

# ヒト糸球体腎炎におけるP-セレクトリン発現とその可溶性分子の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 瀬川, 知香子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9251">http://hdl.handle.net/2297/9251</a>

## ヒト糸球体腎炎における P-セレクトリン発現とその可溶性分子の検討

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

瀬川 知香子

ヒト糸球体腎炎における早期の細胞接着分子の関与を解明する目的で P-セレクトリンに注目し、85例の腎組織における P-セレクトリン蛋白および遺伝子発現を免疫組織化学的方法および組織内ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法を用いて検討した。さらに48例の血清および尿中の可溶性分子を免疫酵素抗体法にて測定した。正常コントロール群では糸球体の P-セレクトリン発現は認められず、血清可溶性 P-セレクトリン値は  $114.3 \pm 36.8 \text{ ng/ml}$  (12例, 平均値土標準誤差) であった。なお、尿中可溶性 P-セレクトリン値は全例で測定感度以下であった。IgA腎症 (IgA nephropathy, IgAN) 26例, ループス腎炎 (lupus nephritis, LN) 7例ならびに急性糸球体腎炎 (acute glomerulonephritis, AGN) 2例を含む増殖性糸球体腎炎例では、糸球体における P-セレクトリン発現はそれぞれ平均スコア 0.4, 0.4, 1.5 と有意に増強していた。また、間質における P-セレクトリン発現は急速進行性糸球体腎炎 (rapidly progressive glomerulonephritis) 5例, IgAN および AGN 症例でそれぞれ平均スコア 0.5, 0.5, 1.5 と増強していた。さらに糸球体では P-セレクトリン発現は血小板由来 CD41b 陽性部位に一致して認められた ( $r = 0.78, P < 0.001$ )。一方、ISH 法による検討では、間質内毛細血管および細静脈内皮に P-セレクトリンの mRNA 発現を認めたが、糸球体では陰性であった。臨床病理学的には、糸球体 P-セレクトリン発現は糸球体管性内皮病変、滲出性病変あるいはメサンギウム増殖と正の相関を示した (相関係数  $r = 0.60, r = 0.44, r = 0.42$ ; いずれも  $P < 0.001$ )。さらに血清可溶性 P-セレクトリン値は IgAN, LN および AGN 例において有意に高値を示し、(それぞれ  $283.6 \pm 64.1 \text{ ng/ml}, 312.8 \pm 52.2 \text{ ng/ml}, 581.0 \pm 219.2 \text{ ng/ml}$ ; いずれも  $P < 0.05$ )、管性内皮病変、滲出性病変と正の相関を示した ( $r = 0.54; P < 0.001, r = 0.35; P < 0.01$ )。また、糸球体および間質の P-セレクトリン発現陽性例で血清可溶性 P-セレクトリン値は陰性例に比し高い傾向を示した。一方、微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephrotic syndrome) 15例, 巣状糸球体硬化症 (focal glomerulosclerosis) 2例, 膜性腎症 (membranous nephropathy) 12例を含む非増殖性糸球体腎症において P-セレクトリンの発現増強ならびに血清可溶性 P-セレクトリン値の上昇は認められなかった。以上より、P-セレクトリンはヒト増殖性糸球体腎炎における糸球体および間質の白血球浸潤と関連し、その発現には糸球体では活性化血小板由来、間質においては血管内皮細胞からの新生という異なる2つの機序が推測された。また、臨床的には血清可溶性 P-セレクトリン値は腎炎における糸球体管性内皮病変ならびに局所の P-セレクトリン発現を反映する有用な指標となりうることを示唆された。

**Key words** P-selectin, soluble P-selectin, human glomerulonephritis, platelet, endothelial cell

生体において細胞間あるいは細胞-基質間の接着は、その構築を維持し、生理的機能を発揮するうえで重要な役割を果たしている。この細胞接着をつかさどる分子は細胞接着分子と呼ばれ、ヒトにおいてはその構造の違いからカドヘリン、インテグリン、免疫グロブリン、セレクトリン、ロイシンリッチリピートおよび CD44 ファミリーの6つのファミリーに大別されている<sup>1)</sup>。近年、免疫系における細胞接着分子の重要な役割が明らかにされると同時に、免疫系の関与する種々の疾患ならびに癌転移の原因として、細胞接着分子の異常が注目されている<sup>2)</sup>。

ヒト糸球体腎炎において、好中球、単球、リンパ球といった炎症細胞の浸潤は病変形成過程上重要な位置を占めている<sup>3-5)</sup>。かかる炎症性細胞が組織内へ浸潤するには血管内皮細胞との接着が必要である。その過程は接触、ローリング、静止、強固接着、遊走といった多段階の反応から成り立っており、それぞれ

の段階で様々な細胞接着分子が関与すると考えられている<sup>6,7)</sup>。最近、ヒト腎疾患において細胞間接着分子-1 (intercellular adhesion molecule-1)、血管細胞接着分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1) などいくつかの細胞接着分子について発現異常が報告されている<sup>8-11)</sup>。これらの接着分子は炎症性刺激発生より数時間後のローリングから強固接着までのいわば後期の反応に主に関与する。一方、最初の接触からローリングにうつる初期反応に関与する分子として、P-セレクトリン、L-セレクトリンとそのリガンドが知られている<sup>6,7,12)</sup>。P-セレクトリンは血小板の $\alpha$ 顆粒と血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体に存在する膜糖蛋白である。分子量 140kDa の顆粒膜蛋白 (granule membrane protein) であることより別名 GMP-140 とも呼ばれており、白血球上の P-セレクトリン糖蛋白リガンド-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) と結合する。P-セレクトリンはトロンピン、

平成8年11月21日受付, 平成8年12月11日受理

Abbreviations: ABC-AP, alkaline-phosphatase conjugated avidin-biotin complex method; AGN, acute glomerulonephritis; Cr, creatinine; FGS, focal glomerulosclerosis; GBM, glomerular basement membrane; HEVs, high endothelial venules; IgAN, IgA nephropathy; ISH, *in situ* hybridization; LN, lupus nephritis; MCNS, minimal

ヒスタミンあるいは活性酸素により血小板、血管内皮細胞膜表面上に速やかに誘導され、炎症部位や出血部位において白血球とこれらの細胞との接着を誘導する<sup>13)</sup>。実際、慢性関節リウマチ、全身性硬化症、局所の脳虚血、再灌流といった疾患におけるP-セレクトチン発現の増加が認められている<sup>14)~16)</sup>。腎疾患に関しては、Tippingらは、マウスの急性抗糸球体基底膜(glomerular basement membrane, GBM)腎炎モデルにおいて、糸球体内皮細胞にP-セレクトチン発現を認め、抗P-セレクトチン抗体によって糸球体内好中球集積と蛋白尿増加が抑制されたと報告した<sup>17)</sup>。これに対してMayadasらは、P-セレクトチン欠損マウスの急性抗GBM腎炎モデルで糸球体内好中球集積と蛋白尿の増悪を認めており、一定の見解をえていない<sup>18)</sup>。ヒト腎疾患におけるP-セレクトチンの関与については、腎移植後の急性拒絶反応例や間質内細胞浸潤例において間質内血管にその発現を認めたという報告があるが<sup>19)</sup>、ヒト糸球体腎炎におけるP-セレクトチンの関与はいまだ十分に検討されていない。

