

〔原 著〕

酸性フォスファターゼ活性とコラーゲン線維
の線維芽細胞内消化

矢嶋 俊彦, 松尾 朗

東日本学園大学歯学部口腔解剖学第一講座

Acid Phosphatase Activity and Intracellular Degradation
of Collagen Fibrils by Fibroblasts *in vitro*

Toshihiko YAJIMA, and Akira MATSUO

First Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY.

Abstract

Human gingival fibroblast cell line was cultured with bovine collagen fibrils. The relationship between acid phosphatase activity and phagocytosis and intracellular degradation of collagen by fibroblasts was investigated by cytological and cytochemical methods.

Cell processes extended and surrounded collagen fibrils at 1 hr of cultivation. The fibrils were then interiorized in cell processes and ultimately became enclosed within phagosomes. Phagocytosis of collagen induced acid phosphatase activity on fibroblast GERL consisting of tubular and vesicular structures. There was no evidence of an enzymatic lysis of the fibrils in the extracellular space. Primary lysosomes derived from GERL fused with the collagen fibril-containing phagosomes to form phagolysosomes. Collagen degradation occurred within them.

The present study demonstrates that the lysosomal system acts as an important part in the intracellular degradation which may play an essential role in the physiological turnover and resorption of collagen.

Key words : AcPase, collagen, phagocytosis, fibroblast

緒 言

コラーゲン生合成機構の研究とともに、近年、その消化・分解機構に注目が集まっている。歯周組織を含む結合組織では、線維芽細胞(fibro-

blasts)はコラーゲン線維(collagen fibers)・弾性線維(elastic fibers)や細胞外基質(ground substance)の合成・分泌・形成とともに、これらの物質の消化・分解・吸収においても重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた

(Garant, 1976¹⁾と矢嶋・Rose, 1980²⁾の総説を参照)。特に, 生理的なコラーゲン代謝・改造過程では, 貪食(phagocytosis)によるコラーゲン原線維の線維芽細胞内消化は, 大きな意義と比重を占めるものと考えられている。

この線維芽細胞内消化に関与するライソゾーム(lysosome)のマーカー酵素の1つである酸性フォスファターゼ(AcPase)活性が, コラーゲン原線維を含む貪食小体(phagosome)に存在することはin vivo^{1,3-8)}とin vitro⁹⁻¹¹⁾の実験で報告されている。しかし, 貪食に伴うAcPase活性の細胞内動態については, まだ明らかにされていない。

本研究では, 我々がすでに確立した線維芽細胞系と実験法を用いて, 細胞の貪食作用に伴う微細構造の変化とAcPase活性の誘導および細胞内動態について, 細胞学・細胞化学的に観察, 検討し, 考察を行った。

材料と方法

1. 培養細胞

実験には, ヒト正常健康歯肉に由来した線維芽細胞系(HGF)を使用した。

2. 培養方法

本細胞($2-2.5 \times 10^4$ cells/dish)を35mmプラスチック培養シャーレ(A/S Nunc, Roskilde, Denmark)に, 5%仔牛血清(Armour pharmaceutical Co., Illinois, U. S. A.)を含むDM-160培地(極東, 東京)を加え, 5% CO₂-95% airの炭酸ガス培養器で1時間から14日間培養した。コラーゲン線維(bovin collagen)は, 細胞とともに培地に懸濁させ培養と同時に, または, 培養2日後に添加された。培養液は3日毎に交換した。

3. 電子顕微鏡観察

培養細胞は, 0.1M cacodylate buffer (pH7.2)で緩衝した2%glutaraldehyde-2%

paraformaldehydeで1~2時間, 4℃で固定した。固定後, 緩衝液で水洗, 1%OsO₄で後固定し, エタノール系列による脱水を経て, Epon812に包埋した。

AcPase反応: AcPase活性の検出は, 前固定後, Gomori法の改良法¹²⁾で37℃, 30分行った。なお, 対照群はNaFをAcPase阻害剤として用いた。

超薄切片は, 鉛染色または酢酸ウラン-鉛の重染色を施し, 電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. 電子顕微鏡所見

