

血小板と白血球の相互作用  
—セレクチンと糖鎖を介した接着による白血球活性化—

辻 勉

星薬科大学 微生物学教室

Platelet-Leukocyte Interaction—Leukocyte activation through the Interaction  
between Selectins and Their Carbohydrate Ligands

Tsutomu TSUJI

*Department of Microbiology, Hoshi University*

はじめに

血小板の最も主要な機能は、血管の損傷などの血管の異常にすばやく応答して自ら凝集塊を形成し、また血液凝固系を作動させ止血機構の始動を通して血液循環系を維持することにある。また一方で、止血に必要な血小板凝集塊の形成は、脳梗塞や心筋梗塞などの血栓形成疾患の元凶ともなり、生体防御システムの微妙なゆらぎが重篤な疾

患の原因となるひとつの例でもある。血栓をよく調べてみると、活性化された血小板の凝集塊の中に白血球が混在することがしばしば観察される。赤血球は白血球の数百倍もの数が血液中に存在するにもかかわらず、その存在がほとんど認められないことから、活性化された血小板と白血球との特異的な相互作用の存在が示唆されていた。Fig. 1 は初期の動脈硬化に陥った血管の走査電子顕微鏡像であるが、活性化血小板からなる微小血栓が

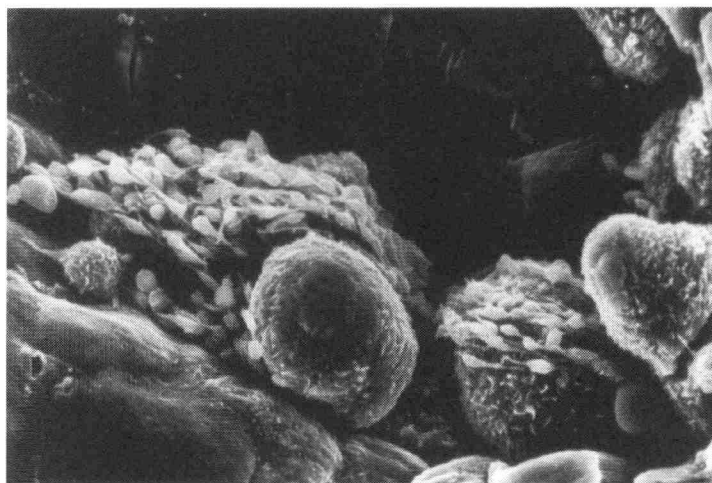


Fig. 1. Scanning electron microscopic observation of the adhesion between platelets and leukocytes.

白血球にまとわりついているのがわかる。このような像は炎症局所や動脈硬化巣によく見られると言われている。*in vitro* においても、血小板が活性化されると、特に好中球や単球などの白血球に接着することが観察される。活性化血小板に白血球が接着することは、血管損傷部位に形成された血栓に白血球を集積させ感染からの防御の役割を担うと考えられている。

最近、細胞接着を媒介とした細胞間の協同作用が生物現象のいろいろな局面において重要な役割を演じていることが報告されてきている。このような細胞接着反応においては、細胞と細胞とが物理的に結合するというばかりでなく、接着分子を介して細胞間の情報交換が行なわれることが示されている。本研究においても、活性化血小板との接着による白血球の機能変化について解析し、血小板と白血球の相互作用の生理的あるいは病理的な意義を考察した。

### 1. 血小板と白血球の接着に関わる接着分子セレクトリン

活性化血小板と白血球との接着に関わる血小板側の分子はP-セレクトリンと呼ばれる糖鎖結合性の細胞接着分子である。P-セレクトリンは、活性化された血小板に特異的なモノクローン抗体に対応する分子量 140 kDa の抗原として 1984 年に発見された。活性化を受けていない血小板においてはアルファ顆粒と呼ばれる細胞内顆粒の膜に存在し、トロンビンやヒスタミンなどの刺激による血

