In vitro における歯髓の生長に伴なう細胞形態と コラーゲンタイプ組成の変化

五 藤 陽 三 島 田 二 郎 齊 藤 滋

神奈川県立歯科大学 口腔生化学教室*

〔受付：昭和55年3月19日〕

抄録：三つの生育段階の歯牙組織から歯髓を採取し、トリプシンとコラゲナーゼにより遊離細胞を集め、各 stage の細胞が産生したプロコラーゲンおよびそれらの培養細胞の形態を比較検討した。その結果、各 stage の歯髓組織はすべてタイプⅠとタイプⅢの2種類のプロコラーゲンを合成していた。しかしながら、歯髓組織が成育するに伴ないタイプⅠとタイプⅢのプロコラーゲンの合成された割合は変化し、後者が優位を占めていくことが明らかとなった。それと同時に培養細胞の形態も明らかに変化していくことが見出された。

緒 言

歯髓は象牙質の形成と維持に関与しており周囲を石灰化した象牙質に囲まれた極めて特異な組織である。コラーゲンは結合組織に存在する主要な蛋白質であるが、歯髓には他の結合組織と比較して、コラーゲンは比較的少量しか含まれていない¹⁾。著者らは家兎切歯歯髓は2種類のタイプのコラーゲン(タイプⅠおよびタイプⅢ)を合成していることを見出した²⁾。Schuttleworth らは歯乳頭と歯髓の2つの組織のコラーゲンを比較し、2種類のタイプのコラーゲンの含有量に差異のあることを報告している³⁾。コラーゲンはプロコラーゲンという前駆体の形で合成された後、細胞自身の作った酵素によりN端側、C端側の余分のペプチドが除去されコラーゲンとなり始めて線維の形成が行なわれる。この過程の解析には細胞培養法は極めて貢献して来ている⁴⁾。著者らは培養歯髓細胞は2種類のプロコラーゲン(タイプⅠプロコラーゲンを主成分として、他にタイプⅢプロコラーゲンを産生していることを見出した⁵⁾。本研

究では、歯髓の生長に伴ない、in vitro において3つの歯髓の生育時期の細胞がどのようなコラーゲンを産生しているかを調べたところ、産生されたコラーゲンのタイプ組成に差異の存在することのみならず、培養細胞の形態にも違いのあることを見出したので報告する。

実験方法

牛の前歯歯髓から次の様な3種類のステージを集めた。(Ⅰ)歯冠部が形成途中にある歯牙、(Ⅱ)歯根部が約 $\frac{1}{4}$ 完成した歯牙、(Ⅲ)萌出しているが未咬合歯牙。それぞれのステージの歯髓組織を採取し、100 μ g/mlのカナマイシンと2.0 μ g/mlのファンギゾンを含むリン酸一食水(PBS)で十分に洗浄した。歯髓組織をスライスし、Ca⁺⁺とMg⁺⁺を含まないPBS中に移し、0.25%トリプシンと0.02%細菌由来コラゲナーゼで処理した^{2,5)}。酵素処理により遊離した細胞はDulbecco-Vogt MEM 培地(上記2種の抗生物質と10%牛胎児血清を含む)に移し、単層培養された^{5,6)}。ラベリングは2 μ Ci/mlの[5-³H]プロリン(NEM, 比

Changes in cell morphology and collagen types during the development of the dental pulp cells *in vitro*

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

* 横須賀市稲岡町 82 (〒 238)

Jap. J. oral Biol., 22: 388-391, 1980.

活性 $^{23}\text{Ci}/\text{m mole}$), β -aminopropionitril ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) および L-ascorbic acid ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) を培養液の中にそれぞれの濃度に添加することにより行なわれた^{2,6)}。24時間後、培養液を集め、プロテアーゼインヒビター (最終濃度, 25mM EDTA, 10mM N-ethylmaleimide および, $300\mu\text{M}$ phenylmethylsulfonylfluoride) を添加し、遠沈後、培養液中のプロコラーゲンは前に述べた様な方法で精製した^{5,6)}。塩析後の沈澱物を遠心により集め、 2M 尿素および 0.1% Triton X-100を含む 50mM Tris-HCl (pH 7.5) に可溶化した後、上記の緩衝液に対して透析した。プロコラーゲンの分離は DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにより既に述べたような方法で分離した^{5,7)}。コラーゲン鎖を分離するためには、硫酸塩析による沈澱の一部を 0.5M 酢酸に可溶化し、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプシンで 4°C 24~72時間処理した後、前に報告した方法により CM-cellulose にかけるカラムクロマトグラフィーを行なった^{2,6)}。

