

学 位 論 文 題 名

Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase
for mineralization of osteoblastic cells

（骨芽細胞の石灰化過程における
アルカリ性ホスファターゼ酵素活性の必要性）

学位論文内容の要旨

【目的】アルカリ性ホスファターゼ（ALP）は生体内に広く存在し、特に骨型 ALP は骨芽細胞の分化や硬組織形成能の指標あるいは骨の動態を反映するマーカー酵素として多くの研究に用いられている。ALP は硬組織の石灰化過程において重要な役割を果たしていると考えられるが、その機能は明らかではなく、生理的基質や至適 pH の同定もされていない。ALP は細胞膜にグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーで結合（結合型 ALP）した細胞外酵素である。細胞培養液中には細胞膜から遊離した ALP（遊離型 ALP）も存在して活性を保持しており、遊離型 ALP 活性の上昇と細胞の石灰化の時間経過が一致していたとする報告もある。この論文は、骨形成細胞における ALP の機能を明らかにすることを目的として、ALP 活性の抑制と ALP の細胞からの遊離が骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の石灰化過程に及ぼす効果を調べたものである。

【材料と方法】骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を 10%FBS を含む α -MEM を用いて、通法に従って培養した。ALP の細胞膜からの遊離には、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C（PIPLC）8mU/ml、ALP 活性の抑制には阻害剤である tetramisole 0.3mM を添加し、通法に従って培養し、非添加群と比較した。PIPLC 添加開始はコンフルエンス後 1 日、10 日、16 日の 3 群で行った。コンフルエンス後、31 日、40 日に、細胞と細胞外基質、および培養液を回収し、ALP 活性と、カルシウム（Ca）、リン（P）、ハイドロキシプロリン（HP）、およびオステオカルシン（OC）量を測定した。ALP 活性は p NPP 加水分解活性とし、Bessey らの変法を用いて測定した。蛋白量は Lowry 法で測定し、結合型 ALP の比活性を求めた。ハイドロキシプロリン量は Woessner 法、カルシウム量は原子吸光法、リン量は Chifflet 法を用いた。また、オステオカルシン量の測定は radioimmunoassay で行った。

【結果と考察】0.3mM tetramisole を添加すると、細胞膜結合型及び遊離型の ALP 活性が、約 90% 阻害された。回収した細胞と細胞外基質を十分に洗って tetramisole を除いた後に、ALP 活性および、蛋白量を測定したところ、コントロールと活性阻害群の間には有意差は認められなかった。この結果から、tetramisole が存在している環境下においても ALP はコントロールと同様に発現しており、tetramisole による細胞の蛋白合成に対する影響はないことを示している。コンフルエンス後 28 日目の細胞の位相差顕微鏡写真、および 40 日目の von Kossa 染色の結果、コントロールの細胞では明らかな石灰化結節が認められるのに対して、ALP 活性阻害群では石灰化結節は認

められず、Ca、P、OC 量も、40 日目で非添加群と比べ有意に低値を示した。このことより、tetramisole による ALP 活性の抑制により細胞の石灰化が抑制されることが示され、E1 細胞の石灰化において、ALP が酵素活性を保持していることが重要であるということが示唆された。

ALP の細胞膜からの遊離による石灰化への影響を調べるために、コンフルエンス後 31 日目の細胞に PIPLC を添加した培養液で 3 日間培養した結果、コントロール群の ALP 活性はほぼ細胞膜結合型であるのに対して、PIPLC 処理群においては、約 97% の ALP が細胞膜表面から遊離していた。続いて、石灰化の定量的評価を行った。その結果、コンフルエンス後 31 日目に回収した細胞と細胞外基質の HP、P、OC 量は、コントロールと比べ PIPLC 処理群でわずかに低い値を示すものの、40 日目の HP、P、OC 量および、31 日、40 日の Ca 量は、コントロール群との間に有意差は認められなかった。すなわち、PIPLC 添加による培養でも、40 日目では、細胞の石灰化はコントロール群との間に相違がなかった。この結果は、ALP はコントロールの細胞群のように細胞膜に結合していても、あるいは、PIPLC 処理によって ALP を細胞膜から遊離しても、細胞培養の環境下に存在していれば石灰化には影響を与えないということを示唆する。また、PIPLC 添加開始日の違いによる石灰化の差は認められなかった。

以上の結果より、E1 細胞の石灰化過程における ALP の役割として、酵素活性を保持していることが重要であり、細胞膜への結合あるいは遊離というのは、石灰化には影響を与えないことが示唆された。

【結論】硬組織石灰化過程における ALP の機能を理解するため、ALP の細胞膜結合状態と加水分解活性の必要性を知ることは非常に重要である。本研究では、MC3T3-E1 細胞の培養中に GPI アンカーを特異的に切断する PIPLC、ALP の特異的阻害剤である tetramisole をそれぞれ添加し、石灰化を定量的に評価した。その結果、ALP の細胞膜からの遊離は石灰化に大きな影響は及ぼさず、ALP の酵素活性が維持されていることが石灰化に必要であることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells

(骨芽細胞の石灰化過程における

アルカリ性ホスファターゼ酵素活性の必要性)

審査は審査担当者が一同に会して約 2 時間かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、その後に口頭試問の形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。

申請者は論文の概要をスライドを用いて以下のように説明した。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) は生体内に広く存在し、特に骨型 ALP は骨芽細胞の分化や硬組織形成能を反映するマーカー酵素として知られ、硬組織の石灰化過程において重要な役割を果たしていると考えられるが、その機能は明らかにされていない。ALP は細胞膜にグリコシルホスファチジルイノシトールアンカーで結合した細胞外酵素であるが、細胞培養液中には細胞膜から遊離した ALP も存在して活性を保持している。そこで、骨形成細胞における ALP の機能を明らかにすることを目的として、ALP 活性の抑制と ALP の細胞からの遊離が骨芽細胞の石灰化過程に及ぼす効果を検討することを目的として実験を行った。

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を、通法に従って培養した。ALP の細胞膜からの遊離には、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PIPLC) 8mU/ml、ALP 活性の抑制には阻害剤である tetramisole 0.3mM を添加し、非添加群と比較した。PIPLC 添加開始はコンフルエンス後 1 日、10 日、16 日の 3 群で行った。コンフルエンス後、31 日、40 日に、細胞と細胞外基質、および培養液を回収し、ALP 活性と、カルシウム(Ca)、リン(P)、ヒドロキシプロリン (HP)、およびオステオカルシン(OC)量を測定した。ALP 活性は Bessey らの変法を用いて測定した。蛋白量は Lowry 法で測定し、結合型 ALP の比活性を求めた。ヒドロキシプロリン量は Woessner 法、カルシウム量は原子吸光法、リン量は Chifflet 法を用いた。また、オステオカルシン量の測定は

radioimmunoassay で行った。

tetramisole を添加して培養し、細胞と細胞外基質の ALP 活性および、蛋白量を測定した結果、コントロールと活性阻害群の間には有意差は認められなかった。細胞の位相差顕微鏡写真、および von Kossa 染色の結果、コントロールの細胞では明らかな石灰化結節が認められるのに対して、ALP 活性阻害群では石灰化結節は認められず、Ca、P、OC 量も、40 日目で非添加群と比べ有意に低値を示した。この結果から tetramisole による細胞の蛋白合成に対する影響はなく、ALP 活性の抑制により細胞の石灰化が抑制されることが示された。

細胞を PIPLC を添加した培養液で培養し、石灰化の定量的評価を行った結果、コンフルエンス後 31 日目に回収した細胞と細胞外基質の HP、P、OC 量は、コントロールと比べ PIPLC 処理群でわずかに低い値を示すものの、40 日目の HP、P、OC 量および、31 日、40 日の Ca 量は、コントロール群との間に有意差は認められなかった。すなわち、PIPLC 添加による培養でも、40 日目では、細胞の石灰化はコントロール群との間に相違がなかった。また、PIPLC 添加開始日の違いによる石灰化の差は認められなかった。この結果は、ALP は PIPLC 処理によって ALP を細胞膜から遊離しても、細胞培養の環境下に存在していれば石灰化には影響を与えないということを示唆するものである。

本論文は歯科矯正学的な歯の移動の際にも重要な骨形成機構における、ALP の生理的機能に関して、その酵素活性と石灰化の関連、および酵素が細胞に結合しているか遊離しているかが与える石灰化に対する影響に関して、骨芽細胞様細胞株を用いて検討したものである。本研究の結果から、ALP の細胞からの遊離は石灰化には大きな影響は及ぼさず、ALP の酵素活性が維持されていることが石灰化に必要であることが明らかにされた。この研究は、ALP が生理機能を発現するために必要な骨芽細胞との関係に関するこれまでの議論に一つの結論を出したものであり、今後の石灰化の機構に関する研究の展開に大きく貢献するものと高く評価されるものである。基礎的領域に留まらず、歯科矯正学的にも今後の発展に大きく寄与するものである。

口頭試問において、審査担当者から、

- 1) tetramisole を用いた理由
- 2) medium 中の燐酸の量
- 3) コラーゲン量とタンパク量を計測した理由。
- 4) 細胞膜との結合は生理的にどのように制御されているか。
- 5) 細胞と細胞外基質を分けて計測するとしたらどのような方法が考えられるか。
- 6) matrix vesicle と遊離型 ALP の関係
- 7) 今後この研究を進めていく方向性

などの試問が成されたが、いずれに対しても明快な回答が得られた。以上から、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、臨床的な広い知識を有していると認められた。よって審査担当者は口頭試問の結果に合格の評価を与え、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を十分に有するものと認めた。