ヒト歯肉線維芽細胞のプロスタグランジンに 対する応答に関する研究

—プロスタグランジン E_2 の DNA 合成への作用機序について—

新井 英雄

岡山大学歯学部歯科保存学第2講座

(指導：村山洋二教授)

(平成2年1月9日受付)

The Response of Human Gingival Fibroblasts to Prostaglandins — Mechanism of the Effect of Prostaglandin E_2 on DNA Synthesis —

Hideo ARAI

Department of Periodontology and Endodontology, Okayama University Dental School

2-5-1, Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(Director : Professor Yoji MURAYAMA)

The effects of 13 kinds of prostaglandins (PGs) on the activities of a human gingival fibroblast (ATCC CRL 1292) were widely examined. PGA_1 and PGD_2 caused deformation in morphology of the fibroblast, and all PGs tested showed inhibitory effects on proliferation, DNA synthesis, collagen synthesis, and noncollagenous protein synthesis in the fibroblast under the conditions used in this study, and many PGs tested increased the intracellular cyclic AMP (cAMP) level. Therefore, the mechanism by which PGE_2 inhibits DNA synthesis was examined in view of the increased cAMP level. The inhibitory effect

of PGE_2 on DNA synthesis was not enhanced when the increase of intracellular cAMP level by PGE_2 was accelerated by a cAMP-phosphodiesterase inhibitor (IBMX). Further the inhibitory effect of PGE_2 on DNA synthesis was not weakened by inhibiting cAMP-dependent protein kinase (A-kinase).

It is suggested from the results that the inhibitory effect of PGE_2 on DNA synthesis in the fibroblast is not mediated through the cAMP—A-kinase system but probably through other cellular signalling systems.

Key words : Gingival fibroblast, Prostaglandin, Cyclic AMP, DNA synthesis, Cell proliferation

要旨 : ヒト正常歯肉由来線維芽細胞 (ATCC CRL 1292) を用いて, その機能に及ぼす 13 種のプロスタグランジン (PG) の作用を広く調べた。本研究の実験条件では, PGA_1 および PGD_2 は供試線維芽細胞の形態を変化させ, すべての被験 PG は, 供試線維芽細胞の増殖, DNA 合成, コラーゲン合成, および非コラーゲン蛋白合成を抑制する作用を有した。また, 多くの被験 PG は, 細胞内サイクリック AMP (cAMP) レベルを上昇させる作用をも有した。そこで, 供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用を調べる手がかりを, ホルモン作用の第 2 情報伝達物質の 1 つである cAMP の代謝に求めて, PGE_2 による作用機序を調べた。

PGE_2 による細胞内 cAMP レベルの上昇を cAMP 分解酵素阻害剤で増強しても, PGE_2 による供試線維芽細胞の

本論文の要旨は, 第 86 回春季日本歯科保存学会 (1987 年 5 月 23 日) および第 89 回秋季日本歯科保存学会 (1989 年 11 月 12 日) において発表した。

DNA 合成抑制作用は強くならなかった。さらに、プロテインキナーゼ阻害剤で cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素 (A キナーゼ) を阻害しても、PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用は弱くならなかった。このことから、PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用は、cAMP—A キナーゼ系を介さないことが示唆された。

索引用語：歯肉線維芽細胞，プロスタグランジン，サイクリック AMP，DNA 合成，細胞増殖

緒 言

線維芽細胞の増殖ならびに結合組織基質成分の合成などの機能は、プロスタグランジン (PG) の影響を受けることが知られている¹⁻²⁵⁾。しかし、線維芽細胞の機能に対する PG の作用は、その線維芽細胞の由来とする組織が違ふと異なることがある。また、PG に関しても、基本的構造は類似しているものの、わずかな構造の違いがあれば各種細胞に対する PG の作用は著しく異なることが言われている^{26,27)}。したがって、歯周疾患の病態を理解するためには、ヒト歯肉線維芽細胞を用いてその細胞機能に対する各種 PG の作用を詳細に整理する必要がある。ところが、このことに関して、PGE₂ がある正常ヒト歯肉を由来とする線維芽細胞の DNA 合成ならびに蛋白合成を抑制することを報告した Ko らの研究¹⁾があるにとどまり、細胞機能への PG の作用機序にまで言及した研究は皆無である。

PG は細胞膜のレセプターに結合してその情報を細胞内に伝達し、第 2 情報伝達物質を介して種々の細胞機能に作用することが多い^{28,29)}。歯肉以外の線維芽細胞においても、その細胞機能に対する PG の作用は、第 2 情報伝達物質の一つであるサイクリック AMP (cAMP) の代謝から説明された研究が多い²⁻¹⁵⁾。

本研究では、種々の PG のヒト正常歯肉由来線維芽細胞の形態、増殖、DNA 合成、および高分子基質合成に及ぼす影響を広く調べた。そして、その結果見出された PG の細胞機能への作用発現に関する機序を様々な角度から整理することを前提とし、PG の線維芽細胞機能に対する作用に関してよく研究対象となっている PGE₂ の DNA 合成に対する作用の機序を cAMP 代謝の面から調べた。

材料と方法

1. 供試線維芽細胞および培養

線維芽細胞は、American Type Culture Collection から購入したヒト正常歯肉由来の ATCC CRL 1292 (donor は 32 歳男性) を供試した。なお、購入時の細胞は 9 年

らびに 11 代であった。

供試線維芽細胞の調製は清水らの記載³⁰⁾に従って行なった。すなわち、細胞は 56°C で非働化したウシ新生児血清 (NCS; GIBCO, Grand Island, New York, USA) を 5% の割合に含むダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM; Flow Laboratories, Inc., McLean, Virginia, USA) で、5% 炭酸ガス存在下、37°C で培養した。細胞の継代は、細胞層に 0.2% トリプシン液 (阪大微研、吹田) を作用させて細胞を分散した後、NCS を 5% の割合に含む培地で培養することによって行なった。なお、本研究では、元の細胞数を 3 倍に増加させる方法で 5~9 回継代した細胞を用いた。

2. プロスタグランジン、サイクリック AMP 分解酵素阻害剤、およびプロテインキナーゼ阻害剤

PG は、PGA₁, PGA₂, PGB₁, PGB₂, PGF_{1α}, PGI₂・Na, トロンボキサン B₂ (TXB₂; TXA₂ 代謝物), 6-keto-PGF_{1α} (PGI₂ 代謝物) (いずれも Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), PGD₂, PGE₁, PGE₂, PGF_{2α} (いずれも小野薬品工業、大阪から恵与を受けた) および 9α-11α-methanoepoxy-PGF_{2α} (TXA₂ analog, フナコシ薬品、東京) を用いた。なお、各種 PG はエタノールに溶かして用いたが、培地に添加したときのエタノールの最終濃度は 0.5% 以下になるようにした。ただし、6-keto-PGF_{1α} はジメチルスルホキシド (DMSO; 石津製薬、大阪) に溶解して用い、培地に添加したときの DMSO の最終濃度を 0.1% 以下になるように調製した。

cAMP 分解酵素阻害剤は 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma Chemical Co.) を用いた。なお、IBMX は DMSO に溶解し、その IBMX 溶液を IBMX の最終濃度が 50 μM になるように培地に添加して用いた。DMSO の最終濃度は 0.05% である。

プロテインキナーゼ阻害剤は、N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide hydrochloride (HA 1004; 生化学工業、東京) および 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7; 生化学工業) を用いた。プロテインキナーゼ阻害剤は、まず阻害剤を 10 mM になるように蒸留水に溶解し、その溶解液をさらに培地で希釈して適宜使用濃度に調製した。

3. 供試線維芽細胞の機能の検定

1) 細胞形態

供試線維芽細胞の形態に及ぼす PG の影響は、以下に述べる方法で調製した供試線維芽細胞を、各々の被験 PG を最終濃度が $30 \mu\text{M}$ になるように添加した培地で 96 時間まで培養し、24 時間ならびに 96 時間 PG を作用させた細胞の形態変化を位相差顕微鏡下で観察することによって調べた。

