

培養角膜実質細胞に対するL-アスコルビン酸 2-リン酸の影響 (第2報)

雑賀司珠也*, 金川 龍一*, 上野山謙四郎*, 廣井 健治**, 平岡 純一***

*和歌山県医科大学眼科学教室, **同 微生物学教室, ***同 第二解剖学教室

要 約

培養家兎角膜実質細胞の増殖に対するL-アスコルビン酸2-リン酸(P-Asc)の影響を検討した。P-Ascは、アルコルビン酸の誘導体で、アスコルビン酸に比べ溶液中で安定で、37°Cで一週間後も約85%がビタミンC活性を保持するとされている。培養10日、20日、及び30日後に培養細胞数を算定した結果、0.1mMのP-Ascは、培養家兎角膜実質細胞の増殖を促進した。また、30日間培養した細胞の透過型電子顕微鏡による観察では、0.1mMのP-Ascは細胞の重層化を促進していることが認められた。コラーゲン合成の阻害剤であるアゼチジン2-カルボン酸は、このP-Ascの増殖促進効果を抑制し、この増殖促進効果に細胞のコラーゲンの合成が関与していることが示唆された。P-Ascの培養家兎角膜実質細胞の増殖に対する促進の効果から、角膜実質の障害に対する治癒促進効果が示唆された。(日眼会誌 95:39-44, 1991)

キーワード: L-アスコルビン酸2-リン酸, 培養家兎角膜実質細胞

Effect of L-ascorbic Acid 2-phosphate on Cultured Rabbit Keratocytes (The Second Report)

Shizuya Saika*, Ryuichi Kanagawa*

Kenshiro Uenoyama*, Kenji Hiroi** and Jun-ichi Hiraoka***

*Department of Ophthalmology, Wakayama Medical College

**Department of Microbiology, Wakayama Medical College

***Department of Anatomy, Wakayama Medical College

Abstract

We examined the effect of L-ascorbic acid 2-phosphate (P-Asc) on the proliferation of cultured rabbit keratocytes. P-Asc is a derivative of L-ascorbic acid and it yields more prolonged effects of vitamin C in solution than L-ascorbic acid. The proliferation of cultured rabbit keratocytes was promoted by the presence of P-Asc in culture medium for 10, 20, and 30 days.

Transmission electron microscopic observations revealed that the cells were more multilayered in the presence of P-Asc (0.1mM) for thirty days than those in the absence of P-Asc. Moreover, this effect of P-Asc was attenuated by azetidine 2-carboxylic acid which is an inhibitor of collagen synthesis. Hence, it is suggested that the promotive effect of P-Asc on the growth of cultured keratocytes is related to the synthesis of collagen. Based on our observations, P-Asc may have a therapeutic effect on corneal stromal damages such as a corneal chemical burn and surgical trauma.

別刺請求先: 640 和歌山市七番町1 和歌山医大眼科 雑賀司珠也

(平成2年2月7日受付, 平成2年5月2日改訂受理)

Reprint requests to: Shizuya Saika, M.D. Department of Ophthalmology, Wakayama Medical College
7 Bancho 27, Wakayama 640, Japan

(Received February 7, 1990 and accepted in revised form May 2, 1990)

(Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 39-44, 1991)