小板の活性化にともなって細胞表面にすみやかに移動することから、GMP-140 (granule membrane protein-140) あるいは PADGEM (platelet activation-dependent granular-external membrane) protein と命名された。その後、この分子は血管内皮細胞の顆粒 (Weibel-Palade body) にも存在し、細胞の活性化に伴い、血小板の場合と同様に細胞表面に移動することがわかった。そして、この分子が血小板と白血球あるいは血管内皮と白血球との接着を媒介することが明らかにされ細胞接着分子の仲間入りをすることになった。

1989 年 P-セレクトリンの cDNA がクローニングされ、その分子構造が明らかにされた<sup>1)</sup>。P-セレクトリンはいくつかの機能的ドメインが連結しているモザイク分子で、いわゆる I 型の膜糖たんぱく質であり、膜貫通ドメインを挟んで N 末端側が大きな細胞外領域、C 末端側が短い細胞内領域という配向性をもつ。N 末端にはカルシウム依存性のレクチン (C 型レクチン) と相同性の高い糖認識ドメイン (carbohydrate recognition domain, CRD) が存在し、ついで上皮増殖因子 (EGF) 様ドメイン、そして補体結合たんぱく質に共通にみられる SCR (short consensus repeat) が 9 回繰り返す構造を有している (Fig. 2)。細胞外領域の細胞膜から最も遠くに位置するレクチンドメインがリガンドとなる糖鎖との結合に直接的に関わり、EGF 様ドメインや補体結合たんぱく質様ドメインもリガンドとの結合に補助的な役割を担っている。

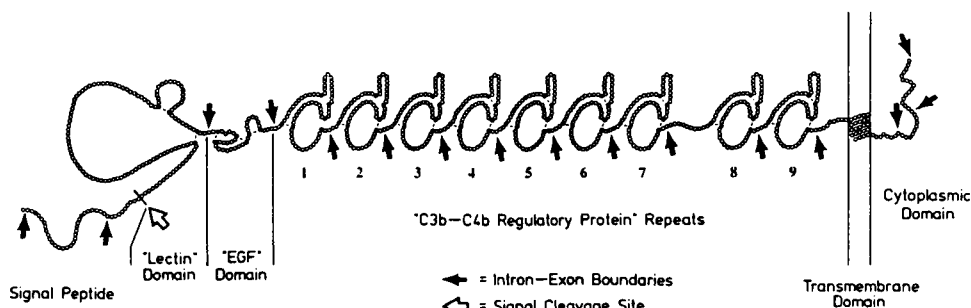


Fig. 2. Structure of P-selectin<sup>4)</sup>.

P-セレクトインと類似の構造をもつ2種類の分子が、白血球と血管内皮細胞とにそれぞれ発現していることが判明し、ファミリーを形成する分子群であることがわかった<sup>2-4)</sup>。それらの分子のcDNA クローニングもほぼ同時期に行なわれ、いずれも分子内に糖結合たんぱく質であるレクチン(lectin)と相同のドメインをもち、これが接着する相手の細胞の表面糖鎖を識別し選択する(select)ことからセレクトイン(selectin)という統一的な名称が与えられた。それぞれの分子はP(血小板)、L(白血球)およびE(内皮細胞)というように頭文字を冠して呼ばれるようになった。CD番号においても同様にCD62P、CD62LおよびCD62Eと命名されている。

P-セレクトインは、血小板ばかりではなく活性化された血管内皮細胞にもE-セレクトインとともに発現し、協同して白血球の血管外浸潤に重要な役割を演じていることが最近注目されている。白血球が細菌感染部位や炎症組織へ浸出していく過程は複雑で、その第一段階として血流に乗って素早く流れていた白血球が血管壁に沿って転がる現象が観察される。この現象がローリングと呼ばれ、セレクトインと糖鎖との可逆的な結合によって媒介されることが明らかにされている。ローリングは白血球の移動速度を低下させ、引き続きおこる強固な接着および血管外遊走を容易にさせるという意義をもつと考えられている。すなわち、セレクトインは白血球の体内交通(leukocyte trafficking)を制御する細胞接着分子であるといえる。

