

博士（医学） 石 部 基 実

学 位 論 文 題 名

Human Prostatic Acid Phosphatase Directly
Stimulates Collagen Synthesis and Alkaline
Phosphatase Content of Isolated Bone Cells

（ヒト前立腺由来酸性フォスファターゼは分離培養骨芽細胞の
コラーゲン合成とアルカリ性フォスファターゼ量を直接に促進する）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

ヒト前立腺癌は骨に転移し易く、その頻度は諸家の報告によると約70%と言われている。骨転移巣の約90%は骨増殖性であり、レントゲン写真では硬化像として認められ、組織学的に転移巣には新しい骨形成が認められる。前立腺癌組織からは塩基性線維芽細胞成長因子などの骨芽細胞の活性を促進する物質が含まれていることが既に報告されている。

一方、ヒト前立腺癌患者の血清及び転移巣において前立腺由来酸性フォスファターゼ(hPAP)が正常に比べて高レベルにあることがよく知られている。hPAPは分子量約90,000の糖タンパクであり2個の分子量45,000のサブユニットから成っている。その糖鎖はマンノース6リン酸(M6P)を含んでいる。

また、骨芽細胞の分化を促進させるインスリン様成長因子-II(IGF-II)に対する受容体とM6Pに対する受容体が同一であることが既に明らかにされている。

そこで我々は、hPAPが細胞膜のIGF-II/M6P受容体を介して直接骨芽細胞を刺激し得るという仮説のもとで以下の実験を行った。

材料及び方法

hPAP

hPAPはSigma社の精製標品を用い、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりその純度を調べた。また、p-ニトロフェニルリン酸(pNPP)を基質として、

用い、hPAP の酸性フォスファターゼとしての機能を調べた。クロラミン T 法にて hPAP を放射性同位元素 ^{125}I で標識し結合実験に使用した。

骨芽細胞の分離培養

生後 1 - 2 日目のラット頭蓋骨より無菌的に側頭骨を採取した。この骨片をコラゲナーゼを含む 37°C の緩衝液中で培養した。20 分毎に 5 回にわたって細胞成分を回収した。以前に報告されているように、フラクション 3, 4, 5 (40 - 100 分) が骨芽細胞を多く含んでいるので本実験に用いた。また、フラクション 1 は線維芽細胞を多く含んでおり、比較実験として用いた。細胞を 5 % の仔ウシ血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて、16 mm マルチウェルを用いて培養した。hPAP を添加する 24 時間前に血清を含まない DMEM に変えた。

コラーゲン合成の測定

hPAP を含む無血清 DMEM にて骨芽細胞を 24 時間培養した後、0.25 mM proline, 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^{14}C] proline を含む無血清 DMEM 0.5 ml で 37°C, 4 時間培養した。0.25 M NaOH で細胞を回収し、Peterkofsky と Diegelmann の方法に従いコラゲナーゼ処理を行った。コラゲナーゼ消化タンパク即ちコラーゲン及び非コラーゲン性タンパクに含まれる [^{14}C] proline を各々測定した。

DNA 量の測定及び thymidine の取り込み

hPAP を骨芽細胞に 24 時間作用させた後、細胞を回収し骨芽細胞の総 DNA 量を蛍光定量分析にて測定した。また、hPAP を 24 時間作用させた時、最後の 2 時間に 2.0 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H] thymidine を加え、細胞の thymidine の取り込みを測定した。

アルカリ性フォスファターゼ活性の測定

hPAP を含む無血清 DMEM にて細胞を 24 時間培養した後、細胞をよく洗浄し基質として pNPP を含む緩衝液 (pH 10.15) を 1.0 ml 加え、37°C で 30 分間培養した。加水分解でできた p-ニトロフェノール (pNP) を 410 nm における吸光度で測定した。また、ATPase, Myokinase, RNase A を用いて同様の実験を行った。

hPAP と骨芽細胞の結合実験

5 % 仔ウシ血清を含む DMEM にて骨芽細胞が confluent になった後、細胞をよく洗浄し [^{125}I] hPAP を含む結合実験用緩衝液 (25 mM HEPES, 1 mg/ml ウシ血清アルブミンを含む無血清 DMEM) に変えた。4 °C, 20 時間培養を行った後、0.05% トリプシンにて細胞を回収し、 γ -カウンターにて結合した [^{125}I] hPAP を測定した。非特異的結合は 200 倍高濃度の非標識 hPAP 存在下で計算された。また、クロスリンキング実験には 0.6 nM [^{125}I] hPAP を用い、20 時間後に 0.5 mM disuccinimidyl suberate 存在下で 15 分間培養した。SDS を含む緩衝液にて細胞

