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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11715
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60966
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Kawamura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

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

平成２７年３月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

川村　良

抄録

【目的】最近の iPS 細胞や腫瘍細胞に関する研究は ALP が細胞の分化に関与することを示唆する．そこで，腫瘍細胞と非腫瘍細胞の ALP を比較することを目的に ALP 阻害剤に対する反応性の違いを検討した．

【材料及び方法】市販のヒトの骨,小腸,胎盤及び肝臓由来の ALP，及びヒト腫瘍細胞である SaOs,Hela,P19 と 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 の ALP を使用し ALP 活性を測定した．また, ALP 阻害剤として tetramisole, levamisole,L-homoarginine,etidronate 及び vanadate に対する反応性を調べた.【結果と考察】ヒト臓器由来の ALP 活性の各阻害剤に対する反応性はアイソザイムの型によって異なったが，ヒト腫瘍細胞由来の ALP 活性の反応性には大きな相違はなく，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が示唆された．P19 と RA-P19 の ALP は etidronate 以外の阻害剤には類似した反応性を示したが， etidronate に対しては異なった. EDTA でも同様の結果が得られたため， etidronate はキレート作用により ALP 活性を阻害すると結論した．ALP 活性に必要な Zn の両 ALP 活性に対する作用を調べたところ，低濃度では ALP 活性を促進したが，高濃度では逆に阻害し，P19 には親和性の異なる 2 種の Zn 結合部位が存在することが示唆された．さらに RA 処理による Zn の低親和性部位の変化が，P19 と RA-P19 の ALP 活性の etidronate に対する反応性の相違を引き起こすことを示唆する結果を得た.【結論】腫瘍細胞の 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と活性発現に必須の Zn 結合部位の変化も阻害剤に対する反応性に影響を及ぼす可能性を示した.

緒言

アルカリ性ホスファターゼ（ALP）は至適pHがアルカリ性のリン酸エステラーゼである．広く全身に分布しており，その大部分はホスファチジルイノシトールのアンカーで細胞膜に結合して局在し，一部はアンカーが切断されて血清中に存在している．活性発現に亜鉛を必要とする亜鉛酵素であり，亜鉛トランスポーターが重要な役割を果たしている[1)]．ALPは細胞で産生が増加すると血清中の濃度が上昇するため，血清ALP活性は胆・肝系の疾患や骨疾患のスクリーニング検査，悪性腫瘍の肝転移・骨転移，甲状腺機能亢進症などで検査され，肝疾患・骨疾患・甲状腺疾患などの指標となる．ALPだけで特定の疾患を確定するのは困難であるが,アイソザイムを測定することにより由来臓器を特定することが可能である[1,2)]．

ヒト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，腎臓型などに分類される[2~5)]．これらのアイソザイムは分子量，熱への安定性，阻害剤への反応性の違いなどの相違点が認められる．小腸型ALPは酵素化学的性質が他のアイソザイムとはかなり異なることが知られている[3)]．骨型ALPは骨芽細胞のマーカー酵素とされ，骨芽細胞への分化，あるいは硬組織形成の指標として測定されることが多い[6, 7)]．血清中の肝臓型ALPは臨床検査では主として肝機能の指標の一つとして扱われることが多い.

ALPは大腸菌からヒトまで保存されており，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，その生理学的な役割に関しては明らかにされていない点が多い．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には種々の阻害剤が存在し,ALPの臓器の由来によって阻害剤に対する反応性が異なることが知ら

れている．そこで，本研究ではヒト由来のALP 4種，ヒト腫瘍細胞由来のALPであるSaOs，P19及びHela及び胚性腫であるP19 細胞と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のALPを用いて，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，5種のALP阻害剤tetramisole，levamisole[8]，L-homoarginine[9, 10]，第一世代ビスホスホネート製剤のetidronate[11]及びvanadateに対する反応性の違いを調べた．

材料と方法

１．各種ALP活性の阻害剤濃度依存性

各種ALP活性の阻害剤濃度依存性を調べるため，種々濃度の5種の阻害剤存在下でALP活性を測定した．阻害剤はtetramisole，levamisole，L-homoarginine，etidronateおよびvanadateの5種を用いた．ALP活性の阻害剤濃度依存性の測定は，各種ALP(骨型,肝臓型,胎盤型,小腸型)，25 mM sucrose（-EDTA），1.5 mM $MgCl_2$，50 mM トリス塩酸緩衝液（各pH），および基質として，生体内には存在しないが，ALP活性の測定に汎用される2 mM パラニトロフェニルリン酸（*p*-NPP）を含む反応溶液300μℓ中にてtriplicateで行った．37℃で30 分間反応させた後，20 mM EDTA を加えて反応を停止させた．酵素反応で基質が加水分解されて生じた無機リンをChifflet 法にて発色させ，HITACHI U-2000分光光度計を用いて波長850 nm における吸光度を測定し算出した．あらかじめ20 mM EDTA を加えてから*p*-NPPを添加して測定される吸光度をバックグラウンド値として差し引いた．

２．腫瘍細胞由来ALP活性のpH依存性

腫瘍細胞由来ALPの至適pHを調べるため,最終濃度50 mMの炭酸緩衝液を用いて活性のpH依存性を測定し

た．9種のpH(9.15，9.63，9.93，10.15，10.37，10.53，10.8，11.07，11.42)の炭酸緩衝液を調製した．ヒト腫瘍細胞由来のALPであるSaOs（骨肉腫）,P19（胚性腫）及びHela（子宮頸癌）を使用した．各種ALP活性の阻害剤濃度依存性の測定と同じ条件で行った．

３．腫瘍細胞由来ALP活性の阻害剤濃度依存性

ヒト腫瘍細胞由来のALPであるSaOs，P19及びHelaの阻害剤濃度依存性を調べるため，種々濃度の5種の阻害剤存在下でALP活性を測定した．活性測定は，各種ALP活性の阻害剤濃度依存性の測定と同じ条件で行った．

４．P19及びレチノイン酸処理P19細胞ALPの阻害剤濃度依存性

胚性腫であるP19 細胞と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のALPで活性の比較を行った．活性測定は，各種ALP活性の阻害剤濃度依存性の測定と同じ条件で行った．

５．P19及びRA-P19 ALPの性質の比較

P19及びRA-P19の性質の相違を検索するため，ALP活性に必要なMgとZnの両ALPに対する作用を調べた．1 mM $ZnCl_2$存在下で，阻害剤はetidronate及びEDTAを用いた．活性測定は，各種ALP活性の阻害剤濃度依存性の測定と同じ条件で行った．また，100μM EGTA-tris存在下で，両ALP活性のMgとZnの濃度依存性を調べた．活性測定は，阻害剤以外は各種ALP活性の阻害剤濃度依存性の測定と同じ条件で行った．

６．試薬

本実験は，購入したヒト由来の骨型，胎盤型，小腸型，肝臓型ALP，及び腫瘍細胞のALPであるSaOs，P19及びHela及びRA-P19を用いて行った．試薬は特級または生化学用試薬を使用した．

７．データ処理

一つの測定条件に対してtriplicateで測定した平均値と標準偏差を結果に示した．多くの測定点では標準偏差はシンボルの大きさの範囲に入った.

結果

１．各種ALP活性の阻害剤濃度依存性

正常細胞由来のヒト骨型,肝臓型,胎盤型,小腸型各種ALP活性に対するtetramisole (Fig.1a), levamisole (Fig.1b), L-homoarginine (Fig.1c), etidronate (Fig.1d)及びvanadate (Fig.1e)の濃度に依存した各種ALP活性の阻害を，阻害剤非存在下の活性を100%とした相対活性で示した．また，それぞれの実験結果からHill plotを行って計算した各アイソザイムの各阻害剤に対する50%活性阻害濃度($Ki_{0.5}$)と最大阻害の割合(%)を表1に示した.

臓器非特異型ALPに属する骨型と肝臓型のALP活性は低濃度から tetramisole, levamisole及び L-homoarginine の濃度に依存して阻害され，最大阻害でほぼ90%以上の阻害を示した(Fig.1a-c，表1)．骨型と肝臓型の$Ki_{0.5}$はtetramisoleとlevamisoleでは 32から670 μMであったが，L-homoarginineでは2.3および2.1 mMであり，高い濃度を必要とした(表1)．一方,胎盤型と小腸型では各阻害剤の濃度に依存して阻害されたものの，臓器非特異型ほどの阻害は見られなかった．両ALPの阻害パターンは類似しており,tetramisoleで10%～30%,levamisoleで50～60%,L-homoarginineではどちらも70%程度であった(Fig.1a-c，表1)．各阻害剤による50%活性阻害濃度,最大阻害とも臓器非特異型である骨型と肝臓型及び臓器特異型である小腸型と胎盤型では類似した傾向を示すが,臓器非特異型と臓器特異型では異なった.

Etidronate とvanadate による阻害濃度依存性の結果に対してもHill プロットを行い50%活性阻害濃度（$Ki_{0.5}$）を計算した結果と最大阻害の割合を表に示した.Etidronateでは,骨型,肝臓型および小腸型では類似した濃度依存性で60%以上の阻害を示したが,臓器特異型の胎盤型では16%の阻害にとどまり異なった傾向を示した(Fig.1d, 表1). これらのALP活性は, etidronateの濃度に依存してシグモイダルな阻害パターンとなった. $Ki_{0.5}$は肝臓型で最小となった. Vanadateは,etidronateとは違って骨型,肝臓型および胎盤型では類似した濃度依存性で100%近く阻害されたが,臓器特異型の小腸型では活性阻害に高濃度を必要とし異なった傾向を示した(Fig.1e, 表1). Etidronate では小腸型が,vanadateでは胎盤型が臓器非特異型と類似した阻害傾向を示したが,臓器非特異型同士は同じ傾向を示した.

以上の結果から,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すと結論した.

２．腫瘍細胞由来各種ALP活性の阻害剤濃度依存性

ヒト腫瘍細胞由来の SaOs（骨肉腫）,Hela（子宮頸癌）,P19（胚性腫）細胞及び P19 細胞をレチノイン酸処理して神経系に分化させた細胞の ALP 活性の阻害剤濃度依存性を検討するために, 各細胞の ALP 活性の pH 依存性を測定した結果をそれぞれの ALP の最大活性 100%とした相対活性で示した(Fig.2).各 ALP の最大活性を示す pH は SaOs と P19 では 10.37, Hela で 10.15 であり類似していた.

