

原著

## マウス角膜線維芽細胞由来の不死化培養細胞における培養下 コラーゲン線維形成における lumican の効果

間宮和久 中澤 満

**抄録** lumican, keratocan などのケラタン硫酸プロテオグリカンは、胚発生期にコラーゲン線維形成を制御することにより、角膜の形態形成に重要な役割を担っている。我々は lumican の N-末端にある高度に保存された 37-CX<sub>3</sub>CXCX<sub>9</sub>C-53 ドメインのコラーゲン線維形成における役割を調べるために、野生型 (CX<sub>3</sub>CXCX<sub>9</sub>C) と変異型 (CX<sub>3</sub>SXCX<sub>9</sub>C) 各々を持つ lumican cDNA を site-specific mutagenesis を用いて作成し、発現ベクターに挿入した後、不死化マウス角膜線維芽細胞 (MK/T-1 細胞) に導入した。安定形質細胞は、zeocin の存在下で選択、クローン化された。それらの細胞は親細胞である MK/T-1 細胞に類似した樹枝状形態を維持していた。野生型と変異型 lumican のそれぞれの培養上澄を用いた western blot では、c-Myc-tag と lumican に対する抗体を用いて 42kDa の lumican タンパクを検出した。透過電子顕微鏡 (TEM) による微細構造分析は、両細胞系とも *in vitro* で多層構造の実質を形成していたが、両者の細胞系のマトリックス集合体には違いが認められた。両者を比較すると、直交したコラーゲン線維を含む領域において、野生型がより密なマトリックスを構成し、変異型には線維の集合と構造に明らかならつきがあることが示された。これらの結果は、変異型は lumican 構造の変化をきたし、野生型が関与するコラーゲン線維形成と角膜実質内のマトリックス集合体の形成が障害されていることを示唆している。

弘前医学 55: 108—114, 2004

**キーワード:** コラーゲン線維形成; 角膜; 角膜線維芽細胞; lumican; ジスルフィド結合。

ORIGINAL ARTICLE

### EFFECTS OF LUMICAN ON IN VITRO COLLAGEN FIBRILLOGENESIS IN CULTURES OF IMMORTALIZED MK/T-1 CELL LINE FROM MOUSE KERATOCYTES

Kazuhiya Mamiya, and Mitsuru Nakazawa

**Abstract** Keratan sulfate proteoglycans, such as lumican and keratocan, play an important role in corneal morphogenesis by modulating collagen fibrillogenesis during embryonic development. We examined the role of a highly conserved 37-CX<sub>3</sub>CXCX<sub>9</sub>C-53 domain adjacent to the N-terminus of lumican in collagen fibrillogenesis, using site-specific mutagenesis to prepare plasmid DNA encoding for wild type (CX<sub>3</sub>CXCX<sub>9</sub>C) and C/S mutant (CX<sub>3</sub>SXCX<sub>9</sub>C) lumican. cDNAs were cloned into an expression vector. Cultures of MK/T-1 cells, an immortalized cell line from mouse keratocytes expressing human telomerase reverse transcriptase were transfected with the cDNAs. Stable transfectants were selected and cloned in the presence of zeocin. The stable transfectants maintain a dendritic morphology similar to the parental MK/T-1 cells. Western blot analysis with antibodies against c-Myc-tag and lumican detected a 42 kDa lumican protein from the culture medium of the wild type and C/S mutant transfectants. Ultrastructural analyses by transmission electron microscopy (TEM) showed that both cell lines generated a multi-layered stroma *in vitro*. However, the matrix assembled by the two cell lines differed. Compared to the mutant cell line, the wild type cells assembled a more organized matrix with regions containing orthogonal collagen fibrils. In addition, the fibrils in the extracellular matrix formed by the mutant cell line showed apparent alterations in fibril packing and structure. The results indicate that the lumican C/S mutant may interfere with collagen fibrillogenesis and stromal matrix assembly, potentially due to an alteration in lumican folding.