すなわち、供試線維芽細胞は、5% NCS 含有 D-MEM を入れた 12 穴プレート (Flow) に 1 穴当たり 5.0×10^4 個ずつ接種し、5% 炭酸ガス存在下、 37°C で 24 時間培養してプレート上に定着させた。そして、細胞形態に及ぼす PG の影響は、各々の被験 PG を最終濃度が $30 \mu\text{M}$ になるように添加した 5% NCS 含有 D-MEM に培地交換して、その 24 時間後に細胞形態を観察する系と、細胞をそのままさらに 24 時間培養し、培地をもう一度、 $30 \mu\text{M}$ の最終濃度になるように PG を添加した同培地と交換して、その 48 時間後に細胞形態を観察する系を用いて調べた。

2) 細胞増殖

供試線維芽細胞の増殖に及ぼす PG の影響は、培養プレート上に定着させた供試線維芽細胞を各々の被験 PG を最終濃度が $30 \mu\text{M}$ になるように添加した 5% NCS 含有 D-MEM で 48 時間および 96 時間培養して、その生細胞数の変化から調べた。すなわち、まず、供試線維芽細胞を細胞形態の項に述べた方法で培養プレート上に定着させた。そして、供試線維芽細胞の増殖に及ぼす PG の影響は、各々の被験 PG を最終濃度が $30 \mu\text{M}$ になるように添加した 5% NCS 含有 D-MEM に培地交換して 48 時間培養した後に培養プレート上の生細胞数を計測する系と、PG を $30 \mu\text{M}$ の最終濃度になるように添加した同じ培地にもう一度培地交換してさらに 48 時間培養した後に培養プレート上の生細胞数を計測する系を用いて調べた。生細胞数の計測は、Bürker-Türk 型血球計算板を用いて位相差顕微鏡下で行なった。なお、細胞の生死の判別は、トリパンブルーを用いた色素排除試験³¹⁾によって行なった。

3) DNA 合成

供試線維芽細胞の DNA 合成量の測定は、 $[\text{H}^3]$ -チミジンの細胞内取り込みを指標とし、Huey らの方法³²⁾に準拠して行なった。

供試線維芽細胞の DNA 合成に及ぼす PG の影響は以下に述べる方法で調べた。まず、供試線維芽細胞を 5% NCS 含有 D-MEM を入れた 48 穴プレート (Coster,

Cambridge, Massachusetts, USA) に 1 穴当たり 3.5×10^4 個ずつ接種し、5% 炭酸ガス存在下、 37°C で細胞が単層を形成するまで培養した。この単層を形成した供試線維芽細胞の周期を可及的に静止期に揃えるため、培地を 0.5% NCS 含有 D-MEM に交換し、さらに 24 時間培養して実験に供した。そこで、培地を 5% NCS 含有 D-MEM に交換し、PG を各々の実験系における使用濃度になるように適宜調製して添加し、細胞を 23 時間培養した。培養終了後、培地を除去し、 $[\text{H}^3]$ -チミジン ($[\text{H}^3]$ -thymidine; specific activity 20.1 Ci/mmol , New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA) を最終濃度が $3 \mu\text{Ci/ml}$ になるように添加した D-MEM で 1 時間のパルスラベルを行なった。パルスラベル終了後、培地を除去し、細胞層を氷冷した Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝塩類溶液 (ダルベッコ PBS (-); 日本製薬, 東京) で 3 回洗浄してから、 0.6 M の水酸化ナトリウムを加えて細胞を溶解した。その細胞溶解液を試験管に回収し 6 M の塩酸で中和した後、 2 mg/ml の濃度のウシ血清アルブミン (BSA; Fraction V, Sigma Chemical Co.) 溶液を加え、その 5% トリクロロ酢酸 (TCA; 石津製薬, 大阪) 不溶画分の放射活性を液体シンチレーションスペクトロメーター (LSC-700; Aloka, 東京) を用いて測定し、DNA 合成量の指標とした。

4) コラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成

供試線維芽細胞のコラーゲン合成量および非コラーゲン蛋白合成量の測定は、清水らの記載³⁰⁾に従って $[\text{H}^3]$ -プロリンのコラーゲン消化性および非消化性蛋白への取り込みを指標として行なった。

供試線維芽細胞のコラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成に及ぼす PG の影響は以下に述べる方法で調べた。まず、供試線維芽細胞を 5% NCS 添加 α 変法イーグル培地 (α -MEM; Flow) を入れた 24 穴プレート (Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) に、1 穴当たり 5.0×10^4 個ずつ接種し、5% 炭酸ガス存在下、 37°C で細胞が単層を形成するまで培養した。単層を形成した供試線維芽細胞の周期を可及的に静止期に揃えるため、培地を 0.5% NCS 含有 α -MEM に交換し、細胞をさらに 24 時間培養して実験に供した。そこで、培地を最終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように PG を添加した 5% NCS 含有 α -MEM に交換して、細胞を 22 時間培養した。培養終了後、培地を除去し、 $[\text{H}^3]$ -プロリン ($[\text{H}^3]$ -proline; specific activity 31.0 Ci/mmol , Amersham International plc., Buckinghamshire, UK) を最終濃度が $10 \mu\text{Ci/ml}$ になるように添加した α -MEM で 2 時間

のラベルを行なった。そして、細胞内のコラーゲン消化性蛋白および非消化性蛋白に取り込まれた ^3H -プロリンの放射活性を、それぞれ液体シンチレーションスペクトロメーターを用いて測定し、それぞれコラーゲン合成量および非コラーゲン蛋白合成量の指標とした。

5) グリコサミノグリカン (GAG) 合成

供試線維芽細胞の GAG 合成量の測定は, Solursh と Meier の方法³³⁾に従って, 細胞培養液と細胞層の N-セチルピリジウムクロライド (CPC; 半井化学, 京都) 沈澱画分への ^3H -グルコサミンあるいは ^{35}S -硫酸基の取り込みの総量を指標として行なった。

供試線維芽細胞の GAG 合成に及ぼす PG の影響は以下の方法で調べた。まず, 供試線維芽細胞を 5% NCS 含有 D-MEM を入れた 24 穴プレート (Falcon) に 1 穴当たり 5.0×10^4 個ずつ接種し, 5% 炭酸ガス存在下, 37°C で細胞が単層を形成するまで培養した。この単層を形成した細胞の周期を可及的に静止期に揃えるため, 培地を 0.5% NCS 含有 D-MEM に交換し, 細胞をさらに 24 時間培養して実験に供した。そこで, ^3H -グルコサミン (D-[6- ^3H]-glucosamine hydrochloride; specific activity 32 Ci/mmol, Amersham) あるいは ^{35}S -硫酸塩 ($\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{O}_4$; specific activity 541.3 mCi/mmol, New England Nuclear) を, 5% NCS 含有 D-MEM に PG と同時に加え, 24 時間培養することによって PG 存在下で GAG の放射性基質を細胞に取り込ませた。なお, 培地に添加した ^3H -グルコサミン, ^{35}S -硫酸塩, および PG の最終濃度は, それぞれ $2 \mu\text{Ci/ml}$, $5 \mu\text{Ci/ml}$, および $10 \mu\text{M}$ である。培養終了後, 培養液と細胞層を 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解したアクチナーゼ E (1,000 チロシン単位/mg; 科研化学, 東京) によって, 50°C で 12 時間消化した。その消化液の CPC 沈澱画分への ^3H -グルコサミンあるいは ^{35}S -硫酸基の取り込みの総量を, それぞれの放射活性を液体シンチレーションスペクトロメーターで測定することによって調べ, GAG 合成量の指標とした。

4. 細胞内 cAMP 代謝

PG による細胞内 cAMP 代謝に及ぼす影響は, 以下に述べるように, 木下の記載³⁴⁾を参考にして細胞内 cAMP レベルの変動を指標として表わした。なお, cAMP レベルの測定はヤマサ cAMP キット (ヤマサ醤油, 千葉) を用いて, ラジオイムノアッセイ法を用いる Honma らの方法³⁵⁾に従って行なった。