SaOs,Hela,P19 細胞の ALP 活性は tetramisole, levamisole, L-homoarginine 及び etidronate では阻害剤の濃度に依存して活性が阻害された. $Ki_{0.5}$, 最大阻害ともに大きな相違はなく, いずれも類似した阻害パターンとなった(Fig.3a-d, 表 2). vanadate においては, 最大阻害はいずれもほぼ 100%であった

が，$Ki_{0.5}$はHelaの2.7 μMからSaOsの9.3 μMと多少の相違があった(Fig.3e，表2)．これらの結果は，正常細胞由来のALPの場合とは異なり，各ALPは個性を失っているように見えた．未分化な細胞である腫瘍細胞の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が示唆された．

３．P19及びレチノイン酸処理P19細胞ALPの阻害剤濃度依存性

次に，P19細胞とP19細胞をレチノイン酸（RA）で処理したRA-P19のALP活性の比較を行った．文献に従ってレチノイン酸処理を行うと，P19細胞は神経系の細胞に分化し細胞の形態も変化した．これらの細胞を回収した後にcell homogenateにしてALP活性の測定を行った．

Tetramisole，levamisole，L-homoarginine及びvanadateでは両ALPの$Ki_{0.5}$，最大阻害とも大きな相違はなく，いずれも類似した阻害パターンとなった(Fig.4a-d)．以上4種の阻害剤に対するP19とRA-P19のALPの阻害の結果をHillプロットして求めた50%阻害濃度と最大阻害の程度を表にまとめた(表3)．P19とRA-P19はほぼ同様の結果となり，レチノイン酸処理して神経系に分化してもこれら4種の阻害剤に対する反応性は変わらなかった．

しかしetidronateでは，P19，RA-P19ともに，他の阻害剤とは異なる特徴的な阻害パターンとなり，いずれもetidronate濃度に依存して低濃度で活性が低下した後，7 mM付近で活性が増加しその後濃度が上がると再び活性が低下した．7 mM付近での活性上昇の程度にはP19とRA-P19では顕著な差があり，RA-P19では30%程度の阻害だが，P19では70%以上の阻害であった（Fig.4e，表3)．

EtidronateによるALP活性の阻害がキレート作用によるものであるという報告があることから，etidronateによるALP活性阻害に対する2価金属の影響を検討することにより，低濃度で活性が低下した

後,7 mMで再び活性が増加し,さらに高濃度では低下する現象を説明できるのではないかと考え,1 mMのZn存在下でetidronateによる阻害の実験を行った.その結果,Zn非存在下の結果とは異なり,P19とRA-P19のALPはどちらも類似したetidronate濃度依存性に低濃度で活性化されて1.8 mMで最大となった後,さらに高濃度ではetidronate濃度に依存して活性は低下した (Fig.5a). さらにetidronateの代わりに2価金属のキレーターであるEDTAによる阻害を調べたところ, EDTA濃度1.25 mMまでは活性が上昇し,さらに高濃度ではEDTAの濃度に依存して活性が阻害された(Fig.5b). P19, RA-P19ともにZn存在下でのetidronateあるいは EDTAによる阻害は類似した阻害パターンとなった.

RA-P19細胞ではP19細胞に比べてALPの2価金属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ALP活性に対する影響を調べた. その結果, P19及びRA-P19細胞のALP活性に対して, 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(Fig.5c). 一方,Zn は0.2 pMまでの低濃度では両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(Fig.5d,e). 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(Fig.5f).

考察

１．各種ALP活性の阻害剤濃度依存性

すでに報告されている動物由来のALPでは, 小腸型, 胎盤型と臓器非特異型では各種阻害剤に対する反応性が異なることが知られている[1)]．ヒト由来のALPを用いた本研究においても, 臓器非特異型である骨型と肝臓型は類似した阻害剤反応性を示し, 臓器特異的な小腸型と胎盤型もそれぞれ他のALPとは異なる

反応性を示した．これらの結果は，ヒトALPにおいても遺伝子レベルで異なる各アイソザイムは阻害剤に対する反応性の相違によって区別が可能であることを示唆する．

Tetramisoleとlevamisoleは光学異性体の関係にあり，各ALPアイソザイムは概ね似た阻害パターンを示したが， 臓器非特異型ALPはlevamisoleに対してtetramisoleよりも低い$Ki_{0.5}$を示し，最大の阻害程度も大きかった．このことから臓器非特異型ALPにおいては光学異性体の構造の違いがALP活性阻害の程度に影響を及ぼすことが示唆された．また，L-homoarginineは非競合的阻害剤であり，tetramisoleおよびlevamisoleより高濃度を必要としたが，臓器非特異型ALP活性の阻害パターンはtetramisoleおよびlevamisoleに類似していた．

Etidronateによる阻害は，骨型， 肝臓型及び小腸型ALPにおいては， 他の4種の阻害剤とは異りシグモイダルな濃度依存性で活性は低下した．この結果は etidronateのALPに対する結合は他の4種の阻害剤のALPへの結合とは異なって協同性があることを示唆する．

Vanadateでは，臓器非特異型ALPの阻害パターンはtetramisole，levamisoleおよびL-homoarginineに類似しており，胎盤型も同様の阻害パターンを示した．しかし，小腸型ALPでは他の3種のALPとは異なり最大阻害が小さくなった．小腸型ALPは酵素化学的性質が他のアイソザイムとはかなり異なると報告されているが，今回の研究では阻害剤に対する反応性の相違に関してより詳細に解析することはできなかった．

２．腫瘍細胞由来各種ALP活性のpH及び阻害剤濃度依存性

ヒト由来の4種のALPにおいては各アイソザイムによって至適pHに相違があるが[11)]，本研究において腫瘍細胞由来各種ALPでは明らかな至適pHの相違は見られなかった．また，本研究において使用したヒト腫瘍

細胞由来の各種ALP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．これらの結果は，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．しかし，今回使用した細胞はSaOs（骨肉腫）,P19（胚性腫）及びHela（子宮頸癌）の3種であり，腫瘍化する前の細胞の起源は必ずしも明確ではない．また，本研究においては，HSC3（舌扁平上皮がん），HSC4（口腔扁平上皮がん），Ca9-22（歯肉扁平上皮がん），MG63（骨肉腫）及びLi-7（肝がん）細胞のALP活性の測定も試みたが，いずれも活性が極めて低く詳細な解析を行うことはできなかった．腫瘍化によって，ALPの性質が腫瘍化する前の細胞のALPから変化することを明確に示すには，より多くの腫瘍細胞について検討することや，腫瘍細胞のサブユニットの組成が腫瘍化によって変化していることなどを直接示す必要がある．

３．P19及びレチノイン酸処理P19（RA-P19）細胞ALPの阻害剤濃度依存性

P19細胞は多分化能を示す細胞であり，レチノイン酸処理によって神経系細胞に分化することが知られている．本研究では，既知の方法によって分化させ細胞の形態変化を確認している．P19及びRA-P19細胞のALPはetidronate以外の4種の阻害剤に対しては同様の阻害パターンで濃度に依存して活性が阻害され，相違は見られなかった．しかし，etidronate対しては異なった反応性を示した．

そこでP19細胞とRA-P19細胞のetidronate阻害の機構と，濃度依存性依存性を明らかにすることを試みた．ヒトのALPには2価金属イオンであるZn，Mg，Caの結合部位の存在が知られている．そこで，もしetidronateによるALP活性の阻害がキレート作用によるものであれば，低濃度で活性が低下した後,7 mMで再び活性が増加し，さらに高濃度では低下する現象を説明できるのではないかと仮説を立て実験を行った．

まず 1 mM の Zn 存在下で etidronate による阻害の実験を行った．その結果，Zn 非存在下の結果とは異なり，P19 と RA-P19 の ALP はどちらも類似した etidronate 濃度依存性で低濃度で活性化されて 1.8mM で最大となった後，さらに高濃度では etidronate 濃度に依存して活性は低下した．この結果は，低濃度の etidronate では ALP 活性を低下させる 2 価金属イオン，おそらくは Zn がキレートされるため活性が上昇し，さらに etidronate が高くなると活性に必要な Mg などがキレートされて活性は低下すると解釈することができる．おそらくは P19 と RA-P19 の ALP は Zn に対する親和性が異なるため Zn を添加しない場合の etidronate 依存性では顕著な差が生じたが，1 mM の Zn 存在下では差が出なかったものと推測される．

そこで，もし etidronate による ALP 活性の阻害がキレート作用によるものであれば，2 価金属イオンのキレーターである EDTA でも同様の結果が得られるはずと考えて，1 mM の Zn 存在下で，P19 と RA-P19 の ALP 活性の EDTA 濃度依存性を調べた．その結果両細胞の ALP 活性は etidronate の場合と同様に低濃度で活性化されて最大となった後，より高濃度では阻害された．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．

Zn 非存在下では，P19 と RA-P19 の ALP 活性の etidronate 阻害の濃度依存性が異なった． その理由は P19 と RA-P19 の Zn に対する親和性が異なるからではないかと推測し，両 ALP 活性の Zn 濃度依存性を調べた．その結果，極めて低濃度の Zn により，両 ALP 活性は類似した濃度依存性で活性化された．さらに Zn 濃度を上げると P19 と RA-P19 の ALP 活性はいずれも阻害されたが,RA-P19 の ALP 活性のほうがより低濃度で阻害された．以上の結果は，P19 と RA-P19 細胞の 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が示唆された．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 との関連などまだ詳細は明らかにできておらず，今後解明を進める必要がある．

結論

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．

参考文献

１）McComb RB, Bowers Jr GN, Posen S：Alkaline Phosphatase. Plenum Press New York and London：373-487, 1979.

２）Weiss JM, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H：Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. J Biol Chem 263：12002-12010, 1988.

３）Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss JM, Harris H：Sequence and Characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. J Biol Chem 263：12011-12019, 1988.

４）Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M：Nucleotide sequence of the human placental alkaline

phosphatase gene. J Biol Chem 263 : 12020-12027,1988.

５）五関正江，大井田新一郎，佐々木哲：骨のアルカリホスファターゼの構造と生理的機能．日骨代謝誌　6：9-19，1990.

６）五関正江，大井田新一郎，佐々木哲：骨代謝マーカーとしての骨型ALP．J Electroph 38：149-153，1994.

７）鈴木邦明，松本章：骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1の石灰化過程のホスファターゼと遺伝子発現．北海道歯誌　20：126-137，1999.

８）Soory M, Suchak A：Effects of alkaline phosphataseand its inhibitor levamisole on the modulation of androgen metabolism by nicotine and minocycline in human gingival and oral periosteal fibroblasts. Arch Oral Biol 48 : 69-76, 2003.

９）Lin CW, Fishman WH：L-homoarginine：An organspecific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphatases. J Biol Chem 247 : 3082-3087,1972.

１０）Suzuki K, Yoshimura Y, Hisada Y, Matsumoto A：Sensitivity of intestinal alkaline phosphatase to L-homoarginine and its regulation by subunitsubunit interaction. Jpn J Phamacol 64 : 97-102, 1994.

１１）Koshikawa M, Suzuki K, Sugawara Y, Iida J：Longterm effects of bisphosphonates on mineralization of osteoblastic cell, MC3T3-E1. Oral Therapeutics and Pharmacology 22 : 61-68, 2003.

１２）飯岡拓馬，出山義昭，吉村善隆，鈴木邦明：ヒトアルカリ性ホスファターゼ・アイソザイムの阻害

剤に対する感受性の相違. 北海道歯学雑誌 32(2): 202-209, 2012.

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究に数々のご援助，ご協力いただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室ならびに口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます.

