



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; 出山, 義昭; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 42, 19-27
Issue Date	2021-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82749
Type	journal article
File Information	42_04.pdf



原 著

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

川村 良¹⁾ 出山 義昭²⁾ 吉村 善隆²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 山崎 裕¹⁾

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。

キーワード: アルカリ性ホスファターゼ, 阻害剤, レチノイン酸, キレート作用

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

¹⁾ 〒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健康科学講座 高齢者歯科学教室 (主任: 山崎 裕 教授)

²⁾ 〒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)

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、ヒト腫瘍細胞であるSaOs、Hela及び胚性腫であるP19細胞由来のALP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, levamisole⁸⁾, L-homoarginine^{9,10)}, 第一世代ビスホスホネート製剤のetidronate¹¹⁾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 MgCl₂, 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300 μ l 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 ZnCl₂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、100 μ M 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、最大阻害ではほぼ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 μ M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

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

Fig.1a

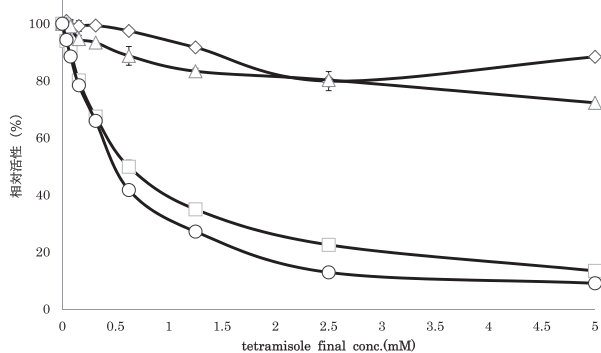


Fig. 1b

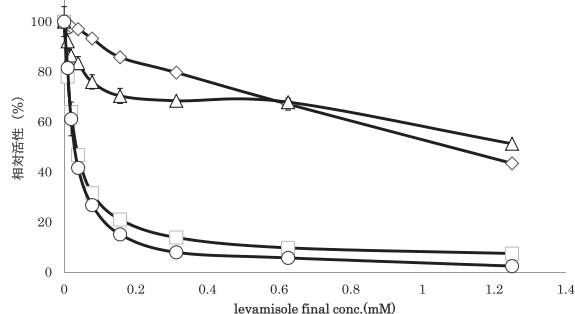


Fig. 1c

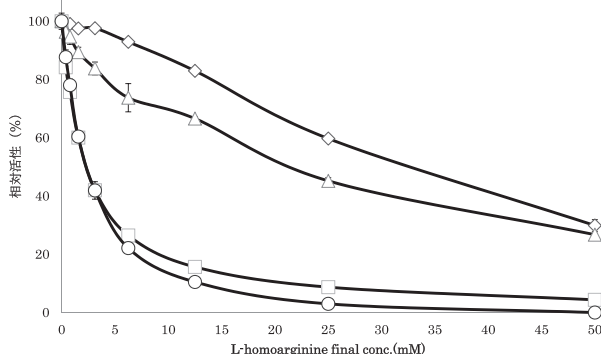


Fig. 1d

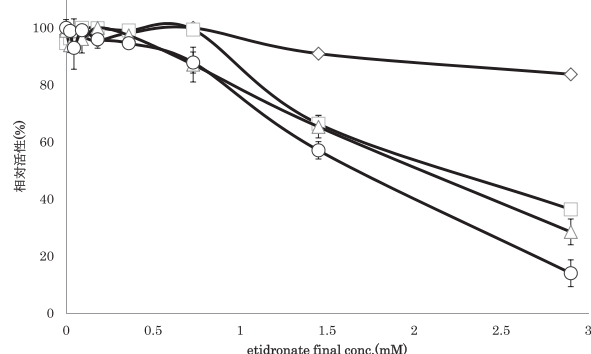


Fig. 1e

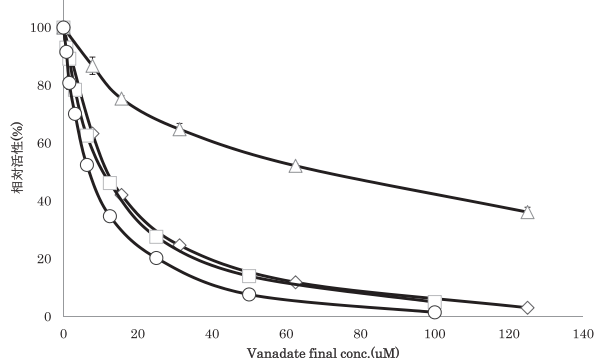


Fig. 1 各種ALP活性のtetramisole(a), levamisole(b), L-homoarginine(c), etidronate(d), vanadate, (e)濃度依存性
各種ALP活性の阻害剤 (a-e) 濃度依存性の測定は、各種ALP (骨型, 肝臓型, 胎盤型, 小腸型), 25 mM sucrose (-EDTA), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM トリス塩酸緩衝液, 2 mM パラニトロフェニリン酸 (p-NPP) および各種濃度の阻害剤を含む反応溶液300 μ l 中にてtriplicateで行った。37 $^{\circ}$ Cで30 分間反応させた後、20mM 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。

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 μ M	100 %
小腸型	n.d.	28 %	n.d.	49 %	20.1 mM	73 %	1.9 mM	71 %	87.6 μ M	64 %
骨型	0.67 mM	87 %	0.03 mM	93 %	2.3 mM	96 %	2.1 mM	64 %	12.6 μ M	95 %
肝臓型	0.59 mM	91 %	0.03 mM	98 %	2.1 mM	100 %	1.5 mM	86 %	8.1 μ M	98 %

(n. d. :決定できず)

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 ($K_{i0.5}$) 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。 $K_{i0.5}$ 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

Fig. 2

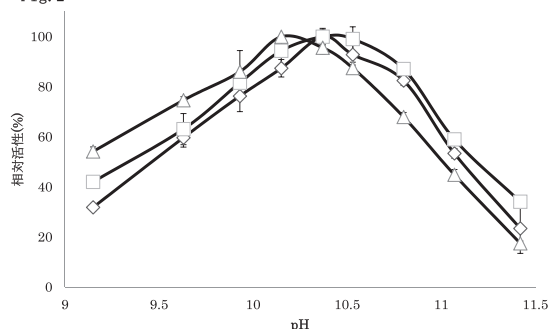


Fig. 2 腫瘍細胞由来各種ALP活性のpH依存性

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300 μl 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. 3a

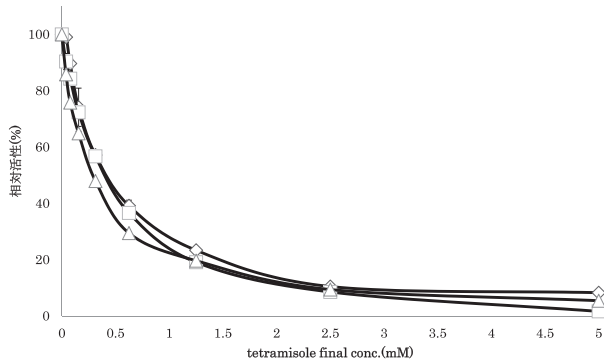


Fig. 3c

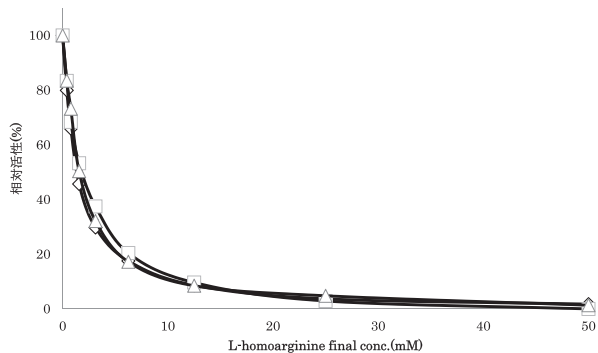
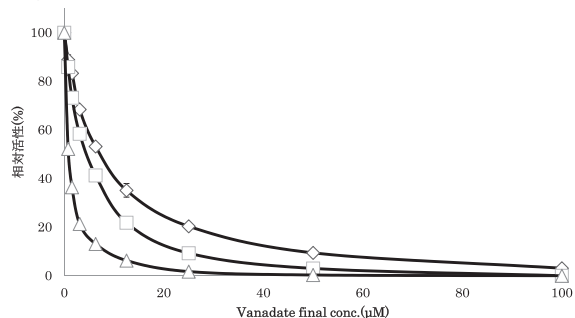


