

マウス顎下腺におけるエステロプロテアーゼ (TAMEase) におよぼすプロスタグランジンの影響

波 井 暁

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任: 工藤啓吾教授)

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

(指導: 太田 稔教授)

Abstract : Some kinds of prostaglandin (PGs) such as PGE₁, PGE₂ and PGF_{2α} are known to regulate the secretion and/or synthesis of many biologically active substances in mouse submandibular glands. This study was undertaken to investigate the effects of prostaglandins, especially PGE₂ which is the main PG synthesized in the submandibular glands, on submandibular esteroprotease, p-tosyl-L-arginine methyl esterase (TAMEase).

Injection of PGE₂ in male mice increased the activity of TAMEase of the submandibular glands after 20 minutes, and the increased level was maintained for 24-48 hours. PGF_{2α} also increased the TAMEase activity after 24 hours. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reduced conditions and immunoblotting analyses revealed that the intensity of the 27.5 kilo dalton (kDa)-band of TAMEase molecules recognized by anti-mouse TAMEase rabbit antibody was increased 1 hour after administration of PGE₂ and the increased level continued for 24 hours. Moreover, an increase in TAMEase molecules was induced by other prostaglandins such as PGE₁, PGF_{1α}, PGF_{2α} and PGI₂. As TAMEase is known to be a secreted protein, the TAMEase activity in saliva was measured before and after the injection of PGE₂. The TAMEase activity in saliva decreased 1 hour after the injection of PGE₂ in contrast with the increase in glandular TAMEase activity, suggesting the inhibition of TAMEase secretion from submandibular gland into saliva by PGE₂. To confirm the inhibition of the secretion of TAMEase by PGE₂ or PGF_{2α}, histological and immunohistochemical analyses were performed. Hematoxylin-eosin staining showed the accumulation of secretory granules in convoluted duct cells 10 minutes after the injection of PGE₂ or PGF_{2α}, and the convoluted duct cells with increased granules occupied the luminal space of the duct 10 minutes after the injection of PGs. Immunohistochemical study showed that the abundant granules in the apical portion of the convoluted duct cells were positive to anti-TAMEase antibody. The storage of secretory granules in the convoluted duct cells was still observed even 24 hours after the injection.

These findings suggested that the increased levels of TAMEase activity and TAMEase molecules in the submandibular glands induced by the administration of PGs were due to the inhibition of the secretion of TAMEase molecules from the submandibular gland into saliva.

Key words : prostaglandin / esteroprotease / TAMEase / mouse submandibular gland

緒 言

マウス顎下腺は形態的にも機能的にも性差が認められ¹⁾, 現在まで多くの研究者によってそ

Effect of prostaglandins on the esteroprotease of mouse submandibular gland.

Satoshi SHIBUI

(First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry, Chuodori 1-3-27, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 19: 54-67, 1994

の形態学的ならびに生化学的研究がなされてきた。マウス顎下腺中には神経成長因子 (nerve growth factor, NGF)^{2,3)}, 上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF)^{3,4)}, レニン^{3,5)}, トニン^{3,6)}, カリクレイン^{3,7)}やその他のエステロプロテアーゼ^{3,8)}, あるいはアミラーゼ^{3,9)}や酸性フォスファターゼ³⁾などの多くの生理活性物質が存在する。これら生理活性物質のうち、顎下腺顆粒管細胞中に含まれる NGF や EGF の量は雌に比べ雄で顕著に多く^{10,11)}, またレニンなど多くのプロテアーゼ活性にも同様な著しい雌雄差が認められる¹²⁾。

マウス顎下腺のエステロプロテアーゼには、カリクレイン, レニン, トニンおよび β -NGF エンドペプチダーゼ¹³⁾や, EGF あるいは NGF と結合する結合タンパク質の存在が知られている^{14,15)}。EGF および NGF 結合タンパク質は, この分子自身がエステロプロテアーゼ活性を持っており, EGF や NGF の前駆体から活性型への変換に関わっていると考えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。これらエステロプロテアーゼは, 合成基質のアルギニンのエステル類を水解する酵素の総称である。しかし, 私共は今回合成基質として p-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) を用いていることから¹⁷⁾, 以下これを TAMEase と称する。私共のこれまでの研究から TAMEase は, 齧歯類の中でもマウスとラット顎下腺に特異的にかつ多量に存在するエステロプロテアーゼで, 主として 27.5 kDa の分子であること, またアンドロゲン依存性であり, 成熟雄に特に多量に存在し, 去勢により消失すること, 成長に伴いアンドロゲンレベルに応答して出現すること, また, 雌ではその活性は雄の約 1/10 と低いことなどが明かとなった¹⁸⁻²¹⁾。しかし, 顎下腺内における TAMEase の生理的役割に関しては, EGF や NGF のプロセッシングに関わっている^{16,17)}ということなど, 一部明らかになっている点を除けばなお不明な点が多い。また, TAMEase は分泌タンパクであり^{5,22)}唾液中にもその存在が知られているが, 唾液中に存在する意義についても定かではない。

一方, TAMEase をはじめ顎下腺に存在する多くの生理活性物質は性ホルモン²³⁻²⁵⁾のみならず, 甲状腺ホルモンや副腎ホルモン^{1,26,27)}さらに炎症メディエーターとして知られるプロスタグランジン (Prostaglandin, PG)²²⁾ による調節も受けているとの報告がある。PG は 20 個の炭素鎖の不飽和脂肪酸誘導体の一族であり, ロイコトリエン, トロンボキサンなどと同様に, アラキドン酸に由来する局所性化学伝介物質で多種の細胞から分泌されることが知られている。PG は 9 群, 16 種以上もあるが, 各種 PG は細胞表面にあるそれぞれに特異的な受容体に結合し²⁸⁾, リン酸化情報伝達系を介し²⁹⁾多様な生物学的効果をもたらすと考えられる。

PG の唾液腺におよぼす作用に関してはこれまでいくつかの報告があるが, そのほとんどは唾液の分泌量とこれに伴う唾液成分の分泌量の変動についてのものである。唾液の分泌に関しては, PGE₁, E₂ ならびに F_{2 α} が唾液流量を増加させる^{30,31)}との報告があるが, 一方, 副交感神経系の興奮による唾液分泌, すなわち副交感神経作動薬の投与などによる唾液分泌に関しては逆にこれを抑制する^{32,33)}との報告もある。また, 唾液成分に関しては Na, Cl や Ca イオンなどの電解質^{33,34)}, ムチン³⁵⁾やレニン³⁶⁾などの生理活性物質の変動に関する報告があるが, 用いる PG の種類や濃度の違い, また顎下腺, 耳下腺唾液といった唾液の種類の違いなどにより唾液腺細胞の PG に対する応答は異なる。このように, PG は唾液腺の生理機能調節に重要な役割を有するものと考えられるものの, その作用機構の分子レベルでの詳細な検討や細胞学的検索も少なく多くは不明である。

そこで本研究においては, 唾液腺で主として生成される PGE₂³⁷⁾をはじめとした各種 PG のマウス顎下腺のエステロプロテアーゼである TAMEase におよぼす影響を, 活性の変動, 分子の消長ならびに分子の組織内における局在の各面からそれぞれ活性測定法, 免疫学的手法ならびに免疫組織化学的手法を用いて検討を行い, PG による顎下腺内エステロプロテアーゼ

