Ca⁺⁺-dependency of Bradykinin-stimulated Enkephalin Production in Fibroblasts of the Tooth Pulp

Teruo Kudo, Bo-Fan Zhu and Reizo Inoki

*Department of Pharmacology, Osaka University Faculty of Dentistry,
Suita, Japan*

(Received 26 April 1991)

Abstract

A possible relationship between enkephalin (EK) production and cathepsin B activity in fibroblasts of the rat dental pulp, which are induced by bradykinin (BK) and its cleavage products, des-Arg⁹-BK and arginine (Arg), was examined. The results showed that EK production induced by BK, des-Arg⁹-BK and Arg was closely related to enhancement of cathepsin B activity by them. In addition, it was found that cysteine also enhanced EK production and des-Arg⁹-BK-induced EK production was inhibited by E-64, an inhibitor of cysteine proteinases. These findings suggested that cathepsin B was involved in EK production in fibroblasts of the pulp. Furthermore, it was examined whether Ca²⁺ was involved in activation of cathepsin B by BK and its cleavage products. In combination with EGTA or BAPTA-AM, the effects of BK, des-Arg⁹-BK and Arg were reduced, while in treatment with BAY K8644, cathepsin B activity of the cells was increased and its increase was reduced by BAPTA-AM. From these results, it was concluded that the enhancement of cathepsin B activity which was involved in EK production in the fibroblasts was depended on elevation of intracellular calcium ion concentration induced by BK, des-Arg⁹-BK and Arg.

Key Words: enkephalin production, cathepsin B, bradykinin, calcium ion, dental pulp, fibroblasts

---

歯髓線維芽細胞における bradykinin による enkephalin 産生促進のカルシウム依存性

工藤 照夫 朱 伯範 猪木 令三

大阪大学歯学部 薬理学教室

はじめに

歯髄組織細胞が enkephalin (EK) や EK 前駆体タンパクおよび EK 産生酵素を含有し、歯髄が侵害刺激を受けたとき、EKs を産生することはすでによく知られている¹⁻⁵⁾。この EKs 産生は、侵害刺激時に歯髄組織に産生する発痛物質 bradykinin (BK) によって EK 産生酵素が活性化されて EK 前駆体タンパクを限定分解するためであることが示唆され⁶⁻¹⁰⁾、また、その EK 産生酵素が歯髄細胞のライソソーム酵素 cathepsin B であることが証明されている¹¹⁻¹⁸⁾。さらに最近、歯髄組織の線維芽細胞がこのような EK 産生のものであることが明らかにされてきた¹⁶⁾。

本研究ではラット切歯の歯髄線維芽細胞を培養し、これを用いて細胞レベルで BK による EK 産生促進の機序を検討し、BK による EK 産生酵素 cathepsin B の活性化が細胞内 Ca^{2+} に依存することを見いだしたのでここに報告する。

材料および方法

1) 細胞培養：実験動物として Sprague Dawley 系雄性ラット (体重 200g 前後) を用いた。断頭後、上顎および下顎の切歯を剔出し、歯髄を無菌的に分離し細切した後、常法に従い EDTA (0.02%) および trypsin (0.5%) にて処理し細胞を分散させ、直径 35mm のシャーレに細胞数 8×10^5 個になるように streptomycin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) および penicillin ($100 \text{ IU}/\text{ml}$) および calf serum 10% を含む Eagle's MEM 培地に播き、 37°C の 5% CO_2 気流中にて培養した。培地の交換は 2 日毎に行い、9 日後ほぼコンフルエントに達した増殖細胞を実験に供した。

2) 薬物処理：1 群 4~6 枚の培養細胞のシャーレを用いた。細胞の薬物処理は、シャーレ中の培地を吸引除去した後、Hanks 液 (pH7.4) にて 1 回洗滌し、各種薬物を含む Hanks 液 0.8 ml に置き換え、 37°C 、30 分インキュベートした。インキュベーション終了後、メジウムを試験管に移し、細胞層と分けた。シャーレ中の細胞層は蒸留水 0.8 ml を加えた後、凍結処理し、解凍後、細胞層の水溶液を試験管に移した。