最近、細胞接着分子の可溶性分子が炎症性メディエーターの存在や細胞の活性化あるいは障害、さらには生体における疾患活動性を反映する指標として注目されている<sup>20)</sup>。加えて可溶性接着分子も膜結合型分子と同様にリガンドと結合し、その機能を調節しようと考えられている。これまで可溶性P-セレクトチンの生成に関しては転写過程でのスプライシングと膜結合型分子の分解産物という2つの機序が考えられているが<sup>20)21)</sup>、その機能と可溶性分子濃度測定の前臨床における有用性は確立されていない。

そこで今回の研究では、ヒト糸球体腎炎におけるP-セレクトチン発現ならびに可溶性P-セレクトチンの意義について臨床病理学的に検討した。

## 対象および方法

### I. 症 例

当科および関連施設において腎生検(76例)あるいは剖検(5例)により組織学的診断を行った81例(男性40例、女性41例、年齢15~81歳、平均44±2歳、平均値±標準誤差)を対象とした。その内訳は、急性糸球体腎炎(acute glomerulonephritis, AGN)2例、IgA腎症(IgA nephropathy, IgAN)26例、急速進行性糸球体腎炎(rapidly progressive glomerulonephritis, RPGN)6例、ループス腎炎(lupus nephritis, LN)7例、微小変化型ネフローゼ症候群(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)15例、巣状糸球体硬化症(focal glomerulosclerosis, FGS)2例、膜性腎症(membranous nephropathy, MN)12例、糖尿病性腎症3例、妊娠中毒症3例、膜性増殖性糸球体腎炎1例、急性間質性腎炎1例、過敏性血管炎1例、薬剤誘発性ループス腎炎1例、シクロスポリン(cyclosporin)腎症1例であった。また、非糸球体性の肉眼的あるいは顕微鏡的血尿を呈した正常腎組織4例を対照群とした。

### II. 病理学的検査

#### 1. 光学顕微鏡的観察

腎組織を10%リン酸緩衝ホルマリン(pH7.4)にて固定後、4μmのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)、過ヨウ素酸シッフ染色(periodic acid Schiff)、過ヨウ素

酸メセナミン銀染色(periodic acid silver methenamine)、マロリー・アザン染色(Mallory-Azan)の各染色を施行した。光顕観察において、糸球体病変をメサンギウム増殖、管外性病変、滲出性病変および管内性病変の4項目で評価した。各々の項目の程度については、変化なし、軽微、軽度、中等度、高度の5段階に分け、それぞれ0、0.5、1、2、3度とスコア化した。また、間質病変については尿管萎縮、細胞浸潤、線維化の3項目について、なし、軽微、斑状、帯状、び漫性の5段階に分け、同様に0、0.5、1、2、3度とスコア化した。

#### 2. 免疫組織染色

新鮮標本をドライアイス・アセトンで冷却したn-ヘキサンにより凍結後、クリオスタットTissue-Tekシステム(Miles, Naperville, USA)により6μmに薄切した。ついで、P-セレクトチンの腎組織における局在を2種類の抗P-セレクトチンマウスモノクローナル抗体(clone AK-6<sup>22)</sup>, IgG<sub>1</sub>, Cambridge Research Biochemicals; clone CLB-Thromb/6<sup>23)</sup>, IgG<sub>1</sub>, Immunotech)を用いたアビジン-ビオチンアルカリフォスファターゼ法(alkaline-phosphatase conjugated avidin-biotin complex method, ABC-AP法)(Vectastain ABC-AP kit, AK-5002 and Vector red, SK-5100, Vector Lab, Burlingame, USA)による免疫組織染色にて検討した。内因性アルカリフォスファターゼ活性はレバミゾール添加によりブロックした。各標本につき3個以上の糸球体を観察し、糸球体内のP-セレクトチン発現をなし、軽微、軽度、中等度の4段階に分け、それぞれを0、0.5、1、2度とスコア化し、それらの平均値として評価した。平均値が0.5以上のものをP-セレクトチン陽性と判断した。間質内血管のP-セレクトチン発現についても同様にスコア化した。なお、AK-6とCLB-Thromb/6による染色パターンに差はなかった。また、20例の連続切片については抗CD41b(血小板gpIIb)マウスモノクローナル抗体(clone SZ. 22<sup>24)</sup>, IgG<sub>1</sub>, Cosmo bio)を用いてABC-AP染色を行い同様の方法でスコア化し、P-セレクトチンの染色結果と比較した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡In SIGHT(Meridian, Okemos, USA)を用いてP-セレクトチンの染色強度を検討した。

#### III. 組織内ハイブリダイゼーション(*in situ* hybridization, ISH)法によるP-セレクトチンmRNAの検討

ISH法はMiyamasuら<sup>25)</sup>の方法に基づいて行った。P-セレクトチンのアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしてエクソン3の塩基配列の一部(5'-CTGGATGGCCACTAAGTCTGTGTAGCGATTCTGGCA-3')を用い<sup>26)</sup>、ジゴキシゲニンオリゴヌクレオチド・テイリングキットとジゴキシゲニン標識核酸検出キット(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を使用してジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼ法により発色させた。なお、アンチセンスプローブと相補的な配列を持つセンスプローブ(5'-TGCCAGAATCGCTACACAGACTTAGTGGCCATCCAG-3')に置き換えてISHを施行し、陰性コントロールとした。まず組織を10%リン酸緩衝ホルマリン(pH7.4)で固定後、4μmのパラフィン切片を作製し、ついで脱パラフィン後、0.2N塩酸による蛋白固定を10分間行った。0.01Mリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)(pH7.4)で洗浄後、250μg/mlプロナー

change nephrotic syndrome; MN, membranous nephropathy; PBS, phosphate-buffered saline; RPGN, rapidly progressive glomerulonephritis;

ゼ (Calbiochem, San Diego, USA) にて室温で20分間蛋白分解処理を行った。2mg/ml グリシンを含む PBS にて洗浄後、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定し、0.25% 無水酢酸を含む 0.1M トリエタノールアミン緩衝液にてアセチル化を行った。2×SSCにて洗浄後、100pmol/l ジゴキシゲニン標識 P-セレクチンオリゴヌクレオチドプローブ、50%ホルムアミド、10mM Tris-HCl、0.3M 塩化ナトリウム、1mM EDTA、10% デキストラン硫酸、1×デンハルト液 (和光, 大阪)、100 μg/ml サケ精子 DNA (salmon sperm DNA, Boehringer Mannheim)、500 μg/ml イースト tRNA (yeast tRNA, Sigma, St. Louis, USA) を含む溶液にて42℃、15時間ハイブリダイゼーションを

行った。ハイブリダイゼーション後、SSCにて洗浄し、3% ブロッキング剤 (Boehringer Mannheim)、2% 正常ヒツジ血清 (Sigma)、0.15M 塩化ナトリウム、0.1M マレイン酸混合液にて室温、30分間ブロッキングを行った。続いて抗ジゴキシゲニン抗体 (Boehringer Mannheim) を4℃、一晩反応させ、ニトロブルーテトラゾリウム塩 (nitroblue tetrazolium)/5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate) (Boehringer Mannheim) にて発色反応を行った。

