

Title	実験的表皮増殖におけるポリアミンの役割に関する研究
Author(s)	滝川, 正春
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31621
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

「実験的表皮増殖におけるポリアミンの
役割に関する研究」

大阪大学大学院歯学研究科

歯学基礎系生化学

滝川正春

緒 言

プロレツシン、スperlミジン、スperlミンなどのポリアミンは、生物界に普遍的に分布する生体アミンである。これらポリアミンの発見の歴史は古く、1927年までにその化学構造が決定されていたにもかかわらず、生理的意義については長らく不明であった。^{1,2)}しかし1960年代の後半以降、動物組織のポリアミン含量が、前立腺、睪、胸腺、骨髓などの蛋白および核酸合成の盛んな組織で特に高く、また、ホルモンや薬物の投与あるいは外科的処置により実験的に組織増殖を誘発した場合、核酸合成の増加に先行あるいは並行して標的組織のポリアミン合成活性およびレベルが著しく上昇することが明らかにされ、ポリアミンと細胞増殖との密接な相関が大きな注目を浴びてきた。¹⁻⁷⁾さらに最近、腫瘍の増殖とポリアミンレベルとの間にも密接な関連のあることが証明され、臨床医学的にも大きな関心を集めている。⁴⁻⁷⁾

動物組織ではポリアミンは図1に示す経路で生合成される。これらの反応を触媒する酵素のうちオルニチン脱炭酸酵素〔EC 4.1.1.17〕とS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素〔EC 4.1.1.50〕はともに、組織に増殖刺激が加えられた場合、増殖の開始に先行して著明な活性上昇を示すが、オルニチン脱炭酸酵素のそれはもっともすみやかにかつ顕著である。また、オルニチン脱炭酸酵素の反応生成物であるプロレツシンはスペルミンおよびスペルミンの前駆体となるのみならず、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素を強く活性化することが知られており、したがってオルニチン脱炭酸酵素はポリアミン合成の最も重要な^{2,3,5~7)}律速酵素とされている。

このように、ポリアミンと細胞増殖との密接な相関を示唆する報告は数多くなされているが、ポリアミンの生理的意義についてはなお不明な点が多く、特にポリアミン合成の亢進が細胞増殖に不可欠であるか否かについて

は未だ明らかでない。

一方、テレピン油、ethylphenyl propiolate あるいは phorbol ester とマウス皮膚に塗布すると、表皮の増殖、肥厚の見られることが知られていいる。^{8,12)} 特に構造の明らかな ethylphenyl propiolate では、同調度の高い一過性の DNA 合成と細胞分裂の促進がみられ、表皮も著明に肥厚する。したがってこの系は細胞増殖機構の研究に適した実験系であると考えられる。

本研究は、ethylphenyl propiolate (EPP) によるマウス表皮増殖時のホリアミン代謝について検討を加えたとともに、ホリアミン合成の律速酵素としてもっとも重要なオルニチン脱炭酸酵素の特異的阻害剤である DL- α -ヒドラジノ- δ -アミノバレリアン酸 (DL-HAV A)¹³⁾ を用いて表皮増殖におけるオルニチン脱炭酸酵素、さらにはホリアミンの役割を追究したものである。

材料と方法

1. 動物の処置

実験には体重25~30gのddK系雄性マウスを用い、hair cycleを考慮して少なくとも実験開始の5日前までにクリッパーで背部の毛を除き、実験当日まで毛の再生の見られないマウスのみを選んで使用した。^{8~10, 12)} 実験動物は固型飼料(オリエンタル酵母社製)と水を自由摂取させたが屠殺の2時間前より絶食した。

Ethylphenylpropionate (EPP) は0.1mlのアセトン溶液とし、除毛した背部皮膚(2×4cm)にマイクロシリンジを用いて均一に塗布した。また、対照群には0.1mlのアセトンと塗布した。他の薬物はすべて投与直前に0.2mlの生理食塩水に溶解し、腹腔内または皮下に注射し、対照群には同量の生理食塩水を投与した。

マウスの屠殺は日内リズムの影響を避けるため10時から15時の間に行なった。屠殺

後ただちにEPPを塗布した部位の皮膚を剔出し、可及的に皮下組織を除いた後、重量を測定して以下の実験に供した。

2. 酵素活性の測定

組織(200~300mg湿重量)を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0), 5mMジチオスレイトール, 0.2mMピリドキサルリン酸, 0.1mMEDTAを含む氷冷した0.25M蔗糖液中でポリトロンを用いてホモジナイズし, 4°C, 105,000×gで30分間遠心して、その上清を酵素液とした。

オルニチン脱炭酸酵素活性の測定は当教室で先に報告した方法^(14,15)により、また、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素活性の測定は、2.5mMのプロレツシンの存在下でJänneおよびWilliams-Ashmanの方法⁽¹⁶⁾により、それぞれカルボキシル基を¹⁴Cでラベルした基質から遊離される¹⁴CO₂を測定して行なった。

両酵素とも37°C, 1時間の反応で/nmolのCO₂を遊離する酵素量を/unitとして表わ

した。

3. ポリアミンの定量

組織を 9 ml の氷冷した 2% 過塩素酸中でポリトロンフいでガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズし、4°C、20,000 × g で 20 分間遠心した。上清を分離後、沈殿を 3 ml の 2% 過塩素酸で 2 回遠心洗滌し、得られた上清をもとの上清と混合した。この混合上清中のポリアミンを、まず Dowex-50 カラムで分離して濃縮し、フいで濾紙電気泳動法により分画したのち、ニンヒドリンで発色し比色定量した。^(14,15,17)

4. スペルミジンよりのプロテツシンの生成の測定

マウスに 1 μ Ci の [テトラメチレン-¹⁴C] スペルミジン (10.03 mCi/mmol) を皮下注射し、7 時間後に屠殺した。上記の方法によつて Dowex-50 カラムで分離、濃縮したポリアミン画分を、Dion と Herbst の方法⁽¹⁸⁾に従つてダシシル化した後、シリカゲル薄層ク

ロマトグラフィーで分画した。ついで、プロ
レウシンとスperlミジンの部位を紫外線下で
確認して、それぞれに相当する部位のシリカ
ゲルをカミソリの刃で削りとリ、細かく砕い
たのち、3 mlのメタノール・28% NH_4OH
(95:5)中で15分間振盪してダンシルア
ミンを抽出した。1,000×gで10分間遠心
したのち、上清の一部にInsta-Gelシンタ
レーション溶液(10 ml)を加えて、Aloka,
LSC 653型液体シンタレーションスペク
トロメーターを用いて放射能を測定した。ま
た、ポリアミンの定量は、残りの上清中のダ
ンシルアミンを日立204型分光蛍光光度計
で測定して行なった。なお、蛍光は、340 nm
で励起し、520 nmで測定した。

5. DNA合成能の測定

In vitroの実験では、ガラスナイフを用い
て調製した皮膚のミンス(1×1 mm)を、10
mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine
- N'-2-ethanesulfonic acid)を含む10 mlの

イーグルのMEM液(pH 7.4)中で30分間ブレインキュベートしたのち、 $10 \mu\text{Ci}$ の〔メチル- ^3H]チミジン($5 \text{ Ci}/\text{mmol}$)を添加した新鮮培養液(5 ml)中に移し、 37°C 、100%気相中でさらに1時間インキュベートした。インキュベーション後、組織を0.5 mMのチミジンを含む氷冷生理食塩水(50 ml)で2回洗滌したのち、9 mlの2%過塩素酸中でホモジナイズした。ホモジネートを 4°C で、 $20,000 \times g$ 、20分間遠心したのち、得られた沈殿を2%過塩素酸(3 ml)で2回洗滌した。この沈殿からSteele¹⁹⁾の方法によつて脂質を除去したのち、SchmidtおよびThannhauserの方法²⁰⁾によつてDNAを可溶化し、とり込まれた放射能およびDNA量を測定した。

In vivoの実験では、 $20 \mu\text{Ci}$ の〔メチル- ^3H]チミジン($20 \text{ mCi}/\text{mmol}$)を屠殺20分前に皮下注射して、ついで上記の方法によりDNAを抽出した。

6. 蛋白定量およびDNA定量

蛋白量は牛血清アルブミンを用いて Lowry の方法²¹⁾により測定した。DNAは仔牛胸腺DNAを標準液として、Schneiderの方法²²⁾により定量した。

7. 組織学的検索

表皮細胞の分裂は著明な日内リズムを示し、10時に最大で22時には最小となることが知られている。²³⁾そこで組織学的検索では、マウスは19時～23時に屠殺した。なお、細胞分裂指数を調べる際は、コルヒチン(5 mg/kg体重)を屠殺1あるいは4時間前に腹腔内注射した。