## 2. P-セレクトインの糖鎖リガンド

P-セレクトインに対する白血球表面でのリガンド糖鎖は、フコース、シアル酸を含むルイス式血液型関連抗原であるシアリルルイスX(sLe<sup>x</sup>, シアリル CD15) 構造を含むものであることが示された<sup>5)</sup>(Fig. 3)。このことは、sLe<sup>x</sup> 抗原を細胞表面に高発現している好中球や単球が、そのような構造をほとんど持たない休止期のリンパ球に比べ、はるかに強く活性化内皮細胞や血小板に対してセ

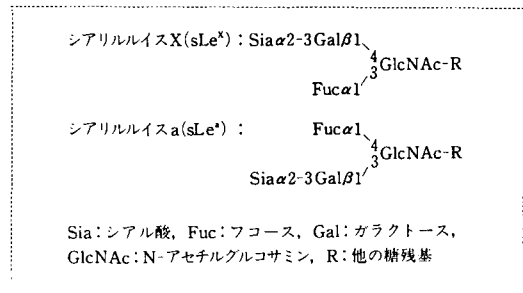


Fig. 3. Structures of carbohydrate ligands for P-selectin.

クチン依存的に接着するという事実とも合致する。sLe<sup>x</sup>の構造異性体であるシアリルルイスa(sLe<sup>a</sup>)糖鎖は、消化器系の腫瘍マーカーとして有名であり、やはりP-セレクトインのよいリガンドとなるが白血球には発現されていない。また、P-セレクトインはスルファチドなどの硫酸化糖脂質やヘパリンなどの硫酸化多糖にも結合するようである。sLe<sup>x</sup>糖鎖は、糖たんぱく質および糖脂質に結合した形で存在する。P-セレクトインに対するカウンター受容体として、PSGL-1(P-selectin glycoprotein ligand-1)と命名された糖たんぱく質が白血球表面に同定されている<sup>6)</sup>。この糖たんぱく質は、ポリペプチド鎖に多量に含まれるSerまたはThr残基に糖鎖が密集して結合したムチン様糖たんぱく質である。この糖鎖の末端に存在するsLe<sup>x</sup>糖鎖がP-セレクトインに対して親和性が高い。

## 3. 活性化血小板との接着により誘導される白血球活性化

ヒト末梢血より単離した好中球および単球を活性化血小板と接着させることにより、これら白血球の機能変化が誘導されるか査定した<sup>7)</sup>。まずはじめに白血球の重要な機能である活性酸素産生について調べた。単球を非活性化血小板と共培養したときのスーパーオキシドアニオンの産生量は両者の産生するbasal levelの和にほぼ相当する量であったが、トロンピンで活性化した血小板と共

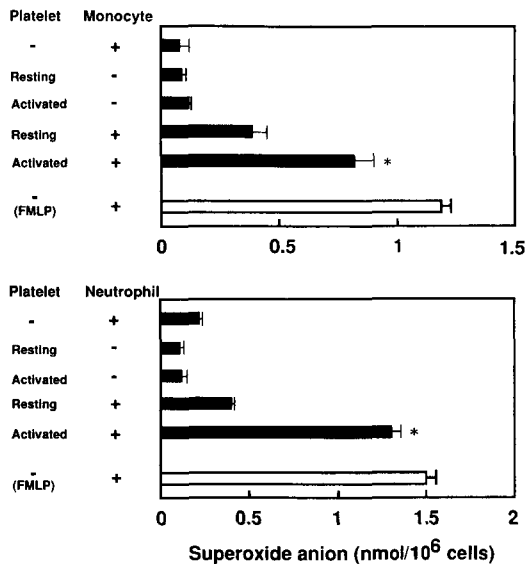


Fig. 4. Induction of superoxide anion ( $O_2^-$ ) production from leukocytes by the adhesion with activated platelets. Human monocytes or neutrophils purified from peripheral blood ( $2 \times 10^5$  cells) were cultured with thrombin-activated platelets ( $4 \times 10^7$  cells) at  $37^\circ\text{C}$  for 90 min. Superoxide anion in the supernatant was measured by the cytochrome *c* method.