Key words: L-ascorbic acid 2-phosphate, Cultured rabbit keratocyte

I 緒 言

近年、種々の細胞についてコラーゲンやフィブロネクチンに代表されるグリコプロテイン、さらにプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスの成分の、細胞の分化、増殖に対する影響が *in vitro* で調べられている。とくにコラーゲンの種々の培養細胞の増殖に対する影響に関して、多くの報告がなされている^{1)~7)}。Liotta らは、コラーゲン分泌を抑制する *cis*-hydroxyproline を用いて *in vitro* で connective tissue cell の増殖にコラーゲン分泌が必要であることを明らかにした⁸⁾。角膜実質細胞はコラーゲン産生能を有し、創傷部や培養状態では活発にコラーゲンを産生し、また、正常状態においても自ら産生したコラーゲン線維の中に存在している。従って、コラーゲン線維の三重鎖構造の構成に関与するプロリン水酸化酵素及びリジン酸化酵素の補酵素であるビタミンCが培養角膜実質細胞のコラーゲン合成、分泌に影響を及ぼすことで、細胞の増殖にも影響を及ぼすことが予想される。アスコルビン酸は、培養液中、37℃では、24時間で約90%が、酸化され薬理作用を失い、一定の活性を培養液中で保つためには、頻回に培養液に添加する必要があるのに対し、L-アスコルビン酸2-リン酸は、培養液中、37℃で1週間後も約85%が酸化されずにビタミンC活性を保持すると報告されている^{9)~11)}。我々は、L-アスコルビン酸2リン酸の培養家兎角膜実質細胞の増殖に対する影響を検討した。さらに、コラーゲン合成の阻害剤であるアゼチジン2-カルボン酸（以下AzCと略す。）存在下でのP-Ascの培養家兎角膜実質細胞の増殖に対する影響についても検討を加えた。

II 材料と方法

体重約2.5kgの白色家兎の角膜を用いた。ペントバルビタールの過量静脈内投与で屠殺し、角膜中央部の直径6mmの部分を選択した。メスを用いて、採取された角膜片の上皮および内皮を充分取り除いた。残った角膜実質を約1mm角に細切した。0.5%コラーゲナーゼ(Yakult)1mlを2時間作用させ、実質細胞を遊離させた。10%牛胎児血清(三菱化学)をくわえたイーグルMEM(ニッスイ)で遊離させた実質細胞の初代培養を

行った。イーグルMEMは、カナマイシン、60mg/lを含有したものを使用し、さらにペニシリンG(明治製薬)100U/ml、アンホテリシンB(GIBCO)250μg/lを加えた。二代継代の後、実験に使用した。0.25%トリプシンで細胞を遊離させ、10%牛胎児血清加イーグルMEMにてピペッティングし細胞浮遊液を作成した。細胞密度は 2.2×10^4 /mlであった。

以下、すべての実験において、培養液は、3ないし4日に1度交換した。

1. 角膜実質細胞の増殖に対するP-Ascの影響。

作成した細胞浮遊液を12穴プラスチックシャーレ(Corning社)に1穴あたり1mlずつ分散した。そこに最終濃度0.1mMのP-Asc(和光純薬)を添加した。コントロールには、同量のP-Ascを含まない培養液を加えた。5%CO₂ 37℃の下で培養した。培養液は、3ないし4日に一度交換した。培養開始後、10日、20日、及び30日後に細胞を0.25%トリプシンでシャーレから遊離させ、各穴ごとの総細胞数を血球計算を用いて算定した。6穴の値の平均値を1穴あたりの平均細胞数とした。

2. AzC存在下でのP-Ascの細胞増殖に対する影響。

12穴プラスチックシャーレに実験1と同様に細胞浮遊液を分散し、P-Asc(0.1mM)、AzC(Sigma chemical)(1.0mMまたは0.5mM)を添加した培養液及びAZC(1.0mM)を添加した培養液で30日培養した後、実験1同様に1穴あたりの平均細胞数を算定した。実験には、それぞれ6穴使用し、6穴の値の平均値を1穴あたりの平均細胞数とした。

3. 透過型電子顕微鏡による観察。

12穴プラスチックシャーレ内に置かれたメンブランフィルター(0.45μm culture plate insert, Millipore社)に上記の細胞浮液0.4mlを分散した。その上に最終濃度0.1mMのP-Ascを添加した。コントロールには同量のP-Ascを含まない培養液をいれた。コントロールでは、P-Ascを含まない培養液を同部に入れた。CO₂インキュベーター内で、5%CO₂ 37℃の下で30日間培養した。培養液は3ないし4日に一度交換した。30日間培養した後、メンブランフィルターごと細胞を2%グルタルアルデヒドで固定した後、1%オスミウム

表 1 0.1mM P-Asc 添加, 又は非添加で培養した家兎角膜実質細胞の一穴あたりの平均細胞数. SD: 標準偏差.

