

〈資料〉

コラーゲン線維の糖化が線維芽細胞活性へ及ぼす影響

坏 信子

Effect of Glycation of Collagen Gel on Fibroblast Activities

Nobuko AKUTSU

Wrinkle formation is mainly associated with the alteration of the structure and physical properties of the dermis. With a focus on collagen because it occupies 70% of the dermis, the effects of glycation of reconstituted collagen fibrils (collagen gel) on the biological activity of fibroblasts was examined in this study. The amounts of lysine and arginine residues in the collagen gels decreased after incubation with 0.56 M glucose for two weeks or more, suggesting that glycation of the residues had occurred. Furthermore, an increased amount of insoluble materials appeared after pepsin treatment, and polypeptides migrating as bands showed lower mobilities on SDS-PAGE after CNBr treatment of collagen gel incubated with 0.56 M glucose for 3 weeks. These effects imply the formation of covalent cross-links. Cell attachment, spreading, and proliferation on the glycated collagen gel were essentially unaffected, but cell migration from the surface into the collagen gel and the contraction of collagen gel were markedly inhibited. The decrease in cell-collagen binding sites (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) and the formation of cross-links by glycation of collagen gel lead to the inhibition of cell migration and collagen gel contraction.

1. 序論

年齢を重ねるとともに身体の機能が低下していくが、外見の変化も著しい。皮膚は乾燥し、シワやタルミが生じ、しみが増える。白髪や脱毛が目立つようになる。これらの老徴のうちでもシワとタルミは中高年女性の肌悩みの上位を占め、美容や化粧品領域にて重要なターゲットである。シワに関する研究は1985年頃から始まり、生化学的、組織学的及び形態学的な検討がなされ、それと並行して様々な計測法も開発されている。

皮膚は外側から角層、表皮、真皮及び皮下脂肪

組織からなるが、シワ、特に深いシワの形成には主に真皮構成成分、コラーゲン線維やエラスチン線維などの線維の太さや配向など構築状態の変化、柔軟性や弾力性の低下が深く関わる。それに加えて表皮細胞の細胞活性変化、角層中の蛋白質や脂質の変化、表皮と角層の厚さなどの構造変化による表皮角層の柔軟性の低下などが複雑に絡み合い、シワが形成される。

私は真皮の主成分であるコラーゲンと線維芽細胞の相互作用という観点から皮膚老化研究を行っている。コラーゲンを含めた細胞外マトリックス

は、単に身体を支持構築する構造物質であると捉えられていた。現在では、液性因子に対して細胞活性を制御する固相の因子として様々な役割を担うことが明らかになっている。また、細胞接着基質として多細胞系を構成する必須要素であり、臓器や組織に特異性を付与している。コラーゲンは線維芽細胞により合成分解されるが、それだけでなく線維芽細胞はコラーゲン線維を編成して線維の三次元的な構築状態に影響を与える。その結果、構築状態が変わる。変化した細胞外マトリックスの構築状態によって、逆に細胞活性が影響を受ける。細胞と細胞外マトリックスとは切っても切り離せない密接な関係にある^{1,2,3)}。老化に伴いこれら線維芽細胞とコラーゲンの相互作用が機能しなくなる結果、シワなどの老徴が生じるのではないかと考えている。

一方、血液中の糖濃度が健常者よりも高い糖尿病患者では、若年者でも老化と似た症状、白内障や動脈硬化が多発することから老化における糖化反応の関与が示唆されている。糖化反応では、蛋白質のリジン残基のアミノ基あるいはアルギニン残基のグアニジル基と糖のカルボニル基が非酵素的に反応し、シッフ塩基、アマドリ生成物を経た後で、蛋白質と蛋白質を結ぶ架橋構造を形成する(図1)。コラーゲンのように生体内での代謝回転

