

P-セレクトリンとそのリガンド分子による血液細胞間の相互作用

伊 藤 佐生智

星薬科大学 微生物学教室

The blood cell interactions mediated by the adhesion molecules,
P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)

Saotomo ITOH

Department of Microbiology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

1. はじめに

白血球による生体防御には、他の細胞との相互作用が必須である。血管内を移動する白血球は炎症部位において血管内腔に存在する血管内皮細胞と接着し、移動を停止し血管内皮細胞の間隙をすり抜けて血管外へ遊走するが、この過程に異常があると白血球の貪食、活性酸素産生能が正常であるにもかかわらず易感染性となる。また、種々の炎症性疾患において血液中の白血球-血小板凝集体が増加することが報告されており、病態形成に関与すると考えられている^{1,4)}。血液細胞に限らず細胞同士の接着には、互いの細胞表面分子を認識する膜タンパク質である『接着分子』が重要な役割を果たしている。接着分子は構造的特徴から免疫グロブリンファミリー、カドヘリンファミリー、セレクトリンファミリー、インテグリンファミリーなどに分類されるが、血液細胞間の接着では特にインテグリンファミリーとセレクトリンファミリーが重要な役割を果たしている。セレクトリンファミリーには発現部位や発現調節の異なる三種の分子、L-セレクトリン、E-セレクトリンおよびP-セレクトリンが属しており⁵⁾、いずれもN末端からC型レクチンドメイン、上皮細胞増殖因子(EGF)様ドメイン、補体制御タンパク質様ドメイ

ンからなり、レクチンドメインを介して糖鎖を認識する接着分子である (Fig. 1)。P-セレクトリンは活性化した血管内皮細胞および血小板の表面に、E-セレクトリンは活性化した血管内皮細胞に発現し、ともに白血球の表面に存在するリガンド分子との結合を介して白血球の炎症、出血部位への集積に重要な役割を果たしている。一方L-セレクトリンは白血球に構成的に存在しており、リンパ球のホーミングに関与している。

上述の3種のセレクトリンはいずれもレクチンドメインを介してシアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、およびフコースからなる4糖構造であるシアリルルイスX (sLe^x) および類似する構造を特異的に認識する。この糖鎖構造は生体において糖タンパク質あるいは糖脂質に結合している。白血球に存在するP-セレクトリンの主要なリガンド分子としてはP-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) が知られている⁶⁾。PSGL-1は分子量110kDaで多数のO-結合型糖鎖を持つムチン様膜貫通糖タンパク質であり、ジスルフィド結合により二量体として存在している。PSGL-1とP-セレクトリンとの結合にはそのN末端に存在するsLe^x含有糖鎖と近傍の3つのチロシン残基のうち少なくとも2つが硫酸化されていることが必要である (Fig. 2)⁷⁾。PSGL-1はすべての白血球に存在し、微絨毛の先端に存在することが知られている。白血球が血管内から炎症組織に浸潤する初期の過程において白血球が血管への接着と解離を繰り返す、あたかも血管表面を転がるように移動する現象、すなわちローリングが観察されるが、PSGL-1はP-セレクトリンとの速い結合と解離を介してこの現象に寄与している。この白血球の血管外遊走は生体防御において重要なステップのひとつであり、フコース含有糖鎖合成異常によるセレクトリンによる糖鎖リガンドの認識異常は白血球の貪食、殺菌能が正常であるにもかかわらず白血球の血管外遊走が障害されるために免疫不全となるLAD-II (Leukocyte adhesion deficiency type-II) を発症することが知られている⁸⁾。またセレクトリン欠損マウスおよ

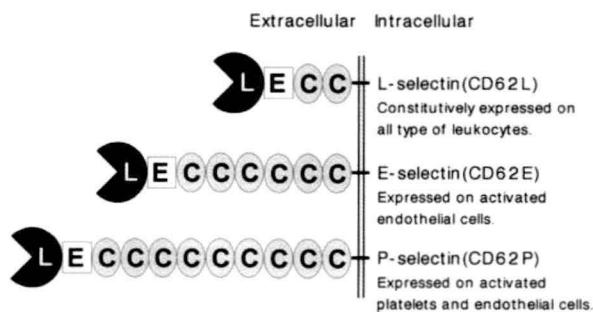


Fig. 1 Domain composition of three human selectins. L: Lectin domain, E: Epidermal growth factor (EGF)-like domain, C: Complement regulatory protein-like domain.

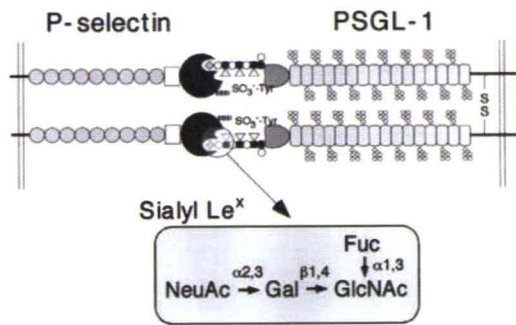


Fig. 2 Model for the interaction between P-selectin and PSGL-1. The C-type lectin domain of P-selectin binds to a sialyl Le^x-containing O-glycan and one or more tyrosine sulfate residues in the N-terminal region of PSGL-1. Sialyl Le^x is a tetrasaccharide composed of sialic acid, galactose, N-acetylglucosamine and fucose.

びマウスへのP-セレクチン抗体とE-セレクチン抗体の投与ではチオグリコール酸投与による腹腔への白血球の滲出が抑制されることから^{9,12)}、セレクチンとリガンドを介した結合は生体防御および炎症反応に重要な役割を果たしていることが示されている。

近年、P-セレクチンとPSGL-1の結合は単に物理的な接着のみならず白血球の活性化を引き起こすことが明らかになりつつある。例えば活性化血小板はP-セレクチン依存的に好中球および単球からの活性酸素産生を誘導し¹³⁾、固相化P-セレクチンとPSGL-1の相互作用あるいは白血球表面のPSGL-1の抗体によるクロスリンクは好中球の活性酸素産生の誘導^{14,15)}、MAPキナーゼの活性化¹⁶⁾、インテグリン依存的な接着の増強^{14,17,18)}、単球からのTNF- α 産生¹⁹⁾などを引き起こすことが知られている。P-セレクチン-PSGL-1相互作用は血小板-白血球、血管内皮細胞-白血球間の相互作用を制御し、白血球の体内動態を制御するとともに白血球の活性化を惹起し、生体防御および炎症性疾患の病態形成に関与している可能性が考えられる。本総説ではP-セレクチン-PSGL-1相互作用による好中球の活性化とその調節メカニズムおよび疾患との関わりについての研究成果を紹介する。

好中球におけるPSGL-1の局在化メカニズム

接着分子による細胞接着を考える上で、その接着分子とリガンドの1対1の親和性（アフィニティー）だけでなく、多価結合による総合的な結合力（アビディティー）についても考慮することが重要である。すなわち接着分子とそのリガンドの親和性はサイトカインと受容体のような結合と比べ一般的に低いが、接着分子とそのリガンドが細胞表面において多価で結合することにより、全体として強い結合力を生み出し、強固な細胞接着を担うことができる。従って、接着分子の細胞表面における分布変化は、局所における接着分子の存在密度を変化させ、アビディティーを制御する可能性がある。PSGL-1とP-セレクチンの接着の本質は糖鎖のレクチンによる認識で

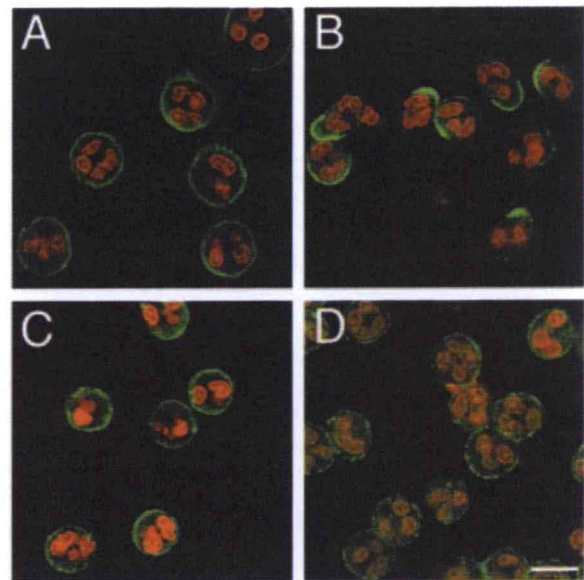


Fig. 3 Redistribution of PSGL-1 on IL-8-treated neutrophils and inhibitory effects of methyl- β -cyclodextrin and filipin.

