HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨芽細胞様MC3T3-E1細胞の各種ATPaseに対するエストロゲンの作用
Author(s)	孔, 令群; 出山, 義昭; 工藤, 智也 他
Citation	北海道歯学雑誌, 33(2), 175-184
Issue Date	2013-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52456
Type	journal article
File Information	13-kong.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　33：175-184，2013.

原　著

骨芽細胞様MC3T3-E1細胞の各種ATPaseに対するエストロゲンの作用

孔　　令群　　出山　義昭　　工藤　智也　　吉村　善隆　　鈴木　邦明

抄　録：本研究は，骨芽細胞様MC3T3-E1（E1）細胞を用い，石灰化に伴う無機イオンの輸送に関与する可能性のある各種ATPaseに対するエストロゲンの作用を明らかにすることを目的として行なった．

各種濃度の17 β-エストラジオール（17 β-E）存在下で10，20，30日間培養したE1細胞のホモジェネートを測定に使用した．アルカリ性ホスファターゼ（ALP）活性とATPase活性は，反応で遊離した無機リンを定量して測定した．

１．ALP活性は，どの日数でも10^{-9}Mから10^{-5}Mの17 β-Eで濃度に依存して増加する傾向を示し，10^{-5}Mでその作用は顕著であった．17 β-EはE1細胞の石灰化を促進し，10^{-5}Mではその作用が強いことを示唆する．２．Na,K-ATPase活性を17 β-Eは20日目に約２倍増加したが，17 β-Eの濃度依存性は認められなかった．３．Ca-ATPase活性は，10^{-9}M及び10^{-7}Mの17 β-E存在下ではコントロールとの有意な差は認められなかったが，10^{-5}Mの17 β-Eではどの日数でも有意に増加した．一方，Ca,Mg-ATPase活性も17 β-Eにより増加したが，17 β-Eの濃度依存性は顕著ではなかった．４．Mg-ATPase活性に対する17 β-Eの作用は，20及び30日ではALPに対する作用に類似していたが，20日での17 β-E濃度依存性は観察されなかった．

以上の結果から，17 β-EによるE1細胞の各イオン輸送ATPase活性の活性化時期は異なったが，ATPaseに対する活性化作用は10^{-5}Mという高濃度で強いことが示唆された．石灰化部位に存在すると推測される，アルカリ性至適pHで高濃度のCaを必要とするATPaseは，10^{-5}Mの17 β-Eで顕著に促進されたことから，石灰化部位にCaを供給するATPaseとなる可能性があると考えられた．

キーワード：エストロゲン，骨芽細胞様細胞，アルカリ性ホスファターゼ，Ca-ATPase

緒　　言

エストロゲンには骨芽細胞の活動を高める作用があり[1]，閉経に伴いエストロゲンが減少すると骨量も減少することからエストロゲンが骨量の維持に重要な役割を担っていると考えられる[2]．男性では類似の構造を持つテストステロンがエストロゲンに変換される．男性でも骨密度の低下と血中エストロゲン量には相関があることが示されており[1]，高齢の男性ではテストステロン量の減少によりエストロゲン量も減少して，骨密度の低下につながると考えられている．生体内のエストロゲンのうちエストラジオールは最も生理活性が高く，なかでも17 β-エストラジオール（17 β-E）は17 α-エストラジオールよりも骨代謝に強く関係する[2, 3]．骨芽細胞様細胞にはエストロゲン受容体が存在している[4]ことから，エストロゲンが骨芽細胞の分化誘導因子や増殖因子として直接作用することが可能である[5, 6]．閉経後の骨粗鬆症の治療薬として，エストロゲン補充療法[7]は世界中で広く行われており，骨密度の増加，女性閉経後の骨粗鬆症の治療，予防及び更年期障害の改善などに有効である[8]．エストロゲンは破骨細胞の働きを抑制する[9]だけでなく，骨芽細胞も直接活性化することによって骨粗鬆症の発生率を下げる[5, 10-11]．しかし，エストロゲンが分子レベルで骨芽細胞を刺激するメカニズム，特に石灰化に伴う無機イオンの輸送に関与する可能性がある各種ATPase活性に対する研究は少ない．

骨組織の形成においては，骨芽細胞がコラーゲンなどの石灰化の基質を合成した後に細胞外へ分泌し，形成された基質にカルシウムやリンが蓄積して石灰化が生じる．そのため，この骨芽細胞の増殖・分化を促進させる薬剤は骨形成を促進させる根本的な骨粗鬆症治療薬及び予防薬となり得る．松山らは培養した骨芽細胞様のMC3T3-E1細胞（E1細胞）に三種のステロイドホルモンのレセプターの存在を発見し，その中でも17 β-EのE1細胞に対する増殖及び分化への直接の刺激作用が最も顕著であると報告した[12]．

〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座細胞分子薬理学教室（主任：鈴木邦明 教授）

骨芽細胞に発現するアルカリ性ホスファターゼ（ALP）は硬組織形成のマーカーとなる酵素である．エストロゲンはある濃度範囲内でE1細胞のALP活性を促進するが，一定の濃度を超えるとE1細胞に細胞毒性を発現し，細胞の増殖，分化を抑制する[12]．骨芽細胞は，多分化能を有する未分化間葉系幹細胞から，骨前駆細胞を経て分化する[13]．骨芽細胞の主な特徴は，in vivo及びin vitroにおける石灰化能，高ALP活性やⅠ型コラーゲンの合成，基質小胞の産生，非コラーゲン性骨有機質の産生能，破骨細胞形成支持能，1.25$(OH)_2D_3$レセプターの存在などが挙げられる[14-16]．本研究では，ヒト骨芽細胞に近い特徴を有するマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株であるE1細胞を選択した．骨原性細胞から骨芽細胞に分化する細胞で，硬組織形成機構の研究に広く用いられている有用な細胞である[17]．