が遅く、非常にターンオーバーの長い蛋白質では糖化反応の影響が大きく、皮膚中で糖化されたコラーゲンの割合は年齢とともに増加することが報告されている⁴⁾。

そこでコラーゲン線維の糖化が線維芽細胞活性へ及ぼす影響について検討した。

2. 方法

2-1. コラーゲンゲルの調製

コラーゲンゲルの作製

6 ml のペプシン処理 I 型コラーゲン溶液 (新田ゼラチン株式会社, 大阪, 濃度: 3 mg/ml), 9 ml の 1 倍濃度の PBS (-)*¹, 3 ml の 3 倍濃度の PBS (-) を氷上で混合して、コラーゲン濃度 1 mg/ml の溶液を作製した。6 ウェルセルカルチャープレート (Becton Dickinson Microbiology Systems, NJ, USA) に 2 ml/well 加え、37°C, CO₂ インキュベーター中にて 2 時間インキュベーションし、コラーゲンを線維化してコラーゲンゲルを作製した。

グルコースとのインキュベーション及びインキュベーション後の洗浄

最終グルコース濃度の 2 倍濃度 (0, 0.12, 0.22, 0.44, 0.66, 0.90 及び 1.12 M) のグルコース溶液

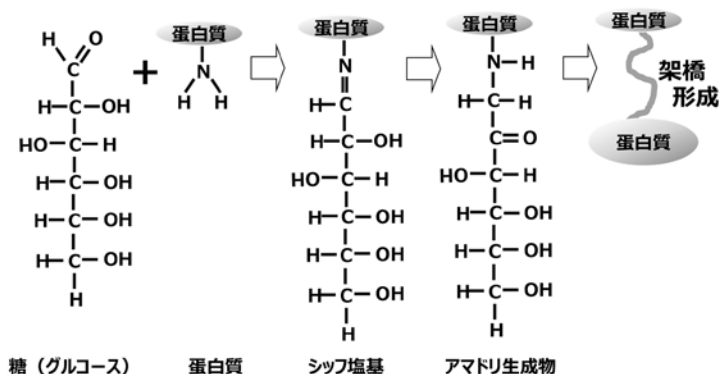


図1 糖化反応

[PBS (-)] 2 ml をコラーゲングルに上載し、37℃、CO₂ インキュベーター中にて1、3及び7日間インキュベーションした。14及び21日間インキュベーションする場合には、7日後に0、0.056、0.11、0.22、0.33、0.45及び0.56 Mのグルコース溶液 [PBS (-)] に変換し、以降7日ごとにグルコース溶液の交換を行った。

グルコースとインキュベーション後のグルコースを除去するためにコラーゲングルの洗浄を行った。インキュベーション時の溶液を除去後、8 ml の PBS (-) [コラーゲン化学構造分析及び生化学的解析用サンプルの場合] あるいは10%FBS/DMEM^{*2} 培地 [細胞生物学的手法による検討用サンプルの場合] をコラーゲングルに上載した。37℃、CO₂ インキュベーター中にて2時間インキュベーションした後で溶液を除去した。この操作をさらに7回繰り返してコラーゲングルの洗浄を行った。

2-2. 化学構造分析及び生化学的解析

アミノ酸分析

コラーゲングルを遠心し (1x10⁴ rpm にて10分間)、遠心沈殿に4 ml の6 M HCl を加え、105℃にて24時間加水分解した。加水分解反応液を遠心エバポレーター (東京理化学器械株式会社、東京) にて乾固後、10 ml のミリQ水に溶解し、アミノ酸含量を日立 L-8500 アミノ酸分析計 (株式会社日立製作所、日立) にて測定した。

コラーゲンの酢酸溶解性とペプシン分解性

コラーゲングルを遠心し (1x10⁴ rpm にて10分間)、遠心沈殿に1 ml の0.5 M 酢酸あるいはペプシン溶液 [10 mg/L (0.5 M 酢酸)] を加え、室温にて2、6及び22時間振とうした。遠心後 (1x10⁴ rpm にて10分間)、沈殿を凍結乾燥した。「アミノ酸分析」にて記載した方法にて加水分解後、ハイドロキシプロリン量を求め、コラーゲン