Hirosaki Med. J. 55: 108—114, 2004

**Key words:** collagen fibrillogenesis; cornea; keratocytes; proteoglycan; disulfide bond.

弘前大学医学部眼科学教室  
別刷請求先: 間宮和久  
平成14年1月21日受付  
平成16年2月26日受理

Department of Ophthalmology, Hirosaki University  
School of Medicine  
Correspondence: K. Mamiya  
Received for publication, January 21, 2002  
Accepted for publication, February 26, 2004

## 結 言

角膜の強度、透明性は、細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) 構成物の適度な割合と適切な水和の比率により構成された均一な直径のコラーゲン線維と規則正しい配列に依存している。角膜実質では、これら規則的に配列された線維は、直交するラメラ層を形成している<sup>1,2)</sup>。このような実質の特異的構造の形成を制御する機序はいまだよく理解されていないが、プロテオグリカンとコラーゲンおよびコラーゲンとコラーゲンの相互作用が重要である可能性と、異なるコラーゲン型の量と作用は、コラーゲン線維直径を制御するのに重要な役割を担っていることが示唆されている<sup>1,3-5)</sup>。成熟した角膜実質は、I型およびV型コラーゲンを主体とする小さく均一化したコラーゲン線維を含み、他のI型コラーゲン含有組織に比較して、V型コラーゲンを多く含んでいる<sup>6)</sup>。V型コラーゲンは線維直径の制御に重要であり、線維直径を縮小化させる *in vitro* の自己集合体システムでは、I型コラーゲンに対してV型コラーゲンの割合が増加している。しかしながら、この自己集合体システムでは、成熟角膜実質におけるコラーゲン線維直径と比較して、大きな直径の線維が生じており、角膜線維直径の制御には他の因子が重要な役割を担っている可能性が考えられている<sup>7)</sup>。

small leucine-rich プロテオグリカン (SLRPs) は、結合組織においてコラーゲンのマトリックス集合体を制御すると考えられている<sup>1,2)</sup>。SLRPs のコラーゲン線維形成を制御する役割は、decorin と lumican null mice において最もよく証明されている<sup>8)</sup>。gene targeting によりそれぞれの遺伝子をノックアウトしたマウスは、病理学的にコラーゲン線維の直径の変化ならびにコラーゲン線維空隙の変化を示している。Decorin<sup>-/-</sup> mice は脆弱な皮膚と透明な角膜を、一方 lumican<sup>-/-</sup> mice は脆弱な皮膚と混濁した角膜を有している<sup>8)</sup>。しかしながら、こ

れらの SRLP がどのようにしてコラーゲン線維直径と ECM を制御しているかという分子メカニズムは不明なままである。

角膜実質における主要なプロテオグリカンは lumican, keratocan, mimecan と decorin であり、これらの化合物は実質ではコラーゲンに次ぐ、2番目に豊富な生体物質である。lumican と keratocan は keratan sulfate-glycosaminoglycan (KS-GAG) 鎖を含み、特に角膜に豊富に存在している。これら高度に荷電したプロテオグリカンは実質の水分の保持に寄与する<sup>9-12)</sup>。

これらのことより、SLRPs はマトリックス集合体の鍵となる制御因子であることが示されている。

また、SLRPs のメンバーは、N-末端領域に高度に保存されたシステイン残基 (37-CX<sub>2-3</sub>CXCX<sub>6-9</sub>C) を有している。これらシステイン残基はコア・タンパク N-末端領域でジスルフィド結合を形成する領域に位置する。この N-末端でのジスルフィド結合が、コア・タンパクにコラーゲン分子を結合させ、線維直径を制御する可能性が示唆されている<sup>5)</sup>。このことを明らかにするために本研究では、CX<sub>3</sub><sup>41</sup>CXCX<sub>9</sub>C の 41 番目のシステインをセリン (S41) に置換した変異型 lumican 遺伝子を作製し、培養条件下での三次元 ECM 形成に対する変異型 lumican 遺伝子の機能を形態学的に検討したので報告する。

## 方 法

### 野生型と変異型 (C/S) lumican のプラスミド DNA の作製

まず初めに野生型 lumican cDNA (985 bp, 以下 lumWt と称す) を pSecTag2A vector (Invitrogen) の Sfi I と Not I 部位に挿入した。Polymerase chain reaction (PCR) のためのプライマーは Sfi I 制限酵素部位と lumican の末端に Not I 制限酵素部位を付加した以下の配列を合成し、使用した (5'>GCG GCC CAG CCG GCC AGT GGC CAA TAC TAC GAT T-3',

5'>ATA AGA ATG CGG CCG CGT TAA CGG TGA TTT CAT T-3'). PCRは100 ng lumican cDNAを鋳型とし, 基質としてdNTP 25 nmolとTaq polymerase (Invitrogen®) 2.5 unitを加え, 全量50  $\mu$ lの系で, 94°C 1分間, 57°C 1分間, 72°C 1分間の反応を35サイクル施行し, 続いて72°C 10分間加熱した. 次いでPCR産物は, 1.0%アガロースゲルにより単一バンドを切り出して分離し, 引き続きフェノール抽出後エタノール沈殿によりさらに精製した. PCR産物とpSecTag2AのSfi IとNot I酵素による消化は, プロトコール (New England Biolabs) に従って37°C 2時間, 続いて50°C 2時間インキュベートした. cDNAは, その後T4 DNA ligaseを用いてpSecTag2Aに挿入された. さらに合成された組換えプラスミドは直接塩基配列決定法により塩基配列を調べることで, 正しく挿入されたことが確認された.