剔出した組織片は、通法に従って10%中性ホルマリンで固定、アルコール脱水、パラフィン包埋、薄切(5 μ m)し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施して、光学顕微鏡で観察した。²⁴⁾

表皮の非角化層の厚さは、毛嚢間の表皮について、倍率400倍で接眼マイクロメーター

を用いて1組織片当り任意に最少20個所を測定し、その平均値を採用した。表皮有核細胞の層数も、同倍率で同じ部位を測定し、平均値を採用した。⁹⁾細胞分裂指数は1,000倍で、最少1,000個の基底細胞中の分裂期核を有する細胞数を数え算出した。

8. 試薬

DL- α -ヒドロジノ- δ -アミノバレリアン酸 (DL-HAVA) は、大日本製薬中央研究所の西村温樹博士より供与されたものを使用した。DL-[1- 14 C]オルニチン \cdot HCl, S-アデノシル-L-[カルボキシル- 14 C]メチオニン, [テトラメチレン-1, 4- 14 C]スベルミジン \cdot 3HCl ならびに [メチル- 3 H]チミジンはいずれも New England Nuclear Co. より購入した。Ethylphenylpropionate は Aldrich Chemical Co. 製を、プロレツシン, スベルミジン ならびに スベルミンの塩酸塩は、Sigma Chemical Co. 製を用いた。

実験結果

1. EPPによる表皮の増殖

図2はEPP塗布後の *in vivo* での皮膚DNA合成能の変動を調べたものである。マウス当り $15 \mu\text{mol}$ のEPPを塗布すると、DNA合成は12時間後より増加しはじめ、24時間で正常値の約2.5倍の最大値に達した。

図2.

つぎに、EPP塗布後にみられる組織学的変化について検索した。アセトンのみと塗布したマウスの背部表皮は、正常マウスの表皮と差はみられず、図7-Aに示すように1~2層の有核細胞と薄い角化層からなり、きわめて薄い。しかしEPPを塗布すると、36時間後には図7-Bに示すように表皮は著明に肥厚した。すなわち有核細胞が数層に増加するとともに顆粒層が出現し、さらに表層も錯角化の状態を示し肥厚がみられた。また、基底細胞に多数の核分裂像が認められた。

このような変化を経時的に計測した結果を、図3に示した。基底細胞の分裂指数はEPP

図3.

塗布後 24 時間ですでに有意の上昇を示し、36 時間で正常値の約 20 倍となり最大値に達した。また、表皮の有核細胞の層数も 24 時間で有意に上昇し、36 時間で正常の約 2.5 倍の最大値を示した。さらに非角化層の厚さも同様の変動を示し、36 時間で最大となり、正常の約 2.5 倍に達した。

2. EPP 塗布後のポリアミン代謝の変動
 まず、ポリアミン合成の律速酵素として最も重要なオルニチン脱炭酸酵素活性を測定した。図 4 は種々の量の EPP を塗布し、8 時間後の皮膚オルニチン脱炭酸酵素活性を測定したものである。酵素活性は塗布した EPP の量に比例して上昇し、マウス当り $15 \mu\text{mol}$ で正常値の約 30 倍の最大活性を示した。しかし、EPP の量をさらに増加すると、酵素活性の上昇は逆に低下した。なお、EPP 塗布による皮膚 DNA 合成活性の促進は EPP 量が過剰であるとむしろ低下し、皮膚に壊死の生ずることが報告されている¹⁰⁾。したがって

図 4.

以下の実験ではEPPはマウス当り $15\mu\text{mol}$ を使用した。

図5はEPP塗布後の皮膚ポリアミン合成の律速酵素活性の経時的変動を示したものである。オルニチン脱炭酸酵素活性はEPP塗布4時間後より急速に上昇し、8時間後に最大となるが、以後すみやかに低下した。一方、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素活性は4時間後より徐々に上昇し、20時間で正常値の約5倍の最大活性を示し、以後漸次低下した。したがって、本酵素活性の上昇は、オルニチン脱炭酸酵素に比して遅くかつ小さい

図5

図6はEPP塗布後の皮膚ポリアミンレベルの変動を調べたものである。プロレウシンレベルはオルニチン脱炭酸酵素活性と一致して著明な変動を示し、EPP塗布4時間後より上昇しはじめ、8時間後で正常値の約4倍の最大値となり、以後急速に低下した。また、スベルミジンレベルは4~6時間で有意の

図6

低下を示した後、徐々に上昇し、28時間で正常値に比して約30%の増加を示した。これに対して、スペルミンレベルはほとんど変動しなかった。なお、プロレツシンの上昇の初期にみられるスペルミジンレベルの低下は、イソプロテレノールによるマウス耳下腺の増殖の場合にも観察されており²⁵⁾、この低下はスペルミジンのプロレツシンへの分解の促進によるものと考えられる²⁶⁾。そこでEPP塗布後にも同様なスペルミジン分解の促進がみられるか否かを検討した。

表1は、EPP塗布1時間前に¹⁴C-スペルミジンを皮下注射して皮膚のスペルミジンをラベルし、EPP塗布6時間後のプロレツシンならびにスペルミジンを分析した結果を示したものである。表から明らかのように、EPP塗布によるプロレツシンレベルの増加は6時間後では約70%にすぎないが、スペルミジンの放射能比活性とプロレツシン中の放射能から算出したスペルミジンよりのプロレ

表1

ツシンの生成量は、EPP塗布により約3倍に増加している。この事実を、EPP塗布4～6時間後にみられたスperlミジンレベルの低下の一因が、スperlミジンよりのプロレスシン生成の亢進にあることを示している。

3. オルニチン脱炭酸酵素活性阻害剤の影響

上記のように、EPPによるマウス表皮の増殖時には、DNA合成の増加に先行して、オルニチン脱炭酸酵素活性ならびにプロレスシンレベルが著明に上昇する。そこで、このプロレスシンレベルの上昇が表皮増殖に不可欠であるか否かを追求するため、オルニチン脱炭酸酵素活性の阻害剤であるDL- α -ヒドロジノ- δ -アミノバレリアン酸(DL-HAVALA)を用いて検討した。なお、本阻害剤はオルニチンの構造類似体であって、オルニチンと拮抗してオルニチン脱炭酸酵素活性を強力かつ特異的に阻害する。^{13,25)}

表2にEPPによるポリアミンレベルの変

動に及ぼすDL-HAVALAの影響を示した。本実験では、オルニチン脱炭酸酵素活性が上昇しはじめた時期、すなわちEPP塗布4時間後にDL-HAVALA (0.4 mmol/kg 体重) を腹腔内注射し、4時間後すなわちEPP塗布8時間後に皮膚のホリアミンレベルを測定した。表2から明らかのように、EPPによるプロレウシンレベルの上昇はDL-HAVALAの投与により著明に抑制された。なお、DL-HAVALAを投与した動物に屠殺1時間前にプロレウシン (0.5 mmol/kg 体重) を腹腔内注射すると、プロレウシンレベルは対照レベルまで上昇した。一方、スperlミジンレベルはEPP単独処置群とDL-HAVALA投与群との間に有意の差は認められなかった。

つきに、EPPによるプロレウシンレベルの上昇をDL-HAVALAで抑制した場合、表皮増殖がどのような影響を受けるかを検討した。表3はDNA合成に及ぼすDL-HAVALAの影響を検討したものである。なお本実験では

DNA合成活性の測定は皮膚ミンスを用いて *in vitro* で行なつた。EPP塗布によりDNA合成は20時間後には対照の約1.7倍に上昇するが、DL-HAVA (0.4 mmol/Kg 体重) をEPP塗布4時間後に投与してプロトレニンレベルの上昇を抑制すると(表2)、このDNA合成活性の上昇がほぼ完全に阻止された。ついで、この阻止が真にプロトレニンレベルの低下に起因するか否かを検討するため、DL-HAVA投与の30分および4時間後に2回プロトレニン (0.5 μ mol/Kg 体重) を投与して皮膚のプロトレニンレベルを上昇させると(表2)、DL-HAVAによるDNA合成の阻害はほぼ完全に消失した。なお、このプロトレニンの作用は特異的であつて、プロトレニンの構造類似体であるカタベリンあるいは1,7-ジアミノヘプタンでは、DNA合成活性の回復はほとんどみられなかつた。これらの事実は、EPPによる表皮増殖では、プロトレニンレベルの上昇が必要かつ不

