

学 位 論 文 題 名

Quantitative analyses of alkaline phosphatase activity
and mineralization process
of a clonal osteoblast-like cell MC3T3-E1

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 のアルカリ性ホスファターゼ活性
および石灰化過程の定量的解析

学位論文内容の要旨

(目的) 矯正臨床における歯牙移動メカニズムを理解する上で、骨形成機構の研究は重要である。マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) は *in vitro* で培養中にコラーゲンなどの細胞外基質を合成・分泌したのちに骨様組織を形成することから骨形成のモデルとして硬組織石灰化過程の研究に、またホルモン、サイトカインおよび薬物などの石灰化に作用する因子の影響を調べるなど、広く研究に用いられている。しかし従来の多くの研究では、石灰化過程は光学顕微鏡を用いる定性的な方法で観察され、骨芽細胞のマーカーとしてのアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の解析も不充分であった。

ALP はフォスファチジルイノシトール (PI) で骨芽細胞の細胞膜表面に結合しているエクトエンザイムであり、その一部は細胞膜から遊離してくることが知られている。ALP は硬組織形成において重要な役割を演じており、これまでに数多くの報告がなされているにもかかわらず、ALP の真の機能や石灰化における意義については未だ明らかではない。

そこで、E1 細胞の石灰化過程を簡便かつ定量的に解析する系を確立することおよび培養中の両タイプの ALP 活性の変化を詳細に検討することを目的として以下の実験を行った。

(材料と方法) E1 細胞を 24 穴のプレートの各ウェルに播種して通法に従って 10%FBS 添加 α -MEM、5%CO₂、37°C で培養し、コンフルエント時を 0 日目としてそれ以後 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, と 40 日目まで回収し、これをサンプルとして以下の測定を行った。

ALP については細胞の産生した ALP の総量は細胞および細胞外基質に結合しているタイプ (結合型) と、メディアウム中に遊離したタイプ (遊離型) との合計であることから、両者をそれぞれ独立して定量した。特に結合型 ALP は回収による損失を防ぐためにウェル内で直接活性を測定した。測定法は Bessey らの方法に準じ、パラニトロフェニルリン酸 (pNPP) を基質に用いた。遊離型 ALP 活性はメディアウムを回収し、同様に反応液を添加して測定した。

結合型 ALP 活性測定後のウェルでは引き続きタンパク質量を測定し、結合型 ALP の比活性を計算した。

E1 細胞によるコラーゲンの産生はヒドロキシプロリン (HP) 量として測定した。すなわち回収したサンプルに 6N 塩酸を加えて 110°C で 24 時間加水分解し、Woessner 法で定量した。

カルシウム (Ca) 量と無機リン (Pi) 量は加水分解したサンプルをさらに 750°C で 18 時間灰化処理したのち、それぞれ原子吸光法と Chifflet 法で定量した。

(結果) 実験に用いた E1 細胞は培養開始直後は光学顕微鏡観察下で繊維芽細胞様の形態をとり、培養開始後約 4 日でコンフルエントに達した。その後、数

石状に形態を変化させて多層化していった。コンフルエント後約 14 日で結節状部位を形成し、20 日から 30 日にかけて石灰化した不透過像が観察されるようになり、経時的にその量は増加した。この形態学的観察により、研究に用いた E1 細胞は培養中に骨芽細胞に分化し、石灰化組織を形成することが確認された。そこで我々は石灰化過程を定量的に観察するために以下の分析をおこなった。

HP 量は、光学顕微鏡下での結節状部位の形成と石灰化の進行に極めて良く一致して、コンフルエント後 15~40 日目にかけて経時的に増加した。これにより E1 細胞の石灰化過程におけるコラーゲンの産生と細胞外への分泌を定量的に測定することが可能になった。

Ca 量、Pi 量もまた、コンフルエント後 5~40 日目にかけて石灰化の進行に伴って経時的に増加したことから、これらの測定により E1 細胞の石灰化過程を簡便かつ定量的に解析することが可能になった。

結合型 ALP の活性は、結節状部位の形成や石灰化がまだ生じないコンフルエント後 5 日目から急速に増加し、20 日目に最大活性を示したのちほぼ一定のレベルを保った。一方、遊離型 ALP の活性はコンフルエント後 15 日目以降 35 日目まで、石灰化の進行に良く一致して増加した。

結合型 ALP と遊離型 ALP の至適 pH は前者で 9.2~9.7、後者では 10.0~10.4 であった。また、LineWeaver-Burk プロットの結果、酵素活性測定の基質である pNPP に対する K_m 値は前者で 3.3mM、後者で 2.1mM と異なっていた。

(考察) MC3T3-E1 細胞はマウス頭蓋冠からアルカリ性ホスファターゼ活性を指標に株化された細胞株である。研究に用いた E1 細胞は過去に報告されているものと同様に培養期間中に石灰化部位を形成し、その数と大きさは経時的に増加した。また培養中のコラーゲン、カルシウム、無機リン量はそれぞれ光顕下で観察される石灰化部位の数と大きさの増大にともなって増加したことから、これらの測定によって石灰化の過程を定量的に評価することができると結論した。