まず, 供試線維芽細胞を 5% NCS 含有 D-MEM を入

れた 12 穴プレート (Flow) に 1 穴当たり 8.0×10^4 個ずつ接種し, 5% 炭酸ガス存在下, 37°C で細胞が単層を形成するまで培養した。この単層を形成した細胞の周期を可及的に静止期に揃えるため, 培地を 0.5% NCS 含有 D-MEM に交換し, 細胞を 24 時間培養し, そして, 培地交換による細胞内 cAMP 濃度への影響をなくすため D-MEM に交換してさらに 3 時間培養した後, 実験に供した。そこで, PG を各々の実験系におけ使用濃度になるように適宜調製して培地に添加し, 供試線維芽細胞に PG を作用させた後, 細胞内の cAMP を氷冷した 5% TCA 液で抽出した。次に, 水飽和エーテルを用いてその cAMP 抽出液から TCA を除き, cAMP 測定用試料とした。

5. 蛋白定量

蛋白量は BSA を標準として Lowry らの方法³⁶⁾で測定した。

6. 統計分析

有意差検定は Student-*t* 検定によった。

結 果

1. 細胞形態に及ぼす PG の影響

図 1 は各種 PG ($30 \mu\text{M}$) を歯肉線維芽細胞に作用させてから, 24 時間および 96 時間培養した後の位相差顕微鏡像である。

培養系に PG を含まない対照では, 24 時間後の培養細胞は線維芽細胞特有の紡錘状の形態を呈した。それに対して, PGD₂ を添加した系では培養細胞は伸展が阻害された形態に, そして, PGA₁ を添加した系では球状に近い形態に変化した。しかし, PGA₂, PGB₁, PGB₂, PGE₁, PGE₂, PGF₁ α , PGF₂ α , PGI₂, 6-keto-PGF₁ α , 9 α -11 α -methanoepoxy-PGF₂ α , および TXB₂ を作用させた系では, 細胞は細胞内顆粒が増加する傾向はあるものの, 形態変化としては観察されなかった (図 1-A)。

PGA₁ および PGD₂ を作用させた場合, 96 時間経過すると, ほとんどの細胞が球状化し, 細胞膜の断裂を伴ったものも数多く見られるようになった。しかし, その他の被験 PG を作用させた場合には, 96 時間を経過しても 24 時間経過したときの細胞形態変化と同じ変化としてしか観察されなかった (図 1-B)。

2. 細胞増殖および DNA 合成に及ぼす PG の影響

各種 PG ($30 \mu\text{M}$) の細胞増殖に及ぼす影響を調べた (図 2)。PG を含まない 5% NCS 含有 D-MEM で培養した対照では, 生細胞数は, 培養 48 時間後には約 2 倍

図 1 供試線維芽細胞の形態に及ぼす PG の影響

Cont : 対照, A₁ : PGA₁, A₂ : PGA₂, B₁ : PGB₁, B₂ : PGB₂, D₂ : PGD₂, E₁ : PGE₁, E₂ : PGE₂, F_{1α} : PGF_{1α}, F_{2α} : PGF_{2α}, I₂ : PGI₂·Na, 6-keto-F_{1α} : 6-keto-PGF_{1α}, TXA₂ analog : 9α-11α-methanoepoxy-PGF_{2α}, TXB₂ : thromboxane B₂

顕微鏡倍率 : 200 倍

A : PG 添加 24 時間後の細胞形態

B : PG 添加 96 時間後の細胞形態

に、そして 96 時間後には約 3 倍に増加した。しかし、PG を 30 μ M の濃度を含む培地で培養した系では、細胞増殖がすべての系で抑制された。特に、PGA₁ および PGD₂ の作用は細胞障害的で、生細胞数は PG 作用 96 時間後まで減少の一途をたどった (図 2)。

供試線維芽細胞の DNA 合成に及ぼす PG (10 μ M) の影響を調べた結果は図 3 に示した。被験 PG はいずれも、供試線維芽細胞の DNA 合成を抑制した。特に、PGA₁, PGD₂, PGE₁, および PGE₂ による DNA 合成の抑制は著明であり、それらの PG を作用させたときの DNA

図2 供試線維芽細胞の増殖に及ぼす PG の影響

細胞を 5.0×10^4 個接種して 24 時間培養し、培養プレート底面に定着させた。その後、各々の被験 PG (最終濃度 $30 \mu\text{M}$) を添加した 5% NCS 含有 D-MEM で 48 時間および 96 時間培養した後の生細胞数を計測し、細胞増殖曲線に表わした。

値は 3 試料の平均値である。

* : $p < 0.01$

A ; ○ : 対照, □ : PGA_1 , ■ : PGA_2 , △ : PGE_1 , ▲ : PGE_2 , ▽ : $6\text{-keto-PGF}_1\alpha$, ▼ : $\text{PGI}_2 \cdot \text{Na}$

B ; ○ : 対照, ● : PGD_2 , □ : PGB_1 , ■ : PGB_2 , △ : $\text{PGF}_1\alpha$, ▲ : $\text{PGF}_2\alpha$, ▽ : TXA_2 analog, ▼ : TXB_2

合成量は、PG を作用させなかった対照の DNA 合成量の 25% 以下であった。一方、 PGI_2 およびその安定代謝物である $6\text{-keto-PGF}_1\alpha$ による DNA 合成の抑制は他の被験 PG に比べて弱く、それらの PG を作用させたときの DNA 合成量は、PG を作用させなかった対照の DNA 合成量の約 70% にとどまった (図 3)。

3. 高分子基質合成に及ぼす PG の影響

コラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成に及ぼす PG ($10 \mu\text{M}$) の影響を調べた結果は図 4 に示した。被験 PG はいずれも、コラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成を抑制した。コラーゲン合成については、 PGE_2 および $\text{PGF}_2\alpha$ が特に強い抑制作用を示し、それらの PG を作用させたときのコラーゲン合成量は PG を作用させなかった対照のその 30% 以下であった (図 4-A)。一方、非コラーゲン蛋白合成については、PG の抑制作用がコラーゲン合成のそれに比べ、相対的に弱かった。しかし、 PGE_1 および E_2 は強い抑制作用を示し、それらの非コラーゲン蛋白合成量は PG を作用させなかった対照のその約 50% であった (図 4-B)。

GAG 合成に及ぼす各種 PG ($10 \mu\text{M}$) の影響を調べた結果を図 5 および 6 に示した。いずれの被験 PG も

$[^3\text{H}]$ -グルコサミン (図 5) ならびに $[^{35}\text{S}]$ -硫酸基の取り込み (図 6) に影響を与えなかった。なお、 PGE_1 、 PGE_2 、 $\text{PGF}_1\alpha$ 、 $9\alpha\text{-}11\alpha\text{-methanoepoxy-PGF}_2\alpha$ および TXB_2 は $[^3\text{H}]$ -グルコサミンの取り込み (図 5) を、そして、 PGA_1 、 PGB_1 、 PGD_2 、 PGE_1 、 PGE_2 、 $\text{PGF}_1\alpha$ および $\text{PGF}_2\alpha$ $[^{35}\text{S}]$ -硫酸基の取り込み (図 6) を抑制する傾向を示したが、いずれも統計的に有意な抑制ではなかった。

4. 細胞内 cAMP 代謝に及ぼす PG の影響

各種 PG の細胞内 cAMP 代謝への影響の概要を把握するため、各種 PG を $10 \mu\text{M}$ の濃度で作用させて細胞内 cAMP レベルに及ぼす影響を調べた (図 7)。 $6\text{-keto-PGF}_1\alpha$ および $9\alpha\text{-}11\alpha\text{-methanoepoxy-PGF}_2\alpha$ を除く被験 PG ($10 \mu\text{M}$) は、細胞内 cAMP レベルを上昇させた。特に、 PGA_1 、 PGE_1 、 PGE_2 および PGI_2 による上昇は著明であった。しかし、この濃度での PGD_2 、 $\text{PGF}_1\alpha$ 、 $\text{PGF}_2\alpha$ および TXB_2 による上昇はわずかであった。

5. PGE_2 による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制と cAMP 代謝

PG による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用が cAMP を介して発現するか否かを調べるために、次の 2 つの実験を行なった。① PGE_2 による細胞内 cAMP

図3 供試線維芽細胞のDNA合成に及ぼすPGの影響

定常期にある細胞を各々の被験PG(最終濃度10 μ M)を添加した5% NCS含有D-MEMで23時間培養した。培養終了後、[³H]-チミジンで1時間のパルスラベルを行ない、細胞内に取り込まれた[³H]-チミジンの放射活性を測定してDNA合成量の指標とした。