量に換算した。総コラーゲン量2 mg に対する割合を求めた。

CNBr 分解と SDS-PAGE

2 mg のコラーゲングルを遠心し (1x10⁴ rpm にて10分間)、遠心沈殿に0.4 ml の70%ギ酸 (富士フィルム和光純薬工業株式会社、大阪) と8 mg のCNBr (富士フィルム和光純薬工業株式会社、大阪) を加え、30℃にて24時間振とうした。10倍量の冷水を加えて反応停止後、凍結乾燥し、200 µl の可溶性溶液^{*3} に懸濁溶解した。このうち8 µl と5倍濃度のサンプル溶液^{*4} 2 µl を混合後、100℃にて3分間熱処理した。その後、ポリアクリルアミド電気泳動 (ゲル濃度: 4-20%) を行った。

2-3. 細胞生物学的手法による検討

細胞調製

線維芽細胞は、explant 法により0歳ヒト包皮から単離したものを使用した¹⁾。採取したヒト包皮に付着している脂肪を除去後、細かく切断し (2 mm x 2 mm 程度)、5~6個の皮膚片の真皮側を下に表皮側を上にして直径60 mm のシャーレ (Becton Dickinson Microbiology Systems, NJ, USA) に付着後、2~3分間室温にて放置した。その後、皮膚片がシャーレから剥離しないように5 ml の10%FBS/DMEM 培地を加え、培養した。2日に1回の割合で培地交換を行い、培養を続けていくと最初に表皮細胞が皮膚片からシャーレ上へ遊走増殖し、それに引き続いて皮膚片からシャーレ上へ遊走増殖した線維芽細胞が表皮細胞に置き換わった。このサブコンフルエント線維芽細胞を初代培養細胞とした。サブコンフルエント細胞を1 ml のトリプシン-EDTA 溶液^{*5} にて剥離し、9 ml の10%FBS/DMEM 培地を加えて遠心した (1x10³ rpm にて5分間)。上清を除去後、沈殿を10 ml の10%FBS/DMEM 培地に懸濁し、

培養シャーレ2枚へ植えつけた。さらに継代し、継代数3代目の細胞を凍結し、液体窒素中にて保存した。保存した細胞を起こし、継代を重ね、継代数16~19代の細胞を実験に用いた。コラーゲンゲルが細胞活性へ及ぼす影響について検討する際には、10%FBS/DMEMに懸濁した 1×10^5 細胞数の細胞をコラーゲンゲル上へ植えつけた。

細胞接着活性の検討

細胞植えつけから5, 10及び30分後の培地を除去後、2 mlのPBS (-)にて3回洗浄した。トリプシン-EDTA溶液2 mlを加えて細胞剥離後、剥離した細胞を遠心し(1×10^3 rpmにて5分間)、上清を除去後、トリプシン-EDTA溶液にて2回洗浄し、最終体積を0.25 mlに合わせた。この後、Labarca and Paigenの方法により細胞のDNA量を測定した⁵⁾。調製した細胞懸濁トリプシン-EDTA溶液0.25 mlに0.02 M PBS溶液*⁶ 0.25 mlを加え、超音波粉碎機(株式会社セントラル科学貿易, 東京)にて10秒間粉碎後、Hoechst33258溶液*⁷を0.5 ml加えた。標準サンプルは、DNA溶液*⁸を0.02 M PBSにて希釈して作製し(濃度: 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0及び10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 体積: 0.25 ml), トリプシン-EDTA溶液0.25 mlとHoechst33248溶液0.5 mlを加えた。サンプル及び標準サンプル溶液の蛍光強度(励起波長: 356 nm, 蛍光波長: 460 nm)を蛍光強度計(製品名フルオロスキャンアセトンFL, 大日本製薬株式会社, 大阪)にて測定した。標準サンプルの測定から得た標準直線を元にDNA量を求めた後、10 pg DNA / 細胞の値を用いてDNA量から細胞数へ換算した。植えつけ細胞数に対する接着細胞数の割合を求めた。