を溶解した後、SDS-PAGEを行った。

結 果

hPAPの性質

SDS-PAGE後銀染色を行った結果、分子量45,000に幅広い単一のバンドが認められた。また、酸性フォスファターゼとしてのhPAPの至適pHは6.0であり、Eadie-Hofsteeのプロットから最大速度 V_{max} は885nmol pNP/h/ μ mol hPAPであり、Kmは88 μ g/mlと算出された。

コラーゲン合成

hPAPは骨芽細胞のコラーゲン合成を用量依存性に促進した。1nM hPAPにて促進作用が認められ、100-300nMで最大に達し対照群に比べて約1.5倍コラーゲン合成を増加させた。また、非コラーゲン性タンパク合成に関しては1nM hPAPでは促進作用がなかったが、100nM hPAPは合成を促進させた。

DNA合成及びthymidineの取り込み

hPAPは骨芽細胞の総DNA量及びthymidineの取り込みに関しては促進作用をもたなかつた。

アルカリ性フォスファターゼ活性

hPAPは骨芽細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性を用量依存性に促進した。1nMで平衡に達し、対照群に比べて約1.5倍であった。また、100nM hPAPは時間依存性に骨芽細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性を促進し、24時間で最大に達した。

残存しているhPAPがアルカリ性フォスファターゼ活性の測定値に影響を及ぼすかどうかをみるために、細胞が無い状態で同様の測定を行ったがpNPPの加水分解を認めることはできなかった。

hPAP以外の酵素のアルカリ性フォスファターゼ活性に対する作用を調べたところ、M6Pを含まないATPase、Myokinaseは影響を及ぼさなかったが、M6Pを含むと考えられるRNase Aはアルカリ性フォスファターゼ活性をhPAP同様に促進した。また、hPAPはラット線維芽細胞に対しても促進作用を示した。

hPAPの骨芽細胞に対する結合

[¹²⁵I] hPAPを用いて骨芽細胞に対する結合実験を行いScatchard解析を行った。その結果、解離定数は6.5nM、結合部位数は細胞当たり 1.0×10^5 個と算出され高親和性結合部位の存在が認められた。

また、クロスリンキング後のオートラジオグラフィーの結果、分子量320,000にバンドが認められ、このバンドは200倍高濃度の非標識 hPAP の存在下では、ほぼ消失した。

考 察

前立腺癌の骨転移巣の大部分は骨増殖性であることが、臨床的によく知られている。転移巣の骨構造は緻密であり、前立腺癌細胞が局所において骨形成を促進する因子を産生していると考えられている。腫瘍細胞や組織から種々の細胞増殖因子が抽出されている。

一方、前立腺癌患者では、hPAP の血清レベルが高値であることが従来より知られている。しかしながら、hPAP の生体における機能は不明であり、hPAP の細胞に対する直接作用について述べた報告は未だない。本研究において、hPAP はラット骨芽細胞に対し DNA 合成を促進させなかつたが、アルカリ性フォスファターゼ活性及びコラーゲン合成を用量依存性に促進させた。即ち、hPAP は骨芽細胞の分化機能を促進させることから、in vivo では骨形成に関与していると考えられる。また、¹²⁵I で標識された hPAP を用いた実験から、ラット骨芽細胞は hPAP に対し高親和性結合部位を持っていることがわかった。クロスリンキング後のオートラジオグラフィーの結果では、分子量320,000にバンドを認めた。hPAP の分子量は約90,000なので、hPAP は骨芽細胞において分子量約230,000のタンパクに結合していると考えられる。

本実験では、hPAP が骨芽細胞に対し生物学的作用をもつことが示された。その機序として、hPAP が骨芽細胞膜のタンパクに特異的に結合したことから、ある種の受容体を介していると考えられる。ヒト骨基質に多量に含まれる細胞増殖因子のひとつである IGF-II は、細胞膜の IGF-II 受容体に結合することにより骨芽細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性やコラーゲン合成を促進することが知られている。IGF-II 受容体は M6P 受容体と同一であり、分子量は約 250,000 である。本実験結果から、hPAP は骨芽細胞に対し IGF-II 様の作用をもち、分子量 230,000 のタンパクに結合することがわかった。また、hPAP はその糖鎖に M6P をもっており、M6P を介して IGF-II / M6P 受容体に結合し骨芽細胞において生物学的作用をもつ可能性があると考えられる。