Fig. 3e



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

Fig. 3b

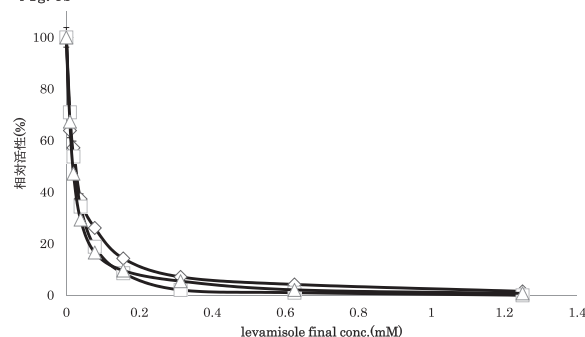


Fig. 3d

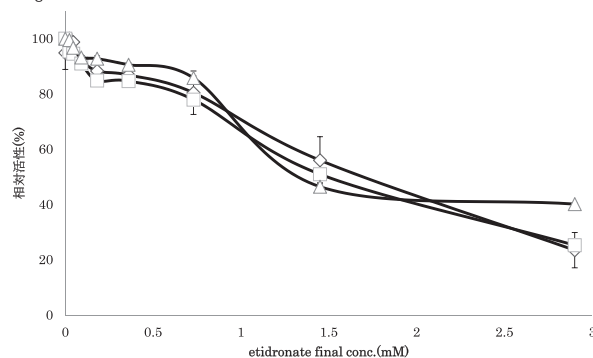


Fig.3 腫瘍細胞由来各種ALP活性のtetramisole(a), levamisole(b), L-homoarginine(c), etidronate(d), vanadate(e) 阻害剤濃度依存性