硬組織形成における石灰化の過程でカルシウム（Ca）やマグネシウム（Mg）を輸送するイオン能動輸送ATPaseが関与する可能性があると考えられる．久保田らはE1細胞の形質膜Ca輸送たんぱく質としてCa^{2+}，Mg^{2+}-ATPase Type Ⅰ～Ⅳ全てのisoformが存在すると報告した[18]．森らは，細胞のホモジェネートを用いてATPase活性を測定し，E1細胞のミクロソーム分画にCa及びMg依存性でアルカリ性に至適pHを示すATPaseが存在することを報告した[19]．また小畑らは，その両者の分離精製が可能であることを報告した[20]．

本実験では，E1細胞のタンパク質量及びALP活性の亢進に対するエストロゲンの作用を確認したのち，細胞内外のイオン環境の維持に必須なNa,K-ATPase及びCaなど無機イオンの輸送に関与する可能性があるCa-ATPase，Mg-ATPase，Ca,Mg-ATPase活性に対するエストロゲンの作用を検討した．我々の知る限り，本報告はE1細胞の各種ATPaseの活性変化におけるエストロゲンの作用に関する初めての報告である．

材料及び方法

1．MC3T3-E1細胞の培養及び回収

E1細胞は理化学研究所細胞開発バンクより購入した．α-minimum essential medium（α-MEM）と牛胎児血清（FBS）はGibco-BRL社製（MD，米国）を用いた．10^{-9}Mから10^{-4}Mまでの各濃度の17β-E存在下で，E1細胞を5%CO_2－95%空気下（37℃），10% FBSを加えたα-MEM中で通法に従い培養した．10，20及び30日間培養した後に細胞を回収して，超音波処理によるホモジェネートを作成し，冷凍して実験に使用した．

2．タンパク質量の測定

牛血清アルブミン（BSA）を標準タンパク質として，Lowry法[21]によりタンパク質量を測定した．

3．ALP活性の測定

ALP活性の測定は，*p*NPP（*p*-nitrophenyl phosphate）を基質として，pH 10.13で37℃，30分間反応させた後，酵素反応の結果生成された無機リン量をChifflet法[22]に従って定量することにより計測した．ALPの可逆的・非競合的な阻害剤である最終濃度５mMのtetramisole存在下で検出される値を対照として差し引いた．

4．ATPase活性の測定

Ca-ATPase活性及びMg-ATPase，Ca,Mg-ATPase，Na,K-ATPaseの活性は，ATP加水分解の結果生成された無機リン量をChifflet法[22]に従って定量することにより計測した．

各ATPase活性の測定条件は，ATPase活性のpH依存性と金属イオンの濃度依存性を測定する実験を行なって，決定した．

Ca-ATPase活性は，1 mM EDTA-trisを含む最終濃度25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer（pH 8.5），及び2.5 mM $CaCl_2$を反応液に加え，最終濃度５mMとなる50 μlのATP-trisを加えて，37℃で30分間反応させた．20 mM EDTA存在下で検出される値を対照として差し引いた．

Ca,Mg-ATPase活性は，EDTAを含まない25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer（pH 7.4），0.1 mM $CaCl_2$，1 mM $MgCl_2$，154 mM Na_3N，100 mM KCl，0.1 mM BAPTAを反応液に加え，最終濃度１mMとなる50 μlのATP-trisを加えて，反応を開始し，37℃で30分間反応させた．最終濃度3 mMとなるEGTA存在下で検出される値を対照として差し引いた．

Mg-ATPase活性の測定は，１mM EDTA-trisを含む最終濃度25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer（pH8.5），及び2.5 mM $MgCl_2$を反応液に加えた後，最終濃度５mMとなる50 μlのATP-trisを加えて反応を開始し，37℃で30分間反応させた．最終濃度20 mM EDTA存在下で検出される値を対照として差し引いた．

Na,K-ATPase活性の測定は，１mM EDTA-trisを含む最終濃度25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer（pH 7.4），及び160 mM NaCl，16 mM KCl，５mM $MgCl_2$を反応液に加え，最終濃度５mMとなる50 μlのATP-trisを加えて反応を開始させ，37℃で30分間反応させた．Na,K-ATPase活性の特異的な阻害剤である最終濃度２mMのouabain存在下で検出される値を対照として差し引いた．

5．試　薬

ATPはATP-$(tris)_2$（SIGMA, St.Louis, MO）を，その他のすべての試薬は特級または生化学用試薬を使用した．

6．データ処理

ALP活性とATPase活性は，一つの測定条件に対して

triplicateで測定した平均値とSDを求めてグラフに示し，有意性の検定にはStudentのｔ検定を用いた．

結　　果

１．E1細胞のALP活性のpH依存性及び*p*NPP濃度依存性

E1細胞の活性はpH 8.5以上のpH値の上昇に伴って増加し，pH 10.13において最大値に達した（図１．a）．ALP活性は基質*p*NPP濃度に依存して増加し，３mM以上で最大活性値を示した（図１．b）．

２．Ca-ATPase活性のpH依存性及びCa濃度依存性

Ca-ATPase活性はpH値の上昇に伴って増加し，9.45付近で最大値を示した．活性の至適pHはアルカリ性であった（図２．a）．Ca-ATPase活性はCa濃度に依存して増加し，１mM以上で最大値を示した（図２．b）．

３．Ca,Mg-ATPase活性のpH依存性及びCa濃度依存性

Ca,Mg-ATPase活性はpH ８付近で最大値を示した（図３．a）．また，Ca,Mg-ATPase活性はCa濃度に依存して増加し，100 μM程度で最大となったが，200 μM以上では逆に抑制された（図３．b））．

４．Mg-ATPase活性のpH依存性及びMg濃度依存性

Mg-ATPase活性はpH値の上昇に伴って増加し，9.45付近で最大値を示した．活性の至適pHはアルカリ性であった（図４．a）．また，Mg-ATPase活性はMg濃度に依存して増加し，２mM以上のMg濃度で最大値を示した（図４．b）．

５．Na,K-ATPase活性のpH依存性

MC3T3-E1細胞のNa,K-ATPase活性のpH依存性測定はアルカリ性領域において困難であった．そこで本研究において使用している緩衝液を用いてラット脳のNa,K-ATPase

