

セレクトインと糖鎖

内村健治¹⁾

KEYWORDS リンパ球, ホーミング, 炎症, 硫酸化

はじめに

リンパ球のリンパ節へのホーミングおよび白血球の末梢炎症部位への血行性移入は、1991年に提唱された多段階の分子シグナルによって厳密に制御されている(図1)^{1,2)}。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は、セレクトインとその認識リガンドである細胞表面糖鎖の蛋白質-糖鎖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呼ばれる現象を示し流速を減少させる(第1段階)。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(第2段階)。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し、内皮細胞上の細胞接着分子との蛋白質-蛋白質の結合を利用し強固な接着を引き起こす(第3段階)。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(第4段階)。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トインとそのリガンド糖鎖について述べる。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他の総説³⁾に詳しい。

セレクトイン

セレクトインファミリーにはL-セレクトイン(CD62L)、P-セレクトイン(CD62P)、E-セレクトイン(CD62E)の3つのメンバーが存在する(表1)。これらセレクトイン分子は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持つ。L-セレクトイ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-セレクトインは血小板の α 顆粒および内皮細胞のWeibel-Palade小体に存在し、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-セレクトインのリガンドとして多くの白血



図1 白血球血行性組織内浸潤の多段階モデル [文献1)より一部改変して引用] セレクトインとその認識リガンドである細胞表面糖鎖の蛋白質-糖鎖分子相互作用は第1段階であるローリングに重要。本文参照。

1) UCHIMURA Kenji 国立長寿医療センター研究所・室長

表1 セレクチンファミリーとその発現様式

分子名	他の文献における命名	遺伝子名	おもな発現細胞	細胞表面発現様式
L-セレクチン (CD62L)	Leu8, gp90MEL, mLHR, TQ-1, Lam-1, Lecam-1, DREG-56	SELL	リンパ球, 単球, 好中球	恒常的に細胞表面に発現 細胞刺激により ADAM17 で shedding される
P-セレクチン (CD62P)	PAD GEM, GMP-140	SELP	血小板, 血管内皮細胞	ヒスタミンなどによりアルファ顆粒(血小板) Weibel-Palade 小体(血管内皮)内に貯留されたものが数分で細胞表面に発現 サイトカイン刺激により数時間で発現
E-セレクチン (CD62E)	ELAM-1	SELE	血管内皮細胞	サイトカイン刺激により数時間で発現

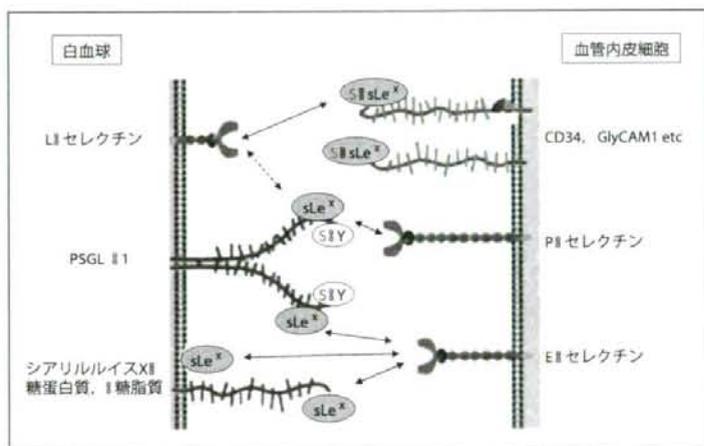


図2 白血球細胞表面および血管内皮細胞表面に発現されるセレクチンとそのリガンド分子
[文献2]より一部改変して引用]
L-セレクチンはシアロムチン糖蛋白質糖鎖の硫酸基修飾されたシアルリルイスX構造(S-sLe^x)を認識する。P-セレクチンはPSGL-1分子の硫酸化チロシン残基(S-Y)とシアルリルイスX(sLe^x)の複合体を認識する。E-セレクチンは主に糖蛋白質や糖脂質糖鎖のシアルリルイスX構造を認識する。

球に発現されるPSGL-1(CD162)が知られている。PSGL-1分子N末端の硫酸化チロシン残基とシアルリルイスX糖鎖¹⁾の複合体をP-セレクチンは認識する(図2)³⁾。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、シアルリルイスX様糖鎖であると考えられる。この糖鎖構造を持つ細胞表面分子は多く報告されており、PSGL-1, CD44, 糖脂質が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(図2)²⁾。

セレクチンと白血球のローリング

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)⁴⁾に発現されるその硫酸化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(図2)。ナイーブリンパ球は微小絨毛突起(mi-

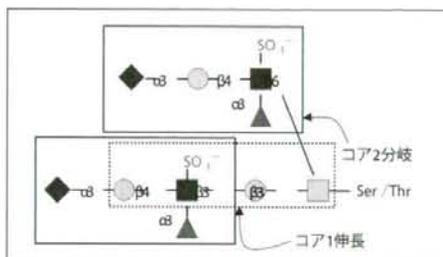


図3 L-セレクトチンが認識するシアリル6-スルホルイス X 糖鎖

シアリルルイス X 構造の N-アセチルグルコサミン残基の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 X⁶(青枠)と呼ばれ、コア2分岐鎖およびコア1伸長鎖に生成される。図4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¹⁰⁾。N-アセチルグルコサミン残基の6位の硫酸化は、L-セレクトチンによる認識および MECA-79 抗体の認識に重要である(紫菱: シアル酸、黄丸: ガラクトース、青四角: N-アセチルグルコサミン、赤三角: フコース、黄四角: N-アセチルガラクトサミン、SO₃⁻: 硫酸基)。

crovilli)を細胞表面に多数保持し、L-セレクトチンはこの突起に高密度に分布している。微小絨毛突起を介して血管内でのローリングが開始されると、血流速度(約 4,000 mm/秒)で流れるリンパ球は血管内で流速を減速(約 100 50 mm/秒)する。一方、炎症時に炎症局所へ好中球、単球または活性化リンパ球が動員される際、それら白血球表面上の PSGL-1 分子、シアリルルイス X 糖鎖分子と内皮細胞上の P-セレクトチン、E-セレクトチンとの間で分子相互作用が起こる(図2)。この他に白血球-白血球の相互作用が生じる場合があり、この現象は P-セレクトチンおよび E-セレクトチンのリガンドとして働く PSGL-1 が、さらに L-セレクトチンリガンドとしても機能することが示されている⁷⁾。炎症部位への白血球の動員に深く関与する P-セレクトチン、および E-セレクトチンの作用機序および生理機能は、他の総説⁸⁾に詳しい。以下にナイーブリンパ球のリンパ節ホーミングにかかわる L-セレクトチン認識糖鎖、およびその合成酵素について詳しく解説する。

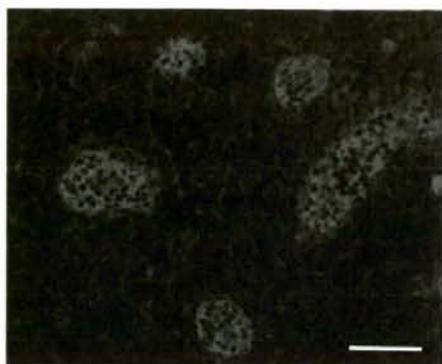


図4 MECA-79 抗体で染色されたマウスリンパ節の HEV

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-セレクト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。

HEV 発現 L-セレクト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-セレクトチンリガンド分子は、CD34、Podocalyx in、GlyCAM-1、Endo mucin、Nepmucin があげられる(図2)⁹⁾。これら HEV リガンドは多数の O-結合型糖鎖で修飾され、シアル酸や硫酸化された糖鎖を多く保持することからシアロムチン糖蛋白質とも呼ばれる。これらの分子の糖鎖に含まれる L-セレクトチンの認識構造は、シアル酸、フコース、硫酸基を含む N-アセチルラクタミン構造(Galb1-4GlcNAc)を基本骨格とするシアリル6-スルホルイス X 構造である(図3)¹⁰⁾。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する(図3)。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, 4)。シアリルルイス X を認識せずシアリル6-スルホルイス X を特異的に認識する G72 および G152 モノクロー

表2 ヒト GlcNAc-Gal-GalNAc 6-硫酸転移酵素ファミリー

酵素名	他の文献における酵素名	遺伝子名	基質	HEV における発現	L-セレクトインリガンド合成能
GlcNAc 6ST-1	N-アセチルグルコサミン 6-硫酸転移酵素 (GlcNAc 6ST)	CHST2	GlcNAc	++	Yes
GlcNAc 6ST-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-GlcNAc 6ST), L-セレクトインリガンド硫酸転移酵素 (LSST)	CHST4	GlcNAc	+++	Yes
GlcNAc 6ST-3	腸管 N-アセチルグルコサミン 6-硫酸転移酵素 (I-GlcNAc 6ST)	CHST5	GlcNAc	∅	∅
GlcNAc 6ST-4	コンドロイチン-6-硫酸転移酵素-2 (C6ST-2)	CHST7	GlcNAc, GalNAc	+/-	?
GlcNAc 6ST-5	角膜 N-アセチルグルコサミン 6-硫酸転移酵素 (C-GlcNAc 6ST)	CHST6	GlcNAc	∅	∅
KS Gal6ST	ケラタン硫酸ガラクトース 6-硫酸転移酵素	CHST1	Gal	+	Yes
C6ST-1	コンドロイチン-6-硫酸転移酵素 (C6ST)	CHST3	GalNAc, Gal	+/-	No

ーナル抗体も作製されている¹¹⁾。

L-セレクトインリガンド糖鎖合成にかかわる酵素

1. コア1 N-アセチルグルコサミン転移酵素 (Core 1 b1-3GlcNAcT)

O-結合型糖鎖のコア1構造に b1-3 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、Core 1b1-3GlcNAcT である¹²⁾。この酵素遺伝子のノックアウトマウスは 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-セレクトインリガンド糖鎖合成においてコア1伸長にかかわる酵素である可能性が高い¹³⁾。

2. 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 b1-6 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¹²⁾、Core 2 GlcNAcT-∅ が HEV に発現し L-セレクトインリガンド糖鎖の生合成にかかわっていることが明らかにされている¹⁴⁾。Core 2 GlcNAcT-∅ 遺伝子ノックアウトマウスでは、リンパ節 GlyCAM-1 は core 2 分岐型の糖鎖がほぼ

消失する¹⁴⁾。

3. フコース転移酵素

O-結合型糖鎖に a1-3 結合でフコースを転移する酵素は、FucT-∅ および FucT-∅ である。FucT-∅ および FucT-∅ は、ともにリンパ節 HEV で発現を示す¹⁵⁾。FucT-∅ 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-∅ が FucT-∅ に比べて優位に L-セレクトインリガンド糖鎖の生合成に働いていると思われる¹⁶⁾。

4. シアル酸転移酵素

HEV において L-セレクトインリガンド糖鎖の合成にかかわり、a2-3 結合でガラクトース残基にシアル酸を転移する酵素は ST3Gal-∅、ST3Gal-∅ と ST3Gal-∅ である¹⁷⁾。ST3Gal-∅ 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-セレクトインリガンドの機能は変化しないことが報告された¹⁸⁾。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-セレクトインリガンド糖鎖のシアル酸合成は ST3Gal-∅ 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¹⁸⁾。

5. 硫酸基転移酵素

シアリル 6-スルホルイス 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(表2)⁹⁾。この中でGlcNAc6ST-1およびGlcNAc6ST-2は、リンパ節HEVでの発現とL-セレクチンリガンド合成能が確認されている^{14, 19, 20)}。酵素基質特異性²¹⁾、ゴルジ体内での局在部位の違い²²⁾および遺伝子欠損マウスHEVでのMECA-79抗体染色パターン^{19, 20)}からGlcNAc6ST-1はコア2分岐鎖上のGlcNAc6-硫酸化を効率良く担い、GlcNAc6ST-2はコア1伸長およびコア2分岐鎖上の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²¹⁾、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²³⁾。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²³⁾。ローリング速度の不完全な減速により次の作用段階であるケモカイン刺激が受け取れず、HEV内での接着不全が起これらと思われる。GlcNAc6ST-1とGlcNAc6ST-2のHEVにおけるシアリル6-スルホヒス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²⁴⁾。シアリルヒスX構造内のガラクトース残基の6位を硫酸化するKS Gal6ST(表2)の遺伝子欠損マウスの作製解析は、現在までに報告はない。

L-セレクチンリガンド糖鎖と慢性炎症

HEVに発現するL-セレクチンリガンド糖鎖および硫酸基転移酵素は、慢性間接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⁹⁾。興味深いこと

に、ピロリ菌感染胃粘膜炎²⁵⁾や潰瘍性大腸炎²⁶⁾の炎症部位においてもそれらの発現が報告されている。L-セレクチンと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かか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⁹⁾。

おわりに

セレクチ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かかわるだけでなく、他の血行性末梢組織ホーミングにもかかわる。皮膚へホーミングするT細胞はP-, E-セレクチ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²⁷⁾。樹状細胞が胸腺へホーミングする場合にはP-セレクチンが重要であり²⁸⁾、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-セレクチンが重要である²⁹⁾。間葉系幹細胞の骨髄へのホーミングにはE-セレクチンリガンド糖鎖が必要である³⁰⁾。制御性T細胞がHEVを介してリンパ節へ移入する場合は、制御性T細胞はL-セレクチンを発現し、炎症部位へ血行性に移入する場合はP-, E-セレクチンリガンドを発現する³¹⁾。また、われわれのグループは、共同でセレクチンリガンドとして知られるPSGL-1がナイーブT細胞の細胞表面ではケモカインを保持する分子として働くことを新規に報告した³²⁾。このようにセレクチ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いる。末梢組織への血行性組織内浸潤とは対照的に、脳や脊髄といった中枢神経組織への白血球の血行性移入の分子機序は、いまだ不明な点が多い。今後のさらなる研究の発展が期待されている。

文献

- 1) von Andrian UH, Meppel TR: Homing and cellular

- traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3 : 867-878, 2003
- 2) Luster AD, Alon R, von Andrian UH : Immune cell migration in inflammation : present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6 : 1182-1190, 2005
- 3) Kinashi T : Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5 : 546-559, 2005
- 4) Kannagi R : Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol* 12 : 599-608, 2002
- 5) Sako D, Comess KM, Barone KM, et al : A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* 83 : 323-331, 1995
- 6) Miyasaka M, Tanaka T : Lymphocyte trafficking across high endothelial venules : dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 4 : 360-370, 2004
- 7) Sperandio M, Smith ML, Førlow SB, et al : P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* 197 : 1355-1363, 2003
- 8) Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, et al : Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7 : 678-689, 2007
- 9) Uchimura K, Rosen SD : Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol* 27 : 559-565, 2006
- 10) Rosen SD : Ligands for L-selectin : homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22 : 129-156, 2004
- 11) Mitsuoka C, Sawada-Kasugai M, Ando-Furui K, et al : Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis X. *J Biol Chem* 273 : 11225-11233, 1998
- 12) Yeh JC, Hiraoka N, Petryniak B, et al : Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Core1 extension beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell* 105 : 957-969, 2001
- 13) Mitoma J, Bao X, Petryniak B, et al : Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat Immunol* 8 : 409-418, 2007
- 14) Hiraoka N, Kawashima H, Petryniak B, et al : Core 2 branching beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and high endothelial venule-restricted sulfotransferase collaboratively control lymphocyte homing. *J Biol Chem* 279 : 3058-3067, 2004
- 15) MRini C, Cheng G, Schweitzer C, et al : A novel endothelial L-selectin ligand activity in lymph node medulla that is regulated by alpha (1,3)-fucosyltransferase-IV. *J Exp Med* 198 : 1301-1312, 2003
- 16) Maly P, Thall A, Petryniak B, et al : The alpha (1,3) fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86 : 643-653, 1996
- 17) Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, et al : The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83 : 727-737, 2001
- 18) Sperandio M, Frommhold D, Babushkina I, et al : alpha 2,3-Sialyltransferase-IV is essential for L-selectin ligand function in inflammation. *Eur J Immunol* 36 : 3207-3215, 2006
- 19) Hemmerich S, Bistrup A, Singer MS, et al : Sulfation of L-selectin ligands by an HEV-restricted sulfotransferase regulates lymphocyte homing to lymph nodes. *Immunity* 15 : 237-247, 2001
- 20) Uchimura K, Kado matsu K, El-Fasakhany FM, et al : N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 regulates expression of L-selectin ligands and lymphocyte homing. *J Biol Chem* 279 : 35001-35008, 2004
- 21) Uchimura K, El-Fasakhany FM, Hori M, et al : Specificities of N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases in relation to L-selectin ligand synthesis and tumor-associated enzyme expression. *J Biol Chem* 277 : 3979-3984, 2002
- 22) de Graffenried CL, Bertozzi CR : Golgi localization of carbohydrate sulfotransferases is a determinant of L-selectin ligand biosynthesis. *J Biol Chem* 278 : 40282-40295, 2003
- 23) Uchimura K, Gauguier JM, Singer MS, et al : A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. *Nat Immunol* 6 : 1105-1113, 2005
- 24) Kawashima H, Petryniak B, Hiraoka N, et al : N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases 1 and 2 cooperatively control lymphocyte homing through L-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. *Nat Immunol* 6 : 1096-1104, 2005
- 25) Kobayashi M, Mitoma J, Nakamura N, et al : Induction of peripheral lymph node addressin in human gastric mucosa infected by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 17807-17812, 2004
- 26) Suzawa K, Kobayashi M, Sakai Y, et al : Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 102 : 1499-1509, 2007
- 27) Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al : Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21 : 527-538, 2004
- 28) Bonasio R, Simone ML, Schaeferli P, et al : Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells

-
- homing to the thymus. *Nat Immunol* 7 : 1092-1100, 2006
- 29) Cavanagh LL, Bonasio R, Mazo IB, et al : Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 6 : 1029-1037, 2005
- 30) Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, et al : Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* 14 : 181-187, 2008
- 31) Huehn J, Hamann A : Homing to suppress : address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 26 : 632-636, 2005
- 32) Veerman KM, Williams MJ, Uchimura K, et al : Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 8 : 532-539, 2007
-