可欠であることと示している。

そこで、この点をさらに明確にするため、組織学的検索とあわせて行なった。表4に示すように、EPP塗布4時間後にDL-HAV Aを投与すると、表皮の非角化層の厚さ、有核細胞層数ならびに基底細胞の分裂指数の増加は著明に抑制された。図7-Cはその組織像の一例で、EPP処置群(図7-B)で見られた組織学的変化は、DL-HAV Aの投与によりほとんど観察されなくなり、対照(図7-A)に近い組織像を呈している。

表4

これに対して、DL-HAV A投与30分と4時間後に2回プロテウシンを投与した場合には、表皮非角化層の厚さ、有核細胞層数および細胞分裂指数は、いずれもEPP処置群とほぼ同レベルにまで回復した(表4)。図7-Dはその組織像であるが、EPP処置群(図7-B)と同様に著明な表皮の肥厚がみられ、顆粒層、錐角化および核分裂像と認められる。すなわち、プロテウシンの投与によ

図7

、 β -DL-HA ν Aの増殖阻止効果の消失することかわかる。このような回復効果もプロレツシンに特異的であつて、同族体であるカタベリンは全く効果がなかつた。

考 察

Raickら¹⁰⁾は、マウス皮膚に $40\mu\text{mol}$ のEP β を塗布すると、皮膚DNA合成は初期に一旦低下したのち上昇し、28時間で正常の約2倍の最大値に達すると報告している。また、彼らは組織学的検索を行つて、表皮の非角化層の厚さおよび有核細胞層数は48時間後に最大となり、基底細胞の分裂指数は44時間後に最大となると述べている。本研究では、マウス当り $15\mu\text{mol}$ のEP β 塗布により、DNA合成は24時間後に正常の約2.5倍の最大値に達し、表皮の非角化層の厚さ、有核細胞層数および基底細胞の分裂指数はいずれも36時間で最大となる(図2,3)。すなわち、本研究におけるDNA合成の増加およ

びそれに伴う表皮増殖は Raick の報告に比して若干早い。この差違は過量の EPP では DNA 合成の上昇度は低下し、かつ遅延するとの報告もあるので、EPP 塗布量の相違によるものと考えられる。これと一致して、ホリアミン合成の最も重要な律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素活性の上昇度と、マウス当り $15 \mu\text{mol}$ の EPP で最大となり、過量では逆に低下する(図4)。この事実は、DNA 合成の増加とオルニチン脱炭酸酵素活性の上昇とが密接に関係していることを示唆している。

EPP の塗布により、オルニチン脱炭酸酵素活性は DNA 合成の増加に先行して著明に上昇し、8 時間後に正常の約 30 倍の最大活性を示す。また、もう一つの律速酵素である S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素活性も上昇するが、その上昇はオルニチン脱炭酸酵素に比して遅く、かつ顕著ではない(図5)。

O'Brien²⁷⁻²⁹⁾ も EPP あるいは表皮増殖と起こ

ことが知られている phorbol ester によって
 両律速酵素活性の上昇することを報告して
 いる。なお、薬物塗布のみならず発毛³⁰⁾や創傷
 治癒³¹⁾の過程でも、DNA合成の上昇に先行し
 て皮膚のオルニチン脱炭酸酵素活性が上昇す
 ることが知られている。

一方、皮膚のプロテッシンレベルはオルニ
 チン脱炭酸酵素活性と一致して著明に変動し
 、8時間後に正常値の約4倍の最大値を示す
 。また、スペルミジンレベルはDNA合成の
 増加とほぼ一致して上昇し、28時間後に正
 常に比して約30%増加するが、増殖初期す
 なわらEPP塗布後4~6時間ではむしろ有
 意の低下を示す(図6)。この低下の一因と
 して表1に示したEPPによるスペルミジン
 からのプロテッシン生成の亢進があげられる
 。したがって、プロテッシンレベルの上昇に
 は、オルニチン脱炭酸酵素の活性上昇のほか
 、スペルミジンのプロテッシンへの分解も関
 与していると考えられる。このようなスペル

ミジンよりのプロテツシン生成は、再生肝³¹⁾あるいは四塩化炭素による肝障害³²⁾の際にも報告されている。しかし、スベルミンレベルはEPP塗布後28時間までほとんど変動しない(図6)。

以上のように、EPPによるマウス表皮増殖時には、DNA合成に先行あるいは一致して著明なポリアミン代謝の変動がみられるが、特にオルニチン脱炭酸酵素活性およびプロテツシンレベルの上昇が最もすみやかに顕著である。このようなオルニチン脱炭酸酵素活性およびそれに伴うプロテツシンレベルの上昇は他の増殖系においても報告されている。^{2,3,5,7,14,15,33~41)} また、Williams-Ashman⁴²⁾は種々のMorrisの肝癌を用いて、増殖の早いものはプロテツシンレベルが高い傾向があることを見出し、細胞増殖におけるポリアミンの重要性を指摘している。

オルニチン脱炭酸酵素の特異的な阻害剤であるDL-HAVAをEPP塗布4時間後に投

与すると、塗布8時間後のプロテッシンレベルの上昇は約50%抑制される(表2)。しかしDL-HA VAの投与量をさらに増加しても、プロテッシンレベルの上昇をそれ以上抑制することはできない(未発表データ)。この理由の一つとして、表1に示したEPPによるスペルミジンよりのプロテッシン生成反応が、DL-HA VAにより阻害されないことが考えられる。

表3, 4および図7に示すように、DL-HA VAを投与すると、DNA合成、表皮有核細胞層数、基底細胞の分裂指数などのEPPによる増加が、いずれも著明に抑制される。

すなわち、EPPによるプロテッシンレベルの上昇をDL-HA VAで阻止すると、それと一致して細胞増殖も著明に抑制される。しかし、スペルミジンレベルはDL-HA VA投与群(EPP塗布8時間後: 442 ± 16 , 10時間後: 582 ± 26 nmol/g 湿重量)とEPP単独処置群(8時間後: 473 ± 31 , 10時間

後：569 ± 48 nmol/g 湿重量)との間に有意の差は認められない。また、DL-HA VA 処置マウスにプロレスチンを投与して、低下した組織内プロレスチンレベルを上昇させると、DL-HA VA による表皮増殖の抑制はほぼ完全に回復する。しかもこの回復作用は、プロレスチンに特異的であってプロレスチンの構造類似化合物であるカダベリンあるいは1,7-ジアミノヘプタンでは認められない。このようなDL-HA VA の増殖抑制作用ならびにプロレスチンの特異的な回復作用は、イソプロテレノールによるマウス耳下腺の増殖²⁵⁾やマウス腋窩部の Sarcoma-180 の増殖³⁹⁾の場合にも観察されている。

以上の事実は、スペルミジンの前駆体として以外に、プロレスチンが細胞増殖に重要な役割を果たしており、組織増殖の初期にみられるプロレスチンレベルの上昇が細胞増殖に必須であることを示している。

総括

Ethylphenylpropionate (EPP) によるマウス表皮増殖時のポリアミン代謝の変動なすびに表皮増殖におけるポリアミンの役割を追究し、以下の結果を得た。

1. EPP塗布により皮膚DNA合成は、12時間後より増加しはじめ24時間で最大値を示した。また、表皮の厚さ、有核細胞層数および基底細胞の分裂指数の増加は36時間後に最大となった。

2. DNA合成の増加に先行して、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチンなすびにS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素活性が著明に上昇した。特に前者の活性上昇は後者に比してすみやかかつ顕著で、EPP塗布8時間後には正常値の約30倍に達した。オルニチン脱炭酸酵素活性の変動と一致してプロテインレベルも著明に変動し、EPP塗布8時間後に正常値の約4倍の最大値を示した。一方、スperlミジンレベルはEPP塗布後

4～6時間で有意の低下を示すが、これと一致してスペルミジンのプロテッシンへの分解も6時間後では正常の約3倍に亢進した。その後、スペルミジンレベルは徐々に上昇して28時間で正常値に比して約30%増加した。これに対して、スペルミンレベルはほとんど変動しなかった。

3. オルニチン脱炭酸酵素活性の特異的阻害剤であるDL-HA/Aを投与して、EPPによるプロテッシンレベルの上昇を抑制すると、DNA合成、表皮有核細胞層数、基底細胞の分裂指数などを指標とした表皮増殖が著明に抑制された。また、この抑制はプロテッシンを投与して組織内プロテッシンレベルを上昇させたことによりほぼ完全に回復した。しかし、この回復作用はプロテッシンに特異的であって、プロテッシンの構造類似体であるカダベリンや、 α - γ -ジアミノヘプタンでは全くその作用が認められなかった。

以上の結果から、EPP塗布によるマウス

表皮の増殖には、複製前期にみられるオルニチン脱炭酸酵素の誘導ならびにプロレスチンレベルの上昇が必須かつ不可欠であることが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜った生化学講座竹田義朗教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲と御助言を頂いた口腔病理学講座八木俊雄教授、生化学講座鈴木不二男助教授に深く感謝致します。

なお本研究を実施するにあたり、終始ひとかたならぬ御指導と御教示を頂いた生化学講座井上秀夫講師、ならびに、組織標本の作製、観察に際し、御教示と御協力を頂いた大阪府立成人病センター組織培養室々長森陽一博士、本学第二口腔外科学教室中村正之博士に厚く御礼申し上げます。

また、種々の御教示と御援助を下さった生化学教室の諸先生方に深謝致します。

STUDIES ON THE ROLE OF POLYAMINES IN THE PROLIFERATION
OF MOUSE EPIDERMIS

Masaharu TAKIGAWA

Department of Biochemistry, Osaka University Dental School,

32 Joan-cho, Kita-ku, Osaka, Japan

The relation between polyamine metabolism and cell proliferation in mouse dorsal epidermis was investigated.