#### IV. 可溶性 P-セレクチン値の測定

腎生検時に採取し-70℃で凍結保存していた48例の血清および尿について、可溶性 P-セレクチンを抗 P-セレクチンマウス

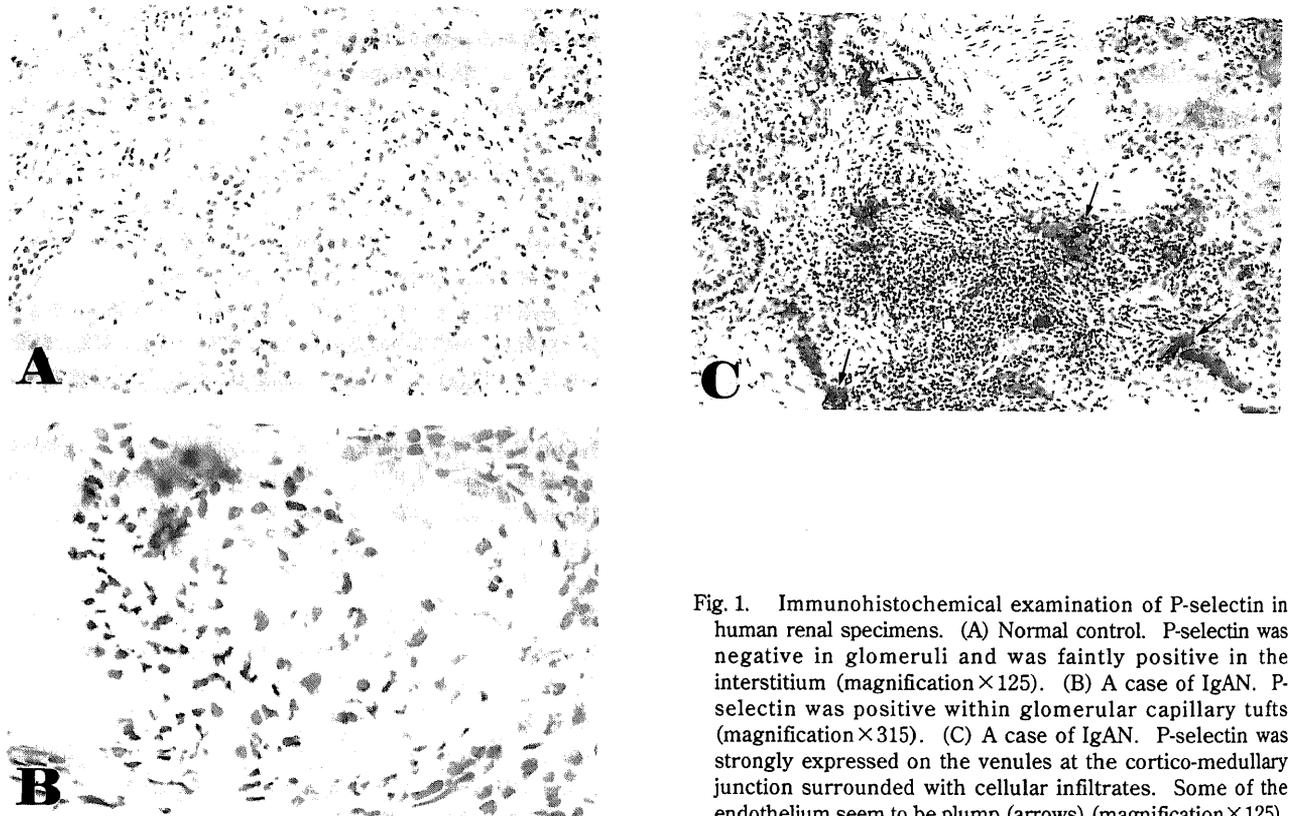


Fig. 1. Immunohistochemical examination of P-selectin in human renal specimens. (A) Normal control. P-selectin was negative in glomeruli and was faintly positive in the interstitium (magnification×125). (B) A case of IgAN. P-selectin was positive within glomerular capillary tufts (magnification×315). (C) A case of IgAN. P-selectin was strongly expressed on the venules at the cortico-medullary junction surrounded with cellular infiltrates. Some of the endothelium seem to be plump (arrows) (magnification×125).

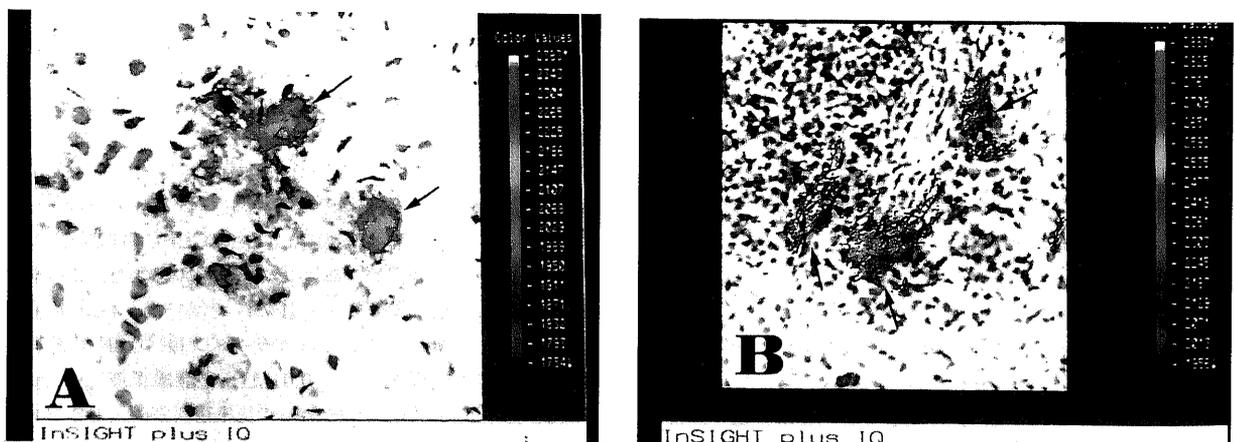


Fig. 2. Confocal laser microscopic findings of P-selectin expression in human glomerulonephritis. (A) The most intense P-selectin expression was observed at the luminal side of capillaries in glomeruli (arrows). (B) P-selectin was strongly positive on the surface and cytoplasm of vascular endothelial cells with cellular infiltrates in the interstitium (arrows).

モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素抗体法 (GMP-140 測定キット, 宝, 京都) にて測定した。吸光度はマイクロプレートフォトメーター MTP-22 (コロナ, 東京) を用いて測定した。また, 健常者12例 (男性6例, 女性6例; 年齢21~48歳, 平均26歳) の血清と尿を正常コントロールとした。この ELISA

法での可溶性 P-セレクトリンの測定感度は40.0ng/ml以上であった。

#### V. 統計処理

数値は平均±標準誤差で表した。P-セレクトリン発現, 可溶性 P-セレクトリン値と臨床病理学的指標との関係は Pearson と

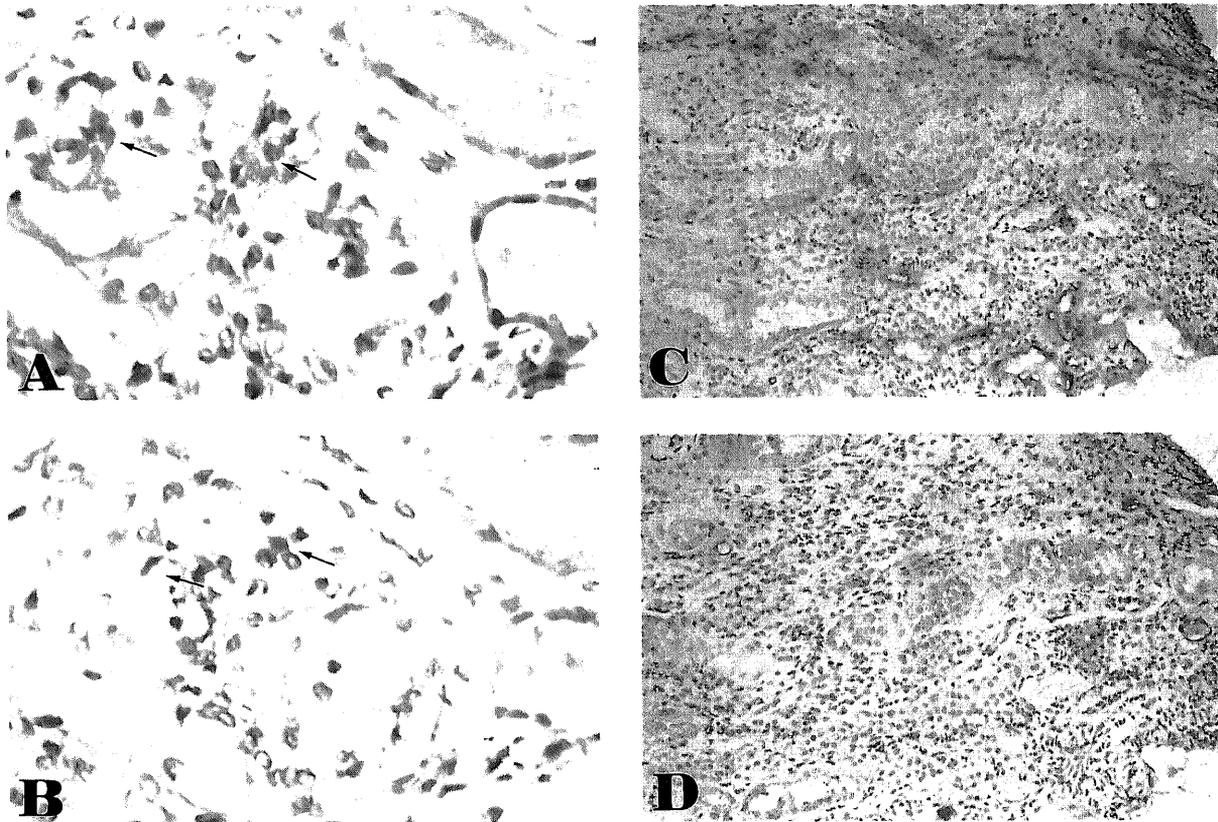


Fig. 3. Comparison between renal CD41b and P-selectin expression using sequential specimens of a patient with AGN. (A) P-selectin was positive in glomeruli (arrows). (B) CD41b was stained in accordance with P-selectin staining in glomeruli (arrows) (magnification  $\times 500$ ). (C) P-selectin was strongly expressed on the postcapillary venous endothelial cells at the corticomedullary junction. (D) Intensive CD41b expression was not found in the interstitium except for thrombus (magnification  $\times 125$ ).

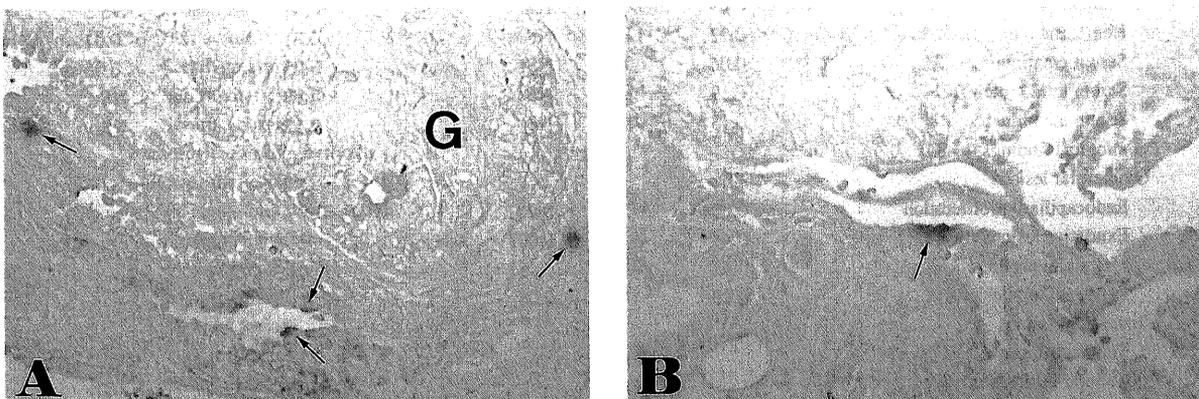


Fig. 4. *In situ* hybridization of P-selectin in human renal specimens. P-selectin mRNA signals were detected in the capillary and venous endothelial cells (arrows), but not in glomeruli (G) (magnification A,  $\times 125$ ; B,  $\times 200$ ).

Spearman の相関係数を用いて評価した。また、各疾患群間の差の検定には二元配置分散分析 (ANOVA) および対応のない Student の t 検定を用いた。危険率 (P) が 0.05 以下をもって有意差と判定した。

## 成 績

### I. 症 例

全例に種々の程度の蛋白尿あるいは顕微鏡的血尿を認めた。一日尿蛋白量が 3.5g 以上、低蛋白血症をともなうネフローゼ症候群は 16 例 (19%) に、中等度蛋白尿 (1.0g/日以上, 3.5g/日未満) は 31 例 (36%) に認めた。また、4 例 (5%) が血清クレアチニン (creatinine, Cr) 2.0mg/dl 以上の腎機能障害を来していた。

### II. 免疫組織染色

1. 糸球体内 P-セレクトリン発現ならびに臨床病理学的所見との比較

対照 4 例と MCNS 15 例では糸球体内 P-セレクトリン発現を認

めなかった (図 1A)。FGS と MN の 14 例では、MN の 1 例に軽微な発現を認めたほかは陰性であった。IgAN 26 例では、4 例に軽微、4 例に軽度、2 例に中等度の発現を認め、スコアは平均値 0.4 であった。同様に LN, AGN 症例でもそれぞれ平均値 0.4, 1.5 と糸球体内 P-セレクトリンの発現増強を認めた (図 1B)。RPGN では、軽微な発現を 2 例に認めたが、平均値は 0.3 で、有意差を認めなかった (表 1)。共焦点レーザー顕微鏡による P-セレクトリン発現強度の解析では、係蹄血管内腔側により強度の発光を認めた (図 2A)。糸球体内 P-セレクトリン発現と病理所見との対比では、管内性病変、滲出性病変、メサンギウム増殖との間に正の相関を認め、とくに管内性病変との間に  $r=0.60$  と強い相関を認めた ( $P<0.001$ )。一方、蛋白尿および血尿の程度、血清 Cr 値、血清総蛋白濃度ならびにアルブミン濃度といった臨床指標との間には明らかな相関を認めなかった (表 2)。