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。

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 %

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

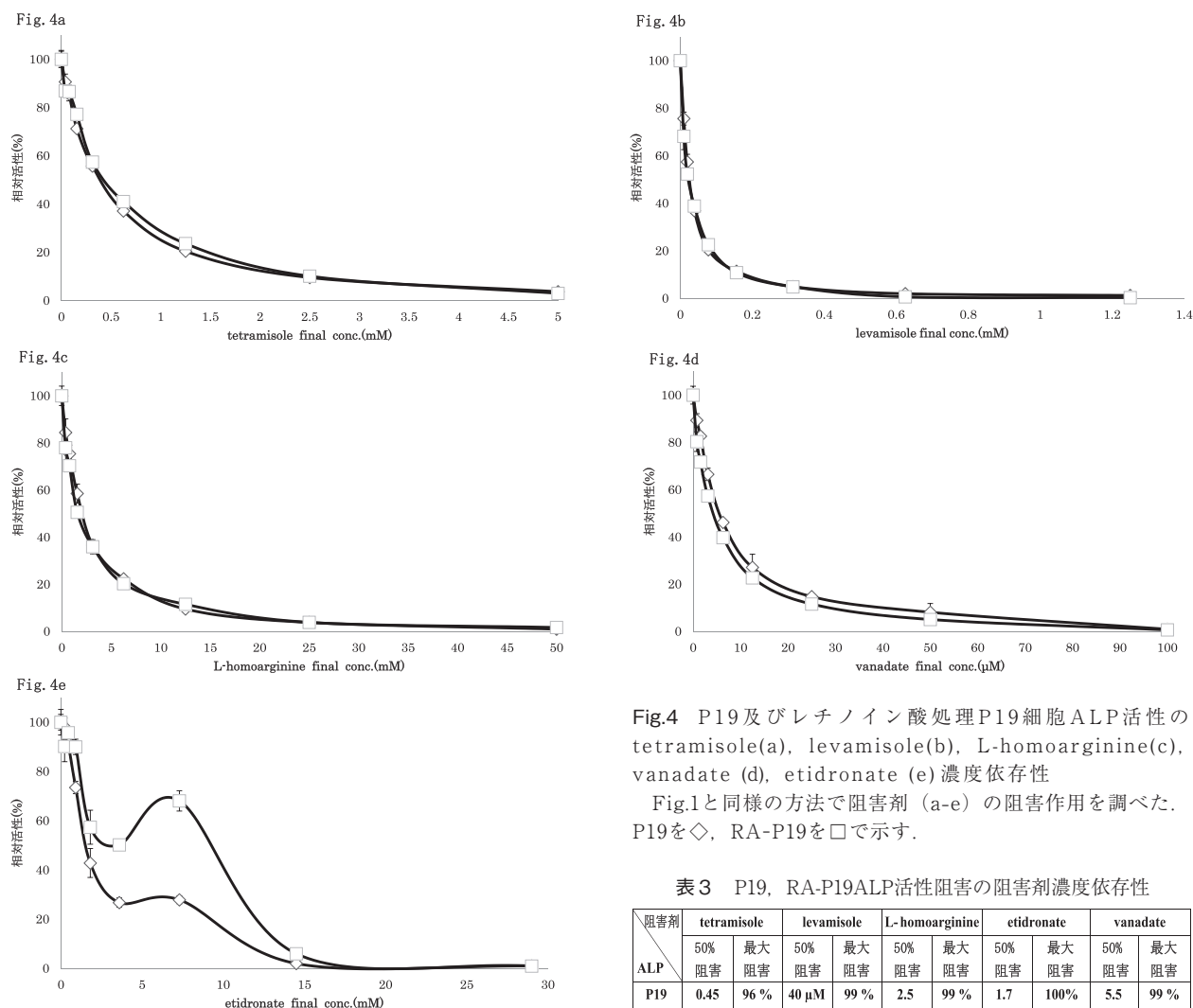


Fig.4 P19及びレチノイン酸処理P19細胞ALP活性の
tetramisole(a), levamisole(b), L-homoarginine(c),
vanadate (d), etidronate (e) 濃度依存性

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。

表3 P19, RA-P19ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