ALP 活性は骨芽細胞のマーカーとして用いられており、硬組織の形成に際しては必須のものとしてされているが、その機能については未だ明確ではない。また ALP は細胞膜表面に存在する酵素であるが、その一部は結合が切れて細胞から遊離してくることが過去に報告されている。しかし、これまでの研究では ALP 活性は細胞に結合した状態の測定が主で、遊離した ALP をその後追跡した実験はほとんどなされていない。さらにその測定方法は細胞を回収した後、超音波破碎したものをを用いるのが一般的で、この方法ではサンプルの調整過程で一部を損失している可能性がある。そこで我々は損失を防ぐために細胞を回収せずにウェルの中で直接 ALP 活性を測定し、さらに細胞に結合した ALP とメディアウム中に遊離した ALP とをそれぞれ区別して石灰化期に至るまで長期的に定量した。結合型 ALP の活性は石灰化開始期に最大値をしめしたのに対し、遊離型 ALP の活性は石灰化の進行に伴って上昇を続けた。また双方の ALP の酵素化学的性質にも違いがみられた。以上の結果は E1 細胞の ALP は結合型として細胞表面に存在する間に修飾を受けて成熟したのちに遊離型となり、遊離型がより有効に石灰化の進行に関与することを示唆している。

(結論) E1 細胞の石灰化過程を簡便かつ定量的に解析する系を確立することができた。細胞に結合した ALP ではなく遊離した ALP がより石灰化に重要である可能性が推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

Quantitative analyses of alkaline phosphatase activity and mineralization process of a clonal osteoblast-like cell MC3T3-E1

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 のアルカリ性ホスファターゼ活性
および石灰化過程の定量的解析

審査はいずれの担当者も口頭試問の形式、あるいはレポートの提出を求めて、提出論文の内容および関連分野について試問した。

矯正臨床における歯牙移動メカニズムを理解する上で、骨形成機構の研究は重要である。マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) は *in vitro* で培養中にコラーゲンなどの細胞外基質を合成・分泌したのちに骨様組織を形成することから骨形成のモデルとして研究に用いられている。しかし従来の多くの研究では石灰化過程は定性的にのみ観察され、骨芽細胞のマーカーとしてのアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の解析も不十分であった。ALP は骨芽細胞のマーカー酵素として硬組織の石灰化に不可欠の酵素であり、遺伝的欠陥がある場合には硬組織形成不全をおこすことが良く知られているが、骨形成過程における本酵素の果たす役割については不明な点が多い。そこで、E1 細胞の石灰化過程を簡便かつ定量的に解析する系を確立することと、培養中の ALP 活性の変化を詳細に解析することを目的として以下の実験を行った。

2×10^3 個の E1 細胞を 24 穴のプレートの各ウェルに播種して 10% FBS を含む α -MEM で通法に従って培養し、コンフルエンス時とそれ以後 5 日毎に 40 日目まで細胞および培養液を回収した。これをサンプルとしてハイドロキシプロリン (HP) 量を Woessner 法で、カルシウム (Ca) 量を原子吸光法で、無機リン (Pi) 量を Chifflet 法でそれぞれ測定した。ALP については細胞の産生した ALP の総量は細胞および細胞外基質に結合しているタイプ (結合型) と、培養液中に遊離したタイプ (遊離型) との合計であることから、両者をそれぞれ独立して定量した。特に結合型 ALP は回収による損失を防ぐためにウェル内で直接活性とタンパク質量を測定した。測定法は Bessey らの方法に準じ、人工基質であるパラニトロフェニルリン酸 (pNPP) を用いた。

実験に用いた E1 細胞は位相差顕微鏡観察下で培養開始後約 4 日でコンフルエントに達し、その後、約 14 日で結節状部位を形成、20 日から 30 日にかけて石灰化した不透過像を形成し、経時的にその量は増加した。HP 量の経時的増加は、顕微鏡

下の石灰化過程の進行に極めて良く一致した。Ca 量、Pi 量も石灰化の進行に伴って増加したことから、これらの測定により E1 細胞の石灰化過程を簡便かつ定量的に解析することが可能になった。結合型 ALP の活性はコンフルエンス後 5 日目から急速に増加し、石灰化開始期に最大活性を示したのちほぼ一定のレベルを保った。一方、遊離型 ALP の活性はコンフルエンス後 15 日目以降 35 日目まで、石灰化の進行経過に極めて良く一致して増加した。結合型と遊離型の至適 pH は前者で 9.2~9.7、後者では 10.0~10.4 であった。また、酵素活性測定の基質である pNPP に対する Km 値は前者で 3.3mM、後者で 2.1mM と異なっていた。以上の結果は E1 細胞の ALP は結合型として成熟したのちに遊離型となり、遊離型がより有効に石灰化の進行に関与する可能性を示唆している。

本論文は、歯科矯正学的な歯の移動を行う際の重要な生体反応の一つである骨芽細胞による骨形成機構の中で、アルカリ性ホスファターゼの役割について検討を加えたものである。本研究においては、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いて、まず実験系を確立した上で、結合型と遊離型の ALP を分離して経時的、定量的に計測し、石灰化過程と対比してそれぞれの役割を考察すると同時に、それぞれの生化学的な性質の相違を検討している。その結果、結合型と遊離型の ALP におけるその生化学的特性に違いを認め、また石灰化過程におけるその役割に差異を見出している。この成果は、本研究で初めて明らかにされたものであり、矯正学的にも、骨形成に関する基礎的研究としても、骨の研究全体に大いに貢献するものと考えられる。加えて、試問に対する明快な回答から、申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野における基礎的、臨床的な広い学識を有していると認められた。よって、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。