の調節機構について検索した。

材料と方法

1. 実験材料

(1) 実験動物

12週齢の自由飲水と固形飼料で飼育した雌雄の ddY マウス (体重 32 - 34 g) は静岡実験動物より購入し、また、3 kg の雌家兎も同様に飼育し、ポリクローナル抗体の作製に供した。

(2) 試薬

以下に使用した試薬とその購入先を示した。
 p-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME): 半井化学, 完全フロイントアジュバント: Gibco 社, ダルベッコ PBS(-): 日水製薬, ウシ血清アルブミン (BSA): Sigma 社, 抗ウサギペルオキシダーゼ標識ヤギ抗体: Cappel 社, アクリルアミド, N, N'-メチレンビスアクリルアミド (電気泳動用特製試薬): 半井化学, ラウリル硫酸ナトリウム (SDS): 半井化学, インドメタシン: Sigma 社, レインボーマーカー (分子量測定用): Amersham 社, ヒストスキャンキット (免疫組織化学染色試薬): Biomed 社, プロスタグランジン E₂, F_{2α}: Sigma 社 また、ご好意により小野薬品から PGE₁, E₂, F_{1α}, F_{2α} ならびに I₂ を供与された。

2. 実験方法

(1) 粗酵素液の調製

マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、ただちに顎下腺を摘出した。摘出顎下腺は氷冷 0.9% NaCl で洗浄後、結合組織を除去し、同じく氷冷した 10 倍容の 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) を加えて、テフロンホモジナイザーで粉碎した。その懸濁液を 10,000 × g, 20 分間 2°C で遠心し、得た上清を粗酵素液とした。

(2) TAMEase 活性の測定

TAME を基質とし、Castellino と Sodetz の方法³⁹⁾により TAMEase 活性を測定した。すなわち、粗酵素液を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2) で 50-1000 倍に希釈後、希釈酵素液 0.2 ml と 0.1 M TAME 溶液 0.05 ml を 22°C にて 10 分間反応させた。その反応液に、3.5 N NaOH-2

M hydroxylamine 1:1 混合液 0.2 ml を加え反応を停止させた。室温に 30 分間放置後、3% トリクロル酢酸 0.4 ml つづいて 0.11 M FeCl₃ 4 ml をそれぞれ加え発色させ、Beckman 社製 D U®-65 Spectrophotometer を用いて 525 nm の吸光度を測定した。タンパク定量はウシ血清アルブミン溶液を標準とし、Lowry らの方法³⁹⁾に準じて行った。

① PG 投与による TAMEase 活性の測定

無水エタノールで 3 mM に調製した PGE₂, PGF_{2α} を使用時に 0.9% NaCl で 10 倍に希釈し、投与量が 480 ng/g 体重となるよう雌雄 ddY マウスの腹腔内へ投与した。対照群には無水エタノールの 0.9% NaCl 10 倍希釈液を同様に投与した。投与後 10 分, 20 分, 1 時間, 3 時間, 24 時間, 48 時間の各時間に顎下腺を摘出し、前述のごとく TAMEase 活性を測定した。

② 唾液内 TAMEase 活性の測定

唾液は以下のごとく採取した。すなわち、雄マウスに PGE₂ (480 ng/g 体重) の投与を行い 1 時間後に全唾液 (3 匹分, 約 5-10 μl) を採取し、ただちに屠殺、顎下腺を摘出した。採取した唾液を 0.9% NaCl で 1,000-2,000 倍に希釈し、TAMEase 活性を測定した。

③ インドメタシン投与による TAMEase 活性の測定

インドメタシンの無水エタノール 1% 溶液を作製し、さらにプロピレングリコールを加え希釈し 0.1% 溶液に調製した。インドメタシンの投与量は、0.1 ml (100 μg のインドメタシン含有) とし、対照群には、無水エタノールのプロピレングリコール 10 倍希釈液 0.1 ml を屠殺 24 時間前に雄マウスの頸部皮下へ投与した。PGE₂ 併用群に対しては、前述のごとくインドメタシン投与を行った後、屠殺 1 時間前にさらに PGE₂ の投与を行った。屠殺後ただちに顎下腺を摘出し TAMEase 活性を測定した。

(3) 抗マウス TAMEase ウサギポリクローナル抗体の作製

雄マウス顎下腺より精製した TAMEase 0.8 mg¹⁸⁾ と完全フロイントアジュバントを混合

し充分乳化後、3 kgの雌ウサギに2週間に1回の間隔で7回皮下注射し免疫を行った。耳静脈から試験採血し、オクタロニー法で抗体価を調べた。抗原である精製 TAMEase (3.9 mg/ml) に対して抗血清の10倍希釈液まで沈降線を形成したところで、ネブタール麻酔下に開胸し、心臓採血により全血採血した。血液を30°Cで2時間加熱後、3,000 rpm 10分遠心により抗血清を得た。これを40%飽和硫酸で塩析し12,000 rpm 20分遠心後の沈澱物をPBSに溶解後、これをPBSに一晩透析した。得られた部分精製のIgG画分を抗TAMEaseポリクローナル抗体とした。

(4) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)とイムノプロット法によるTAMEase分子の検出

精製した抗TAMEase抗体を用いて、SDS-PAGEならびにイムノプロット法により、PGE₂投与後の雄マウスTAMEase分子の経時的変動(10分, 1時間, 24時間)と各種PGの投与によるTAMEase分子の変動を検討した。各種PG投与の実験において、雄マウスはエタノールの0.9% NaCl 10倍希釈液投与群(対照群), PGE₁, PGF_{1α}, PGF_{2α}ならびにPGI₂各投与群に分け、また雌マウスは対照群, PGE₂ならびにPGF_{2α}各投与群に分けた。各PGの投与量ならびに投与方法は前述と同様に行い、各群とも投与後24時間で屠殺し、ただちに顎下腺を摘出した。

顎下腺より調製した各粗酵素液はタンパク量を1 mg/mlに調整した後、その5 μlをSDS-PAGEで展開した。つづいて、ゲル中のタンパク質を25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% (v/v) メタノール, pH 8.3の緩衝液中で10 V, 200 mAで、1時間、4°Cで、ニトロセルロース膜上に電気泳動的に移行させた。膜をPBSで洗浄後、2% gelatinを含むPBS (2% gelatin-PBS) 中で2時間室温で反応させ、膜上の空いている吸着部位をブロックした。その後、膜に1次抗体として1,000倍に希釈した抗TAMEase ウサギ抗体を4°Cで一晩反応させた。

なお、抗体の希釈には非特異的な結合を防ぐため2% gelatin-PBSを用いた。反応後、0.05% Tween-20を含むPBS (PBS-Tween) で洗浄し、二次抗体として500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG ヤギ抗体を室温で2時間反応させた。つぎに膜をPBS-Tweenで洗浄後、基質として0.3% 過酸化水素, 4-chloro-1-naphthol 0.6 mg/mlを含むPBSと反応させ、室温で10分間発色させた。発色後、蒸留水で洗浄し風乾した。

