。

文献

- 1) Gowans, J. L. : Immunol. Today, 17 : 288-291, 1996
- 2) von Andrian, U. H. & Mempel, T. R. : Nat. Rev. Immunol., 3 : 867-878, 2003
- 3) Luster, A. D. et al. : Nat. Immunol., 6 : 1182-1190, 2005
- 4) Kinashi, T. : Nat. Rev. Immunol., 5 : 546-559, 2005
- 5) Kannagi, R. : Curr. Opin. Struct. Biol., 12 : 599-608, 2002
- 6) Sako, D. et al. : Cell, 83 : 323-331, 1995
- 7) Hirata, T. et al. : J. Exp. Med., 192 : 1669-1676, 2000
- 8) Katayama, Y. et al. : J. Exp. Med., 201 : 1183-1189, 2005
- 9) Miyasaka, M. & Tanaka, T. : Nat. Rev. Immunol., 4 : 360-370, 2004
- 10) Eriksson, E. E. et al. : J. Exp. Med., 194 : 205-218, 2001
- 11) Sperandio, M. et al. : J. Exp. Med., 197 : 1355-1363, 2003
- 12) Ohmori, K. et al. : Blood, 107 : 3197-3204, 2006
- 13) Ley, K. & Kansas, G. S. : Nat. Rev. Immunol., 4 : 325-335, 2004
- 14) Umemoto, E. et al. : J. Exp. Med., 203 : 1603-1614, 2006
- 15) Uchimura, K. & Rosen, S. D. : Trends Immunol., 27 : 559-565, 2006
- 16) Mitsuoka, C. et al. : J. Biol. Chem., 273 : 11225-11233,

- 1998
- 17) Yeh, J. C. et al. : Cell, 105 : 957-969, 2001
- 18) Hiraoka, N. et al. : J. Biol. Chem., 279 : 3058-3067, 2004
- 19) Mitoma, J. et al. : Nat. Immunol., in press, 2007
- 20) Harduin-Lepers, A. et al. : Biochimie, 83 : 727-737, 2001
- 21) Sperandio, M. et al. : Eur. J. Immunol., 36 : 3207-3215, 2006
- 22) M'Rini, C. et al. : J. Exp. Med., 198 : 1301-1312, 2003
- 23) Maly, P. et al. : Cell, 86 : 643-653, 1996
- 24) Hemmerich, S. et al. : Immunity, 15 : 237-247, 2001
- 25) Uchimura, K. et al. : J. Biol. Chem., 279 : 35001-35008, 2004
- 26) de Graffenried, C. L. & Bertozzi, C. R. : J. Biol. Chem., 278 : 40282-40295, 2003
- 27) Uchimura, K. et al. : J. Biol. Chem., 277 : 3979-3984, 2002
- 28) Uchimura, K. et al. : Nat. Immunol., 6 : 1105-1113, 2005
- 29) 内村健治 : 実験医学, 24 : 392-395, 2006
- 30) Kawashima, H. et al. : Nat. Immunol., 6 : 1096-1104, 2005
- 31) Iwata, M. et al. : Immunity, 21 : 527-538, 2004
- 32) Bonasio, R. et al. : Nat. Immunol., 7 : 1092-1100, 2006
- 33) Cavanagh, L. L. et al. : Nat. Immunol., 6 : 1029-1037, 2005
- 34) Huehn, J. & Hamann, A. : Trends Immunol., 26 : 632-636, 2005

<著者プロフィール>

内村健治 : 1999年名古屋大学大学院医学研究科博士過程修了(村松 喬教授)。2001年よりカリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部解剖学免疫部門(Steven D. Rosen教授)。日本学術振興会特別研究員DC1, PD, 海外特別研究員。2006年10月より現職。中枢神経組織実質内への血行性細胞動員の分子メカニズムの解明および糖鎖生物学、免疫生化学を応用した神経変性疾患の新規治療法の開発に貢献したい。現在ポスドク、学生さん募集中。
E-mail : arumihcu@nils.go.jp

Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs

Krystle M Veerman^{1,5}, Michael J Williams^{1,5}, Kenji Uchimura^{2,6}, Mark S Singer², Jasmeen S Merzaban^{1,6}, Silvia Naus¹, Douglas A Carlow¹, Philip Owen¹, Jesús Rivera-Nieves³, Steven D Rosen² & Hermann J Ziltener^{1,4}

P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is central to the trafficking of immune effector cells to areas of inflammation through direct interactions with P-selectin, E-selectin and L-selectin. Here we show that PSGL-1 was also required for efficient homing of resting T cells to secondary lymphoid organs but functioned independently of selectin binding. PSGL-1 mediated an enhanced chemotactic T cell response to the secondary lymphoid organ chemokines CCL21 and CCL19 but not to CXCL12 or to inflammatory chemokines. Our data show involvement of PSGL-1 in facilitating the entry of T cells into secondary lymphoid organs, thereby demonstrating the bifunctional nature of this molecule.

Immune surveillance requires that lymphocytes frequently home to secondary lymphoid organs (SLOs) to monitor for foreign antigens presented by antigen-presenting cells. The entry of blood-borne lymphocytes into lymph nodes is restricted to specialized postcapillary venules known as high endothelial venules (HEVs)¹. To exit the blood vessels under the shear force of blood flow, lymphocytes undergo a complex multistep process that involves adhesive and chemotactic events and is characterized by tethering and rolling, followed by cell arrest and extravasation. Interaction of L-selectin on lymphocytes with its low-affinity ligand, 6-sulfo sialyl Lewis X, presented on peripheral node addressin (PNAd) expressed on HEVs, is an essential step in this cascade of events². The relatively slow rolling induced by the L-selectin–PNAd interaction allows the lymphocytes sufficient time to initiate the second critical step in the homing cascade: responding to local chemokines presented on the luminal aspect of HEVs³. The chemokines CCL21 and CCL19 are recognized as being central to this step^{4,5}. Their interaction with the chemokine receptor CCR7, expressed on lymphocytes, induces the third crucial step of the cascade: activation of the integrin LFA-1 on lymphocytes⁶. Interaction of LFA-1 with its ligand ICAM-1 expressed on HEVs results in cell arrest, which is followed by immigration of cells into the lymph nodes^{7,8}. Although naive T cells, central memory T cells and naive B cells all use the same adhesion cascade to enter lymph nodes from the blood¹, some differences do exist in the molecular requirements for homing to SLOs. Homing of naive T cells is most strongly affected

by lack of CCL21 and CCL19 (ref. 5) or CCR7 (ref. 4), whereas homing of naive B cells is also dependent on CXCL12 and CXCR4 (ref. 9) and involves less L-selectin^{10,11}.

Naive T cells that have entered the SLOs and encounter dendritic cells presenting their cognate antigen will undergo clonal expansion, become effector cells and leave the lymphoid organ to eventually re-enter the bloodstream¹. A similar highly regulated multistep adhesion cascade also controls the recruitment of effector cells from the bloodstream to inflamed tissues, with a notable difference being that the first crucial step of rolling and tethering is often mediated by the interaction of appropriately glycosylated P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on the activated lymphocyte with P-selectin and/or E-selectin expressed on activated endothelial cells lining the post-capillary venules of inflamed tissue¹². It was previously thought that distinct arrays of molecules were required for the homing of naive cells to SLOs versus the recruitment of inflammatory cells. However, the known function of PSGL-1 in the recruitment of effector cells to sites of inflammation¹³ has been extended to include homing of thymic progenitors to the thymus¹⁴, thereby establishing the involvement of PSGL-1 in homing in noninflammatory conditions. Here we provide evidence that PSGL-1 is a bifunctional molecule that has, in addition to its established proadhesive function, a chemotaxis-enhancing function required for the efficient homing of resting T cells to SLOs through a mechanism that is independent of the interaction of PSGL-1 with selectins.

¹The Biomedical Research Centre, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada. ²Department of Anatomy and Program in Immunology, University of California, San Francisco, San Francisco, California 94143-0452, USA. ³Digestive Health Center of Excellence, University of Virginia Health Sciences Center, Charlottesville, Virginia 22908 USA. ⁴Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada. ⁵These authors contributed equally to this work. ⁶Present addresses: National Institute for Longevity Sciences, 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, Japan (K.U.), and Harvard Institutes of Medicine, Boston, Massachusetts 02115, USA (J.S.M.). Correspondence should be addressed to H.J.Z. (hermann@brc.ubc.ca).

