培養ヒト歯根膜細胞によるプロコラーゲンの合成

五 藤 陽 三 斉 藤 滋

神奈川歯科大学口腔生化学教室*

〔受付：昭和53年8月2日〕

抄録：培養されたヒト歯根膜細胞は形態的には線維芽細胞様細胞のみ観察された。培養ヒト歯根膜細胞を³H-prolineを用いて、ラベルすることにより細胞が産生したプロコラーゲン及びコラーゲンの性状を生化学的に分析した。培養ヒト歯根膜細胞が産生したプロコラーゲンは DEAE-cellulose クロマトグラフィーにより分析した結果、タイプⅠおよびタイプⅢの2種類のプロコラーゲンであることが認められた。一方ペプシン処理後のコラーゲンは CM-cellulose クロマトグラフィーによりその構成鎖に分離され、タイプⅠおよびタイプⅢの2種類のコラーゲンであることがわかった。2つの独立したクロマトグラフィーにより分離された各分画の放射活性から推定すると、2種類のタイプの存在量はほぼ一致しており、全コラーゲン中の10～20%がタイプⅢコラーゲンであることが判明した。

緒 言

歯根膜はセメント質と歯槽骨との狭い空間をみたしている結合組織であり、咬合機能を営んでいる歯牙では歯根を懸垂している。

ヒト歯根膜には多量のコラーゲンが含まれている¹⁾が、慢性歯周炎の組織では全コラーゲン中の50～70%が崩壊をうけていることが報告されている²⁾。歯根膜内に炎症が波及すると歯根膜線維は吸収され、その結果歯牙の保持が困難となり遂には歯牙の喪失に致らしめることが知られている。従って歯根膜のコラーゲンを生化学的に分析し、その代謝を明らかにすることは歯周疾患の病因を解明する一つの手掛りとなるものと思われる。

現在コラーゲンは遺伝的に異なったタイプ(Type I, II, III, IV)が存在し、それらの量的分布は組織特異性を示すことが知られている³⁾。それぞれのタイプのコラーゲンはプロコラーゲンとして細胞により合成された後、特異的プロテアーゼにより修飾を受け、トロポコラーゲンが出来ることが明らかにされている³⁾。

これ迄に著者らは口腔諸組織の細胞培養を行な

い各組織のコラーゲンの合成と分解に関して若干の情報を得て来た⁶⁻⁸⁾。本論文では著者は初めてヒト歯根膜細胞の培養に成功したので、培養ヒト歯根膜細胞により産生されたプロコラーゲンおよびコラーゲンの生化学的分析を行った結果について報告する。即ち、培養ヒト歯根膜細胞は2種類のタイプのコラーゲン、Type I および Type III を合成して居り、2つの独立したクロマトグラフィーの分析結果から、Type I を80～90%、Type III を10～20%産生していることが明らかとなった。

実験材料および方法

材料

ヒト歯根膜は本学附属病院に歯科矯正治療の為に来院した10～12歳の患者の健全な抜去歯牙(第1小臼歯)から採取した。

方法

1) 細胞培養

抜去歯牙に付着している歯根膜のうち、歯冠部側および歯根部側のそれぞれ1/3を除去した後、歯牙中央部の歯根膜をメスにより注意深く剝離

Biosynthesis of procollagen by cultured human periodontal ligament cells

Yozo GOTOH, Shigeru SAITO (Kanagawa Dental College, Department of Oral biochemistry, Yokosuka)

* 神奈川県横須賀市稲岡町82 (〒238)

Jap. J. oral Biol., 20 : 825-831, 1978.

し、60 μ g/ml のカナマイシンおよび2.0 μ g/ml ファンギゾンを含むハンクス液で十分洗浄した。次に歯根膜組織片はプラズマクロット法⁵⁾により培養チューブに固定した。培養液は20mM ヘペス緩衝液に10% (v/v) の牛胎児血清を添加し pH を7.2に調製したダルベッコ MEM を使用した^{7,8)}。37°C でインキュベートし、線維芽細胞様細胞が組織片より遊出し、増殖が認められるようになった時、組織片を除去した。細胞が confluent となった時に0.1%のトリプシン (GIBCO, 1:250) で1回植継ぎを行なった。