(5) 免疫組織化学染色法によるTAMEaseの組織内局在の検討

雄マウスにPGE₂, PGF_{2α}をそれぞれ投与し、10分ならびに24時間後に屠殺し顎下腺を摘出した。摘出した顎下腺を10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィン包埋し、薄切しスライドを作成した。作成した切片をキシロールとエタノールで順次脱パラフィン後、十分に水洗を行い、最後にPBSで3分間洗浄した。つづいて、このスライド上の切片を1% BSAを含むPBS (1%BSA-PBS) で100倍に希釈した抗TAMEase抗体(一次抗体)と25°C 1時間インキュベートした。二次抗体以降は、ヒストスキャンキット (Biomed社) を用い、アビジン・ビオチンペルオキシダーゼ法により染色を行った。また、連続切片を用いてヘマトキシリン・エオジン染色法を並行して行い、分泌顆粒の局在を検索した。標本は光学顕微鏡により鏡検した。

結 果

(1) PG投与後のマウス顎下腺TAMEase活性の経時的変化

12週齢の雄マウスにPGE₂ (480 ng/g体重)を投与し、48時間までの経時的なTAMEase活性を測定した。Fig.1に示したごとく、PGE₂投与後20分でTAMEase活性は急激に上昇し1時間後で最大値を示し、その後活性は24-48時間にわたって高い値で持続された。この結果からPG投与後短時間でTAMEase活性が上昇し、さらにその上昇はあ

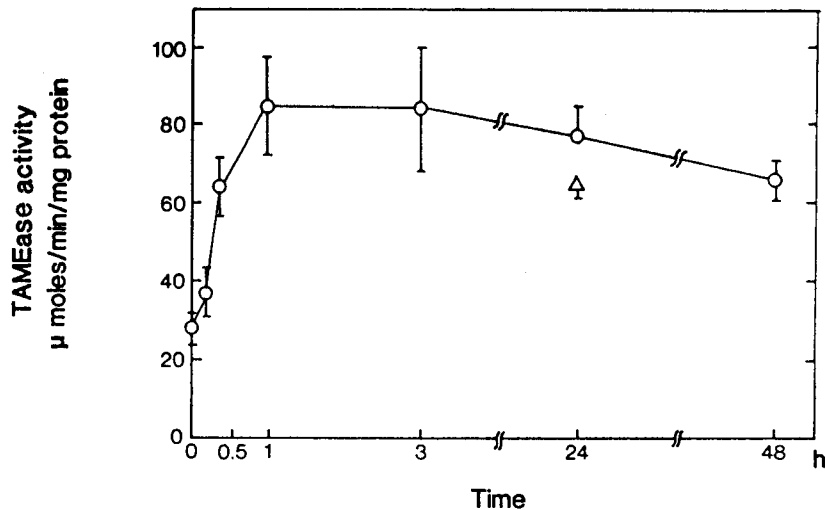


Fig. 1 Time course of TAMEase activity in male mouse submandibular glands after injection of prostaglandin E_2 .

Twelve week-old mice were injected intraperitoneally with 480 ng/g body weight of prostaglandin (PG) E_2 (open circle). The mice were killed at different time intervals after the injection. The activity of TAMEase in the submandibular glands was measured as described in "Materials and Methods". Control mice received ethanol in 10 volumes of 0.9% NaCl, and immediately killed (0 hour). The mice were injected with the same dose of $PGF_{2\alpha}$ (triangle) and killed 24 hours after. Data are shown as the mean \pm SD from three mice in each experiment.

る一定の時間持続されることが明かとなった。投与後 48 時間以降の変動に関しては本実験においては検討しなかった。また $PGF_{2\alpha}$ の投与は、 PGE_2 と同様 TAMEase 活性を上昇させた。

先に述べたが、私共のこれまでの研究で TAMEase 活性は雌マウスでは雄の約 1/10 と低いことが明かとなっている¹⁸⁾。そこでつぎに、雌マウスに PGE_2 ならびに $PGF_{2\alpha}$ を投与し TAMEase 活性におよぼす影響を検討した。その結果、 PGE_2 ならびに $PGF_{2\alpha}$ の投与により TAMEase 活性の有意な変動はみられなかった(データは示さない)。

(2) PGE_2 投与によるマウス顎下腺内および唾液中の TAMEase 活性の変化

TAMEase は分泌タンパク質であるので、 PGE_2 投与による顎下腺内 TAMEase 活性の上

昇が唾液の分泌阻害によってもたらされた可能性を考え、つぎに PGE_2 投与後の唾液中の TAMEase 活性の変動を調べた。その結果は Table 1 に示したごとく、 PGE_2 投与後 1 時間で顎下腺内の TAMEase 活性は上昇したが、唾液中の TAMEase 活性は顕著に減少した。

(3) 内因性プロスタグランジンの顎下腺内 TAMEase 活性に対する影響

内因性の PG 合成を抑制する目的で、PG 合成過程におけるシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシンをマウスに投与し、 PGE_2 投与と合わせて検討した。結果は Table 2 に示したごとく、対照群に比較しインドメタシン単独投与群において、TAMEase 活性の減少は認められず、逆に活性は有意に上昇した。また、インドメタシン・ PGE_2 併用群で最も高い活性を示したが、これは PGE_2 投与による

Table 1 The TAMEase activities in male mouse submandibular glands and saliva following injection of prostaglandin E₂.

| Treatment | TAMEase activities (μ moles/min/mg protein) | |
|------------------|---|--------|
| | SMG | Saliva |
| Control | 34.2 \pm 2.73 | 58.0 |
| PGE ₂ | 48.3 \pm 5.84 | 22.9 |

Male mice were injected 480 ng/g body weight of PGE₂ intraperitoneally. One hour later, all mixed-saliva samples were collected and then the mice were killed and the submandibular glands were removed. All saliva samples collected from untreated control and PG-treated mice were diluted with 0.9% NaCl to the final volume of 10ml. the TAMEase activities of the submandibular glands and the saliva samples were measured as described in "Materials and Methods". Data of the TAMEase activities of the submandibular glands are shown as the mean \pm SD from three mice in two experiments. Data of the TAMEase activities in the saliva samples are indicated as the mean of triplicated determinations in one experiment.

TAMEase 活性上昇効果にインドメタシン投与による TAMEase 活性上昇効果が加わったものと思われた。

(4) SDS-PAGE ならびにイムノブロット法による顎下腺 TAMEase 分子の検出

馬場¹⁸⁾はマウス顎下腺中の TAMEase には活性を持ち抗体で認識されるものと抗体では認識されるが活性を持たない分子種があることを報告している。そこで、抗 TAMEase ポリクローナル抗体を作成し、抗体で認識される顎下腺内の TAMEase 分子に対する PG 投与の影響を SDS-PAGE とイムノブロット法により検討した。

はじめに PGE₂ 投与後の TAMEase 分子の経時的変動を非還元条件下ならびにメルカプトエタノール・ジチオスレイトール (DTT) 還元条件下にて検討した。非還元下では、26 kDa のメインバンドのほかに 23 kDa, 22 kDa と全部で 3 本のバンドを認めたが、これらバンドは PGE₂ 投与後 1 時間で有意に増強し、24 時間後も維持された (Fig.2A, lanes 1-4)。一方、還元下では雄で 27.5 kDa のメインバンドの他

Table 2 The effect of indomethacin on the activity of TAMEase in male mouse submandibular glands.

| Treatment | TAMEase activity (μ moles/min/mg protein) |
|-------------------------------|---|
| | Control |
| PGE ₂ | 46.5 \pm 1.87 |
| Indomethacin | 50.0 \pm 0.33 |
| Indomethacin+PGE ₂ | 65.9 \pm 1.23 |

Male mice were injected subcutaneously with 0.1% ethanol in propylene glycol containing 100 μ g indomethacin 24 hours before sacrifice. Control mice received a vehicle alone. 480 ng/g body weight of PGE₂ were administered intraperitoneally 1 hour before the sacrifice and the TAMEase activity was measured. Data are shown as the mean \pm SD from three mice in each experiment.