Received 16 November 2006; accepted 8 March 2007; published online 1 April 2007; doi:10.1038/ni1456

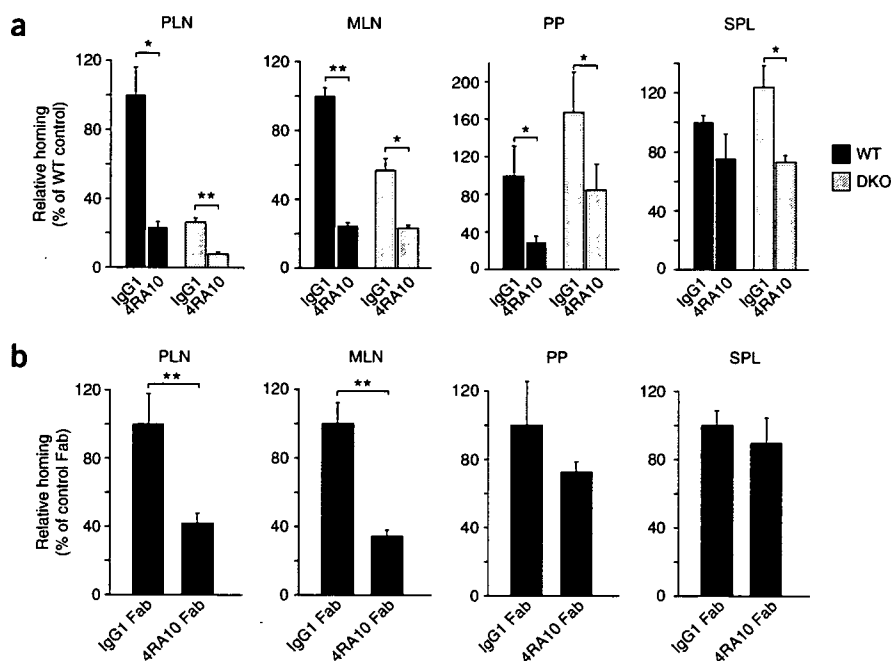


Figure 1 PSGL-1 is required for efficient homing of lymphocytes to SLOs. (a) Flow cytometry to assess homing of lymphocytes after treatment with mAb 4RA10. Cells from CD-1 mouse donors were labeled with CMFDA and treated with mAb 4RA10 or control IgG1 before injection into the tail veins of age-matched C57BL/6 wild-type recipient mice (WT; $n = 3$ mice) or recipient mice lacking both GlcNAc6ST-1 and GlcNAc6ST-2 (DKO; $n = 3$ mice); absolute numbers of CMFDA⁺ cells from recipient peripheral lymph nodes (PLN), mesenteric lymph nodes (MLN), Peyer's patches (PP) and spleen (SPL) were determined 1 h after injection. (b) Flow cytometry to assess homing of lymphocytes after treatment with Fab fragments of mAb 4RA10. Cells from CD-1 mouse donors were labeled with CMFDA and treated with Fab fragments of mAb 4RA10 or IgG1 before injection into the tail veins of C57BL/6 wild-type recipient mice ($n = 3$ mice); CMFDA⁺ cells in recipient SLOs were analyzed 1 h later. Raw data for *in vivo* homing experiments are in **Supplementary Table 1** online. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.001$, mAb 4RA10 versus IgG1 (Student's *t*-test). Data are mean (+ s.d.) percent cells relative to wild-type IgG1 control (a) or wild-type IgG1 Fab control (b); and are representative of at least three independent experiments (a) or are representative of two independent experiments (b).

to the same degree in mice deficient in both sulfotransferases and in wild-type mice ($P < 0.05$), indicating that PSGL-1-dependent homing occurred in the presence or absence of functional PNAd. Monovalent Fab fragments of mAb 4RA10 also inhibited the short-term homing of lymphocytes to SLOs, excluding the possibility that agglutination of lymphocytes or Fc-receptor mediated events were responsible for the reduced homing (Fig. 1b). These Fab fragments inhibited homing to peripheral and mesenteric lymph nodes by $65\% \pm 3.6\%$ ($P = 0.000048$) and $58\% \pm 6\%$ ($P = 0.0009$), respectively. Homing to Peyer's patches and spleen was reduced by $28\% \pm 6\%$ ($P = 0.08$) and $11\% \pm 14.8\%$ ($P = 0.27$), respectively, indicating trends lacking statistical significance.