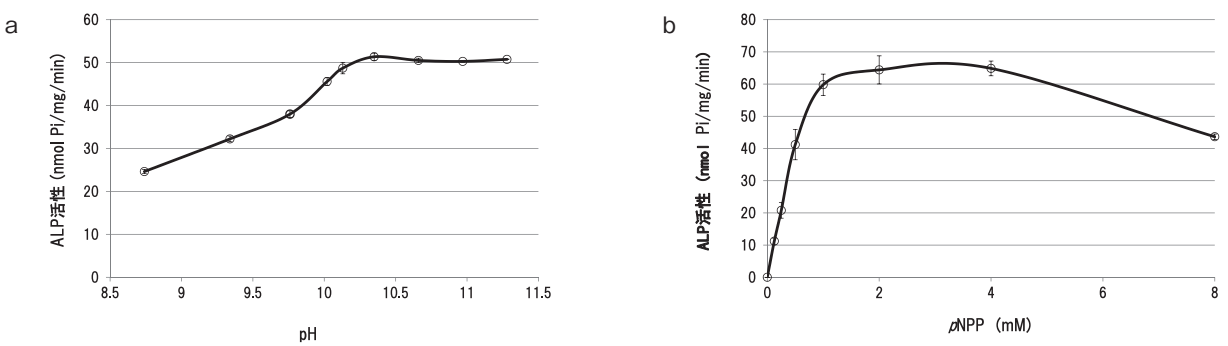

図１　E1細胞のALP活性のpH依存性（図１．a）および*p*NPP濃度依存性（図１．b）

ALP活性の測定は，*p*NPPを基質として，37℃，30分間反応させた後，酵素反応の結果生成された無機リン量をChifflet法に従って定量することにより計測した．阻害剤であるtetramisole存在下で検出される値を対照として差し引いた．（図１．a）E1細胞のALP活性はpH p8.5より徐々に増加し，pH 10.13において最大値を示した．（図１．b）E1細胞のALP活性は基質*p*NPP濃度に依存して，３mM以上で最大値を示した．

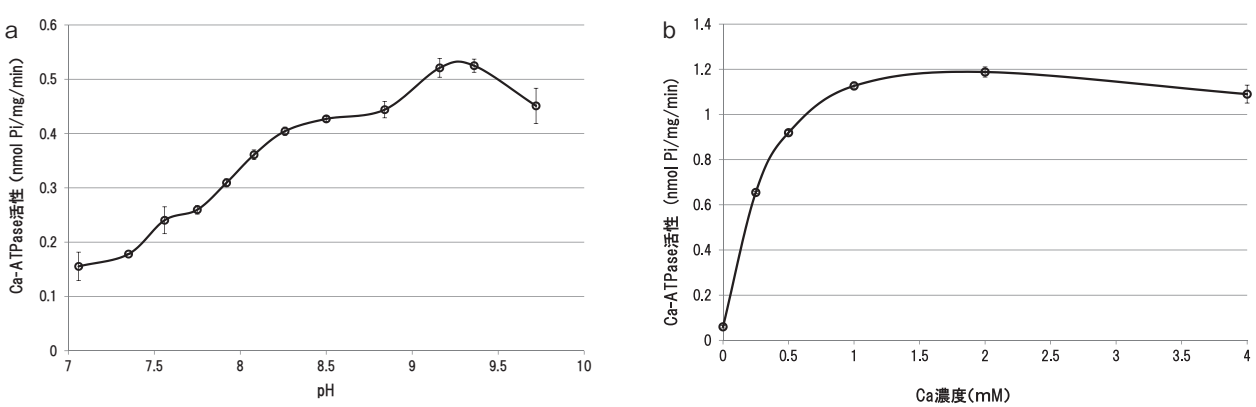

図２　E1細胞のCa-ATPase活性のpH依存性（図２．a）およびCa濃度依存性（図２．b）

Ca-ATPase活性は，１mM EDTA-trisを含む最終濃度25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer及び$CaCl_2$を反応液に加え，最終濃度５mMとなるATP-trisを加えて，37℃で30分間反応させた．20 mM EDTA存在下で検出される値を対照として差し引いた．（図２．a）Ca-ATPase活性はpHの増加に伴って増加する傾向を示し，9.45付近で最大値を示した．（図２．b）Ca-ATPase活性はCa濃度に依存して増加し，１mM以上で最大値を示した．

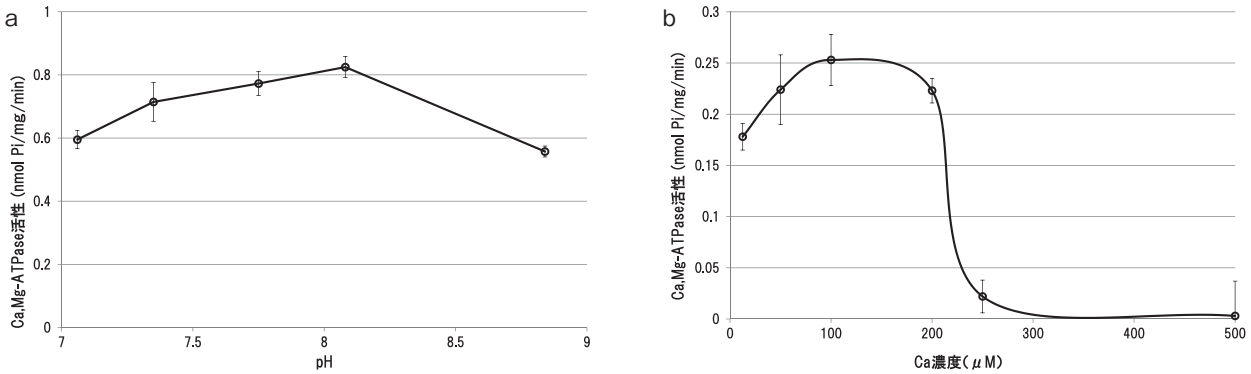

図３　E1細胞のCa,Mg-ATPase活性のpH依存性（図３.a）およびCa濃度依存性（図３.b）

Ca,Mg-ATPase活性は，EDTAを含まない25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer，$CaCl_2$，1 mM $MgCl_2$，154 mM Na_3N，100 mM KCl，0.1 mM BAPTAを反応液に加え，最終濃度１mMとなるATP-trisを加えて反応を開始し，37℃で30分間反応させた．最終濃度３mMとなるEGTA存在下で検出される値を対照として差し引いた．（図３.a）Ca,Mg-ATPase活性はpHの増加に伴って増大しpH ８前後で最大となった．（図３.b）Ca,Mg-ATPase活性はCa濃度100 μM程度で最大となり，200 μM以上では逆に抑制された．