に 14-17 kDa 付近に 2-3 本 (Fig. 2A, lanes 5-8), 雌で 27.5 kDa ならびに 16 kDa にバンドを認めた (Fig.2B, lanes 6-8)。このうち雄の 27.5 kDa のバンドは PGE₂ 投与 1 時間から 24 時間後にわたり有意に増強した (Fig.2A, lanes 7, 8)。

つぎに、各種 PG 投与の顎下腺 TAMEase 分子におよぼす影響を検討した。雄マウスにおいては、27.5 kDa の抗 TAMEase 抗体と結合する分子の増加が、PGE₂ と同様に PGF_{1 α} , PGF_{2 α} ならびに PGI₂ 投与群 (Fig.2B, lanes 3, 4, 5) で認められた。一方、雌マウスでは対照群と比較し PG 投与による明らかな変動はみられなかった (Fig.2B, lanes 6-8)。

(5) ヘマトキシリン・エオジン染色法による分泌顆粒と免疫組織化学染色法による顎下腺内 TAMEase 分子の局在

ヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色による雄マウス顎下腺の顆粒管細胞内の分泌顆粒の局在を Fig.3 に示した。対照群では、顆粒管細胞の核は基底側に明瞭に位置し、腺腔側には好酸性の分泌顆粒が中等度に存在した。管腔は広く、一部管腔内に滴状の顆粒が観察されることもあった (Fig.3E)。PGE₂ 投与後 10 分では対照群と比較して、顆粒管細胞内に分泌顆粒が多量に存在し、管腔は狭小化、あるいはほとんど

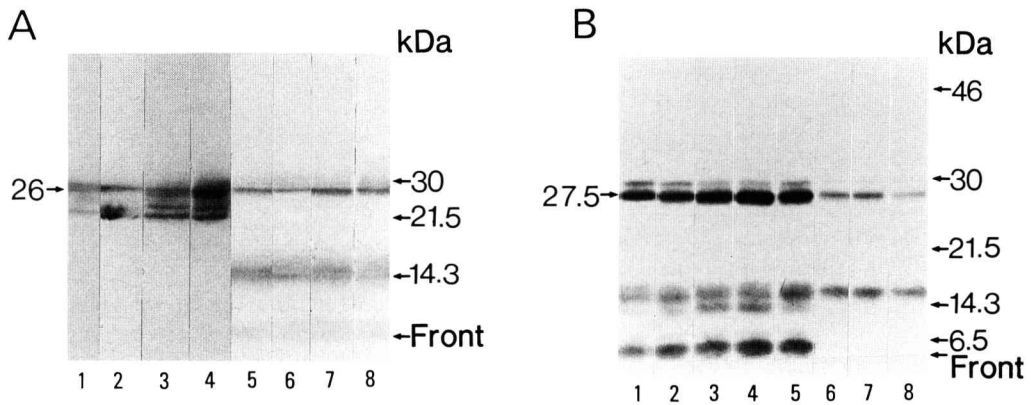


Fig. 2 Immunoblotting detection of TAMEase molecules in male and female mouse submandibular glands. A) Male mice were injected with a vehicle (lane 1, 5) or 480 ng/g body weight of PGE₂ (lane 2-4, 6-8), and killed immediately (lane 1, 5), 10 minutes (lane 2, 6), 1 hour (lane 3, 7), and 24 hours (lane 4, 8) after the injection. Five μ l of crude extracts of mouse submandibular glands were run on a SDS-PAGE gel under the non-reduced (lane 1-4) or the reduced (lane 5-8) condition. The immunoblotting analysis was performed using a specific antibody to purified TAMEase as described in "Materials and Methods". Arrows indicate the positions of molecular weight markers: carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), and lysozyme (14.3 kDa).

B) Male (lane 1-5) and female (lane 6-8) mice were injected with a vehicle (lane 1, 6), PGE₁ (lane 2), PGE₂ (lane 7), PGF_{1 α} (lane 3), PGF_{2 α} (lane 4, 8) or PGI₂ (lane 5). After 24 hours, SDS-PAGE was carried out under the reduced condition, and immunoblotting was performed. Arrows indicate the positions of molecular weight markers: ovalbumin (46 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.3 kDa), and aprotinin (6.5 kDa).

ど閉塞していた (Fig. 3A)。24 時間後では細胞内に顆粒が多量に残存するものの、管腔は対照群とほぼ同程度に広く、顆粒の管腔への分泌の回復が示唆された (Fig. 3B)。PGF_{2 α} でも同様な所見がみられた (Fig. 3C, D)。これらの組織を抗 TAMEase 抗体を用いて免疫組織化学的に検索したところ、対照群では管腔は広く、顆粒管細胞の管腔側に抗 TAMEase 抗体陽性顆粒が中等度に認められた (Fig. 4E)。PGE₂ 投与後 10 分では、抗 TAMEase 抗体に陽性の顆粒は対照群に比較し H・E 染色と同様に顆粒管細胞の管腔側に多量に存在し、管腔は顕著に狭くなった (Fig. 4A)。24 時間後では顆粒管細胞の管腔側には抗 TAMEase 抗体陽性の顆粒が未だ多量に認められたが、管腔の空隙は観察された (Fig. 4B)。PGF_{2 α} でも同様な所見が観察された (Fig. 4C, D)。

考 察

PG は炎症メディエーターとしての作用のほかに、骨の吸収および形成⁴⁰⁾、血球および免疫細胞の分化誘導、癌遺伝子の制御などに関連するきわめて多様な機能を果たしている⁴¹⁾が、臨床的には、その多彩な生理活性のため、さまざまな疾患の治療に使われるようになってきた。生体中では常に生理作用を行う部位で産生され、作用を発現した後は、ただちにその部位ないしは近傍の細胞で分解されてしまうため“局所ホルモン”とも呼ばれている。PG は顎下腺においてレニンなど多くの生理活性物質の合成や分泌に影響を及ぼすことが知られているものの、その作用機序をはじめとして細胞あるいは分子レベルでの解析は進んでいない。本研究では、各種 PG がマウス顎下腺のエステロプロテアーゼである TAMEase におよぼす影響を検