培養すると、単球からのスーパーオキシド産生量の著しい増加が認められた (Fig. 4 上図)。好中球を用いた場合でも、単球の場合と同様な結果が得られた (Fig. 4 下図)。ここで見られた活性化血小板により誘導されたスーパーオキシド産生量は、FMLP などの走化性ペプチドにより産生される量に匹敵する量であった。

次に、活性化血小板の濃度依存性について調べた。活性化血小板の濃度を  $2.5 \sim 20 \times 10^7$  cells/mL と変化させると、加えた血小板の濃度に依存して単球あるいは好中球からのスーパーオキシドの産生が増加した (Fig. 5)。この活性化血小板と白血球との共培養系に、両細胞の接着を阻害する P-セレクトリンおよび sLe<sup>x</sup> 糖鎖に対するモノクローン抗体を添加しそれらの効果を検討した (Fig. 6)。その結果、抗 P-セレクトリン抗体あるいは

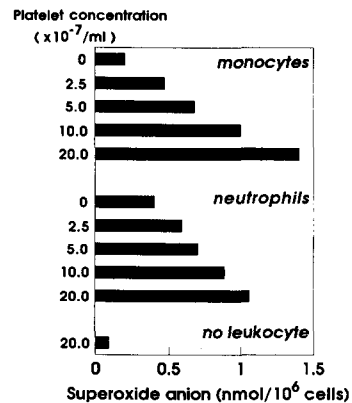


Fig. 5. Effect of activated platelets on superoxide anion release by leukocytes. Human monocyte or neutrophil suspension ( $2 \times 10^5$  cells) were cultured with various concentration of thrombin-activated platelets at  $37^\circ\text{C}$  for 90 min. Superoxide anion in the culture supernatant was measured.

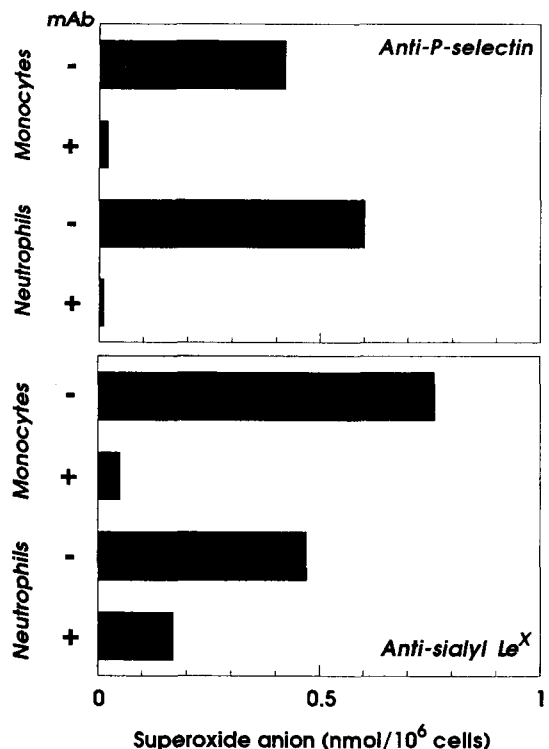


Fig. 6. Inhibition by antibodies against



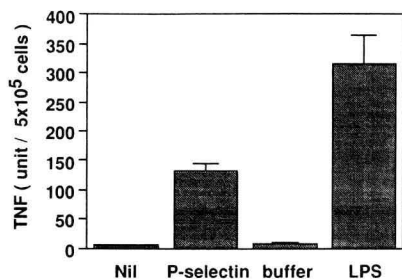


Fig. 9. Induction by P-selectin of tumor necrosis factor (TNF) release from human monocytes. Monocytes ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were incubated in a 96-well plate which had been coated with P-selectin ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 4 h. The amount of TNF in the culture supernatant was measured by the cytotoxic assay using L. P3 cells.

の約 30 倍に高まることを認めた (Fig. 9). このように P-セレクトインが白血球に結合することにより活性酸素産生ばかりでなくサイトカイン産生も促進されることが判明した。

以上の実験から、活性化血小板表面に発現誘導された P-セレクトインが白血球表面の sLe<sup>x</sup> 糖鎖を含む複合糖質受容体に結合することが引き金となって白血球機能の活性化がもたらされるものと考えられた (Fig. 10).