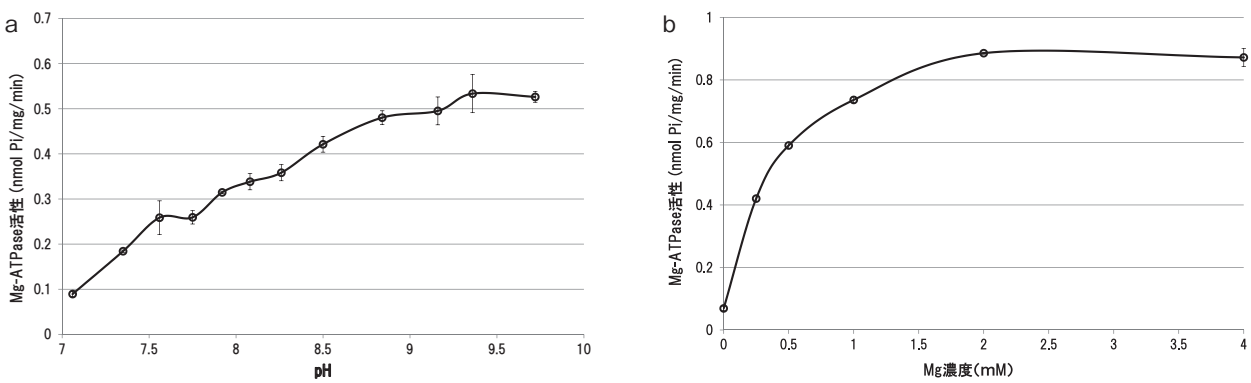

図４　E1細胞のMg-ATPase活性のpH依存性（図４.a）およびMg濃度依存性（図４.b）

Mg-ATPase活性の測定は，１mM EDTA-trisを含む最終濃度25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer，及び$MgCl_2$を反応液に加えた後，最終濃度５mMとなるATP-trisを加えて反応を開始し，37℃で30分間反応させた．最終濃度20 mMのEDTA存在下で検出される値を対照として差し引いた．（図４.a）Mg-ATPase活性はpHの増加に伴って増加し，9.45付近で最大値を示した．（図４.b）Mg-ATPase活性はMg濃度に依存して増加し，２mM以上のMg濃度で最大値を示した．

活性のpH依存性を測定した．活性は中性よりややアルカリ性付近で最大値を示した（図５）．

６．E1細胞のタンパク質量の17 β-Eによる経時的変化

E1細胞を10^{-8}，10^{-6}及び10^{-4}Mの17 β-E存在下で培養して，10日，20日及び30日目にそれぞれ回収したホモジェネートのタンパク質量を測定した結果を図に示す（図６）．培養日数が増加すると，E1細胞の平均タンパク質量は増加したが，どの日数においても，DMSO添加のコントロールに対して，10^{-8}及び10^{-6}Mの17 β-Eは顕著な影響を示さなかった．一方，17 β-Eの濃度が10^{-4}Mに増加すると，どの日数においてもE1細胞のタンパク質量は有意に減少した．

７．E1細胞のALP比活性に対する17 β-Eの影響

17 β-Eの有無にかかわらずALP活性は20日目に最大値を示し，30日目では低下した（図７）．10日，20日，30日

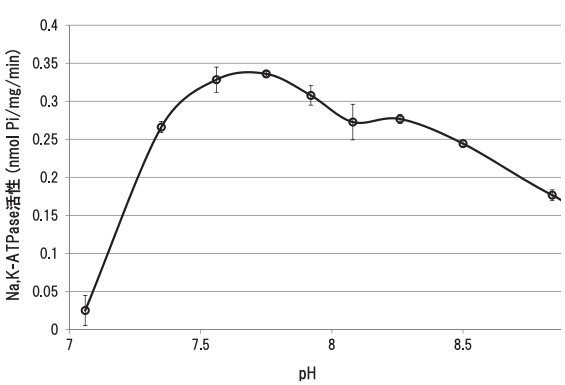

図５　ラット脳Na,K-ATPase活性のpH依存性

Na,K-ATPase活性の測定は，１mM EDTA-trisを含む最終濃度25 mMのsucrose，50 mM tris-HCl buffer，及び160 mM NaCl，16 mM KCl，５mM $MgCl_2$を反応液に加え，最終濃度５mMとなるATP-trisを加えて反応を開始させ，37℃で30分間反応させた．Na,K-ATPase活性の特異的な阻害剤である最終濃度２mMのouabain存在下で検出される値を対照として差し引いた．Na,K-ATPase活性はpH 7.6～7.8で最大値を示した．

