



Title	ラット歯髄の培養線維芽細胞におけるブラジキニンおよびその分解産物によるエンケファリン産生に關与するカテプシンBの活性化機序
Author(s)	朱, 伯範
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38062
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	朱 伯 範
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 10687 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学 位 論 文 名	ラット歯髓の培養線維芽細胞におけるブラジキニンおよびその分解産物 によるエンケファリン産生に関与するカテプシン B の活性化機序
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 猪 木 令 三 (副査) 教 授 重 永 凱 男 助 教 授 脇 坂 聡 講 師 廣 田 康 晃

論 文 内 容 の 要 旨

Enkephalin (EK) およびその前駆体タンパクが歯髓組織に含まれていることはすでによく知られている。歯髓が侵害刺激を受けた時 EK 含量が増大するが、これは侵害刺激により歯髓組織中に産生遊離される bradykinin (BK) が EK 産生酵素を活性化し、EK 前駆体タンパクを限定分解して EK を産生したためであること、また、この BK の作用は B_1 受容体を介していることが明らかにされている。最近、この EK 産生酵素はライソゾームの cysteine proteinase, cathepsin B (Cat.B) であることが証明された。本研究では、歯髓細胞における BK およびその carboxypeptidase B による分解産物, des-Arg⁹-BK ならびに L-arginine (L-Arg) による EK 産生の機序、とくに Cat.B の活性化に関与する細胞内情報伝達機構について検討した。

1) BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg による EK 産生およびその特徴

ラットの上、下顎両側切歯歯髓より分離された細胞を常法に従い、10% calf serum を含む Eagl's MEM 培地にて培養した。細胞の増殖がコンフルエントに達した後、実験に供した。この細胞は線維芽細胞であることが確認された。細胞内外の EK 含量は EK 抗血清を用いて 2 抗体法による RIA にて測定した。1) BK, des-Arg⁹-BK, L-Arg あるいは cysteine を細胞に作用させると、いずれもメジウム中の EK 含量が著明に増加したが、細胞内の EK 含量は変化しなかった。2) des-Arg⁹-BK の EK 産生遊離に対する促進作用は B_1 受容体拮抗剤 des-Arg-[Leu⁵]-BK あるいは cysteine proteinase 阻害剤 E-64 によって有意に抑制された。これらの結果は EK 前駆体タンパクおよび EK 産生酵素が歯髓線維芽細胞に存在し、また、des-Arg⁹-BK の作用は B_1 受容体を介していることおよびこの EK 産生酵素が Cat.B であることを示した。

2) BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg による Cat.B の活性化機序

BK およびその分解産物の培養歯髓線維芽細胞における Cat.B 活性化機序を細胞内情報伝達の観点から種々の阻害剤を用いて検討した。細胞およびメジウム中の Cat.B 活性はその特異的合成基質 Z-Arg-Arg-MCA を用いて蛍光測定した。3) 細胞の Cat.B 活性は BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg によっていずれも著明に増強され、BK あるいは des-Arg⁹-BK による Cat.B 活性増強は des-Arg⁹-[Leu⁵]-BK によっていずれも有意に抑制されたが、L-Arg の作用は kyotorphin (KTP) 受容体の拮抗剤 Leu-Arg によって有意に抑制された。4) 細胞を高分子 G タンパクを不活性化する百日咳毒素 (IAP) で 18 時間処理すると、BK あるいは des-Arg⁹-BK の Cat.B 活性化作用は消失したのに対し、L-Arg の作用は細胞を低分子 G タンパクを不活性化するボツリヌス C₃ 菌体外酵素 (C₃ 酵素) での 18 時間

処理によって消失した。また、この IAP あるいは C_3 酵素で処理された細胞の形態観察により、それぞれ特異的形態変化が見出された。5) BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg の活性化作用は細胞内外の Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM あるいは EGTA によっていずれも著明に抑制された。

これらの結果より、線維芽細胞における BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg の Cat.B 活性化作用はいずれも Ca^{2+} に依存し、また、BK あるいは des-Arg⁹-BK の作用は IAP 感受性 G タンパクとカップリングしている B_1 受容体を介し、L-Arg の作用は KTP 受容体および C_3 酵素感受性 G タンパクを介しているものと考えられた。