To further corroborate the idea that PSGL-1 is involved in homing to SLOs, we did competitive short-term homing assays with mixtures of fluorescence-labeled lymphocytes from PSGL-1-null and wild-type mice. The results (Fig. 2a) closely paralleled the mAb inhibition studies. Homing of PSGL-1-null lymphocytes to lymph nodes was $49\% \pm 4.5\%$ less than that of wild-type ($P = 0.000000083$), whereas homing to Peyer's patches was $35\% \pm 10.7\%$ less ($P = 0.000069$) and homing to the spleen was $10\% \pm 4.7\%$ less ($P = 0.0014$). In the peripheral blood, the numbers of wild-type and PSGL-1-null lymphocytes were similar ($P = 0.28$). Control experiments with wild-type lymphocytes showed that the fluorescent labels used did not affect the SLO-homing properties of lymphocytes (Supplementary Fig. 1 online).

To determine whether PSGL-1 conferred on all the main lymphocyte subsets efficient homing to SLOs, we monitored the PSGL-1-dependent homing of B cells and of T cell subsets in the competitive short-term homing assay. Homing of B cells to SLOs was not affected by PSGL-1 status ($P = 0.34$), as the ratio of wild-type to PSGL-1-null B cells that had migrated into peripheral lymph nodes remained identical to the ratio in peripheral blood (Fig. 2b). In contrast to its effect on the homing of B cells, lack of PSGL-1 resulted in a similar lower lymph node-homing efficiency for CD4⁺ and CD8⁺ T cells of both the naive (CD44^{lo}) and central memory (CD44^{hi}) phenotype ($P < 0.0003$).

PSGL-1 effect is independent of selectin interactions

PSGL-1 is known to interact with all three selectins¹⁷. Therefore, one possibility was that PSGL-1 binds to hitherto undetectable amounts of E-selectin and/or P-selectin expressed on HEVs. Alternatively, it was possible that T cells adhering to HEVs through L-selectin–PNAd interactions bind other lymphocytes by secondary tethering through an L-selectin–PSGL-1 interaction¹⁸. To determine whether E-selectin or P-selectin interactions were involved, we did competitive lymphocyte homing experiments with E-selectin-null or P-selectin-null recipient mice, with the expectation that the competitive advantage of wild-type lymphocytes would be lost if the vascular selectin were required. However, the homing advantage of wild-type over

RESULTS

Efficient homing of T cells to SLOs requires PSGL-1

While analyzing parabiotic mice to delineate the function of PSGL-1 in thymic progenitor homing¹⁴, we noted that T cells lacking PSGL-1 expression were approximately 50% less represented in lymph nodes than were T cells expressing PSGL-1, whereas in the spleen, both T cell types were present in comparable numbers. Those findings raised the possibility that T cell-expressed PSGL-1 may be required for the efficient homing of T cells to lymph nodes. To further investigate that issue, we tested whether antibody blockade of PSGL-1 would affect the short-term homing of lymphocytes to SLOs. Treatment of lymphocytes with monoclonal antibody (mAb) 4RA10 to PSGL-1 significantly reduced short-term homing to SLOs (Fig. 1a). Homing to peripheral lymph nodes was reduced by $77\% \pm 16\%$ ($P = 0.0013$), homing to mesenteric lymph nodes was reduced by $75\% \pm 5\%$ ($P = 0.000014$) and homing to Peyer's patches was reduced by $71\% \pm 6.7\%$ ($P = 0.018$); however, homing to spleen was reduced by $25\% \pm 17\%$ and this result did not achieve statistical significance ($P = 0.07$). Mice deficient in the *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases GlcNAc6ST-1 and GlcNAc6ST-2 lack functional PNAd and have much less homing of lymphocytes to lymph nodes, as their HEVs cannot synthesize the sialyl 6-sulfo Lewis^x determinants required for L-selectin binding^{15,16}. Residual homing was inhibited by mAb 4RA10