2) メディウム中のプロコラーゲンおよびコラーゲンの調製

定常期に入った細胞を2 μ Ci/ml の³H-L-proline (NEN, 63 Ci/mM) により80 μ g/ml の L-アスコルビン酸および50 μ g/ml の β -aminopropionitril の存在下で24時間ラベルした。ラベル後集めた培養液は氷冷しプロテアーゼインヒビター (最終濃度, 25mM EDTA, 10 mM N-ethylmaleimide および300 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride) を添加した。遠沈後、メディウム中のプロコラーゲンは前に述べた様な方法で硫酸塩析により精製した⁸⁾。塩析後の沈渣は遠心により集め2 M 尿素および0.1% Triton X-100を含む50mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶かした後、不溶物は遠心により除去し、上清は DEAE-cellulose クロマトグラフィーの緩衝液に対して透析した。プロコラーゲンの分離は前に述べた様な方法により行なった⁸⁾。DEAE-cellulose クロマトグラフィーにより分離されたプロコラーゲンおよびそれらのサブユニットは1 M グアニジン塩酸を含む50mM Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化した Biogel A-5M (Bio Rad 200~400 メッシュ) (1.5 $\times$ 113cm) により分離された⁸⁾。

硫酸塩析の沈澱の一部はペプシン消化後1 M 尿素を含む40mM 酢酸ソーダ (pH 4.8) に対し透析された後 CM-cellulose クロマトグラフィーによりコラーゲンの構成鎖に分離された⁷⁾。

3) 細胞層のコラーゲンの調製

ラベル後培養液を取り去り残った細胞層は500 mM 酢酸中で500 μ g/ml のペプシン (Miles) の存在下、4°C, 24時間インキュベートした⁸⁾。可溶化

されたコラーゲンはラット皮膚のタイプ I コラーゲンを添加し、900 mM NaCl とする事により塩析された⁸⁾。沈渣は遠心後100mM 酢酸に溶かした後、100mM 酢酸に対して十分透析した。透析内液は凍結乾燥され、細胞層のコラーゲンの構成鎖は2) で述べた様な方法により分離された。

4) CNBr ペプチドの調製と分離

DEAE-cellulose クロマトグラフィーにより分離されたプロコラーゲンは100mM 酢酸に対して十分透析後凍結乾燥された。CNBr 分解はキャリア Type I 又は Type III コラーゲンを添加後70% 酢酸に溶かしコラーゲンと同量の CNBr (和光純薬) を加え室温で4時間反応させることにより行なわれた²¹⁾。

5) Type I および Type III コラーゲンの調製

クロマトグラフィーのキャリアコラーゲンとして用いた Type I および Type III コラーゲンはそれぞれ Piez らの方法²⁰⁾ と Chung らの方法¹³⁾ に準じて調製した。

6) イミノ酸分析

培養細胞への³H-proline のとり込みは β -aminopropionitril の非存在下で細胞を24時間ラベル後培養液をメディウム分画に、細胞層を500mM 酢酸により24時間4°Cにおいて抽出した分画を acid extracted 分画に、その残渣を insoluble 分画とに分けた。それぞれの分画は100mM 酢酸に十分透析し凍結乾燥した後、減圧封管内で110°C 24時間加水分解した。その後塩酸を除去し乾燥しDow $\times$ 50 ($\times$ 8) の0.9 $\times$ 20cm カラムでイミノ酸を分離した⁸⁾。

7) 放射活性の測定

液体シンチレーションカウンターによる放射活性は Aloka LSC-653によって15% BBS-3を含むトルエンシンチレーターによって計測した⁷⁾。

実験結果

培養したヒト歯根膜細胞は形態的にみると線維芽細胞様細胞のみが観察され、上皮性細胞は存在していないことが判った。0.4% Trypan blue を用いた cell viability test¹⁰⁾によれば、酵素により単離された細胞は80~90% が生きていることが判明した。

表 1 ヒト歯根膜細胞により合成された蛋白質中の ³H-proline のとり込み

	³ H-OHpro/ ³ H-pro	total ³ H-OHpro (CPM)	collagen synthesis (%)	total collagen (%)
Medium	0.18	6.1 × 10 ⁴	32	82
Cell extracted	0.059	1.0	5	14
Insoluble	0.018	0.30	2	4

Fig. 1 DEAE-cellulose カラムによるヒト歯根膜細胞の産生したプロコラーゲンの分離

培養ヒト歯根膜細胞をアスコルビン酸の存在下、³H-proline により24時間ラベルを行なった後、細胞により取込まれたコラーゲン及び非コラーゲン性タンパク 質量を表 1 に示した。牛歯根膜のコラーゲンはアミノ酸 1000 残基当り 83 残基の oxyproline と 111 残基の proline を含む¹¹⁾ことと、ここで分析した oxyproline と proline との比からヒト歯根膜細胞により合成され各分画 にとり込まれたコラーゲン量を計算した。その結果メディウム分画では32%、acid cell extracted 分画では 5 %、cell insoluble 分画には 2 % の コ ラ ー ゲ ン が含まれていることが判った。