PGの表記は図1に準ずる。

値は4~6試料の平均値±標準偏差で表わした。*: p<0.01

レベルの上昇をcAMP分解酵素阻害剤で増強し、PGE₂のDNA合成抑制作用が強くなるか否かを調べる。②プロテインキナーゼ阻害剤であるHA1004でAキナーゼを阻害することによって、PGE₂のDNA合成抑制作用が弱くなるか否かを調べる。

1) PGE₂による供試線維芽細胞のDNA合成抑制作用へのcAMP分解阻害の影響

図8に、IBMX(50 μ M)前処理によって各濃度のPGE₂による細胞内cAMPレベル上昇がさらに高まるか、そして、図9に細胞内cAMPレベルは経時的にどのように変動するかを調べた結果を示した。なお、これらの結果は5%血清存在下で得たものである。以上の結果を参考にして、IBMXによるcAMP分解阻害によってPGE₂によるDNA合成抑制がどのような影響を受けるかを調べた(図10)。細胞内cAMPレベルは、PGE₂の濃度を増すに従って上昇した。IBMXで前処理してcAMPの分解を阻害すると、上述の細胞内cAMPレベルはさらに上昇した(図8)。PGE₂添加により細胞内cAMPレベルは15分後に最大になり3時間後まで徐々に低下した。その後、細胞内cAMPレベルは、PGE₂添加24時間後までその最大値の約1/2のレベルを維持した(図9)。

IBMX前処理の系でのPGE₂作用による細胞内cAMPレベルの変動はIBMXで前処理しない系のその約2~3倍のレベルを維持していた(図9)。

PGE₂による細胞内cAMPレベルの上昇はIBMX前処理によってさらに高まった(図10-A)。一方、PGE₂によるDNA合成抑制作用はIBMX前処理によって強められる傾向が見られた(図10-B)が、同じ実験を繰り返しても、本結果と同様、両者に有意差は認められなかった。

2) PGE₂によるDNA合成抑制に及ぼすAキナーゼ阻害の影響

Aキナーゼを十分に阻害し、そしてCキナーゼに影響を与えないHA1004の濃度を知るために、供試線維芽細胞に2種のプロテインキナーゼ阻害剤HA1004およびH-7を作用させたときの供試線維芽細胞のDNA合成に及ぼす影響を調べた。結果は図11に示す通りである。HA1004およびH-7のAキナーゼに対する阻害定数(Ki)は、それぞれ2.3 μ Mおよび3.0 μ Mでほぼ等しく、HA1004とH-7のAキナーゼ阻害効果は同程度である。一方、HA1004およびH-7のCキナーゼに対するKiは、それぞれ40 μ Mおよび6.0 μ Mで、Cキナーゼ阻害効果はH-7の方がはるかに高い。ここで、HA

図 4 供試線維芽細胞のコラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成に及ぼす PG の影響

定常期にある細胞を各々の被験 PG (最終濃度 10 μ M) を添加した 5% NCS 含有 α -MEM で 22 時間培養した。培養終了後, [³H]-プロリンで 2 時間のパルスラベルを行なった。その後, コラゲナーゼ消化性蛋白とコラナーゼ非消化性蛋白に取り込まれた [³H]-プロリンの放射活性を調べ, それぞれコラーゲン合成量と非コラーゲン蛋白合成量の指標とした。

PG の表記は図 1 に準ずる。

値は 3~4 試料の平均値 $\pm$ 標準偏差で表わした。*: $p < 0.01$

A: コラーゲン合成

B: 非コラーゲン蛋白合成

図 5 供試線維芽細胞の GAG 合成に及ぼす PG の影響

定常期にある細胞を各々の被験 PG (最終濃度 10 μ M) と [³H]-グルコサミンとともに添加した 5% NCS 含有 D-MEM で 24 時間培養を行なった。培養終了後、細胞とその培養液のアクチナーゼ消化画分を CPC で沈澱させ、その放射活性の総量を測定して GAG 合成量の指標とした。実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

PG の表記は図 1 に準ずる。

値は 3~4 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

図 6 供試線維芽細胞の GAG 合成に及ぼす PG の影響

定常期にある細胞を各々の被験 PG (最終濃度 10 μ M) と [³⁵S]-硫酸塩とともに添加した 5% NCS 含有 D-MEM で 24 時間培養を行なった。培養終了後、細胞とその培養液のアクチナーゼ消化画分を CPC で沈澱させ、その放射活性の総量を測定し含硫 GAG 合成量の指標とした。実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

PG の表記は図 1 に準ずる。

値は 3~4 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

図7 供試線維芽細胞の細胞内 cAMP レベルに及ぼす PG の影響

定常期にある細胞を血清を含まない D-MEM に交換し 3 時間培養した後、各種 PG (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を添加して 15 分後に細胞内 cAMP レベルを測定した。実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

PG の表記は図 1 に準ずる。

値は 3 試料の平均値 $\pm$ 標準偏差で表わした。*: $p < 0.05$

1004 を $10 \mu\text{M}$ より高い濃度で作用させると、H-7 を $10 \mu\text{M}$ 以上の濃度で作用させたとときと同様に DNA 合成が抑制されるが、HA 1004 を $10 \mu\text{M}$ の濃度で作用させても DNA 合成抑制作用は現われなかった。したがって、A キナーゼを十分阻害し、C キナーゼに影響を与えない HA 1004 の濃度を $10 \mu\text{M}$ に設定した。

PGE_2 による DNA 合成抑制作用に及ぼす A キナーゼ阻害の影響を調べた結果は図 12 および図 13 に示した。 $10 \mu\text{M}$ の濃度の HA 1004 を作用させた系での、 PGE_2 各濃度の DNA 合成抑制作用は、HA 1004 を作用させない系でのそれより弱くなることはなかった (図 12)。また、 $0.1 \mu\text{M}$ の PGE_2 によって供試線維芽細胞の DNA 合成は抑制されるが、HA 1004 の添加濃度を変えて A キナーゼの阻害効果の変化による影響を調べてもその PGE_2

による DNA 合成抑制の程度は変わらなかった (図 13)。

考 察

歯周疾患は、歯周組織の代謝の変化が破壊、修復の遅延、および過剰増殖などの現象として現われたものである。したがって、歯周疾患の病態を歯周組織を構成する細胞の代謝調節の面から説明されることが望まれる。歯肉結合組織を構成する主たる細胞は線維芽細胞であり、歯肉結合組織の破壊と修復を考える際には、まず線維芽細胞の代謝を重視しなければならないことになる。また、それと同時に、歯肉線維芽細胞の代謝および機能に影響する因子についても熟知されなければならない。

歯肉以外の線維芽細胞に対する PG の作用を調べた過

図8 供試線維芽細胞の細胞内 cAMP レベルに及ぼす cAMP 分解阻害剤の PGE₂ の濃度変化に伴う影響

NCS (最終濃度 5%) と種々の濃度の PGE₂ を添加して 15 分後に細胞内 cAMP レベルを測定した。実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

○: PGE₂ のみを添加したもの

●: PGE₂ 添加 10 分前に IBMX を 50 μM の濃度で添加したもの

値は 3 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

PGE₂ 各濃度において、IBMX で前処理した場合としない場合の有意差検定を行なった。*: $p < 0.01$

去の報告は、歯肉線維芽細胞に対する PG の作用を知る上での参考にはならない。なぜなら、同じ種類の PG を同じ動物種由来の線維芽細胞に作用させても、その由来とする組織の違いによって PG の作用の仕方が異なることがある^{5,16,17)}からである。たとえば、PGE₂ はヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成を促進する作用を示す¹⁶⁾のに、その同じ PGE₂ がヒト胎児肺線維芽細胞のコラーゲン合成に対しては抑制的に作用する^{5,17)}。一方、PG は、細菌由来因子、サイトカイン、血清因子、および成長因子などの刺激によって細胞が産生する物質であり、しかもこれら因子自身の作用をも修飾する働きもしている。たとえば、歯周炎患者由来の炎症歯肉組織は、正常歯肉組織に比べて PG 含量が著明に高くなることが *in vitro* の研究で明らかにされている³⁷⁻⁴²⁾。また、PG は構造の類似した不飽和脂肪酸群であり、各々の PG は構造のわ