次に BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg による Cat.B 活性増強の時間経過を検討した。6) 細胞を BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg で刺激すると、Cat.B 活性はいずれも 1 分以内に著明に増強し、その後この活性は 10 分後まで持続的に増強された。7) 細胞を BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg により 1 分間刺激した後、正常 Hanks 液に置き換えると、Cat.B 活性の増強は置換 1 分以内に減弱したが、その後この活性は徐々に回復し、9 分後まで次第に増強された。これは、BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg の刺激が除かれると細胞応答の初期条件が消失したため、Cat.B の活性が低下するが、細胞に対する刺激を加えないままさらにインキュベーションを延長すると、すでに初期刺激によってある段階まで進行していた細胞応答がそれを基としてさらに進行し、Cat.B を活性化しうるものと考えられた。従って、この初期刺激のみによる Cat.B 活性の持続ないしは増強をコントロールとして各種酵素阻害剤の影響を検討した。8) BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg による 1 分間刺激によって増強された Cat.B の活性は phospholipase C (PLC) 阻害剤 neomycin B によって、いずれも 1 分以内に著明に抑制されたが、protein kinase (PK) C 阻害剤 H-7、 Ca^{2+} /calmodulin 依存性 PK II 阻害剤 W-7 あるいは cAMP-および cGMP 依存性 PK の阻害剤 H-8 によってそれぞれ異なる時点において有意に抑制された。すなわち、BK 刺激の場合ではいずれも置換後 4 分に、des-Arg⁹-BK 刺激の場合では置換後 1 分、4 分あるいは 4 分に、L-Arg 刺激の場合では置換後 4 分、1 分あるいは 2 分に有意な抑制が認められた。9) BK あるいは L-Arg の刺激による増強された活性は NO 生成阻害剤 L-NMMA に置き換えると、それぞれ 4 分あるいは 1 分に有意に抑制されたが、des-Arg⁹-BK 刺激の場合においては変化しなかった。10) 細胞を des-Arg⁹-BK により 1 分間刺激した後、tyrosine kinase (TPK) 阻害剤 genistein に置き換えると、この増強された活性は 1 分以内に有意に抑制され、この抑制は 9 分後に消失した。L-Arg 刺激によることの活性増強は genistein の置換によって 9 分後に有意に抑制された。11) BK あるいは des-Arg⁹-BK によるこの活性増強は phosphatase 阻害剤 β -glycerophosphate (β -GP) での置換によってそれぞれ 4 分あるいは 1 分で有意に抑制されたが、L-Arg 刺激の場合においては β -GP 置換後 1-2 分の間のみその活性はさらに著明に増強された。

これらの結果より、BK, des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg による Cat.B の活性化作用はいずれも PLC の活性化を介し、さらに異なる経路を経て Ser/Thr PK の活性化を来すことによるものと考えられた。また、des-Arg⁹-BK あるいは L-Arg によるこの活性化作用には TPK も関与していると考えられた。さらに BK あるいは des-Arg⁹-BK による Cat.B の活性化においてはリン酸化プロセスだけでなく、脱リン酸化プロセスも関与しているのに対し、L-Arg の作用では主としてリン酸化プロセスが関与していると考えられた。

以上を要約すると、1) EK 前駆体タンパクおよび EK 産生酵素が歯髄線維芽細胞に存在し、また、その EK 産生酵素はライソゾームの cysteine proteinase, Cat.B であることが確かめられた。2) BK と des-Arg⁹-BK による Cat.B の活性化は IAP 感受性 G タンパクとカップリングしている BK の B_1 受容体を通した PLC の活性化を介しているが、L-Arg による場合は一部は KTP 受容体と C_3 酵素感受性 G タンパクを通した PLC の活性化を介していると考えられた。

3) BK の作用における各種キナーゼとホスファターゼの遅い時期における活性化は des-Arg⁹-BK や L-Arg によって早い時期に引き起こされる各種キナーゼとホスファターゼの活性化と内容的によく一致していた。したがって、BK はその受容体に結合した後、ライソゾームのカルボキシペプチターゼ B による分解を受け、des-Arg⁹-BK および L-Arg が産生され、それ以降それらの分解産物の作用がそれぞれ発現することが考えられた。すなわち、BK のカテプシン B 活性化作用は B_2 受容体のアゴニストとしての独自の作用以外に、その分解産物 des-Arg⁹-BK と L-Arg の作用の組合わさった作用が主であることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

本論文はラット切歯歯髓の培養線維芽細胞を用いて、ブラジキニンおよびその酵素分解産物 des-Arg⁹ - ブラジキニンと L-アルギニンによるエンケファリン産生に関与するカテプシン B の活性化機序を主として細胞内情報伝達の観点から検討したものである。

本論文において、歯髓線維芽細胞はエンケファリンおよびエンケファリン前駆体タンパクを含むことが新規に確かめられ、そのエンケファリンはブラジキニン、des-Arg⁹ - ブラジキニン及び L-アルギニンによって細胞を刺激したとき、カテプシン B が活性化されて産生されることが見出された。そのカテプシン B の活性化の機序はそれぞれの受容体からそれ以降の一連のリン酸化酵素の活性化に至るまでそれぞれの異なる経路を経ることを明かにし、ブラジキニンのカテプシン B 活性化作用は des-Arg⁹ - ブラジキニン及び L-アルギニンの組合わさった作用であると結論した。

これらの研究成果は歯髓線維芽細胞においてブラジキニンおよびその分解産物による細胞刺激からカテプシン B 活性化に至る細胞内情報伝達機構において、独創的ならびに新規性に富む知見を加えるものであり、また、歯髓の痛みの内因性制御機構の解明にも重要な知見を与えるものと考えられた。

以上の審査の結果から、本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認められる。