表１　　各種ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

阻害剤 / ALP	tetramisole		levamisole		L-homoarginine		etidronate		vanadate	
	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害
胎盤型	n.d.	12 %	1.18 mM	57 %	32.1 mM	70 %	n.d.	16 %	24.1 μM	100 %
小腸型	n.d.	28 %	n.d.	49 %	20.1 mM	73 %	1.9 mM	71 %	87.6 μM	64 %
骨型	0.67 mM	87%	0.03 mM	93 %	2.3 mM	96 %	2.1 mM	64 %	12.6 μM	95 %
肝臓型	0.59 mM	91%	0.03 mM	98 %	2.1 mM	100 %	1.5 mM	86 %	8.1 μM	98 %

(n.d.:決定できず)

表2　　腫瘍細胞由来ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

阻害剤 / ALP	tetramisole		levamisole		L-homoarginine		etidronate		vanadate	
	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害
SaOs	0.44 mM	92 %	25 μM	98 %	1.5 mM	98 %	1.7 mM	77 %	9.3 μM	97 %
P19	0.45 mM	98 %	40 μM	100 %	2.5 mM	100 %	1.7 mM	75 %	5.5 μM	100 %
Hela	0.42 mM	95 %	35 μM	99 %	2.6 mM	99 %	2.1 mM	60 %	2.7 μM	100 %

表3　　P19, RA-P19ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

阻害剤 / ALP	tetramisole		levamisole		L-homoarginine		etidronate		vanadate	
	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害	50%阻害	最大阻害
P19	0.45 mM	96 %	40 μM	99 %	2.5 mM	99 %	1.7 mM	100%	5.5 μM	99 %
RA-P19	0.41 mM	97 %	41 μM	100 %	3.0 mM	98 %	2.9 mM	100%	4.8 μM	99 %

Fig.1　各種ALP活性のtetramisole(a), levamisole(b), L-homoarginine(c), etidronate(d), vanadate (e)濃度依存性

各種ALP活性の阻害剤 (a-e) 濃度依存性の測定は, 各種ALP(骨型,肝臓型,胎盤型,小腸型), 25 mM sucrose (-EDTA) , 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM トリス塩酸緩衝液, 2 mM パラニトロフェニルリン酸 (p-NPP) および各種濃度の阻害剤を含む反応溶液300μℓ中にてtriplicate で行った.37℃で30 分間反応させた後、20 mM EDTA を加えて反応を停止させた。酵素反応で基質が加水分解されて生じた無機リンをChifflet 法にて

発色させ，HITACHI U-2000分光光度計を用いて波長850 nm における吸光度を測定し算出した．胎盤型を◇,小腸型を△,骨型を□,肝臓型を○で示す.

Fig.2　腫瘍細胞由来各種ALP活性のpH依存性

腫瘍細胞由来ALPの至適pHを調べるため、最終濃度50 mMの炭酸緩衝液を用いて活性のpH依存性を測定した．9種のpH(9.15，9.63，9.93，10.15，10.37，10.53，10.8，11.07，11.42)の炭酸緩衝液を調製した．ヒト腫瘍細胞由来のALPであるSaOs（骨肉腫）、P19（胚性腫）及びHela（子宮頸癌）を使用した．sucrose（no EDTA），$MgCl_2$，およびパラニトロフェニルリン酸（p-NPP）を含む反応溶液300μℓ中にてFig.1と同様の方法で行った．SaOsを◇，P19を□，Helaを△で示す.

Fig.3 腫瘍細胞由来各種ALP活性のtetramisole(a)，levamisole(b)，L-homoarginine(c)，etidronate(d)，vanadate(e)阻害剤濃度依存性

腫瘍細胞由来各種ALP活性の阻害剤（a-e）濃度依存性の測定は，ヒト腫瘍細胞由来のALPであるSaOs（骨肉腫）、P19（胚性腫）及びHela（子宮頸癌）を使用し，Fig.1と同様の方法で阻害剤の阻害作用を調べた．SaOsを◇，P19を□，Helaを△で示す.

Fig.4 P19及びレチノイン酸処理P19細胞ALP活性のtetramisole(a)，levamisole(b)，L-homoarginine(c)，vanadate（d)，etidronate（e)濃度依存性

Fig.1と同様の方法で阻害剤（a-e）の阻害作用を調べた．P19を◇，RA-P19を□で示す.

Fig. 5a　P19及びP19 RA細胞ALP活性のetidronate阻害濃度依存性

1 mM $ZnCl_2$存在下で，阻害剤はetidronateを用いた．Fig.1と同様の方法でetidronateの阻害作用を調べた．P19を◇，RA-P19を□で示す.

Fig. 5b　P19及びP19 RA細胞ALP活性のEDTA阻害濃度依存性

1 mM $ZnCl_2$存在下で，阻害剤はEDTAを用いた．Fig.1と同様の方法でEDTAの阻害作用を調べた．P19を◇，RA-P19を□で示す.

Fig. 5c　P19及びRA-P19 ALP活性のMg濃度依存性

100μM EGTA-tris存在下で，P19及びRA-P19細胞ALP活性のMgの濃度依存性を調べた．P19を◇，RA-P19を□で示す.

Fig. 5d　P19及びRA-P19 ALP活性のZn濃度依存性(Mg,no Mg and EGTA)

P19を◇，RA-P19を□，P19(no Mg)を△，RA-P19(no Mg)を○で示す.

Fig. 5e　P19及びRA-P19 ALP活性のZn濃度依存性(Mg,no Mg and EGTA)

100μM EGTA-tris存在下で，P19及びRA-P19細胞ALP活性のZnの濃度依存性を調べた．P19を◇，RA-P19を□，P19(no Mg)を△，RA-P19(no Mg)を○で示す.

Fig. 5f　　P19及びRA-P19 ALP活性のZn濃度依存性(高濃度)

P19を◇, RA-P19を□で示す.

Difference in sensitivity of alkaline phosphatase activity derived from tumor or non-tumor cells to its inhibitors

Ryo Kawamura[1)], Yoshiaki Deyama[2)], Yoshitaka Yoshimura[2)], Kuniaki Suzuki[2)], Yutaka Yamazaki[1)]

[1)]Department of Oral Gerodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University.(Chief: Prof.Yutaka Yamazaki) [2)] Department of Dental Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University.(Chief: Prof.Kuniaki Suzuki) Kita13, Nishi7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.

[Objectives] Recent study on iPS and tumor cells suggests that ALP may be related to the differentiation of cells. Therefore we examined the difference in sensitivity to ALP inhibitors for the purpose of comparing the ALP of non-tumor cells with the tumor cells. [Materials and methods]We measured ALP activity using commercial ALP derived from human bone, small intestine, placenta and liver, and ALPs of human tumor cells, SaOs, Hela, P19 and RA-P19 which was differentiated into neurologic cells treated with retinoic acid (RA). Also, we examined sensitivity of ALP activity to tetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronate and vanadate as ALP inhibitor. [Results and Discussion]The sensitivity to each inhibitor of the ALP activity derived from a human organ varied depending of isozyme type. Sensitivities of the ALP activity derived from human tumor cells did not show the big difference, suggesting that ALP of undifferentiated tumor cells show similar characters regardless of the origin of the organ.

The ALP of P19 and RA-P19 showed similar sensitivity to inhibitors except etidronate, but was different for etidronate. Because similar results were obtained with the EDTA, we concluded that etidronate inhibited ALP activity by chelate effects. We examined effects for P19 and RA-P19 ALP activity of Zn, which is necessary for ALP activity. Zn promoted ALP activity with the low concentration, but it inhibited the activity at the high concentration. It was suggested that two kinds of Zn binding sites with low and high affinity were present in P19. Furthermore, we obtained results to suggest that the change of the low affinity site of Zn by the RA treatment caused difference in the sensitivity for etidronate of the ALP activity in P19 and RA-P19.

[Conclusion] The change of the Zn binding site which was essential to activity, changed the sensitivity to the inhibitor and that the ALP of tumor cells lost organ-specific sensitivity to inhibitors.

Key Words : alkaline phosphatase, ALP inhibitor, retinoic acid, chelate effect

Fig. 1a

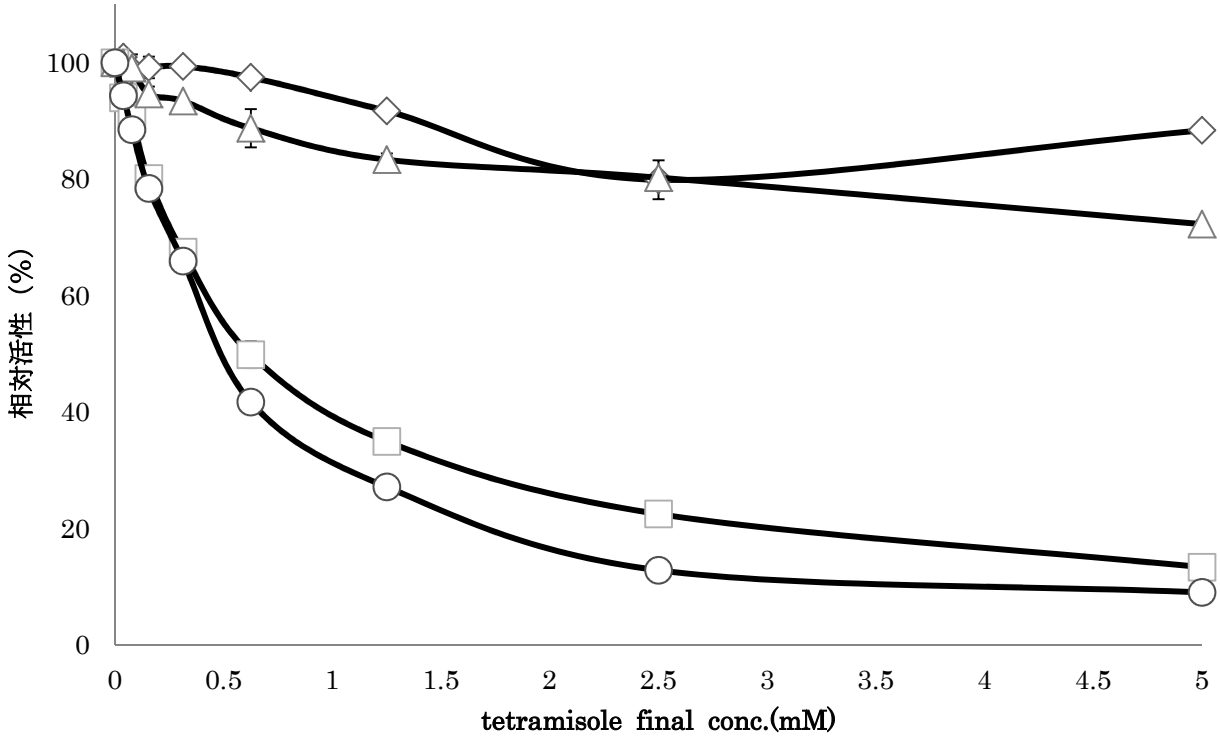

100
80
60
40
20
0
相対活性（%）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
tetramisole final conc.(mM)

