S1-12

ラット遊離クッパー細胞による分画ヘパリン輸送機構：スカベンジャー受容体の関与

○巾 正美、浦野公彦、湯浅博昭、渡辺 淳
名古屋市立大学薬学部薬剤学教室

Uptake Mechanism of Fractionated Heparin by Isolated Rat Kupffer Cells:
Involvement of Scavenger Receptors

Masami HABA, Kimihiko URANO, Hiroaki YUASA, Jun WATANABE

Department of Biopharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University

[目的] Heparinに代表される酸性ムコ多糖類は、癌細胞の転移抑制作用や抗HIV作用などを有することが最近見いだされ¹⁾、これら豊富な生理活性の治療薬への応用が期待されているばかりでなく、生理活性ペプチドの組織への送達を目的とした、DDS素材としても注目されている²⁾。しかし、酸性ムコ多糖類を用いた多くの研究は、in vitro試験を中心とした薬効評価に偏っており、体内動態に関する報告は極めて少なく、このことが酸性ムコ多糖類の合理的な薬物療法を実現する上での大きな障害となっている。これらの問題を克服し、酸性ムコ多糖類の合理的な薬物療法を実現するために、我々は酸性ムコ多糖類のモデル物質として、分子量を約20000 Da.に限定した分画heparinを取り上げ、その主要分布臓器である肝での輸送機構を検討してきており、これまでに以下の知見を得ている。(1) 肝への取り込みには実質および非実質の両細胞群が寄与している³⁾。(2) 培養実質細胞による取り込みには、生理活性ペプチドの輸送機構として知られている、受容体介在性エンドサイトーシスとは異なる未知の輸送機構が関与している可能性がある⁴⁾。本研究では、クッパー細胞に焦点をあて、濃度依存性、構造輸送相関、分子量依存性を中心に分画heparin輸送機構の検討を行った。

[実験方法] 分画³Hheparin：プロタミンに対しアフィニティを有し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量を23000および10000Da.に限定した高分子量(HMWFH)および低分子量分画³Hheparin(LMWFH)を用いた。クッパー細胞の分離：Collagenase灌流法およびPercoll密度勾配遠心法により、非実質細胞を分離した後、クッパー細胞のみが有するプラスティックディッシュへの吸着能を利用することにより、非実質細胞からクッパー細胞を分離、精製し、取り込み実験に用いた。取り込み実験：細胞密度をディッシュあたり 10^6 cellsとして、4°及び37℃で結合及び取り込み実験を行った。取り込み実験の後、分子量500 kDa.の硫酸デキストランで細胞をwashし、解離した分画³Hheparin量を細胞表面結合量として、細胞に残存している分画³Hheparin量を内在化量として分離評価した。

[結果および考察] 取り込みparameterの算出：平衡状態におけるHMWFHの結合には

Table I
Uptake Parameters for Fractionated Heparin in Rat Kupffer Cells

	K_d (nM)	B_{max} (pmol/ 10^6 cells)	$k_{int,app}$ (min^{-1})
HMWFH (23000 Da.)	5.7 ± 1.6	1.5 ± 0.2	0.0100 ± 0.0012
LMWFH (10000 Da.)	$50.0 \pm 15.7^*$	2.3 ± 0.8	$0.0033 \pm 0.0020^*$

Mean $\pm$ S.D. (n=3). K_d , dissociation constant; B_{max} , maximum binding capacity; $k_{int,app}$, apparent internalization rate constant. * Significantly different from HMWFH at $p < 0.05$.

濃度依存性が認められ、クッパ-細胞によるHMWFHの取り込みには、特殊な輸送機構が関与していることが示唆された。

結合-濃度曲線をLangmuir型の式にあてはめ解析した結果、解離定数(K_d)として5.7 nM、最大結

合能(B_{max})として1.5 pmol/ 10^6 cellsが得られた。HMWFHの内在化量には経時的な上昇が認められ、内在化量と表面結合量の積分値のプロットの傾きから、見かけの内在化速度定数($k_{int,app}$)として0.010 min^{-1} が算出された(Table I)。

スカベンジャー-受容体基質の影響：HMWFHのクッパ-細胞への結合は、フコイダ

Fig. 1 Competitive Inhibitions of the Binding of HMWFH to Rat Kupffer Cells by Various Compounds

Mean $\pm$ S.D. (n=3) Binding measurements at 4°C for 2 h. Inhibitor conc.: dextran sulphate, 5 nM; fucoidan, 25 nM; polyguanylic acid, 100 nM; heparan sulphate, 500 nM; DIDS, 50 μM .

ン、硫酸デキストラン、ポリグアニル酸などのスカベンジャー-受容体の基質により競合的に阻害され、得られた阻害定数

(47、2.6、72 nM)は、酸化低密度リポタンパク質など他のスカベンジャー-受容体の基質で報告されている結合解離定数(2 - 250 nM)^{5,6}の範囲内の値であった(Fig. 1)。また、HMWFHの結合は、ヘパリン類似物質であるヘパラン硫酸、有機アニオン輸送系の阻害剤

であり硫酸基を有するDIDSによって競合的に阻害され、阻害定数として、370 nM、27 μM が得られた (Fig. 1)。結合と同様にHMWFHの内在化は、フコイダン、硫酸デキストラン、ポリグアニル酸によって阻害された。しかし、ポリグアニル酸と類似構造を有するがスカベンジャー-受容体には認識されないことが知られているポリシチジル酸⁷⁾によっては、HMWFHの結合、内在化は共に影響を受けなかった。以上の結果