細胞伸展形態の解析

細胞植えつけから6時間後の細胞の板状仮足の伸展と伸展後の細胞面積に着目して観察を行い、

写真撮影した。

細胞増殖活性の検討

細胞植えつけから7日間培養後の細胞をコラーゲンゲルごと5 mlチューブへ移し、1 mlの細胞分散用コラーゲナーゼ溶液*⁹を加え、37°Cにて30分間インキュベーションし、コラーゲン蛋白質を分解した。その後、遠心し(1×10^3 rpmにて10分間)、上清を除去後、トリプシン-EDTA溶液にて2回洗浄した。この後、Labarca and Paigenの方法により細胞のDNA量を測定した⁵⁾。さらに10 pg DNA / 細胞の値を用いて求めたDNA量を細胞数に換算した。

コラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走活性の検討

細胞植えつけから3日間培養後のコラーゲンゲル表面からゲル中へ遊走した細胞数をSchorの方法⁶⁾を元に測定した。コラーゲンゲル上の5箇所の5 mm²の面積範囲において、コラーゲンゲル表面から100 μm よりも下に位置する細胞の数を位相差顕微鏡の視野を上から下へと下げながら測定した。

コラーゲンゲル収縮活性の検討

細胞植えつけから2時間後、コラーゲンゲルをウェルから剥離し、24及び48時間後のコラーゲンゲルの面積を測定した。

3. 結果

表1は、グルコースとインキュベーション後のコラーゲンのアミノ酸組成を示したものである。低濃度(0.056 M)グルコース溶液にてコラーゲンゲルをインキュベーションした場合、あるいは、高濃度(0.56 M)グルコース溶液にて短期間(7日以内)インキュベーションした場合には、コラーゲンのアミノ酸組成に変化は認められな

かった。一方、高濃度 (0.56 M) グルコース溶液にて長期間 (14 及び 21 日間) インキュベーションした場合には、リジン残基とアルギニン残基が減少していた。また、高濃度 (0.56 M) グルコース溶液にて長期間 (21 日間) インキュベーションしたコラーゲンは、グルコース非存在下で同期間インキュベーションしたコラーゲンよりも酢酸への溶解性やペプシン分解性が低下 (表 2) し、ブロムシアン (CNBr) 分解で生じるペプチドバンドの高分子量化が起こっていた。これらのことは糖化反応の結果、架橋構造が形成されていることを示唆していた。

線維芽細胞のコラーゲンゲルへの接着活性は、コラーゲンゲルとインキュベーションするグル

コース濃度、インキュベーション期間に関わらず、同じようなレベルであった (図 2)。同様にコラーゲンゲル上での細胞伸展や細胞増殖活性もコラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションの影響をあまり受けなかった。

一方、コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションにより顕著に変化したのが、細胞遊走活性とコラーゲンゲル収縮活性であった。0.22 M 以上のグルコース溶液で長期間 (3 週間) インキュベーションしたコラーゲンゲルでは、細胞遊走が顕著に低下したが、短期間 (1 日) のインキュベーションではグルコース濃度に関わらず、有意な差はなかった (図 3)。高濃度 (0.56 M) のグルコースでコラーゲンゲルをインキュベーションした場合には、インキュベーション期間が 7 日以上にて細胞遊走が抑制された (図 4)。

図 5 は、0, 0.056 M 及び 0.56 M グルコース溶液で長期間 (21 日間) インキュベーションしたコラーゲンゲル上に線維細胞を植えつけ、24 及び 48 時間後のコラーゲンゲルの面積をプロットしたものである。コラーゲンゲルとのインキュベーション時のグルコース濃度が低濃度 (0.056 M) の条件下に比べて高濃度 (0.56 M) の条件下では、細胞がコラーゲンゲルを収縮しにくくなっていた。

表 1 グルコースとインキュベーションしたコラーゲンのリジン, アルギニン残基数 (1000 残基数当たりの残基数)

グルコース濃度 (M)	反応時間 (日)	リジン残基	アルギニン残基
0	0	23 ± 0	50 ± 0
0.056	1	23 ± 0	50 ± 0
0.056	21	23 ± 0	50 ± 0
0.56	1	23 ± 0	50 ± 0
0.56	7	23 ± 0	50 ± 0
0.56	14	21 ± 0**	45 ± 0**
0.56	21	21 ± 0**	45 ± 0**