ラベルコラーゲンのブロムシアン分解は既に述べたような方法により行った¹⁵⁾。

液体クロマトグラフィーに用いたキャリヤーのタイプ I, III コラーゲンは前に述べたような方法により調製した^{2,5,7)}。

放射活性は Aloka LSC-653 を用いて計測した^{2,5,6)}。

結 果

3種の歯髄の生育ステージの細胞が合成したコラーゲン鎖の CM-cellulose クロマトグラフィーによる溶出位置はキャリヤーのタイプ I コラーゲン, タイプ III コラーゲンとそれらのブロムシアン分解物の CM-cellulose カラムクロマトグラフィーによる溶出位置により同定された (図示せず)。各鎖の分離は良好で十分に定量分析出来る結果であった。それぞれの生育ステージの細胞は2種類のコラーゲン (タイプ I コラーゲンの $\alpha 1$, $\alpha 2$ 鎖とタイプ III コラーゲン [$\alpha 1(\text{III})$]₃) を合成していることが判明した (図1)。しかしながら、タイプ I コラーゲンとタイプ III コラーゲンとの占める面積の割合は、明らかに歯髄の生育ステージと共に変化していくことを認めた。ステージ I ではタイプ

図1 歯髄の生育に伴うコラーゲンタイプ組成の変化

CM-cellulose (●, ■) および DEAE-cellulose (○, □) を用いて定量された培養液中のタイプ I (—), タイプ III (---) コラーゲン (A) Stage I の細胞の合成したプロコラーゲンをペプシン消化後の CM-cellulose クロマトグラフィー, (B) Stage I の細胞の合成したプロコラーゲンの DEAE-cellulose クロマトグラフィー

III コラーゲンは12%であるが、ステージ II ではそれぞれ23%, 24%とタイプ III コラーゲンの占める割合が増加していることが明らかとなった。特にステージ I と II の間におけるコラーゲンのタイプ組成の変化は顕著であった。

一方、DEAE-cellulose クロマトグラフィーにより分離された2種のタイプのプロコラーゲンはそれぞれの分画を回収し、ペプシン消化後ブロムシアン分解し、CM-cellulose にかけるブロムシアンペプチドを分離して同定した (図示せず)。合成されたプロコラーゲン量から見てもタイプ I プロコラーゲンは歯髄の生育に伴って減少傾向にあり、タイプ III プロコラーゲンは逆に増加していくことが明らかとなった (図1)。

培養歯髄細胞の細胞形態は、ステージ I ではいわゆる satellite-like であった (図2)。ステージ II では spindle-like であった。しかしながら、ステージ II と III において、顕微鏡レベルでは細胞の形態

図 2 培養歯髄細胞の Jacobson 染色
(上) stage I の細胞 (×125)
(下) stage II の細胞 (×130)

には差異を認めることが出来なかった。これ迄に述べた結果は、すべて初代培養の細胞についての成果であるが、3代継代後の細胞においても培養細胞の細胞形態は光顕的には初代の細胞のそれとそれぞれ差異を認めることが出来なかった。

考 察

この実験で得たコラーゲンのタイプ組成が2つの定量法 (DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによるプロコラーゲンの分離定量, 細胞の合成したすべてのコラーゲン性物質をペプシン消化し, CM-cellulose カラムクロマトグラフィーによりタイプ I, III コラーゲンを分離定量) により大きな差異の存在することを認めた。その原因としてプロコラーゲンからコラーゲンへの processing がプロコラーゲンのタイプにより異なることが挙げられる¹⁰⁾。しかしながらプロコラーゲンの processing はこの実験条件 (10%血清濃度) では遅いことが知られている^{7,9)}。又コラーゲンのタイプ組成を決定するにはプロコラーゲンを分離し、定量

することが最も信頼性に富むと言われている^{7,9)}。従ってペプシン消化法において、2つのコラーゲンの回収に差異のあることが原因かも知れない。しかしながら、現在ここで得た2種の方法によるコラーゲンのタイプ組成の差異の原因を明らかにすることは出来ない。我々はプロコラーゲンの分離定量により得られたタイプ組成がより信憑性に富むものと考えている。

歯冠部完成前後の細胞が産生したプロコラーゲンのタイプ組成についてみると、38%から62%と大きくタイプ III プロコラーゲンが増加していることが明らかである。コラーゲンのタイプは現在のところ少なくとも4種類 (タイプ I から IV) 存在すると言われている⁴⁾。そしてそれらの組織における役割についてはさまざまな議論がなされている¹¹⁾が、未だに明らかとはされていない。しかしながら、一般にタイプ III コラーゲンは幼若な組織に多いと言われており、10週より80歳までの人皮膚のコラーゲンをみるとタイプ I コラーゲンが直線的増加にあることが報告されている¹²⁾。歯髄は、成長のある一時期にタイプ III コラーゲン含量が増大していることは興味ある現象である。歯髄の生育に伴ないプロリル水酸化酵素活性の変化をみると、歯冠部形成時に高いと報告されている¹³⁾。従っておそらくこの時期はタイプ III コラーゲンの合成がより盛んとなっているものと思われる。しかし、コラーゲンの崩壊過程を考慮すると、コラーゲンのタイプによってその崩壊速度が異なる結果、見掛け上分析するとコラーゲンのタイプ組成に変化が生じるという可能性がある。これらの問題は今後の成果に待たねば解決出来ないであろう。

歯髄は歯乳頭から生育に伴なって血管系の豊富な組織に移行すると言われる。タイプ III コラーゲンは血管系に比較的多量存在する¹⁴⁾ので、ステージの増加に伴ってここで得たコラーゲンのタイプ組成の変化を反映しているのかも知れない。しかしながら、我々の細胞培養では血管由来の細胞は混入していないものと思われる。又培養細胞の形態が歯髄の生育に伴って変化していることを考慮すると、細胞自体の変化が起きているとも考えられる。これが *in vitro* で生じているのか *in*

vitro においた時に始めて現われるものか明らかではない。

最近、我々は歯髄細胞を長時間培養するとタイプ I トリマーコラーゲン [$\alpha 1(I)$]₃ の合成があることを認めた²⁾。タイプ I トリマーコラーゲンは胚性組織に多いと言われている¹⁶⁾ことから歯髄組

織は未分化な細胞の多い組織であると考えられる。このような細胞集団から成る歯髄組織は、外界からの象牙質を介しての種々の刺激に対して積極的に反応し、第 2 象牙質形成や歯髄結石の形成といった硬組織形成に関与しているものと考えられる。

Summary : Procollagen synthesized by bovine pulp cells was studied in the development of tissue *in vitro*. All the pulp cells in the development stage produced type I and type III procollagens. During tissue development the ratio of type I : type III procollagen changed with type III becoming predominant form. Morphological observation of pulp cells showed alteration of cell morphology during tissue development *in vitro*. These results suggested the presence of the relation between the synthesized collagen types and cell morphology.

文 献

- 1) ORLOWSKI, W. A.: Analysis of collagen and mucopolysaccharides and glycoproteins in bovine and porcine pulp. *Arch. Oral Biol.* 19 : 255-258, 1974.
- 2) 五藤陽三, 斎藤 滋: 培養歯髄細胞によるタイプ I トリマーコラーゲン [$\alpha 1(III)$]₃ の産生, 歯科基礎誌, 20 : 643-649, 1978.
- 3) SCHUTTLEWORTH, C. A., WARD, J. L. and HIRSCHMAN, P. N.: The presence of type III collagen in the developing tooth. *Biochim. Biophys. Acta* 535 : 348-355, 1978.
- 4) 五藤陽三: 歯科領域における組織培養 I, 組織培養におけるコラーゲンの合成と分組織培養, 解, 3 : 21-30, 1977.
- 5) GOTOH, Y. SAITO, S. and SATO, A.: Synthesis of procollagen by dental pulp cells from incisor *in vitro*. *J. Biochemistry* 86 : 1037-1040, 1979.
- 6) 五藤陽三, 斎藤 滋: 培養ヒト歯根膜細胞によるプロコラーゲンの合成, 歯科基礎誌, 20 : 825-831, 1978.
- 7) GOTOH, Y. and SAITO, S., and SATO, A.: Synthesis of procollagen by odontogenic cells of rabbit tooth germ. *Biochim. Biophys. Acta* 587 : 253-262, 1979.
- 8) LICHTENSTEIN, J. R., BEYER, 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.
- 9) BURKE, J. M., BAILIAN, G., ROSS, R. and BORNSTEIN, P.: Synthesis of types I and III procollagen and collagen by monkey aortic smooth muscle cells *in vitro*. *Biochemistry* 16 : 3243-3249, 1977.
- 10) GOLDBERG, B.: Kinetics of processing of type I and III procollagens in fibroblast culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 3322-3325, 1977.
- 11) MILLER, E. J. and MARTUKAS, V. J.: Biosynthesis of collagen. *Fed. Proc.* 33 : 1197-1204, 1974.
- 12) EPSTEIN, E. H. Jr.: [$\alpha 1(III)$]₃ Human skin collagen, release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J. Biol. Chem.* 249 : 3225-3231, 1974.
- 13) HAYAKAWA, T., NUMATA, Y. and IIZIMA, K.: Changes in prolylhydroxylase activity during the development of the bovine dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 23 : 831-833,
- 14) BARNES, M. J., MORTON, L. F. and LEVENE, C. I.: Synthesis of collagens type I and III by pig medial smooth muscle cells in culture. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 70 : 339-347, 1976.
- 15) OHTA, Y. GOTOH-HIBINO, Y., ASABA, K., SUGIURA, K. and SAMEJIMA, T.: On the conformation changes of hen-egg white lysozyme by chemical scission. *Biochim. Biophys. Acta*, 236 : 802-805, 1971.
- 16) JIMNES, S. A., BASHEY, R. I., BENDITT, M. and YANOWSKI, R.: Identification of collagen $\alpha 1(I)$ trimer in embryonic chick tendon and calvaria. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 78 : 1354-1361, 1977.