図9 PGE₂ (1 μM) による細胞内 cAMP レベルの経時変化とそれに対する cAMP 分解阻害の影響

NCS (最終濃度 5%) と PGE₂ (最終濃度 1 μM) を同時に培地に添加して各時間経過した後の供試線維芽細胞の細胞内 cAMP レベルを測定した。実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

○: PGE₂ のみを添加したもの

●: PGE₂ 添加 10 分前に IBMX を 50 μM の濃度で添加したもの

値は 3 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

PGE₂ 添加後の各時間において、IBMX で前処理した場合としない場合の細胞内 cAMP レベルの有意差検定を行なった。

*: $p < 0.01$

ずかな違いによりその生理作用が著しく異なること、さらに、ある種の組織や細胞においては PG の種類が異なると逆の作用を示すことが知られている^{26,27)}。したがって、歯周疾患の病態を歯周組織細胞の機能の面から説明しようと思えば、各種 PG が歯肉線維芽細胞のどのような機能に深く関わっているか、そして、それらの細胞機能に対する PG の作用発現のメカニズムはどうかをことごとく明らかにする必要がある。しかし、この課題に関するヒト歯肉線維芽細胞の情報は少なく、Ko らの報告¹⁾と小野らの報告⁴³⁾があるに過ぎない。Ko らは、PGE₂ (10 μM) がヒト歯肉線維芽細胞の増殖、DNA 合成、および蛋白合成を抑制するという、さらに、PGE₂ (10 μM) 存在下でヒト歯肉線維芽細胞をある期間培養すると、PGE₂ 感受性の subpopulation が消失することを報告している。本研究では、小野らの研究を受け、PGE₂ をはじめとする各種 PG が、Ko らによって調べられた細胞機能やそれ以外の線維芽細胞の主要な機能である GAG 合成にどのような影響を及ぼすかを調べ、さらに、PGE₂

図 10 PGE₂ による供試線維芽細胞の細胞内 cAMP レベルおよび DNA 合成への作用に及ぼす cAMP 分解阻害の影響

A : PGE₂ (1 μM) による細胞内 cAMP レベル上昇に及ぼす cAMP 分解阻害の影響

実験方法は材料と方法に示した通りである。

値は 3 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

IBMX (50 μM) で前処理した場合としなかった場合の細胞内 cAMP レベルの有意差検定を行なった。

* : $p < 0.01$

B : PGE₂ (1 μM) による DNA 合成抑制に及ぼす cAMP 分解阻害の影響

実験方法は材料と方法に示した通りである。

値は 4 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

の DNA 合成に対する作用機序を探ることを目的とした。

本研究の実験条件では、各種 PG は供試線維芽細胞の DNA 合成に対しては抑制的に働き、促進的に働くことはなかった (図 3)。ヒト由来の線維芽細胞を用いた過去の研究では、PGE₂ は本研究結果と同様に DNA 合成に対しては抑制的に働くと報告されている^{1,5,24,25)}。一方、マウス Swiss 3T3 線維芽細胞を用いた研究^{10~15, 18~22)}では PGE₁ および PGF_{2α} が、そして、ラットカラゲニン肉芽腫由来線維芽細胞を用いた研究²³⁾では PG F_{2α} および TXB₂ が、DNA 合成を促進すると報告されている。本研究では、上述の線維芽細胞で DNA 合成を促進した PGE₁, PGF_{2α}, および TXB₂ が、ヒト歯肉由来の供試線維芽細胞の DNA 合成を抑制する結果が得られた。このように、同じ種類の PG でも、線維芽細胞の由来が異なれば、その DNA 合成に対して相反する作用を示すことがある。ただ、作用させる PG の濃度の違いによっても、細胞の DNA 合成に対して促進的にも抑制

的にも働く可能性がある。さらに、本研究結果は、単層を形成した (confluent の) 供試線維芽細胞の周期を静止期に揃えた条件で得られたものに過ぎないが、細胞密度や細胞周期の条件を変えれば、得られる結果も異なる可能性が十分あることを意識しておくべきであろう。

上記の DNA 合成のみならず、その他の細胞機能に関しても、実験条件によって PG に対する応答が異なる可能性がある。したがって、細胞機能に対する PG の作用を正確に把握するためには、様々な実験条件下でその作用を調べなければならず、膨大な実験が必要となる。そこで、本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞の PG に対する応答に関する研究の出発として、数多くある PG が細胞機能にどのような影響を与えるかを概括することを一つの目的とした。そして、ある限られた実験条件ではあるが細胞諸機能に対して各種 PG がどのような影響を及ぼすかを広く調べた結果、供試線維芽細胞の増殖、DNA 合成、およびコラーゲン合成の機能がいずれの PG によっても抑制的な影響を受けることが明らかになった (図

図 11 供試線維芽細胞の DNA 合成に及ぼすプロテインキナーゼ阻害剤の影響

定常期にある細胞をプロテインキナーゼ阻害剤 (○: HA 1004, ●: H-7) を各濃度添加した 5% 血清含有 D-MEM で 23 時間培養した。培養終了後, [³H]-チミジンで 1 時間のパルスラベルを行ない細胞内に取り込まれた [³H]-チミジンの放射活性を測定して DNA 合成量の指標とした。

実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

値は 4 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

プロテインキナーゼ阻害剤を濃度添加したときの値と, プロテインキナーゼ阻害剤を添加しない対照の値の有意差検定を行なった。*: $p < 0.05$

2~4)。なお, 供試線維芽細胞は, PGA_1 および PGD_2 によって細胞形態変化を受けた (図 1)。このことは, PGA_1 および PGD_2 が供試線維芽細胞に対して障害的に作用していることを示しているが, その作用機序については不明である。

細胞機能に対する PG の代表的な作用の系には, 代謝された PG が細胞内に能動輸送され PG の代謝産物が細胞機能を調節する系と, PG がレセプターに結合し第 2 情報伝達物質—蛋白リン酸化酵素を介して作用する系の 2 つが考えられている^{44~47)}。線維芽細胞機能に対する PG の作用機序に関しては, レセプターを介しない系についての報告は見当たらないが, これまで研究されてきた各種細胞について報告されている機序を総括して考え

ると, 図 14 に示すような模式図を組み立てることができる。

レセプターを介する PG の作用機序に関しては, ① cAMP-A キナーゼ系, ② cGMP-G キナーゼ系, ③ ジアシルグリセロール (DG)-C キナーゼ系, ④ Ca^{2+} -カルモジュリン系, および ⑤ チロシンキナーゼ系などいくつかの細胞情報伝達系が考えられている。これらの細胞情報伝達系の第 2 情報伝達物質のうち, cAMP は Sutherland によって最初に発見されたものであり⁴⁸⁾, 第 1 情報伝達物質が細胞膜レセプターに結合してから cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼが活性化されるまでのメカニズムも詳細に解明されている^{49,50)}。このようにホルモン作用の第 2 情報伝達物質としての cAMP の役割が重視されてきたことから, 線維芽細胞の諸機能に対する PG の作用に関する研究は, その機序が主として cAMP を第 2 情報伝達物質とする系から検討されてきた。そして, PG による線維芽細胞の増殖および DNA 合成抑制作用については, cAMP と関連していることを示唆する報告が多い^{51~60)}。PG による線維芽細胞の細胞内 cAMP レベルへの影響について調べた研究はいくつかある^{61~64)}。しかし, 細胞内 cAMP レベルを上昇させることがわかっている PG の種類は極く限られており, PGE_1 , PGE_2 , PGI_2 , PGA_1 , および $\text{PGF}_2\alpha$ がそれに相当する^{61~64)}。また, この他の PG については研究報告が見当たらないので, 細胞内 cAMP レベルを上昇させる作用があるのかないのかは全く不明である。歯肉線維芽細胞における PG の cAMP 代謝に及ぼす影響に関する研究は, 本研究の進行途中に発表された PGE_2 が歯肉線維芽細胞の cAMP 合成を促進するという Ngan らの報告⁶⁴⁾のみである。

本研究結果は, これまでに報告のある PGE_1 , PGI_2 , PGE_2 , PGA_1 , および $\text{PGF}_2\alpha$ に加えて, PGB_1 , PGB_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_1\alpha$, および TXB_2 にも細胞内 cAMP レベルを有意に上昇させる作用があり, 6-keto- $\text{PGF}_1\alpha$ および 9- α -11- α -methanoepoxy- $\text{PGF}_2\alpha$ には細胞内 cAMP レベル上昇作用がないことを示すものであった (図 7)。