medium	cell number/well (±SD)		
	10 days	20 days	30 days
control	$1.5 \times 10^5 (\pm 2.1 \times 10^4)$	$3.0 \times 10^5 (\pm 2.0 \times 10^4)$	$3.7 \times 10^5 (\pm 3.4 \times 10^4)$
0.1mM P-Asc	$2.4 \times 10^5 (\pm 4.0 \times 10^4)$	$4.1 \times 10^5 (\pm 5.2 \times 10^4)$	$4.8 \times 10^5 (\pm 3.8 \times 10^4)$

酸で後固定した. アセトン系列による脱水の後, メンブランごと Epon812 に包埋し, 超薄切片作成後, 電子染色を行い, 透過型電子顕微鏡で観察した.

III 結 果

1. 角膜実質細胞の増殖に対する P-Asc の影響 (表 1)

1.0mM の P-Asc を添加した培養液で培養された家兎角膜実質細胞の 1 穴あたりの平均細胞数は, 10 日後, 20 日後, 30 日後とも P-Asc を含まない培養液で培養された細胞より多かった. 結果はそれぞれ統計学的に 5 % の危険率で有意であった. 培養期間中, 倒立顕微鏡による観察で細胞毒性を示す所見は認められなかった.

2. AzC 存在下での P-Asc の細胞増殖に対する影響 (表 2)

P-Asc の細胞増殖促進効果は, AzC で抑制された. しかも, その抑制効果は AzC の濃度が 0.5mM よりも 1.0mM の方が強かった. AzC 1.0mM のみを含む培養液での培養細胞数は, P-Asc 0.1mM 及び AzC 1.0mM を添加した場合と差がみとめられなかった. 培養期間中, 倒立顕微鏡による観察で, 細胞毒性を示す所見は認められなかった.

3. 透過型電子顕微鏡による観察 (図 1)

0.1mM P-Asc を添加した培養液で 30 日間培養した家兎角膜実質細胞は, 9 層ないし 10 層に重層化して配列しているのが観察された. P-Asc 非添加の培養液で

培養された細胞は 5 層ないし 6 層に重層化していた. 細胞内の微細構造は, P-Asc 添加群と非添加群の間で差異は認められなかった. P-Asc 添加群の細胞の粗面小胞体は, コントロール群の細胞のものに比べ, 内容物が少なかった.

IV 考 按

近年, 細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンの種々の細胞の分化, 増殖に対する影響に関して, 多くの報告がされている^{1)~8)}. ビタミン C は, プロリルヒドロキシラーゼ, リジルヒドロキシラーゼの補酵素であることから, 細胞内でプロトコラーゲンのプロリン, リジンの水酸化を促進し, 三重鎖構造をとるプロコラーゲン線維の合成および細胞外へ分泌を促進する事が種々の細胞で報告されている^{12)~15)}. 又, コラーゲンペプチドの mRNA 量をアスコルビン酸が増加させるという事も報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾. 従って, in vitro でビタミン C が細胞外のコラーゲン量を増加させ, さらに細胞の増殖にも影響を及ぼす事が予想される. Hata らは, アスコルビン酸が, ヒト皮膚由来の培養線維芽細胞の非コラーゲタンパク質の合成を促進せずに, コラーゲンの合成を促進し, 同時に細胞増殖も促進することを報告した¹⁸⁾. さらに, 彼らは, 今回, 我々が使用した L-アスコルビン酸 2-リン酸についても検討し, アスコルビン酸と同様に培養ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成及び細胞増殖をすること, コラーゲン合成阻害剤であるアゼチジン-2-カルボン酸がこの細胞増殖促進効果およびコラーゲン合成を抑制することを報告した¹¹⁾.