グルコース濃度が 0 M, 反応時間が 0 日のコラーゲンに対する有意差

N=5, means ± SD, **p<0.01, 多重比較による検定

表 2 グルコースとインキュベーションしたコラーゲンのペプシン分解性

処理時間 (時間)	不溶性物質の割合 (%)	
	コントロール	グルコースとインキュベーションしたコラーゲン
2	89.6 ± 5.8	102.7 ± 17.6
6	48.5 ± 3.1	83.4 ± 6.8**
22	6.9 ± 1.8	63.6 ± 3.4**

コントロール (グルコースとインキュベーションしていないコラーゲンゲル) に対する 0.56 M のグルコースで 21 日間インキュベーションしたコラーゲンゲルの有意差

N=5, means ± SD, **p<0.01, マン・ホイットニ検定

4. 考察

以上、高濃度のグルコースで長期間インキュベーションしたコラーゲンゲルでは糖化反応、架橋形成が起こっていた。このコラーゲンゲル上に植えつけた線維芽細胞の接着活性、細胞伸展及び増殖活性は変化しなかったが、細胞遊走活性とコラーゲンゲル収縮活性が顕著に抑制された。

線維芽細胞はインテグリンなどの細胞膜レセプターを介してコラーゲンと結合する。その結合部位として、いくつかの塩基配列が報告されているが、その一つがアルギニン残基-グリシン残基-ア

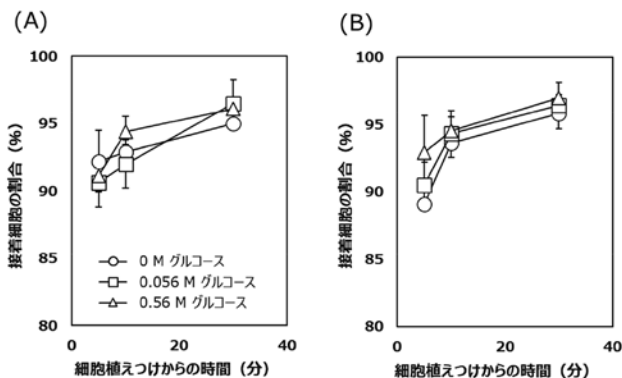


図2 コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションがコラーゲンゲル上での線維芽細胞接着活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルを0 M (○), 0.056 M (□) 及び0.56 M (△) のグルコース溶液にて1日 (A) あるいは21日間 (B) インキュベーションした。洗浄後、 1×10^5 細胞数の線維芽細胞を植えつけ、5、10及び30分後にコラーゲンゲル上に接着した細胞数を求めた。N=5, means \pm SD, 一元配置分散分析法, あるいは, クラスカル・ワールス検定

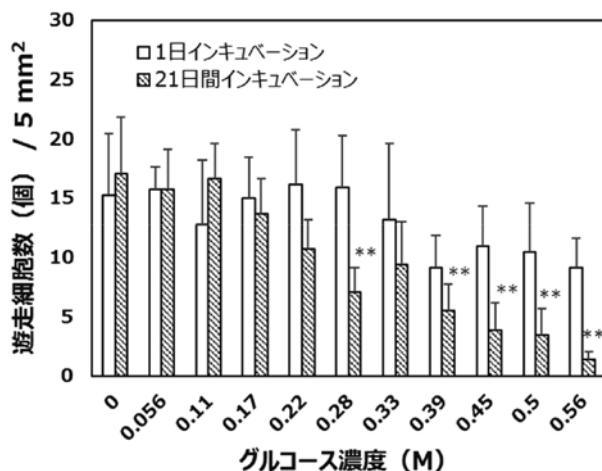


図3 コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションが線維芽細胞遊走活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルをグラフ中で示した濃度のグルコース溶液で1日 (□) あるいは21日間 (▨) インキュベーションした。洗浄後、 1×10^5 細胞数の線維芽細胞を植えつけ、3日間培養し、コラーゲンゲル中へ遊走した細胞数を測定した。0 Mのグルコース溶液で21日間インキュベーションしたコラーゲンゲルに対する有意差 N=5, means \pm SD, **p<0.01, 多重比較による検定