The activity of ornithine decarboxylase in mouse skin increased very rapidly after a single application of ethylphenylpropiolate (EPP), a potent hyperplastic agent of epidermis. It reached a maximum after 8 hr and then decreased abruptly to one fifth of the maximum in the next 5 hr. S-Adenosylmethionine decarboxylase was induced by EPP but increase in its activity was slower and less pronounced than that of ornithine decarboxylase. The tissue concentration of putrescine changed in parallel with change in ornithine decarboxylase activity and was maximal 8 hr after EPP treatment. The spermidine level decreased significantly 4-6 hr after EPP treatment, when putrescine formation from spermidine was accelerated, and increased to 30% more than the normal level at 28 hr. The spermine level did not change within 28 hr after EPP treatment. The highest activity of DNA synthesis was observed at 24 hr, and the mitotic activity of basal cells was reached to the maximum 36 hr after the application of EPP.

Administration of DL- α -hydrazino- δ -aminovaleric acid (DL-HAVA), a potent and fairly specific inhibitor of ornithine decarboxylase, greatly depressed the increase in putrescine level in EPP-stimulated mouse skin but had little effect on the change in spermidine concentration. Under the same conditions, examination of DNA synthesis and the histological appearance of the skin showed that DL-HAVA also inhibited induction of cell proliferation by EPP. The inhibition by DL-HAVA was reversed by administration of putrescine, but not cadaverine or 1,7-diaminoheptane.

From these results, it is suggested that the rise in the putrescine level induced by EPP is a requisite for subsequent cell proliferation of the epidermis of mice.

文献

- 1) Tabor, H. and Tabor, C. W. (1964): Spermidine, spermine, and related amines. Pharmacol. Rev. 16, 245~300.
- 2) Bachrach, U. (1973): Functions of naturally occurring polyamines. Academic Press Inc., New York and London, 1~211.
- 3) Snyder, S. H. and Russell D. H. (1970): Polyamine synthesis in rapidly growing tissues. Fed. Proc. 29, 1575~1582.
- 4) Russell, D. H. (1973): Polyamines in growth—normal and neoplastic; in Polyamines in normal and neoplastic growth. (Russell, D. H., editor). Raven Press, New York, 1~13.
- 5) 竹田義朗 (1974): 成長とホリアミン. 代謝, 11, 699~712, 昭和49.
- 6) 竹田義朗, 井上秀夫 (1975): ホリアミンと細胞増殖, ホルモンと臨床, 23, 111~119, 昭和50.
- 7) Raina, A. and Jänne, J. (1975): Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. Med. Biol. 53, 121~147.
- 8) Baird, W. M., Sedgwick, J. A. and Boutwell, R. K. (1971): Effects of phorbol and four diesters of phorbol on the incorporation of tritiated precursors into DNA, RNA, and protein in mouse epidermis. Cancer Res. 31, 1434~1439.

- 9) Raick, A. N. (1973): Ultrastructural, histological, and biochemical alterations produced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on mouse epidermis and their relevance to skin tumor promotion. Cancer Res. 33, 269~286.
- 10) Raick, A. N. and Burdzy, K. (1973): Ultrastructural and biochemical changes induced in mouse epidermis by a hyperplastic agent, ethylphenylpropiolate. Cancer Res. 33, 2221~2230.
- 11) Raick, A. N. (1974): Cell proliferation and promoting action in skin carcinogenesis. Cancer Res. 34, 920~926.
- 12) Krieg, L., Kühlmann, I. and Marks, F. (1974): Effect of tumor-promoting phorbol esters and of acetic acid on mechanisms controlling DNA synthesis and mitosis (chalones) and on the biosynthesis of histidine-rich protein in mouse epidermis. Cancer Res. 34, 3135~3146.
- 13) Sawayama, T., Kinugasa, H. and Nishimura, H. (1976): Syntheses of ornithine decarboxylase inhibitors: D- and DL- α -hydrazinoornithine. Chem. Pharm. Bull. 24, 326~329.
- 14) Inoue, H., Tanioka, Y., Shiba, K., Asada, A., Kato, Y. and Takeda, Y. (1974): Effect of isoproterenol on polyamine metabolism in mouse salivary glands. J. Biochem. 75, 679~687.
- 15) 谷岡博昭、芝憲三、井上秀夫、加藤幸夫、浅田彬、滝川正春、尾野雅義。(1974): イソプロテレノールによるマウス唾液腺の増殖とポリアミン代謝. 阪大歯学誌, 19, 113~121, 昭和49.

- 16) Jänne, J. and Williams-Ashman, H. G. (1971): Dissociation of putrescine-activated decarboxylation of S-adenosyl-L-methionine from the enzymic synthesis of spermidine and spermine by purified prostatic enzyme preparations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 222~229.
- 17) Mizutani, A., Inoue, H., and Takeda, Y. (1974): Changes in polyamine metabolism during wound healing in rat skin. Biocim. Biophys. Acta 338, 183~190.
- 18) Dion, A. S. and Herbst, E. J. (1970): Polyamine changes during development of Drosophila melanogaster. Ann. N. Y. Acad. Sci. 171, 723~734.
- 19) Steele, W. J., Okamura, N. and Busch, H. (1964): Prevention of loss of RNA, DNA and protein into lipid solvents. Biochim. Biophys. Acta 87, 490~492.
- 20) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J. (1945): A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem. 161, 83~89.
- 21) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265~275.

- 22) Schneider, W. C. (1945): Phosphorus compounds in animal tissues.
I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid
and of pentose nucleic acid. J. Biol. Chem. 161, 293~303.
- 23) Cooper, Z. K. and Franklin, H. C. (1940): Mitotic rhythm in
the epidermis of the mouse. Anat. Rec. 78, 1~8.
- 24) 佐野 豊 (1975): 組織学研究法—理論と術式—. 4版, 南山堂, 東京
55~246, 昭和 50.
- 25) 加藤幸夫 (1976): イソプロテレノールによるマウス耳下腺の
増殖におけるホリアミンの役割. 阪大歯学誌, 21, ^{校正時記}_{入の子定}, 昭和 51.
- 26) 井上 秀夫, 浅田 彬, 加藤幸夫, 竹田義朗 (1976):
組織増殖の初期段階におけるスベルミジン代謝に関する研究,
生化学, 48, 468, 昭和 51.
- 27) O'Brien, T. G., Simsiman, R. C. and Boutwell, R.K. (1975):
Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis
by tumor-promoting agents. Cancer Res. 35, 1662~1670.
- 28) O'Brien, T. G., Simsiman, R. C. and Boutwell, R. K. (1975):
Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis
and their specificity for tumor promotion. Cancer Res. 35,
2426~2433.
- 29) O'Brien, T. G. (1976): The induction of ornithine decarboxylase
as an early, possibly obligatory, event in mouse skin carcinogenesis.
Cancer Res. 36, 2644~2653.