角膜実質細胞は, 線維芽細胞と同様にコラーゲン産生能を有し, 角膜の創傷部や培養状態で活発にコラーゲンを産成する. 従って, ビタミン C が in vitro で培養角膜実質細胞の増殖に何等かの影響を及ぼす事が予想される. 前回, 我々は, 0.1mM の P-Asc 存在下で 30 日後に培養家兎角膜実質細胞の増殖が促進されることを報告した¹⁹⁾. さらに, この時, 位相差顕微鏡での観察

表 2 1.0mM AzC, 1.0mM AzC と 0.1mM P-Asc, 又は, 0.5mM AzC と 0.1mM P-Asc を含む培養液で 30 日培養したときの一穴あたりの平均細胞数. SD: 標準偏差.

medium	cell number/well (±SD)
1.0mM AzC	$2.3 \times 10^5 (\pm 3.3 \times 10^4)$
1.0mM AzC + 0.1mM P-Asc	$2.8 \times 10^5 (\pm 5.5 \times 10^4)$
0.5mM AzC + 0.1mM P-Asc	$4.2 \times 10^5 (\pm 4.0 \times 10^4)$

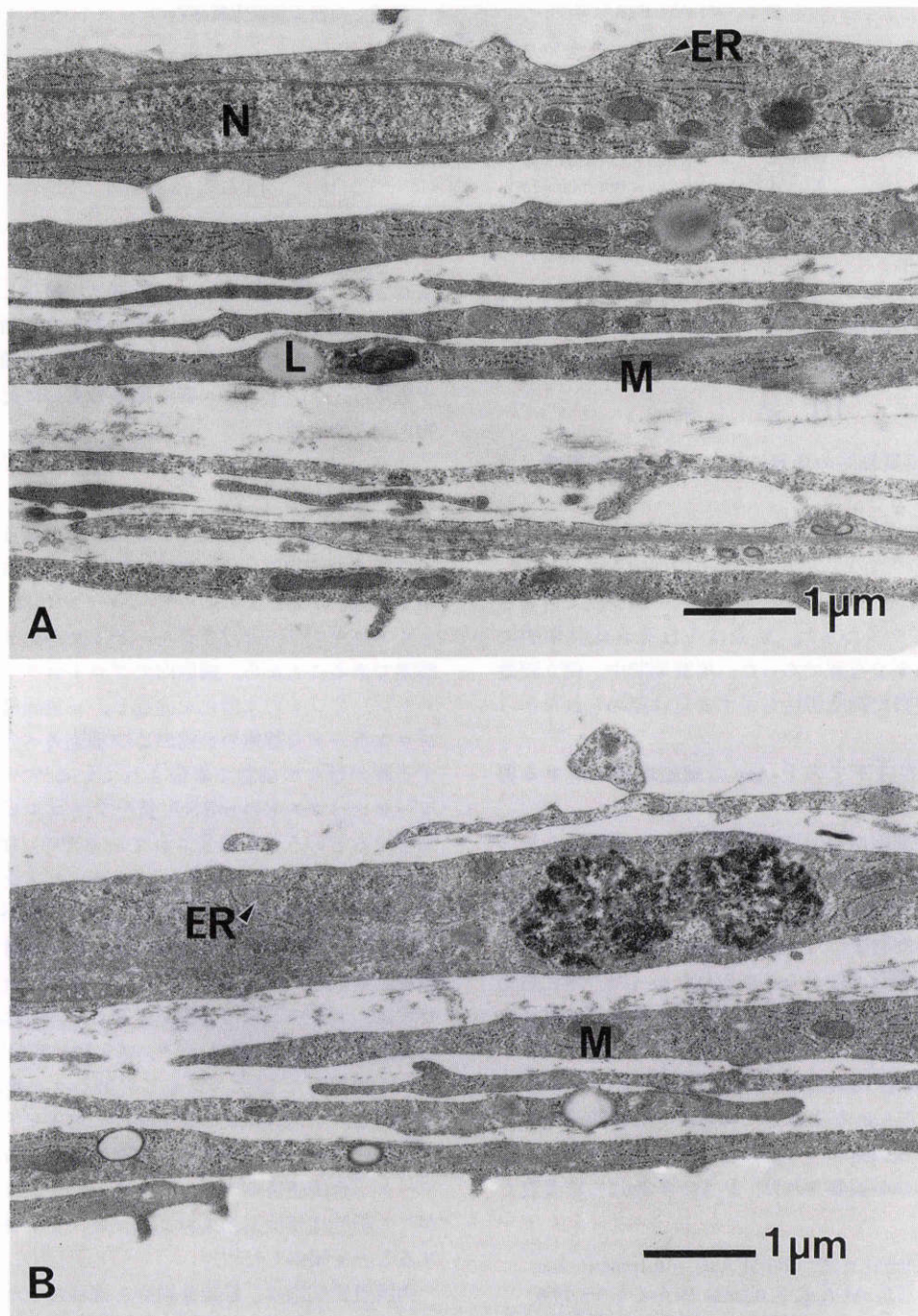


図1 30日間、0.1mMのP-Ascを添加したイーグルMEMで培養した家兎角膜実質細胞(A)、および、P-Ascを含まないイーグルMEMで30日間培養した家兎角膜実質細胞(B)の透過型電子顕微鏡写真。P-Ascを添加した培養液では9ないし10層の細胞が観察される。P-Ascを含まない培養液では5ないし6層の細胞が観察される。また、P-Asc存在下で培養された細胞の粗面小胞体は、非存在下のものに比べ、その内容が少ない。N：核、ER(矢頭)：粗面小胞体、M：ミトコンドリア、L：Lipid deposit.

で細胞は confluent になった後もゆっくりと増殖を続け、一部に細胞の重層化を示唆する所見が得られた。今回は、10日、20日、30日で同様に細胞数の算定を行い、増殖曲線の作成を試みた。さらに、30日間、P-Asc の存在下で培養された細胞およびコントロールの細胞を透過型電子顕微鏡で観察し、細胞の重層化が促進されている事を示した。AzC は、コラーゲン合成を阻害する薬剤であるが、P-Asc の細胞増殖促進効果が AzC で抑制されたことから、コラーゲン量の定量は行っていないが、この増殖促進効果に細胞のコラーゲン線維の合成が関与している可能性が示唆された。