Fig. 1b

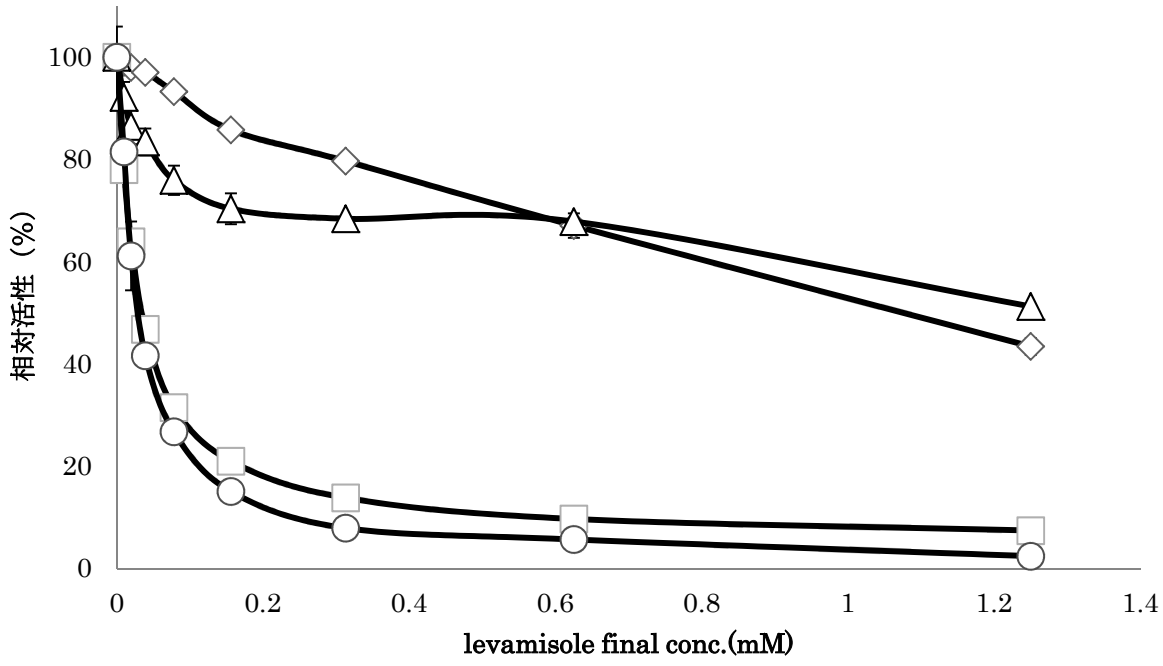

100
80
60
40
20
0
相対活性（%）
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
levamisole final conc.(mM)

Fig. 1c

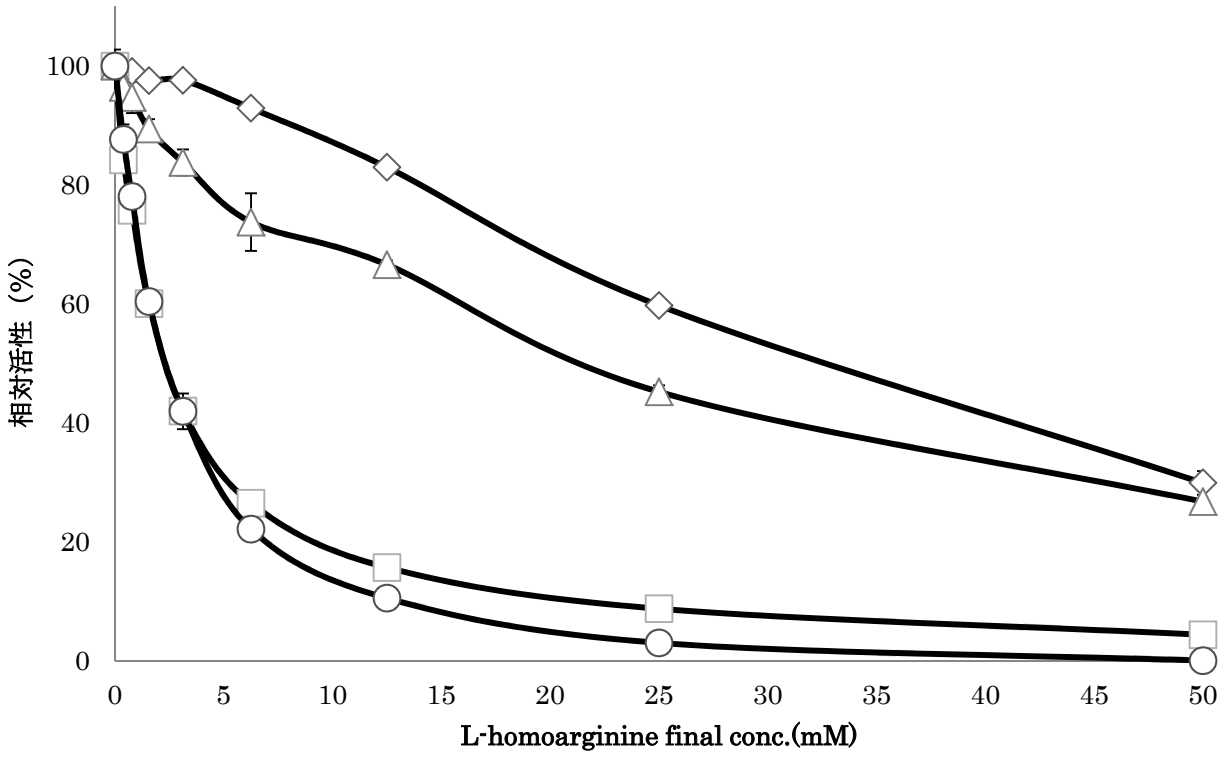

100
80
60
40
20
0
相対活性（%）
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
L-homoarginine final conc.(mM)

Fig. 1d

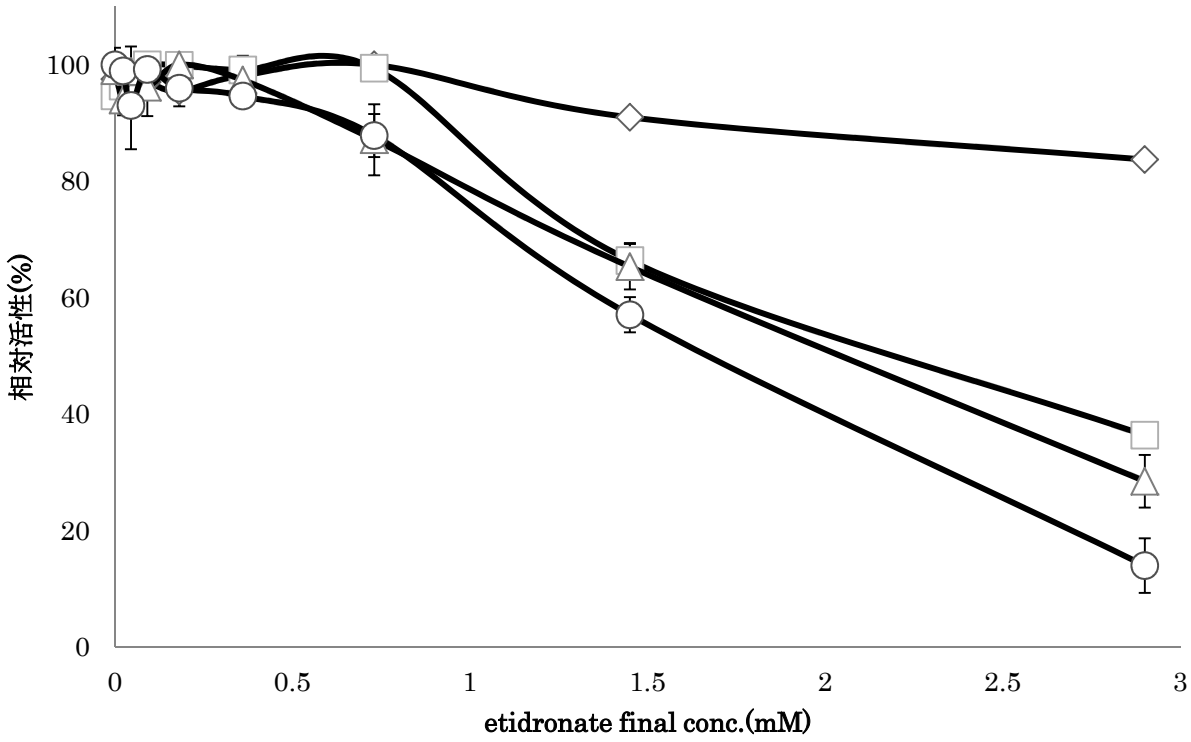


Fig. 1e

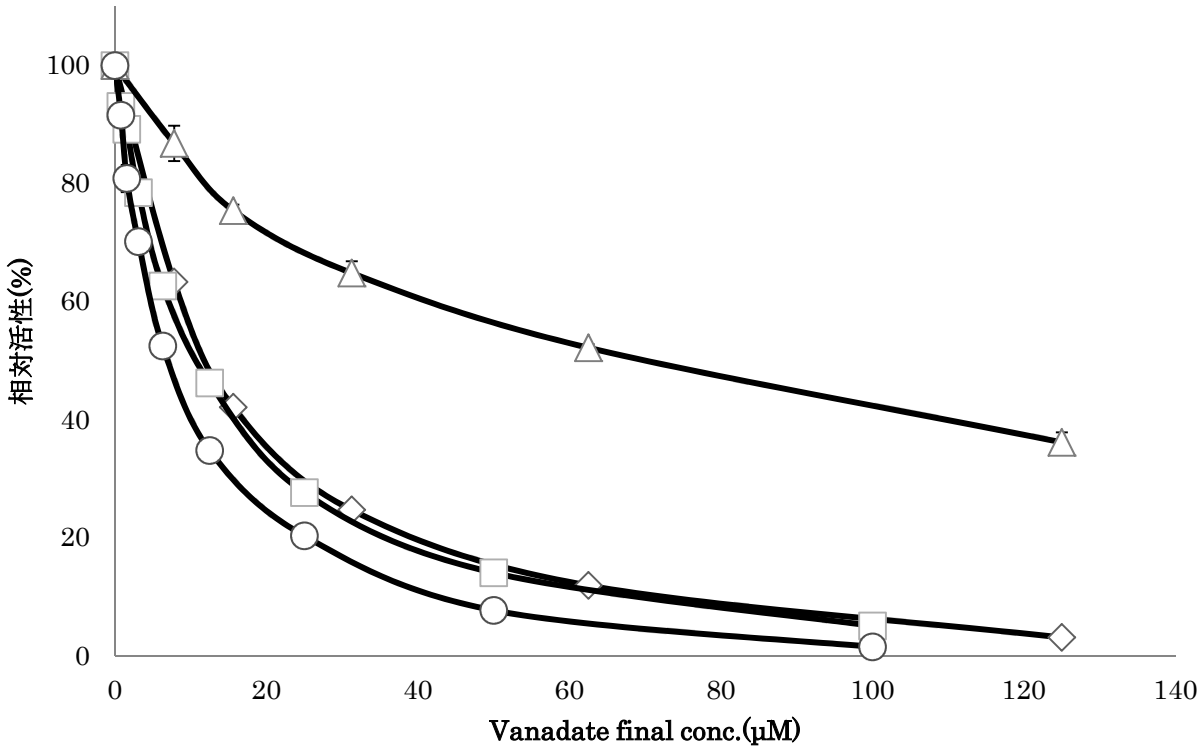

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
20
40
60
80
100
120
140
Vanadate final conc.(μM)

