

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

ウシ角膜コラーゲン線維についての生化学的および細胞学的研究  
Biochemical and cytological studies on collagen fibril in bovine corneal stroma

氏名 竹村 幸敏

ヒトなど高等動物の組織・器官の構築・恒常性維持においては、細胞と細胞外マトリックスの相互作用は決定的に重要な役割をしている。細胞外マトリックスの主要構成成分であるコラーゲンタンパク質は力学的な支持をし、組織の骨格構造を構成するだけでなく、細胞との相互作用を介して、これらの生命現象に関わっている。コラーゲンタンパク質は 27 種類の分子種が知られている。その中で I, II, III, V, XI 型コラーゲンはコラーゲン線維を形成するものであるが、新しく発見された XXVII 型コラーゲンは遺伝子の構造からはコラーゲン線維を形成するものと想定されているが、タンパク質レベルでの検討はなされていない。

硝子軟骨以外の組織のコラーゲン線維はこれまでの研究結果ではどれも I 型コラーゲンを主成分とし、組織によって異なる含量の III 型, V 型コラーゲンを伴っている生体内のコラーゲン線維は 80- 100 nm の太い線維と 20- 40 nm の細い線維の二種類に大別される。本研究で対象とした研究材料である角膜実質層は他の結合組織（真皮, 腱など）と同様にコラーゲン線維が組織成分の主体であり、線維芽細胞様の細胞（ケラトサイト）はコラーゲン線維に囲まれて、まばらに存在している。角膜実質層の特徴は、1) コラーゲン線維を構成するコラーゲン分子は I 型コラーゲンであるものの、他の組織よりもずっと多い割合で V 型コラーゲンが含まれている。2) コラーゲン線維の直径は均一で細く（約 30 nm）、それら

が一定方向に配列し、分岐せず、線維間の間隙も均一である。コラーゲン線維は密度高く詰まっている。

3) 角膜実質層内で角膜コラーゲンを産生し、コラーゲン線維の編成に関与している細胞はケラトサイトと呼ばれる線維芽細胞であるが、いくつかの点で真皮線維芽細胞と異なる。例えば、再構成した I 型コラーゲンゲル内でのケラトサイトの細胞培養において、コラーゲンゲル収縮を引き起こすが、真皮線維芽細胞ほどは強くない。

本学位論文は、上記の 1), 2), 3) の特徴を有する角膜コラーゲン線維に関して生化学的、細胞学的に研究したものである。以下に順を追って、具体的に成果を要約する。

1) については学位論文の第 2 章が対応する。角膜実質層内には I 型、V 型コラーゲン分子の両方が存在し、均質なコラーゲン線維が多数あることから、各コラーゲン線維は I 型コラーゲンと V 型コラーゲンのハイブリッドから構成されていると予想されている。免疫化学的研究より V 型コラーゲンに対する抗体は細い線維に反応することが報告されている。また、コラーゲン分子を再会合させると I 型コラーゲンは 80-100 nm かそれ以上の線維径をもつ線維を形成するのに対し、V 型コラーゲンは細い線維(太くても 50 nm) を形成する。さらに I 型、V 型コラーゲンを混合して再会合させると V 型コラーゲンの含量がある程度以上であれば混合線維の径が一定以上にならないことが報告されている。このように V 型コラーゲンは線維の細さに影響を及ぼしていると考えられている。

ウシ角膜組織はペプシン処理により、ほぼ完全に可溶化される。角膜実質層の組織全体からペプシンによって可溶化された画分中のタンパク質は I 型コラーゲンと V 型コラーゲンで占められていた。I 型コラーゲンと V 型コラーゲンの割合は、約 9 : 1 程度と見積もられた。角膜コラーゲン線維の酵素処理を限定した場合に溶けだしてくる I 型コラーゲンと V 型コラーゲンの割合から、角膜コラーゲン線維における V 型コラーゲンの分布についての情報が得られると考え検討した。酸性でペプシン処理した際、短い時間に可溶化された画分には V 型コラーゲンが I 型コラーゲンと同じ程度の量含まれていた。コラーゲン線維の表面に近いところには V 型コラーゲンが分布していると解釈できる。しかし、酸性中では線維中のコラーゲン分子間の間隙が開いている可能性がある。実際、Birk らは V 型コラーゲンに対する抗体が中性条件では反応せず、コラーゲン線維を酸性条件にした後で反応することから、V 型コラーゲンは線維の内部にあると考察した。V 型コラーゲンが線維の内部にあるとのモデルが広く取り上げられている。すなわち、ペプシンを用いた酸性 pH の条件では、コラーゲン線維は膨潤しコラーゲン分子間の間隙が広がっているため、ペプシンが線維の内側まで浸透し作用し、たとえ V 型コラーゲンが線維の内部にあったとしても V 型コラーゲン分子の方が分子間架橋結合を切断されやすいために、ペプシンの限定処理で可溶化された割合が大きいことも考えられる。そこで、コラーゲン線維中の分子パッキング