ビタミン C は、上述のように細胞のプロコラーゲンの分泌を促進する。従って、今回の透過電顕による観察で、P-Asc 添加培養液で培養された細胞の粗面小胞体が、コントロールの細胞のものに比べ、その内容が少なかったのは、P-Asc によってコラーゲンの分泌が促進されたことによる可能性がある。

一般に、コラーゲンゲル内で細胞を培養した場合、細胞は static になり、その増殖は抑制されるのに対し、何故、ビタミン C 活性を有する P-Asc が培養角膜実質細胞の増殖を促進し、しかも、コラーゲン合成を抑制することでその作用が無くなるのかは、不明である。仮説として、コラーゲンゲル内では、すべての細胞がコラーゲンマトリックスに取り囲まれ static な状態であるのに対し、本実験では、P-Asc によりコラーゲンの合成、分泌が P-Asc を含まない培養液中での培養に比べ促進し、細胞外に沈着したコラーゲン量も増加し、これを足場 (scaffold) にして細胞の重層化が促進するのではないかと考えられる。しかも、重層化した細胞はコラーゲンマトリックスに取り囲まれ static になっているとしても、最上層の細胞は、上方 (培養液側) は、細胞外マトリックスに取り囲まれていないので static でなく、重層化する以前と同じ分裂能を有しているために、重層化が進行するのではなからうかと言う事が考えられる。

Pfister らは、家兎眼に作成した実験的アルカリ外傷に対し、10%アスコルビン酸の点眼を行ったところ、角膜潰瘍の発生が有意に抑制されたと報告した^{20)~22)}。彼らは、アスコルビン酸がプロリン、リジンの水酸化の補酵素であることから、コラーゲン線維の合成が促進されることが原因であると考察している。今回、我々が in vitro で示した細胞増殖の促進が、彼らの実験で in vivo においても同じように起こっていたかどうかは現時点では不明である。P-Asc は、溶液

にした時の安定性が、アスコルビン酸に比べ良好で、1週間後も約85%がビタミン C 活性を有するとされるので、アルカリ外傷などに対し、臨床応用する際にも便利であると考えられる。ビタミン C、コラーゲンと角膜実質細胞の関係には不明な点が多く、今後も、P-Asc の培養角膜実質細胞の増殖促進効果の原因の追及、並びに、種々の角膜実質障害に対する P-Asc の臨床応用を目的として研究を進めて行く予定である。