Human neutrophils (1×10^5 cells/ml, 0.5 ml) were treated with IL-8 (50 ng/ml) in the presence or absence of methyl- β -cyclodextrin (M β CD) (10 mM) or filipin (10 μ g/ml) at 37°C for 20 min. The cells were fixed with 1% formaldehyde and stained with anti-PSGL-1 antibody (PL1) plus Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibody. The nuclei were stained with propidium iodide (25 μ g/ml). After being stained, the cells were observed with a confocal laser scanning microscope. A, untreated; B, treated with IL-8 (50 ng/ml); C, treated with IL-8 and M β CD (10 mM); D, treated with IL-8 and filipin (10 μ g/ml). Bar, 10 μ m.

Table 1 Effects of cholesterol-perturbing agents on the redistribution of PSGL-1 induced by IL-8

Treatment	Cap-forming cells ¹⁾ (%)
Control	2.7 \pm 2.6
IL-8 (50 ng/ml)	69.9 \pm 10.6
+ M β CD (5 mM)	28.6 \pm 4.4
+ M β CD (10 mM)	0.9 \pm 1.1
+ filipin (5 μ g/ml)	19.3 \pm 14.0
+ filipin (10 μ g/ml)	1.2 \pm 1.6

1) Mean percentage (\pm S.D.) of cap-forming cells in 20 fields.

あり、接着分子の中でも比較的結合力が弱いことから、アビディティーについて考慮することが特に重要であると思われる。PSGL-1は無刺激の好中球において細胞表面全体に均一に存在しているが (Fig. 3A)、好中球をIL-8のようなケモカインにより低濃度で処理することにより、このPSGL-1が細胞の一方の端に局在する現象（キャップ形成）が観察される (Fig. 3B, Table 1)。このPSGL-1の局在変化はアビディティーを変化させ、好中球のP-セレクチンに対する接着を調節する可能性が考えられる。またPSGL-1の下流で働くシグナル伝達分

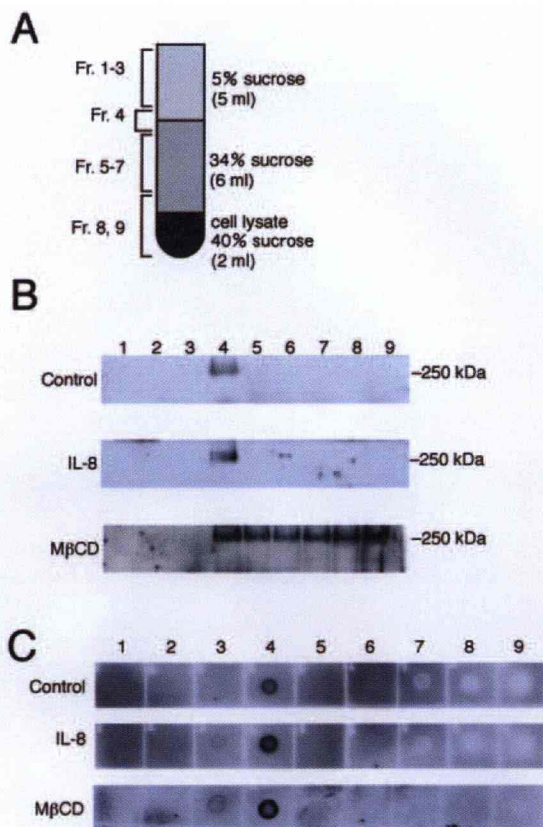


Fig. 4 Localization of PSGL-1 in detergent-insoluble lipid microdomain. Neutrophils were treated with or without IL-8 (50 ng/ml, 37°C, 20 min) and lysed with a buffer containing 0.5% Brij 58 at 4°C. Postnuclear supernatants were centrifuged in a 5%/34% discontinuous sucrose density gradient (A) at 200,000 x g for 20 hr. Fractions (1.5 ml) from top to bottom were collected, and each fraction was analyzed by Western blotting with anti-sLe^x IgM (KM93) plus biotin-conjugated anti-IgM antibody and HRP-conjugated streptavidin (for PSGL-1 staining) (B), and by dot-blotting with HRP-conjugated cholera toxin B subunit (for GM1 ganglioside staining) (C).

子の存在密度を増加させることにより、好中球の活性化を調節することも考えられ、PSGL-1の局在化のメカニズムの解明は好中球におけるP-セレクトイン依存的接着および活性化のメカニズムを理解するのに重要であると考えられた。近年、PSGL-1はT細胞において、脂質マイクロドメインに局在することが報告されている²⁰⁾。脂質マイクロドメインとはスフィンゴ脂質、およびコレステロールに富む細胞膜上のマイクロドメインで、これらの脂質と主要な細胞膜の構成成分であるリン脂質との物性の差から細胞膜においてこれらが濃縮されたマイクロドメインを形成することが知られている²¹⁾。脂質マイクロドメインは脂質ラフトとも呼ばれ、また低温において非イオン性の界面活性剤に不溶性であることからdetergent insoluble microdomain (DIM)、あるいは糖脂質に富むことから glycolipid-enriched microdomain (GEM) とも呼ばれる。この脂質マイクロドメインには種々の膜タンパク質、シグナル伝達分子が会合し²²⁻²⁵⁾、

細胞膜において細胞接着やシグナル伝達の間を提供していると考えられている。それゆえ、好中球においてもPSGL-1が脂質マイクロドメインに分布し、このことが好中球におけるPSGL-1の局在変化に関与している可能性が考えられたので、PSGL-1のキャップ形成と脂質マイクロドメインの関係について解析した。好中球を非イオン性界面活性剤Brij 58で可溶化したライセートをショ糖密度勾配遠心にかけ低密度画分に分離された脂質マイクロドメインを回収し、PSGL-1の脂質マイクロドメインへの分布を検討した結果、PSGL-1は脂質マイクロドメインのマーカ分子であるガングリオシドGM1とともに脂質マイクロドメインに分布することが示された (Fig. 4B and C)。また好中球をIL-8処理することによって誘導されるPSGL-1のキャップ生成はコレステロールを隔離して脂質マイクロドメイン構造を破壊するmethyl- β -cyclodextrin (M β CD)やfilipinによって抑制された (Fig. 3C and D, Table 1)。さらにM β CD処理はPSGL-1の脂質マイクロドメインへの局在を抑制したことから (Fig. 4B)、PSGL-1の脂質マイクロドメインへの局在がPSGL-1の細胞表面での分布制御に関与していることが推測された。PSGL-1はIL-8処理下においても脂質マイクロドメインに分布していたことから (Fig. 4B)、PSGL-1はキャップ形成の有無にかかわらず脂質マイクロドメインに存在し、IgEレセプター (Fc ϵ RI)、B細胞抗原レセプター、 α L β 2インテグリンなどにおいて報告されているように^{23,26,27)}、刺激の有無によって脂質マイクロドメインに出入りして局在が変化しているわけではないことも示された。

PSGL-1はM β CD処理によって脂質マイクロドメインへの分布が抑制される一方で、ガングリオシドGM1の脂質マイクロドメインへの分布はM β CDによって抑制されないことから (Fig. 4C)、両分子は異なる脂質マイクロドメインに局在している可能性が考えられた。このことを確認するため、GM1に結合するAlexa Fluor 488標識コレラトキシンBサブユニットと抗PSGL-1抗体を用いて好中球を二重染色した結果、IL-8処理によりPSGL-1がキャップ形成した部位にはGM1の集積は認められず (Fig. 5A)、抗PSGL-1抗体を用いてPSGL-1のパッチを形成させた部位にもGM1の集積は認められず (Fig. 5B)、抗コレラトキシン抗体を用いてGM1をパッチ形成させてもその部位へのPSGL-1の局在は認められなかったことから (Fig. 5C)、細胞表面においてGM1とPSGL-1は異なるマイクロドメインに存在していることが示唆された。またBrij 58のかわりにTriton X-100を用いてライセートを調製し、脂質マイクロドメインを回収したところGM1は低密度画分に回収されたが、PSGL-1は回収されなかったことも、両者が異なるマイクロドメインに存在することを示している。

以上より脂質マイクロドメインがPSGL-1の細胞表面での分布変化に重要であることが示された。また脂質マイクロドメインにはheterogeneityが存在し、このこと