培養歯根膜細胞を ³H-proline でラベル後メディウム中に分泌された物質を塩析しその沈渣を DEAE-cellulose クロマトグラフィーにより分離すると、Fig. 1 のようになった。放射活性を持つ 2 つの peak A 及び B をそれぞれ回収し Biogel A-5M によりゲルクロマトを行なうと分子量は共に30万以上であることがわかった(Fig. 2A, 2B)。更に両者の過ギ酸酸化後同じカラムにかけた 時両試料共にコラーゲンの α 鎖と β 鎖との間に溶出された。一方 peak A はペプシン処理により α

Fig. 2A Biogel A-5M カラムによる Fig. 1 の peak A (—)とそのペプシン消化後(-----) およびその過ギ酸酸化後(.....) のゲルろ過

Fig. 2B Biogel A-5M カラムによる Fig. 1 の peak B (—)とその過ギ酸酸化後(-----) およびそのペプシン消化後(.....) のゲルろ過

鎖の溶出位置に、peak B はペプシン 消化により β 鎖と未処理試料のピークとの間に溶出された (Fig. 2A, 2B)。以上の事実は プロコラーゲンが分子量 35~45 万であり、SS 結合を含むという報告¹²⁾とよい一致を示している。従って Fig. 1 の

Fig. 3 CM-cellulose カラムによる Fig. 1 の peak A の CNBr 分解後のペプチドの分離, キャリヤーの Type I CNBr ペプチドの吸光度 (—), 放射性 (-----)

Fig. 4 CM-cellulose カラムによる Fig. 1 の peak B の CNBr 分解後のペプチドの分離, キャリヤーの Type III CNBr ペプチドの吸光度 (—), 放射性 (-----)

peak A 及び B は共にプロコラーゲンであることがわかった。次に Fig. 1 の peak A 及び peak B をそれぞれ回収し、ペプシン消化後 CNBr 分解し、得られた CNBr ペプチドを CM-cellulose クロマトグラフィーにかけた (Fig. 3, Fig. 4)。Fig. 3 及び Fig. 4 は、peak A 及び peak B がそれぞれキャリヤーの Type I コラーゲン及び Type III コラーゲンの CNBr ペプチドの溶出パターンと極めて類似していることを示している。以

上の結果より、Fig. 1 の peak A 及び peak B はそれぞれ Type I プロコラーゲン及び Type III プロコラーゲンであることが同定出来た。DEAE-cellulose により分離された 2 種類の Type のプロコラーゲン量は、Fig. 1 の A, B 2 つの放射活性の peak から算定すると Type III コラーゲンは全プロコラーゲン量の 15~20% を占め、Type I プロコラーゲンは 80~85% を占めることが判った。

Fig. 5 CM-cellulose カラムによるメディウム中のプロコラーゲンのペプシン消化後のコラーゲン鎖の分離, キャリヤーの type I コラーゲン (—), 放射活性 (-----)

ヒト歯根膜細胞がメディウム中に分泌したプロコラーゲンをペプシン消化し、得られたコラーゲンを CM-cellulose クロマトグラフィーにより分離した (Fig. 5)。Fig. 5 の放射活性のピークはキャリヤーの Type I コラーゲンの α_1 鎖及び α_2 鎖の溶出位置に現われた。 α_1 鎖と α_2 鎖のクロマトグラフィーの溶出位置の放射活性の比は 2~2.5 であり, $[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2$ の組成をもつ Type I コラーゲンの存在が確かめられた。Fig. 5 には更に α_1 鎖と α_2 鎖との間に放射活性の Peak P が見出された。この溶出位置に Type III コラーゲンが溶出されて来ることが知られている^{8,13)}。Peak P とその SS 結合開裂後の試料の分子量の差異から, P は Type III コラーゲンであることが確かめられた (図示せず)。Fig. 4 の Type I コラーゲン $[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2$ の全放射活性と Type III コラーゲン $[\alpha_1(III)]_3$ の全放射活性とからヒト歯根膜細胞がメディウム中に分泌した 2 種のタイプのコラーゲンの存在量を算定すると Type III コラーゲンは合成された全コラーゲン量の約 15% を占めていることがわかった。

