

## 学位論文題名

## 骨芽細胞様MC3T3-E1細胞の各種ATPaseに対するエストロゲンの作用

## 学位論文内容の要旨

## 「緒言」

高齢女性の骨粗鬆症においては、閉経後のエストロゲン量の急速な低下が原因となることが知られている。エストロゲンは破骨細胞の働きを抑制するだけでなく、骨芽細胞に直接作用して活性化することにより、骨密度を増加させたり、骨基質の石灰化を促進する。骨粗鬆症の治療薬として使用されているが、エストロゲンが分子レベルで骨芽細胞を刺激するメカニズム、特に石灰化に伴う無機イオンの輸送に関与する可能性のある各種 ATPase 活性に対する研究は少ないので、本研究を行った。

エストロゲンには、エストラジオール、エストロン、エストリオールがあるが、エストラジオールは最も生理活性が高く、骨代謝に重要な役割を果たすことが明らかになっている。本研究では、エストロゲンとして、エストラジオール ( $17\beta\text{-E}$ ) を用いた。

Orimo による骨芽細胞と基質小胞を介したハイドロキシアパタイトの合成蓄積のモデルでは、基質小胞で合成され分泌されたハイドロキシアパタイトが成熟するには高い Ca 濃度が必要である。この Ca を供給する機構については不明な点が多い。我々は Ca を能動輸送する ATPase がこの機能を担うのではないかという仮説をもとに研究を行なった。

我々の研究から、MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) には以下のような ATPase が存在する。

1. Ca-ATPase : アルカリ性に至適 pH を示し、最大活性化には数 mM の Ca 濃度を必要とする。Nakano らは骨形成部位の活性染色から石灰化部位に Ca-ATPase 活性が存在すると報告したが、E1 細胞に存在する Ca-ATPase 活性と共通点が多い。この Ca-ATPase は Ca 供給源として有力だと考えられるが、この酵素に関する報告は少ない。
2. Mg-ATPase : Mg で活性化される以外は Ca-ATPase と類似しているが、

Ca-ATPase と分離精製することが可能であり、この酵素に関する報告も少ない。

3. Ca,Mg-ATPase : 形質膜の Ca-ATPase として知られる PMCA あるいは SERCA に相当する。細胞内の Ca 濃度の調節、情報伝達において重要な酵素であるが、骨形成における役割は不明である。

4. Na, K-ATPase : 細胞の基本的な機能に関与する酵素で、中性に至適 pH があり、Na と K の能動輸送を行なう。

今回は、E1 細胞のこれら 4 種の ATPase に対する  $17\beta$ -E の作用を調べた。

### 「材料と方法」

E1 細胞を  $10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-4}\text{M}$  までの  $17\beta$ -E 存在下で培養し、コンフルエント後、10 日、20 日、30 日後に回収したのち、超音波処理によるホモジェネートを作成し、冷凍保存して実験に用いた。タンパク質量は Lowry 法で測定し、アルカリ性ホスファターゼ(ALP)活性は、pH 10.13 の炭酸バッファーを使用し、パラニトロフェニルリン酸(pNPP)を基質として測定した。ATPase 活性は ATP の加水分解により生じた無機リンを Chifflet 法で定量することにより測定した。

### 「結果と考察」

1. Ca-ATPase, Mg-ATPase, Ca,Mg-ATPase, Na,K-ATPase 活性測定の最適条件を決定するために、回収した細胞の各 ATPase 活性の pH 依存性と基質濃度依存性を測定した。1) ALP 活性測定の至適 pH は 10.1 程度であり、活性は約 3 mM の pNPP で最大となった。2) Ca-ATPase 活性は pH 9.45 付近で、また 1 mM 以上の Ca 濃度で最大となった。3) Ca,Mg-ATPase 活性は pH 7 付近で最大となった。活性は 100  $\mu\text{M}$  程度の Ca で最大となり、200  $\mu\text{M}$  以上では逆に抑制された。4) Mg-ATPase 活性は pH 9.45 付近で、また 2 mM 以上の Mg 濃度で最大となった。5) E1 細胞の Na,K-ATPase 活性の pH 依存性の測定は、アルカリ性で Mg-ATPase の影響が大きく困難であった。そこで、本研究で使用している緩衝液を使用して、ラット脳 Na,K-ATPase 活性の pH 依存性を測定すると、最大活性は中性よりややアルカリ性であった。以上の結果をもとに、各 ATPase 活性の測定条件を決定した。本研究では、Ca-ATPase 活性は 2.5 mM の Ca で pH 8.5, Ca,Mg-ATPase 活性は 0.1 mM の Ca で pH 7.4 で測定し、Mg-ATPase 活性を pH 8.5 で測定した。