結 論

hPAP は in vitro においてラット骨芽細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性及びコラーゲン合成を用量依存性に促進させた。また、hPAP は骨芽細胞の分子量230,000のタンパクに高親和性に結合した。hPAP は細胞膜の受容体を介して骨芽細胞を刺激し、前立腺癌の骨転移巣における骨形成に関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　金　田　清　志

副　查　教　授　阿　部　和　厚

副　查　教　授　葛　巻　　遼

研究目的

ヒト前立腺癌の骨転移巣の約90%は造骨性であり、組織学的に転移巣には新しい骨形成が存在する。一方、ヒト前立腺癌患者の血清及び転移巣において前立腺由来酸性フォスファターゼ(hPAP)が正常に比べて高レベルにあることがよく知られている。hPAPは分子量約90,000の糖タンパクであり、その糖鎖にはマンノース6リン酸(M6P)が含まれている。また、骨芽細胞の分化を促進させるインスリン様成長因子-II(IGF-II)に対する受容体とM6Pに対する受容体が同一であることが既に明らかにされている。そこで、hPAPがIGF-II/M6P受容体を介して骨芽細胞を刺激し、骨形成を促進するという仮説のもとで以下の実験を行った。

実験結果

hPAPの特性

hPAPはSigma社の精製標品を用いた。SDS-PAGE後銀染色を行いその純度を調べた結果、分子量45,000に幅広い単一のバンドが認められた。また、酸性フォスファターゼとしてのhPAPの至適pHは6.0であり、Eadie-Hofsteeのプロットから最大速度 V_{max} は885nmol pNP/h/ μ molであり、Kmは88 μ g/mlと算出された。

コラーゲン合成

hPAPを含む無血清培養液にて骨芽細胞を24時間培養した後、[¹⁴C]proline存在下で更に4時間培養した。コラゲナーゼ消化タンパク即ちコラーゲン及び非コラーゲン性タンパクにおける[¹⁴C]prolineの取り込みを各々測定した。その結果、hPAPは骨芽細胞のコラーゲン合成を用量依存性に促進した。1nM hPAPにて促進作用が認められ、100nMで最大に達し、対照群に比べて約1.5倍コラーゲン合成を増加させた。また、非コラーゲン性タンパク合成に関しては、1nM hPAPは促進作用を示さなかったが、100nM hPAPは合成を促進させた。

DNA合成及びthymidineの取り込み

hPAPは骨芽細胞の総DNA量及びthymidineの取り込みに関しては促進作用をもたなかつた。

アルカリ性fosファターゼ活性

hPAP を骨芽細胞に添加し24時間培養した。p-ニトロフェニールリン酸を含む緩衝液（pH 10.15）を加え、加水分解でできたp-ニトロフェノールを410nmにおける吸光度で測定した。hPAP は骨芽細胞のアルカリ性fosファターゼ活性を用量依存性に促進し、1nMで最大に達し、対照群に比べて約1.5倍であった。また、100nM hPAP は時間依存性に骨芽細胞のアルカリ性fosファターゼ活性に対する作用を調べたところ、M6Pを含まないATPase、Myokinase は影響を及ぼさなかつたが、M6Pを含むと考えられるRNase A はアルカリ性fosファターゼ活性をhPAP 同様に促進した。また、hPAP はラット線維芽細胞に対しても促進作用を示した。

hPAP の骨芽細胞に対する結合

[¹²⁵I] hPAP を用いて骨芽細胞に対する結合実験を行いScatchard 解析を行った。その結果、解離定数は6.5nM、結合部位数は細胞当たり 1.0×10^5 個と算出され、高親和性結合部位の存在が認められた、また、クロスリンク後のオートラジオグラフィーの結果、分子量320,000にバンドが認められ、このバンドは200倍高濃度の非標識 hPAP の存在下では、ほぼ消失した。

考 案

hPAP はラット骨芽細胞の分化機能を促進し、骨芽細胞はhPAP に対して分子量230,000の高親和性結合部位を持っていることが示された。一方、IGF-II/M6P受容体の分子量は約250,000であることが知られており、hPAP が骨芽細胞に対し生物学的作用をもつ機序として、その糖鎖に存在するM6Pを介してIGF-II/M6P受容体に結合し、骨細胞に対しIGF-II様の作用をもつことが考えられる。in vitro における本研究結果から、hPAP が前立腺癌の骨転移巣における骨形成に関与している可能性が示唆された。

以上本研究は前立腺由来酸性fosファターゼの骨芽細胞に対する生物学的作用を明らかにしたものであり、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認定された。