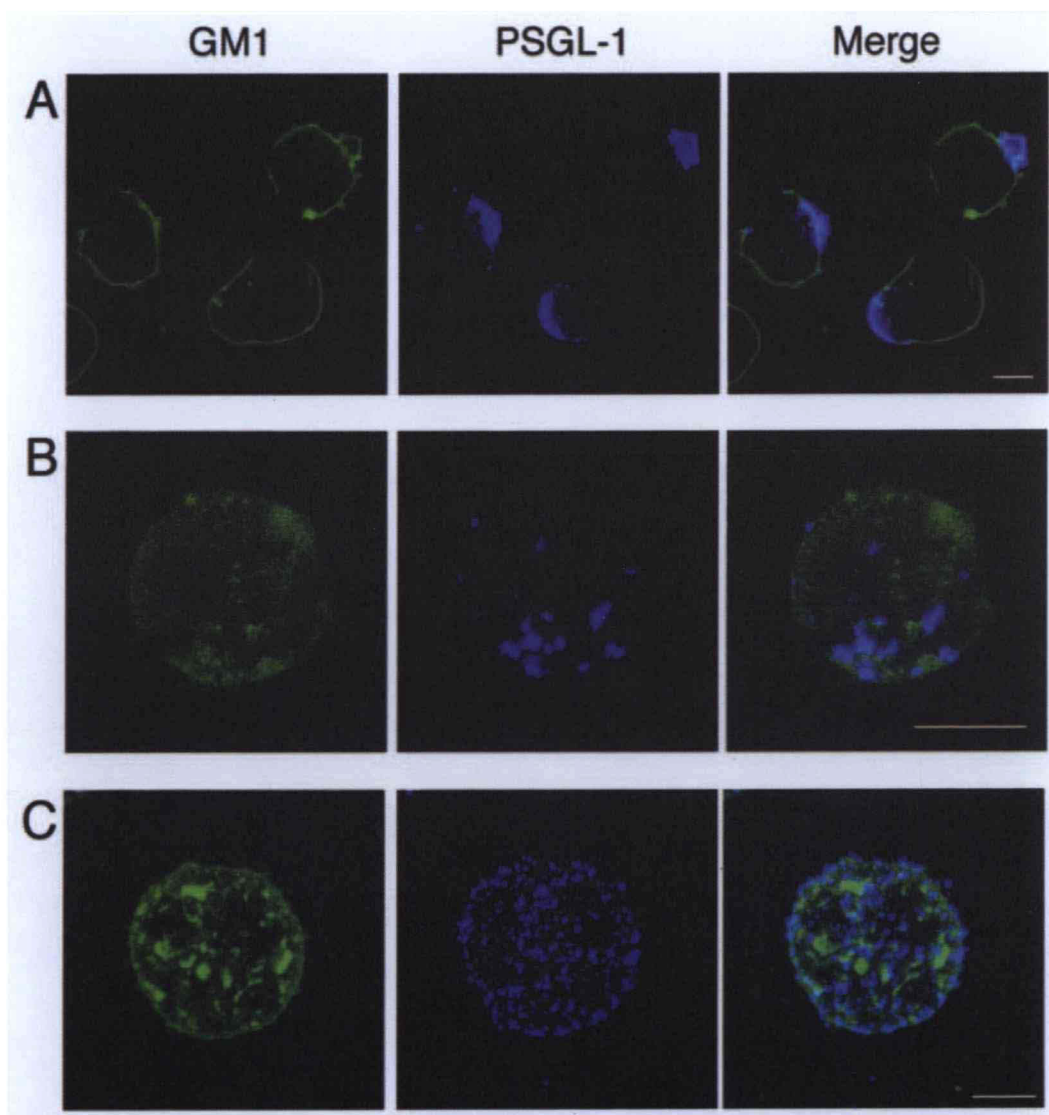


Fig. 5 Intracellular distribution of PSGL-1 and GM1 ganglioside in neutrophils. (A) IL-8-treated neutrophils were stained with Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin B subunit for 10 min at 4°C. The cells were then fixed with 1% formaldehyde, and stained with anti-PSGL-1 antibody (PL1) plus Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG. Bar, 5 μm. (B) The distributions of PSGL-1 and GM1 ganglioside were observed after the cross-linking of PSGL-1 by antibodies. Neutrophils were sequentially treated with PL1 for 10 min, anti-mouse IgG F(ab')₂ for 10 min, and Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin B subunit for 10 min at 4°C. The cells were fixed with 1% formaldehyde, and treated with Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG. Confocal images of 15 serial sections with a thickness of 0.93 μm are superimposed on each other. Bar, 5 μm. (C) The distributions of PSGL-1 and GM1 ganglioside were observed after the cross-linking of GM1 ganglioside. Neutrophils were treated with Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin B subunit for 20 min at 4°C, and then with anti-cholera toxin B subunit antisera for 10 min at 4°C. The cells were fixed with 1% formaldehyde, and stained with PL1 plus Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG. Confocal images of 15 serial sections with a thickness of 0.72 μm are superimposed. Bar, 5 μm.

が各分子の微細な調節を可能にしていると考えられる。PSGL-1のケモカインによるキャップ形成はサイトカラシンD処理によってアクチン細胞骨格を破壊することによっても抑制されることから¹⁵⁾、好中球におけるPSGL-1のキャップ形成にはアクチン細胞骨格も重要であることが示されている。PSGL-1はその細胞内領域でERMファミリーのアクチン結合タンパク質と相互作用することが報告されており²⁸⁻³⁰⁾、また脂質マイクロドメインへの分布が報告されているCD44においてはアクチンおよび微小管細胞骨格系が分布制御に関与しているという報

告がなされていることから³¹⁾、脂質マイクロドメイン上に存在するPSGL-1が直接あるいは他のマイクロドメイン局在タンパク質を介してアクチン細胞骨格と連結し、内側から細胞膜内をマイクロドメインごと側方に動かされている可能性が考えられた。

好中球におけるPSGL-1の局在化と白血球の機能調節

前章で述べたIL-8処理好中球におけるPSGL-1のキャップ形成は細胞表面のPSGL-1の分布密度を変化させることにより、P-セレクチンとの結合力を変化させ、P-セレ

クチン発現細胞との接着性を調節し、またPSGL-1によるシグナル伝達を調節する可能性がある。そこでまず好中球PSGL-1のキャップ形成がP-セレクトリン発現CHO細胞(CHO-P)モノレイヤーへの接着およびトロンビン刺激血小板との複合体形成にどのように影響するかを検討した。好中球のCHO-Pモノレイヤーに対する接着はIL-8処理によって有意に低下し(Fig. 6A)、一方で活性化血小板と好中球との複合体形成はIL-8処理によって促進された(Fig. 6B)。P-セレクトリン依存的な接着がIL-8処理により標的細胞の違いによって正あるいは負に調節される理由として、P-セレクトリン発現細胞におけるP-セレクトリンの密度と細胞間の接着面積によって調節されている可能性が考えられる。好中球よりサイズが大きく、モノレイヤーを形成しているCHO-Pとの接着ではPSGL-1のキャップ形成により接着面積が減少し、接着が不利になる可能性が考えられる。逆に好中球よりサイ

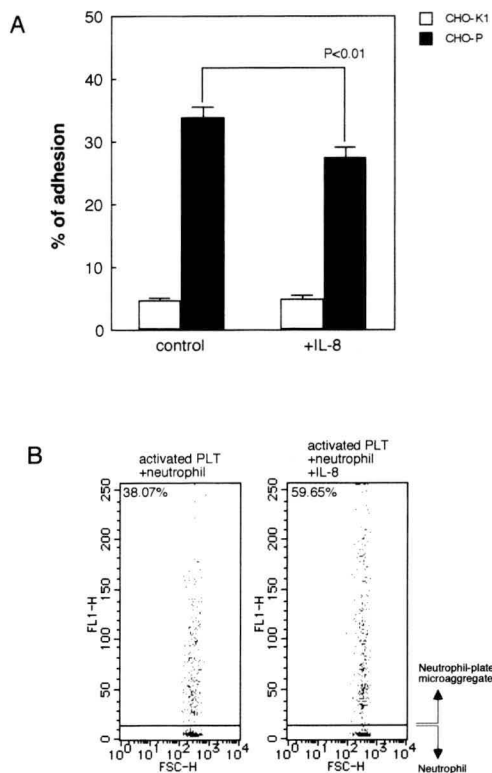


Fig. 6 Effect of interleukin (IL)-8 on P-selectin-dependent adhesion of neutrophils.

A, Effect of IL-8 on the adhesion of neutrophils to a P-selectin-expressing CHO cell (CHO-P) monolayer. Fluorescently-labeled neutrophils were treated with or without IL-8 (50 ng/ml) for 20 min and allowed to adhere to P-selectin-transfectant CHO-P cells and the parental CHO-K1 cells under the shear stress (112 min^{-1}) at 4°C for 30 min. B, Flow cytometric analysis of microaggregates consisting of neutrophils and thrombin-activated platelets. Neutrophils were mixed with fluorescently-labeled and thrombin-activated platelets, and incubated in the presence or absence of IL-8 (50 ng/ml) for 20 min at 37°C . The cell mixture was subjected to flow cytometric analysis. Neutrophils were gated for forward-scatter versus side-scatter plotting. The fluorescence intensity associated with neutrophils was measured. Data for 2,000 cells were collected.