討した。

PGE₂ 投与後の TAMEase 活性を経時的に測定した結果、投与後 20 分より活性が上昇し、48 時間経過後でも活性は維持されていた (Fig. 1)。すなわち、短時間でマウス顎下腺内の TAMEase 活性が上昇するという本研究の結果は、本酵素の活性上昇がタンパク質合成を介さないで誘導されることを示唆し、他方では活性上昇が顆粒管細胞からの分泌阻害の結果である可能性を支持するものである。TAMEase は分泌タンパクであるので、PGE₂ 投与による顎下腺内 TAMEase の活性上昇が、TAMEase の合成促進によるものか唾液の分泌阻害による結果もたらされたものかを検討する目的で、つぎに顎下腺内と唾液中の TAMEase 活性をそれぞれ測定し、その分布を調べるとともに PGE₂ 投与の効果を検討した。その結果、対照群と比較し PGE₂ 投与群では相反した TAMEase 活性の分布を呈した。すなわち、PGE₂ 投与群では顎下腺内の TAMEase 活性の著明な上昇とともに唾液中の活性の減少が認められた (Table 1)。これらの結果から、PGE₂ 投与による顎下腺内 TAMEase 活性の上昇は、唾液中への TAMEase の分泌が抑制された結果惹起されたものと考えられた。

内因性の PG 合成を抑制する目的で、PG 合成過程におけるアラキドン酸より中間代謝産物の PGG₂ (PG エンドペルオキシド) を生成する過程を触媒する酵素であるシクロオキシゲナーゼに対する阻害剤のインドメタシンをマウスに単独投与および PGE₂ と併用投与した。結果は予想に反し、インドメタシン単独投与により顎下腺内 TAMEase 活性は抑制されず、逆に PG を投与した群と同様に上昇した (Table 2)。また、PG と併用した群では活性はさらに上昇した。この結果は、定常状態における雄マウス顎下腺内の内因性 PG 量がもともと少ないため阻害剤の効果は無視できるほど少なく、活性の抑制として検出されなかったという可能性、あるいはインドメタシンの投与が PG の合成阻害を介さずにあらたに TAMEase の活性上昇をも

たらした可能性を示唆するものである。Fazekas ら⁴²⁾はウサギを用いた実験においてインドメタシンが唾液流量を減少させるとの報告をしており、本実験においてもインドメタシン自身が唾液の分泌を抑制した結果、顎下腺内 TAMEase 活性上昇をもたらした可能性が考えられた。

PGE₂ 投与後の顎下腺内 TAMEase 分子の経時変動をイムノブロット法により検討した結果、還元、非還元各条件下ともに経時的にメインバンド (27.5 kDa, 26 kDa) の有意な増強が確認され、抗体で認識される TAMEase の量的な増加が示された (Fig. 2A)。この結果ならびに Fig. 1 でみられた活性上昇の結果から、PGE₂ 投与による TAMEase 活性の上昇は、26 kDa ならびに 27.5 kDa の TAMEase 分子の増加と相関することが明らかとなった。各種 PG を投与し還元条件下における TAMEase 分子の変動を調べた結果は、PGE₂ の他に PGF_{1α}、PGF_{2α} および PGI₂ にも PGE₂ と同様に 27.5 kDa の抗 TAMEase 抗体と結合する分子の増加作用のあることが明らかとなった (Fig. 2B)。

H・E 染色と免疫組織化学染色法を用いた TAMEase 分子の顎下腺内の局在を調べた結果は、TAMEase 分子が顎下腺顆粒管細胞の分泌顆粒に局在することを示し (Fig. 3E, Fig. 4E)、これまでの多くの報告と一致した^{43,44)}。また、PGE₂ および PGF_{2α} 投与後 10 分には管腔は閉塞するほど、顆粒管細胞には分泌顆粒が充満し、TAMEase 分子を含む分泌顆粒の管腔への分泌阻害が起こっていることが判明した (Fig. 3A, C, Fig. 4A, C)。さらに、再び管腔の空隙がみられるようになる 24 時間後も顆粒管細胞内には抗 TAMEase 抗体陽性顆粒が、未だ多量に存在していたことから (Fig. 4B, D)、TAMEase の分泌阻害は比較的長時間にわたり維持されることが示された。また、これら免疫組織化学的所見は、PGE₂ ならびに PGF_{2α} 投与による TAMEase 活性の上昇 (Fig. 1) およびイムノブロット法によりみられた TAMEase 分子の増加 (Fig. 2) が投与後 24 時間後も維持

