

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3報)

— I型コラーゲンの産生, 分泌に対する影響—

雑賀 司珠也*, 上野山謙四郎*, 広井 健治**, 大島 章**

*和歌山県立医科大学眼科学教室, **同 微生物学教室, ***同 第一病理学教室

要 約

安定型ビタミン C である L-アスコルビン酸2-リン酸 (以下 P-Asc) による培養家兎角膜実質細胞の細胞内 I 型コラーゲンの分布の変化を酵素抗体法で, I 型コラーゲンの産生分泌量の変化を酵素免疫測定法で検討した。10時間の0.1mM P-Asc 処理で細胞質の抗 I 型コラーゲン抗体に対する顆粒状に染色される反応陽性物質は消失した。また, 培養液中の I 型コラーゲン量は, 0.1mM P-Asc 添加により増加した。0.1mM P-Asc 処理は, 培養家兎角膜実質細胞の I 型コラーゲンペプチドの合成, 分泌を促進したと考えられ, P-Asc の角膜実質の傷害に対する治療効果が示唆された。(日眼会誌 95 : 835-840, 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, 酵素免疫測定, 免疫組織化学, I 型コラーゲン

Effect of L-ascorbic Acid 2-phosphate on Cultured Rabbit Keratocytes (The Third Report) Effect on Production and Secretion of Type I Collagen

Shizuya Saika*, Kenshiro Uenoyama*, Kenji Hiroi** and Akira Ooshima***

*Department of Ophthalmology, **Department of Microbiology,

***Department of Ist Pathology, Wakayama Medical College

Abstract

We examined the effect of L-ascorbic acid 2-phosphate (P-Asc), a long-acting phosphate derivative of L-ascorbic acid, on intracellular distribution and production of type I collagen in cultured rabbit keratocytes by an immunohistochemistry and enzyme immunoassay. Exposure of 0.1mM P-Asc for 10 hours decreased a type I collagen immunoreactivity of the cytoplasm as stained in fine granular materials. 0.1mM P-Asc induced increase of type I collagen level in the medium. The results suggested that 0.1mM P-Asc might increase the biosynthesis and secretion of type I collagen in keratocytes and have a therapeutic effect on corneal stromal damage. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95 : 835-840, 1991)

Key words : L-ascorbic acid 2-phosphate, Cultured rabbit keratocyte, Enzyme-linked immunosorbent assay, Immunohistochemistry, Type I collagen

別刷請求先 : 640 和歌山市七番丁27 和歌山県立医科大学眼科学教室 雑賀 司珠也

(平成2年10月26日受付, 平成3年1月8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 October 26, 1990 and accepted in revised form January 8, 1991)

I 緒 言

既報^{1)~3)}において、我々は、安定型ビタミンCであるL-アスコルビン酸2-リン酸⁴⁾⁵⁾ (以下P-Ascと略す。)が、培養家兎角膜実質細胞の増殖を促進し、コラーゲン産生がこの増殖促進のメカニズムに関与している可能性があることを報告した。コラーゲンは、プレプロコラーゲンとして粗面小胞体で合成され、プロコラーゲンを経て細胞外に分泌され、さらにプロセッシングを受けコラーゲンとなる。プレプロコラーゲンが、プロコラーゲンになるためには、プロリン残基、およびリジン残基の水酸化が必要で、ビタミンCは、この水酸化の補酵素でコラーゲンの合成、分泌を促進する^{6)~8)}。また、コラーゲンペプチドのmRNAを増加させるといふ報告もある⁹⁾¹⁰⁾。従って、ビタミンC活性を有するP-AscがI型コラーゲンの合成、分泌を促進し、また、細胞内のコラーゲンおよびその前駆体の分布に影響を及ぼすことが予想される。今回は、P-Ascの培養家兎角膜実質細胞のI型コラーゲンの代謝に対する影響をI型コラーゲンに対するモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的手法による観察およびcompetitive enzyme-linked immunosorbent assay (competitive ELISA)による定量により検討した。

II 材料と方法

1. 材料

L-アスコルビン酸2-リン酸 (P-Asc)は、和光純薬より購入した。イーグルMEMは日水製薬から、牛胎児血清は三菱化学から購入した。β-アミノプロピオニトリルは、東京化成工業から購入した。ペルオキシダーゼ標識家兎抗マウス免疫グロブリン抗体はDako社から、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗体マウスIgG抗体(F(ab')₂)フラグメントはCappel社から購入した。35mmプラスチックシャーレおよびELISA用96穴ポリスチレンプレートはBecton Dickinson and Company製を、12穴プレートはCorning Glass Works製を使用した。ブロックエースは大日本製薬社製であった。ヒト胎盤のI型コラーゲン (pepsin digestion法により精製)は本学第一病理学教室から供与を受けた。

2. 家兎I型コラーゲンの精製

家兎皮膚を0.5N酢酸中でホモゲナイズしベプシン消化の後、上清に最終濃度2Mの塩化ナトリウムを加え、コラーゲンを析出させた。これを0.5N酢酸に溶解させ0.5N酢酸、0.7M塩化ナトリウムで透析しI、III

型コラーゲンを析出させた。0.5M塩化ナトリウム、0.05Mトリス塩酸buffer (pH7.4)に溶解させ、1.7M塩化ナトリウム、0.05M Tris塩酸bufferで透析しIII型コラーゲンを析出、除去しI型コラーゲンを得た。純度はドデシル酸ソーダポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)で確認した。

3. 抗I型コラーゲン抗体の作成

ヒト胎盤から pepsin digestion 法で精製したI型コラーゲン100μgを初回はフロインド完全アジュバンドと、2回目からは0.5M塩化ナトリウム、0.05Mトリス塩酸bufferに溶解したまま単独で2ないし4週間ごと、合計6回BALB/cマウスの腹腔内に投与した。最終免疫3日後にポリエチレングリコール法で脾細胞とマウス myeloma cell line (p3-X63-Ag8-UI)を融合させHAT培地に移し、ハイブリドーマを得、ELISA、蛍光抗体法を用いて抗体産成株を選別した。limiting dilution法でクローニングし、抗体産成株を得た。これをpristan処理したBALB/cマウス腹腔内に移植し10日後に腹水を採取し、硫酸分画、DEAE-Sephacelイオン交換カラムロマトグラフィーにより抗体を精製した。抗体はIgGであった。抗体のヒトおよび家兎I型コラーゲンに対する特異性はcompetitive ELISAおよびimmunoblotにより確認した。(作成した抗体を以下、抗I型コラーゲン抗体と呼ぶ。)

4. 免疫組織化学的観察

1) 細胞培養

家兎角膜実質細胞の採取、初代培養の方法、使用培養液は前報に記した^{1)~3)}。二代継代の後、0.25%トリプシンで遊離させ細胞浮遊液 (細胞密度は 1.2×10^4 個)を作成した。35mmプラスチックシャーレにカバーグラスを入れ、上述の細胞浮遊液1mlをいれた。subconfluentになったところで一部はカルシウムホルマリン (7から12%のメタノールを添加された市販ホルマリンを10%に希釈し100mlにつき0.9g塩化カルシウムを加えたもの)で12時間固定すると同時に、他のシャーレには最終濃度0.1mMのP-Ascを添加しコントロールには同量の培養液を加えた。37℃、湿度100%、二酸化炭素5%の下で10時間インキュベートした後、カルシウムホルマリンで12時間固定した。固定された細胞はカバーグラスごと0.01M phosphate buffered saline (PBS)で3回洗浄した後、酵素抗体法による染色を行った。

2) 酵素抗体法

カバーグラス上の細胞を、過酸化水素加メタノール

(5%過酸化水素:メタノール=1:100)に30分浸し、内因性ペルオキシダーゼを除去した後、FBSで洗浄し、作成したマウスモノクローナル抗I型コラーゲン抗体(IgG)をPBSで適当な倍率(200倍)に希釈し、細胞と4℃の下、12時間反応させた。PBS洗浄後、PBSで100倍に希釈したペルオキシダーゼ結合家兎抗マウス免疫グロブリン抗体を4℃で12時間反応させた。PBS洗浄後、3,3-ジアミノベンジン(DAB)加0.05M トリス塩酸緩衝液(0.05M トリス塩酸緩衝液50ml)に対し、DAB・4HC 110mgを溶解し使用直前に5%過酸化水素水50 μ lをくわえたもの。)で30分発色させた。0.5%メチルグリーンで核対比染色を行った。エタノール脱水、キシロールを経て、バルサム封入し、光学顕微鏡で観察した。なお、コントロールとしてsubconfluentの細胞を1次抗体のかわりに正常マウスIgGを使用した免疫染色を行った。

5. competitive enzyme-linked immunosorbent assay (competitive ELISA)

1) 測定用サンプルの作成

培養家兎角膜実質細胞を12穴プレートに1穴あたり 2.2×10^4 個分散し、3日後、confluentの状態では一方には0.1mM P-Ascを含む培養液を、他方にはコントロールの培養液をそれぞれ2ml入れ、6日間培養した後、培養液を採取した。培養液には、産成されたコラーゲンを細胞周囲に沈着させず培養液中に溶解させておく目的でリジルオキシダーゼ阻害剤である β -アミノプロピオニトリルを50 μ g/ml添加しておいた。培養終了時に培養上清を採取するとともに、細胞を0.25%トリプシンで分散させ、各穴あたりの平均細胞数を血球計算板で求めた。

2) 一次抗体至適濃度の決定

96穴ポリスチレンプレートに0.02%アジ化ナトリウム加carbonate buffer (pH 9.6)で1 μ g/100 μ lに調整した家兎I型コラーゲンを各穴に100 μ lずつ分散し、4℃、24時間固相化した。0.05%Tween20加PBS(PBS-T)洗浄後、ブロックエースで各穴を室温で1時間処理し、蛋白質の非特異的吸着を防いだ後に、作成した抗I型コラーゲン抗体をPBS-Tで400倍、1,600倍、6,400倍、25,600倍、102,400倍に希釈し、4℃、24時間反応させた。各濃度に6穴ずつ使用した。PBS-T洗浄後、PBS-Tで2,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識山羊抗マウスIgG抗体(F(ab')₂ Fragment)を4℃、24時間反応させた。PBS-Tで十分に各穴を洗浄した後、基質液(2,2'-azino-di[3-ethyl-

benzthiazoline sulfate (6)] (ABTS)を0.3g/lの濃度でglycine/citric acid bufferに溶解し、使用直前に過酸化水素0.01%を添加したものを)を各穴に100 μ lずつ入れ、10分間発色させ、415nm吸光度をマイクロプレートタイター(MPR A-4, 東洋曹達工業)で測定した。各抗原濃度で6穴のうち最大値および最小値を除いた4穴の平均値でグラフを描き、relative absorbanceが50%の時の希釈度を求めた(Fig. 1)。

3) 標準曲線の作成

96穴ポリスチレンプレートに一次抗体至適濃度決定時と同様に家兎I型コラーゲンの固相化、ブロッキングを行い、標準曲線作成用の抗原(家兎I型コラーゲン)希釈系列(0.1M phosphate buffered saline, PBSで希釈、最終濃度1 μ g/100 μ lから2倍希釈で0.0039 μ g/100 μ lまで設定。)と抗I型コラーゲン抗体(上述の方法で決定した濃度:3,200倍にPBS-Tで希釈)を4℃、24時間反応させたものを各穴に100 μ lずつ分注した。各濃度に6穴ずつ使用した。PBS-Tで充分洗浄した後、二次抗体の反応、ABTS発色、吸光度測定を同様に行い、最大値、最小値を除いた4穴の平均値で標準曲線を作成した。

4) 測定

96穴ポリスチレンプレートにI型コラーゲンの固相化、ブロッキングをおこなった後、各穴に培養に使用したのと同じ培養液、P-Asc添加培養での培養上清、およびコントロールの培養上清と抗I型コラーゲン抗体(標準曲線作成時と同倍希釈)を4℃、24時間反応させたものを各穴100 μ lずつ分注し、反応させた。PBS-T洗浄後、2次抗体、ABTSによる発色、吸光度測定を同様に行い、標準曲線から培養液中のI型コラーゲン量を求め、培養終了時の細胞数で除し細胞あたりのI型コラーゲン産生分泌量とした。

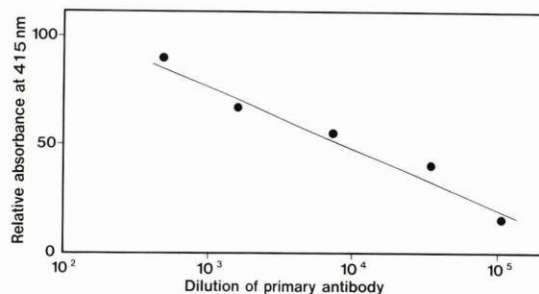


Fig. 1 ELISA for determination of optimal concentration of primary antibody to be used in competitive ELISA.

III 結 果

1. 免疫組織化学的観察 (Fig. 2, 3)

抗 I 型コラーゲン抗体を用いた酵素抗体法では、実験前の細胞 (Fig. 2) および P-Asc を添加していない培養液で培養された大部分の細胞 (Fig. 3A) (細胞100個あたり平均97個) において、核周囲の小胞体やゴルジ装置と考えられる顆粒状の DAB 陽性反応を認め、細胞膜にも軽度のびまん性の DAB 陽性反応を認めた。0.1mM P-Asc 添加群の細胞 (Fig. 3B) では、上述の核周囲の顆粒状 DAB 陽性反応は、少数の細胞において認められた (細胞100個あたり平均4個)。細胞膜は、びまん性に弱い DAB 陽性反応を認めたが、P-Asc 非添加群との間に差異は検出できなかった。なお、コントロールの免疫染色では細胞に DAB 反応を認めなかった。

2. ELISA (Fig. 4, Table 1)

Fig. 4 に標準曲線を示す。それぞれの培養液の500 nm における relative absorbance は P-Asc 添加群 55.6%、非添加群 75.0%、使用前の培養液 92.6% で、培養終了時の平均細胞数は P-Asc 添加群 2.1×10^4 個、非添加群 1.9×10^4 個であった。細胞あたりの I 型コラーゲン産生分泌量は表に示すごとく計算され、0.1 mM P-Asc 添加群の産生量は、コントロール群の約4倍であった。

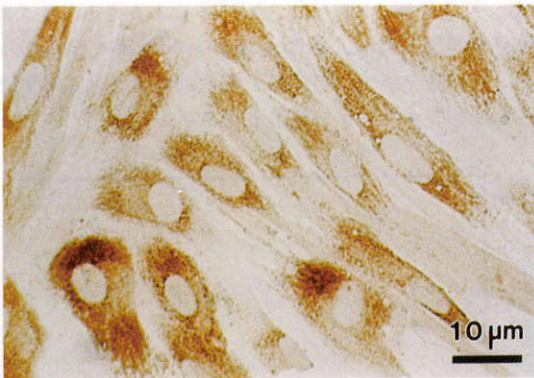


Fig. 2 Immunostaining of type I collagen in rabbit keratocytes cultured in Eagle's MEM supplemented with 10% fetal calf serum. Many type I collagen immunoreactive granules are observed in the cytoplasm. ($\times 1000$)

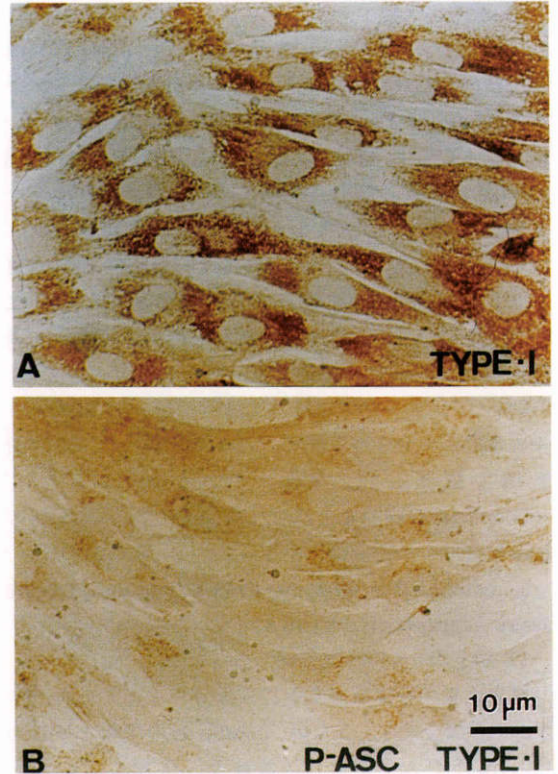


Fig. 3 Immunostaining of type I collagen in cultured rabbit keratocytes incubated in the presence (B) and in the absence (A) of 0.1mM P-Asc for ten hours. Many DAB-positive granules are observed in the cytoplasm of the cells incubated in the absence of P-Asc. Only a few DAB-positive granules are observed in the cytoplasm of the cells incubated with 0.1mM P-Asc. ($\times 1000$)

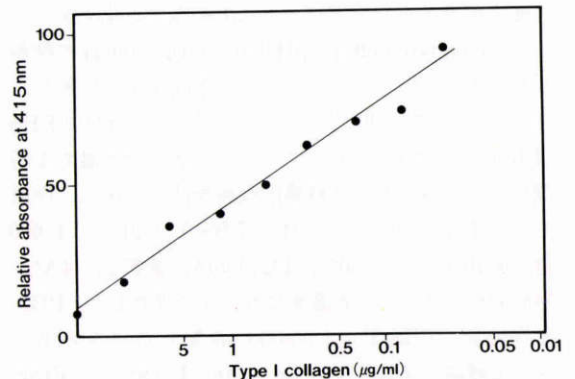


Fig. 4 Standard for estimation of type I collagen in culture medium.

Table 1

Culture medium	Total type I collagen produced by keratocytes	Type I collagen produced by a single keratocytes
P-Asc & β -APN	0.953 μ g/ml	4.5×10^{-3} ng
β -APN	0.223 μ g/ml	1.1×10^{-3} ng

β -APN : β -aminopropionitril

IV 考 按

本研究では、P-Ascの培養家兎角膜実質細胞のI型コラーゲンの産生分泌に対する影響を免疫組織化学的手法および免疫アッセイにより検討した。その結果、抗コラーゲン抗体を用いた酵素抗体法による観察では、P-Asc添加により、ゴルジ装置や小胞体と考えられる核周囲の顆粒状のDAB陽性反応が著明に減少した。これは、前報²⁾³⁾の透過電顕による観察でのP-Asc存在下に培養された粗面小胞体はコントロールのそれに比べ、その内容が少ない状態になっていたという結果に一致するものであると考えられる。

アスコルビン酸の培養液への添加による細胞内のプロコラーゲンの消失は、培養ニワトリ胎児線維芽細胞でも認められている。消失した細胞内コラーゲンはturnoverの亢進と相俟って細胞外に分泌された可能性が高い。すなわち、P-Asc添加群で細胞内にDAB反応がほとんど認められないのは、合成後、ただちに分泌されるためと考えられる。培養細胞の産成したコラーゲンの定量法には、 $[^3\text{H}]$ -prolineを用いた方法による定量やアミノ酸分析による方法、モノクローナル抗体を用いた免疫測定法¹²⁾¹³⁾などが考えられるが、前2者では、コラーゲンのタイプ別の定量が困難という欠点があり、今回はその欠点を補う目的でELISAによる定量を試みた。その結果、0.1mM P-Asc添加により、6日間の細胞あたりのI型コラーゲペプチド産生分泌量が約4倍に増加していることが証明された。角膜細胞外マトリックスの主要成分はI型コラーゲンであるが、角膜実質細胞は、創傷部や培養状態では、他の型のコラーゲンの産成もみられ、Cintronら¹⁴⁾¹⁵⁾は、corneal scarあるいは創傷治癒過程にある角膜にI, III, V型コラーゲンが認められたと報告している。我々も培養家兎角膜実質細胞のIII型コラーゲンの存在を免疫組織化学的に確認している¹⁶⁾。よって、前報^{1)~3)}で報告したP-Ascによる細胞増殖促進へのコラーゲン合成の関与の可能性に関しても、どのタイプのコラーゲンが関与しているかは不明である。また、細胞増殖の

促進とコラーゲンの産成増加がそれぞれ、独立した現象である可能性も否定できない。このように、コラーゲンの分泌と細胞増殖、P-AscおよびビタミンCの関係については、不明な点が多く、今後の検討が必要であろう。また、コラーゲン産生分泌量の増加から、アスコルビン酸と同様^{17)~19)}にP-Ascの角膜実質の障害に対する治療効果も示唆され、今後検討に値する問題であろう。

文 献

- 1) 雑質司珠也, 中尾俊也, 田村 学, 他: 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1報). 眼紀 41: 287-290, 1990.
- 2) 雑質司珠也, 中尾俊也, 金川龍一, 他: 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). 日眼会誌 95: 39-44, 1991.
- 3) Saika S, Kanagawa R, Uenoyama K, et al: L-ascorbic acid 2-phosphate, a phosphate derivative of L-ascorbic acid, enhances the growth of cultured rabbit keratocytes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 229: 79-83, 1991.
- 4) 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.
- 5) Hata R, Senoo H: L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three dimensional tissue like structure by skin fibroblasts. J Cell Physiol 138: 8-16, 1989.
- 6) Levene CI, Bates CJ: Ascorbic acid and collagen synthesis in cultured fibroblasts. Ann NY Acad Sci 258(Suppl): 288-306, 1975.
- 7) Murad S, Tajima S, Johnson GR, et al: Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: Effect of ascorbic acid and its analogues. J Invest Dermatol 81: 158-162, 1988.
- 8) 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.

- 9) **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.
- 10) **Lyon BI, Schwarz RI** : Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic Acid Res* 12 : 2579-2579, 1984.
- 11) **佐賀信介, 平芳一法, 永田和宏** : コラーゲン結合性熱ショック蛋白質 hsp47-コラーゲンとの関係を中心に. *生体の科学* 39 : 270-274, 1988.
- 12) **Taubman MB, Goldberg B, Sherr CJ** : Radioimmunoassay for human procollagen. *Science* 186 : 1115-1117, 1974.
- 13) **Rennard SI, Berg R, Martin GR, et al** : Immunosorbent assay (ELISA) for connective tissue components. *Annal Biochem* 104 : 205-214, 1980.
- 14) **Cintron C, Hong B-S, Kublin CL** : Quantitative analysis of collagen from normal developing corneas and corneal scars. *Curr Eye Res* 1 : 1-8, 1981.
- 15) **Cintron C, Hong B-S, Convington HI, et al** : Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: Type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 767-775, 1988.
- 16) **雑賀司珠也, 上野山謙四郎** : 培養角膜実質細胞のコラーゲンの免疫染色. 安定型ビタミンCの影響. *眼紀* 42 : 212-215, 1991.
- 17) **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.
- 18) **Pfister RR, Paterson CA, Hayes SA** : Topical ascorbate decrease the incidence of corneal ulceration after experimental alkali burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17 : 1019-1024, 1978.
- 19) **Pfister RR, Paterson CA** : Ascorbic acid in the treatment of alkali burns of the eye. *Ophthalmol* 87 : 1050-1057, 1980.