スパラギン酸残基 (RGD) 配列である。表1に示したように、高濃度のグルコースで長期間インキュベーションしたコラーゲンゲルではアルギニン残基が減少しており、糖化反応により線維芽細胞がコラーゲンに結合する足場が減少していた。

コラーゲンゲル収縮では、線維芽細胞は細胞膜レセプターを介してコラーゲン線維に結合し、線維を引っ張り引き縮めて強度が高く、弾力のある真皮類似構造を構築する。糖化反応により細胞の足場が減少し、線維に形成された架橋により線維

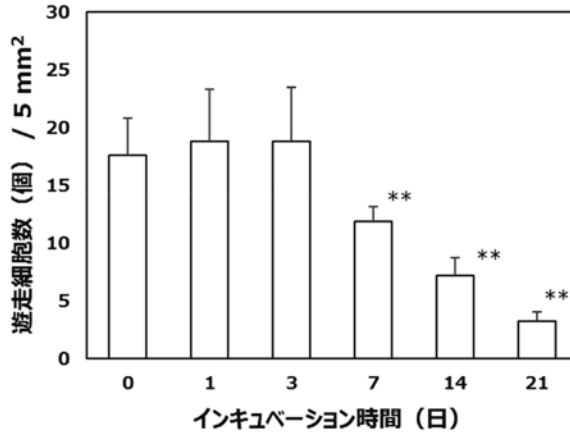


図4 コラーゲングルと 0.56 M グルコース溶液のインキュベーションが線維芽細胞遊走活性へ及ぼす影響

インキュベーション 0 時間のコラーゲングルに対する有意差 N=5, means ± SD, ** p<0.01, 多重比較による検定

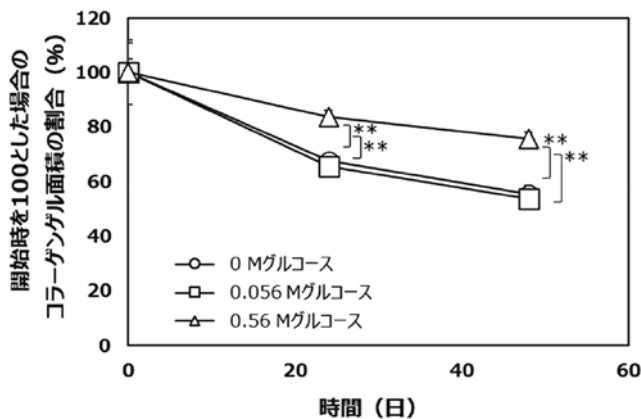


図5 コラーゲングルとグルコースのインキュベーションが線維芽細胞によるコラーゲングル収縮へ及ぼす影響

コラーゲングルを (○), 0.056 M (□) 及び 0.56 M (△) のグルコース溶液にて 21 日間インキュベーションした。洗浄後, 1×10^5 細胞数の線維芽細胞を植えつけ, コラーゲングルをシャーレから剥がし, 24, 48 時間後のコラーゲングルの面積を求めた。

N=5, means ± SD, **p<0.01, 多重比較による検定

を引き寄せにくくなるためゲル収縮が低下したと考えられる。

線維芽細胞が遊走する際には細胞膜レセプターを介してコラーゲン線維に結合し, 線維を手繰り寄せて細胞が移動するとともに線維を離し, 移動方向にある別の線維に結合して手繰り寄せるとい

うことを繰り返す。そのため細胞遊走活性にはコラーゲン線維の可塑性が大きく作用する。糖化反応による細胞の足場の減少と架橋形成によるコラーゲン線維の可塑性低下のため細胞遊走活性が低下した可能性が高い。

細胞遊走は創傷治癒過程において重要な細胞活

性である。細胞は創傷部位に遊走し、液性因子や細胞外マトリックスなどの固相因子を産生する。線維芽細胞は産生された細胞外マトリックス、コラーゲン線維をコラーゲングル収縮活性等により三次元的に編成し、正常な組織を構築する。コラーゲンの糖化によりコラーゲン線維の固さや可塑性などの物性が変わることに加え、これらの細胞活性が低下することによる組織の構築状態の変化やそれによる機能低下がシワなどの老徴発生や老化による皮膚の機能低下に関わっていると考えている。