- 30) Probst, E. and Krebs, A. (1975): Ornithine decarboxylase activity in relation to DNA synthesis in mouse interfollicular epidermis and hair follicles. Biochim. Biophys. Acta 407, 147~157.
- 31) Siimes, M. (1967) : Studies on the metabolism of 1,4-¹⁴C-spermidine and 1,4-¹⁴C-spermine in the rat. Acta Physiol. Scand. Suppl. 298, 1~66.
- 32) Hölttä, E., Sinervirta, R. and Jänne, J. (1973): Synthesis and accumulation of polyamines in rat liver regenerating after treatment with carbon tetrachloride. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 350~357.
- 33) Russell, D. H. and Snyder, S. H. (1968); Amine synthesis in rapidly growing tissues: Ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60, 1420~1427.
- 34) Hölttä, E., and Jänne, J. (1972): Ornithine decarboxylase activity and the accumulation of putrescine at early stages of liver regeneration. FEBS Lett. 23, 117~121.
- 35) Hayashi, S., Aramaki, Y. and Noguchi, T. (1972): Diurnal change in ornithine decarboxylase activity of rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 795~800.
- 36) Raina, A. and Jänne, J. (1970): Polyamines and the accumulation of RNA in mammalian systems. Fed. Proc. 29, 1568~1574.

- 37) Pegg, A. E., Lockwood, D. H. and Williams-Ashman, H. G. (1970):
Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic
synthesis during androgen-induced prostatic growth. Biochem. J.
117, 17~31.
- 38) Russell, D. H. and Taylor, R. L. (1971): Polyamine synthesis
and accumulation in the castrated rat uterus after estradiol-17 β
stimulation. Endocrinology 88, 1397~1403.
- 39) Kato, Y., Inoue, H., Gohda, E., Tamada, F. and Takeda, Y. (1976):
Effect of DL- α -hydrazino- δ -aminovaleric acid, an inhibitor of
ornithine decarboxylase, on polyamine metabolism and growth of mouse
sarcoma-180. Gann 67, (in press).
- 40) Fillingame, R. H. and Morris, D. R. (1973): Polyamine accumulation
during lymphocyte transformation and its relation to the synthesis,
processing, and accumulation of ribonucleic acid. Biochemistry
12, 4479~4487.
- 41) Heby, O., Marton, L. J., Zardi, L., Russell, D. H. and Baserga, R.
(1975): Changes in polyamine metabolism in W138 cells stimulated
to proliferate. Exp. Cell Res. 90, 8~14.
- 42) Williams-Ashman, H. G., Coppoc, G. L. and Weber, G. (1972);
Imbalance in ornithine metabolism in hepatomas of different
growth rates as expressed in formation of putrescine, spermidine,
and spermine. Cancer Res. 32, 1924~1932.

<脚注>

著者の所属

大阪大学歯学部生化学講座

(主任 竹田義朗教授)

図の説明

図2. EPP塗布後の皮膚DNA合成能の変動

EPPは $15\mu\text{mol}$ /マウスと塗布した。
 屠殺20分前に〔メチル- ^3H]チミジン
 (20 μCi /マウス)を皮下注射し、
 DNAへのとりこみと測定した。数値
 は4~13匹のマウスより得た結果の
 平均値 \pm 標準誤差。

図3. EPP塗布後の表皮の非角化層の厚さ、
 有核細胞層数ならびに基底細胞の分
 裂指数の変動。

EPPは $15\mu\text{mol}$ /マウスと塗布した。
 細胞分裂指数を調べた際にはコルヒチン
 (5 mg /kg体重)を屠殺1時間前に腹
 腔内注射した。数値は4~10匹のマ
 ウスから得た値の平均値 \pm 標準誤差。

○—○ : 細胞分裂指数

●—● : 有核細胞層数

□---□ : 非角化層の厚さ

図4、EPP塗布量と皮膚オルニチン脱炭酸酵素活性との関係、

種々の量のEPPを塗布し、8時間後の酵素活性を測定した。数値は3~8匹のマウスから得た値の平均値±標準誤差。

図5、EPP塗布後のオルニチンならびにS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素活性の変動、

EPPは $15\mu\text{mol}$ /マウス塗布した。数値は4~9匹のマウスから得られた結果の平均値±標準誤差。

○—○：オルニチン脱炭酸酵素

●—●：S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素

図6、EPP塗布後の皮膚ポリアミンレベルの変動、

EPPは $15\mu\text{mol}$ /マウスを塗布した。

数値は8~30匹のマウスより得た結果の平均値±標準誤差。

○—○ : プロレツシン

●—● : スペルミジン

□---□ : スペルミン

図7. EPPによるマウス表皮増殖に及ぼす
DL-HAVAの影響。

マウスはEPP ($15 \mu\text{mol}/\text{マウス}$) 塗布
36時間後に屠殺した。DL-HAVA
($0.4 \text{mmol}/\text{kg}$ 体重) はEPP塗布4時
間後に腹腔内注射した。プロレツシン
($0.5 \text{mmol}/\text{kg}$ 体重) はDL-HAVA投
与30分後と4時間後に腹腔内注射し
た。

A. アセトン塗布 (対照)。

表皮は薄く、1~2層の有核細胞と薄
い角化層がみられる。(X200)

B. EPP塗布。

表皮は著明に肥厚し、顆粒層、錯角化
および核分裂像がみられる。(X200)

C. EPP塗布後DL-HAVAを投与。

B. にみられたような組織学的変化は

認められず、A. に近い組織像を示す
(X200)

D. EPPおよびDL-HAVAで処置した
のちフトレッピンを投与。

B. と同様な著明な表皮の肥厚がみられ、
顆粒層、錯角化および核分裂像も
みられた。(X200)

表の説明

表1. スペルミジンよりのプロレツシン生成に及ぼすEPPの影響

マウスはEPP ($15 \mu\text{mol}/\text{マウス}$) 塗布6時間後に屠殺した。〔テトラメチレン ^{14}C 〕スペルミジンはEPP塗布1時間前に $1 \mu\text{Ci}/\text{マウス}$ を皮下注射した。右端のプロレツシン生成量はスペルミジンの放射能比活性とプロレツシン中の放射能より算出した。数値は6匹のマウスから得た結果の平均値 \pm 標準誤差

表2. EPPによる皮膚ホリアミンレベルの変動に及ぼすDL-HAVAの影響

マウスはEPP ($15 \mu\text{mol}/\text{マウス}$) 塗布8時間後に屠殺した。DL-HAVA ($0.4 \text{ mmol}/\text{Kg}$ 体重) はEPP塗布4時間後に腹腔内注射した。プロレツシン ($0.5 \text{ mmol}/\text{Kg}$ 体重) は屠殺1時間前に腹腔内注射した。数値は平均値 \pm 標準

準誤差.

表3. EPPによる皮膚DNA合成能の上昇に及ぼすDL-HA VAの影響

マウスはEPP ($15 \mu\text{mol}/\text{マウス}$) 塗布20時間後に屠殺した。DL-HA VA ($0.4 \text{ mmol}/\text{kg}$ 体重) はEPP塗布4時間後に腹腔内注射した。7-トレッシン、カタベリンあるいは1,7-ジアミノヘプタンは、DL-HA VA投与30分後および4時間後に $0.5 \text{ mmol}/\text{kg}$ 体重を腹腔内注射した。その他の実験条件は、実験方法に記載した *in vitro* の方法に従った。数値は平均値±標準誤差。

表4. EPP塗布による表皮の基底細胞の分裂指数、有核細胞層数ならびに非角化層の厚さの増加に及ぼすDL-HA VAの影響。

マウスはEPP ($15 \mu\text{mol}/\text{マウス}$) 塗布36時間後に屠殺した。DL-HA V

A (0.4 mmol/kg 体重) は EPP 塗布 4 時間後に腹腔内注射した。7 α -トロンシンあるいはカタベリンは、DL-HAV A 投与 30 分後および 4 時間後に 0.5 mmol/kg 体重を腹腔内注射した。細胞分裂指数を調べる際には、コルヒチン (5 mg/kg 体重) を屠殺 4 時間前に腹腔内注射した。数値は 4~8 匹のマウスから得た結果の平均値 \pm 標準誤差。