ズの小さい血小板との複合体形成では、好中球表面のPSGL-1がキャップ形成することによりアビディティが増加し、複合体形成が促進されると考えられる。P-セレクトリンとPSGL-1はshear stress存在下で機能することから、単に分子と分子の結合親和性だけでなく、細胞の変形しやすさなどにも影響を受けることが報告されており³²⁾、複雑な制御を受けている可能性が高い。

PSGL-1は単に物理的な接着を仲介するのみならず、P-セレクトリンとの結合によりシグナルを細胞内に伝達し白血球を活性化することが報告されている。P-セレクトリンを発現した活性化血小板、あるいはプレート表面に固相化した精製P-セレクトリンにより好中球、単球からの活性酸素産生が誘導されることが報告されている^{13,19)}。またPSGL-1のクロスリンクによりRasやMAPキナーゼの活性化が誘導されることも報告されている¹⁶⁾。前述の好中球におけるケモカインによるPSGL-1のキャップ形成は細胞内においてPSGL-1のシグナル伝達にかかわる分子の集積を引き起こし、PSGL-1のシグナル伝達に影響を与える可能性が考えられる。そこでIL-8処理によるPSGL-1のキャップ形成が好中球表面のPSGL-1クロスリンク時の好中球の活性酸素産生にどのような影響を与えるのかを調べた。好中球表面のPSGL-1を抗PSGL-1抗体および抗マウスIgG抗体でクロスリンクすることにより誘導される活性酸素産生はIL-8共存下で増強された(Fig. 7)。このときのPSGL-1の細胞内分布を調べてみると抗体クロスリンクによりPSGL-1のパッチ形成が誘

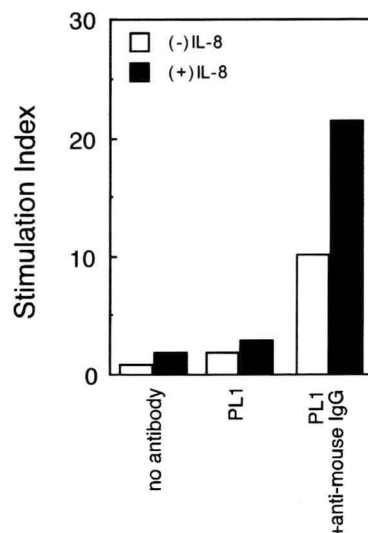


Fig. 7 Effect of IL-8 on ROS production induced by the ligation of PSGL-1 on neutrophils.

DCFH-DA-loaded neutrophils (3×10^5 cells in 0.6 ml of PBS containing 0.90 mM CaCl_2 and 0.49 mM MgCl_2) were treated with anti-PSGL-1 antibody (PL1, $5 \mu\text{g/ml}$) or with a combination of PL1 ($5 \mu\text{g/ml}$) and the F(ab)'_2 fragment of anti-mouse IgG ($5 \mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of IL-8 (25 ng/ml) at 37°C for 30 min. The production of ROS was measured by flow cytometry, and was expressed as a stimulation index calculated based on the ratio of the geometric mean of stimulated cells to that of control cells. A representative result of three independent experiments is shown.

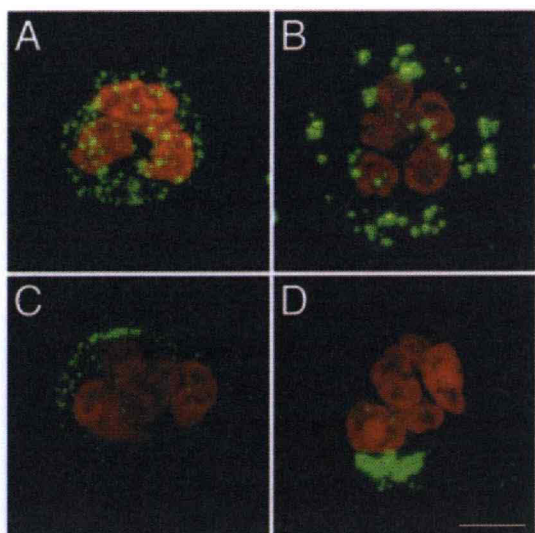


Fig. 8 The intracellular distribution of PSGL-1 on IL-8-treated or untreated neutrophils after the cross-linking with anti-PSGL-1 antibody. Neutrophils were treated with anti-PSGL-1 antibody (PL1, 10 μ g/ml) for 10 min at 4°C. The cells were then treated with (B and D) or without (A and C) anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment (10 μ g/ml) for 10 min at 4°C, and subsequently with (C and D) or without (A and B) IL-8 (50 ng/ml) for 20 min at 37°C. After the cells were fixed with 1% formaldehyde, they were stained with Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG. The nuclei were stained with propidium iodide (25 μ g/ml). Confocal images of 15 serial sections with a thickness of 0.93 μ m are superimposed. Bar, 5 μ m.

導され、IL-8存在下ではこのパッチがキャッピングして細胞の一ヶ所に強く集積していた (Fig. 8)。このことからIL-8によるPSGL-1のキャップ形成は抗体によりクロスリンクされたPSGL-1をさらに集積することによりPSGL-1の下流のシグナル伝達を増強している可能性が考えられた。PSGL-1のシグナルを担う分子としてはPSGL-1にアクチン結合タンパク質エズリン、あるいはモエシンを介して結合することが報告されているチロシンキナーゼSyk²⁸⁾や脂質マイクロドメインに局在することが知られているSrcファミリーのチロシンキナーゼ、低分子量GTP結合タンパク質があげられる。PSGL-1のキャップ形成によりこれらシグナル伝達分子がPSGL-1キャップ部位に濃縮され、これによりPSGL-1クロスリンク時のシグナル伝達が増強されると考えられる。

生体内において好中球が炎症部位近傍の血管内皮細胞や出血部位の血栓に接着する際に、ケモカインによるPSGL-1のキャップ形成とPSGL-1クロスリンクによる好中球活性化が起こりうる。すなわち好中球がP-セレクチンを発現する内皮細胞や血栓を構成する活性化血小板と接着する過程で、近傍に存在するケモカインによって好中球のPSGL-1がキャップ形成し、P-セレクチンによる活性化が増強され活性酸素産生が促進され、生体防御に働いている可能性がある。今回見出したケモカインによるP-セレクチン-PSGL-1相互作用の調節はこのような微小環境においてP-セレクチン依存的な好中球の機能

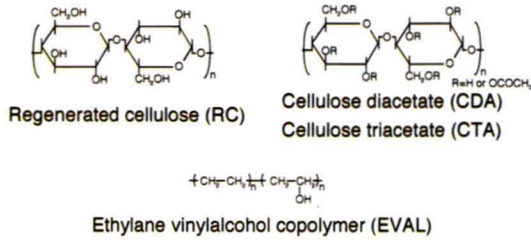
調節に関与していると考えられた。

P-セレクチン-PSGL-1相互作用と疾患

～長期透析合併症への関与～

種々の炎症性疾患において好中球と血小板の複合体が観察されることが報告されている¹⁻⁴⁾。好中球と血小板の相互作用の役割については未だ不明な点が多いが、互いから産生される液性分子、または細胞表面分子を介して相互に活性化している可能性が示されている³³⁾。それゆえ、前述のP-セレクチン-PSGL-1相互作用による白血球活性化は実験的条件下だけでなく種々の炎症性の病態においても病態形成に関与している可能性が考えられる。この一例として血液透析における長期透析合併症が挙げられる。血液透析は慢性腎不全患者に行われる血液浄化療法であり、血液を体外に取り出し、数万本の中空糸状の透析膜からなる透析器を用いて血液中の老廃物を透析により除去し、浄化された血液を再び体内に戻す。この時、血液と人工物である透析膜との接触により血小板、白血球および補体の活性化が起こる可能性がある。これら血液成分の活性化は単回の血液透析においては低レベルであったとしても、血液透析は週2~3回、患者の生涯に渡って行われることや、腎不全患者は酸化ストレスに対する抵抗性が健康人に比べて低いことから^{34,35)}、血液透析療法の度に透析患者体内において軽度の全身的な炎症が惹起され、長期的には動脈硬化、透析アミロイドーシスなど慢性透析合併症の原因になっていると考えられている^{36,37)}。血液透析の際の白血球の活性化の原因として、透析療法の開発初期より補体の活性化が注目されてきた。セルロース膜を用いた血液透析中に一過性に患者体内の血中白血球数の減少が観察され、後にこれはセルロース膜の水酸基による補体の活性化が原因であることが示された³⁸⁾。それゆえ、補体の活性化を回避することにより血液透析膜の生体適合性の改善がなされてきた。一方で透析膜の血小板に対する影響については回路内血栓形成や凝集など、主に抗血栓性について検討されていたが³⁹⁾、血液透析の際に血小板と好中球の複合体が観察されることが報告されて以来¹⁾、血小板の活性化を介した白血球活性化も注目されつつある⁴⁰⁾。そこで長期透析合併症の病態形成におけるP-セレクチンとPSGL-1を介した血液細胞間の相互作用の関与を明らかにするため、血液透析膜と血小板、好中球の相互作用についての解析を行った⁴¹⁾。市販透析器より取り出した各種透析膜 (EVAL, エチレンビニルアルコール共重合体; RC, 再生セルロース; CDA, セルロースジアセテート; CTA, セルローストリアセテート; PS, ポリスルホン; PMMA, ポリメチルメタクリレート, Fig. 9) を細断し、血小板および好中球との接着性を検討した結果、EVAL、RC、CDA、CTAといった親水性の透析膜に対しては血小板の接着は低く、一方でPMMA、PSといった疎水性の透析膜においては血小板が強く接着することが示された (Fig. 10)。またセルロースの水酸基を酢酸エステル

1) Hydrophilic membranes



2) Hydrophobic membranes

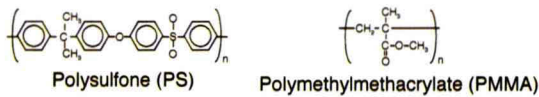


Fig. 9 Materials of hemodialysis membranes used in this study.