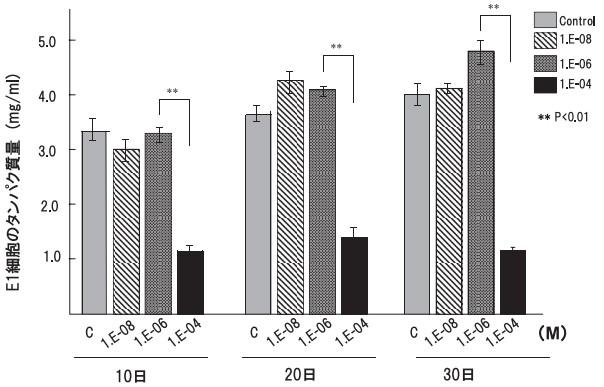

図６　E1細胞のタンパク質量の経時的変化に対する17 β-Eの影響

E1細胞を“材料と方法”で記したように培養し，10，20，30日目に回収したホモジェネートのたんぱく質量をLowry法で測定した．10日目，20日目と30日目のE1細胞の平均タンパク質量は増加したが，どの日数でも，DMSO添加のコントロールに対して，10^{-8}M及び10^{-6}Mの17 β-Eは顕著な影響は示さなかった．一方，17 β-Eの濃度が10^{-4}Mに上がると，どの日数でもE1細胞のタンパク質量は有意に減少した．図の中に，コントロール値を（□），17 β-Eの濃度1.0×10^{-8}Mを（▨），1.0×10^{-6}Mを（▩），1.0×10^{-4}Mを（■）として表した．

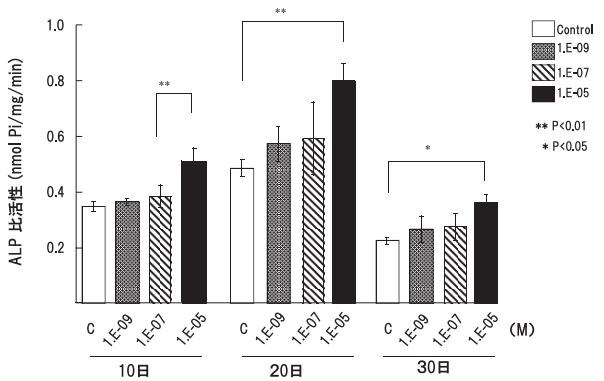

図７　E1細胞のALP比活性に対する17 β-Eの影響

MC3T3-E1細胞を“材料及び方法”で記したように培養し，実験10，20，30日目のホモジェネートのALP比活性をChifflet法で測定した．ALP比活性はどの日のホモジェネートとも17 β-E濃度10^{-9}，10^{-7}，10^{-5}Mの順に有意に増加した．特に，10^{-5}Mにおいては，ALP活性の増加は顕著であった．また20日目で最大値を示し，30日目ではALP活性は減少した．図の中に，コントロール値を（□），17 β-Eの濃度1.0×10^{-9}Mを（▨），1.0×10^{-7}Mを（▨），1.0×10^{-5}Mを（■）として表した．

目それぞれにおいて，ALP活性は17 β-E濃度が10^{-9}，10^{-7}，10^{-5}Mと増加すると，有意に増加した．特に10^{-5}Mにおいては，ALP活性の増加は顕著であった．

8．E1細胞のNa,K-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響

図８に示すようにE1細胞のNa,K-ATPase活性は，20日目において17 β-E存在下でコントロールのDMSO群より約２倍増加した．しかし，17 β-Eの濃度依存性は認められなかった．10日及び30日でも，17 β-EはNa,K-ATPase活性を促進した．

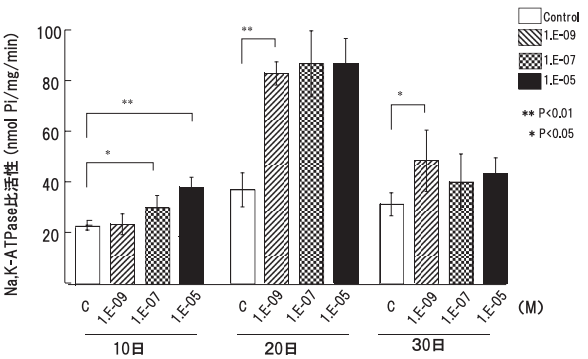

図８　E1細胞のNa,K-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響

DMSOをコントロールとして，17 β-E各濃度下で培養したE1細胞のNa,K-ATPase活性をChifflet法で測定した．Na,K-ATPase活性は17 β-E存在下で，20日目にコントロールのDMSO群より約２倍増加したが，17 β-Eの濃度依存性は認められなかった．10日，30日でも，17 β-EはNa,K-ATPase活性を促進した．図の中に，コントロール値を（□），17 β-Eの濃度1.0×10^{-9}Mを（▨），1.0×10^{-7}Mを（▩），1.0×10^{-5}Mを（■）として表した．

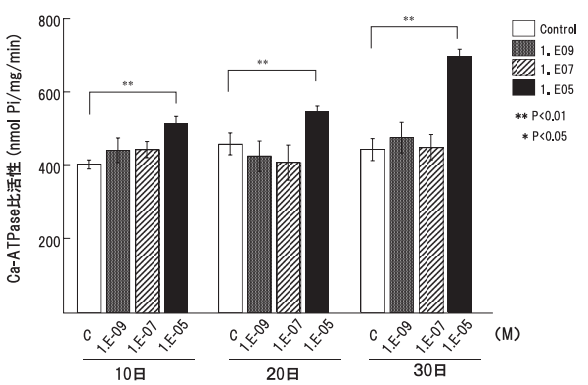

図９　E1細胞のCa-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響

Ca-ATPaseの最大活性を示す至適pH 8.5付近でCa濃度2.5 mMでCa-ATPase比活性をChifflet法で測定した．Ca-ATPase比活性は，10日目，20日目，30日目とも10^{-5}Mでは，有意に増加したが，10^{-9}M及び10^{-7}Mではコントロールとの有意な差は認められなかった．図の中に，コントロール値を（□），17 β-Eの濃度1.0×10^{-9}Mを（▨），1.0×10^{-7}Mを（▨），1.0×10^{-5}Mを（■）として表した．

9．E1細胞のCa-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響

Ca-ATPaseの比活性は，10日，20日及び30日目において，10^{-5}Mでは有意に増加したが，10^{-9}及び10^{-7}Mではコントロールとの有意な差は認められなかった（図９）．