阻害剤	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
ALP	0.45 mM	96 %	40 μM	99 %	2.5 mM	99 %	1.7 mM	100 %	5.5 μM	99 %
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 %

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-

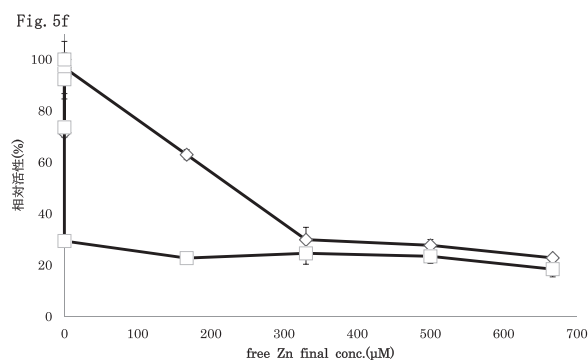
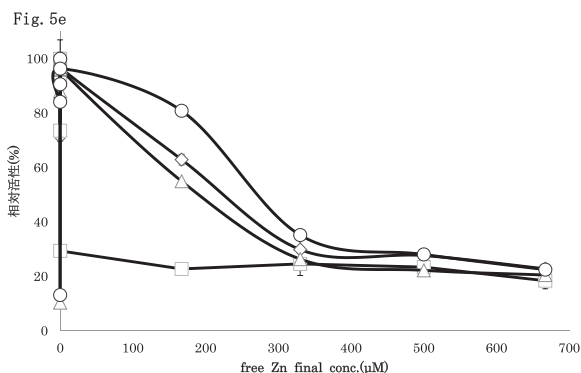
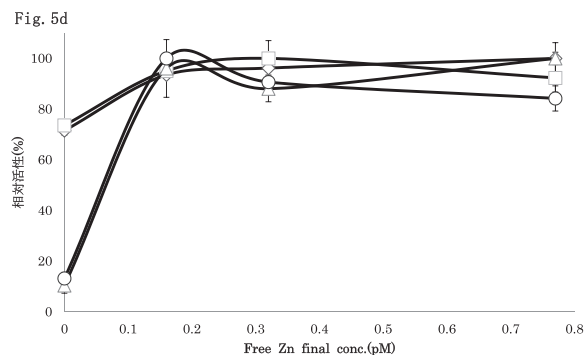
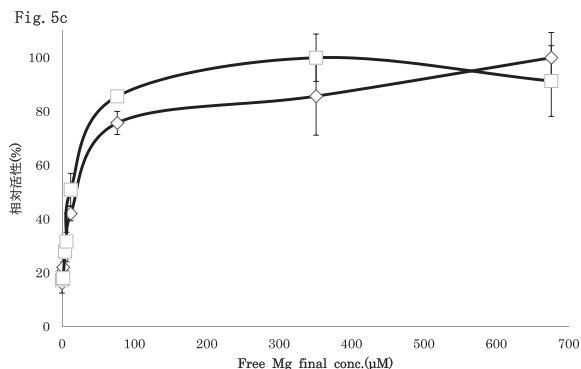
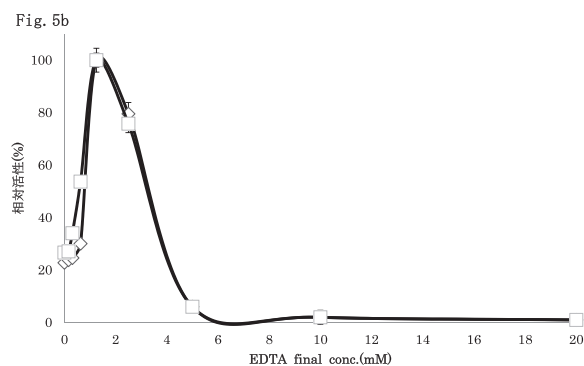
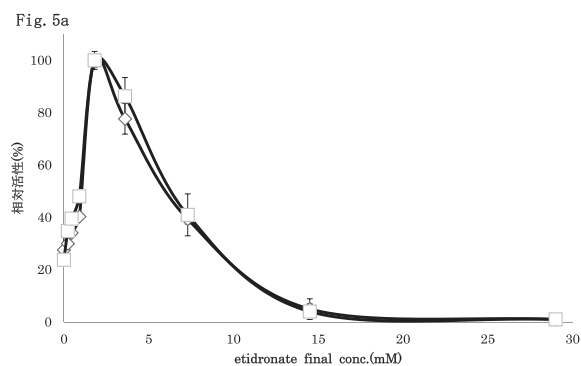