Fig. 2

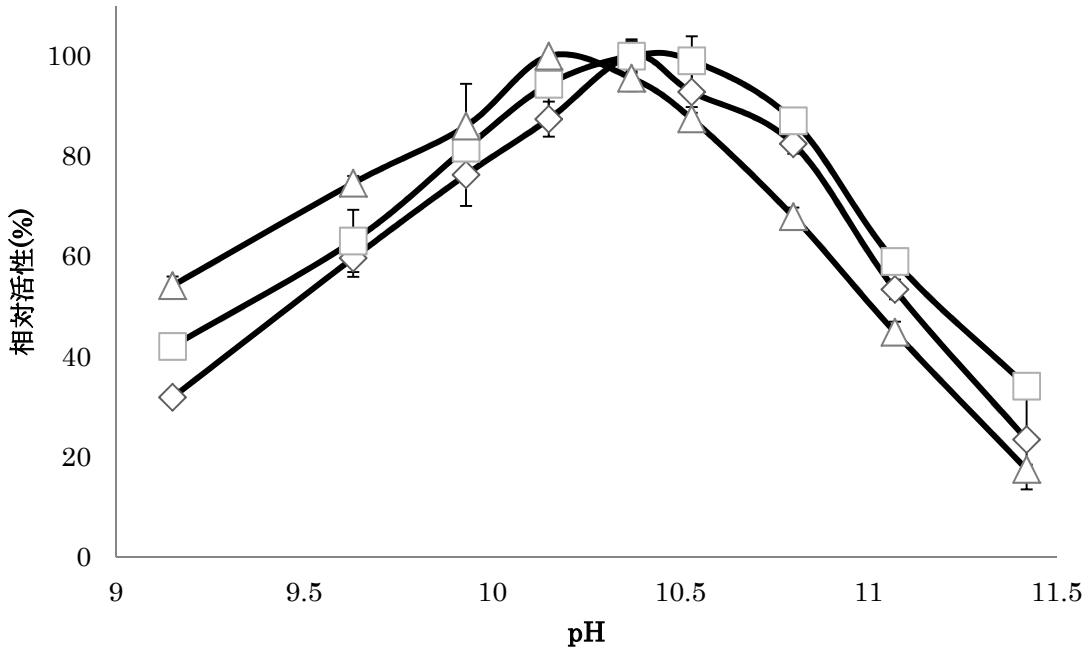


Fig. 3a

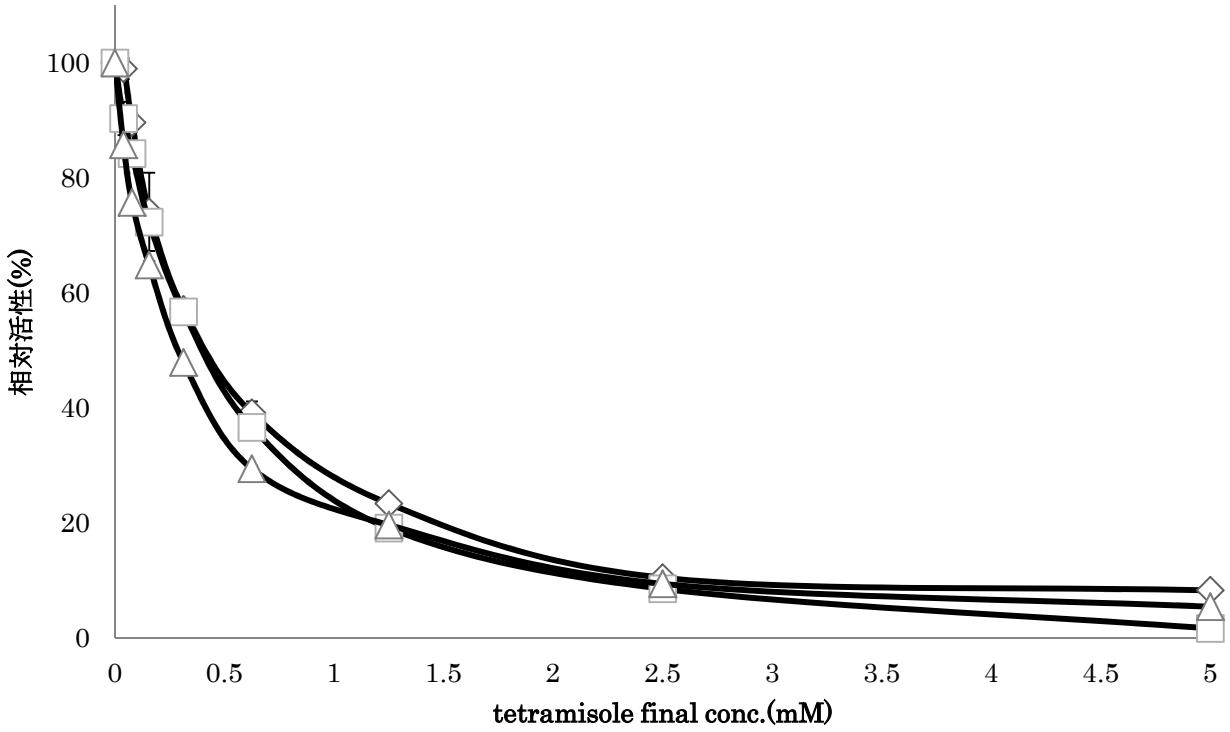

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
tetramisole final conc.(mM)

Fig. 3b

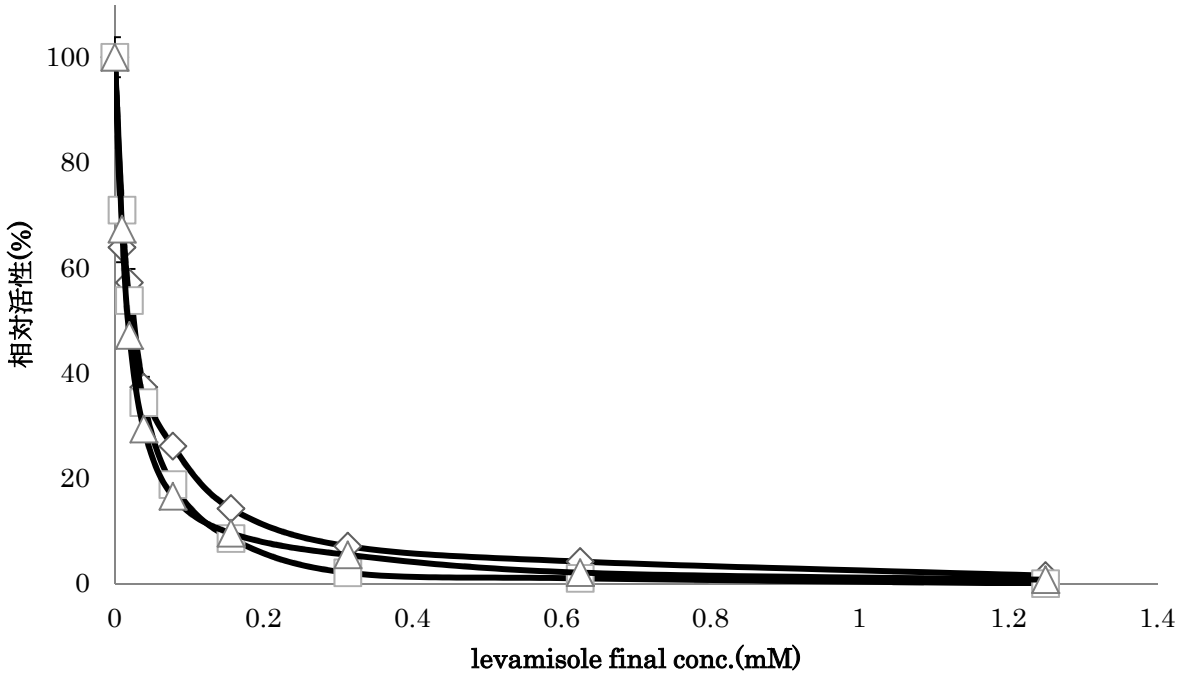

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
levamisole final conc.(mM)

Fig. 3c

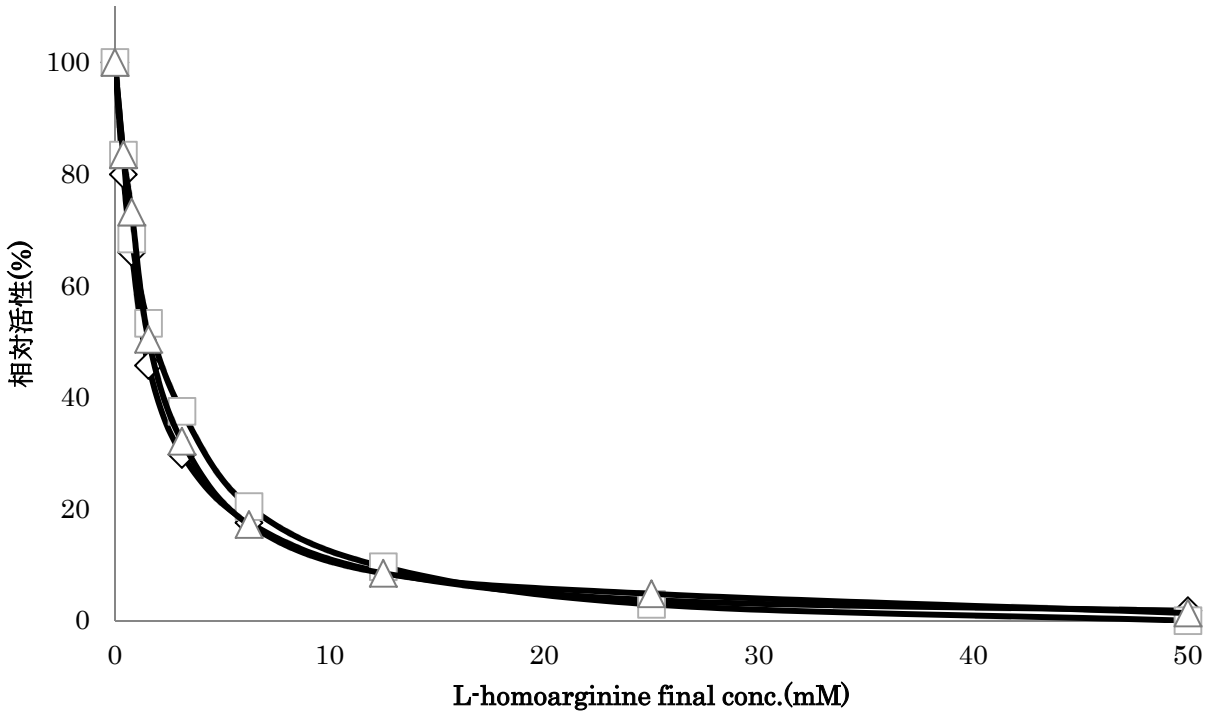

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
10
20
30
40
50
L-homoarginine final conc.(mM)