これらのメジウムおよび細胞層懸濁液はその cathepsin B 活性の測定に用いられた。EK 含量の測定の場合は、メジウムを試験管に移した後、 $0.1 \text{ N HCl } 2 \text{ ml}$ をシャーレ中の細胞層に加えて凍結し、解凍後、メジウムおよび細胞層に 60% になるように ethyl alcohol を加えてペプチドを抽出し、凍結乾燥後、ラジオイムノアッセイにてそれぞれの EK 含量を測定した。

3) Cathepsin B 活性の測定：cathepsin B 活性はその特異的合成基質 carbobenzoxy-L-arginine-L-arginine-4-methyl-coumaryl-7-amide (Z-Arg-Arg-MCA) の cathepsin B による分解産物 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) の蛍光を励起波長 370 nm 、蛍光波長 440 nm で分光蛍光測定装置 (島津 RF-540) を用いて測定した。すなわち、2) のメジウム $100 \mu\text{l}$ あるいは細胞層懸濁液 $100 \mu\text{l}$ と Z-Arg-Arg-MCA ($100 \mu\text{M}$) $100 \mu\text{l}$ をリン酸緩衝液 (pH6.0) 1.6 ml とともに 37°C 、30 分インキュベートし、インキュベーション終了後、反応停止液 ($100 \text{ mM sodium mono-chloroacetate}$, $30 \text{ mM sodium acetate}$, $70 \text{ mM acetic acid}$, pH4.3) 1.8 ml を加えて反応を停止させ、冷却後、蛍光測定した¹⁹⁾。得られた値は AMC p mole/min/dish としてあらわし、数値の有意差検定は Student's t-test あるいは Mann-Whitney's U-test にて行った。

4) EK 含量の測定：メジウムあるいは細胞層懸濁液中の EK 含量の測定には met-EK 抗血清を用いる 2 抗体法によりラジオイムノアッセイし^{3,5)}、met-EK 相当量 p mole/dish としてあらわした。数値の有意差検定は 3) と同様にして行った。

結果および考察

1) BK, des-Arg⁹-BK および Arg の歯髄線維芽細胞における EK 産生促進作用

BK ($10 \mu\text{M}$)、des-Arg⁹-BK ($10 \mu\text{M}$)、あるいは Arg ($10 \mu\text{M}$) をそれぞれ培養歯髄線維芽細胞に作用させた。結果を Table 1 に示す。Table 1 から明らかなように、BK およびその carboxypeptidase B による分解産物 des-Arg⁹-BK ならびに Arg はいずれも細胞

Table 1 Enkephalin production induced by bradykinin, des-Arg⁹-bradykinin and arginine in fibroblasts of the rat dental pulp

	met-EK-like peptides (p mole/dish)	
	content	release
control	0.007±0.001 (3)	0.104±0.02 (3)
BK 10μM	0.007±0.001 (4)	0.46 ±0.05 (4) **
des-Arg ⁹ -BK 10μM	0.04 ±0.001 (4)	0.58 ±0.07 (4) **
Arg 10μM	0.009±0.001 (4)	0.24 ±0.04 (4) *

Values are the mean ± SEM. Number in parentheses is that of samples. *p <0.05 and **p <0.01, compared with the corresponding control. Cultured fibroblasts were incubated with bradykinin (BK), des-Arg⁹-BK and arginine (Arg), respectively, in Hanks solution (pH7.4) at 37°C for 30 min. After incubation, medium and cells were separated. The cells were treated with 0.1N HCl and frozen, followed by extraction of peptides with 60% ethanol. After lyophilization, the dry materials were radioimmunoassayed by a double antibody method using antiserum of met-enkephalin (met-EK).

Table 2 Enkephalin production induced by cysteine and trypsin in fibroblasts of the rat dental pulp

	met-EK-like peptides (p mole/dish)	
	content	release
control	0.005±0.001 (4)	0.6±0.1 (4)
cysteine 10μM	0.02 ±0.008 (4)	11.3±1.2 (4) *
trypsin 25μg/ml	0.03 ±0.003 (4)	36.4±0.7 (4) *

Values are the mean ± SEM. Number in parentheses is that of samples. *p <0.05, compared with the control. Cultured fibroblasts were incubated with cysteine or TPCK-treated bovine pancreatic trypsin in Hanks solution (pH7.4) at 37°C for 30 min. After incubation, medium and cells were separated. The cells were treated with 0.1N HCl and frozen, followed by extraction of peptides with 60% ethanol. After lyophilization, the dry materials were radioimmunoassayed by a double antibody method using antiserum of met-enkephalin (met-EK).

