VLDL と血管内皮細胞表面グリコースアミノグリカンの 相互反応について*

島 田 和 幸** 小 沢 利 男**

I. はじめに

VLDLあるいはカイロミクロンは、血管壁表面においてリポ蛋白リパーゼの中性脂肪水解作用を受ける。その際、これらのリポ蛋白は血管内皮表面に結合ないし、吸着され、リパーゼの作用をより受けやすくする可能性が考えられる。一方、リポ蛋白リパーゼや VLDL, カイロミクロンはヘパリンと強い親和性を有することが知られており、血管内皮細胞表面に glycocalyx として存在するグリコースアミノグリカン (GAG) とこれらのヘパリン親和性物質との in vivo における結合が想定される。実際、リポ蛋白リパーゼと血管内皮表面ヘパラン硫酸の相互反応は、著者らにより、証明されてきた^{1,2)}。また、GoldsteinらのLDL receptorは、ヘパリンにより阻害されることから、それらの receptor が、細胞表面のヘパリン様物質と何らかの関連を有している可能性も残されている³⁾。本研究では、これらの問題を培養血管内皮細胞を用い、in vitro において検証することを目的とする。

II. 方 法

VLDLと内皮細胞の結合は、人血漿中より分離した VLDL 分画をヨード化し (ICl 法)、豚大動脈より初代培養した内皮細胞と4°Cにおいてインキュベートした後、メディウムを除去し、洗浄した後、トリプシン処理を行い、細胞をペトリ皿より浮遊させ、遠心して得られた上清み中の放射活性を細胞表面結合 VLDL, 細胞沈渣中のそれを細

胞内にとりこまれた VLDL とした。そして、このような VLDL 結合実験を、GAG 分解酵素で処理した細胞とそうでない細胞を比較検討した。

III. 結 果

内皮細胞をあらかじめ ³⁵S 硫酸あるいは、³H ロイシンで標識した後に、種々の GAG 分解酵素で細胞を処理 (37°C, 60分) した。GAG 分解酵素処理後、細胞をトリプシン処理して得られる上清み中の ³⁵S 放射活性を細胞表面に残存する GAG と仮定すると、ヘパリチネース処理により、細胞表面 GAG はコントロール (パフファーのみの処理) に比し、約80%減少した。一方、コンドロイチネース ABC 処理では、対照の20%に減少した。すなわち、細胞表面 GAG の80%がヘパラン硫酸よりなり、残り20%がコンドロイチン硫酸で構成されており、かつ、今回用いた方法により、それらの GAG が選択的に完全に除去されたことが証明された。³Hロイシンで標識した細胞からは、これらの酵素処理により、有意な放射活性の遊離はみられなかった。すなわち、蛋白分解活性の混入の可能性は否定できた。

次に、Fig. 1 に VLDL と内皮細胞の結合実験を示す。4°C において結合は 2 時間で平衡に達し、細胞内とりこみは表面結合の30%に達した。そして、これらの結合は VLDL, 約 100 μg 蛋白/ml で飽和することが示された。Tables 1, 2 には VLDL 細胞表面結合および細胞内とりこみ (VLDL, 3.6 μg/ml) を GAG 分解酵素処理前後で比較した2回の実験成績を示してある。ヘパリチネースおよびコンドロイチネースともに VLDL の内皮細胞結合に影響を及ぼさなかった。

* 1983年12月, 日本動脈硬化学会 昭和58年度冬季大会において発表

** 高知医科大学老年病科

Cell Surface Binding (●) and Cellular Uptake (○)

Fig. 1 VLDL binding to endothelial cells.

Table 1 Effects of heparitinase on $[^{125}\text{I}]$ VLDL binding to endothelial cells

	Cell surface binding (ng/mg cell protein)		Cellular uptake (ng/mg cell protein)	
	Control	Heparitinase	Control	Heparitinase
Expt. 1	83	105	26	28
Expt. 2	54	47	21	19

Table 2 Effects of chase ABC on $[^{125}\text{I}]$ VLDL binding to endothelial cells

	Cell surface binding (ng/mg cell protein)		Cellular uptake (ng/mg cell protein)	
	Control	Chase ABC	Control	Chase ABC
Expt. 1	54	44	21	18
Expt. 2	46	46	13	11

IV. 考 案

今回の実験成績からは、VLDL の内皮細胞結合に GAG が関与している可能性は否定的であった。残された可能性として以下のことが考えられる。1) VLDL と内皮細胞 GAG の結合は、今回の結合実験システムでは検出され得ない程度の弱い相互反応である。2) VLDL のヨード化が

GAG 反応性を变化させた。3) VLDL には subclass があり流血中の VLDL は内皮 GAG との反応性に乏しい。4) 直接、VLDL が内皮 GAG と結合するのではなく、LPL (リポ蛋白リパーゼ) を介して内皮表面に保持される。以上のような諸点の検討が今後必要と考えられる。

謝辞：本研究の実施にあたり、卓越した技術的援助をいただいた村井みき、門田幸子両氏に深謝いたします。

本報告は文部省科学研究費補助 No. 57570352, 財団法人日本心臓財団の奨励および厚生省循環器病研究委託費 (58公-1) による研究成果である。

文 献

- 1) Shimada, K., Gill, P. J., Silbert, J. E., Douglas, W. H. J. and Fanburg, B. L.: Involvement of cell surface heparan sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **68**: 995-1002 (1981).
- 2) Cheng, C.-F., Oosta, G. M., Bensadoun, A. and Rosenberg, R. D.: Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **256**: 12893-12898 (1981).
- 3) Wight, T. N.: Vessel proteoglycans and thrombogenesis. *Prog. Hemostasis Thromb.*, **5**: 1-39 (1980).

Summary

Interactions between VLDL and Glycosaminoglycans on the Endothelial Cell Surface

Kazuyuki SHIMADA and Toshio OZAWA

Department of Geriatrics, Kochi Medical School

Binding of ^{125}I -VLDL to endothelial cells was investigated before and after the treatment of cells with glycosaminoglycan (GAG) degrading enzymes. Treatment of the endothelial cell monolayer by heparitinase or chondroitinase ABC was found to remove all of the cell surface heparan sulfate or chondroitin sulfates, which accounted for 80% or 20% of cell surface GAGs respectively. No proteinase activity was demonstrated.

Binding of VLDL to endothelial cells reached equilibrium at 4°C by 2 hr and, was saturable at

VLDL concentration of 100 μg protein/ml. Neither heparitinase nor chondroitinase treatment affected the amount of cell surface binding and cellular uptake of VLDL.

These results do not support the concept that endothelial cell surface GAGs contribute to the attachment of VLDL to the surface of the endothelium.

Key words: Endothelial cells, VLDL, Glycosaminoglycans, Glycosaminoglycan lyase.