10．E1細胞のCa,Mg-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響

Caとの親和性が高いCa,Mg-ATPase活性は，10，20及び30日目において17 β-E存在下でコントロールより高い

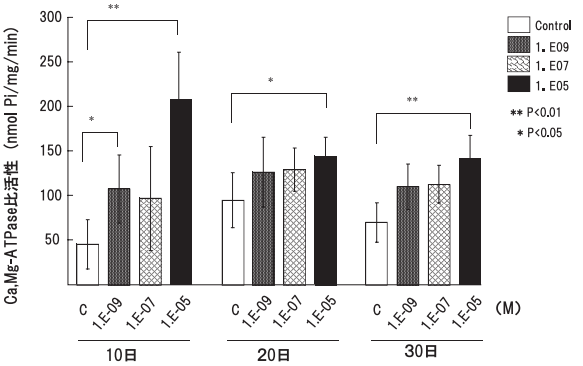

図10　E1細胞のCa,Mg-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響
Ca^{2+}との親和性の高いE1細胞のCa,Mg-ATPaseの活性をpH 7.4で，0.1 mMのCa濃度で測定を行った．Ca,Mg-ATPase活性は，10，20，30日目とも17 β-E存在下でコントロールより高い値を示したが，10日目の10^{-5}Mを除いて，17 β-Eの濃度依存性は顕著ではなかった．図の中に，コントロール値を（□），17 β-Eの濃度1.0×10^{-9}Mを（▩），1.0×10^{-7}Mを（▨），1.0×10^{-5}Mを（■）として表した．

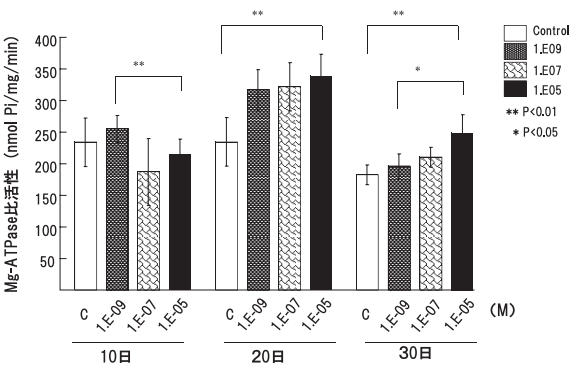

図11　E1細胞のMg-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響
Mg-ATPaseの活性をpH 8.5で測定した．Mg-ATPase比活性は20及び30日目で，17 β-E存在下で高い値を示したが，10日での17 β-E依存性は観察されなかった．図の中に，コントロール値を（□），17 β-Eの濃度1.0×10^{-9}Mを（▩），1.0×10^{-7}Mを（▨），1.0×10^{-5}Mを（■）として表した．

値を示したが，10日目の10^{-5}Mを除いて，17 β-Eの濃度依存性は顕著ではなかった（図10）．

11．E1細胞のMg-ATPase比活性に対する17 β-Eの影響

Mgの輸送に関与する可能性のあるMg-ATPase比活性は20及び30日目で17 β-E存在下で高い値を示したが，10日での作用は観察されなかった（図11）．

考　　察

1．E1細胞のタンパク質量について

E1細胞のタンパク質量は，10，20，30日目と培養日数が増加すると増加し（図6），細胞増殖及び細胞外基質の増加を反映すると考えられる．どの日数でも，DMSO添加のコントロールに対して，10^{-8}及び10^{-6}Mの17 β-Eは顕著な影響を示さなかったことから，E1細胞の細胞増殖及び細胞外基質の増加には顕著な影響を与えないことを示唆する．一方，17 β-Eの濃度が10^{-4}Mに上がると，どの日数でもE1細胞のタンパク質量は有意に減少して，細胞増殖抑制作用を示唆する．従って，活性測定の実験における17 β-Eの濃度は10^{-9}，10^{-7}及び10^{-5}Mとした．この結果は，17 β-Eは，生理的濃度を超えた高濃度では，細胞に対して毒性を示すことを示唆している[12]．

2．ALPについて

ALPは石灰化マーカーであり，リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒して石灰化を促進すると考えられる．E1細胞のALPは17 β-Eの有無にかかわらず，20日目で高い値を示した．17 β-E存在下で，E1細胞のALP活性は10日，20日及び30日目において，17 β-E濃度が10^{-9}，10^{-7}，10^{-5}Mと増加すると濃度に依存して有意に増加した．17 β-Eは濃度依存的にE1細胞のALP活性を亢進し，石灰化を促進することを示唆する（図7）．

今回の研究で，20日目の17 β-E存在下のALP比活性は10日目のそれぞれの17 β-E存在下のALP比活性と比べて顕著な増加傾向を示した．しかし，30日目になると逆に10日目のALP比活性よりも小さい値を示し，20日目で17 β-EのALPに対する効果が最も顕著であった．Bodine[23]らは，骨芽細胞にあるエストロゲンのレセプターのmRNAレベルについて，同様の傾向を見出した．

エストロゲンのALP活性促進作用は骨芽細胞の分化段階によって異なり，20日目までのE1細胞のALP活性は17 β-Eの影響を受けて上昇しやすいという報告がある[4, 5, 24]．また，石灰化の後期になると，エストロゲンレセプターのmRNAレベルが下がり[23]，17 β-Eの影響が低下すると推測される．E1細胞にはALP活性が上昇しなくても石灰化を示すという報告もあるので[13]，ALP活性の上昇だけで石灰化を説明することはできないが，異なる分化段階によるエストロゲンの促進作用の変動はin vivoでの石灰化促進効果と関連する可能性がある．

3．ATPaseについて

ATPaseは生体内に広く存在する酵素であるが，中でも，細胞の形質膜あるいは小胞体膜に存在する酵素には，ATP加水分解エネルギーを用いて無機イオンの能動輸送を行うものが存在する[25~29]．石灰化は骨芽細胞が合成・分泌した細胞外の骨基質にカルシウムやリンが蓄積して生じる．骨細胞や骨芽細胞の細胞内カルシウム濃度は細胞外液に比べて著しく低いため，細胞外のCa^{2+}は濃度勾配に従って骨芽細胞や骨細胞に単純拡散するが，Ca-ATPaseは逆に骨芽細胞内から能動的に細胞外へCa^{2+}を排出して，石灰化を生じさせる可能性がある[14, 15, 30~33]．