次にCX<sub>3</sub>CXCX<sub>9</sub>CのC41をS41に置換したCX<sub>3</sub>SXCX<sub>9</sub>C (変異型, 以下lumC/Sと称す)を作製するためにPCR-based site directed mutagenesisを行った. 非対称性C/S mutantの1本鎖オリゴヌクレオチド (194bp) を作製するために5'>GTT AGA TTC TGG TGC ACA GTT GGG-3' (lumican mRNAに相補的な3'プライマー) とT7プライマーのプライマー対 (モル比1:20) を使用し, PCRを行った. この1本鎖PCR産物は前述と同様の方法にてゲル精製した後, 3'プライマーであるNot Iを含むヌクレオチドと共に他のPCR反応液に加えられた. このPCR産物もlumWtの場合と同様にpSecTag2A vectorに挿入された.

#### 細胞培養とP-アスコルビン酸とtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1を含む三次元細胞培養

lumWtとlumC/Sを含むvectorは, それぞれリン酸カルシウムを使用してマウス角膜実質細胞に由来する不死化細胞系であるMK/T-1細胞に導入された. 細胞を100  $\mu$ g/ml zeocin

(Invitrogen) と10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含有したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で5% CO<sub>2</sub>, 37°Cで培養し増殖させた. 100  $\mu$ g/ml zeocinは, クローンを同定するための抗生剤として使用された.

2.5x10<sup>4</sup>個の細胞を, 24穴培養皿 (Falcon) 上の24穴培養皿用フィルター膜 (Falcon) に蒔き, 100  $\mu$ g/ml zeocin, 0.1 mM P-アスコルビン酸, 1 ng/ml 組み換えTGF- $\beta$ 1 (R&D), 10% FBS含有DMEMで5% CO<sub>2</sub>/95% airで4~6週間培養した. 培養液は週2回交換した.

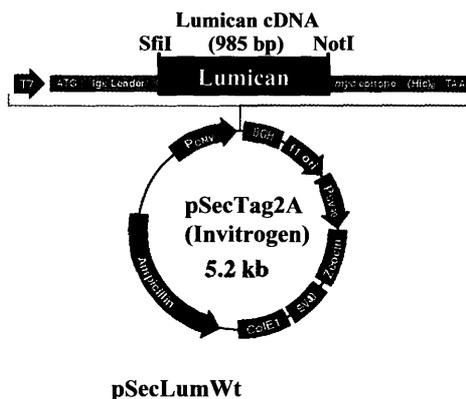
#### 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

培養終了時に, 速やかに培養液を取り除いた細胞を, リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4, PBS) にて3分間洗浄した後, modified Karnovsky固定液 (2.5% EM grade glutaraldehyde, 4.0% paraformaldehyde, 8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4) を加え, 温度ショックを避けるために室温で固定した. 細胞を室温の固定液に浸した後, 速やかに氷上に移し固定を継続した. 10ないし15分後に新しい4°Cの固定液に交換し, 4°Cでさらに2時間固定した. 2時間後, 固定液を除去し, 細胞をtransport solution (0.1 M cacodylate buffer, 10%スクロース, 1/10 modified Karnovsky固定液) で1回洗浄した. サンプルは常法に従って, TEMにて観察した.

## 結 果

lumican cDNAは, pSecTag2A vectorに挿入された (図1, 上段). 野生型と変異型lumicanの塩基配列では, コドン41のTGTがTCTに変化し, この結果lumWtのC41がlumC/SではS41に変化していることが確認された (図1, 下段).

全てのstable transfectantsは導入遺伝子の種類にかかわらず, MK/T-1細胞に類似した樹枝状形態を示していた (図2). これらの細胞は, 増殖能においても違いは認められず, 外来



**pSecLumWt**

TGT GCA CCA GAA TGT AAC TGC CCC CAC AGC TAC CCA ACT GCC ATG TAC TGT  
 37-C A P E C N C P H S Y P T A M Y C-53  
 TGT GCA CCA GAA TCT AAC TGC CCC CAC AGC TAC CCA ACT GCC ATG TAC TGT  
 37-C A P E S N C P H S Y P T A M Y C-53

**pSecLumC/S**

図 1 pSecLumWt (野生型) および pSecLumC/S (変異導入) の模式図 (上段), 塩基ならびにアミノ酸配列 (41C は赤字) を下段に示す.

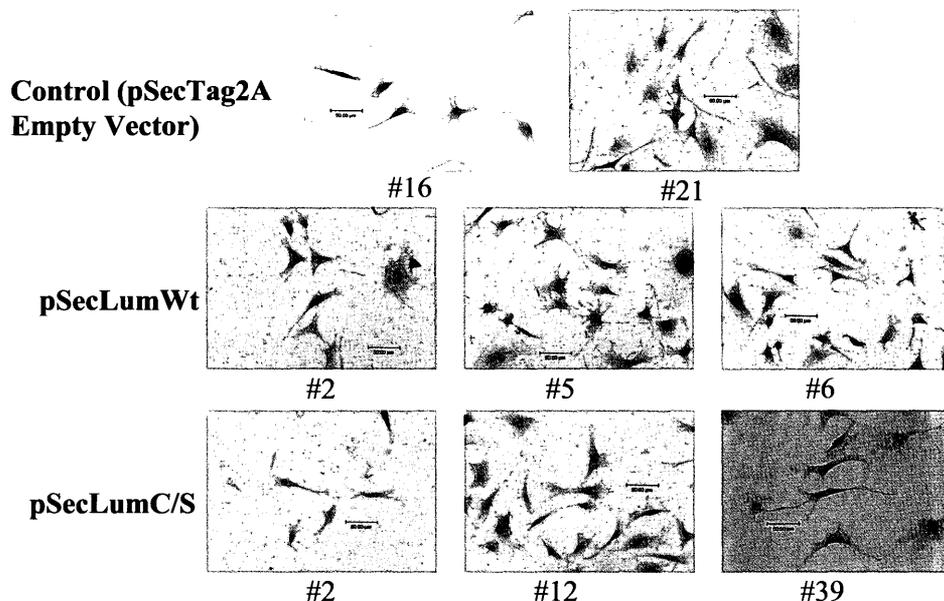


図 2 安定形質細胞の形態. pSecLumWt および pSecLumC/S はともに親細胞の MK/T-1 細胞に類似した樹枝状形態を示している.

遺伝子による影響は認められなかった(図 3).

western blot は, lumWt, lumC/S の培養液に分泌された lumican タンパクを検出する anti-Myc 抗体で行った. 図 4 のプロットは anti-Myc 抗体でプローブした. WT2, WT5, WT6 は lumWt クローンであり, これらの培

養液からは分泌された lumican タンパク陽性を示す 42 kDa バンドが認められた. 変異型 lumC/S のクローン C/S2, C/S12, C/S39 でも, lumican タンパクの分泌が見られた (図 4).

TEM による観察では, lumWt 細胞の ECM では, コラーゲン線維がより集合した形態を示

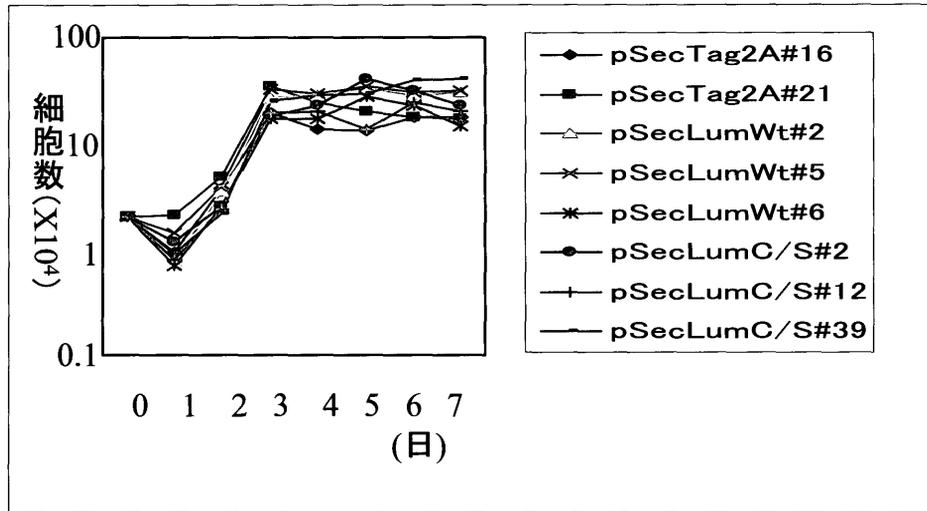


図3 細胞増殖曲線. それぞれの遺伝子導入細胞に増殖能には差は認められなかった.

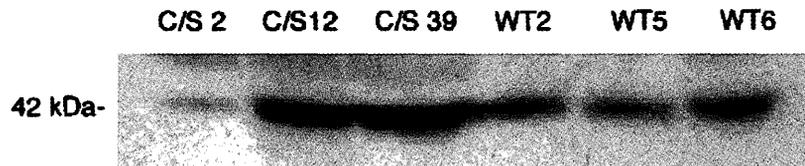


図4 抗 c-Myc 抗体を用いた western blot. 両者で外来遺伝子による lumican タンパクの発現が認められる.

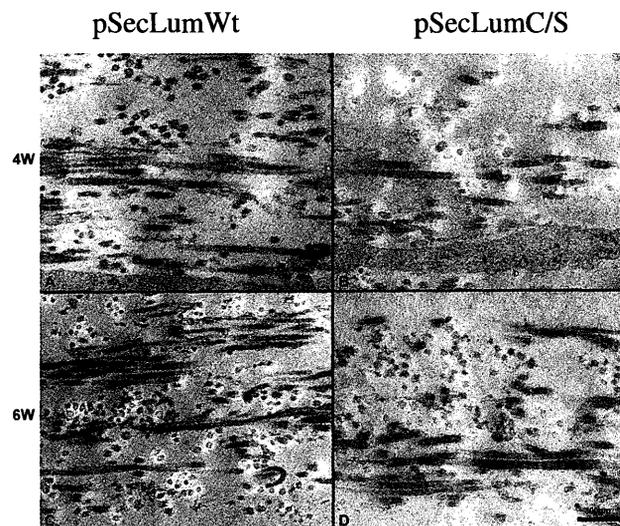


図5 透過電子顕微鏡 (TEM) 検査. 変異型 LumC/S のコラーゲン線維形成が障害されている.

しているが, 変異型 lumC/S 細胞の ECM ではコラーゲン線維の集合が乱れていた (図5). 2つの細胞系とも ECM でのコラーゲン線維形

成がみられるが, 両者を比較すると, lumWt 細胞の方が, 正常角膜実質に見られるように直交したコラーゲン線維を含む密な ECM を示し

ている。一方, lumC/S 細胞は疎な ECM を示している。

## 考 察

角膜実質は SLRPs とコラーゲンを豊富に含む高度に組織されたマトリックスであり, 角膜の形状, 強度, 透明性に寄与している。角膜の透明性は均一なコラーゲンの直径と秩序正しい線維の配列によるコラーゲンマトリックスによるものである<sup>1,2)</sup>。角膜の SLRPs である lumican, keratocan, mimecan はコラーゲンマトリックスの維持に重要な役割を果たしているという報告が多々ある。例えば lumican ノックアウトマウスはコラーゲン直径の変化, 線維間の不均一な空間を含む角膜実質の ECM 構造のために, 角膜混濁を生じている<sup>13)</sup>。しかしながら, コラーゲン線維形成の制御, 角膜透明性の維持における SLRPs の正確な役割は依然として不明である。

今回の研究は, 培養角膜実質細胞由来の不死化細胞である MK/T-1 を用いて, 野生型と変異型 lumican 遺伝子を導入することにより, 細胞外コラーゲン線維形成における導入遺伝子の機能について調べたものである。MK/T-1 細胞は, 継代を繰り返すと (>70), 内因性の keratocan と lumican の合成と分泌を停止する。このことは HT1080 のような腫瘍由来の多くの不死化細胞系で keratocan, lumican のような SLRP のコア・タンパクの発現が失われるということと類似する。腫瘍細胞による SLRP コア・タンパクの抑制の原因は不明であるが, *in vitro* のコラーゲン線維形成における lumican あるいは他のコア・タンパクの役割を調べる培養システムでは内因性の SLRP の発現が抑制されているため, 外来遺伝子による発現のみが認められるので, 有利な条件となる。興味深いことに野生型, 変異型 lumican コア・タンパクの発現は, MK/T-1 細胞の特徴である樹枝状形態 (図 2) を明らかに変化させず, 増殖能 (図 3) にも影響を与えなかった。同様

にアスコルビン酸, TGF- $\beta$ 1 の存在下でも三次元 ECM の合成能が認められている (図 5)。また, 免疫抗体反応 (図 4) で示されたように, 野生型および変異型 (C41S) lumican 遺伝子は, lumican タンパクを発現, 分泌している。

この MK/T-1 細胞培養システムを利用して, 我々は lumican の N-末端にあるジスルフィド結合が, コラーゲン線維形成を制御する lumican 機能の本質であるという仮説を検証するために研究を行なった。lumican コア・タンパクの N-末端ドメインで<sup>37</sup>CAPE<sup>41</sup>CNCPHSYPTAMYC<sup>53</sup> の C41 と C53 の間のジスルフィドループが, lumican とコラーゲン分子の結合を制御していることが示唆されている。本研究の結果から, 変異型 (lumC/S) コア・タンパクは, 不均一な直径のコラーゲン線維の形成, コラーゲンラメラ配列の不整を生じさせるということが明らかとなり, lumican コア・タンパクの N-末端ドメインは, コラーゲン線維形成に重要な役割を担っているということが示唆された。角膜実質におけるコラーゲンマトリックスの不整は, 不可逆的な視覚障害を引き起こす。ECM における均一な直径のコラーゲン線維が互いに直交する整然とした配列が, 角膜の透光性に不可欠である。このマトリックスのごく僅かな不整は, 光の屈折と反射に影響し, 視覚像に変化を与える。角膜実質マトリックスの不整は, 重度の視覚障害を起こす角膜混濁の原因となる。これら構成物を含むマトリックスは, 透光性を阻害するだけでなく, 角膜の構造異常を引き起こす可能性があり, 角膜の構造的脆弱は円錐角膜などの原因となりうる。

過去の報告では, 角膜の SLRP N-末端ドメインの重要性が証明されている<sup>14)</sup>。我々は lumican の N-末端領域に存在する他の種の lumican でも類似した CX<sub>3</sub>CXCX<sub>9</sub>C ドメインの重要性を示した。このドメインの C41 を S41 に変化させることによりコラーゲン線維の形成は障害された。このアミノ酸置換が lumican

の構造に及ぼす効果は不明であるが, 変異型は, ジスルフィド結合を形成できないことにより, タンパクの折りたたみが障害される可能性がある。また今回の研究では, 我々は細胞培養で三次元のECMを合成し, TEMを用いてコラーゲン線維を分析する新たな方法を開発した。この技術は, ECMシステムにおけるタンパクとコラーゲンの相互作用を解析するのに有効であると考えられた。今後このような分野でさらに応用されるものと期待される。

### 文 献

- 1) Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. *Ann N Y Acad Sci* 1990;580:143-60.
- 2) Hay ED. Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol* 1979;63:263-322.
- 3) Doane KJ, Babiarz JP, Fitch JM, Linsenmayer TF, Birk DE. Collagen fibril assembly by corneal fibroblasts in three-dimensional collagen gel cultures. *Exp Cell Res* 1992;202:113-24.
- 4) Hahn RA, Birk DE. beta-D xyloside alters dermatan sulfate proteoglycan synthesis and the organization of the developing avian corneal stroma. *Development* 1992;115:383-93.
- 5) Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis *in vitro* by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res* 1993;56:635-48.
- 6) McLaughlin JS, Linsenmayer TF, Birk DE. Type V collagen synthesis and deposition by chicken embryo corneal fibroblasts *in vitro*. *J Cell Sci* 1989;94:371-9.
- 7) Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis *in vitro*: interaction of type I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 1990;95:649-57.
- 8) Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 1996;271:31767-70.
- 9) Funderburgh JL, Funderburgh ML, Hevelone ND, Stech ME, Justice MJ, Liu CY, Kao WW, Conrad GW. Sequence, molecular properties, and chromosomal mapping of mouse lumican. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995;36:2296-303.
- 10) Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 1995;270:21942-9.
- 11) Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995;64:403-34.
- 12) Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, Hassell JR. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. *J Biol Chem* 1992;267:347-52.
- 13) Saika S, Shiraishi A, Liu CY, Funderburgh JL, Kao CW, Converse RL, Kao WW. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem* 2000;275:2607-12.
- 14) Funderburgh JL, Funderburgh ML, Brown SJ, Vergnes JP, Hassell JR, Mann MM, Conrad GW. Sequence and structural implications of a bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein. Protein 37B represents bovine lumican and proteins 37A and 25 are unique. *J Biol Chem* 1993;268:11874-80.