外のメジウム中の EK 含量を著明に増加させたが、細胞内の EK 含量はほとんど変化させなかった。後述の cathepsin B 活性の増強態度から考えて、これらの結果は細胞内で産生された EK が細胞外に放出、遊離されたものと考えられた。

Table 3 Inhibition of des-Arg⁹-bradykinin-induced production of enkephalin by E-64 and des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin in fibroblasts of the rat dental pulp

	met-EK-like peptides (p mole/dish)	
	none	des-Arg ⁹ -BK 10μM
content		
control	0.005±0.001 (4)	0.04 ±0.008 (4)
E-64 10μM	0.02 ±0.003 (4)	0.02 ±0.001 (4)
des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK 10μM	0.02 ±0.002 (4)	0.036±0.003 (4)
release		
control	0.6 ±0.1 (4)	3.5±0.9 (4) **
E-64 10μM	0.4±0.04 (4)	0.2±0.02 (4) *
des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK 10μM	0.65±0.08 (4)	0.7±0.05 (4) *

Values are the mean ± SEM. Number in parentheses is that of samples. **p <0.01, compared with "none". *p <0.05, compared with the corresponding "control". Cultured fibroblasts were incubated with des-Arg⁹-BK and E-64 or des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK in Hanks solution (pH7.4) at 37°C for 30min. Further procedures were as described in Table 1.

2) Cysteine および trypsin の歯髄線維芽細胞における EK 産生促進作用

Cathepsin B の活性化剤 cysteine (Cys) (10μM)

あるいは EK 前駆体タンパクを限定分解して EK を産生する TPCK 処理した trypsin (25μg/ml) を歯髄線維芽細胞に作用させると、Table 2 に示すように、細胞外のメジウム中に遊離した EK 含量は著明に増加したが、細胞内の EK 含量は有意な増加を示さなかった。これらの結果は serine proteinase である trypsin と同様、cysteine proteinase の cathepsin B が細胞内の EK 前駆体タンパクから EK を産生することを示している。

3) des-Arg⁹-BK の歯髄線維芽細胞における EK 産生促進作用に対する E-64 および des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK の抑制

1) において示した des-Arg⁹-BK の EK 産生促進作用は、Table 3 に示すように、cysteine proteinase の阻害剤 E-64 (10μM) によって著明に抑制され、

Table 4 Influences of EGTA or BAPTA-AM on enhancement of cathepsin B activity in the fibroblasts induced by BK, des-Arg⁹-BK and Arg

	activity of cathepsin B in the fibroblasts (AMC p mole/min/dish)			
	none	BK 10 μ M	des-Arg ⁹ -BK 10 μ M	Arg 10 μ M
control	19.1 $\pm$ 0.72 (6)	24.8 $\pm$ 3.07 (6) **	30.8 $\pm$ 0.81 (6) **	28.5 $\pm$ 3.9 (6) **
EGTA 2mM	20.9 $\pm$ 0.93 (6)	17.2 $\pm$ 1.5 (4) **	21.3 $\pm$ 0.49 (4) **	19.6 $\pm$ 1.4 (5) **
BAPTA-AM 10 μ M	17.5 $\pm$ 0.85 (6)	19.4 $\pm$ 0.57 (6) *	15.7 $\pm$ 1.1 (6) **	16.9 $\pm$ 2.5 (6) **

Values are the mean $\pm$ SEM. Number in parentheses is that of samples. **p <0.01, compared with "none" in the control. *p <0.05 and **p <0.01, compared with the corresponding control. Cultured fibroblasts were incubated with BK, des-Arg⁹-BK and Arg, respectively, in the presence or absence of EGTA or BAPTA-AM in Hanks solution (pH7.4) at 37°C for 30 min. After incubation, the cells and medium were separated. The cells in dish were treated with water and frozen. After defrosting, the cell suspensions were subjected to determine activity of cathepsin B as described in "Materials and Method". Cathepsin B activity of the medium were also determined, but not shown in this table as the activities were not changed in all experimental group.