培養開始1時間で, 線維芽細胞の多くはシャーレに付着した。コラーゲンを培養と同時に添加した実験群では, 線維芽細胞は付着後, 直ちに細胞突起をコラーゲン線維に向って活発に延し始めた。細胞突起は線維を取り囲み, 細胞内への取り込み—貪食—を開始した(Fig. 1)。これらの突起や突起基部の細胞質には, 多数の微細線維が観察された。貪食を始めた細胞には, 小管状構造と多数の小胞から成る発達したGERL¹³⁻¹⁴⁾が認められた。しかし, ゴルジ空胞(Golgi vacuoles)とゴルジ層板(Golgi lamellae)から成るゴルジ装置(Golgi apparatus)の発達はみられなかった。

コラーゲンが培養開始2日後に添加された実験群でも, コラーゲン原線維が細胞に接すると直ちに, 貪食作用が開始され, その過程には差異は認められなかった。

貪食され始めたコラーゲン原線維は, 次第に細胞内に引き込まれ, 線維の一部分または, 全体が完全に貪食小体に取り込まれた。これらの線維を含む貪食小体では, その基質の電子密度が低いものから非常に高いもの, また線維の横紋構造が明瞭なものから線維構造の不明瞭なものまで, 変化に富んでいた(Fig. 2)。線維の周囲に顆粒構造が, 時に観察された。これらは, 貪食小体内の線維消化過程の時間的差異による

ものと考えられる。

さらに消化・分解の進んだ小体では、線維構造は完全に消失し、電子密度の高い残渣小体 (residual body) へ移行した。なお、コラーゲン線維の細胞外消化像は観察されなかった。

2. 酸性フォスファターゼ活性

コラーゲン原線維に細胞突起をのぼし、食食を始めた線維芽細胞では、AcPase活性は最初に GERL に出現した。反応産物は、ゴルジ装置に近接する小管構造と小胞構造から成る GERL にみられ、ゴルジ空胞とゴルジ層板で構成されるゴルジ装置には認められなかった (Fig. 3)。細胞外に、活性はみられなかった。

コラーゲン添加のない対照群や、食食を行っていない細胞では、GERL は発達しておらず、AcPase 活性は 1-2 個のライソゾームにのみ観察された。

食食作用の進行に伴い、食食小体近くの 1 次ライソゾーム (primary lysosome) や多胞体 (multivesicular body) に AcPase 活性が認められた (Fig. 4)。これらの 1 次ライソゾームと食食小体との融合像はしばしば観察された。この融合により、ライソゾーム酵素は小体内に移行し、2 次ライソゾーム (secondary lysosome) — 食食水解小体 (phagolysosome) — が形成された。ライソゾームが融合した小体膨隆部で、反応産物は顆粒状に出現した (Fig. 4)。AcPase 活性は、電子密度の高い物質とともに、小体内に拡散し (Fig. 5)、食食された線維にそって小体全体に観察された (Fig. 5)。残渣小体にも、AcPase 活性が認められるものがあった。

なお、NaF (50mM) を AcPase 阻害剤として用いた対照群では、反応産物は全く認められなかった。

考察ならびに結論

コラーゲン線維の消化・分解・吸収機構の研究は、その代謝速度が比較的遅いことと相俟って

遅れていた。Luse and Hutton (1964)¹⁵⁾ は、ラット分娩後子宮退縮時でのコラーゲン吸収機序を電子顕微鏡で追跡し、線維芽細胞内の空胞中にコラーゲン原線維を認め、食食によるものであると報告した。その後、同様な線維芽細胞内コラーゲン線維は観察、報告されたが、多くは細胞内での異常合成や人工産物とされてしまった。それは、コラーゲンの合成、分泌機能のみが考えられてきた線維芽細胞に、コラーゲンの消化・吸収機能をも考え合わせることにかなり抵抗があったためである。Ten Cate^{3-4, 16-19)} 電子顕微鏡と組織細胞化学を用いて、コラーゲン代謝の比較的活発な歯周靱帯と歯肉を観察し、線維芽細胞はコラーゲン原線維を食食し、その消化・吸収機構にも関与していることを明らかにした。これに続いて、多くの研究者により、線維芽細胞によるコラーゲン原線維の食食像が報告されてきた。