Fig. 3d

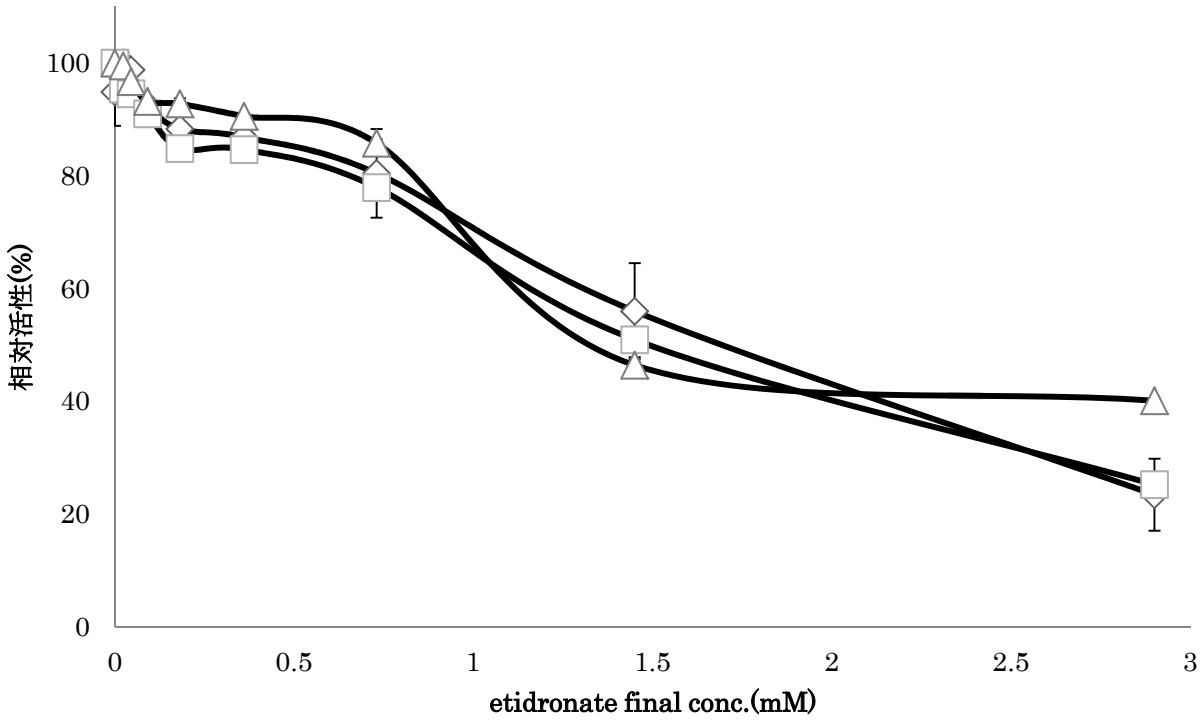


Fig. 3e

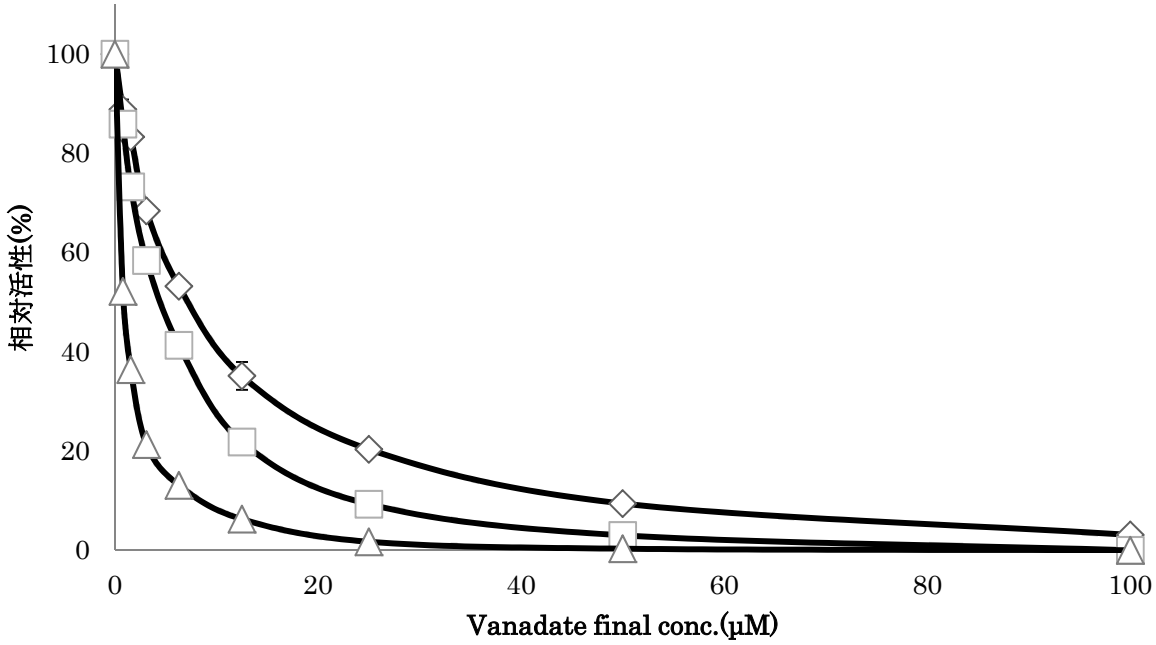


Fig. 4a

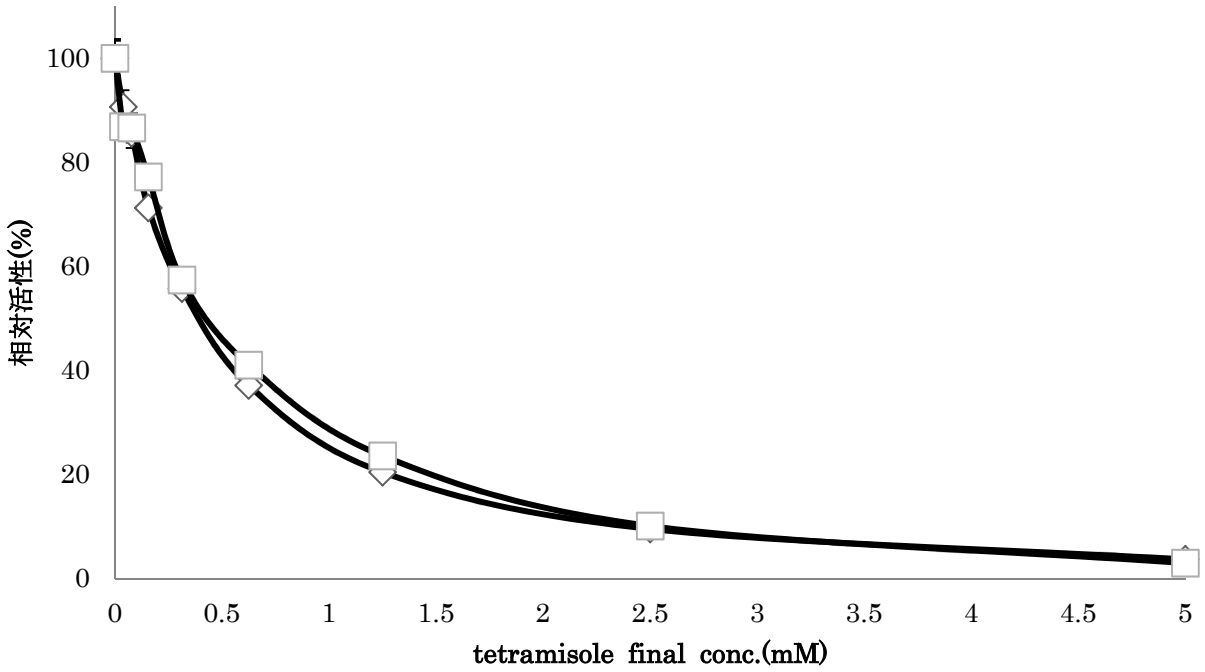

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
tetramisole final conc.(mM)

Fig. 4b

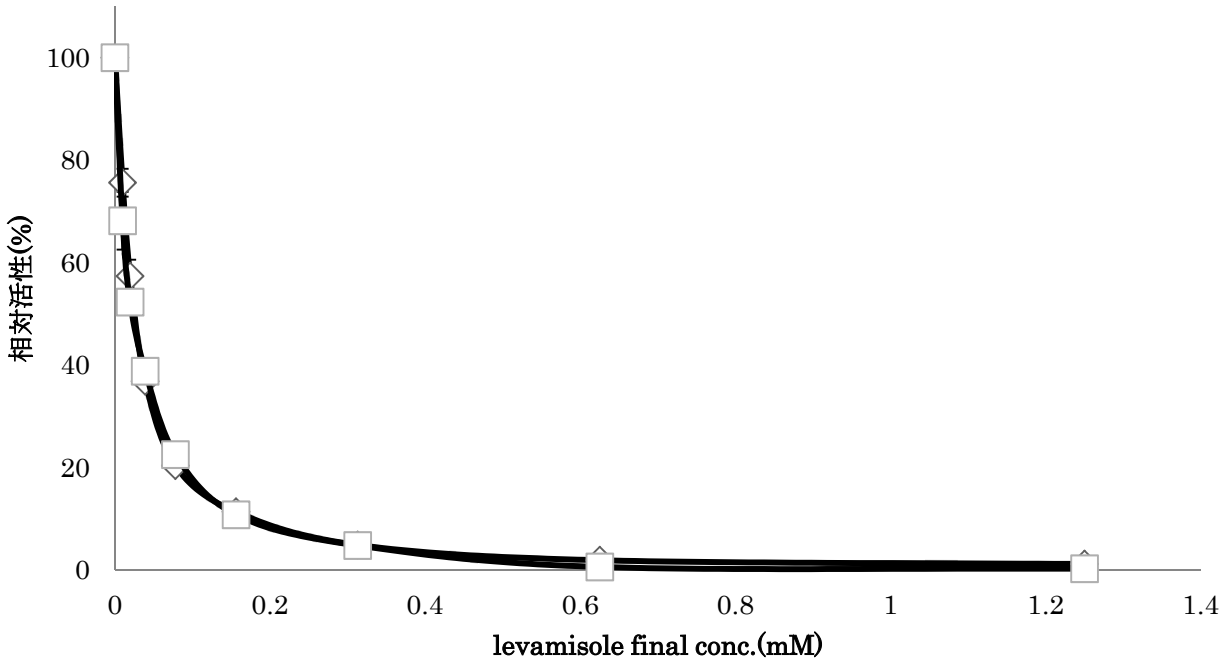

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
levamisole final conc.(mM)

Fig. 4c

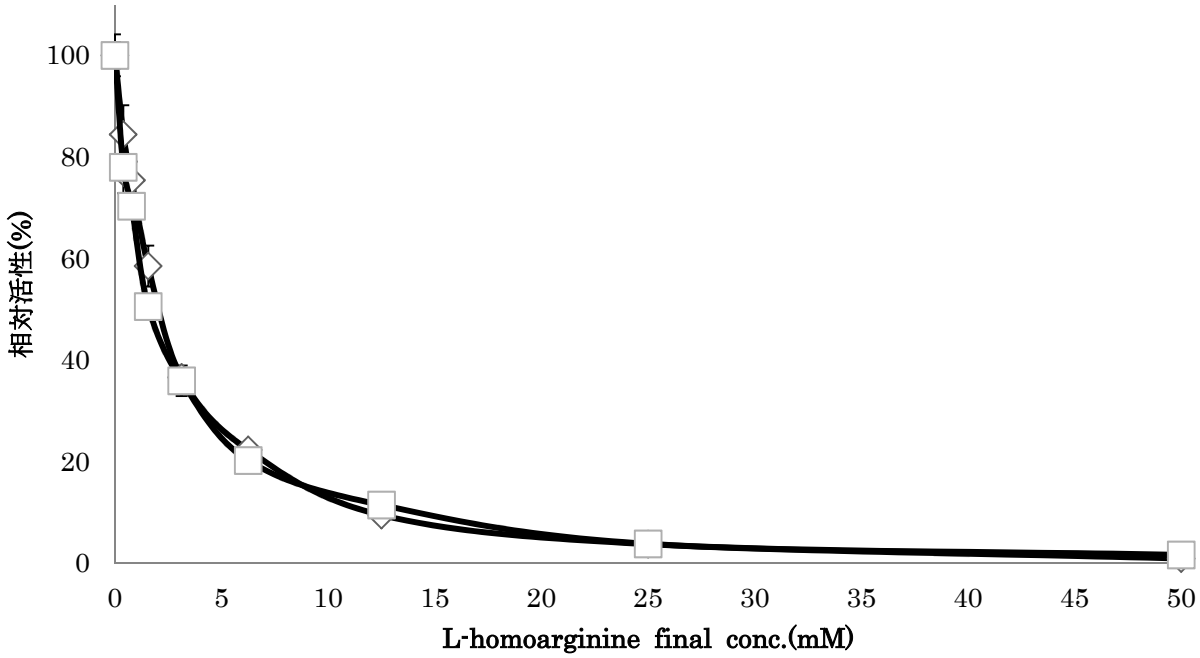

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
L-homoarginine final conc.(mM)