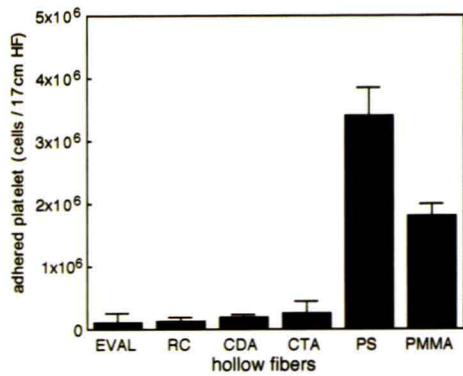


Fig. 10 Adhesion of platelets to hemodialysis membranes. Fluorescently-labeled platelets were suspended in autologous plasma (a) or whole blood (b) and incubated with hemodialysis membranes at 37°C for 1 hr. After unadhered platelets were removed by washing with PBS, platelets adhering to the membranes were lysed with 1% Triton X-100, and the fluorescence in the lysate was measured with a fluorescence spectrophotometer.

化したCDA、CTAにおいては酢酸置換の程度に応じて血小板の接着が強くなる傾向にあった。このことから血小板は親水性の透析膜よりも疎水性の透析膜に強く接着する傾向にあることが示された。一方で好中球の各種透析膜に対する接着はPS膜においては他の約2倍の接着が見られたものの、他の材質間での差は認められなかった。透析膜とのインキュベーションによる血小板表面のP-セレクチンの発現を検討した結果、PS膜、PMMA膜とのインキュベーションにより浮遊血小板および透析膜に粘着した血小板においてP-セレクチンの発現が誘導されていることが確認された (Fig. 11A and B)。一方でEVAL膜とのインキュベーションでは血小板表面のP-セレクチン発現は誘導されなかった。ここまでの結果より疎水性の透析膜においては親水性の透析膜と比して血小板の粘着とP-セレクチンの発現が強く誘導されることが示された。次に各種透析膜とのインキュベーションによる好中球からの活性酸

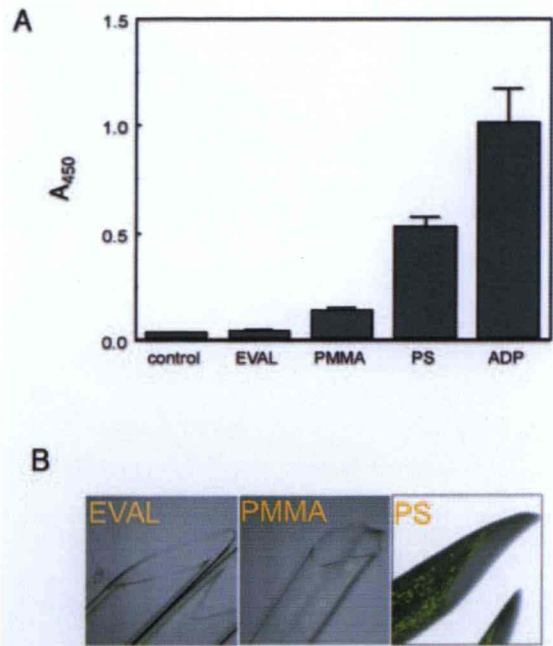


Fig. 11 Expression of P-selectin on the surface of platelets after co-incubation with hemodialysis membranes. A, Expression of P-selectin on platelets in suspension. PRP (platelet rich plasma) was incubated with hemodialysis membranes at 37°C for 1 hr. Platelets were then fixed with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min, and the expression of P-selectin on the platelet surface was measured by cell-based ELISA. Platelets were activated with ADP (adenosine 5'-diphosphate, 20 mM) for a positive control. B, Expression of P-selectin on platelets adhered to hemodialysis membranes. PRP was incubated with hemodialysis membranes at 37°C for 1 hr. Platelets on hemodialysis membranes were fixed with 1% formaldehyde, and then immunofluorescently stained with the combination of anti-P-selectin antibody (2D7) and Alexa Fluor 488-conjugated anti mouse IgG.

素産生について検討した。血小板の関与を調べるため、好中球を血漿に懸濁（血小板非存在）および血小板血漿（血小板存在）に懸濁して検討した結果、血小板非存在下においてはPS膜とインキュベートした好中球のみ活性酸素産生が誘導されたが、血小板存在下においてはPS膜とのインキュベーションによる好中球の活性酸素産生が増強され、またPMMAにおいて好中球からの活性酸素産生の誘導が観察された (Fig. 12C and D)。親水性の透析膜であるRC膜およびEVAL膜とのインキュベーションでは血小板の存在/非存在にかかわらず活性酸素産生は誘導されなかった (Fig. 12A and B)。血小板の粘着/活性化を誘導する疎水性の透析膜とのインキュベーションにより血小板の存在下で好中球からの活性酸素産生が誘導あるいは促進されることから、血小板が透析膜とのインキュベーションによる好中球からの活性酸素産生に対して促進的な役割を果たしていることが示唆された。このことをさらに検証するため、疎水性の透析膜とインキュベートした血小板に好中球との複合体形成能および好中球活性化能があるかどうか検討した。PS膜あるいはPMMA膜と予めインキュベートした血小板は好中球と複合

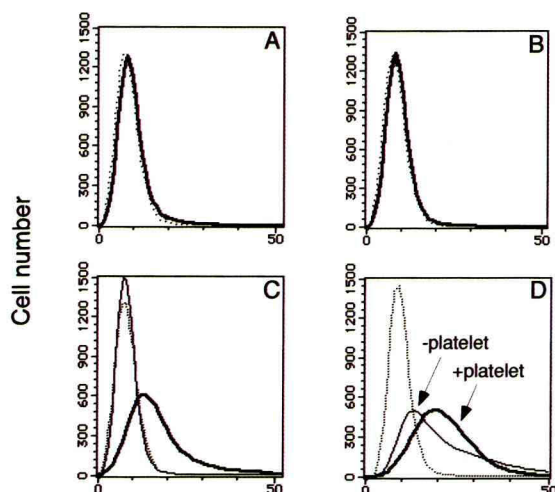


Fig. 12 Production of intracellular hydroperoxide in neutrophils incubated with hemodialysis membranes in the presence or absence of platelets. Human neutrophils were suspended in plasma (-platelets) or platelet-rich plasma (+platelets) and incubated with hemodialysis membranes for 30 min. After the addition of 2', 7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, 0.1 mM) to the suspension, the mixture was incubated for 30 min. The generation of the oxidized form of DCFH was assayed by flow cytometry. *Dotted line*, neutrophils incubated without hemodialysis membranes; *thin line*, neutrophils incubated with hemodialysis membranes in the absence of platelets; *thick line*, neutrophils incubated with hemodialysis membranes in the presence of platelets. (a), RC membranes; (b), EVAL membranes; (c), PMMA membranes; (d), PS membranes. Representative data of three experiments are shown.

体を形成し (Fig. 13A and B)、これは抗P-セレクチン抗体で抑制され、さらに好中球からの活性酸素産生が誘導されることが示された (Fig. 13C)。以上の結果より、血液透析の際の好中球の活性化において血小板が仲介的な役割を果たしている、すなわち透析膜と血小板の接触が血小板の活性化を引き起こし、血小板表面のP-セレクチンの発現を誘導し、このP-セレクチンを介して好中球と複合体を形成し好中球の活性酸素産生を引き起こすことが示唆された。透析膜の生体適合性においては透析膜による補体の活性化が重要視され^{42,43)}、再生セルロースのような親水性の透析膜よりも水酸基を置換したセルロースアセテートあるいはPS膜のような疎水性の合成高分子膜が開発されてきた。しかしながら今回の結果より、透析膜の生体適合性を考える上で透析膜が血小板に与える影響も考慮するべきであり、新規合成透析膜の開発の際には補体活性化能および血小板活性化能の両方を評価することが望まれる。

血液透析の際の白血球の活性化には血小板の活性化を基点とするメカニズムが存在することが示されたが、その一方で好中球の側も透析膜との接触により何らかの変化を起こし、血液透析による白血球の活性化に影響を及ぼしている可能性がある。すなわち血液透析膜との接触により、先に述べたケモカインによるキャップ形成のような好中球表面のPSGL-1の分布変化が起こり、血小板