図 1

動物組織におけるポリアミン合成経路

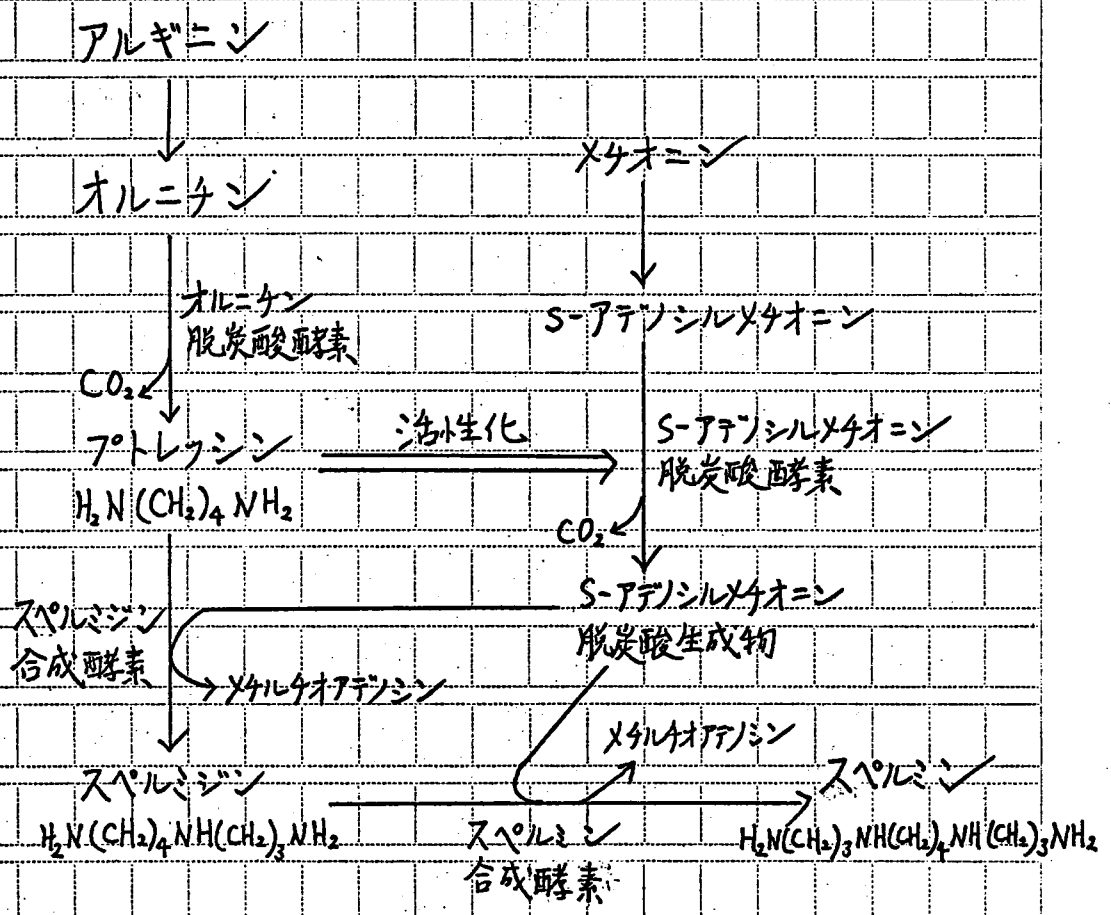


図 2

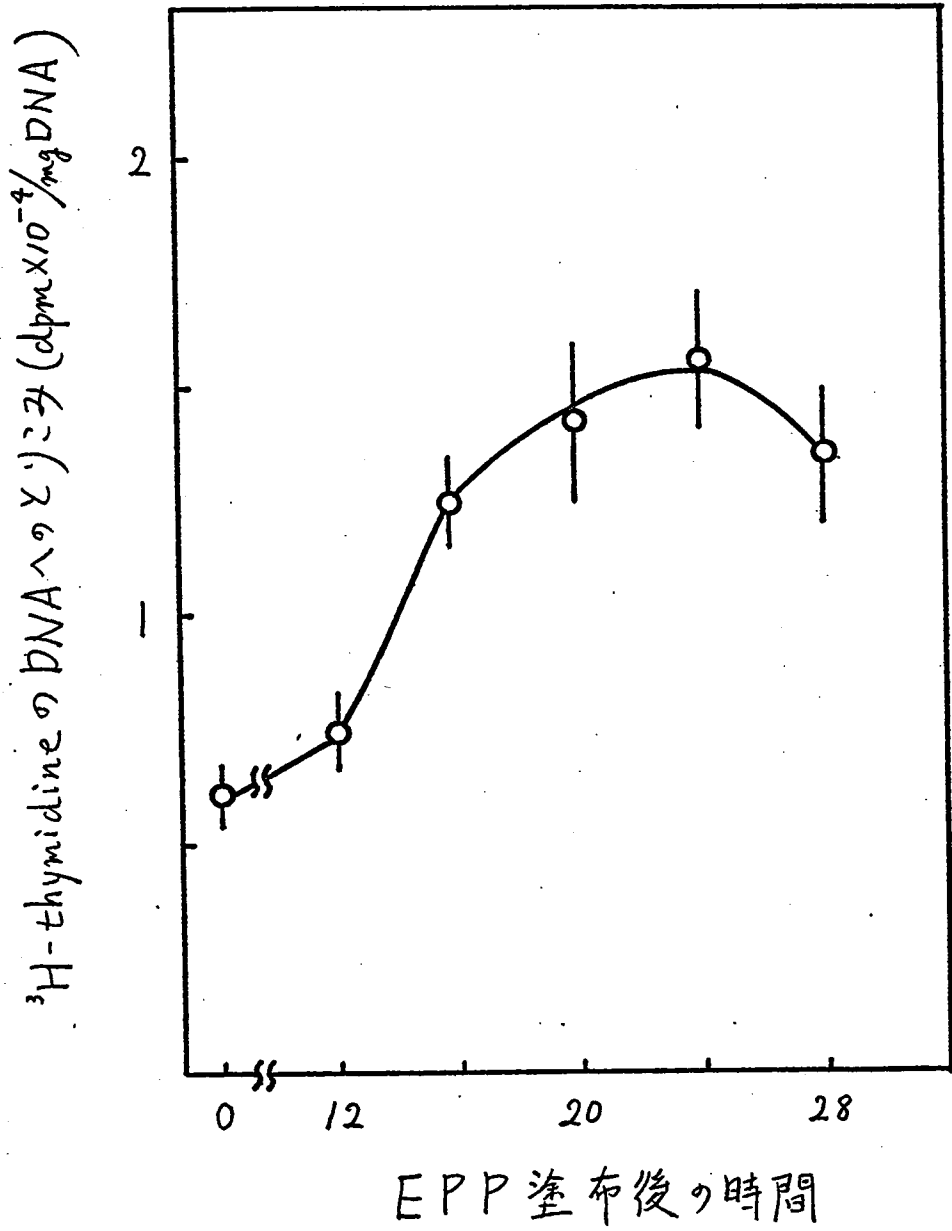


図 3