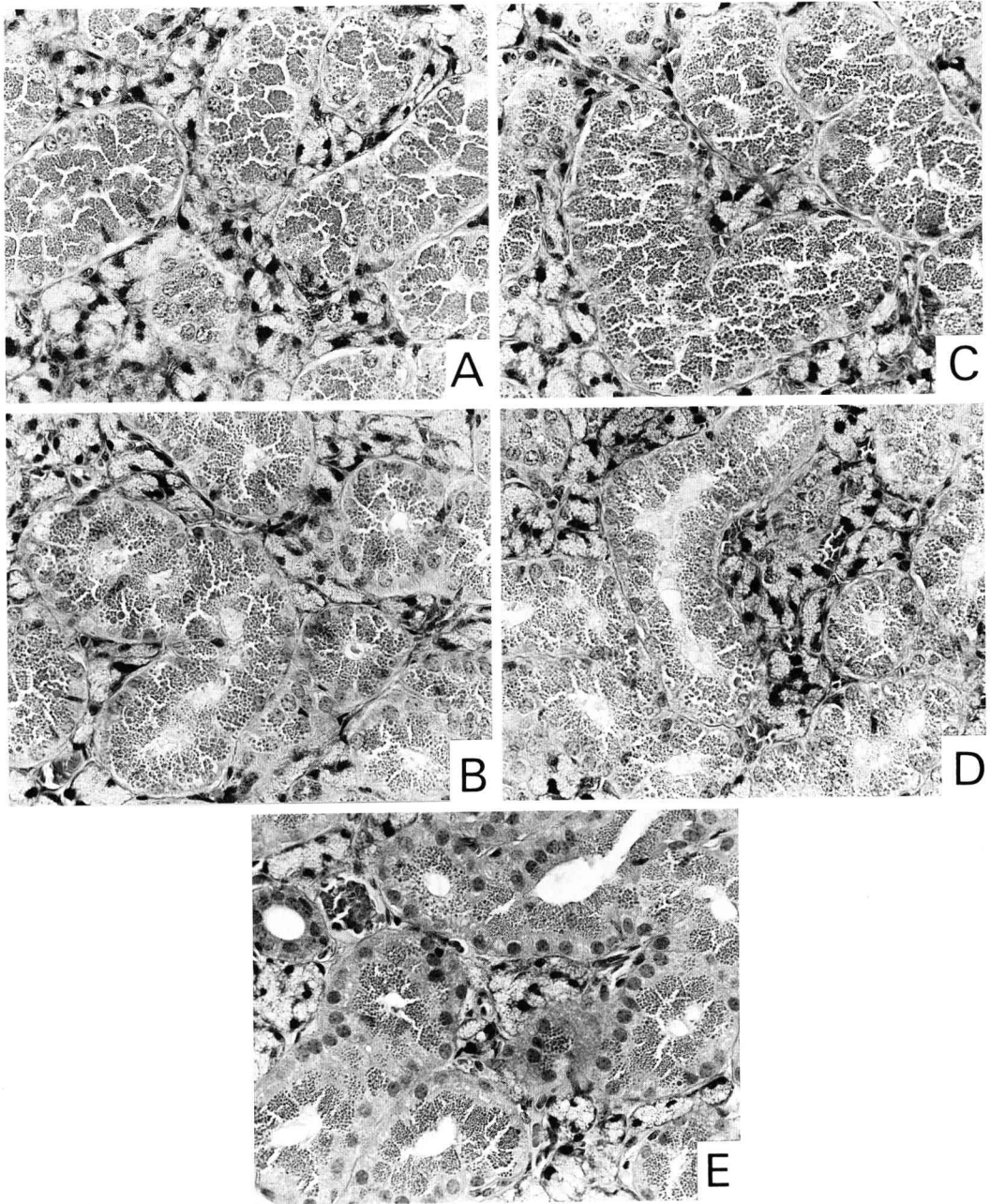


Fig. 3 Photomicrographs of the submandibular glands of male mouse administered with prostaglandin E_2 or $F_{2\alpha}$. Mice were injected intraperitoneally with a vehicle (E), 480 ng/g body weight of PGE_2 (A, B) or the same dose of $PGF_{2\alpha}$ (C, D). The mice were killed 10 minutes (A, C, E) or 24 hours (B, D) later, and the submandibular glands were removed. The glands were immediately fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. Sections were cut, deparaffinized, and stained with hematoxylin-eosin. Light microscopic photographs were taken ($\times 260$).

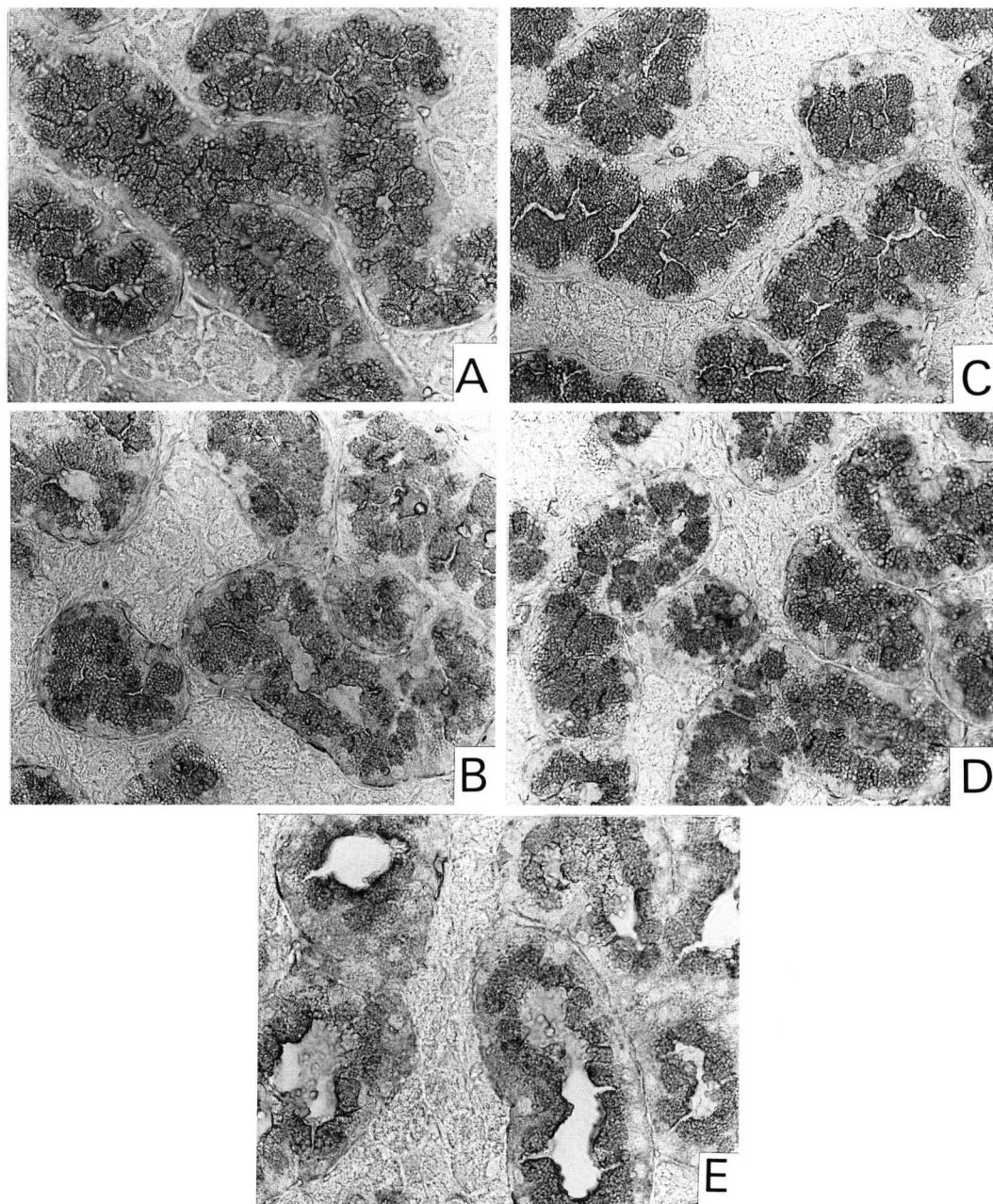


Fig.4 Immunohistostaining of TAMEase in male mouse submandibular glands using anti-TAMEase antibody after the injection of PGE₂ or PGF_{2α}. Mice were injected intraperitoneally with a vehicle (E), 480 ng/g body weight of PGE₂ (A, B) or the same dose of PGF_{2α} (C, D), and killed 10 minutes (A, C, E), or 24 hours (B, D) later. The deparaffinized tissue sections obtained as described in the Legend of Fig.3 were incubated with anti-TAMEase antibody at 25°C for 1hr, and stained according to avidin-biotin peroxidase method. (×260)

されているという結果とも一致した。これらの結果から、PG投与後の顎下腺内TAMEaseの上昇は顆粒管細胞から導管への分泌阻害により

もたらされたものと考えられた。

PGの作用は、細胞膜にその存在が証明されているPGレセプター^{28,45)}とそれに続くキナー

ゼを中心とした各種酵素系の活性化²⁹⁾によるものと推測されるが、その詳細は不明な点が多い。これまでに知られている作用としては、PGE₁やPGE₂がアデニル酸サイクラーゼを活性化してcAMP濃度の上昇を引き起こすこと^{31,46)}、PGF_{2α}は細胞膜リン脂質のホスホリパーゼCによる加水分解を促進してジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸を産生させ、このジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸がそれぞれCキナーゼの活性化と細胞質へのCa⁺⁺の動員を引き起こす⁴⁷⁾ことなどがある。本実験におけるPGE₂ならびにPGF_{2α}によるTAMEaseの分泌阻害もキナーゼ系による調節を介している可能性が考えられ今後の検討課題となろう。