本研究では, 細胞内 cAMP レベルを著明に上昇させ, かつ DNA 合成を抑制する PGE_2 の作用機序を調べることを課題とした。cAMP は cAMP ホスホジエステラーゼによって 5'-AMP に分解されること, および, cAMP は A キナーゼを活性化することによって特定の機能蛋白をリン酸化し細胞機能を調節していると考えられていることから (図 14 の模式図参照), cAMP 分解酵素阻害剤

図 12 各濃度の PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用に及ぼす HA 1004 の影響

定常期にある細胞を PGE₂ を各濃度添加した 5% NCS 含有 D-MEM (○: HA 1004 不含, ●: HA 1004 10 μM 含有) で 23 時間培養した。培養終了後, [3H]-チミジンで 1 時間のパルスラベルを行ない, 細胞内に取り込まれた [3H]-チミジンの放射活性を測定して DNA 合成量の指標とした。

実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

値は 4 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

で cAMP の細胞内レベルを上昇させる系と A キナーゼ阻害剤で機能蛋白のリン酸化を阻害する系を用いて, 供試線維芽細胞の DNA 合成を抑制する PGE₂ 作用が cAMP-A キナーゼ系を介しているか否かを検討した。結果は, IBMX を用いて cAMP の分解を阻害し PGE₂ による細胞内 cAMP レベルの上昇を増強しても, PGE₂ による DNA 合成抑制作用は増強されず (図 10), そして, A キナーゼを阻害しても PGE₂ による DNA 合成抑制作用が弱くならないというものであった (図 12 および 13)。この結果から判断すると, PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用は, cAMP-A キナーゼ系を介していない可能性が高い。

線維芽細胞の機能に対する PG の作用が cAMP を介しているという過去の研究^{2~15)}は, PG が供試線維芽細胞

図 13 PGE₂ (0.1 μM) による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制に及ぼす HA 1004 の濃度による影響

定常期にある細胞を HA 1004 を各濃度添加した 5% NCS 含有 D-MEM (○: PGE₂ 不含, ●: PGE₂ [最終濃度 0.1 μM]) で 23 時間培養した。培養終了後, [3H]-チミジンで 1 時間のパルスラベルを行ない, 細胞内に取り込まれた [3H]-チミジンの放射活性を測定して DNA 合成量の指標とした。

実験方法の詳細は材料と方法に示した通りである。

値は 3~4 試料の平均値 ± 標準偏差で表わした。

細胞の細胞内 cAMP レベルを上昇させる作用を有するというを前提にしている。そして, ① cAMP 誘導体や cAMP 合成促進剤などの細胞内 cAMP レベルを上昇させる物質は PG と同様の細胞機能への作用を有すること, および, ② cAMP 分解酵素阻害剤の存在下で細胞機能に対する PG の作用が増強されるということの 2 点から, PG の細胞機能への作用は cAMP を介すると説明されている。たとえば, マウス Swiss 3T3 線維芽細胞の DNA 合成が PGE₁ と同様に dibutyryl cAMP, 8-bromo cAMP および forskolin によっても促進されること^{10~15)}, L-929 線維芽細胞の増殖が PGE₁ と同様に dibutyryl cAMP によって抑制されること³⁾, ヒト胎児肺由来線維芽細胞およびハムスター肺由来線維芽細胞の DNA 合成およびコラーゲン合成が PGE₂ と同様に di-

図 14 細胞機能に対する PG の作用様序

PGs: プロスタグランジン, PGs': プロスタグランジン代謝物, R: レセプター, Gp: GTP 結合蛋白質, Ac: アデニル酸シクラーゼ, PLC: ホスホリパーゼ C, Gc: グアニル酸シクラーゼ, TYK: チロシンキナーゼ, ATP: アデノシン 5'-三リン酸, cAMP: サイクリックアデノシン 3', 5'-リン酸 (サイクリック AMP), PI: ホスファチジルイノシトール, DG: ジアシルグリセロール, IP₃: イノシトール 1, 4, 5-三リン酸, GTP: グアノシン 5'-三リン酸, cGMP: サイクリックグアノシン 3', 5'-リン酸 (サイクリック GMP), CaM: カルモジュリン

butyryl cAMP によって抑制されること⁵⁾, そして, マウス胎児由来線維芽細胞の GAG 合成が PGE₁ と同様に dibutyryl cAMP によっても促進されること^{6~9)}から, 各々の PG の細胞機能への作用は cAMP を介していると説明されている。

本研究でも, PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用を cAMP との関連から調べる上で, 上記の報告のように細胞外から cAMP 誘導体を作用させ PGE₂ の作用を再現させるという方法も採用した。結果には示していないが, 供試線維芽細胞の DNA 合成は, dibutyryl cAMP によって 0.1 μM から 1 mM の濃度範囲で濃度依存的に抑制を受けた。しかし, 過去に dibutyryl cAMP の分解産物である butyrate によって線維芽細胞の DNA 合成が抑制されるという報告⁶⁵⁾がある。また, 著者は, butyrate が, dibutyryl cAMP と同程度に供試線維芽細胞の DNA 合成を抑制することを確認した。したがって, 供試線維芽細胞の DNA 合成に対する dibutyryl cAMP の抑制作用はその分解産物であ

る butyrate によるものである可能性が高い。このことから, dibutyryl cAMP を用いて, cAMP が PG による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制にどのように関わっているかを知ることができなかった。

本研究では, cAMP 分解酵素阻害剤である IBMX とともにプロテインキナーゼ阻害剤である HA 1004 を用いて, PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用への cAMP の関わりを調べた。なお, HA 1004 は, 近年, Hidaka ら⁶⁶⁾によって開発された一連のイソキノリンスルフォナミド誘導体のプロテインキナーゼ阻害剤の一つである。これらは, プロテインキナーゼの活性化サブユニットの活性部位すなわち ATP-Mg²⁺ や基質蛋白質の結合部位に結合し dead-end 阻害を起こすことによってプロテインキナーゼの活性を阻害する⁶⁶⁾もので, 細胞情報伝達系の解明に有効である。

cAMP 分解酵素阻害剤とプロテインキナーゼ阻害剤を用いて得られた本研究の結果は, PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用が cAMP を介するとい

う予測を否定するものであった。しかし、PGE₂ により DNA 合成が抑制される細胞と PGE₂ により細胞内 cAMP レベルが上昇する細胞が異なる可能性がある。ところが、このことに関して、Ngan らの免疫組織化学的染色法を用いた研究⁶⁴⁾では、同一ディッシュ内の歯肉線維芽細胞について、PGE₂ 作用によってすべての細胞の細胞内 cAMP が増加する結果が得られている。したがって、PGE₂ によって DNA 合成が抑制される細胞亜集団と PGE₂ によって細胞内 cAMP レベルが上昇する細胞亜集団が存在する可能性は少ないと思われる。さらに、cAMP-A キナーゼ系が他の細胞情報伝達系に作用し、間接的に DNA 合成抑制作用を発現する可能性のあることも考察しておかなければならない。PG の細胞機能への作用発現において、cAMP-A キナーゼ系と DG-C キナーゼ系は、互いに無関係に作動する場合、協同して作動する場合、あるいは互いに拮抗して作動するような場合が考えられている⁶⁷⁾。しかし、cAMP の細胞内レベルを上昇させても A キナーゼを阻害しても PGE₂ による DNA 合成抑制作用に変化はないという結果 (図 10, 12, 13) から判断すれば、cAMP-A キナーゼ系が他の情報伝達系に作用して間接的に DNA 合成を抑制する可能性はないものと考えられる。

それでは、PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用はどのような細胞情報伝達系を介して発現されるのかということが問題になってくる。本研究は血清により DNA 合成を誘導する実験条件下で PGE₂ の DNA 合成に対する作用を調べたものである。血清による DNA 合成の誘導は、マウス Swiss 3T3 線維芽細胞において C キナーゼの活性化が関与していると考えられている⁶⁸⁾。本研究においても HA 1004 と H-7 の C キナーゼに対する Ki 値を反映するように、H-7 は血清による DNA 合成誘導を HA 1004 より 1 オーダー低い濃度から抑制し始めた (図 11)。この DNA 合成抑制作用は C キナーゼ活性の阻害によるものと考えられる。このことから、PGE₂ はこの C キナーゼを介する細胞情報伝達系のどこかに作用し、DNA 合成を抑制していることが考えられる。PGE₂ の DNA 合成抑制作用の機序を探る上で、まず DG-C キナーゼ系からの検討が必要である。