細胞層にはプロコラーゲンは殆んど存在しなかった。しかし細胞層からペプシンにより可溶化さ

れたコラーゲンは CM-cellulose クロマトグラフィーによりその構成鎖に分離すると, Fig. 5 とほぼ同様の溶出パターンとなった (図示せず)。CM-cellulose により分離された $\alpha_1(I)$, $[\alpha_1(III)]_3$, α_2 鎖の放射活性から算定された Type I コラーゲン量は 85~90%, タイプ III コラーゲン量は 10~15% を占めていることがわかった。

考 察

培養ヒト歯根膜細胞は線維芽細胞様であり上皮性細胞は見出されなかった。Brunette ら¹⁴⁾はブタの歯根膜細胞の培養により線維芽細胞様細胞と上皮性細胞を観察した。彼等は後者は Malassez の上皮遺残から由来したものと考えている。本実験のために採取したヒト歯根膜組織には出来る限り歯肉及び根尖組織の混入を避けた。その結果歯根膜細胞の初代培養においても上皮性細胞は観察されなかった。最近 Sodek ら¹⁵⁾はブタ, ウサギ, サル及びラットの歯根膜細胞の培養を行ないコラーゲンの合成量を測定した。その結果培養サル歯根膜細胞により合成された蛋白質の 34% がコラーゲンであることを報告している。ヒト歯根膜細胞では合成された蛋白質の OHproline と proline

との比は0.16であり、合成されたコラーゲン量は約32%であった。この結果はサルの場合とほぼ一致していることがわかった。ヒト歯根膜細胞が産生したコラーゲン及びプロコラーゲンの Type を DEAE-cellulose 及び CM-cellulose クロマトグラフィーにより分離し同定したところ、両者から算定したコラーゲンの分子種の存在量はほぼ一致しており、Type I コラーゲンが全合成コラーゲン量の80~90%を占め、Type III コラーゲンは残りの10~20%を占めていることがわかった。ヒトの各組織のコラーゲンの Type 組成と比較するとここに得られた結果はヒト皮膚のコラーゲン Type 組成とほぼ一致している⁴⁾。一方 Narayanan ら¹⁷⁾のヒト歯肉の線維芽細胞の培養により産生されたコラーゲンの Type 組成は本実験で示した歯根膜細胞の結果とほぼ一致した Type 組成であることがわかった。我々は正常及び炎症歯肉の細胞培養により産生されたコラーゲンの分析をしたところ正常及び軽度の歯周炎の患者の歯肉由来の細胞は Type I コラーゲンを約80%合成し、約20%が Type III コラーゲンであることを認めた⁹⁾。しかし Narayanan ら¹⁷⁾の結果と同様に骨吸収が顕著である歯周病患者の歯肉由来細胞は Type I コラーゲン以外に Type I トリマー $[\alpha_1(I)]_3$ を産生していることを見出した⁹⁾。又 Type III コラーゲン量は正常および軽度の歯肉の場合に比較し減少していることも見出した。著者は先に培養歯髓細胞が Type I トリマーの産生を行なうことを報告したが^{7,18)}、ヒト歯根膜細胞においてはこのような現象を認めなかった。しかし重症歯周炎の歯根膜細胞は Type I トリマーの産生を行なう可能性は存在すると思われる。

コラーゲンの Type は現在4種 (Type I, II, III, IV) に分類されている⁹⁾。組織によりそれぞれの Type の存在量は異なっていること⁴⁾からコラーゲンの Type 組成はその組織の構造と機能に密接な関係を持つものと思われる。象牙質には Type III コラーゲンは微量存在する¹⁹⁾が、骨コラーゲンは Type I のみである⁴⁾。又セメント質コラーゲンは Type I が主成分で Type III コラーゲンが僅かに含まれている¹⁶⁾。従って間葉系の硬組織では存在するコラーゲンは Type I がその殆

んどを占めているのに対し、口腔軟組織のヒト歯肉、歯根膜のコラーゲンには Type III コラーゲンが10~20%含まれていることがわかった。ヒト歯髓細胞に関しては未だ知見はないが、著者ら⁹⁾の培養ウサギ歯髓細胞の実験では少なくとも合成されたコラーゲン中の20%は Type III であることが認められたことから、この程度の存在がヒト歯髓の場合に存在するものと推定される。

ヒト歯根膜のように微量であるために直接生化学的な分析によりコラーゲンのタイプ組成を得ることは困難を極めるが、ここに示した様な細胞培養法は、微量の組織から出発しアイソトープを利用することによりコラーゲンの組成などを明らかにすることを可能にした。勿論、培養に伴う細胞の本来の形質の変異や消失の危険性について十分な配慮が必要ではあるが、ここに述べたような方法論は口腔領域のような量的制限のある組織のコラーゲン代謝などを明らかにする上で有用であると思われる。

