

Title	Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. III. Characterization of L-selectin reactive heparan sulfate proteoglycans
Author(s)	渡邊, 哲史
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41697">https://hdl.handle.net/11094/41697</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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	渡邊 哲史
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14476 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 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. III. Characterization of L-selectin reactive heparan sulfate proteoglycans. (腎におけるL-セレクチンリガンドの同定および解析。第3報。L-セレクチン結合性ヘパラン硫酸プロテオグリカンの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之  (副査) 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、ほとんどすべての白血球に発現する細胞接着分子であり、白血球が血管内から組織へと遊走する過程において血管内皮細胞上のリガンドとの相互作用を介した初期の接着に関与する。一方、これまでに我々はL-セレクチンのリガンドが血管内皮細胞以外にも発現していることを報告している。すなわち、L-セレクチン-IgG キメラ分子(LEC-IgG)は、腎凍結切片上で遠位尿細管上皮細胞に選択的に結合し、また、腎間質への白血球浸潤が見られるラットの尿管結紮モデルでは、L-セレクチンに対する中和抗体であるHRL3によって白血球浸潤が有意に抑制される。これらのことは、ラット腎には白血球浸潤に関与するL-セレクチン結合性分子が存在することを示すものである。そこで、本研究で我々は、ラット腎に存在するL-セレクチン結合性分子の同定ならびにその生化学的性状の解析を試みた。

#### 【方法ならびに成績】

L-セレクチン結合性分子が遠位尿細管上皮細胞に限局していることから、我々は、腎より尿細管を豊富に含む画分を調製し、その可溶化物からL-セレクチン結合性分子を得ることを試みた。まず、尿細管可溶化物を陰イオン交換カラムにて分画し、各画分についてLEC-IgGとの結合性をドットプロット法にて検討した。その結果、1 M NaClで溶出された画分にLEC-IgGとの強い結合性が見られた。そこで、この画分をビオチン標識し、LEC-IgGとの結合特異性をELISAにて調べた結果、この結合はL-セレクチンに対する中和抗体であるHRL3、あるいは2価金属イオンのキレート剤であるEDTA存在下で著しく阻害された。このことから、1 M NaCl画分に含まれる分子とL-セレクチンとの結合は、2価金属イオン依存的なL-セレクチンのレクチンドメインを介した特異的な結合であることが明らかとなった。次にLEC-IgGによる免疫沈降を行うことで、1 M NaCl画分中のL-セレクチン結合性分子の同定を試みた。沈降物をアガロースを含むポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した結果、L-セレクチン結合性分子の分子サイズは約600kDaであった。また、1 M NaCl画分を様々な糖鎖分解酵素で前処理した後に免疫沈降を行った結果、ヘパリナーゼあるいはヘパリチナーゼ処理をした場合にのみ600kDaのバンドがほぼ完全に消失し、それ以外のコンドロイチナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラタナーゼ、そしてシアリダーゼ処理ではまったく影響を受けなかった。これらの結果から、1 M NaCl画分中のL-セレクチン結合性分子は、約600kDaのヘパラ

ン硫酸プロテオグリカン (HSPG) であることが明らかとなった。さらに HSPG をヘパリチナーゼ消化した時に新たに生じるエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体 3 G10を用いたウェスタンブロット解析の結果、この L-セレクトイン結合 HSPG のコアタンパク質の分子サイズは、160kDa および180kDa であることが明らかとなった。また、腎に豊富に存在することが知られている HSPG であるアグリンあるいはパールカンに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析では、これらの抗体と L-セレクトイン結合性 HSPG のコアタンパク質とは反応性を示さなかった。従って、腎の遠位尿細管上皮細胞に存在する L-セレクトイン結合性 HSPG はアグリンやパールカンとは異なる分子であると考えられる。

#### 【総括】

本研究において、我々は腎の遠位尿細管上皮細胞に存在する L-セレクトイン結合性分子の一つとして約600kDa のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) を同定した。この分子と L-セレクトインとの結合は、L-セレクトインのレクチンドメインとヘパラン硫酸鎖を介した特異的なものであることが明らかとなった。抗体を用いた検討から、この L-セレクトイン結合性 HSPG は、既知の分子であるパールカンあるいはアグリンとは異なる分子であると考えられ、またそのコアタンパク質の分子サイズ (160kDa, 180kDa) からシンデカン、グリピカンなどのその他の HSPG と異なる分子であると考えられる。HSPG は様々なタンパク質と相互作用することが知られており、その中で炎症時における白血球浸潤という現象を考えた場合、HSPG が可溶性の分子であるケモカインを保持し、白血球に効率良く提示する役割を果たすことが提唱されている。このことから、本研究で同定した HSPG は、腎炎での白血球浸潤において、L-セレクトインとの相互作用ばかりでなく、ケモカインの機能にも関与する可能性を持った重要な分子であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

リンパ節の高内皮細静脈に発現し、リンパ球ホーミングに関与すると考えられる L-セレクトインリガンドについては多くの研究がなされているが、それ以外の組織に存在する L-セレクトイン結合性分子に関してはほとんど明らかにされていない。本研究では、腎の遠位尿細管上皮細胞に局在する L-セレクトイン結合性分子を同定しその生化学的性状の解析を行った。

腎の尿細管可溶化物を陰イオン交換カラムにて分画したところ、1 M NaCl で溶出された画分に L-セレクトイン結合性分子が含まれていた。この分子と L-セレクトインとの結合は、2 価金属イオン依存的で L-セレクトインのレクチンドメインを介した特異的なものであった。免疫沈降および各種の糖鎖分解酵素を用いた検討より、この L-セレクトイン結合性分子は約600kDa のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) であることが明らかとなった。ウェスタンブロットにより、この L-セレクトイン結合性 HSPG のコアタンパク質の分子サイズは160kDa および180kDa であることが判明し、また、既知の HSPG であるパールカンやアグリンとは異なる分子であることが示唆された。

本研究は腎の遠位尿細管上皮細胞に存在する L-セレクトイン結合性 HSPG を初めて同定、解析したものであり、学位に値すると考える。