BK 受容体の B₁-antagonist である des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (10 μ M) によってそれぞれ有意に抑制された。これらの結果は des-Arg⁹-BK の作用が BK の B₁ 受容体を介していることを示唆し、先に報告した¹⁷⁾ ように、BK によって活性化される EK の産生酵素が cysteine proteinase の cathepsin B であることを示している。

4) BK, des-Arg⁹-BK および Arg の歯髄線維芽細胞における cathepsin B 活性増強作用

1)と同様に、BK (10 μ M), des-Arg⁹-BK (10 μ M), あるいは Arg (10 μ M) をそれぞれ培養歯髄線維芽細胞に作用させ、細胞の cathepsin B 活性に及ぼす影響を検討した。結果を **Table 4** に示す。Table 4 から明らかのように、BK, des-Arg⁹-BK および Arg はいずれも線維芽細胞内においてその cathepsin B 活性を著明に増加させたが、メジウム中のそれ (表中に示していない) はまったく変化させなかった。これらの結果は 1) において述べた結果とまったく逆であり、EK 産生が細胞内で起こることを示している。また、細胞における cathepsin B 活性増強作用の強さは des-Arg⁹-BK がもっとも強く、次に Arg, BK の順であった。

5) BK, des-Arg⁹-BK および Arg の歯髄線維芽細胞における cathepsin B 活性増強作用に対する EGTA あるいは BAPTA-AM の影響

歯髄線維芽細胞を細胞外液 Ca²⁺ のキレート剤

Table 5 Enhancement of cathepsin B activity in the fibroblasts induced by BAY K8644 and its inhibition by BAPTA-AM

	activity of cathepsin B (AMC p mole/min/dish)	
	none	BAY K8644 10 μ M
control	19.1 $\pm$ 0.72 (6)	23.4 $\pm$ 0.6 (6) **
BAPTA-AM 10 μ M	17.5 $\pm$ 0.85 (6)	11.2 $\pm$ 0.77 (6) **

Values are the mean $\pm$ SEM. Number in parentheses is that of samples. **p <0.01, compared with "none" in the control. **p <0.01, compared with the corresponding control. Details were as described in Table 4.

EGTA (2mM) あるいは細胞内 Ca²⁺ キレート剤 BAPTA-AM (10 μ M) で処理して BK (10 μ M), des-Arg⁹-BK (10 μ M) あるいは Arg (10 μ M) の線維芽細胞内における cathepsin B 活性増強作用が Ca²⁺ に依存するかどうかを検討した。Table 4 に示すように、EGTA および BAPTA-AM で処理することによって BK, des-Arg⁹-BK および Arg の細胞内 cathepsin B 活性増強作用はいずれも著明に減弱し、細胞内外の Ca²⁺ に依存していることが明らかであった。このことは先に報告した BK, des-Arg⁹-BK および Arg の歯髄における EK 産生促進作用が Ca²⁺ に依存するという結果とよく一致していた¹²⁾。

6) BAY K8644 の歯髄線維芽細胞における cathepsin B 活性増強作用

5)の結果から BK, des-Arg⁹-BK および Arg の線

維芽細胞 cathepsin B 活性増強作用が calcium ion に依存することが示されたので, calcium agonist である BAY K8644 (10 μ M) を歯髄線維芽細胞に作用させ, 細胞の cathepsin B 活性に対する影響を検討した. 結果を Table 5 に示す. Table 5 から明らかなように, BAY K8644 で処理することによって細胞の cathepsin B 活性は有意に増強した. また, この BAY K8644 の効果は BAPTA-AM と併用することにより著明に抑制された. これらの結果は部分的に細胞外液中の Ca²⁺ が細胞内に流入することにより細胞の cathepsin B 活性が増強することを意味するものと考えられた.

本研究は文部省科学研究費補助金 (一般研究 B No. 01480432) の助成によって行われた.