稿を終えるにあたり御教示ならびに、有益な助言をいただいた東京医科歯科大学歯学部佐藤重教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) PAUNIO, K.: Periodontal connective tissue ; Biochemical studies of disease in man. *Soum. Hammaslääk toim* 65 : 249-280, 1969.
- 2) ROBERTSON, P. B.: *Dental Biochemistry* (Lazzari, E. P. ed.) 187p. Lea & Febriger, Philadelphia, 1976.
- 3) DAVIDSON, J. M., MACENEAMY, L. S. and BORNSTEIN, P.: Intermediates in the limited proteolytic conversion of procollagen to collagen. *Biochemistry*, 14 : 5188-5194, 1975.
- 4) EPSTEIN, E. H. Jr. and MUNDERLOH, N. H.: Isolation and characterization of CNBr peptides of human $[\alpha_1(III)]_3$ collagen and tissue distribution of $[\alpha_1(I)]_2$, α_2 and $[\alpha_1(II)]_3$ collagens. *J. Biol. chem.* 250 : 9304-9312, 1975.
- 5) 中井準之助: 組織培養 (中井他編) 85頁, 朝倉書店, 東京, 1964年.
- 6) 五藤陽三: 歯科領域における組織培養 I, 組織培養によるコラーゲンの合成と分解. *組織培養*, 3 : 21-30, 1977.
- 7) 五藤陽三: 培養歯髓細胞によるタイプ I トリマーコラーゲン $[\alpha_1(I)]_3$ の産生. *歯基礎誌*, 20, 643-649, 1978.

- 8) GOTOH, Y., SAITO, S. and SATO, A. : Synthesis of procollagen and collagen by dental pulp cells from rabbit incisor in vitro. *J. Biochemistry*. 印刷中, 1979.
- 9) 五藤陽三 : 未発表.
- 10) 堀川正克 : 組織培養 (中井他編) 187 頁, 朝倉書店, 東京, 1964年.
- 11) BUTLER, W. J., BIRKEDAL-HANSEN, H., BEEGLE, W. F. and TAYLAR, R. E. : Proteins of periodontium, identification of collagens and $[\alpha_1(\text{III})]_3$ structures in bovine periodontal ligament. *J. Biol. chem.* 250 : 8907-8912, 1975.
- 12) LICHTENSTEIN, J. R., BYERS, P. H., SMITH, B. D. and MARTIN, G. R. : Identification of the collagenous proteins synthesized by cultured cells from human skin *Biochemistry*, 14 : 1589-1594, 1975.
- 13) CHUNG, E. and MILLER, E. J. : Collagen polymorphism : characterization of molecular with the chain composition $[\alpha_1(\text{III})]_3$ in human tissue. *Science*, 183 : 1200-1201, 1974.
- 14) BRUNETTE, D. M., MELCHER, A. H. and MOE, H. K. : Culture and assign of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspension. *Archs. oral biol.* 21 : 393-400, 1976.
- 15) SODEK, J., BRUNETTE, D. M., FENG, J., HEERSCH, J. M., Limeback, H. M., Melcher, A. H., and Ng, B. : *Archs. oral biol.* 22 : 647-653, 1977.
Collagen synthesis is a major component of proteins synthesis in the periodontal ligament in various species.
- 16) BIRKEDAL-HANSEN, H., BUTLER, W. T. and TAYLAR, R. E. : Proteins of the periodontium. *Cal. tissue res.* 23 : 39-44, 1977.
- 17) NARAYANAN, A. S. and PAGE, R. C. : Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblast derived from normal and diseased human gingiva. *J. biol. chem.* 251 : 5464-5471, 1976.
- 18) 五藤陽三, 齊藤滋 : 家兎歯髓細胞によるコラーゲンの合成. 生化学, 49 : 884, 1977.
- 19) VOLPIN, D. and VEIS, A. : Cyanogen bromide peptides from insoluble skin and dentin bovine collagen. *Biochemistry*, 12 : 1452-1464, 1973.
- 20) PIEZ, K. A., EIGNER, E. A. and LEWIS, M. S. : The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens. *Biochemistry*, 2 : 58-66, 1963.
- 21) OHTA, Y., GOTOH-HIBINO, Y., ASABA, K., SUGIURA, K. and SAMEJIMA, T. : On the conformational change of hen egg-white lysozyme by chemical scission. *Biochim. Biophys. Acta*, 236 : 802-805, 1971.