2. 間質内 P-セレクトリン発現ならびに臨床病理学的所見との比較

対照群 4 例では、1 例の一部の細静脈内皮細胞に軽微な陽性

Table 1. Renal P-selectin expression in various glomerular diseases

Disease	No. of cases	P-selectin expression ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , score)	
		Glomerular	Interstitial
Control	4	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
MCNS	15	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1
FGS	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0
MN	12	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
RPGN	6	0.3 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1*
IgAN	26	0.4 $\pm$ 0.2*	0.5 $\pm$ 0.1*
LN	7	0.4 $\pm$ 0.2*	0.4 $\pm$ 0.1
AGN	2	1.5 $\pm$ 0.5*	1.5 $\pm$ 0.5*

MCNS, minimal change nephrotic syndrome; FGS, focal glomerulosclerosis; MN, membranous nephropathy; RPGN, rapidly progressive glomerulonephritis; IgAN, IgA nephropathy; LN, lupus nephritis; AGN, acute glomerulonephritis. \*  $P<0.05$

Table 2. Relationship between renal P-selectin expression and clinicopathological findings

Finding	Statistic analysis to each finding of P-selectin			
	Glomeruli		Interstitial	
	r	P value	r	P value
Clinical data (n=66)				
Proteinuria	-0.07	NS	-0.01	NS
Hematuria	0.22	NS	0.31	<0.01
Serum creatinine	0.06	NS	0.25	<0.05
Serum total protein	0.19	NS	0.17	NS
Serum albumin	0.13	NS	0.12	NS
Pathological findings (n=84)				
Glomerular lesions				
Endocapillary proliferation	0.60	<0.001	ND	
Exudative lesions	0.44	<0.001	ND	
Mesangial proliferation	0.42	<0.001	ND	
Extracapillary lesions	0.22	<0.05	ND	
Interstitial lesions				
Tubular atrophy		ND	0.31	<0.01
Cellular infiltration		ND	0.33	<0.01
Fibrosis		ND	0.26	<0.02

NS, not significant; ND, not determined

所見を認めるのみであった (図 1A)。MCNS 15例中 3例ならびに MN 12例中 1例の細静脈内皮細胞に弱い発現を認めた。IgAN では、26例中 11例に軽微、4例に軽度、2例に中等度の P-セレクトリン発現を間質内血管に認め、平均スコアは 0.5であった。同様に、AGN, RPGN 症例でも平均値 1.5, 0.5と有意な発現増強を認めた (表 1)。この間質内 P-セレクトリン発現は毛細血管～細静脈内皮細胞に認められ、とくに細胞浸潤を伴った皮髄境界部の毛細血管後細静脈内皮細胞に強く発現していた (図 1C)。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による解析でも、間質内血管内皮細胞の細胞質および細胞表面に一致して強度の発光が認められた (図 2B)。なお、間質内 P-セレクトリン発現と細胞浸潤、尿細管萎縮、繊維化、血尿ならびに血清 Cr との間に弱い正の相関を認めた (表 2)。

3. CD41b (血小板 gpIIb) 発現と P-セレクトリン発現との対比  
CD41b 発現は、血栓を形成した種々の血管内腔に認められ、同部位では P-セレクトリンも強陽性であった。糸球体において、

CD41b と P-セレクトリンの発現は  $r=0.78$  と正の相関を示した ( $P<0.001$ ) (図 3A, B)。一方、間質においては両者の分布は一致せず、P-セレクトリンを強く発現していた細胞浸潤を伴う皮髄境界部細静脈内皮細胞では、CD41b 発現はほとんど陰性であった (図 3C, D)

### Ⅲ. P-セレクトリン mRNA 発現の検討

ISH 法による P-セレクトリン mRNA の発現は、免疫組織染色で陽性を示した間質内細静脈あるいは毛細血管レベルの血管内皮細胞に一致して認められたが、糸球体においては陰性であった (図 4)。対照とした P-セレクトリンセンスオリゴヌクレオチドプローブではいずれも陰性であった。

### Ⅳ. 可溶性 P-セレクトリンの検討

1. 種々の糸球体疾患における可溶性 P-セレクトリン値  
対照群 12例の血清可溶性 P-セレクトリン値は  $114.3 \pm 36.8 \text{ ng/ml}$  であった。AGN, LN, IgAN 例において血清可溶性 P-セレクトリン値は有意な高値を示した (表 3)。一方、MCNS, MN, FGS,

Table 3. Soluble P-selectin levels in various glomerular diseases

Disease	No. of cases	Soluble P-selectin levels ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , ng/ml)	
		Serum	Urine
Control	12	$114.3 \pm 36.8$	<40.0
MCNS	5	$229.6 \pm 35.9$	<40.0
FGS	2	$282.9 \pm 113.2$	<40.0
MN	10	$118.1 \pm 31.6$	<40.0
RPGN	6	$249.5 \pm 54.6$	<40.0
IgAN	12	$283.6 \pm 64.1^*$	<40.0
LN	5	$312.8 \pm 52.2^*$	<40.0
AGN	2	$581.0 \pm 219.2^*$	<40.0

MCNS, minimal change nephrotic syndrome ; FGS, focal glomerulosclerosis ; MN, membranous nephropathy ; RPGN, rapidly progressive glomerulonephritis ; IgAN, IgA nephropathy ; LN, lupus nephritis ; AGN, acute glomerulonephritis. \*  $P<0.05$

Table 4. Relationship between serum soluble P-selectin levels and clinicopathological findings

Finding	Statistic analysis to each finding of serum soluble P-selectin	
	r	P value
Clinical data (n=48)		
Proteinuria	-0.31	NS
Hematuria	0.11	NS
Serum creatinine	-0.06	NS
Serum total protein	0.24	NS
Serum albumin	0.19	NS
Pathological findings (n=48)		
Glomerular lesions		
Endocapillary proliferation	0.54	<0.001
Exudative lesions	0.35	<0.01
Mesangial proliferation	-0.08	NS
Extracapillary lesions	0.02	NS
Interstitial lesions		
Tubular atrophy	-0.11	NS
Cellular infiltration	-0.17	NS
Fibrosis	-0.17	NS

NS, not significant.

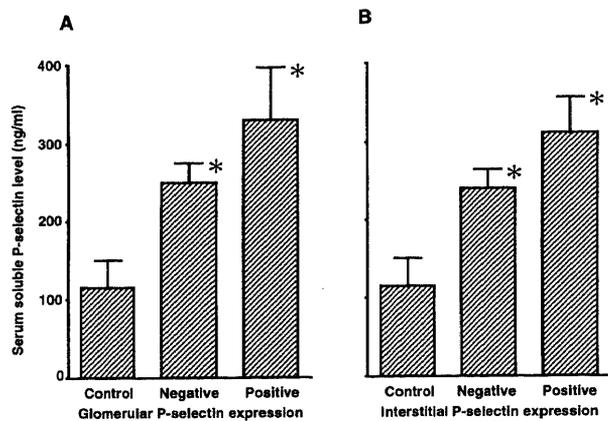


Fig. 5. The relationship between glomerular (A) and interstitial (B) P-selectin expression and serum soluble P-selectin. Serum soluble P-selectin levels were higher in patients with positive glomerular and interstitial P-selectin expression than those in patients with negative expression. Those levels in nephritis were elevated significantly compared with normal control levels (\* $p < 0.05$  by ANOVA). Results represent  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ .

RPGN 例では有意な変化を認めなかった。なお、尿中可溶性 P-セレクトリンは全例で測定感度以下であった。

## 2. 血清可溶性 P-セレクトリン値と腎における P-セレクトリン発現および臨床病理学的所見との関係

糸球体内 P-セレクトリン発現陽性10例および陰性37例では、血清可溶性 P-セレクトリン値はそれぞれ  $329.4 \pm 67.7 \text{ ng/ml}$ ,  $250.2 \pm 25.2 \text{ ng/ml}$  と陽性例で高い傾向を示した。また、対照群に比しいずれも有意な上昇を認めた (図 5A,  $P < 0.05$ )。同様に、間質内発現陽性21例および陰性27例においてもそれぞれ  $311.2 \pm 44.8 \text{ ng/ml}$ ,  $239.7 \pm 25.0 \text{ ng/ml}$  と陽性例でより高い傾向にあった (図 5B)。加えて、血清可溶性 P-セレクトリン値は糸球体の管内性病変との間に  $r = 0.54$  と正の相関を示した ( $P < 0.001$ )。また、滲出性病変とも  $r = 0.35$  と弱いながら相関していた ( $P < 0.01$ ) が、他の臨床病理学的指標との間には有意な相関を認めなかった (表 4)。

## 考 察

本研究により、ヒト増殖性糸球体腎炎の糸球体における P-セレクトリン発現の増強に加えて管内性病変をはじめとする増殖性病変との相関が示された。これまで糸球体腎炎発症の機序として、抗体あるいは免疫複合体の糸球体内沈着により種々の炎症性メディエーター産生ならびに補体活性化を生じ、好中球や単球に対して走化性を示すインターロイキン-8 (interleukin-8)、単球走化性ペプチド-1 (monocyte chemotactic peptide-1)、ロイコトリエン、補体成分 (C5a) などにより炎症性細胞が糸球体係蹄内に集積すると考えられている<sup>20-28</sup>。さらに今回の成績をふまえて、炎症早期に発現が誘導される P-セレクトリンを介して、集積した白血球と内皮細胞が相互作用し、糸球体腎炎における白血球浸潤を伴う急性増殖性変化が生じると推測される。加えて今回の検討では間質においても P-セレクトリン発現が間質病変部に一致して認められ、P-セレクトリンが糸球体のみならず間質における細胞浸潤にも関与している可能性が示唆された。

ところで今回の検討により P-セレクトリン発現には異なる 2 つ

の機序が考えられた。つまり、糸球体においては P-セレクトリン mRNA は検出されず、CD41b (血小板 gpIIb) の発現が P-セレクトリン分布に一致して認められた。一方、間質においては、細静脈あるいは毛細血管内皮細胞に一致した mRNA 発現を認めた。これらの結果より、糸球体内 P-セレクトリン発現は主として糸球体係蹄内皮細胞と結合した活性化血小板であると推測された。糸球体係蹄内皮細胞は一般の微小循環における血管内皮細胞と異なり、非常に薄い有窓細胞であることが知られており<sup>12,29</sup>、そのため含有する Weibel-Palade 小体が少ないという可能性が考えられる。また、糸球体腎炎における血小板の役割については、これまでに糸球体内血栓形成、免疫複合体沈着の促進、血管作動性物質放出による血行動態の変化、形質変換成長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 放出による糸球体硬化促進、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor) やインターロイキン-1 (interleukin-1) によるメサングウム細胞増殖および活性化などが確認されている<sup>30</sup>。加えて Johnson らは、ラット免疫複合体腎炎モデルにおいて、抗原抗体沈着による腎炎惹起後、早期に血小板の係蹄内集積が生じることを観察し、血小板が白血球による糸球体障害を助長する可能性を指摘している<sup>31</sup>。また、Lalor らは、試験管内において固相化した血小板に P-セレクトリンを介して白血球が接着する現象を確認している<sup>32</sup>。したがって、免疫複合体や種々の炎症性メディエーターにより糸球体係蹄内皮細胞が障害された部分に血小板が集積し、その血小板上に発現された P-セレクトリンに白血球が接着し、続いて内皮細胞との相互作用が生じるという機序が推測される。しかし、Tipping らのマウス急性抗 GBM 腎炎モデルでは、血小板を除去した場合においても同様の糸球体内 P-セレクトリン発現と白血球集積を認めている<sup>17</sup>。この理由としてはヒトとマウスの間の種差による可能性が挙げられるが、糸球体内に認められた P-セレクトリンは血小板の膜結合型分子のみではなく、糸球体以外の活性化内皮細胞や血小板から放出された可溶性 P-セレクトリン分子である可能性も考えられる。この点に関しては今後さらなる検討が必要と思われる。

一方、間質においては、P-セレクトリン発現が認められる細静脈内皮細胞に一致して mRNA が検出されたが、CD41b (血小板 gpIIb) はほぼ陰性であった。したがって、糸球体における P-セレクトリン発現とは異なり、間質内では血管内皮細胞による新たな産生の結果 P-セレクトリンが発現したと推測された。毛細血管後細静脈は一般的に炎症における白血球浸潤が最も多く見られる部位で、P-セレクトリンはこのレベルの静脈に強く発現するが、より太い静脈や動脈系の血管にはほとんど発現しないことが知られている<sup>19</sup>。ところで近年、慢性炎症性疾患における高内皮細静脈 (high endothelial venules, HEVs) の存在が注目されている。この HEVs はリンパ組織に存在しリンパ球のホーミングに関与する特別な毛細血管後細静脈として発見され、Weibel-Palade 小体を初めとする顆粒構造を多数含んでいる<sup>33,34</sup>。最近の研究により、HEVs はリンパ組織以外にも慢性炎症の生じている組織で確認されており、関節リウマチや Graves 病などの炎症性疾患の形成に深く関わっていると推測されている<sup>33,35,36</sup>。今回の検討において、P-セレクトリンを強く発現している皮髄境界部の毛細血管後細静脈内皮細胞は一般の内皮細胞に比し寸高であることが観察された (図 1C)。これまでに Renkonen らがラット腎移植モデルの急性拒絶反応において、周囲にリンパ球浸潤を伴う傍尿細管毛細血管内皮細胞に HEVs 様の構造を観察

している<sup>39)</sup>が、いまだ腎における HEVs の存在は完全には証明されていない。しかし今回の結果からも、ヒトの腎間質障害においてこのレベルの細静脈が HEVs となり、白血球が浸潤する門戸となりうる可能性が示唆された。

