



Title	樹立細胞株の産生するアルカリホスファターゼ アイソエンザイムについて
Author(s)	田中, 正信
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35691
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【9】

氏名・(本籍)	た 田	なか 中	まさ 正	のぶ 信
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7792	号	
学位授与の日付	昭和62年5月11日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	樹立細胞株の産生するアルカリホスファターゼ アイソエンザイムに ついて			
論文審査委員	(主査) 教授	岸本	進	
	(副査) 教授	垂井清一郎	教授	和田 博

論文内容の要旨

[目的]

ヒトのアルカリホスファターゼには3種類のアイソエンザイムが存在し、胎盤型・小腸型、そして肝・腎・骨など多くの臓器に分布する組織非特異型に分類されている。癌化に伴って、正常組織固有のアイソエンザイムが消失し、癌特異的なアイソエンザイムが形質発現する現象が知られている。このような酵素を腫瘍マーカーとして癌の生化学診断に利用するために研究がなされてきた。本研究では、上顎癌と肝芽腫におけるアルカリホスファターゼアイソエンザイムの酵素偏倚の可能性を検討する目的で、これらの癌組織由来の樹立細胞株のアルカリホスファターゼを部分精製し、その性質を同定した。

[方法]

(1) ヒト上顎癌由来のOKK細胞をヌードマウスに移植して得た腫瘍の抽出物より、DEAE-celluloseカラム、Sephadex G-200カラムにより、アルカリホスファターゼを部分精製した。

(2) ヒト肝芽腫由来のHuH-6 clone 5細胞の培養上清より硫酸アンモニウム沈澱、エタノール沈澱、DEAE-celluloseカラム、Affi-Gel Blueカラム、Sephadex G-200カラムにより、アルカリホスファターゼを部分精製した。

上記2種の細胞株由来のアルカリホスファターゼについて、電気泳動法、各種アミノ酸による活性阻害、熱処理による失活度、Ouchterlony法による抗原性を調べることにより性質を同定した。

(3) 羊膜由来のFL細胞は、肝癌アルカリホスファターゼを産生することがすでに報告されているがOKK細胞と同様の方法でアルカリホスファターゼを精製し対照とした。

[成績]

電気泳動的に最も速く易動するOKK細胞及びFL細胞のアルカリホスファターゼの電気泳動度は一致した。又これらの酵素に対して、L-phenylalanineとL-leucineは著明に活性を阻害するが、L-homoarginineは影響が少なかった。これらの酵素に対するリン酸、尿素、EDTA、熱処理による不活化の程度は同様であり至適pHも10.2-10.3であった。免疫拡散法では、これらの酵素は、抗小腸アルカリホスファターゼ抗体と反応した。以上よりOKK細胞とFL細胞の電気泳動的に最も速く易動するアルカリホスファターゼは同一であるといえる。OKK細胞のglucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymeはHela細胞とは異なった。

HuH-6 clone 5細胞の2種のアルカリホスファターゼをALP-1, ALP-2と名付けた。ALP-1はノイラミニダーゼ感受性あり、ALP-2はなかった。ノイラミニダーゼ処理前後でALP-1は肝癌アルカリホスファターゼよりも軽度易動度が小さかった。ALP-2は肝癌アルカリホスファターゼと肝臓アルカリホスファターゼの中間に泳動された。ALP-1, ALP-2, 小腸アルカリホスファターゼは、L-phenylalanine, L-tryptophan, L-leucineに感受性があつたが、L-homoarginine, L-leucylglycylglycineには感受性がなかった。56°C15分の熱処理によりALP-2と肝臓アルカリホスファターゼは失活するが、ALP-1と小腸アルカリホスファターゼは中等度の失活を示した。免疫拡散法で、ALP-1, ALP-2は小腸アルカリホスファターゼと同様の抗原性を示した。ゲル濾過によりALP-1とALP-2の分子量はそれぞれ170000, 110000であった。

ALP-1, ALP-2, 小腸アルカリホスファターゼは、Cibacron Blue F 3 GAに対してaffinityがあり結合するが、肝臓アルカリホスファターゼは、Cibacron Blue F 3 GAカラムには全く結合せず、胎盤アルカリホスファターゼは、カラムを非常に遅い速度で通過した。

[考 按]

FL細胞の電気泳動的に最も易動度の大きいアルカリホスファターゼは肝癌アルカリホスファターゼであることが、既に証明されているが、ヌードマウスに形成されたFL細胞の腫瘍にも、これに対応するisoenzymeの形質発現が保持されている。今回の研究でOKK細胞の腫瘍の電気泳動的に最も速く易動するアルカリホスファターゼは、FL細胞の同様のアルカリホスファターゼと酵素学的、免疫学的、電気泳動的性質において同一であることを明らかにすることによって、肝癌アルカリホスファターゼであることを示した。

HuH-6 clone 5細胞の2種のアルカリホスファターゼは耐熱性、アミノ酸阻害、抗原性により小腸アルカリホスファターゼと思われる。即ちALP-1と肝癌アルカリホスファターゼは多少電気泳動では易動度が異なるが、非常に性質が似ている。ALP-2は小腸アルカリホスファターゼよりも熱に対して失活しやすく、分子量も小さい。即ちALP-2は腸類似肝アルカリホスファターゼに類似している。

以上2種の細胞株が肝癌アルカリホスファターゼを産生していることを述べた。現在まで肝癌アルカリホスファターゼを産生する細胞株はHeLa細胞が混在しているかHeLa細胞そのものと報告されている。しかしOKK細胞は染色体及びglucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymeがHeLa細胞

と異なることにより、又HuH-6 clone 5細胞もY染色体をもつことや、アルブミン、 α -フェトプロテインを産生することよりHeLa細胞ではないといえる。

[総括]

1. HeLa細胞の混在しないOKK細胞, HuH-6 clone 5細胞が肝癌アルカリホスファターゼを産生することを示した。
2. 小腸, 肝臓, 胎盤アルカリホスファターゼのCibacron Blue F 3 GAに対するaffinityがそれぞれ異なる。

論文の審査結果の要旨

肝癌に比較的特異的な肝癌アルカリホスファターゼ (ALP) は原発性肝癌患者の血中や癌組織に見出される。また樹立細胞株にも肝癌ALPが存在することが報告されているが、これは混在するHeLa細胞によると考えられている。

本研究ではHeLa細胞の混在しないことを確認したヒト上顎癌由来のOKK樹立株とヒト肝芽腫由来の樹立株HuH-6 clone 5が肝癌ALPを産生すること、さらに小腸-, 肝-, 胎盤-ALPがCibacron Blue F 3 GAに対する親和性を異にすることを明らかにした。