Fig. 4d

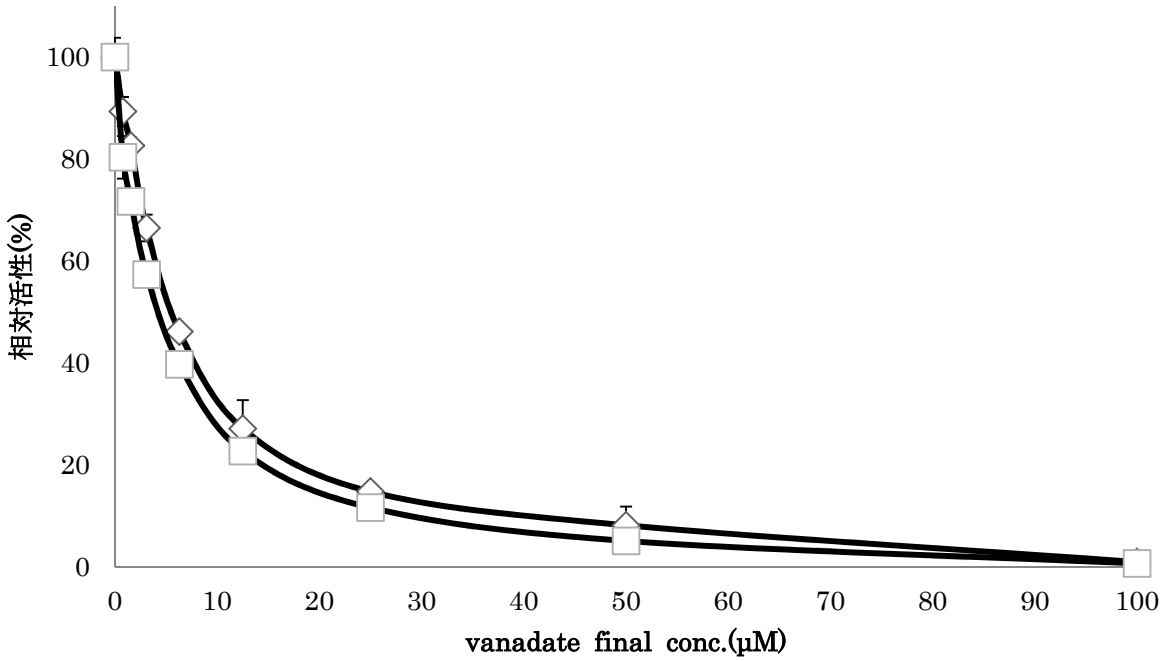

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
vanadate final conc.(μM)