本実験で用いた精製 mouse esteropeptase は、馬場の報告¹⁸⁾から propeptase A (EC 3, 4, 21, 40) に相当すると考えられていたが、最近の esteropeptase に関するクローニングを含めた一連の研究の進歩により、各々の研究者により別個に命名されていた多くの esteropeptase^{26,48)} は、腺性カリクレイン gene family として統一された⁴⁹⁾。このなかで、マウスの腺性カリクレイン (mouse glandular kallikrein, mGK) は機能や構造の違いから 26 種に分類された。これらカリクレインは、顎下腺のアンドロゲン応答性を示す顆粒管細胞に発現されている^{43,44)}。mGK-9 ならびに 13 は EGF 結合タンパクであり、mGK-3 ならびに -4 はそれぞれ NGF の γ ならびに α サブユニットであり、mGK-22 は β -NGF エンドペプチダーゼを示すものとされた。本実験で抗体の作成に用いた精製 esteropeptase, すなわち馬場らの報告による protease A は、分子量 27 kDa, 等電点 5.8 ならびにアミノ酸分析の結果より、新しく統一された命名法においては mGK-22, すなわち β -NGF エンドペプチダーゼに相当すると考えられる^{18,49,50)}。

β -NGF エンドペプチダーゼは β -NGF の N 末端ペプチドを加水分解する酵素であり、NGF 機能の調節に関わっていると考えられている。

顎下腺において、NGF は ProNGF の形で合成され、その後 proteolysis によるプロセッシングを経て活性型すなわち β -NGF に変換され^{15,16)}、こうして生成された活性型 β -NGF は、外分泌あるいは内分泌により生体内の標的組織へと運ばれる。ここで、もし PG が TAMEase の分泌を阻害し、その結果顎下腺内の TAMEase 活性が上昇すると、顎下腺内における NGF の合成やプロセッシングに変化が起こり得ることが予想される。従って今後は、PG 投与後の顎下腺内 NGF の合成やプロセッシングの詳細を検討することも、PG の顎下腺におよぼす生理作用をより深く理解するために必要と思われる。

かくして、マウス顎下腺における PG による TAMEase 活性の調節機構ならびに活性 NGF 合成の制御機構をアンドロゲンなどの関連ホルモンとの関係で、またキナーゼ系を介した転写調節のレベルで解明していくことは非常に興味深いと考えられる。

結 語

マウス顎下腺エステロプロテアーゼ (TAMEase) におよぼす各種プロスタグランジン (PG) の効果を活性の変動、分子の消長、組織内における局在の各面から検討し、以下の成績を得た。

1. PGE₂ ならびに PGF_{2α} を雄マウスに投与すると顎下腺内の TAMEase 活性は上昇した。

2. PGE₂ による顎下腺内 TAMEase 活性上昇は投与後 20 分でみられ、1 時間で最大となりその後 48 時間後もほぼ維持された。一方、顎下腺内における活性上昇に反し、口腔内に分泌された唾液中の TAMEase 活性は投与 1 時間後では減少した。

3. PGE₂, PGF_{1α}, PGF_{2α} ならびに PGI₂ は 26 - 27.5 kDa の抗 TAMEase 抗体で認識される顎下腺内 TAMEase 分子を増加させた。

4. PGE₂ および PGF_{2α} を投与後 10 分で、雄マウス顎下腺の顆粒管細胞内の抗 TAMEase 抗体陽性の顆粒が顆粒管の管腔をほぼ閉塞させ

るほど顕著に増加した。

以上の所見から、雄マウス顎下腺において各種PGにより誘導されたTAMEase活性の上昇あるいはTAMEase量の増加は、PG投与による顎下腺顆粒管細胞からのTAMEaseの分泌阻害による結果もたらされたものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔生化学講座太田稔教授、本研究の機会を与えて下さり、またご鞭撻いただいた口腔外科学第1講座工藤啓吾教授ならびに藤岡幸雄名誉教授に感謝致します。また、本研究の遂行にあたり終始ご指導、ご教示を賜りました口腔生化学講座客本斉子博士に心より謝意を表します。さらに病理学的なご指導、ご教示を頂きました口腔病理学講座畠山節子博士ならびにプロスタグランジンをご提供頂いた小野薬品工業株式会社に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Gresik, E. W. and Barka, T.: Precocious development of granular convoluted tubules in the mouse submandibular gland induced by thyroxine or by thyroxine and testosterone. *Am. J. Anat.* 159 : 177-185, 1980.
- 2) Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. U.: Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48 : 534-569, 1968.
- 3) Barka, T.: Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.* 28 : 836-859, 1980.
- 4) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237 : 1555-1562, 1962.
- 5) Cohen, S., Taylor, J. M., Murakami, K., Michelakis, A. M. and Inagami, T.: Isolation and characterization of renin-like enzymes from mouse submaxillary glands. *Biochemistry* 11 : 4286-4293, 1972.
- 6) Boucher, R., Asselin, J. and Genest, J.: A new enzyme leading to the direct formation angiotensin II. *Circ. Res.* 34 & 35 Suppl. : I-203-209, 1974.
- 7) Bothwell, M. A., Wilson, W. H. and Shooter, E. M.: The relationship between glandular kallikrein and growth factor-processing proteases of

mouse submaxillary gland. *J. Biol. Chem.* 254 : 7287-7294, 1979.

- 8) Hosoi, K., Ueha, T., Fukuuchi, H., Kohno, M. and Takahashi, T.: Reversal of relative proteinase F activity and onset of androgen-dependent proteinases in the submandibular gland of post-natal mice. *Biochem. Int.* 22 : 179-187, 1990.
- 9) Chopra, D. P. and Xue-Hu, I. C.: Secretion of α -amylase in human parotid gland epithelial cell culture. *J. Cell. Physiol.* 155 : 223-233, 1993.
- 10) Byyny, R. L., Orth, D. N. and Cohen, S.: Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* 90 : 1261-1266, 1972.
- 11) Hendry, I. A.: Developmental changes in tissue and plasma concentrations of the biologically active species of nerve growth factor in the mouse, by using a two-site radioimmunoassay. *Biochem. J.* 128 : 1265-1272, 1972.
- 12) Hirata, Y. and Orth, D. N.: Concentrations of epidermal growth factor, nerve growth factor, and submandibular gland renin in male and female mouse tissue and fluids. *Endocrinology* 105 : 1382-1387, 1979.
- 13) Wilson, W. H. and Shooter, E. M.: Structural modification of the NH₂ terminus of nerve growth factor ; purification and characterization of β -nerve growth factor endopeptidase. *J. Biol. Chem.* 254 : 6002-6009, 1979.
- 14) Taylor, J. M., Mitchell, W. M. and Cohen, S.: Characterization of the binding protein for epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 249 : 2188-2194, 1974.
- 15) Stach, R. W., Server, A. C., Pignatti, P., Piltch, A. and Shooter, E. M.: Characterization of the γ subunits of the 7S nerve growth factor complex. *Biochemistry* 15 : 1455-1461, 1976.
- 16) Berger, E. A. and Shooter, E. M.: Biosynthesis of β nerve growth factor in mouse submaxillary glands. *J. Biol. Chem.* 253 : 804-810, 1978.
- 17) Boesman, M., Levy, M. and Schenkein, I.: Esteroproteolytic enzymes from the submaxillary gland ; kinetics and other physico-chemical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 175 : 463-476, 1976.
- 18) 馬場利恵 : マウス顎下腺における esteroprotease に関する研究, 歯基礎誌, 28 : 573-589, 1986.
- 19) Baba, R., Kurokawa, R. and Ota, M.: Developmental changes of esteroprotease and androgen receptors in the mouse submandibular gland. *J. Dent. Res.* 66 : 1623-1626, 1987.
- 20) Kurokawa, R., Baba, R. and Ota, M.: Tissue specificities of protease A-like esteroprotease in male mice. *Biochem. Int.* 15 : 295-302, 1987.
- 21) Sato, N., Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Baba,

- R. and Ota, M.: Effects of castration and sex hormones on the androgen receptor of the mouse submandibular gland. *Jpn. J. Oral Biol.* 27 : 640-648, 1985.
- 22) Verna, R., Galli, C., Pascale, E., Pozzi, D., D'Amore, L., Scarpa, S., Frati, L. and Modesti, A.: Prostaglandin-induced storage and secretion of esteroproteases in the mouse submandibular gland. *Cytobios* 46 : 37-41, 1986.
- 23) Clements, J. A., Matheson, B. A., Wines, D. R., Brady, J. M., MacDonald, R. J. and Funder, J. W.: Androgen dependence of specific kallikrein gene family members expressed in rat prostate. *J. Biol. Chem.* 263 : 16132-16137, 1988.
- 24) Clements, J. A., Matheson, B. A., MacDonald, R. J. and Funder, J. W.: Oestrogen administration and the expression of the kallikrein gene family in the rat submandibular gland. *J. steroid Biochem.* 35 : 55-60, 1990.
- 25) Wolf, D. A., Schulz, P. and Fittler, F.: Transcriptional regulation of prostate kallikrein-like genes by androgen. *Mol. Endo.* 6 : 753-762, 1992.
- 26) Hosoi, K., Maruyama, S., Ueha, T., Sato, S. and Gresik, E. W.: Additive and/or synergistic effects of 5 α -dihydrotestosterone, dexamethasone, and triiodo-L-thyronine on induction of proteinases and epidermal growth factor in the submandibular gland of hypophysectomized mice. *Endocrinology* 130 : 1044-1055, 1992.
- 27) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M.: Glucocorticoid regulates secretion of epidermal growth factor in the human salivary gland adenocarcinoma cell line. *J. Endocrinol.* 116 : 451-455, 1988.
- 28) Wu-Wang, C. Y., Wang, S. -L., Yao, P., Slomiany, A. and Slomiany, B. L.: Prostaglandin E₂ receptor of rat submandibular salivary glands. *Archs oral Biol.* 36 : 637-640, 1991.
- 29) Rubin, J. E., Titus, L. and Nanes, M. S.: Prostaglandin E₂ induction of monoblastic differentiation utilizes both cAMP and non-cAMP dependent signalling systems. *Biochem. Biophys. Acta.* 1091 : 87-95, 1991.
- 30) Yu, J. H., Burns, S. and Schneyer, C. A.: Prostaglandin E₁ induced salivary secretion. *Experientia* 38 : 1077-1078, 1982.
- 31) Kim, B. -H.: Studies on the effects of prostaglandins and bradykinin on salivary flow, blood flow and cyclic nucleotide contents in the submaxillary gland of cat. *J. Osaka Dent. Univ.* 16 : 52-66, 1982.
- 32) Vo, C. P., Cassity, N., Ford, D. and Martinez, J. R.: *In-vivo* effects of prostaglandin E₁ and lysine-bradykinin on rat salivary secretions elicited by parasympathomimetic stimulation. *Archs oral Biol.* 28 : 259-262, 1983.
- 33) Yu, J. -H.: Modulating effects of prostaglandins on parasympathetic mediated secretory activities of rat salivary glands. *Prostaglandins* 31 : 1087-1097, 1986.
- 34) Martinez, J. R. and Barker, S.: Effect of prostaglandins on Cl and K transport in rat submandibular salivary acini. *Archs oral Biol.* 32 : 843-847, 1987.
- 35) Bradbury, N. A. and McPherson, M. A.: Actions of prostaglandins E₂ and F_{2 α} on release of ¹⁴C-labelled mucins from rat submandibular salivary acini *in vitro*. *Archs oral Biol.* 32 : 719-722, 1987.
- 36) Lin, C. -S., Puttkammer, S. and Michelakis, A. M.: Prostaglandins and renin release from submaxillary glands *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172 : 472-477, 1983.
- 37) Ohshima, K., Takada, K. and Tsujimoto, A.: Prostaglandin synthesis by murine salivary glands. *Archs oral Biol.* 32 : 751-753, 1987.
- 38) Castellino, F. J. and Sodetz, J. M.: Rabbit plasminogen and plasmin isozymes. *Methods in Enzymology* (ed. by Lorand, L.) Vol. 45, pp 41-63, 1976.
- 39) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 40) 羽毛田慈之, 久米川正好: 骨とプロスタグランジン, 現代医療, 25 : 959 - 982, 1993.
- 41) 腰原康子: プロスタグランジンと細胞分化, 蛋白質核酸酵素, 37 : 937 - 947, 1992.
- 42) Fazekas, A., Pösch, E. and Zelles, T.: Effect of indomethacin on the blood flow of the rabbit submandibular gland. *J. Dent. Res.* 62 : 537-539, 1983.
- 43) Ekfors, T. O. and Hopsu-Havu, V. K.: Immunofluorescent localization of trypsin-like esteropeptidases in the mouse submandibular gland. *J. Histochem.* 3 : 415-420, 1971.
- 44) Ørstavik, T. B., Brandtzaeg, P., Nustad, K. and Halvorsen, K. M.: Cellular localization of kallikrein in rat submandibular and sublingual salivary glands; immunofluorescence tracing related histological characteristics. *Acta histochem.* 54 : 183-192, 1975.
- 45) Yumoto, N., Watanabe, Y., Watanabe, K., Watanabe, Y. and Hayaishi, O.: Solubilization and characterization of prostaglandin E₂ binding protein from porcine cerebral cortex. *J. Neurochem.* 46 : 125-132, 1986.
- 46) Martinez, J. R., Cassity, N. and Barker, S.: Differential effects of prostaglandins and isoproterenol on cAMP content and Na, K pump activity in rat submandibular acini. *Experientia* 43 :

- 1013-1015, 1987.
- 47) Berridge, M. J.: Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220 : 345-360, 1984.
- 48) Berg, T., Schøyen, H., Wassdal, I., Hull, R., Gerskowitch, V. P. and Toft, K.: Characterization of a new kallikrein-like enzyme (KLP-S 3) of the rat submandibular gland. *Biochem. J.* 281 : 819-828, 1992.
- 49) Berg, T., Bradshaw, R. A., Carretero, O. A., Chao, J., Chao, L., Clements-Fahnestock, M., Fritz, H., Gauthier, F. and MacDonald, R. J.: A common nomenclature for members of the tissue (glandular) kallikrein gene families. *Agents Actions* 38 : 19-25, 1992.
- 50) Hosoi, K., Tsunasawa, S., Kurihara, K., Aoyama, H., Ueha, T., Murai, T. and Sakiyama, F.: Identification of mK 1, a true tissue (glandular) kallikrein of mouse submandibular gland : tissue distribution and a comparison of kinin-releasing activity with other submandibular kallikreins. *J. Biochem.* 115 : 137-143, 1994.