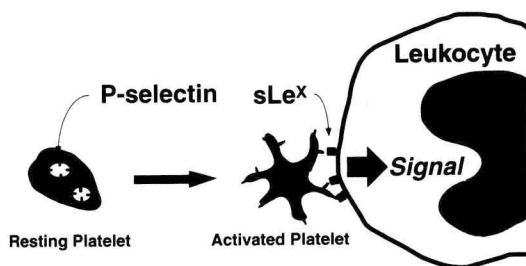


Fig. 10. Induction of leukocyte activation by the adhesion with activated platelets. In thrombin-activated platelets, P-selectin is rapidly translocated from  $\alpha$ -granule to the cell surface, where it binds to a sialyl Le<sup>x</sup>-containing receptor on monocytes or neutrophils. The binding may trigger to generate a signal which is transduced into the leukocyte.

#### 4. 白血球膜糖たんぱく質の糖鎖の役割

P-セレクトインに対する白血球表面の糖鎖受容体の性質を調べるために糖たんぱく質の糖鎖を修飾し、P-セレクトインに対する反応性を解析した。この実験においては、骨髓球系の白血病細胞株である HL-60 をジメチルスルホキシドで好中球様に分化させた細胞を用いた。この細胞をシアリダーゼで処理し、sLe<sup>x</sup> 糖鎖を分解すると、P-セレクトインに反応せずスーパーオキシドの産生誘導は認められなかった (Fig. 11)。次に、細胞の分化を誘導する間、糖たんぱく質糖鎖の生合成阻害剤を共存させ、細胞表面糖鎖を変化させた。Ser/Thr 結合型糖鎖の阻害剤である ベンジル-N-アセチルガラクトサミニド (Bz- $\alpha$ -GalNAc) を加えた場合やはりスーパーオキシドの産生誘導が抑制された。しかし、Asn 結合型糖鎖の生合成阻害剤であるデオキシマンノジリマイシン (1-deoxymannojirimycin) やスワインソニン (swainsonine) の共存下では、対照と比べほとんど影響はなかった。いずれの阻害剤を用いた場合にもホルボールエステル (PMA) に対する反応性は変化がなかったことから、NADPH オキシダーゼなどのスーパーオキシド産生系そのものが障害されたのではなく、P-セレクトインの糖鎖受容体の生合成が阻害されたためと考えられた。すなわち、P-セレクトインからの白血球の活性酸素産生の誘導シグナルを受容するために Ser/Thr 結合型糖鎖が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。さらに、このような糖鎖を多量に含むムチン様糖たんぱく質を選択的に分解するシアログリコプロテアーゼ (sialoglycoprotease) を細胞に作用させると同様に P-セレクトインに対する反応性が抑制されることから、Ser/Thr 結合型糖鎖の重要性が支持された<sup>9)</sup>。

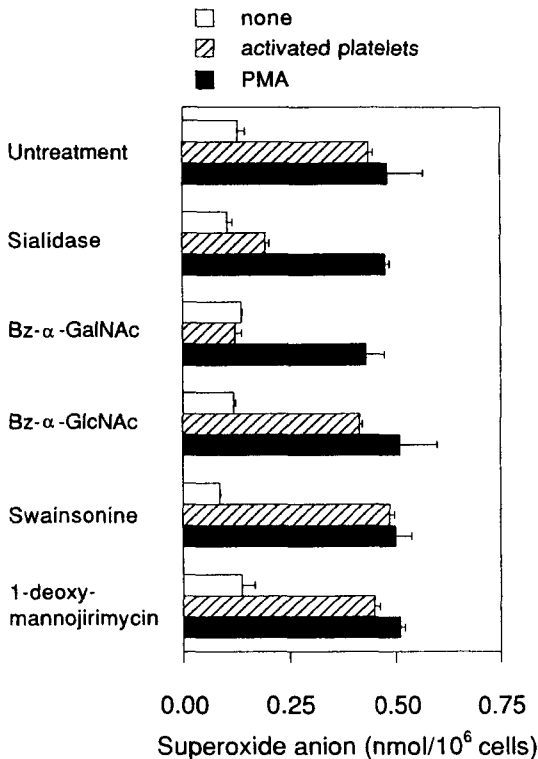


Fig. 11. Effects of the modification of granulocyte-like differentiated HL-60 cell surface carbohydrate chains on platelet-induced  $O_2^-$  generation. Cells were pretreated with various reagents and incubated with activated platelets (hatched bar) or PMA (solid bar) at 37°C for 90 min in the presence of cytochrome c.