Fig. 5a P19及びP19 RA細胞ALP活性のetidronate阻害濃度依存性
1 mM ZnCl₂存在下で、阻害剤はetidronateを用いた。Fig.1と同様の
方法でetidronateの阻害作用を調べた。P19を◇、RA-P19を□で示す。

Fig. 5b P19及びP19 RA細胞ALP活性のEDTA阻害濃度依存性
1 mM ZnCl₂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
100 μM 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)

100 μM 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。

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 $K_{0.5}$ 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種の阻害剤とは異な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おり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に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1.8 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。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して推測されるが、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。

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。

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 phosphatase and 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 subunit-subunit interaction. Jpn J Pharmacol 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.

ORIGINAL

Differences in the sensitivity of alkaline phosphatase activity to its inhibitors in tumor or non-tumor cells

Ryo Kawamura¹⁾, Yoshiaki Deyama²⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾, Kuniaki Suzuki²⁾
and Yutaka Yamazaki¹⁾

ABSTRACT :

[Objectives] In a recent study on iPS and tumor cells, it was suggested that different types of cells have different levels of alkaline phosphatase (ALP) activity. Therefore, we examined differences in sensitivity to ALP inhibitors in both non-tumor cells and tumor cells.

[Materials and methods] We measured ALP activity using commercial ALP derived from the small intestine, human bone, placenta, and liver. ALP activity in human tumor cells: SaOs, Hela, P19, and RA-P19, which was differentiated into neurologic cells with retinoic acid (RA) treatment. Additionally, we examined the sensitivity of ALP activity to inhibitors using tetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronate, and vanadate.

[Results and Discussion] The sensitivity to each inhibitor of ALP activity varied depending on the isozyme type and its human organ origin. The sensitivity of ALP activity derived from human tumor cells did not show large differences, suggesting that ALP activity of undifferentiated tumor cells has similar characteristics regardless of the organ origin.

ALP activity in P19 and RA-P19 showed similar sensitivity to inhibitors, except for etidronate, which produced different sensitivity. Similar results were obtained with EDTA, thus etidronate inhibited ALP activity by chelation effects was concluded. We examined the effects of Zn, which is necessary for ALP activity, on ALP activity in P19 and RA-P19. Zn promoted ALP activity at a low concentration, but it inhibited ALP activity at a high concentration. It has been proposed that two types of Zn binding sites with either low- or high-affinity are present in P19 cells. Furthermore, our results suggested that changes in the low-affinity site of Zn with RA treatment caused differences in sensitivity of ALP activity to etidronate in P19 and RA-P19.

[Conclusion] The changes in the Zn binding site, which are essential for inhibitory activity, changed sensitivity to the inhibitor along with ALP activity in tumor cells that lost organ-specific sensitivity to inhibitors.

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

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

²⁾ Kita13, Nishi7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan. Department of Molecular Cell Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief: Prof.Kuniaki Suzuki)