は、クッパ-細胞によるHMWFHやヘパリン類似物質の取り込みには、スカベンジャー-受容体が発現していることを強く示唆するものであり、スカベンジャー-受容体への結合にはHMWFH中の硫酸基が発現していることが考えられた。

輸送阻害剤、温度の影響：スカベンジャー-受容体によるHMWFHの内在化は、代謝阻害剤であるジニトロフェノールやロテノン、生理活性ペプチドの受容体介在性エンドサイト-シスや吸着性エンドサイト-シスの内在化阻害剤であるフェニルアルシンオキサイド^{8,9)}、ファゴサイト-シスを阻害することが知られているサイトカラシンBやコルヒチン^{10,11)}により影響を受けなかった(Fig.2)。一方、温度を37℃から4℃に低下させることにより、HMWFHの内在化率は約33%から6%に減少したが、25℃における内在率(27%)は、37℃における内在化率とほぼ同程度であった。これらの結果より、スカベンジャー-受容体による取り込みは、ATP非依存性であり、内在化における温度依存性に関しては、典型的なエンドサイト-シスの特徴を有するが、生理活性ペプチドの受容体介在性エンドサイト-シスや吸着性エンドサイト-シス、ファゴサイト-シスとは異なった、取り込み特性を有することが考えられる。

Fig. 2 Effects of Transport Inhibitors on the Total Association and Internalization of HMWFH in Rat Kupffer Cells

Mean $\pm$ S.D. (n = 3). Uptake measurements at 37°C for 2 h. 5 nM fractionated [³H]heparin.

分子量依存性：LMWFHのクッパ-細胞への結合と内在化はHMWFHやいくつかのスカベンジャー-受容体の基質により阻害されたことから、LMWFHはHMWFHと同様にスカベンジャー-受容体により取り込まれると考えられる。ただし、スカベンジャー-受容体による分画ヘパリンの取り込みには、顕著な分子量依存性が認められ、分画ヘパリンの分子量の低下により、解離定数の上昇、すなわちスカベンジャー-受容体への親和性の低下と、みかけの内在化速度定数の低下が認められた(Table I)。

[まとめ] 以上の結果より、クッパ-細胞による分画ヘパリンの取り込みにはスカベンジャー-受容体が発現しており、スカベンジャー-受容体による取り込みは、生理活性ペプチドの受容体介在性エンドサイト-シス等とは異なった取り込み特性を有すること、分画ヘパリンの分子量が、クッパ-細胞による分画ヘパリンの取り込みにおいて重要な支配要因であることが明らかにされた。

[ABSTRACT] The uptake of fractionated [^3H]heparin was examined to elucidate the uptake mechanism in isolated rat Kupffer cells. The equilibrium binding of high molecular weight fractionated [^3H]heparin (HMWFH; 23000 Da.) to Kupffer cells was concentration-dependent with the dissociation constant of 5.7 nM and the maximum binding capacity of 1.5 pmol/ 10^6 cells. Several ligands of scavenger receptors inhibited the binding of HMWFH to Kupffer cells competitively and also the internalization of HMWFH, suggesting the involvement of scavenger receptors in the uptake of HMWFH. HMWFH was also suggested to be internalized according to first order kinetics with the apparent internalization rate constant of 0.010 min^{-1} . Lowering temperature from 37° to 4°C reduced the fraction internalized from 33 % to 6 % without affecting the total association, while the fraction internalized at 25° was comparable with that at 37°C . Metabolic inhibitors (2,4-dinitrophenol and rotenone), an inhibitor of receptor-mediated and absorptive endocytosis of polypeptides (phenylarsine oxide) and phagocytosis inhibitors (cytochalasin B and colchicine) did not inhibit the internalization of HMWFH. These results suggested the scavenger receptor-mediated uptake of HMWFH is ATP-independent and different from the receptor-mediated and absorptive endocytosis of polypeptides and phagocytosis, although, as for temperature dependency, it showed the typical characteristics of receptor-mediated endocytosis. Low molecular weight fractionated [^3H]heparin (LMWFH; 10000 Da.) was also suggested to be taken up by scavenger receptors. The binding affinity to scavenger receptors and apparent internalization rate constant were reduced with the decrease in molecular weight, suggesting that the molecular weight of fractionated heparin is one of the major factors determining the uptake by scavenger receptors.

[REFERENCES]

- 1) M. Ito *et al.*, *Antivir. Res.*, **7**, 361-367 (1987).
- 2) M. Inoue *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 16409-16414 (1991).
- 3) J. Watanabe *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**(10), 1031-1034 (1993).
- 4) J. Watanabe *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**(5), 497-500 (1993).
- 5) E. Ottand *et al.*, *Biochem. J.*, **281**, 745-751 (1992).
- 6) K. Takata *et al.*, *J. Biochem. Chem.*, **263**, 14819-14825 (1988).
- 7) L. Rohrer *et al.*, *Nature.*, **343**(8), 570-572 (1990).
- 8) H. S. Wiley *et al.*, *J. Biochem. Chem.*, **257**, 4222-4229 (1982).
- 9) T. Terasaki *et al.*, *Pharm. Res.*, **9**(4), 529-534 (1992).
- 10) K. Sadvig *et al.*, *J. Biochem. Chem.*, **265**, 6382-6388 (1990).
- 11) M. Pratten *et al.*, *Biochem. J.*, **180**, 567-571 (1979).