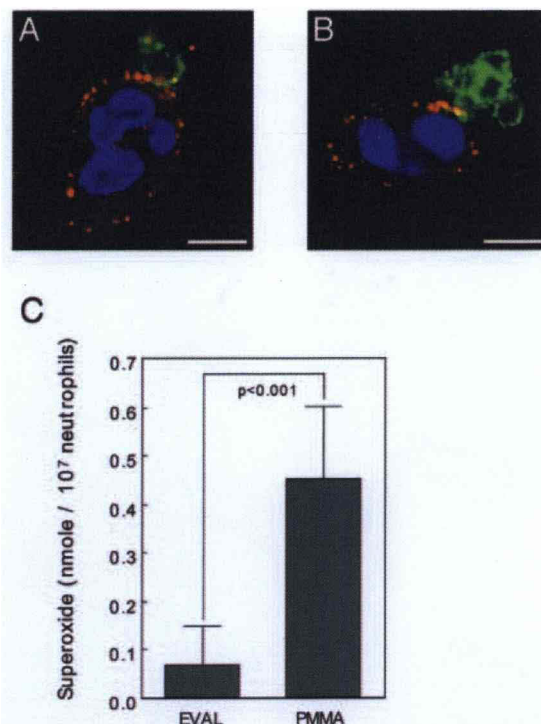


Fig. 13 Interaction between neutrophils and platelets previously incubated with hemodialysis membranes.

A and B, Formation of a platelet-neutrophil microaggregate after co-incubation with hemodialysis membranes. PRP was incubated with PS (A) or PMMA (B) membranes at 37°C for 1 hr. Platelets were then mixed with neutrophils, and the mixture was incubated at 37°C for 30 min. The cells were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Activated platelets were stained with anti-P-selectin antibody (2D7) plus Alexa Fluor 488-conjugated anti-IgG (green). Neutrophils were stained with a combination of anti-sialyl Le^x carbohydrate antibody (KM93), biotinylated anti-IgM antibody, and Alexa Fluor 555-conjugated streptavidin (red). The nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). The cells were observed with a confocal laser scanning microscope. Scale bar, 5 mm. C, Production of superoxide anion by neutrophils after co-incubation with platelets pretreated with hemodialysis membranes. The neutrophil suspension (1×10^6 cells, 50 μ L) was mixed with a platelet suspension (50 μ L) that had been treated with EVAL membranes or PMMA membranes, and the cells were incubated at 37°C for 90 min in the presence of cytochrome *c*. After centrifugation of the mixture at 5,000 rpm for 10 min, the supernatant was measured for A₃₄₀, A₅₅₀, and A₅₆₀. Superoxide anion was determined by the change in A₅₅₀ caused by the reduction of cytochrome *c*.

とのP-セレクチン依存的な相互作用に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、血液透析膜との接触による好中球のPSGL-1の分布変化について検討した。血液をPS膜と混和し37°Cで20分インキュベートしたところ、好中球をIL-8で処理した際と同様な好中球のPSGL-1のキャップ形成が観察された (Fig. 14)。好中球を血漿に懸濁し、透析膜とインキュベートした際にもこの現象が観察されたことから、この現象には他の血液細胞は必要でないことが示された。透析膜と好中球の直接の接触がPSGL-1のキャップ形成に必要であるか否か検討するため、あらかじめ血漿と透析膜を37°Cで20分インキュベートし、

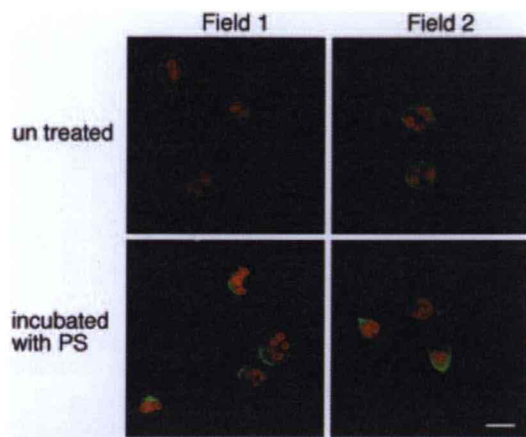


Fig. 14 The cap-formation of PSGL-1 on human neutrophils incubated with hemodialysis membranes. Human neutrophils were suspended in autologous platelet rich plasma (PRP) at 2×10^6 cells/ml and incubated with pieces of PS membranes at 37°C for 20 min. The cells were fixed with 1% formaldehyde and stained PL1 (anti-PSGL-1 antibody) plus Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibody. The nuclei were stained with propidium iodide. After staining, the cells were observed using a confocal laser scanning microscope. Bar, $10 \mu\text{m}$.

回収した血漿による好中球表面のPSGL-1のキャップ形成の有無を検討した結果、透析膜処理血漿中にキャップ形成が認められたことから (Fig. 15)、キャップ形成には透析膜と好中球の直接の接触は不要であり、透析膜と血漿の接触により血漿中にPSGL-1キャップ形成誘導活性が生じていることが示された。他の材質の透析膜においてもこの現象が観察されるか調べるため、各種透析膜処理血漿のPSGL-1キャップ形成誘導活性を比較した結果、PS膜以外にRC膜と処理した血漿中に高いキャップ形成誘導活性が認められ (Fig. 16A)、RC膜の水酸基を酢酸エステル化したCDA、CTA膜と処理した血漿では、RC膜処理血漿と比してキャップ誘導活性の低下が認められた (Fig. 16B)。RC膜は補体活性化能が比較的高いことが知られている。それゆえ、透析膜処理血漿中のPSGL-1キャップ形成誘導活性は補体の活性化に伴って生じるC3aやC5aといったアナフィラトキシンによる可能性が考えられた。そこでC3a、C5aのアンタゴニストであるSB290157、W-54011によってRC膜処理血漿によるPSGL-1キャップ形成が抑制されるかどうか検討したところ、C5aアンタゴニストW-54011によってPSGL-1のキャップ形成は完全に抑制された (Fig. 17)。この結果より、透析膜処理血漿中に生じたC5aがPSGL-1のキャップ形成を誘導していることが示唆された。このことは血漿をあらかじめ 56°C で30分処理することにより補体を非働化した場合、透析膜とインキュベートしてもPSGL-1キャップ形成誘導活性が生じないことから確認された。

透析膜処理血漿による好中球表面のPSGL-1のキャップ形成は、IL-8処理好中球で示したように、活性化血小板との相互作用を促進する影響する可能性が考えられる。

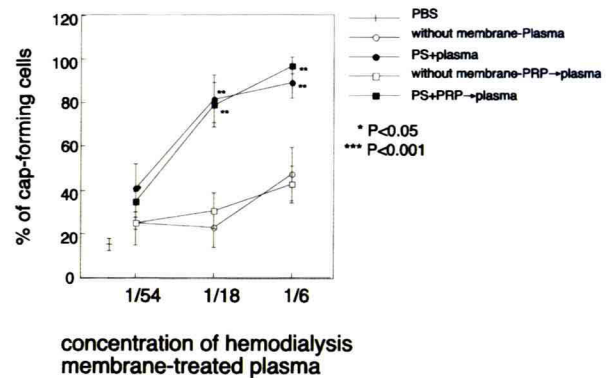


Fig. 15 The cap-formation of PSGL-1 on human neutrophils by hemodialysis membrane-treated plasma. Human plasma and platelet rich plasma isolated from heparinized blood were treated with pieces of PS membranes at 37°C for 1 hr. The plasma was recovered, diluted, and mixed with peripheral neutrophils (1×10^6 cells/ml). The mixture was incubated at 37°C for 20 min. The cells were then fixed with 1% formaldehyde and stained with PL1 plus Alexa Fluor 488-conjugated anti-IgG antibody. After staining, the cells were observed using a confocal laser scanning microscope. The cap-forming neutrophils were counted in five fields.

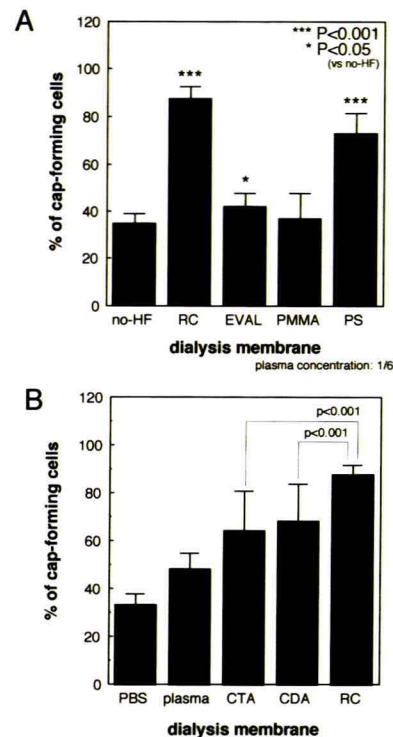


Fig. 16 The cap-formation of PSGL-1 on neutrophils by the plasma treated with various hemodialysis membranes. Human plasma isolated from heparinized blood was treated with pieces of various hemodialysis membranes at 37°C for 1 hr. The recovered plasma was diluted to one sixth and mixed with human neutrophils (1×10^6 cells/ml), and the mixture was incubated at 37°C for 20 min. The cells were fixed and stained with PL1 plus Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. The cap-forming neutrophils were counted in five fields. A, Comparison among RC and synthetic membranes. B, Comparison among RC and modified cellulosic membranes.