文 献

- 1) Kudo, T., Yonehara, N., Hayashi, T., Inoki, R., Nishimoto, T. and Akai, M., Opioid peptide in the dog canine pulp? In: Takagi, H. and Simon, E. J. (Eds.), *Advances in Endogenous and Exogenous Opioids*, Kodansha/Elsevier, Tokyo, 1981, pp. 173-175.
- 2) Kudo, T., Nishimoto, T., Inoki, R., Akai, M. and Yonehara, N., Met-enkephalin positive cells in the dog canine pulp, *Acta Histochem. Cytochem.*, **15** (1982) 449.
- 3) Kudo, T., Chang, H.-L., Maeda, S., Uchida, Y., Nakamae, J. and Inoki, R., Changes of the met-enkephalin-like peptide content induced by noxious stimulation in the rat incisor pulp, *Life Sci.*, **33** (sup. I) (1983) 677-680.
- 4) Kudo, T., Maeda, S. and Inoki, R., Opioid peptides in the tooth pulp, *J. Osaka Univ. Dent. Soc.*, **28** (1983) 167-182.
- 5) Kudo, T., Maeda, S., Nakamae, J., Chang, H.-L., Uchida, Y. and Inoki, R., A possible relationship between processing from precursor proteins to opioid peptides and noxious stimulation in the rat incisor pulp, *Life Sci.*, **33** (sup. I) (1983) 681-684.
- 6) Kudo, T., Chang, H.-L., Kuroi, M., Wakisaka, S., Akai, M. and Inoki, R., Influences of bradykinin and substance P on the met-enkephalin-like peptide content in the rat incisor pulp, *Neuropeptides*, **7** (1986) 399-405.
- 7) Kudo, T., Kuroi, M. and Inoki, R., In vitro production and release of opioid peptides in the tooth pulp induced by bradykinin, *Neuropeptides*, **7** (1986) 391-397.
- 8) Inoki, R. and Kudo, T., Enkephalins and bradykinin in dental pulp, *TIPS*, **7** (1986) 275-277.
- 9) Inoki, R., Kudo, T. and Wei, E.-Q., Significance of the production of bradykinin in inflamed dental pulp, In: Tsuchiya, M., Asano, M., Mishima, Y. and Oda, M. (Eds.), *Microcirculation—an update*, vol. 2, Excerpta Medica, Amsterdam, 1987, pp. 111-114.
- 10) Kudo, T., Wei, E.-Q., Zhu, B.-F. and Inoki, R., Involvement of lysosomal enzymes in enkephalin production in dental pulp of the rat, *Dentistry in Japan*, **26** (1989) 41-44.
- 11) Wei, E.-Q., Bian, R.-L., Kudo, T. and Inoki, R., Interaction between bradykinin and enkephalins in rat dental pulp, *Acta Pharmacologica Sinica*, **10** (1989) 500-503.
- 12) Kudo, T., Wei, E.-Q. and Inoki, R., Activation of calcium ion-dependent proteinases by bradykinin in dental pulp of the rat, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **247B** (1989) 627-631.
- 13) Kudo, T., Wei, E.-Q. and Inoki, R., Characteristics of BANA-degrading enzyme in the tooth pulp activated by bradykinin, *Progr. Clin. Biochem. Res.*, **328** (1990) 275-278.
- 14) Kudo, T., Wei, E.-Q. and Inoki, R., Is cathepsin B an enkephalin processing enzyme in the tooth pulp? *Progr. Clin. Biochem. Res.*, **328** (1990) 271-274.
- 15) Kudo, T., Wei, E.-Q. and Inoki, R., Proteases in inflammation. In: Inoki, R., Kudo, T. and Olgart, L. (Eds.), *Dynamic Aspects of Dental Pulp*. Chapman and Hall, London, 1990, pp. 445-470.
- 16) Kudo, T., Wei, E.-Q., Zhu, B.-F. and Inoki, R., Enkephalin production in tooth pulp cells by cathepsin B. In: Van Ree, J. M., Mulder, A. H., Wiegant, V. M. and Van Wilmersma Greidanus (Eds.), *New Leads in Opioid Research*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1990, pp. 27-29.
- 17) Wei, E.-Q., Kudo, T. and Inoki, R., Pharmacological and biochemical study on the mechanism of enkephalin production in rat dental pulp, *J. Osaka Univ. Dent. Sch.*, **30** (1990) 8-30.
- 18) Wei, E.-Q., Kudo, T. and Inoki, R., Subcellular distribution of enkephalin precursor proteins in rat dental pulp and the usefulness as substrate

- for enkephalin-producing enzymes, *Life Sci.*, **48** (1991) 667-674.
- 19) Barrett, A. J. and Kirschke, H., Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L, *Methods Enzymol.*, **80** (1981) 535-561.

Address for correspondence : Teruo Kudo, PhD.,
Department of Pharmacology, Osaka University Faculty
of Dentistry, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan.
Telephone : 06-876-5711