結合組織高分子物質の 2 段階性消化機序仮説 (two-stage digestion of extracellular macromolecules) が Dingle らにより提唱されている。²⁰⁻²¹⁾ すなわち、細胞外の巨分子たとえばコラーゲンの消化・分解は、まず第 1 段階として、細胞の周辺で分泌された中性プロテアーゼ (neutral protease) により起り、ついで第 2 段階として、部分的に消化あるいは切断された物質が細胞内に取り入れ、細胞内ライソゾーム系で完全に消化されると考えている。未変性コラーゲンを消化できる中性プロテアーゼはコラーゲナーゼ (collagenase) である。ヒトおよび動物の歯肉は、コラーゲン・ゲルやコラーゲン基質を消化・分解することが報告されている。²²⁻²⁷⁾ さらに、線維芽細胞がコラーゲナーゼを合成・分泌することも明らかになっている。²⁸⁻³³⁾ 線維芽細胞はラテックス顆粒の食食により、コラーゲナーゼおよび中性プロテアーゼの合成と細胞外への分泌が促進されるのに対し、カテプシン D (cathepsin D) と β -グルクロニダーゼ (β -glucuronidase) の酸

性水解酵素は合成されてもわずかし細胞外に分泌されず、細胞内に貯留されるという興味深い報告もなされている³¹⁾。また、コラーゲン線維の細胞外での消化像は、炎症等の病理組織ではしばしば観察され、報告されている。

この2段階性消化仮説に従えば、線維芽細胞に貪食された線維は、すでにコラゲナーゼ等の消化を受けた変性コラーゲンであり、細胞内消化はその第2次的意義しか持たないことになる。しかし、*in vivo*の実験系では、種々の因子が複雑に絡み合っており、消化機序のより明確な解析は困難であった。

そこで、我々は、ヒト歯肉由来の線維芽細胞を用いた*in vitro*の実験系で、コラーゲンの消化・吸収機構の解明を試みてきた。Yajima and Rose (1977)³⁴⁾は、線維芽細胞がコラーゲン原線維を能動的に貪食し、細胞内消化する過程を*in vitro*で最初に明らかにした。続いて、線維芽細胞の貪食能はプロスタグランデンF₂α (prostaglandin F₂α)と細菌のLPSにより促進され、ヘパリン (heparin) で抑制されることを報告した³⁵⁾。貪食によるコラーゲン原線維の線維芽細胞内消化過程を細胞学・細胞化学的に詳細に解析した⁹⁾。また、*in vitro*においても、細胞により分泌・形成された線維が、その細胞により貪食され、消化・吸収されること、すなわち、代謝・改造現象が起ることを報告した³⁶⁾。さらに最近、貪食に先立つ、中性プロテアーゼや物理化学的力によるコラーゲン原線維の部分消化・変性や切断 — 第1段階消化 — は必ずしも必要でないことを明らかにした¹¹⁾。

本研究で、コラーゲン原線維の貪食作用に伴って、線維芽細胞にGERLが発達し、そこにAcPase合成が誘導されることが明らかとなった。このAcPase活性はGERLのみに検出され、コラーゲン合成に関与しているゴルジ装置本体とは明確に区別された。線維を含む貪食小体が完全に細胞外と閉鎖されると、GERL

で形成されたコラーゲン分解酵素 — カテプシンB (cathepsin B)、コラーゲン分解カテプシン (collagenolytic cathepsin) 等 — を含む1次ライソゾームが融合し、消化が進行すると考えられる。また、細胞外に酵素で消化・変性している線維は認められず、未変性の線維が貪食されていた。これらの所見は、細胞の特異的な貪食と、それに続く細胞内でのライソゾーム系による消化・分解が、主たるコラーゲン消化・吸収機構であることを強く示唆している。ゆえに、ライソゾーム酵素の細胞内動態は重要な意味をもっている。

結合組織の代謝・改造過程では、その組織の構造と機能を変えることなく、構成成分の消化・吸収と形成が行われる必要がある。特に歯周組織は、絶えず咬合による消耗を受けており、機能していないコラーゲン線維や機能している線維の部分的な交換を常に行っていると考えられる。しかし、正常組織に、貪食能を有する炎症性細胞の関与は考えにくく、また、細胞外に分泌されたコラゲナーゼは潜在性酵素 (latent enzyme) として存在することが分っている。

