

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、16mmマルチウエ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、 0.25mM proline, $0.1\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^{14}C] prolineを含む無血清DMEM 0.5ml で 37°C , 4時間培養した。 0.25M 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 ($\text{pH}10.15$) を 1.0ml 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 410nm 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 (25mM HEPES, $1\text{mg}/\text{ml}$ 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、クロスリンク実験には 0.6nM [^{125}I] hPAPを用い、20時間後に 0.5mM 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、 K_m 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。1 nM 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1 nM 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った。

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。1 nM 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、M 6 P を含まない ATPase、Myokinase は影響を及ぼさなかったが、M 6 P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

[125 I] 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 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ったが、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、 ^{125}I 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。クロスリンク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 M 6 P 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 M 6 P をもっており、M 6 P を介して IGF-Ⅱ / M 6 P 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 査 教 授 金 田 清 志

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 葛 巻 暹

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、 K_m 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、 $[^{14}\text{C}]$ proline 存在下で更に4時間培養した。コラー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 $[^{14}\text{C}]$ 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。1 nM 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、1 nM 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った。

アルカリ性フォスファターゼ活性

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フォスファターゼ活性を用量依存性に促進し、1 nM 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フォスファターゼ活性を促進し、24時間で最大に達した。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、M6 Pを含まないATPase、Myokinase は影響を及ぼさなかったが、M6 P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

[^{125}I] 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 察

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/M6 P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M6 Pを介してIGF-II/M6 P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フォス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。