グが保たれていると考えられる条件で限定酵素処理を行って検討した。中性 pH でトリプシンおよびキモトリプシン処理を行い、線維の表面に近いところだけに作用していると思われる線維を得た。このように角膜線維を酵素処理することにより、種々の溶媒で溶け出してくるコラーゲタンパク質等を検討した。2M 尿素，0.7 M NaCl を含むトリス緩衝液処理で可溶化されてくる画分にコラーゲタンパク質があり、それらの大部分は V 型コラーゲンであった。この結果をもとに角膜実質コラーゲン線維の V 型コラーゲンと I 型コラーゲンの構成比，コラーゲン分子の径，コラーゲン線維の径から，V 型コラーゲン分子が角膜コラーゲン線維の表面に分布するモデルを提唱した。このモデルは，現在最も頻繁に引用されている Birk らが提案しているモデルと全く異なるものである。本モデルは V 型コラーゲン分子から再構成した線維の径は一定以上に太くならないことが，V 型コラーゲンの線維表面の分布によることを合理的に説明できるものと考察した。

2) については学位論文の第 3 章が対応する。コラーゲン線維はコラーゲン分子が規則的に会合して形成される。コラーゲン線維はさらに会合してコラーゲン線維束となり，線維束はさらに 1 つ高次構造の会合体を形成し，組織中に光学顕微鏡を用いて観察される“膠原線維”(膠原はコラーゲンの意味)と対応した構造となっている。このようにコラーゲタンパク質は階層構造を形成していると考えられる。これまでのコラーゲン線維に関する研究においては，形態学的な研究やコラーゲン分子を再構成した再構成線維に限られている。コラーゲン線維がどのように配向し，また他のコラーゲン線維と結合するのはどのような機構によるかは，組織構築の重要な課題である。

角膜実質層は多数の一定の径をしたコラーゲン線維が整然と配向した形態をしている。線維と線維を結びつけていて線維間に存在する物質についても均一であることを仮定して，角膜実質層のコラーゲン線維を分散させ，線維をばらばらに分離することを試みた。メルカプトエタノール，EDTA，NaCl などを適度な組み合わせで用いると，棘皮動物(ウニ，ヒトデ，ナマコなど)ではほぼ完全に結合組織が分散し，ほとんどすべてのコラーゲン線維が回収できることが報告されているので，この方法を改変し，角膜に応用した。角膜組織片は分散し，分散したのから大きな破片を除いたあと，多少濁りを有する画分を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

さまざまな長さの線維が存在したが，どの線維もコラーゲン線維に特有の縞模様を示し，線維径が一定で約 25 nm であった。線維の向きも，線維間の距離もさまざまで，コラーゲン線維へと分散されることがわかった。コラーゲン線維分散液の濁りは，線維が溶液中で分散していることを反映していた。ウシ角膜中のコラーゲン線維はメルカプトエタノールの処理により接着性を失うような物質で結合していると考えられる。

3)については学位論文の第4章が対応する。I型コラーゲンタンパク質を基質として用いた細胞培養研究は多数報告されている。I型コラーゲンから再構成した線維を培養基質として用いることで、生体内での環境としての線維がコラーゲン分子状のI型コラーゲンタンパク質とは異なる作用を細胞に及ぼすことが報告されている。培養基質として、生体内にコラーゲン線維として存在するものを用いたらどのような応答を細胞はするのであろうか。このような観点から、ヒトケラトサイトをウシ角膜から分離・分散したコラーゲン線維上で培養を行い、I型、V型コラーゲン再構成線維に対するケラトサイトの細胞応答を比較し検討した。

I型、V型コラーゲン再構成線維あるいはウシ角膜から分散した角膜線維画分を培養皿にコートし、ヒトケラトサイトを播種し無血清下で培養した。その結果、培養1日後の細胞数は角膜線維上が最も多かった。無血清下でケラトサイトの角膜線維に対する細胞応答はI型、V型コラーゲン再構成線維に対するものとは大きく異なり、I型、V型コラーゲン再構成線維にはない効果を角膜線維がもつ可能性が考えられた。角膜線維のどのような構造的特徴がそのような作用を有するのか、今後詳細に角膜線維の構造と他の組織中のコラーゲン線維あるいは再構成コラーゲン線維と比較することでさらに前進する可能性を追求したい。特に、角膜コラーゲン線維が一定の細い線維径を有し、かつV型コラーゲン分子が線維表面に分布することを本研究論文では提案していることに鑑み、角膜線維にV型コラーゲンが存在することにより、このような作用が生じているとの可能性を追求する意味があると考えている。

ヒトなど動物組織に見られるコラーゲン線維にはI型コラーゲンのほかにIII型コラーゲン、V型コラーゲンが存在する。多様な線維性コラーゲン分子種が存在する意義については全く解明されていない。本研究はV型コラーゲンの存在がI型コラーゲンだけでは持っていない何らかの特徴をコラーゲン線維に付与している可能性を考え、角膜のコラーゲン線維の特徴を解明することを試みた。本研究の成果は角膜のコラーゲン線維について、V型コラーゲンが線維の表面に分布するというモデルを提出した。このモデルを1)コラーゲン線維径を細くかつ一定にし、2)線維間の結合、3)細胞との相互作用、において角膜コラーゲン線維が有する特徴を解明する第一歩と位置づけたい。