単球マクロファージの血管内皮基底膜へパラン硫酸分解活性*

島田 和 幸** 三 森 康 世** 小 沢 利 男**

I. はじめに

高脂血症で惹起された動脈硬化モデルの初期病変においては、血液単球由来のマクロファージが内皮下に侵入し、ついで脂質を貪食して泡沫細胞となる過程が明らかにされている¹⁾。マクロファージが血管内皮下に侵入、内皮基底膜を通過する

際、基底膜の重要な構成成分の一つであるプロテオグリカンを経細胞が分解しながら侵入していくことが想定される。実際、転移性腫瘍細胞や活性化リンパ球の血管外漏出過程において、このような機序が証明されている²⁾。同様な機構が血管壁プロテオグリカンと単球由来マクロファージの相互反応にも存在する可能性を検討した。

Fig. 1 血清の非存在下における ECM 標識プロテオグリカンの単球-マクロファージによる分解
—●—; 培養液のみ, —○—; 単球-マクロファージ.

* 1985年6月, 第17回日本動脈硬化学会総会において発表

** 高知医科大学老年病科

Fig. 2 ECM 標識プロテオグリカンの蛋白成分分解処理と単球-マクロファージによる分解の比較。
—●—; 培養液のみ, —○—; 単球-マクロファージ, --△--; アルカリ処理, --▲--;
pronase 処理.

II. 方 法

血管内皮基底膜 (Extracellular Matrix, ECM) のモデルの作成にあたっては、培養豚大動脈内皮細胞の産生するプロテオグリカンを放射性硫酸で標識した後、細胞を triton X で処理し、ペトリ皿上にラベルされた ECM のみを残して調整した²⁾。このようにして作成された ECM 中のグリコサミノグリカンはヘパラン硫酸が約 3/4、コンドロイチン硫酸が残り 1/4 の構成比率であった。次に、人末梢血中より単核球を分離し、標識 ECM 上に 1~2 時間静置した後、ペトリ皿に強く付着した単球-マクロファージのみを残してさらに 2~3 日間インキュベーションを続けた。この間に培養液中に ECM より遊離した標識プロテオグリカン

を Sepharose CL-6B 上にてゲル濾過しその分解過程を観察した。

III. 結 果

単球を含まない培養液のみで ECM をインキュベートした場合には遊離プロテオグリカンは void volume 分画にのみ溶出されたが、単球が付着した ECM からはより小分子の放射化合物が遊離した。これは培養液中に血清成分がなくても同じであった (Fig. 1)。溶出した放射活性はすべて cetylpyridinium chloride で沈殿した。さらにこの小分子分画をアルカリおよび pronase などのたんぱく分解処理、あるいはコンドロイチン硫酸分解処理を行ってもその分子サイズに変化がなく、逆にヘパリチネースや nitrous acid 処理などのヘパラン硫

酸分解処理にてさらに小分子化合物に分解された。すなわち、この単球-マクロファージによって遊離するプロテオグリカンとはたんに成分を欠くヘパラン硫酸グリコサミノグリカンであることがわかる。しかもそのサイズは Fig. 2 で示すように、ECM をアルカリあるいは pronase 処理して得たインタクトな ECM グリコサミノグリカンのサイズよりも小さく、それらが分解されたものであることが明らかとなった。以上の事実は単球由来マクロファージからたんに分解酵素とは別に、ECM 中のヘパラン硫酸を特異的に分解する酵素活性が産生されていることを強く示唆している。さらにマクロファージ-ECM 反応系に大量のヘパリンを加えた場合、ヘパラン硫酸分解物の生成が阻害された。ヘパラン硫酸 endoglycosidase の基質ともなりうるヘパリンが過量に存在したために ECM ヘパラン硫酸の分解が抑制されたものと解釈される。

IV. 結 論

人末梢単球が血管内皮基底膜に付着、侵入する過程で、基底膜を構成するヘパラン硫酸グリコサミノグリカンの分解活性が産生されることが示唆された。このことは動脈硬化初期病変における単球-マクロファージ-内皮細胞間の相互反応の一つの分子メカニズムを表わしていると考えられる。

本研究は文部省科学研究費 nos 59570366, 60570395 および厚生省心臓血管病研究委託費 No. 58C-1 によった。

文 献

- 1) Faggiotto, A., Ross, R. and Harker, L.: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, **4**: 323-340 (1984).
- 2) Vlodavsky, I., Fuks, Z., Bar-Ner, M., Ariav, Y. and Schirrmacher, V.: Lymphoma cell-mediated degradation of sulfated proteoglycans in the sub-endothelial extracellular matrix: Relationship to tumor cell. *Cancer Res.*, **43**: 2704-2711 (1983).

Summary

A Subendothelial Extracellular Matrix Heparan Sulfate Degrading Activity of Human Monocyte-Macrophages

Kazuyuki SHIMADA, Yasuyo MIMORI and Toshio OZAWA

Department of Medicine and Geriatrics, Kochi Medical School Nankoku, Kochi 781-51, Japan

In order to understand a mechanism of monocyte-endothelial cell interactions, the present study was performed to investigate the degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix (ECM) by monocyte-macrophages in vitro. Adherent mononuclear leucocytes isolated from human peripheral blood were plated on the [³⁵S]O₄-prelabeled ECM coated dishes prepared from cultured porcine aortic endothelial cells. The nature of radiolabeled materials released upon incubation of the ECM with cells at 37°C for 48-72 hrs was studied by applying the culture medium to gel filtration on Sepharose CL-6B columns. The monocyte-macrophages solubilized the labeled matrix to a lower mol. wt. component compared with the material released during exposure of the ECM to medium without cells that eluted with the void volume. Degradation products eluted in the lower mol.

wt. peak were precipitated with cetylpyridinium chloride and were resistant to further digestion with alkali, pronase or chondroitin ABC lyase, but were converted to further lower mol. wt. fragments after nitrous acid or heparitinase treatment. The size of intact glycosaminoglycan side chains determined by subjecting the ECM to cleavage with alkali or pronase was larger than that of degradation products released by the cells. Heparin inhibited the degrading activity of cells.

These results suggest that the attachment and subsequent invasion of vascular endothelium by monocyte-macrophages may involve the production of ECM heparan sulfate degrading activity by these cells.

Key words: Endothelial cell, Extracellular matrix, Heparan sulfate, Monocyte, Macrophage, Endoglycosidase.