結 論

ヒト正常歯肉由来線維芽細胞 (ATCC CRL 1292) を用いて、その機能に及ぼす PGA₁, PGA₂, PGB₁, PGB₂, PGD₂, PGE₁, PGE₂, PGF₁α, PGF₂α, PGI₂, 6-keto-PG

F₁α, 9 α-11 α-methanoepoxy-PGF₂α および TXB₂ の作用を広く調べた。本研究の実験条件下では、PGA₁ および PGD₂ は、供試線維芽細胞の形態に変化を与え、すべての被験 PG は、供試線維芽細胞の増殖、DNA 合成、コラーゲン合成および非コラーゲン蛋白合成を抑制する作用を有した。また、多くの被験 PG は、細胞内サイクリック AMP (cAMP) レベルを上昇させる作用をも有した。そこで、供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用を調べる手がかりを、ホルモン作用の第 2 情報伝達物質の 1 つである cAMP の代謝に求めて、PGE₂ による作用機序を調べた。

PGE₂ による細胞内 cAMP レベルの上昇を cAMP 分解酵素阻害剤である IBMX で増強しても、PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用は強くならなかった。さらに、cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素 (A キナーゼ) をプロテインキナーゼ阻害剤である HA 1004 で阻害しても、PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用は弱くならなかった。このことから、PGE₂ による供試線維芽細胞の DNA 合成抑制作用は、cAMP-A キナーゼ系を介さないことが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始懇篤なご指導とご校閲を賜りました岡山大学歯学部歯科保存学第 2 講座村山洋二教授に深く感謝致します。また、本研究を遂行するに際し直接ご指導とご教示を頂いた第二保存科木下正彦講師ならびに歯科保存学第 2 講座野村慶雄助教授に心から謝意を表します。

最後に種々の面にわたって貴重なご助言ご協力を頂いた歯科保存学第 2 講座の皆様には深謝致します。

文 献

- 1) Ko, S.D., Page, R.C. and Narayanan, A.S.: Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 3429-3432, 1977.
- 2) Johnson, G.S. and Pastan, I.: Change in growth and morphology of fibroblasts by prostaglandins. *J. Nat. Cancer Inst.*, 47 : 1357-1364, 1971.
- 3) Thomas, D.R., Philpott, G.W. and Jaffe, B.M.: The relationship between concentration of prostaglandin E and rates of cell replication. *Exp. Cell Res.*, 84 : 40-46, 1974.
- 4) Baum, B.J., Moss, J., Breul, S.D., Berg, R.A. and Crystal, R.G.: Effect of cyclic AMP on the

- intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.*, 255 : 2843-2847, 1980.
- 5) Clark, J.G., Kostal, K.M. and Marino, B.A. : Modulation of collagen production following bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *J. Biol. Chem.*, 257 : 8098-8105, 1982.
 - 6) Shönhöfer, P.S., Peters, H.D., Karzel, K. and Dinnendahl, V. : Influence of antiphlogistic drugs on prostaglandin E_1 stimulated cyclic 3', 5'-AMP levels and glycosaminoglycan synthesis in fibroblast tissue cultures. *Pol. J. Pharmacol. Phar.*, 26 : 51-60, 1974.
 - 7) Castor, C.W. : Connective tissue activation; Evidence supporting a role for prostaglandins and cyclic nucleotides. *J. Lab. Clin. Med.*, 85 : 392-404, 1975.
 - 8) Peters, H.D., Peskar, B.A. and Shönhöfer, P. S. : Glucocorticoids; Effects on prostaglandin release, cyclic AMP levels and glycosaminoglycan synthesis in fibroblast tissue cultures. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 296 : 131-137, 1977.
 - 9) Schönhöfer, P.S., Rucker, W., Dembinska-Klec, A., Peters, H.D., Pesker, B.A. and von Figura, K. : Prostaglandins and fibroblast functions *in vitro*. *Agents Actions*, 5 : 39-51, 1979.
 - 10) Rozengurt, E., Collins, M.K.L. and Kechan, M. : Mitogenic effect on prostaglandin E_1 in Swiss 3T3 cells; Role of cyclic AMP. *J. Cell. Physiol.*, 116 : 379-384, 1983.
 - 11) Rozengurt, E. and Mendosa, S.A. : Synergistic signals in mitogenesis; Role of ion fluxes, cyclic nucleotides and protein kinase C in Swiss 3T3 cells. *J. Cell Sci. Suppl.*, 3 : 229-242, 1985.
 - 12) Rozengurt, E. : Early signals in the mitogenic response. *Science*, 234 : 161-166, 1986.
 - 13) Tsuda, T., Hamamori, Y., Yamashita, T., Fukumoto, Y. and Takai, Y. : Involvement of three intracellular messenger systems, protein kinase C, calcium ion and cyclic AMP, in the regulation of *c-fos* gene expression in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.*, 208 : 39-42, 1986.
 - 14) Yamashita, T., Tsuda, T., Hamamori, Y. and Takai, Y. : Possible involvement of cyclic AMP and calcium ion in prostaglandin E_1 -induced elevation of *c-myc* mRNA levels in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 261 : 16878-16882, 1986.
 - 15) Spiegel, S. and Panagiotopoulos, C. : Mitogenesis of 3T3 fibroblasts induced by endogenous ganglioside is not mediated by cAMP, protein kinase C, or phosphoinositides turnover. *Exp. Cell Res.*, 177 : 414-427, 1988.
 - 16) Steinman, B.U., Abe, S. and Martin, G.R. : Modulation of type I and type III collagen production in normal and mutant human skin fibroblasts by density, prostaglandin E_2 and epidermal growth factor. *Coll. Rel. Res.*, 2 : 185-195, 1982.
 - 17) Goldstein, R.H. and Polgar, P. : The effect and interaction of bradykinin and prostaglandins on protein and collagen production by lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 257 : 8630-8633, 1982.
 - 18) Jimenez de Asua, L., Clingan, D. and Rudland, P.S. : Initiation of cell proliferation in cultured mouse fibroblasts by prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 : 2724-2728, 1975.
 - 19) Jimenez de Asua, L., O'Farrell, M.K., Clingan, D. and Rudland, P.S. : Temporal sequence of hormonal interactions during the prereplicative phase of quiescent cultured 3T3 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 3845-3849, 1977.
 - 20) Otto, A.M., Nilsen-Hamilton, M., Boss, B.D., Ulrich, M.O. and Jimenez de Asua, L. : Prostaglandin E_1 and E_2 interact with prostaglandin $F_{2\alpha}$ to regulate initiation of DNA replication and cell division in Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 4992-4996, 1982.
 - 21) Macphee, C.H., Drumond, A.H., Otto, A.H. and Jimenez de Asua, L. : Prostaglandin $F_{2\alpha}$ stimulates phosphatidylinositol turnover and increases the cellular content of 1, 2-diacylglycerol in confluent resting Swiss 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 119 : 35-40, 1984.
 - 22) Richmond, K.M.V., Riddle, P.N. and Brooks,