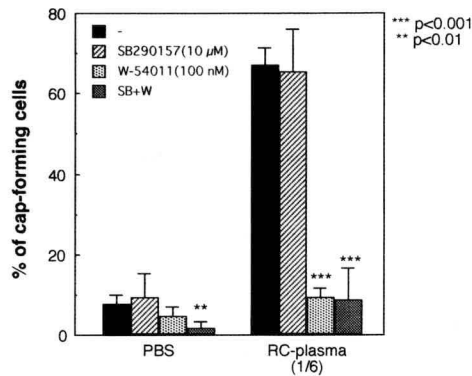


Fig. 17 The effect of anaphylatoxin inhibitors on the cap-formation of PSGL-1 on neutrophils by the plasma treated with RC membrane. Human plasma was treated with pieces of RC membranes at 37°C for 1 hr. The recovered plasma was diluted to one sixth and mixed with human neutrophils (1×10^6 cells/ml), and the mixture was incubated at 37°C for 20 min in the presence or absence of C3a antagonist, SB290157 (10 μM) or C5a antagonist, W-54011 (100 nM). The cells were then fixed and stained with PL1 plus Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. The cap-forming neutrophils were counted in five fields.

そこで好中球-血小板複合体形成に対する透析膜処理血漿の影響を検討した。ヘパリン加血液にトロンビン処理血小板を添加し、さらに透析膜処理血漿を加え、37°Cで20分インキュベートした後、フローサイトメーターで複合体形成を測定した。その結果、活性化血小板の割合が低い場合に好中球-血小板複合体形成が促進されることが示された (Fig. 18)。この結果よりPSGL-1のキャップ形成による好中球-血小板複合体形成促進効果は、血液透析時のような血小板の活性化が低い場合に特に意味を持つと考えられた。血液透析の際の白血球活性化の指標としては、Mac-1 ($\alpha M \beta 2$ インテグリン)をはじめとする接着分子の発現上昇が繁用されているが、透析膜処理血漿によるPSGL-1のキャップ形成はMac-1の発現上昇よりも低濃度の血漿で誘導され、血小板との相互作用を促進しうることから、血小板活性化を介した白血球の活性化を評価するためにはより高感度な指標となりうると考えられる。

以上より、血液透析における白血球の活性化は透析膜と血小板の接触により血小板が活性化し、血小板表面でのP-セレクチンの発現が誘導され、このP-セレクチンを介して好中球と複合体形成を形成し、好中球の活性酸素産生が誘導される。その一方で透析膜と血漿の接触により血漿中の補体の活性化が誘導され、これに伴って生じるアナフィラトキシンC5aが好中球表面のPSGL-1のキャップ形成を引き起こし、血小板との複合体形成および好中球の活性化が促進されることが示された (Fig. 19)。このように血液透析の際には血小板と補体の活性化が協調して好中球の活性化を促進するというメカニズムが考えられる。血液透析膜の生体適合性についてはこれまで補体の活性化による白血球活性化が主に注目されてきたが、

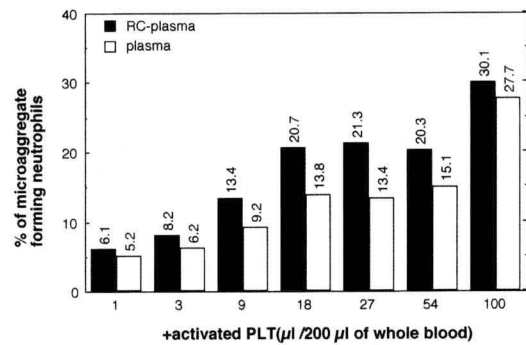


Fig. 18 Enhancement of platelet-neutrophil microaggregate formation by the RC membrane-treated plasma. Human plasma was treated with pieces of RC membranes at 37°C for 1 hr. The recovered plasma (1:6 dilution) was mixed with heparinized blood and various number of thrombin-activated platelets. The mixture was incubated at 37°C for 20 min, and platelet-neutrophils microaggregates were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-P-selectin antibody. Erythrocytes were lysed with FACS lysing solution, and the cell suspension was subjected to flow cytometric analysis. Neutrophils were gated for forward-scatter versus side-scatter plotting. The fluorescence associated with neutrophils was measured. Data for 10,000 cells were collected.

今回の結果より血小板の活性化を起点とした白血球の活性化も考慮するべきであると思われる。

この血液透析に伴う白血球の活性化は、生体適合性の高い透析膜を使用することで低減できると思われるが、血管内皮細胞に匹敵する生体適合性を持った透析膜はまだ開発されていない。そこで現在用いられている透析膜の生体適合性を向上させることを目的として、透析膜との接触による血液細胞の活性化を抑制する薬剤の探索を試みている。血液透析は週三回、一生にわたって繰り返される療法であることから、候補となる薬剤は安全性が確立されており、コストも低ければなおよい。最近、我々はこの条件を満たす候補物質としてビタミンEを見出した。ビタミンEは透析膜とのインキュベートによる血小板のP-セレクチン発現誘導を抑制し、好中球からの活性酸素産生も抑制した。この活性酸素産生抑制効果はビタミンEの活性酸素消去作用と血小板の活性化抑制作用の両方によるものであると考えられる。今後、このビタミンEの効果についてさらに検討するとともに、新たな薬剤を検索することにより、長期透析合併症を予防する薬剤を見出したいと考えている。

最後に

以上、P-セレクチンとそのリガンドPSGL-1を介した血液細胞の相互作用に関する研究成果を紹介した。今後はPSGL-1を介したシグナル伝達経路およびインテグリンなど他の接着分子も含めて、接着分子の細胞表面における局在変化を介した接着調節機構について明らかにしたい。また長期透析合併症に限らず、生体防御および炎症性疾患におけるP-セレクチン-PSGL-1相互作用の関与を明らかにし、P-セレクチン-PSGL-1相互作用を標

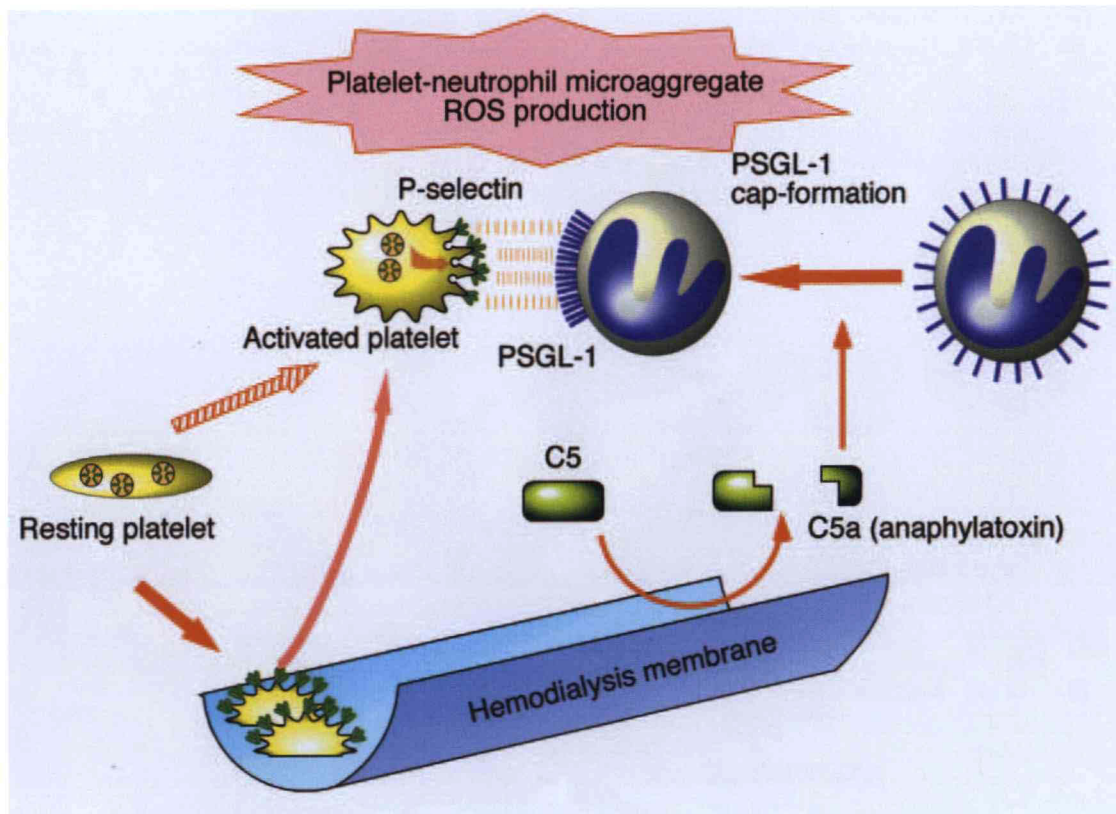


Fig. 19 A model for platelet-mediated activation of neutrophils during hemodialysis.

的にした医薬の開発につなげたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、平成17年度星薬科大学大谷研究助成金を賜りまして、深くお礼申し上げます。

本研究をご指導いただきました星薬科大学微生物学教室、辻勉教授に心より感謝致します。また本研究に多大なご協力をいただきました微生物学教室の皆様にも深く感謝致します。

参考文献

- 1) Gawaz, M.P., Mujais, S.K., Schmidt, B. and Gurland, H.J. (1994) *Kidney Int* 46, 489-95.
- 2) Ott, I., Neumann, F.J., Gawaz, M., Schmitt, M. and Schomig, A. (1996) *Circulation* 94, 1239-46.
- 3) Kirschenbaum, L.A., Adler, D., Astiz, M.E., Barua, R.S., Saha, D. and Rackow, E.C. (2002) *Shock* 17, 508-12.
- 4) Irving, P.M., Macey, M.G., Shah, U., Webb, L., Langmead, L. and Rampton, D.S. (2004) *Inflamm Bowel Dis* 10, 361-72.
- 5) McEver, R.P. (1994) *Curr Opin Immunol* 6, 75-84.
- 6) Sako, D. et al. (1993) *Cell* 75, 1179-86.
- 7) Wilkins, P.P., Moore, K.L., McEver, R.P. and Cummings, R.D. (1995) *J Biol Chem* 270, 22677-80.
- 8) Etzioni, A. and Tonetti, M. (2000) *Immunol Rev* 178, 138-47.
- 9) Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O. and Wagner, D.D. (1993) *Cell* 74, 541-54.
- 10) Labow, M.A. et al. (1994) *Immunity* 1, 709-20.
- 11) Frenette, P.S., Mayadas, T.N., Rayburn, H., Hynes, R.O. and Wagner, D.D. (1996) *Cell* 84, 563-74.
- 12) Kunkel, E.J. and Ley, K. (1996) *Circ Res* 79, 1196-204.
- 13) Nagata, K., Tsuji, T., Todoroki, N., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Hanai, N. and Irimura, T. (1993) *J Immunol* 151, 3267-73.
- 14) Blanks, J.E., Moll, T., Eytner, R. and Vestweber, D. (1998) *Eur J Immunol* 28, 433-43.
- 15) Nagata, K., Tsuji, T., Matsushima, K., Hanai, N. and Irimura, T. (2000) *Int Immunol* 12, 487-92.
- 16) Hidari, K.I., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A. and McEver, R.P. (1997) *J Biol Chem* 272, 28750-6.
- 17) Evangelista, V. et al. (1999) *Blood* 93, 876-85.
- 18) Ma, Y.Q., Plow, E.F. and Geng, J.G. (2004) *Blood* 104, 2549-56.

- 19) Koike, J., Nagata, K., Kudo, S., Tsuji, T. and Irimura, T. (2000) *FEBS Lett* 477, 84-8.
- 20) Handa, K., Jacobs, F., Longenecker, B.M. and Hakomori, S.I. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 285, 788-94.
- 21) Rajendran, L. and Simons, K. (2005) *J Cell Sci* 118, 1099-102.
- 22) Katagiri, Y.U., Kiyokawa, N. and Fujimoto, J. (2001) *Microbiol Immunol* 45, 1-8.
- 23) Leitinger, B. and Hogg, N. (2002) *J Cell Sci* 115, 963-72.
- 24) Kwiatkowska, K., Frey, J. and Sobota, A. (2003) *J Cell Sci* 116, 537-50.
- 25) Razzaq, T.M., Ozegbe, P., Jury, E.C., Sembi, P., Blackwell, N.M. and Kabouridis, P.S. (2004) *Immunology* 113, 413-26.
- 26) Draber, P. and Draberova, L. (2002) *Mol Immunol* 38, 1247-52.
- 27) Petrie, R.J., Schnetkamp, P.P., Patel, K.D., Awasthi-Kalia, M. and Deans, J.P. (2000) *J Immunol* 165, 1220-7.
- 28) Urzainqui, A. et al. (2002) *Immunity* 17, 401-12.
- 29) Serrador, J.M., Urzainqui, A., Alonso-Lebrero, J.L., Cabrero, J.R., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M., Yanez-Mo, M. and Sanchez-Madrid, F. (2002) *Eur J Immunol* 32, 1560-6.
- 30) Snapp, K.R., Heitzig, C.E. and Kansas, G.S. (2002) *Blood* 99, 4494-502.
- 31) Foger, N., Marhaba, R. and Zoller, M. (2001) *J Cell Sci* 114, 1169-78.
- 32) Yago, T., Leppanen, A., Qiu, H., Marcus, W.D., Nollert, M.U., Zhu, C., Cummings, R.D. and McEver, R.P. (2002) *J Cell Biol* 158, 787-99.
- 33) Li, N., Hu, H., Lindqvist, M., Wikstrom-Jonsson, E., Goodall, A.H. and Hjendahl, P. (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2702-8.
- 34) Zachara, B.A., Salak, A., Koterska, D., Manitius, J. and Wasowicz, W. (2004) *J Trace Elem Med Biol* 17, 291-9.
- 35) Alhamdani, M.S., Al-Najjar, A.F. and Al-Kassir, A.H. (2005) *Int J Artif Organs* 28, 576-82.
- 36) Huysmans, K., Lins, R.L., Daelemans, R., Zachee, P. and De Broe, M.E. (1998) *J Nephrol* 11, 185-95.
- 37) Miyata, T., Ueda, Y., Saito, A. and Kurokawa, K. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 1, 25-8.
- 38) Kormoczi, G.F., Rosenkranz, A.R. and Zlabinger, G.J. (1999) *Clin Chem Lab Med* 37, 351-5.
- 39) Simon, P., Ang, K.S. and Cam, G. (1987) *Nephron* 45, 172-3.
- 40) Bonomini, M., Sirolli, V., Stuard, S. and Settefrati, N. (1999) *Artif Organs* 23, 23-8.
- 41) Itoh, S., Susuki, C. and Tsuji, T. (2006) *J Biomed Mater Res A*.
- 42) Ivanovich, P., Chenoweth, D.E., Schmidt, R., Klinkmann, H., Boxer, L.A., Jacob, H.S. and Hammerschmidt, D.E. (1983) *Kidney Int* 24, 758-63.
- 43) Hakim, R.M., Fearon, D.T. and Lazarus, J.M. (1984) *Kidney Int* 26, 194-200.

The blood cell interactions mediated by the adhesion molecules, P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)

Saotomo ITOH

Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Japan

P-selectin is a member of the selectin family of adhesion molecules. This molecule is expressed on activated endothelial cells and platelets, and mediates adhesion of these cells to leukocytes via interaction between P-selectin and a counter ligand on the leukocyte cell surface, designated as P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). The adhesion of these cells is considered to be responsible for the recruitment of leukocytes to inflammatory tissues and hemorrhagic sites. The ligation of P-selectin and PSGL-1 induces activation of leukocytes including production of reactive oxygen species and cytokines. The interaction is thus likely to regulate leukocyte functions. In this study, our research group examined the alteration of intracellular distribution of PSGL-1 after chemokine stimulation of neutrophils and its relevance to cellular functions, and also assessed the pathophysiological significance of the leukocyte-platelet interaction, especially potential involvement in hemodialysis-associated complications. The results are summarized as follows: 1) PSGL-1 was redistributed to one end of the cell to form a cap-like structure in chemokine-treated neutrophils. Several cell adhesion molecules have been reported to be distributed in cholesterol-enriched intramembranous domain (lipid microdomain), and functions of the adhesion molecules are greatly affected by environmental membrane lipids. The cap-formation of PSGL-1 was found to require for the integrity of lipid microdomains. 2) The cap-formation of PSGL-1 up-regulated neutrophil-platelet microaggregate formation and neutrophil activation induced by cross-linking of PSGL-1. 3) During hemodialysis, platelets activated through the interaction with hemodialysis membranes stimulated neutrophils to form P-selectin-mediated microaggregates. 4) Anaphylatoxin C5a produced by the contact of plasma with hemodialysis membranes induced the cap-formation of PSGL-1, and enhanced the neutrophil-platelet microaggregate formation.

These findings suggest that the P-selectin-PSGL-1 interaction is modulated by distribution of these adhesion molecules on the cell surface, and is involved in the regulation of blood cell cross-talk which is responsible for the pathogenesis of various disorders including inflammatory and immunological processes.