今回の検討により、増殖性糸球体腎炎例において血清可溶性 P-セクレチン値が有意な高値を示した。また、血清可溶性 P-セクレチン値は糸球体および間質での局所の P-セクレチン発現と相関を示し、さらに糸球体管内性病変と強く相関していた。血中可溶性 P-セクレチンの一部は細胞膜上に発現する P-セクレチンから蛋白分解により生じた分子であるが、大部分は転写過程でのスプライシングによって膜結合領域が欠如した分子であると報告されている<sup>20,21)</sup>。このスプライシングを誘導する直接の刺激因子はいまだ同定されていないが、血中可溶性 P-セクレチン値は種々の血栓ないし炎症性疾患あるいは全身性ループスエリテマトーデス、混合性結合組織病、慢性関節リウマチなどの膠原病において、血小板や血管内皮細胞の活性化もしくは損傷度を反映しうると考えられている<sup>20,39)</sup>。さらに、Gruschwitzらは急性期の強皮症患者の血清可溶性 P-セクレチン値が皮膚病変局所での P-セクレチン発現および疾患活動性と相関を示したと報告している<sup>39)</sup>。したがって今回の結果より、ヒト糸球体腎炎においても血清可溶性 P-セクレチン値は血小板や血管内皮細胞の活性化および白血球の集積を反映する有用な指標と考えられた。一方、尿中の可溶性 P-セクレチンは今回用いた ELISA 法では全く検出できなかった。Tomino らは IgAN 症例において抗ヒト P-セクレチンモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光法により、尿沈渣中の活性化血小板を検出しえたことと報告している<sup>40)</sup>。今回尿中に可溶性 P-セクレチンが検出されなかった理由として、可溶性 P-セクレチンの分子量が約 137kDa<sup>20,21)</sup>と大きいため糸球体基底膜を通過出来ないこと、ならびに尿中の活性化血小板から放出される P-セクレチンが微量のためこの ELISA 法の測定感度以下 (<40.0ng/ml) であったという可能性が考えられる。

可溶性 P-セクレチンの機能に関しては正確には解明されていないが、白血球上のリガンドに結合し、白血球と血管内皮細胞や血小板の相互作用を阻害しうると推測されている<sup>20,21)</sup>。Mayadas らは P-セクレチン欠損マウスを用いた急性抗 GBM 腎炎モデルにおいて糸球体内の好中球集積ならびに蛋白尿の増悪を報告している<sup>19)</sup>。彼らはその原因を好中球と内皮細胞の接着を阻害するリポキシン A<sub>4</sub> (lipoxin A<sub>4</sub>) の産生低下によるものと推測したが、本マウスモデルでは可溶性 P-セクレチンも欠損していることより可溶性分子による制御が行われず、糸球体への白血球浸潤が促進された可能性も考えられる。このように、P-セクレチンは白血球と内皮細胞あるいは血小板との接着を促進するのみならず、白血球を介する炎症反応を調節する作用も有し、この破綻により組織障害が促進される可能性が考えられる。

## 結 論

ヒト糸球体腎炎における P-セクレチン発現ならびに血清、尿中可溶性 P-セクレチンについて検討し、以下の成績をえた。

1. P-セクレチン発現は正常コントロール群の糸球体には認められず、間質の細静脈の一部に発現を認めた。また、正常コントロール群の血清可溶性 P-セクレチン値は 114.3±36.8ng/ml であったが、尿中可溶性 P-セクレチンは全例で測定感度以下であった。

2. 増殖性糸球体腎炎例では、糸球体および間質における P-セクレチン発現の増強が認められ、血清可溶性 P-セクレチン値も有意な高値を示した。

3. 糸球体内 P-セクレチン発現は滲出性病変、メサンギウム増殖ならびに管内性病変と正の相関を示し、とくに管内性病変との間に  $r=0.60$  ( $P<0.001$ ) と強い相関を示した。一方、間質内 P-セクレチン発現も間質病変との間に弱い相関を示した。

4. 血清可溶性 P-セクレチン値は、糸球体および間質の P-セクレチン発現陽性群では陰性群に比して高い傾向が認められ、糸球体の管内性病変ならびに滲出性病変と正の相関を示した。

5. P-セクレチン mRNA の発現は間質の毛細血管および細静脈内皮細胞に認められ糸球体では陰性であった。一方、糸球体内 P-セクレチン発現に一致して活性化血小板由来の CD41b 発現が認められた。

以上より、P-セクレチンはヒト増殖性糸球体腎炎において糸球体および間質双方の白血球浸潤と関連することが示された。さらに、P-セクレチンの発現機序として糸球体では活性化血小板、間質では血管内皮細胞による新たな産生とそれぞれで異なることが推測された。また、血清可溶性 P-セクレチンは糸球体において管内性病変と対応する腎局所での P-セクレチン発現を反映する臨床上有用な指標となりうることを示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、終始直接の御指導・御教示を賜りました血液浄化療法部横山仁助教授に心から感謝致します。さらに本研究に多大の御協力を戴きました第一内科第三研究室の諸先生方、および研究協力員の皆様に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第28, 29回米国内腎臓学会 (1995年, San Diego, 1996年, New Orleans) および第38, 39回日本腎臓学会総会 (1995年, 東京, 1996年, 倉敷) において発表した。

## 文 献

- 1) 月田早智子: 細胞接着研究の現状。細胞接着分子の生物学 (月田承一郎編), 第1版, 2-7頁, 中山書店, 東京, 1995
- 2) 江口勝美, 川上 純, 長瀧重信: 自己免疫疾患と接着分子。医学のあゆみ 174: 62-66, 1995
- 3) Hooke DH, Gee DC, Atkins RC. Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 31: 964-972, 1987
- 4) Kincaid-Smith P, Nicholls K, Birchall I. Polymorphs infiltrate glomeruli in mesangial IgA glomerulonephritis. *Kidney Int* 36: 1108-1111, 1989
- 5) Nolasco FEB, Cameron JS, Hartley B, Coelho A, Hildreth G, Reuben R. Intraglomerular T cells and monocytes in nephritis: Study with monoclonal antibodies. *Kidney Int* 31: 1160-1166, 1987
- 6) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314, 1994
- 7) Hogg N, Berlin C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol Today* 16: 327-330, 1995
- 8) Roy-Chaudhury P, Wu B, King G, Campbell M, Macleod AM, Haites NE, Simpson JG, Power DA. Adhesion molecule