本研究で，10^{-9}及び10^{-7}Mの17 β-Eでは10，20，30日

のいずれの細胞培養の期間においてもCa-ATPaseの活性の変化は認められなかったが，10^{-5}Mになると有意に増加した（図９）．この結果はCa-ATPase活性を促進させるには高濃度の17 β-Eを必要とすることを示唆する．Nakanoらは石灰化部位にアルカリ性至適pHで現れる比較的高濃度のCaを必要とするCa-ATPaseが存在することを組織染色の結果から報告している[33]．本研究でE1細胞のホモジェネートを用いて測定したCa-ATPase活性は，おそらくNakanoらの報告にあるCa-ATPaseと同一であり，Ca輸送による石灰化に関与している可能性がある．10^{-5}M 17 β-EによるCa-ATPaseの活性化についてさらに検討する必要がある．

本研究で培養期間にかかわらず，Na,K-ATPase活性は17 β-E存在下で増加傾向を示し，特に20日目では，すべての17 β-E濃度においてNa,K-ATPase活性が顕著に増加した（図８）．Na,K-ATPaseのE1細胞における存在量には異なった報告があるが，これらの結果は，E1細胞にはNa,K-ATPaseが存在し，20日目で17 β-Eによる顕著な活性化を受けることを示す[34, 35]．Na/Ca交換系の関与するCa^{2+}の輸送との関連性に関する研究が必要である[36]．

E1細胞のCa,Mg-ATPase活性も各培養期間において10^{-5}Mで増加傾向が認められた（図10）．Ca,Mg-ATPaseはよく知られたPMCAあるいはSERCAであると考えられ，石灰化のためのCa^{2+}の輸送より，むしろ少量のCaによる細胞内の情報伝達に関与すると考えられるが，17 β-Eにおいて活性化されることによる機能変化について検討が必要である．

Mg-ATPase活性は20日目と30日目に17 β-E濃度に依存してコントロールより上昇を示した（図11）ことから，E1細胞において17 β-Eは，石灰化の中期及び後期にMg-ATPase活性促進作用を強く示すと示唆された．

CaとMgはいずれも硬組織に多いが，CaとPの重要性と比べるとMgの存在意義に関しては，不明な点が多い[37]．CaとMgが相互に関連していると考えられるものに，骨粗鬆症，動脈硬化症，虚血性心疾患，低カルシウム血症，ストレスなどが挙げられる．骨のリン酸カルシウムの安定にMgが必要とする報告もあり，Mgが欠乏すると，骨の形成，吸収，石灰化のいずれも障害されることが知られている[38-40]．また，ATPaseにおいてMgとCaは互換性を持つことが多いことから，17 β-Eによって類似した影響をうける可能性があると考えられる．

結　論

17 β-Eによる各イオン輸送ATPase活性の活性化時期は異なること，ATPaseに対する活性化作用は10^{-5}Mという高濃度の方が強いことが示唆された．

謝　辞

本稿を終えるにあたり，本研究に数々の御援助，御協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます．

文　献

1）Greendale GA, Edelstein S, Barrett-Connor E : Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men. The Rancho Bernardo Study. J Bone Miner Res 12 : 1833-1843, 1997.
2）Takano-Yamamoto T, Rodan GA : Direct effects of 17 beta-estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. Proc Natl Acad Sci U S A 87 : 2172-2176, 1990.
3）Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR : Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science 241 : 81-84, 1988.
4）Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL : Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. Science 241 : 84-86, 1988.
5）Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Vaananen HK, Harkonen P: Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. Bone 22 : 201-209, 1998.
6）Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA :Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. J Bone Joint Surg Am 76 : 713- 721, 1994.
7）Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC: Skeletal effects of estrogen. Endocr Rev 15 : 275-300, 1994.
8）Horst-Sikorska W, Wawrzyniak A : The role of hormonal therapy in osteoporosis. Endocrynol Pol 62 Supl 2 : 19-22, 2011.
9）Qu Q, Harkonen PL, Monkkonen J, Vaananen HK: Conditioned medium of estrogen -treated osteoblasts inhibits osteoclast maturation and function in vitro. Bone 25 : 211-215,1999.
10）Trémollières F, Pouilles JM, Ribot C : Postmenopausal bone loss. Role of estrogens. Presse Med 21 : 903-906, 1992.
11）Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ : Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone-resorption but also by stimulation of bone-formation. J Clin Invest 89 : 74-78, 1992.
12）Matsuyama A, Ouchi Y, Sato F, Hosoi T, Nakamura

T, Orimo H : Characteristics of steroid hormone receptors in cultured MC3T3 -E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferation. Calcif Tissue Int 51 : 376-381, 1992.

13) Katagiri T, Lee T, Takeshima H, Suda T, Tanaka H, Omura S : Transforming growth factor-beta modulates proliferation and differentiation of mouse clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells depending on their maturation stages. J Bone Miner Res 11 : 285-293, 1990.

14) 野田政樹：骨のバイオロジー，13-55，羊土社，東京，1998.

15) 羽毛田慈之：MC3T3-E1について，細胞培養，15：160-164．1989.

16) 山口　朗，池田　通，吉木周作：骨芽細胞の培養，細胞培養，15：155-159，1989.

17) Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S：In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. J Cell Biol 96 : 191-198, 1983.

18) 久保田恵，小矢野和歌子，須田幸子，池田己喜子：骨芽細胞様培養細胞マウスMC3T3-E1細胞におけるCa-ATPase isoformの遺伝子クローニングと発現量の変動．日本栄養・食糧学会大会講演要旨集55回　4：160，2001.

19) 森　幸徳，鈴木　邦明，小畑　真，出山　義昭：骨芽細胞様細胞のカルシウム依存ATPase活性．北海道歯誌24：213-220，2003.