2. E1 細胞ホモジェネートのタンパク質量は 10 日、20 日、30 日目と増加した。どの日数でも、DMSO 添加のコントロールに対して、 $10^{-8}\text{M}$  及び  $10^{-6}\text{M}$  の  $17\beta$ -E は顕著な影響を示さなかった。しかし、 $17\beta$ -E の濃度が  $10^{-4}\text{M}$  に上がると、どの日数でもタンパク質量は有意に減少し、増殖抑制を示唆したため、今後の

実験での  $17\beta$ -E の濃度は  $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$  及び  $10^{-5}\text{M}$  とした。 $17\beta$ -E は E1 細胞に対しては顕著な細胞増殖促進作用を示さず、 $10^{-4}\text{M}$  では増殖を抑制した。

3. 石灰化の指標となる ALP 活性は、 $17\beta$ -E の有無にかかわらず、コンフルエント後 20 日目に最大値を示し、30 日目では活性は低下した。どの日数でも、ALP 活性は  $10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-5}\text{M}$  の  $17\beta$ -E で濃度に依存して増加する傾向を示し、 $10^{-5}\text{M}$  でその作用は顕著であった。 $17\beta$ -E は E1 細胞の石灰化を促進し、 $10^{-5}\text{M}$  ではその作用が強いことを示唆する。

4.  $17\beta$ -E は 20 日目に Na,K-ATPase 活性を約 2 倍増加したが、 $17\beta$ -E の濃度依存性は認められなかった。10 日及び 30 日目でも  $17\beta$ -E は Na,K-ATPase 活性を促進した。

5. 高濃度の Ca で活性化される Ca-ATPase の比活性は、10 日、20 日、30 日目とも  $10^{-9}\text{M}$  及び  $10^{-7}\text{M}$  濃度の  $17\beta$ -E 存在下ではコントロールとの有意な差は認められなかったが、 $10^{-5}\text{M}$  では有意に増加した。

6. 低濃度の Ca で活性化され、細胞内 Ca 濃度の調節と情報伝達に参与する Ca,Mg-ATPase の比活性は、 $17\beta$ -E 存在下では 10, 20, 30 日目ともコントロールより高い値を示したが、10 日目の  $10^{-5}\text{M}$  を除いて、 $17\beta$ -E の濃度依存性は顕著ではなかった。

7. Mg の輸送に参与する可能性のある Mg-ATPase の活性は 20 及び 30 日目で、 $17\beta$ -E 存在下で高い値を示した。 $17\beta$ -E の作用は、20 及び 30 日目では ALP に対する作用に類似していたが、20 日での  $17\beta$ -E 濃度依存性は観察されなかった。

以上の結果から、 $17\beta$ -E による E1 細胞の各イオン輸送 ATPase 活性の活性化時期は異なったが、ATPase に対する活性化作用は  $10^{-5}\text{M}$  という高濃度の方が強いことが示唆された。今回の結果から、骨形成を促進するエストロゲンの作用に直接関与するイオン輸送 ATPase を推測することはできなかったが、Nakano らの報告と共通点があり石灰化部位に存在すると推測される Ca-ATPase 活性は、 $10^{-5}\text{M}$  の  $17\beta$ -E で顕著に促進されたことから、石灰化部位に Ca を供給する ATPase となる可能性があると考えられる。今後さらに研究を進める予定である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明  
副 査 教 授 田 村 正 人  
副 査 教 授 進 藤 正 信

## 学位論文題名

### 骨芽細胞様MC3T3-E1細胞の各種ATPaseに対するエストロゲンの作用

審査は審査担当者が一同に会して行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、口頭試問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以下のように説明した。

本研究は、骨芽細胞様 MC3T3-E1 (E1) 細胞を用い、石灰化に伴う無機イオンの輸送に関与する可能性のある各種ATPase に対するエストロゲンの作用を明らかにすることを目的として行なった。