文 献

- 1) Sarber R, Hull B, Merrill C, et al: Regulation of proliferation of fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech Age Develop* 17: 107-117, 1981.
- 2) Yasuda K: Transdifferentiation of "lentoid" structures in cultures derived from pigmented epithelium was inhibited by collagen. *Develop Biol* 68: 618-623, 1979.
- 3) Gallagher JT, Gasiunas N, Schor SL: Synthesis of glycosaminoglycans by human skin fibroblasts cultured on collagen gels. *Biochem J* 190: 243-254, 1980.
- 4) Yoshizato K, Taira T, Shioya N: Collagendependent growth suppression and changes in the shape of dermal fibroblasts. *Ann Plast Surg* 13: 9-14, 1984.
- 5) Gibson GJ, Schor SL, Grant ME: Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: Synthesis of a low molecular weight collagen species by cultured within collagen gels. *J Cell Biol* 93: 767-774, 1982.
- 6) Greenburg, G, Hay ED: Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95: 333-339, 1982.
- 7) Yoshizato K, Taira T, Yamamoto N: Growth inhibition of human fibroblast by reconstituted collagen gels. *Biomed Res* 6: 61-71, 1985.
- 8) Liotta LA, Vembu D, Kleinman HK, et al: Collagen required for proliferation of cultured connective tissue cells but not their transformed counterparts. *Nature* 272: 622-624, 1978.
- 9) Nomura H, Ishiguro T, Morimoto S: Studies on L-ascorbic acid derivatives. III. Bis (L-ascorbic acid-3,3') phosphate and L-ascorbic acid 2-phosphate. *Chem Pharm Bull* 17: 387-393, 1969.
- 10) 畑隆一郎, 砂田泰伸, 永井 裕: 安定なビタミン C 誘導体 (フォスフォアスコルビン酸) の培養皮膚線維芽細胞への作用 (抄). *生化学* 58: 823, 1986.

- 11) **Hata R, Senoo H**: L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 138: 8—16, 1989.
- 12) **Schwarz E, Bienkowski RS, Coltooff-Schiller B**, et al: Changes in the components of extracellular matrix and ingrowth properties of cultured aortic smooth muscle cells upon ascorbate feeding. *J Cell Biol* 92: 462—470, 1982.
- 13) **Murad S, Tajima S, Johnson GR**, et al: Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: Effect of ascorbic acid and its analogs. *J Invest Dermatol* 81: 158—162, 1983.
- 14) **Peterkofsky B**: The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 152: 318—328, 1972.
- 15) **Tanzawa K, Berger J, Prockop DJ**: Type I procollagen N-proteinase from whole chick embryo. *J Biol Chem* 260: 1120—1126, 1985.
- 16) **Tajima S, Pinnel SR**: Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. Ascorbic acid increases type I procollagen mRNA. *Biomed Biophys Res Commun* 106: 632—637, 1982.
- 17) **Lyons BL, Schwarz RI**: Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic Acid Res* 12: 2569—2579, 1984.
- 18) **Hata R, Sunada H, Arai K**, et al: Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Biochem* 173: 261—267, 1988.
- 19) 雜賀司珠也, 中尾俊也, 田村 学, 他: 培養角膜實質細胞に対するL-アスコルビン酸2-リン酸の影響(第1報), *眼紀* 41: 287—290, 1990.
- 20) **Pfister RR, Paterson CA**: Additional clinical and morphological observation on the favorable effect of ascorbate in experimental ocular alkali burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 478—487, 1977.
- 21) **Pfister RR, Paterson CA, Hayes SA**: Topical ascorbate decreases the incidence of corneal ulceration after experimental alkali burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 1019—1024, 1978.
- 22) **Pfister RR, Paterson CA**: Ascorbic acid in the treatment of alkali burns of the eye. *Ophthalmology* 37: 1050—1057, 1980.