- R.F. : Apparent desensitization of Swiss 3T3 cells to the mitogens FGF and vasopressin. *J. Cell. Physiol.*, 121 : 547-557, 1984.
- 23) Murota, S., Morita, I. and Abe, M. : The effects of thromboxane B₂ and 6-keto-PGF₁ α on cultured fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 444 : 122-125, 1977.
 - 24) Korn, J.H., Halushka, P.V. and Leroy, E.C. : Mononuclear cell modulation of connective tissue function; Suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J. Clin. Invest.*, 65 : 543-554, 1980.
 - 25) Fine, A. and Goldstein, R.H. : The effect of PGE₂ on the activation of quiescent lung fibroblasts. *Prostaglandins*, 33 : 903-913, 1987.
 - 26) 室田誠逸 : アラキドン酸カスケード, 室田誠逸, プロスタグランジンと病態, 第1版, 東京化学同人, 東京, 1984, 3-37.
 - 27) 鹿取 信 : 生物活性と生理作用の概要, 山本尚三, 鹿取 信, プロスタグランジン研究法 (上), 東京化学同人, 東京, 1986, 32-37.
 - 28) 市川 厚 : PG レセプターを介する代謝応答, 室田誠逸, プロスタグランジンと病態, 第1版, 東京化学同人, 東京, 1984, 67-77.
 - 29) 市川 厚 : プロスタグランジン E₂ 受容体研究の現状. *現代医療*, 21 : 3175-3180, 1989.
 - 30) 清水秀樹, 宝来宏治, 木下正彦, 野村慶雄, 村山洋二 : 根管治療薬のヒト線維芽細胞に及ぼす影響. *日歯保誌*, 28 : 1389-1402, 1985.
 - 31) McLimans, W.F., Davis, E.V., Glover, F.L. and Rake, G.W. : The submerged culture of mammalian cells; The spinner culture. *J. Immunol.*, 79 : 428-433, 1957.
 - 32) Huey, J., Narayanan, A.S., Jones, K. and Page, R.C. : Effect of epidermal growth factor on the synthetic activity of human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 632 : 227-233, 1980.
 - 33) Solursh, M. and Meier, S. : A conditioned medium (CM) factor produced by chondrocytes that promotes their own differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69 : 2069-2072, 1973.
 - 34) 木下正彦 : 軟骨細胞のサイクリック AMP 代謝, 細胞増殖および分化機能発現におよぼすプロスタグランジンの影響. *阪大歯誌*, 30 : 267-285, 1985.
 - 35) Honma, M., Satoh, T., Yakezawa, J. and Ui, M. : An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in a small-volume samples from blood and tissue. *Biochem. Med.*, 18 : 257-273, 1977.
 - 36) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
 - 37) Goodson, J.M., McClathy, K. and Revell, C. : Prostaglandin-induced resorption of adult rat calvarium. *J. Dent. Res.*, 53 : 670-677, 1974.
 - 38) ElAttar, T.M.A. : Prostaglandin E₂ in human gingiva in health and disease and its stimulation by female sex steroids. *Prostaglandins*, 11 : 331-341, 1976.
 - 39) 平田博則 : 歯周病発症におけるプロスタグランジンの役割—その骨カルシウム遊離作用と歯肉での動態について—. *広大歯誌*, 12 : 252-264, 1980.
 - 40) Dewhirst, F.E., Moss, D.E., Offenbacher, S. and Goonson, J.M. : Levels of prostaglandin E₂, thromboxane, and prostacyclin in periodontal tissues. *J. Periodont. Res.*, 18 : 156-163, 1983.
 - 41) Offenbacher, S., Odle, B.M., Gray, R.C. and Van Dyke, T.E. : Crevicular fluid prostaglandin E levels as a measure of the periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. *J. Periodont. Res.*, 19 : 1-13, 1984.
 - 42) Mendieta, C.F., Reeve, C.M. and Romero, J. C. : Biosynthesis of prostaglandins in gingiva of patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 56 : 44-47, 1984.
 - 43) 小野耕資, 木下正彦, 野村慶雄, 清水秀樹, 宝来宏治, 後藤弘幸, 難波秀樹, 新井英雄, 村山洋二 : 歯周疾患病態とプロスタグランジンの関係—歯肉線維芽細胞の生理機能におよぼすプロスタグランジンの影響—. *日歯保誌*, 30 : 716-724, 1987.
 - 44) 成宮 周 : プロスタグランジン作用の二つの発現機構; 受容体と細胞内輸送. *生化学*, 58 : 453-469, 1986.

- 45) 宮本英七：情報の受容と作用発現，細胞情報伝達と蛋白質リン酸化反応，宮本英七，西塚泰美，蛋白質核酸酵素(臨時増刊)，31：1690-1700，1986.
- 46) Rozengurt, E. : Stimulation of DNA synthesis in quiescent cultured cells; Exogenous agents, internal signals, and early events. *Curr. Top. Cell Regul.*, 17 : 59-88, 1980.
- 47) Dumont, J.E., Jauniaux, J.C. and Roger, P.P. : The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *TIBS*, 14 : 67-71, 1989.
- 48) Sutherland, E.W. and Rall, T.W. : The properties of an adenosine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{2+} and epinephrine or glucagon. *J. Am. Chem. Soc.*, 79 : 3608, 1957.
- 49) 堅田利明，宇井理生：細胞膜受容体とアデニル酸シクラーゼの連関 ① -GTP 結合蛋白質の機能を中心に，蛋白質核酸酵素，30：209-219，1985.
- 50) 堅田利明，宇井理生：cAMP の情報伝達系，日本生化学会，続生化学実験講座7，情報伝達と細胞応答(上)，東京化学同人，東京，1986，241-262.
- 51) 市川 厚，杉本雅子：Cyclic AMP と分化・増殖；Cyclic AMP の現状と展望. *最新医学*, 40 : 296-303, 1985.
- 52) Burk, R.R. : Reduced adenyl cyclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature*, 219 : 1272-1275, 1968.
- 53) Johnson, G.S. and Pastan, I. : Role of 3', 5'-adenosine monophosphate in regulation of morphology and growth of transformed and normal fibroblasts. *J. Nat. Cancer Inst.*, 48 : 1377-1387, 1972.
- 54) Otten, J., Johnson, G.S. and Pastan, I. : Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.*, 247 : 7082-7087, 1972.
- 55) Willingham, M.C., Johnson, G.S. and Pastan, I. : Control of DNA synthesis and mitosis in 3T3 cells by cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48 : 743-748, 1972.
- 56) Goggins, J.F., Johnson, G.S. and Pastan, I. : The effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on synthesis of sulfated acid mucopolysaccharides by transformed fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 247 : 5759-5764, 1972.
- 57) Oey, J., Vogel, A. and Pollack, A.R. : Intracellular cyclic AMP concentration responds specifically to growth regulation by serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 : 694-698, 1974.
- 58) Rozengurt, E. : Synergistic stimulation of DNA synthesis by cyclic AMP derivatives and growth factors in mouse 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 112 : 243-250, 1982.
- 59) Rozengurt, E. : Adenosine receptor activation in quiescent Swiss 3T3 cells. *Exp. Cell Res.*, 139 : 71-78, 1982.
- 60) Friedman, D.L. : Regulation of the cell cycle and cellular proliferation by cyclic nucleotide, Kebabian, J.W., *Handbook of experimental pharmacology*, Springer-Verlag, 58, 1982, 151-187.
- 61) Maganiello, V. and Vaughan, M. : Prostaglandin E_1 effects on adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate concentration and phosphodiesterase activity in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69 : 269-273, 1972.
- 62) Kelly, L.A. and Butcher, R.W. : The effects of epinephrine and prostaglandin E_1 on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in WI-38 fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 53 : 3098-3102, 1974.
- 63) Ager, A. and Gordon, J.L. : Effects of vasoactive and inflammatory agents on cyclic AMP levels in WI-38 fibroblasts, endothelial and vascular smooth muscle cells in culture. *Agents Actions*, 10 : 569-572, 1980.
- 64) Ngan, P.W., Crock, B., Varghese, J., Lanese, R., Shanfeld, J. and Davidovitch, Z. : Immunohistochemical assessment of the effect of chemical and mechanical stimuli on cAMP and prostaglandin E levels in human gingival fibroblasts *in vitro*. *Archs. Oral Biol.*, 33 : 163-174, 1988.
- 65) Singer, R.E. and Buckner, B.A. : Butyrate and propionate; Important components of toxic dental plaque extracts. *Infect. Immun.*, 32 : 458-463, 1981.

- 66) Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y. : Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide-dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, 23 : 5036-5041, 1984.
- 67) 川原康洋, 津田晃孝, 高井義美 : Diacylglycerol, Ca^{2+} と cyclic AMP ; Cyclic AMP の現状と展望. *最新医学*, 40 : 296-303, 1985.
- 68) Rodriguez-Pena, A. and Rozengurt, E. : Serum, like phorbol esters, rapidly activates protein kinase C in intact quiescent fibroblasts. *EMBO J.*, 5 : 77-83, 1986.

連絡先 :

岡山大学歯学部歯科保存学第2講座

〒 700 岡山市鹿田町2丁目5番1号