各種濃度の  $17\beta$ -エストラジオール( $17\beta$ -E)存在下で 10, 20, 30 日間培養した E1 細胞のホモジェネートを測定に使用した。アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性と ATPase 活性は、反応で遊離した無機リンを定量して測定した。

1. ALP 活性は、どの日数でも  $10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-5}\text{M}$  の  $17\beta$ -E で濃度に依存して増加する傾向を示し、 $10^{-5}\text{M}$  でその作用は顕著であった。 $17\beta$ -E は E1 細胞の石灰化を促進し、 $10^{-5}\text{M}$  ではその作用が強いことを示唆した。2. Na, K-ATPase 活性を  $17\beta$ -E は 20 日目に約 2 倍増加したが、 $17\beta$ -E の濃度依存性は認められなかった。3. Ca-ATPase 活性は、 $10^{-9}\text{M}$  及び  $10^{-7}\text{M}$  の  $17\beta$ -E 存在下ではコントロールとの有意な差は認められなかったが、 $10^{-5}\text{M}$  の  $17\beta$ -E ではどの日数でも有意に増加した。一方、Ca, Mg-ATPase 活性も  $17\beta$ -E により増加したが、 $17\beta$ -E の濃度依存性は顕著ではなかった。4. Mg-ATPase 活性に対する  $17\beta$ -E の作用は、20 及び 30 日では ALP に対する作用に類似していたが、20 日での  $17\beta$ -E 濃度依存性は観察されなかった。

以上の結果から、 $17\beta$ -E による E1 細胞の各イオン輸送 ATPase 活性の活性化時期は異なったが、ATPase に対する活性化作用は  $10^{-5}\text{M}$  という高濃度で強いこと

が示唆された。石灰化部位に存在すると推測される、アルカリ性至適 pH で高濃度の Ca を必要とする ATPase は、 $10^{-5}\text{M}$  の  $17\beta\text{-E}$  で顕著に促進されたことから、石灰化部位に Ca を供給する ATPase となる可能性があると考えられた。

以上の説明に対して、各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。

- 1) Ca-ATPase、Mg-ATPase、Ca, Mg-ATPase の細胞膜における存在部位、
- 2) Ca-ATPase、Mg-ATPase、Ca, Mg-ATPase 活性の各イオンの濃度依存性と細胞内外のイオン濃度との関連性、
- 3) エストロゲンはメディウム交換ごとに新たに添加したのか、
- 4) 各 ATPase 活性測定の際の ATP 濃度が違う理由、
- 5)  $\mu\text{NPP}$  とは何か、基質阻害を起こす理由は、
- 6) Na, K-ATPase 活性を測定する際だけ rat 由来の酵素を使用した理由、
- 7)  $10^{-4}\text{M}$  では増殖抑制なのか、それとも細胞死が起こるのか、
- 8) ALP の活性化には  $10^{-5}\text{M}$  のエストロゲンが必要なのか、その理由は、
- 9) 予備実験では Na, K-ATPase 活性の測定は困難であったのに、どのように測定法を改善して、エストロゲンの作用を調べる実験を行ったのか、その際に Mg-ATPase による測定の妨害はなかったのか、
- 10) Ca-ATPase と ALP がどちらも石灰化に関与していると推測するのなら、最大活性化の時期に違いがあることをどのように考えるか、
- 11) mRNA レベルでの発現の相違は調べていないのか、

これらの質問に対して、学位申請者から適切かつ明確な回答および説明が得られ、申請者が本研究の一連の実験および分析を主体的に遂行し、得られた結果について科学的考察を行い、それらを論理的に表現し他者に伝達する能力を有することが確認された。

本論文は、骨芽細胞様細胞の有する各種イオン輸送 ATPase 活性に対するエストロゲンの作用を明らかにした最初の論文であると考えられる。骨芽細胞及び基質小胞が関与する石灰化の機構に関する理解は進んだが、最終的に石灰化基質にカルシウムやリンが輸送される機構に関してはほとんど明らかになっていない。本研究成果には新規性があり、得られた結果はこの分野の今後の研究と発展に大いに貢献するものであることについて、審査委員全員の賛同が得られた。以上より、申請者の学位論文について、北海道大学の博士（歯学）の学位授与に値するものと認めた。