



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Identification and Characterization of Ligands for L-Selectin in the Kidney. II. Expression of Chondroitin Sulfate and Heparan Sulfate Proteoglycans Reactive with L-Selectin |
| Author(s)    | 李, 永菲   |
| Citation     | 大阪大学, 1999, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41680">https://hdl.handle.net/11094/41680</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。                               |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 李 永 菲  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博士(医学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 14478 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成11年3月25日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科病理系専攻  |
| 学 位 論 文 名     | Identification and Characterization of Ligands for L-Selectin in the Kidney. II. Expression of Chondroitin Sulfate and Heparan Sulfate Proteoglycans Reactive with L-Selectin.<br>(腎におけるL-セレクチンリガンドの同定と解析。第2報。L-セレクチンと相互作用するコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教授 宮坂 昌之   |
|               | (副査)<br>教授 谷口 直之 教授 白倉 良太  |

## 論文内容の要旨

## 【目的】

L-セレクチンはリンパ球、顆粒球や単球などの白血球全般に広く発現し、血管内皮細胞上のリガンドとの結合により、リンパ球の末梢リンパ節へのホーミング現象および白血球の炎症巣への浸潤過程に関与する。しかし、L-セレクチンのリガンドは血管内皮細胞上にのみ局在するのではなく、腎の遠位尿細管にも局在していることが知られており、病的な状態において腎への白血球浸潤に何らかの役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、免疫組織化学および生化学的方法により、腎のL-セレクチンのリガンドの性質を明らかにすることを目的とする。

## 【方法ならびに成績】

これまでに知られている糖蛋白質性のL-セレクチンのリガンドはシアリルLe<sup>x</sup>糖鎖を持つ。はじめに、可溶性L-セレクチン(LEC-IgG)およびさまざまな抗シアリルLe<sup>x</sup>抗体を用いて腎凍結切片を免疫染色したところ、LEC-IgGは遠位尿細管直部と選択的に結合したが、各種の抗シアリルLe<sup>x</sup>抗体はこれとは異なる染色パターンを示した。また、LEC-IgGと腎凍結切片の結合はシアリダーゼ非感受性であった。以上の結果より、腎におけるL-セレクチンのリガンドはシアリルLe<sup>x</sup>糖鎖を持たないと考えられた。一方、スルファチドはシアリルLe<sup>x</sup>糖鎖とは構造の異なるL-セレクチン・リガンドとして知られており、L-セレクチンとの結合は部分的にのみCa<sup>2+</sup>依存性である。免疫染色を行ったところ、腎においてスルファチドの存在が確認できたが、LEC-IgGの腎凍結切片との結合が完全に二価金属イオン依存性であったことより、スチルファチドも腎の主要なL-セレクチン・リガンドではないと考えられた。次に、腎尿細管画分を調製後、その可溶化物をSephacryl S-300ゲルろ過カラムにかけて、L-セレクチン・リガンドの部分精製を行った。各フラクションとLEC-IgGの結合をドットプロット法で調べたところ、ボイド容積付近に溶出される大きな分子サイズ(>400kDa)のフラクションがLEC-IgGと強く結合した。このフラクションをビオチン化後、LEC-IgGを用いて免疫沈降を行ったところ、500~1,000kDaの分子サイズを持つ物質が沈降した。この高分子サイズの物質とLEC-IgGの結合はコンドロイチナーゼABCおよびヘパリチナーゼ消化により阻害された。また、これらの酵素消化により腎凍結切片とLEC-IgGの結合も阻害された。以上の結果から、腎におけるL-セレクチンのリガンドにはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンが含まれていると考えられた。最近、当教室の川島らは、腎培養細胞株を用いた解析からコンドロイチン硫酸プロテオグリ

カン・バーシカンを新しいL-セレクチンのリガンドとして見い出し、腎凍結切片における抗バーシカン抗体およびLEC-IgGの染色パターンは部分的に一致することを報告している。このことから、腎におけるL-セレクチンのリガンドの一部はバーシカンであると考えられる。これ以外の腎におけるコンドロイチン硫酸タイプのL-セレクチン・リガンドおよびヘパラン硫酸タイプのL-セレクチン・リガンドについては今までのところコア蛋白は不明である。共同研究者の岡山大学・四方らの結果では、輸尿管を結紮して間質性腎炎を誘導したラットに抗L-セレクチン抗体を投与したところ、腎間質への白血球浸潤が有意に抑制された。また、正常腎においてみられた遠位尿細管部へのLEC-IgGの結合は尿管結紮後24hまでには消失し、尿細管近傍の血管束 (vascular bundle) に LEC-IgGの結合が見られた。これらのことから、腎におけるL-セレクチンのリガンドは病的な状態において血管内皮細胞上で白血球と結合し、間質への白血球浸潤に関与する可能性が考えられる。

### 【総括】

本研究により、腎遠位尿細管に局在するL-セレクチン・リガンドはスルファチドやシアリル  $Le^x$  様糖鎖保有分子ではなく、500~1,000kDaの分子サイズのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンであることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

L-セレクチンはリンパ球、顆粒球や単球などの白血球全般に広く発現し、血管内皮細胞上のリガンドとの結合により、リンパ球の末梢リンパ節へのホーミング現象および白血球の炎症巣への浸潤過程に関与する。一方、L-セレクチン結合物質は腎の遠位尿細管にも局在していることが知られているが、本物質が白血球L-セレクチンのリガンドとして機能するかは明らかでない。本研究では、免疫組織化学および生化学的方法により、正常腎のL-セレクチン結合物質の解析を行った。その結果、腎遠位尿細管に局在するL-セレクチン結合物質は既知のリガンドとは異なり、500~1,000kDaの分子サイズのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンであることが明らかとなった。本研究は、非リンパ組織中に存在するL-セレクチン結合物質の性状をはじめて明らかにしたものであるとともに、今後腎炎におけるL-セレクチンの関与を研究するための重要な情報を提供すると考えられることから、学位に値するものと認める。