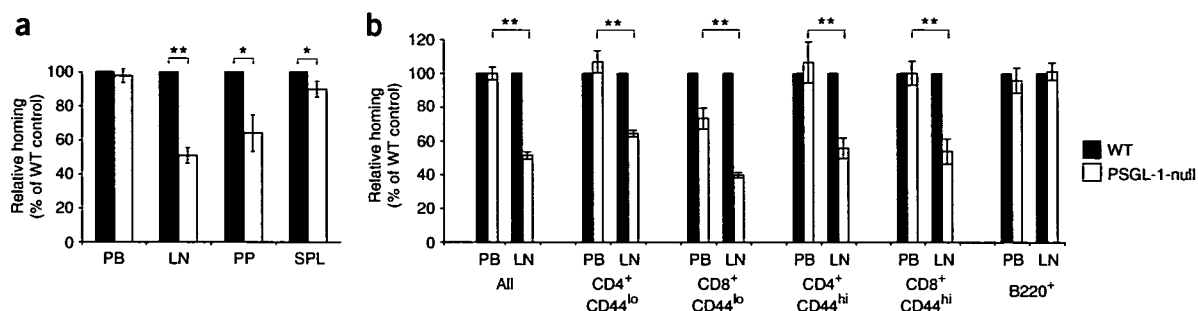


Figure 2 The effect of PSGL-1 on homing to SLOs is restricted to resting T lymphocytes. (a) Competitive *in vivo* short-term homing of lymphocytes from C57BL/6 wild-type and PSGL-1-null mouse donors, labeled with CFDA-SE or CTO and injected intravenously into C57BL/6 wild-type recipient mice; relative numbers of labeled lymphocytes in recipient peripheral blood (PB), lymph nodes (LN), Peyer's patches (PP) and spleen (SPL) were determined by flow cytometry after 1 h. (b) Flow cytometry of lymphocyte subsets among CFDA-SE-labeled C57BL/6 wild-type lymphocytes and GFP-transgenic PSGL-1-null lymphocytes injected intravenously into wild-type recipient mice and assessed 1 h later in recipient peripheral blood and lymph nodes. Raw data for *in vivo* homing experiments are in **Supplementary Table 2** online. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.001$ (Student's *t*-test; a, $n = 5$; b, $n = 4$). Data are mean (+ s.d.) percent cells relative to wild-type and are representative of five (a) or three (b) independent experiments.

PSGL-1-null lymphocytes was maintained in both E-selectin-deficient and P-selectin-deficient recipient mice (**Fig. 3a,b**). These data rule out the possibility of involvement of selectin binding. As the interaction of PSGL-1 with L-selectin and P-selectin is dependent on activity of the core 2 glycosyltransferase 'C2GlcNAcT-I'^{19,20}, we did competitive homing assays with lymphocytes from C2GlcNAcT-I-null and wild-type donors. Both populations homed equivalently to the various SLOs (**Supplementary Fig. 2** online), whereas in competition between lymphocytes lacking C2GlcNAcT-I alone and lymphocytes lacking both C2GlcNAcT-I and PSGL-1 in recipient mice lacking both C2GlcNAcT-I and PSGL-1, the donor cells lacking PSGL-1 remained at a disadvantage (**Supplementary Fig. 2**), challenging the idea of involvement of L-selectin or P-selectin. Finally, competition in E-selectin-null recipient mice between lymphocytes lacking C2GlcNAcT-I alone and lymphocytes lacking both C2GlcNAcT-I and PSGL-1 allowed simultaneous exclusion of the possibility of involvement of all three selectins in the short-term homing assay (**Fig. 3c**). Again, cells lacking PSGL-1 remained at a disadvantage, demonstrating that our inability to show involvement of selectins was not due to selectin redundancy. In summary, it is unlikely that interaction of PSGL-1 with one or more selectins was the mechanism supporting the homing of T cells to SLOs; thus, we explored other possibilities, including the involvement of chemokines.