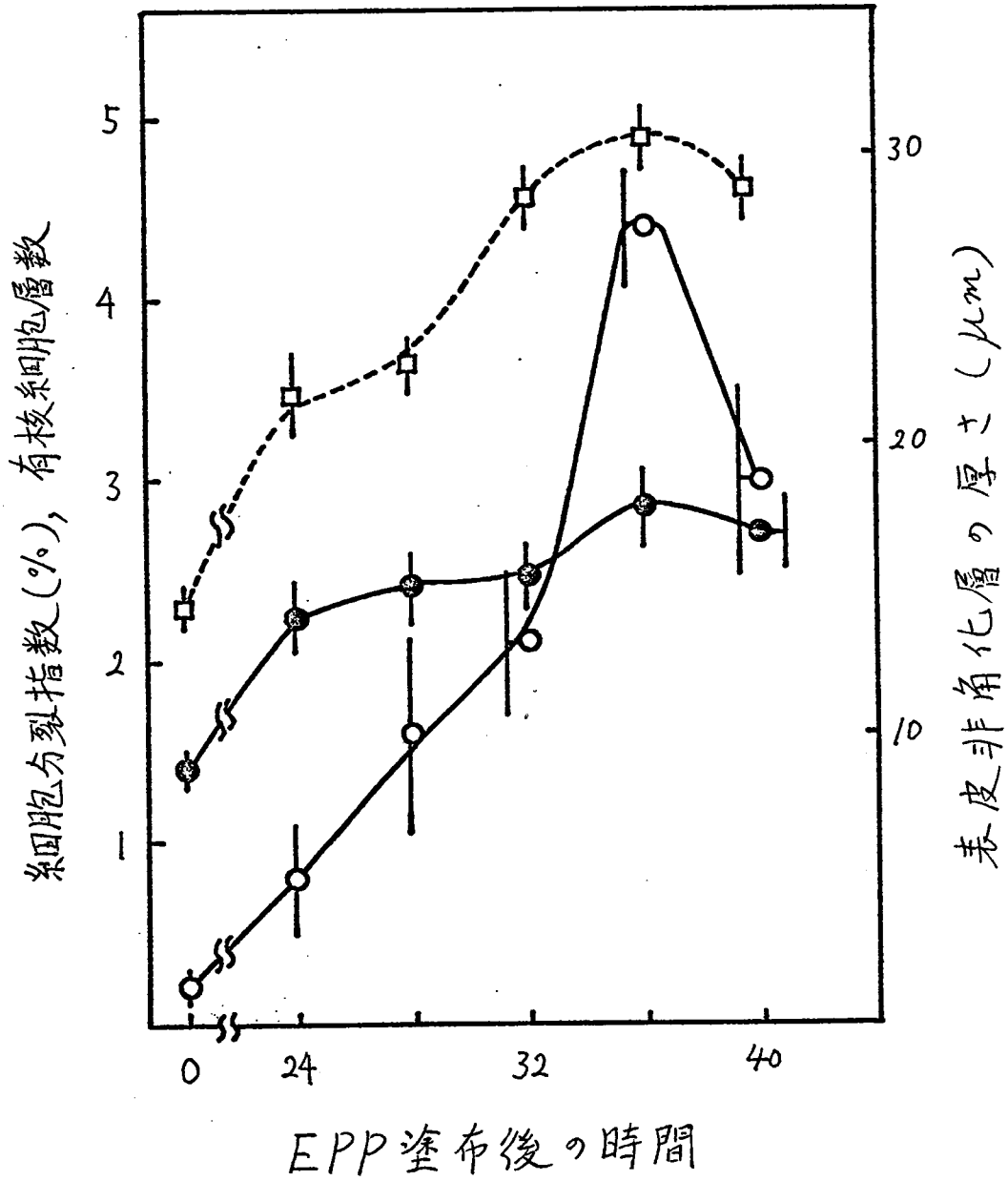


図 4

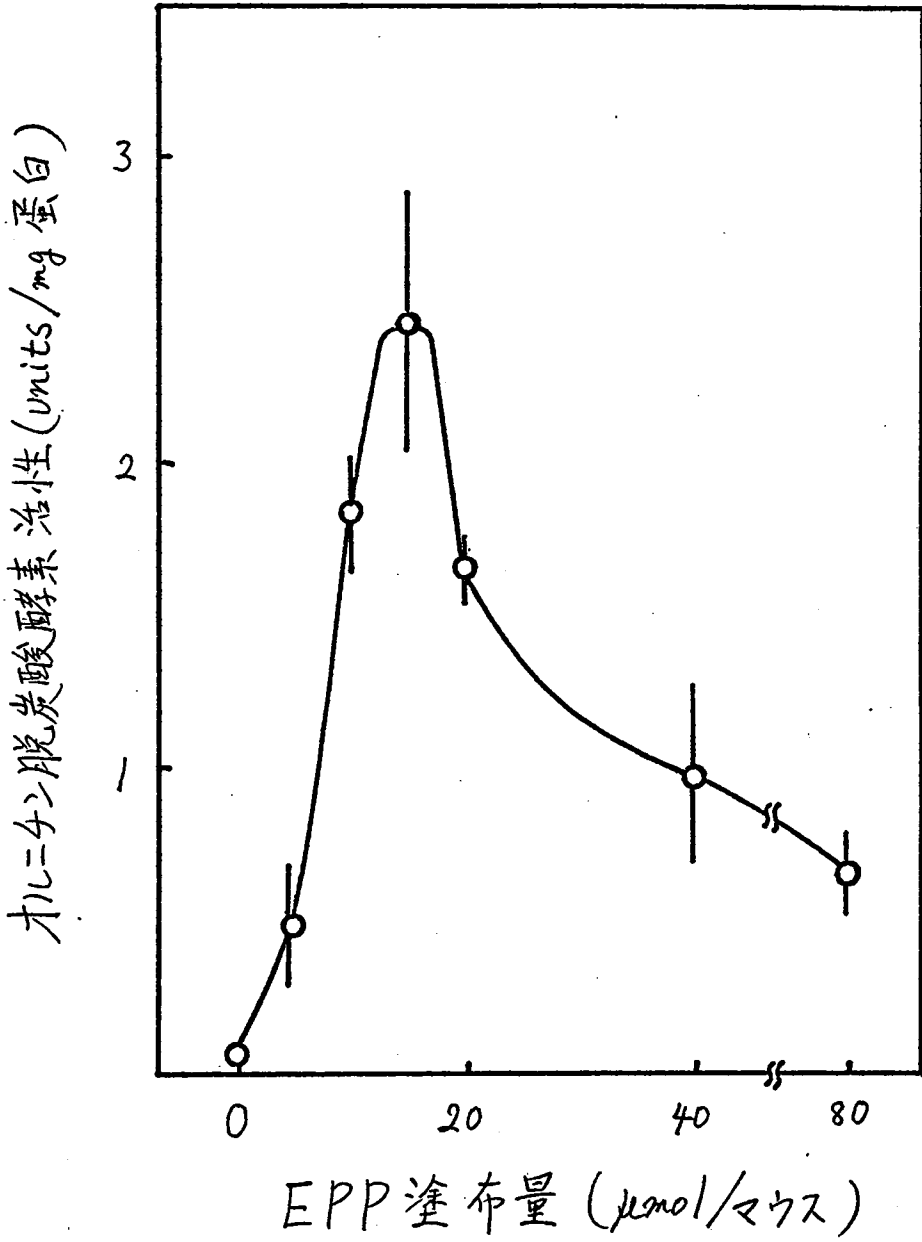


図 5.

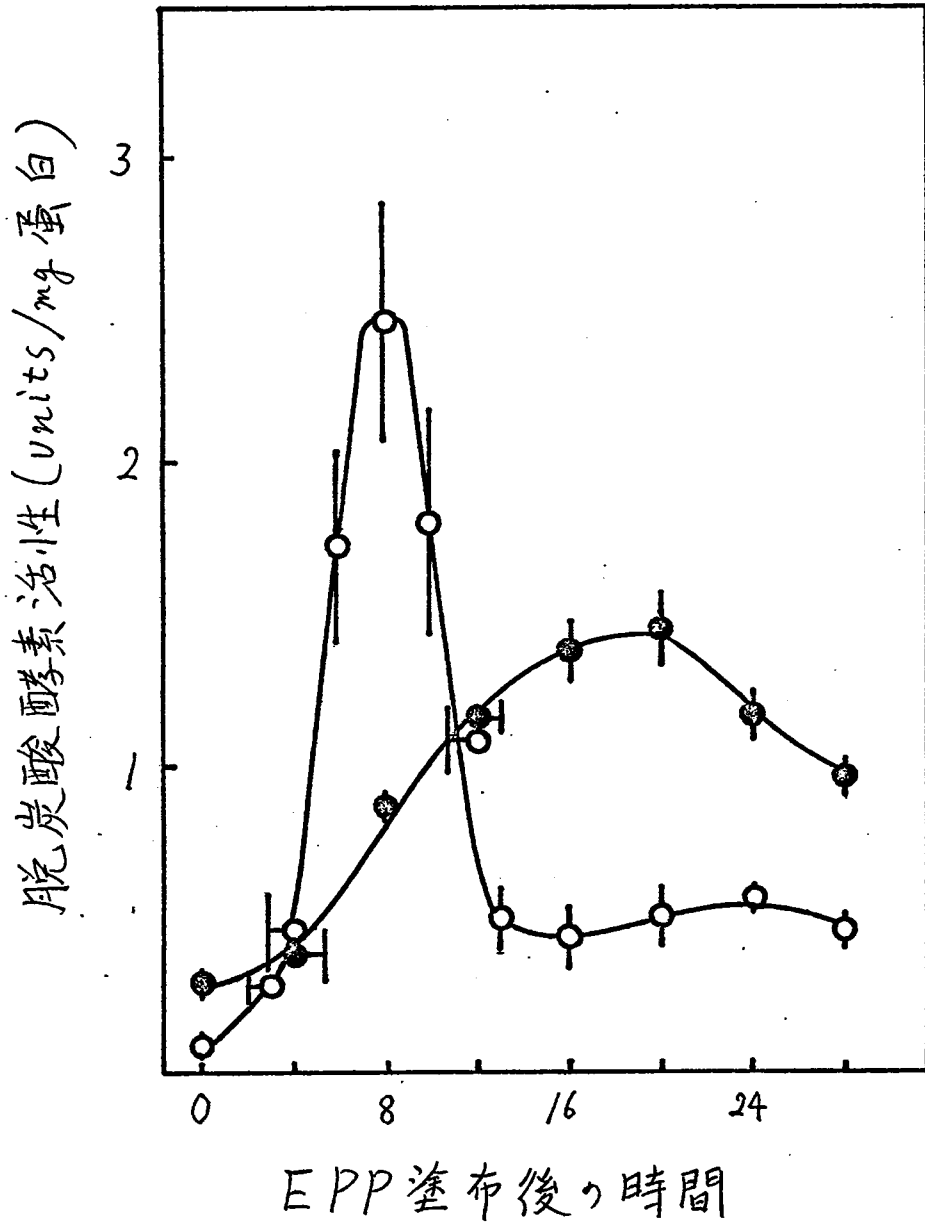


図 6.