Fig. 4e

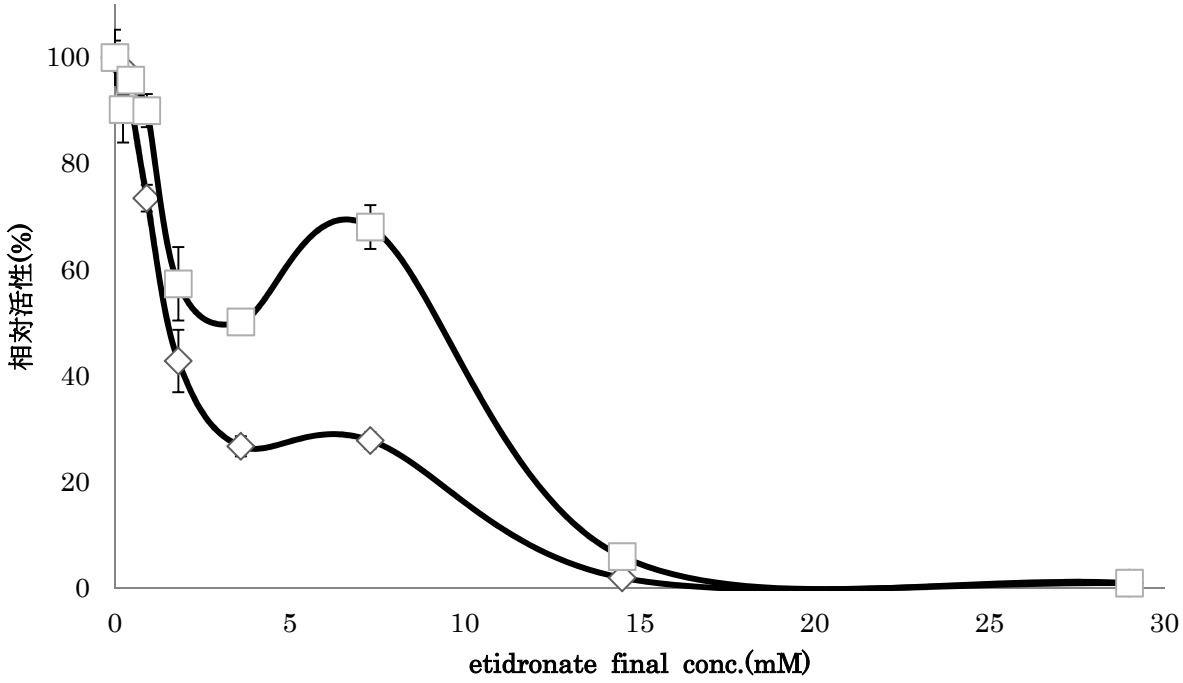


Fig. 5a

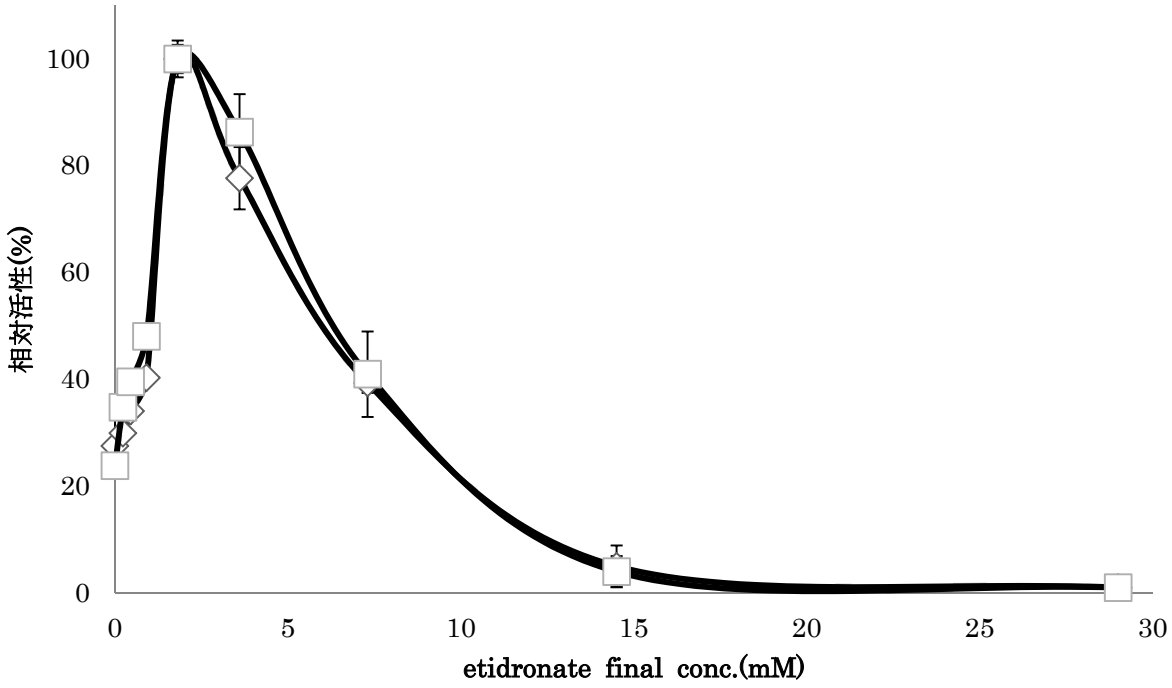


Fig. 5b

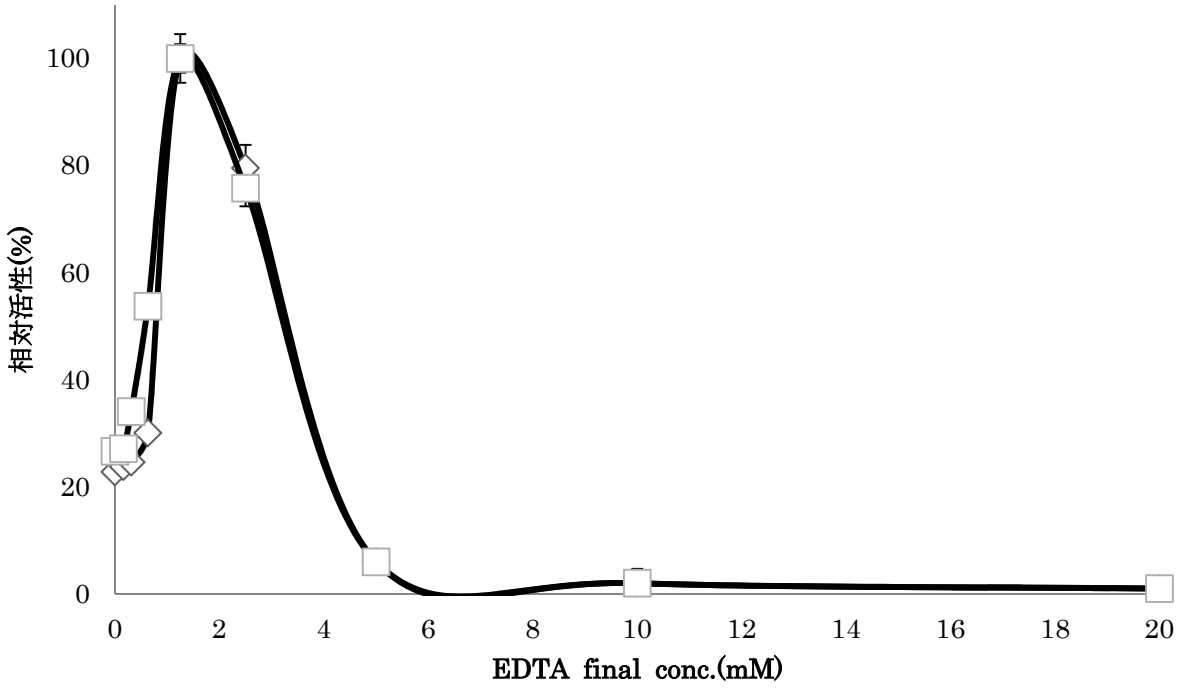


Fig. 5c

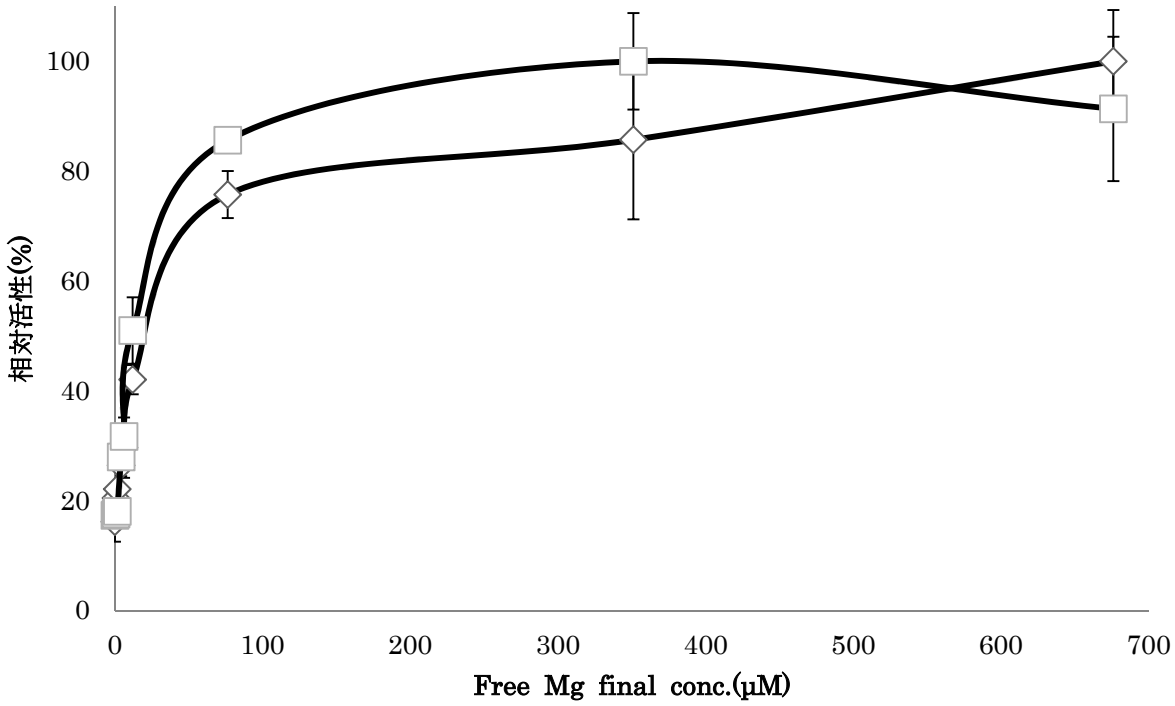

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
100
200
300
400
500
600
700
Free Mg final conc.(μM)

Fig. 5d

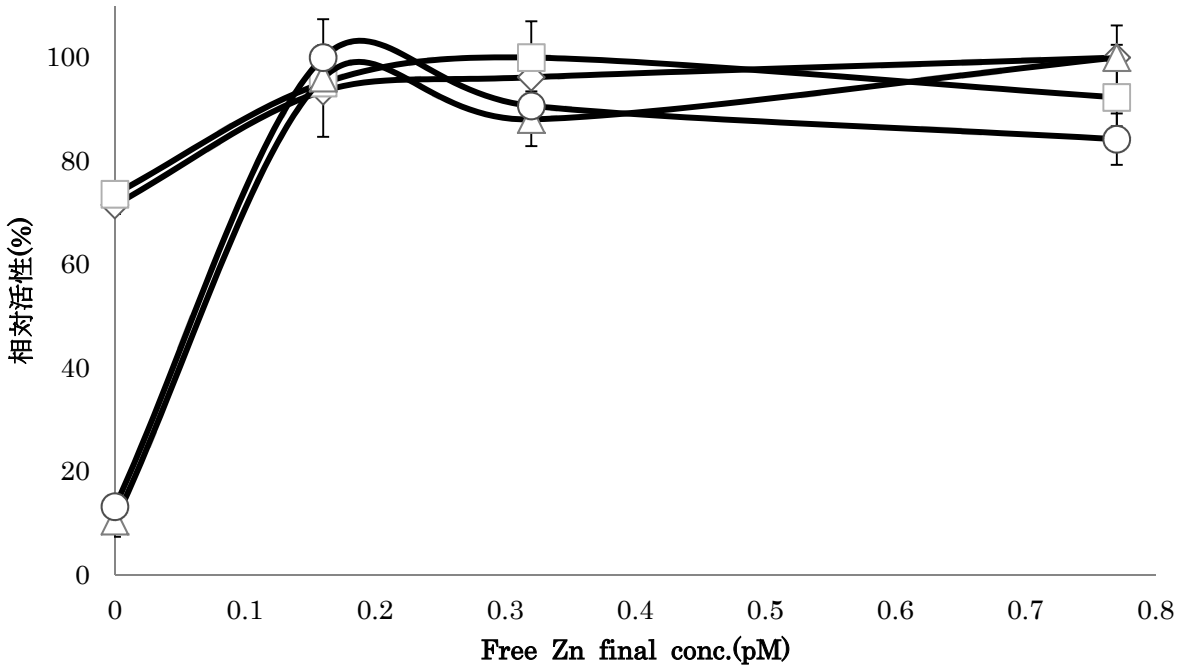

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
Free Zn final conc.(pM)

Fig. 5e

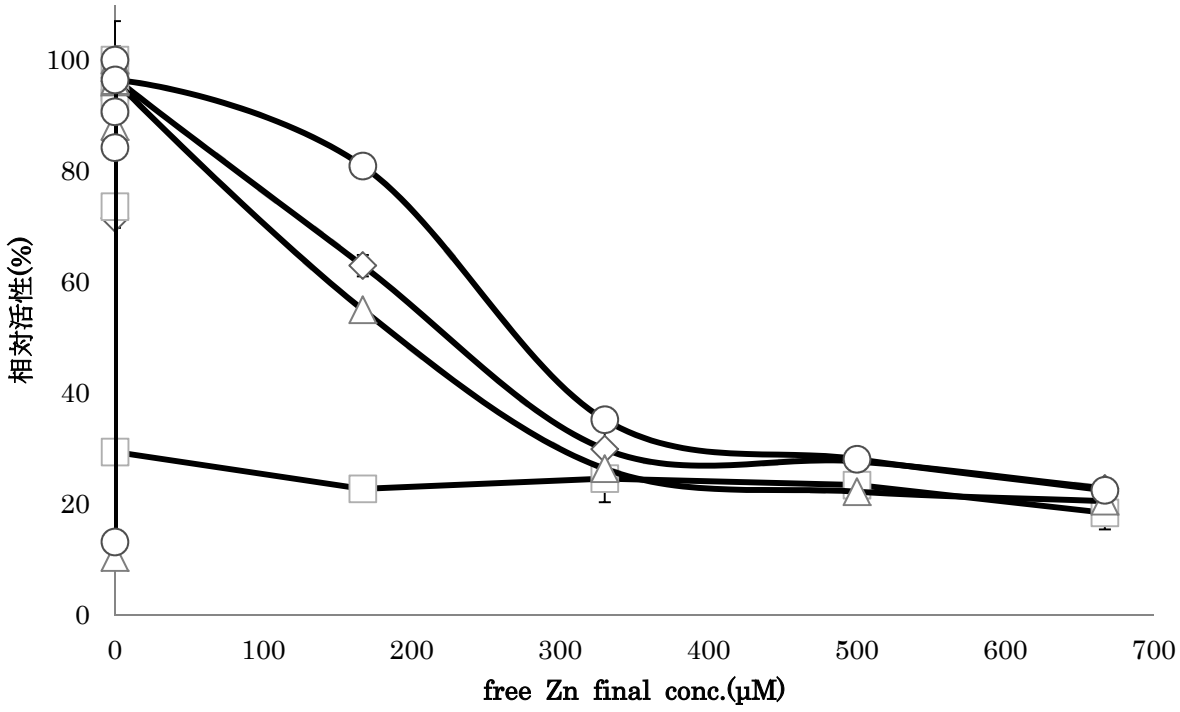
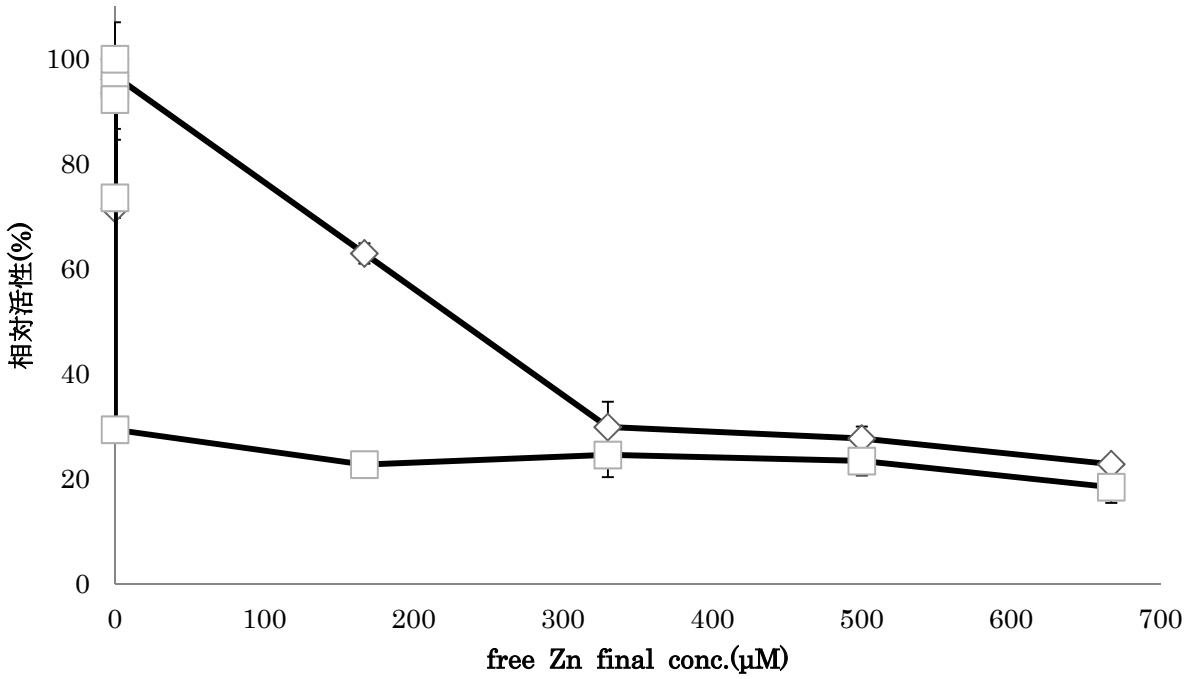

100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
100
200
300
400
500
600
700
free Zn final conc.(μM)

Fig. 5f


100
80
60
40
20
0
相対活性(%)
0
100
200
300
400
500
600
700
free Zn final conc.(μM)