



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関与するカテプシン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関するカテプシン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 脇坂聰 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髄組織に含まれていることはすでによく知られている。歯髄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髄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、歯髄細胞における 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、下顎両側切歯歯髄より分離された細胞を常法に従い、10% calf serum を含む Eagle'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-[Leu⁹]-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 産生酵素が歯髄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髄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-[Leu⁸]-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ポツリヌス 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C₃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Ca²⁺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Ca²⁺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B₁受容体を介し、L-Argの作用はKTP受容体およびC₃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, Ca²⁺/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B₁受容体を通じた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C₃酵素感受性Gタンパクを通じた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ダーゼ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B₂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の作用の組合せられ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髄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、歯髄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髄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、歯髄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。