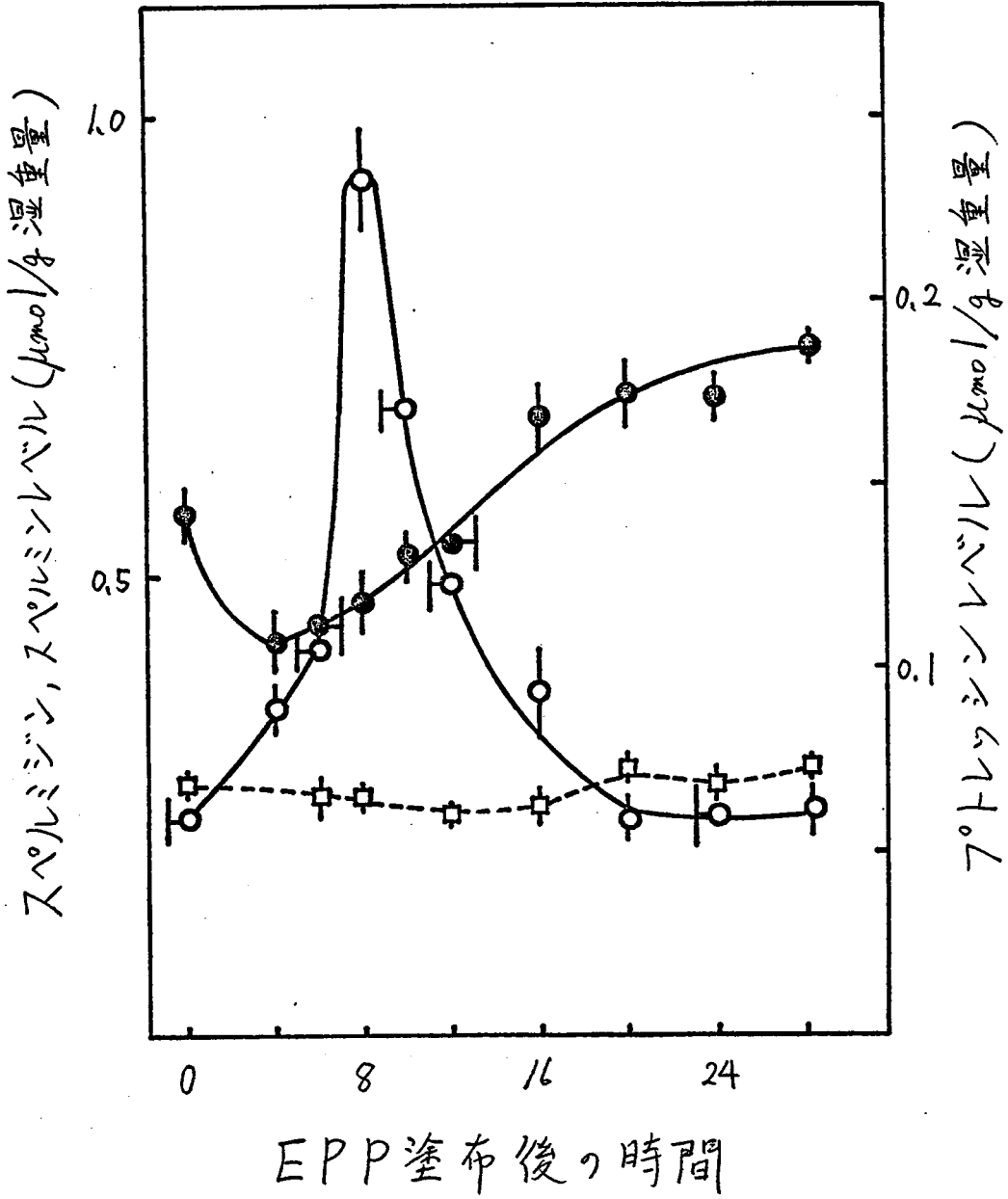


表 1

処 置	ホリアミンレベル(nmol/g湿重量)		スペルミジンの比活性 dpm/nmol	アトレッシン生成	
	アトレッシン	スペルミジン		dpm/g湿重量	nmol/g湿重量
アセトン	60 ± 7	550 ± 23	115 ± 11	1486 ± 139	11.6 ± 1.4
EPP	101 ± 7	444 ± 19	109 ± 10	4270 ± 711	38.2 ± 2.9

表 2

処 置	使用マウス数	プロレツシン		スベルミジン	
		nmol/g 湿重量	%	nmol/g 湿重量	%
アセトン	19	59 ± 6	100	561 ± 23	100
EPP	17	233 ± 14	395	473 ± 31	84
EPP+DL-HAVA	10	129 ± 8	219	442 ± 16	79
EPP+DL-HAVA+ プロレツシン	8	211 ± 3	358	554 ± 31	99

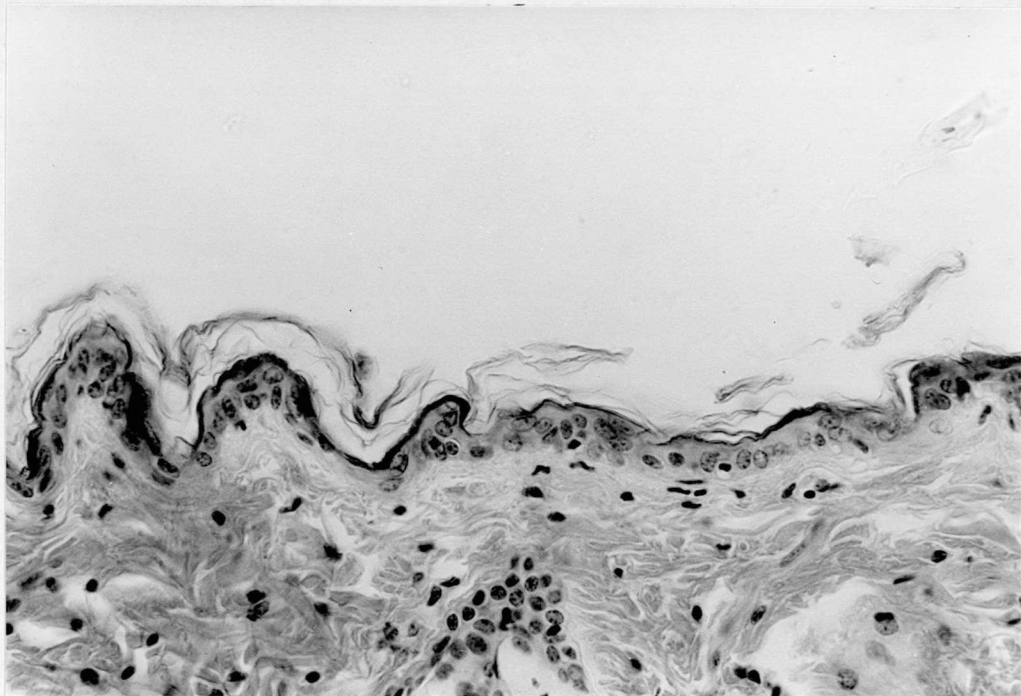
表 3

処 置	使用マウス数	DNA 合成	
		dpmX10 ⁻⁴ /mg DNA	%
アセトン	4	3.67 ± 0.16	100
EPP	14	6.29 ± 0.34	171
EPP+ フトレツシン	4	6.52 ± 0.67	178
EPP+DL-HAVA	10	3.98 ± 0.17	108
EPP+DL-HAVA+ フトレツシン	7	6.64 ± 0.28	181
EPP+DL-HAVA+ カダベリン	4	3.82 ± 0.27	104
EPP+DL-HAVA + 1,7-ジアミノヘプタン	3	3.99 ± 0.20	109

表 4

処 置	細胞分裂指数 (%)	有核細胞層数	非角化層の厚さ (μm)
アセトン	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.1	14.4 ± 0.8
EPP	11.2 ± 1.1	2.8 ± 0.1	31.6 ± 0.8
EPP+ フォトレッシン	11.5 ± 0.8	2.7 ± 0.1	27.9 ± 0.4
EPP+DL-HAVA	3.2 ± 0.6	1.4 ± 0.1	13.4 ± 1.5
EPP+DL-HAVA + フォトレッシン	11.8 ± 1.6	2.7 ± 0.2	28.9 ± 1.3
EPP+DL-HAVA + カダベリン	4.2 ± 0.4	1.5 ± 0.1	16.6 ± 2.0

7-A



7-B