注

- *1 PBS (-)
1 L 作製用の CaCl₂ 非含有 PBS 粉末
3.7 g/L NaHCO₃
50 units/L ペニシリン
50 μg/L ストレプトマイシン
pH 7.4 に調製した。
- *2 DMEM
10 g/L DMEM (日水製薬株式会社, 東京)
3.7 g/L NaHCO₃
50 units/L ペニシリン
50 μg/L ストレプトマイシン
pH 7.4 に調製した。
- *3 可溶化溶液
40 g/L SDS
15 g/L Tris
- *4 5 倍濃度のサンプル溶液
0.2 M Tris (pH 6.8)
16% グリセロール
4% SDS
8% 2-メルカプトエタノール
20 mg/L BPB
- *5 トリプシン-EDTA 溶液
5.41 g の KH₂PO₄, 57.25 g の Na₂HPO₄ · 12H₂O, 80.06 g の NaCl をミリ Q 水に溶解し、pH 7.4 に調製後、1 L にメスアップした (0.2 M PBS 溶液)。0.2 g の EDTA をミリ Q 水に溶解後、0.5g のトリプシン (Becton Dickinson Microbiology Systems,

NJ, USA), 100 ml の 0.2 M PBS を加え、1 L にメスアップした。

- *6 0.02 M PBS
0.54 g/L KH₂PO₄
5.73 g/L Na₂HPO₄ · 12H₂O
8.01 g/L NaCl
pH 7.4 に調製した。
- *7 Hoechst33258 溶液
20 mg の Hoechst33258 (商品名 Bisbenzimidazole H33258 Fluorochrome, Calbiochem-Novabiochem Corporation, CA, USA) を 100 ml のミリ Q 水に溶解し、この溶液を 0.02 M PBS にて 100 倍希釈した。
- *8 DNA 溶液
10 mg の牛胸腺 DNA (SIGMA, MI, USA) に 25 ml のミリ Q 水を加え、4℃ にて一晩攪拌後、濾紙にて濾過して不溶物を除去した。濾液の一部をとり、260 nm での吸光度を測定後、濃度 1 μg/ml の DNA 溶液の吸光度を 0.023 とし、DNA 溶液の濃度を補正した (市販の DNA は水分、蛋白質、塩等の混入があり、また不溶物を除去するため補正が必要である)。
- *9 細胞分散用コラゲナーゼ溶液
2 g/L コラゲナーゼ (富士フィルム和光純薬工業株式会社, 大阪)
1 L 作製用の CaCl₂ 含有 PBS 粉末
1 L にメスアップした。

参考文献

- 1) Nishiyama T., Tsunenaga M., Nakayama Y., Adachi E. and Hayashi T., Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix. *Matrix* 1989, **9** (3), 193-199.
- 2) Nishiyama T., Akusu N., Horii I., Nakayama Y., Ozawa T. and Hayashi T., Response to growth factors of human dermal fibroblasts in a quiescent state owing to cell-matrix contact inhibition. *Matrix* 1991, **11**, 71-75.
- 3) Nishiyama T., Tsunenaga M., Akutsu N., Horii I., Nakayama Y., Adachi E., Yamato M. and Hayashi T., Dissociation of actin microfilament organization

- from acquisition and maintenance of elongated shape of human dermal fibroblasts in three-dimensional collagen gel. *Matrix* 1993, **13** (6), 447-455.
- 4) Dunn J. A., McCance D. R., Thorpe S. R., Lyons T. J. and Baynes J. W., Age-dependent accumulation of N epsilon- (carboxymethyl) lysine and N epsilon- (carboxymethyl) hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 1991, **30** (5), 1205-1210.
- 5) Labarca C., Paigen K., A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 1980, **102**, 344-52.
- 6) Schor S. L. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *J. Cell Sci.* 1980, **41**, 159-75.

(あくつ のぶこ 生活科学研究専攻 教授)

受理年月日 2020年9月30日

審査終了日 2020年10月26日