##### 5. 血小板-白血球相互作用の炎症反応における意義

P-セレクトリンと糖鎖の相互作用は、白血球を血管の損傷部位に集積させるばかりでなく、白血球内にシグナルを伝達し細胞機能を調節する役割をもつことが明らかとなった。また、P-セレクトリンと血小板活性化因子 (PAF) との共同作用により、細胞内カルシウムイオンの上昇、 $\beta_2$  インテグリン (CD11/CD18) の機能的な活性化、MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) や 腫瘍壊死

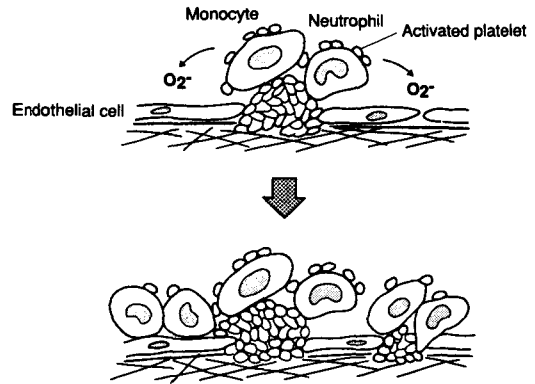


Fig. 12. Schematic representation of the possible involvement of activated platelets in the progression of vascular inflammation. In injured sites on vascular endothelium, neutrophils and monocytes attached to platelet aggregates produce oxygen radicals such as  $O_2^-$ . These oxygen radicals induce endothelial cells to express P-selectin molecules on their surface. The P-selectin molecule newly expressed on endothelium captures another leukocyte. Oxygen radicals are also toxic for endothelial cells and cause endothelium damage. Consequently, another thrombus forms in the adjacent area, and more leukocytes are accumulated at the site. This process seems to initiate a chain reaction.

因子  $TNF-\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) などのサイトカインの産生および分泌も誘導されることが示されている<sup>10)</sup>。私達の研究においても、インターロイキン-1 (IL-1) やインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を血小板に作用させると、低濃度のトロンビンに反応してP-セレクトリンの細胞表面への発現が増加し、結果として白血球との接着反応が増強されることが観察されている<sup>11)</sup>。この結果は、炎症組織の血小板がトロンビンなどの血小板活性化物質に対して感受性が高まっていることを示している。また、好中球をインターロイキン-8 (IL-8) や顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) で前処

理すると、P-セレクトイン依存的なスーパーオキシド産生が増強される。IL-8やG-CSFは、単球、線維芽細胞あるいは血管内皮細胞からIL-1やTNFなどの炎症性サイトカインの刺激によって放出されるので、炎症組織に集積した好中球は効率良くスーパーオキシドを産生することが予想される。活性酸素は外界から侵入する病原微生物の殺菌のための実効分子として重要であるが、その一方で血管内皮に損傷をあたえる。Fig. 12の模式図に示したように、血小板凝集塊に接着した白血球から放出された活性酸素は、新たな部位で血管内皮を損傷し、露出した血管内皮下組織に新たな血小板凝集を誘導する。また、活性酸素は内皮細胞に作用しP-セレクトインの発現を促すことも知られているので、さらに白血球を集積させるというように、一種の連鎖反応を引き起こす。このように、血小板の活性化がP-セレクトインの発現を介して白血球機能の亢進を誘導し炎症反応を促進的に進行させることを推測させる。P-セレクトインがTNFのような炎症性サイトカインの産生を誘導することも、炎症のカスケードを促進させると思われる。

活性酸素による血管内皮の損傷は、虚血再灌流傷害、成人呼吸逼迫症候群 (ARDS)、動脈硬化など重篤な脈管系の疾患との関連において注目されている。局所に集積した白血球の産生する活性酸素はこれらの疾患の病態の増悪因子であると考えられているので、血小板や内皮細胞に発現したP-セレクトインがこれら疾患の病因の一部をなすことも十分考えられる。最近では、P-セレクトインに対する抗体や  $sLe^x$  構造を含む糖質誘導体が、肺炎や心筋の虚血再灌流傷害などの急性炎症のモデ

ルに適用され、病態の改善をもたらすという報告もなされている<sup>12)</sup>。

## おわりに

組織への免疫炎症細胞の集積と細胞の機能の活性化状態は、炎症の発症と進行を決める重要な因子であり、セレクトインと糖鎖の相互作用はその両者を制御する因子のひとつであると考えられる。P-セレクトインの単球への結合が組織因子（組織トロンボプラスチン）の産生を誘導するという知見も報告されているので<sup>13)</sup>、P-セレクトインは免疫炎症系と止血血栓系を連携させる接点として機能している可能性も考えられる。細胞内に伝達される生化学的シグナルについては未解明であるが、最近Tリンパ球がP-セレクトインに結合することにより接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase)  $p125^{FAK}$  のチロシンリン酸化が誘導されることが報告された<sup>14)</sup>。このようなリン酸化のカスケードを含め、細胞内カルシウムイオンの動態、GTP結合たんぱく質の役割などのシグナル伝達系の解明も今後の課題である。炎症アレルギー疾患あるいは血栓症の分子的理解および治療のための有力な標的としてセレクトインと糖鎖との相互作用がもたらす生物現象が解明されることが期待される。

本研究を行なうにあたりご指導を賜りました東京大学薬学部大沢利昭名誉教授、入村達郎教授、ならびに研究にご協力をいただきました東京大学薬学部生体異物免疫化学教室の皆様にご感謝申し上げます。また、本稿執筆の機会を与えてくださいました星薬科大学紀要編集委員会の皆様に御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Johnston, G. L., Cook, R. G., and McEver, R. P. *Cell* **56**: 1033-1044, 1989
- 2) Lasky, L. A. *Science* **258**: 964-969, 1992
- 3) Bevilacqua, M. P. and Nelson, R. M. *J. Clin. Invest.* **91**: 379-387, 1993
- 4) McEver, R. P. *J. Cell. Biochem.* **45**: 156-161, 1991
- 5) Varki, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7390-7397, 1994
- 6) Sako, D., Chang, X. J., Barone, K. M., Vachino, G., White, H. M., Shaw, G., Veldman, G. M., Bean, K. M.,



- Ahern, T. J., Furie, B., Cumming, D. A., and Larsen, G. R. *Cell* **75**: 1179–1186, 1993
- 7) Nagata, K., Tsuji, T., Todoroki, N., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Hanai, N., and Irimura, T. *J. Immunol.* **151**: 3267–3273, 1993
- 8) Tsuji, T., Nagata, K., Koike, J., Todoroki, N., and Irimura, T. *J. Leukocyte Biol.* **56**: 583–587, 1994
- 9) Nagata, K., Tsuji, T., Hanai, N., and Irimura, T. *J. Biol. Chem.* **269**: 23290–23295, 1994
- 10) Weyrich, A. S., McIntyre T. M., McEver R. P., Prescott, S. M., and Zimmerman, G. A. *J. Clin. Invest.* **95**: 2297–2303, 1995
- 11) Todoroki, N., Watanabe, Y., Akaike, T., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Tsuji, T., Toyoshima, S., and Osawa, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 756–761, 1991
- 12) Lowe, J. B. and Ward, P. A. *J. Clin. Invest.* **99**: 822–826, 1997
- 13) Celi, A., Pellegrini, G. Lorenzet, R., De Blasi, A., Ready, N., Furie, B. C., and Furie, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8767–8771, 1994
- 14) Haller, H. Kunzendorf U., Sacherer K., Lindschau, C., Walz, G., Distler A., and Luft, F. C. *J. Immunol.* **158**: 1061–1067, 1997