以上の結果と従来の知見を考え合せると、比較的広範囲で非特異的に行なわれるコラーゲン分解酵素によるコラーゲンの細胞外消化分解に比べ、特異的で局所的に行われる線維芽細胞の貪食とライソゾーム系による細胞内消化は、結合組織の主たる生理的消化・吸収機構であると考えられる。

本研究の一部は、昭和57年度文部省科学研究費補助金 (一般研究C 課題番号57570655)による。

文 献

1. Garant, P. R. : Collagen resorption by fibroblasts : A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament, *J. Periodontol.*, 47; 380-390, 1976.
2. 矢嶋俊彦, G. G. Rose : 歯周組織の改築現象と歯周病, *歯科ジャーナル*, 11; 71-81, 1980.

3. Depoter, D. A. and Ten Cate, A. R. : Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen-containing vesicles of fibroblasts, *J. Anat.*, 114;457-461, 1973.
4. Ten Cate, A. R. and Syrbu, S. : A relationship between alkaline phosphatase activity and the phagocytosis and degradation of collagen by the fibroblast, *J. Anat.*, 117;351-359, 1974.
5. Garant, P.R. : An electron microscopic study of the periodontal tissues of germ free rats and rats monoinfected with *Actinomyces neaslundii*, *J. Periodont. Res.* 15(Suppl.); 36-72, 1976.
6. Yajima, T. : Ultrastructural and cytochemical studies on the remodeling of the tracheal cartilage, *Arch. Histol. Jap.*, 39;79-97, 1976.
7. Soames, J. V. and Cavies, R. M. : Intracellular collagen fibrils in early gingivitis in the beagle dog. *J. Periodont. Res.*, 12; 378-386, 1977.
8. Yee, J. A. : Response of periodontal ligament cells to orthodontic force: Ultrastructural identification of proliferating fibroblasts, *Anat. Rec.* 194;603-613, 1979.
9. Rose, G. G., Yajima, T. and Mahan, C. J. : Human gingival fibroblast cell lines in vitro. I. Electron microscopic studies collagenolysis, *J. Periodont. Res.*, 15;53-70, 1980.
10. 足羽紀子, 大高裕一 : ウサギ培養皮膚組織における細胞内膠原原線維について, 結合組織, 13; 223-224, 1982.
11. 矢嶋俊彦, 久米川正好 : コラーゲン線維の線維芽細胞内消化, 結合組織, 14(印刷中).
12. Holt, S. J. and Hicks, R. M. : The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 11;49-66, 1961.
13. Novikoff, A. B., Essner, E. and Quintana, N. : Golgi apparatus and lysosome, *Fed. Proc.*, 23;1010-1022, 1964.
14. Novikoff, P. M., Novikoff, A. B., Quintana, N. and Hauw, J. J. : Golgi apparatus, GERL and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studies by thick section and thin section cytochemistry, *J. Cell Biol.*, 50;859-886, 1971.
15. Luse, S. and Huttner, R. : An electron microscopic studies of the fate of collagen in the postpartum rat uterus, *Anat. Rec.*, 148;308, 1964.
16. Ten Cate, A. R. : Morphological studies of fibroblasts in connective tissue undergoing rapid remodeling, *J. Anat.*, 112;401-414, 1972.
17. Ten Cate, A. R. : Morphological studies of fibroblasts in connective tissue undergoing in collagen turnover in the functioning periodontal ligament of the mouse, *Archs. Oral Biol.*, 19;339-340, 1974.
18. Ten Cate, A. R. and Depoter, D. A. : The degradative role of the fibroblast in the remodeling and turnover of collagen in soft connective tissue, *Anat. Rec.*, 182;1-14, 1975.
19. Ten Cate, A. R., Depoter, D. A. and Freeman, E. : The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement, *Am J. Orthodont.*, 69; 155-168, 1976.
20. Dingle, J. T. : The extracellular secretion of lysosomal enzymes, In: Dingle, J. T. and Fell, H.B. (ed.) : *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol. 2;421-436, North-Holland Publishing Co. Amsterdam-London, 1969.
21. Glauert, A. M., Fell, H. B. and Dingle, J. T. : Endocytosis sugars in embryonic skeletal tissues in organ culture. II. Effect of sucrose on cellular fine structure. *J. Cell Sci.* 4;105-131, 1969.
22. Beuther, E. H., Thriftshouser, C. and Hazen, S. P. : Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal diseases, *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121;1082-1085, 1966.
23. Fullmer, H. M. and Gibson, W. : Collagenolytic activity in gingivae of man, *Nature*. 209; 728-729 1966.
24. Gibson, W. and Fullmer, H. M. : Collagenolytic activity of gingival tissues in vitro, *J. Dent. Res.*, 45;1225, 1966.
25. Bennick, A. and Hunt, A. M. : Collagenolytic activity in oral tissue, *Archs. Oral Biol.*, 12;1-9, 1967.

26. Taylor, A. C. : Collagenolysis in cultured tissue : 1. Digestion of mesenteric fibers by enzymes from experimental gingival tissue, *J. Dent. Res.*, 50; 1294-1300, 1971.
27. Rose, G. G. and Cattoni, M. : Human gingiva cultivated in circumfusion systems, *Archs. Oral Biol.*, 19; 113-123, 1974.
28. Houck, J. C., Sharma, V. K., Patel, Y. M. and Gladner, J. A. : Induction of collagenolytic and proteolytic activities by anti-inflammatory drugs in the skin and fibroblast, *Biochem. Pharmacol.* 17; 2081-2090, 1968.
29. Reddick, M. E., Bauer, E. A. and Eisen, A. Z. : Immunocytochemical localization of collagenase in human skin and fibroblasts in monolayer culture, *J. Invest. Dermatol.*, 62 ; 361-366, 1974.
30. Werb, Z. and Burleigh, M. C. : A specific collagenase from rabbit fibroblasts in monolayer culture, *Biochem. J.*, 137; 373-385, 1974.
31. Werb, Z. and Reynolds, J. J. : Stimulation by endocytosis of the secretion of collagenase and neutral protease from rabbit synovial fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 140; 1482-1497, 1974.
32. Bauer, E. A., Stricklin, G. P., Teffrey, J. J. and Eisen, A. Z. : Collagenase production by human skin fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 64; 232-240, 1975.
33. Birkedal-Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M. : Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 251; 3162-3168, 1976.
34. Yajima, T. and Rose, G. G. : Phagocytosis of collagen by human gingival fibroblast in vitro *J. Dent. Res.*, 56; 1271-1277, 1977.
35. Rose, G. G., Yajima, T. and Mahan, C. J. : Microscopic assay for the phagocytotic-collagenolytic performance (PCP index) of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 57; 1003-1015, 1978.
36. Yajima, T., Rose, G. G. and Mahan, C. J. : Human gingival fibroblast cell lines in vitro. II. Electron microscopic studies of fibrogenesis, *J. Periodont. Res.*, 15; 267-287, 1980.

Explanation of Figures

- Fig 1.** Periphery of a human gingival fibroblast cultured with collagen fibrils. Cell processes (cp) extend and surround collagen fibrils (col). Note the well developed GERL (GE) consisting of numerous tubular and vesicular structures. N, nucleus. X 33,000.
- Fig 2.** Collagen fibril-containing phagosomes show various patterns. They present four variations of electron densities surrounding the fibrils (arrows). col, extracellular collagen fibrils; M, mitochondrion. X 70,000.
- Fig 3.** AcPase reaction products are present in the tubular portions and vesicles of GERL (GE). Golgi vacuoles and lamellae of Golgi apparatus (Go) are unreactive. col, extracellular collagen fibrils; N, nucleus. X 20,000
- Fig 4.** AcPase activity is present in the primary lysosome (ly) and dilated portion of phagolysosome (arrows). col, extracellular collagen fibril. X 28,000.
- Fig 5.** AcPase activity is confined to the electron dense matrix of phagolysosome (arrows). M, mitochondrion. X 35,000.
- Fig 6.** Heavy deposits of AcPase reaction products are distributed along the course of the fibril within phagolysosome. N, nucleus. X 20,000