- interactions in human glomerulonephritis: Importance of the tubulointerstitium. *Kidney Int* 49: 127-134, 1996
- 9) Canton AD, Fuiano GF, Sepe V, Caglioti A, Ferrone S. Mesangial expression of intercellular adhesion molecule-1 in primary glomerulosclerosis. *Kidney Int* 41: 951-955, 1992
  - 10) Bruijn JA, Dinklo NJCM. Distinct patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in renal disease. *Lab Invest* 69: 329-335, 1993
  - 11) Lhotta K, Neumayer HP, Joannidis M, Geissler D, König P. Renal expression of intercellular adhesion molecule-1 in different forms of glomerulonephritis. *Clin Sci* 81: 477-481, 1991
  - 12) Savage COS. The biology of glomerulus: Endothelial cells. *Kidney Int* 45: 314-319, 1994
  - 13) McEver RP. GMP-140: A receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 45: 156-161, 1991
  - 14) Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson CB, Fox DA, Stoolman LM. Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis: In situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. *J Clin Invest* 91: 2609-2619, 1993
  - 15) Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, Strieter RM, Kunkel SL, Massa MC, Barr WG, Jimenez SA. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis: Their role in early and late disease. *Pathobiology* 61: 239-246, 1993
  - 16) Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25: 202-211, 1994
  - 17) Tipping PG, Huang XR, Berndt MC, Holdsworth SR. A role for P-selectin in complement-independent neutrophil-mediated glomerular injury. *Kidney Int* 46: 79-88, 1994
  - 18) Mayadas TN, Mendrick DL, Brady HR, Tang T, Papayianni A, Assmann KJM, Wagner DD, Hynes RO, Cotran RS. Acute passive anti-glomerular basement nephritis in P-selectin-deficient mice. *Kidney Int* 49: 1342-1349, 1996
  - 19) Andersen CB, Ladefoged SD, Larsen S. Acute kidney graft rejection. *APNIS* 102: 23-37, 1994
  - 20) Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14: 506-512, 1993
  - 21) Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Fevaloro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, Gamble JR, Vadas MA, Berndt MC. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med* 175: 1147-1150, 1992
  - 22) Saunders KB, Kansas GS, Tedder TF. Domain mapping of the selectin panel of mAb. (abstract) *Tissue Antigens* 42: 294, 1993
  - 23) Ruan C, Du X, Wan H, Hu X, Xi X, Li P. Characterization of the fibrinogen binding sites using monoclonal antibodies to human platelet membrane glycoproteins IIb/IIIa. (abstract) *Thromb and Haemostas* 58: 243, 1987
  - 24) Miyamasu M, Hirai K, Takahashi Y, Iida M, Yamaguchi M, Koshino T, Takaishi T, Morita Y, Ohta K, Kasahara T, Ito K. Chemotactic agonists induce cytokine generation in eosinophils. *J Immunol* 154: 1339-1349, 1995
  - 25) Johnston GI, Cook RG, McEver RP. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: Sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 56: 1033-1044, 1989
  - 26) Noris M, PharmD C, Remuzzi G. New insights into circulating cell-endothelium interactions and their significance for glomerular pathophysiology. *Am J Kid Dis* 26: 541-548, 1995
  - 27) Canton AD. Adhesion molecules in renal disease. *Kidney Int* 48: 1687-1696, 1995
  - 28) Brady HR. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 45: 1285-1300, 1994
  - 29) Tisher CC, Madsen KM. *The Kidney*, 5th ed, p9-18, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996
  - 30) Johnson RJ. Platelets in inflammatory glomerular injury. *Semin Nephrol* 11: 276-284, 1991
  - 31) Johnson RJ, Alpers CE, Pruchno C, Schulze M, Baker PJ, Pritzl P, Couser WG. Mechanisms and kinetics for platelet and neutrophil localization in immune complex nephritis. *Kidney Int* 36: 780-789, 1989
  - 32) Lalor P, Nash GB. Adhesion of flowing leukocytes to immobilized platelets. *Br J Haematol* 89: 725-732, 1995
  - 33) Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16: 449-457, 1995
  - 34) Freemont AJ, Jones CJP. Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of human lymph node paracortical venules. *J Anat* 136: 349-362, 1983
  - 35) Dinther-Janssen ACHM, Pals ST, Scheper PR, Breedveld F, Meijer CJLM. Dendritic cells and high endothelial venules in the rheumatoid synovial membrane. *J Rheumatol* 17: 11-17, 1990
  - 36) Kabel PJ, Voorbij HAM, Haan-Meulman M, Pals ST, Drexhage HA. High endothelial venules present in lymphoid cell accumulations in thyroids affected by autoimmune disease: A study in men and BB rats of functional activity and development. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 744-751, 1989
  - 37) Renkonen R, Turunen JP, Rapola J, Hayry P. Characterization of high endothelial-like properties of peritubular capillary endothelium during acute renal allograft rejection. *Am J Pathol* 137: 643-651, 1990
  - 38) Takeda I, Kaise S, Nishimaki T, Kasukawa R. Soluble P-selectin in the plasma of patients with connective tissue diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 105: 128-134, 1994
  - 39) Gruschwitz MS, Hornstein OP, Driesch P. Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum* 38: 184-189, 1995
  - 40) Tomino Y, Tsushima Y, Ohmuro H, Shimizu M, Kuramoto T, Shirato I, Koide H. Detection of activated platelets in urinary sediments by immunofluorescence using monoclonal antibody to human platelet GMP-140 in patients with IgA nephropathy. *J Clin Lab Anat* 7: 329-333, 1993

***In situ* Expression and Soluble Form of P-selectin in Human Glomerulonephritis** Chikako Segawa, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105, 766—775 (1996)

**Key words** P-selectin, soluble P-selectin, human glomerulonephritis, platelet, endothelial cell

#### Abstract

To clarify the early involvement of cellular adhesion molecules in human glomerulonephritis, P-selectin expression in 85 kidney specimens was investigated by immunohistochemical and *in situ* hybridization analyses, and measured serum and urinary soluble P-selectin levels, in 48 cases by ELISA. In normal controls, renal P-selectin expression was negative (n=4), and serum soluble P-selectin levels were  $114.3 \pm 36.8$  ng/ml (mean  $\pm$  SEM, n=12). Soluble P-selectin was not detected in the urine of any case. In proliferative glomerulonephritis involving IgA nephropathy (IgAN, n=26), lupus nephritis (LN, n=7) and acute glomerulonephritis (AGN, n=2), glomerular P-selectin expression was significantly up-regulated with mean scores 0.4, 0.4 and 1.5, respectively. Interstitial P-selectin expression was also up-regulated in patients with rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN, n=6), IgAN and AGN (0.5, 0.5 and 1.5, respectively). CD41b (platelet) staining was positive in accordance with P-selectin in glomeruli ( $r=0.78$ ,  $P<0.001$ ). However, P-selectin mRNA signals detected by *in situ* hybridization were only observed on capillary or venous endothelium in the interstitium, but not in glomeruli. Glomerular P-selectin expression correlated positively with endocapillary proliferation, exudative lesions and mesangial proliferation ( $r=0.60$ ,  $r=0.44$  and  $r=0.42$ , respectively;  $P<0.001$ ). Serum soluble P-selectin levels were significantly higher in patients with IgAN, LN and AGN ( $283.6 \pm 64.1$ ,  $312.8 \pm 52.2$  and  $581.0 \pm 219.2$  ng/ml, respectively;  $P<0.05$ ), and showed a positive correlation with endocapillary proliferation and exudative lesions ( $r=0.54$ ;  $P<0.001$ ,  $r=0.35$ ;  $P<0.01$ ). In addition, serum soluble P-selectin levels tended to be higher in glomerular or interstitial P-selectin positive patients than in negative patients. On the other hand, in non-proliferative glomerulonephritis such as minimal change nephrotic syndrome (n=15), focal glomerulosclerosis (n=2) and membranous nephropathy (n=12), both renal P-selectin expression and serum soluble P-selectin levels were not up-regulated. These observations indicated that P-selectin was associated with both glomerular and interstitial leukocyte accumulation in human proliferative glomerulonephritis, and might be expressed by two distinct mechanisms, that is, the activated platelets in glomeruli and the *de novo* expression on the endothelial cells in the interstitial lesions, and serum soluble P-selectin may be a useful clinical marker for predicting *in situ* P-selectin expression associated with glomerular endocapillary proliferation in nephritis.