



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腫瘍及び非腫瘍細胞由来アルカリ性ホスファターゼの阻害剤に対する反応性の相違 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	川村, 良
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11715号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59149
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Kawamura_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 川 村 良

審 査 担 当 者	主査	教授	山 崎 裕
	副査	教授	鈴 木 邦 明
	副査	教授	田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

腫瘍及び非腫瘍細胞由来アルカリ性ホスファターゼの阻害剤に対する反応性の相違

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

ヒトアルカリ性ホスファターゼ（ALP）は、遺伝子レベルで臓器特異的な小腸型、胎盤型、胚細胞型と臓器非特異型である骨型、肝臓型などに分類される。ヒトではほぼ全身に存在して臓器によるアイソザイムが分類されるが、その生理的な役割に関しては不明な点が多い。ALP はiPS細胞において細胞の初期化のマーカーとされ、また腫瘍細胞ではALPのサブユニット構成に変異が生ずるという報告があり、ALPは細胞の分化に関係する可能性がある。ALPは臓器の由来によって阻害剤に対する反応性が異なる。そこで、腫瘍細胞と非腫瘍細胞のALPの相違を明らかにすることを目的に研究を行った。

材料はヒト由来のALPとして市販の小腸型と胎盤型、及び骨型と肝臓型のALPを購入した。また、ヒト腫瘍細胞由来のSaos-2、HeLaとP19細胞、及びP19をレチノイン酸（RA）で処理して神経系細胞に分化させたRA-P19を培養後、回収してcell homogenateとしALP活性の測定を行った。ALPの阻害剤にはtetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronate及びvanadateを使用した。ALP活性の基質としてパラニトロフェニルリン酸を使用し、酵素反応の結果生じた無機リンをChifflet 法にて発色させ、吸光度を測定して活性を算出した。

各ALP活性の各阻害剤に対する反応性を測定し、50%活性阻害濃度（ $Ki_{0.5}$ ）と最大阻害の程度を比較した。その結果、正常組織由来のALPの場合は、臓器非特異型と臓器特異型は一部の例外を除いて、それぞれ類似した阻害剤に対する反応性を示した。

ヒト腫瘍細胞由来の、Saos-2、HeLa、P19 細胞の ALP 活性は 5 種の全ての阻害剤に対して、同様の阻害パターンで濃度に依存して活性が阻害された。この結果は、未分化な腫瘍細胞のALP は、臓器の由来にかかわらず類似した性質を示す可能性を示唆する。

P19 細胞と RA-P19 細胞の ALP では、etidronate 以外の阻害剤では $Ki_{0.5}$ と最大阻害に大きな相違はなかった。しかし etidronate では P19、RA-P19 とともに、他の阻害剤とは異なる

特徴的な阻害パターンを示した。

Etidronate による ALP 活性の阻害がキレート作用によるという報告があることから、Zn 存在下で etidronate とキレーターである EDTA による阻害の実験を行った。その結果、P19、RA-P19 とともに類似した阻害パターンとなった。以上の結果から、etidronate はキレート作用により ALP 活性を抑制すると結論した。

RA-P19ではP19に比べてALPの2価金属イオンに対する親和性が変化しているのではないかと考えてMgとZnの両ALP活性に対する影響を調べた。その結果、Mgは類似した濃度依存性で両ALP活性を促進し、高濃度でも阻害しなかった。一方、Zn はごく低濃度では両ALP活性を類似した濃度依存性で促進したが、高濃度では逆に阻害した。RA-P19ではごく低濃度のZn でALP活性が70%以上阻害されたが、P19では4%程度にとどまった。

以上の結果は、P19とRA-P19のALPにはZn結合部位が2個存在し、高親和性部位ではALP活性は促進され、低親和性部位では逆に抑制されること、高親和性部位に対してはP19とRA-P19のALPの親和性は類似しているが、低親和性部位に対してはRA-P19のALPの親和性の方が高く、より低濃度で活性を抑制することを示唆する。EtidronateはP19とRA-P19の低親和性Znに対するキレート作用によって低濃度でALP活性を活性化したものと推測されるが、Mgとの関連など今後解明を進める必要がある。

以上の結果から、腫瘍細胞由来のALPは臓器特異的な阻害剤に対する反応性を喪失する可能性を示した。また、胚性腫瘍であるP19細胞を神経系細胞に分化させると、ALPの低親和性Zn結合部位の親和性が低下して、etidronateのALP活性に対する作用が影響されることを示唆した。

続いて、審査担当者から本研究およびその関連事項について質問がなされた。

主な質問内容は以下の通りであった。

- 1) Etidronate は一般的な ALP の阻害剤となりうるのか
- 2) 他のビスホスホネート製剤を阻害剤として使用した場合に、etidronate の場合と比較して反応性に違いはあったか
- 3) Mg と Zn 以外の 2 価金属イオンは、ALP 活性に影響を与えているのか
- 4) 他の腫瘍細胞の ALP 活性も、今回使用した腫瘍細胞と同様の阻害傾向を示すのか
- 5) P19, RA-P19 は etidronate を使用した場合に相違が現れたが、他のビスホスホネート製剤でも違いはあったか
- 6) 一般的に未分化な細胞と分化した細胞で反応性に違いが現れると考えられるか
- 7) 本研究の今後の展望について

上記の質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答を通して、申請者は本研究並びに関連分野に対する十分な理解があること、また幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・今後の展望が期待された。

以上のことから、審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。