PSGL-1-null T cells have lower chemotactic responses

The chemokines CCL21 and CCL19 are constitutively produced in lymph nodes²¹ and are presented on the surfaces of HEVs, most likely through an association with glycosaminoglycans⁶. Loss of CCL19 and CCL21 is associated with a defect in the migration of T cells to SLOs, which demonstrates the importance of these chemokines in lymphocyte homing⁵. Studies have shown that a small subset of chemokines, including CCL21 and CCL27, can bind the amino (N) terminus of human PSGL-1 by a tyrosine-sulfation-dependent interaction²². We therefore sought to determine whether lack of PSGL-1 would alter the chemotactic response of lymphocytes to CCL21. In competitive transwell chemotaxis assays, PSGL-1-null lymphocytes migrated about 30% less effectively than wild-type lymphocytes in response to CCL21, and the attenuated chemotactic response was present over a wide range of CCL21 concentrations (**Fig. 4a**; $P < 0.005$). As loss of the abundant and heavily glycosylated molecule PSGL-1 might conceivably alter the chemotactic response of lymphocytes in a non-specific way, we sought to determine whether lack of CD43, a mucin expressed in high abundance on lymphocytes²³, also affected their chemotactic response. Loss of CD43 did not inhibit the response of cells to CCL21; instead, cells lacking CD43 seemed to migrate somewhat more efficiently than wild-type cells (5–8% increase over wild-type; **Fig. 4b**). Because our *in vivo* homing data showed that the effect

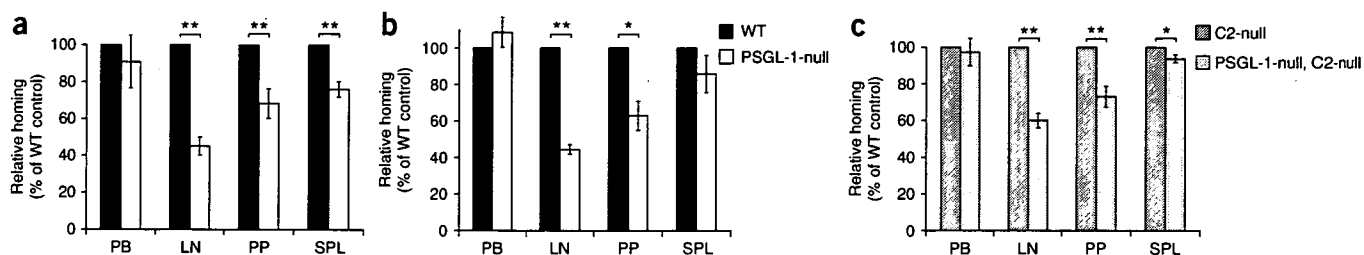


Figure 3 The contribution of PSGL-1 in the homing to SLOs is not dependent on its interaction with selectins. (a,b) Competitive *in vivo* short-term homing of lymphocytes from C57BL/6 wild-type and PSGL-1-null mouse donors, labeled with CFDA-SE or CTO and injected intravenously into E-selectin-null recipients (a; $n = 4$ mice) or P-selectin-null recipients (b; $n = 3$ mice). Lymph nodes, $P = 0.00000052$ (a) or $P = 0.00000029$ (b); Peyer's patches, $P = 0.0002$ (a) or $P = 0.0014$ (b); spleen, $P = 0.000028$ (a) or $P = 0.075$ (b); peripheral blood, $P = 0.24$ (a) or $P = 0.13$ (b), all wild-type versus PSGL-1-null donor (Student's *t*-test). (c) Flow cytometry of the relative number of lymphocytes lacking C2GlcNAcT-I (C2-null) and lymphocytes lacking both PSGL-1 and C2GlcNAcT-I (PSGL-1-null, C2-null), labeled with CFDA-SE or CTO and injected into E-selectin-null recipient mice ($n = 4$ mice), detected in recipient peripheral blood ($P = 0.075$), lymph nodes ($P = 0.0000021$), Peyer's patches ($P = 0.00016$) and spleen ($P = 0.002$). *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Raw data for *in vivo* homing experiments are in **Supplementary Table 3** online. Data are mean (+ s.d.) percent cells relative to wild-type and are representative of at least three independent experiments.