20) 小畑　真，出山　義昭，吉村　善隆，福島　和昭，鈴木　邦明：骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）のカルシウム依存ATPaseの部分精製．北海道歯誌　27：104-111，2006.

21) Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr, AL, Randll, RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275, 1951.

22) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S : A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein : application to lens ATPases. Anal Biochem 168 : 1-4, 1988.

23) Bodine PV, Henderson RA, Green J, Aronow M, Owen T, Stein GS, Lian JB, Komm BS : Estrogen receptor-alpha is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness of gene expression. Endocrinology 139 : 2048-2057, 1998.

24) Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Mizuno Y, Nakamura T, Ouchi Y, Orimo H : Immuno-histochemical detection and northern blot analysis of estrogen receptor in osteoblastic cells, J Bone Miner Res 8 : 1103-1109, 1993.

25) Skou, CJ : The influence of same cautions on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochem Biophys Acta 23 : 394-401, 1957.

26) 林　雄太郎：Na^+-K^+-ATPase の機能と精製，蛋白質核酸酵素28：1201-1217，1983.

27) Glynn IM : Na^+-K^+-transporting adenosine triphosphatase. In the enzymes of Biological Membranes, Martonosi, AN 3 : 35-114, 1985.

28) Inesi G, Meris L.: Kinetic regulation of catalytic and transport activities in sarcoplasmic reticulum ATPase. In the enzymes of Biological Membranes, Martonosi, AN 3 : 157-191, 1985.

29) Bruce A, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Eatoson JD : Moleculer Biology of the cell. Garland Publishing, New York, 1985.

30) Fukushima O, Goshi N, Koda M, Tokudome M : Localization of Ca-ATPase activity at high alkaline pH in bone cell. J Bone Miner Metab 3 : 88-92, 1985.

31) Meszaros JG, Krin NJ : Osteoblasts express the PMCA 1b isoform of the plasma membrane Ca（2+）-ATPase. J Bone Miner Res 10 : 1235-1240, 1993.

32) Hsu HHT, Anderson HC : Evidence of the Presence of a Specific ATPase Responsible for ATP-initiated Calcification by Matrix Vesicles Isolated from Cartilage and Bone. J Biol Chem 271 : 26383-26388, 1996.

33) Nakano Y, Beertsen W, VanDenBos T, Kawamoto T, Oda K, Takano Y : Site-specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane calcium ATPase. Bone 35 : 1077～1085, 2004.

34) Caverzasio J, Selz T, Bonjour JP : Characteristics of phosphate transport in osteoblast-like cells. Calcif Tissue Int 43 : 83-87, 1988.

35) Krieger NS : Demonstration of sodium/ calcium exchange in rodent osteoblasts. J Bone Miner Res 7 : 1105-1111, 1992.

36) Chen X, Huang Y, Wang R, Chen Z, Wu Z : Simultaneous assay of Ca（2+）-ATPase and Na（+）, K（+）-ATPase activities of osteoblast from rat by malachite green colorimetic method, Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao（in Chinese）29 : 427-430, 1998.

37) 斎藤　豪紀，出山　義昭，吉村　善隆，戸塚　靖則，鈴木　邦明：骨芽細胞様細胞のMg^{2+}依存性ATPase活性の性質．北海道歯誌30：61-68，2009.

38) Nishimuta M, Kodama N, Ono K : Magnesium uresis by risk factors for chronic degenerative disease.: Magnesium in Health and Disease. 279–284, John libbey &Co Ltd, London, 1989.
39) Rude RK : Magnesium Deficiency : A Cause of Heterogenous Disease in Humans. J Bone Miner Res 13 : 749–758, 1998.
40) Mortl M, Busse D, Burtel H, Pohl B : Partial purification and characterization of rabbit-kidney brush-border (Ca^{2+} or Mg^{2+}) -dependent adenosine triphosphatase. Biochim Biophys Acta 776 : 237–246, 1984.

ORIGINAL

The effects of estrogen on various ATPases in osteoblastic MC3T3-E1 cells

Lingqun Kong, Yoshiaki Deyama, Tomonari Kudo, Yoshitaka Yoshimura and Kuniaki Suzuki

ABSTRACT : This study was intended to clarify the action of estrogen on a number of ATPases which may participate in the transport of inorganic ions with calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells (E1 cells) . A homogenate of E1 cells cultured for 10, 20, or 30 days in the presence or absence of various concentrations of 17 β-estradiol (17 β-E) were used for measurements. The alkaline phosphatase (ALP) activity and the ATPase activity was assayed by measurements of the inorganic phosphate liberated by the enzyme reaction.

1. The ALP activity showed increases depending on the concentration of 17 β-E from 10^{-9} to 10^{-5} M at all time points, and the action was remarkable with 10^{-5} M. This result suggests that 17 β-E promotes the calcification of E1 celsl and that the action is strongest at 10^{-5} M.
2. 17 β-E had increased Na,K-ATPase activity approximately 2 times on the 20th day, but there was no concentration-dependence of 17 β-E.
3. Ca-ATPase activity did not show statistically signoficant differences with the control in the presence of 10^{-9} and 10^{-7} M 17 β-E, but it increased significantly in 10^{-5} M 17 β-E at any time point. The Ca,Mg-ATPase activity also increased by 17 β-E, but not in a clearly concentration-dependent manned.
4. The effect of 17 β-E on Mg-ATPase activity was similar to that for ALP at 20 and 30 days, but these was no 17 β-E concentration-dependence at 20 days.

These results suggest that the length of maximum activation are different depending on the ion transport ATPase, and that maximum activation was obtained at 10^{-5} M, relatively high concentration. The ATPase with alkaline optimal pH and low affinity to Ca, the environment in calcified parts, was strogly promoted at 10^{-5} M 17 β-E, suggesting that this ATPase may supply Ca to the calcifing parts.

Key Words : estrogen, osteoblast-like cell, alkaline phosphatase, Ca-ATPase

Department of Dental Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Kuniaki Suzuki) Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan