原 著

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株が産生する alkaline phosphatase の特性

石 崎 明

東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第1講座（主任：天笠光雄教授）

東京医科歯科大学歯学部生化学講座（主任：佐々木哲教授）

〔受付日：平成4年9月2日〕

Property of alkaline phosphatase of a human oral squamous cell carcinoma cell line

Akira Ishisaki

*First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Director: Prof. Teruo Amagasa)*

*Department of Biochemistry, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Director: Prof. Satoshi Sasaki)*

1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

〔Accepted for publicaion: September 2, 1992〕

Key words: alkaline phosphatase/squamous cell carcinoma/HSC-5 cell/over expression/activator

Abstract: Alkaline phosphatase is frequently found in cell lines established from cancer tissues, whereas the original normal epithelial cells do not express this enzyme.

Alkaline phosphatase activities of fifteen human oral squamous cell carcinoma cell lines were examined and nine cell lines were found to express higher alkaline phosphatase activities than the normal epithelial tissue of oral mucosa. Therefore, it was confirmed that some human oral squamous cell carcinoma cell lines express alkaline phosphatase as well as human colon or uterocervical cancer cell lines.

The enzyme of one cell line (HSC-5), which expressed especially high alkaline phosphatase activity, was found to be tissue-nonspecific type for human bone. From the result of the Southern blotting analysis, disorders were not found in genomic DNA of alkaline phosphatase in HSC-5 cells. Therefore, it was suggested that HSC-5 cells abnormally expressed tissue-nonspecific type alkaline phosphatase by an unidentified activator for gene expression.

It is expected that the elucidation of the mechanism of the over expression of alkaline phosphatase in HSC-5 cells might be valuable for the investigation on the roles of alkaline phosphatase of human cancer.

緒 言

癌と alkaline phosphatase (以下 ALP) に関する研究は、主として診断学的応用の面から進展してきた。研究の初期には、肝癌や骨肉腫のように、ALP 活性の高い母組織に由来する例や、あるいはこれらの ALP 活性の高い正常組織が癌の浸潤、転移に反応して産生する場合などが報告されていた。その後、本来正常母組織は ALP 活性をもたない、あるいはきわめて低い、癌化すると異常に高い ALP 活性を発現する例が発見され、注目されるようになった。

ヒトの ALP には遺伝子の異なる 4 型があり、

1. 臓器非特異型、2. 小腸型、3. 胎盤型、4. 胎盤類似型に分類されている¹⁾。1968年 Fishman らが、本来ならば妊娠血清中に認められる胎盤型 ALP を肺癌患者の血清中に異所的に発見し、剖検時の癌組織でも非常に高い活性の胎盤型 ALP を認めたこと²⁾、また、1970年 Nakayama らが本来ならば精巣や胸腺に微量に認められる胎盤類似型 ALP を胸膜癌患者の血清中に異所見に発見したこと³⁾ などから、癌化に伴う ALP の異所的な発現に関する研究が進展してきた^{4,5)}。その後、ヒト癌と ALP との関係については、樹立癌細胞株が産生する ALP についての研究が盛んに行われてきたが、ヒト癌細胞株が産生する ALP の種類については、先に述べた胎盤型、胎盤類似型の他に、小腸型や臓器非特異型 ALP も報告されており⁶⁾、ヒト体内で認められるすべての種類の ALP の産生が確認されている。また、ALP を産生している癌細胞株については、特に正常母組織がほとんど発現していなかったはずの ALP を多量に発現している癌細胞株について注目されており、癌化における ALP 発現の意義について興味が集まりつつある。

一方、ヒト口腔扁平上皮癌では、現在までの報告によると、組織化学的には腫瘍細胞自身にはほとんど活性は認められず、腫瘍周囲の結合組織に認められるとされているが⁷⁾、最近 ALP 活性を示すヒト口腔扁平上皮癌細胞株の報告もあり⁸⁾、その真偽は定かではない。そこで今回、多数のヒト

口腔扁平上皮癌細胞株の ALP の発現について検索し、腫瘍本体における ALP 活性の有無について確かめるとともに、特に ALP 活性の高かった細胞株について、その酵素の性質を詳細に調べ、また異常発現の原因についても検討を試みた。

材料および方法

1. 細胞と培養条件

ALP 活性測定のために用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞株は、Ca922, NA⁹⁾, HOC313, ZA¹⁰⁾, HOC719, TSU¹¹⁾, HOC815, HOC927¹²⁾, NU¹³⁾, HSC-2, 3, 4¹⁴⁾, 5, 6, 7 の15種類である。すべての細胞株は、10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's MEM (D-MEM) にて単層培養した。

なお、上記細胞株のうち、HSC-5, 6, 7はいずれも未発表の細胞株であるため、それらの特徴を記述する。

HSC-5: 82歳女性の左側上顎洞原発扁平上皮癌の口腔内浸潤巣より採取

HSC-6: 60歳男性の舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移巣より採取

HSC-7: 53歳女性の舌扁平上皮癌の原発巣より採取

いずれの場合も、外科的に腫瘍組織を切除し、これを phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、腫瘍細胞を細かく切り刻み 60 mm dish に播いて 20% FBS 含有 D-MEM を加えて 5% CO₂ インキュベーター内に静置した。上皮細胞がシート状に伸びて出てきたところで、0.2% trypsin 含有 PBS にて腫瘍細胞を dish より剥し、10% FBS 含有 D-MEM にて新しい dish に播種し直した。その後、いずれの細胞株も単層培養にて現在まで 200 継代以上を行っている。

正常ヒト口腔粘膜上皮角化細胞は MCDB153 を基本培地とし、ウシ下垂体抽出物および epidermal growth factor (EGF) 1 ng/ml を添加して単層培養した。

2. 酵素の調製法

酵素活性分析, sodium dodecyl sulfate (SDS)-ポリアクリルアミド電気泳動分析およびウェスタ

ンブロットング分析には、各種癌細胞、正常ヒト口腔粘膜上皮およびヒト腎組織を生理食塩水とともにホモジナイズしたものを使用した。

阻害実験に用いた ALP のうち、HSC-5 細胞および HOC313 細胞の ALP については生理食塩水とともに細胞をホモジナイズしたものを試料として用いた。また、ヒト各臓器に存在する ALP の阻害実験では、組織をそのまま生理食塩水とともにホモジナイズしてこれをサンプルとして実験に用いると、培養細胞の場合とは違って阻害実験に影響を及ぼす物質が多量に含まれてしまうため、以下の方法で酵素を抽出し、サンプルとした。肝臓、胎盤および小腸の ALP は冷凍保存しておいたサンプルに 2 倍量の蒸留水を加えてよくホモジナイズし、1-ブタノールを加えてよく混和し、室温 1 時間放置後、遠心して水層を 1 M 酢酸で pH 4.9 に調製して、生じた沈澱を除去し、上清を 1 M NaOH で pH 6.5 に戻した後、冷アセトンで 30~40% になるように加えて沈澱させた。これを凍結乾燥し、tris-buffered saline (TBS) に溶解して用いた。

3. 酵素活性分析法

ALP 活性は 5 mM $MgCl_2$ 含有 100 mM 2-amino-2-methyl-1, 3-propanediol-HCl buffer, pH 10 中の 10 mM p-nitro-phenyl-phosphate を基質とし、37°C にて測定した。

4. ALP 活性の経時的変化の測定法

2×10^5 個の HSC-5 細胞を直径 10 cm の培養 dish に播種し、3 日後、1 週間後、2 週間後、20 日後、4 週間後に細胞を生理食塩水とともにホモジナイズしたものについて ALP 活性を測定した。また、培養液は 3 日ごとに新しいものと取り替えた。なお、細胞を dish から採取する前に、各 dish を PBS にて 3 回洗い、浮遊している細胞あるいは細胞片をサンプル中に取り込まないようにした。

5. 阻害実験

レバミゾール (Lev) 1 mM, L-ホモアルギニン (HA) 10 mM, L-フェニルアラニン (L-Phe) 5 mM および 56°C 10 分間にて各種癌細胞、組織の ALP を処理してその阻害効果を測定した。

6. ALP 活性染色法

SDS-ポリアクリルアミドゲル中の ALP 活性染色はアゾ色素法¹⁵⁾により行った。また、単層培養状態の HSC-5 細胞の ALP 活性染色は、100% メタノールにて固定後、同様にして行った。

7. ALP 誘導実験

癌細胞が sub-confluent の状態で、sodium butyrate を 2 mM の濃度で与え、1 週間作用させた後に ALP 活性を測定し、作用させていないものと比較した。また、同様に retinoic acid を 10^{-5} M の濃度で与え、48 時間作用させた後に ALP 活性を測定し、作用させていないものと比較した。

8. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法およびウェスタンブロットング法

癌細胞およびヒト細胞中の ALP の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 7.5% ゲルにて Weber と Osborn の方法¹⁶⁾により行った。なお、各 lane とも 0.015 U と同じ活性量の ALP を電気泳動させた。ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (pore size 0.45 μ m : BIO-LAD 社) に Towbin らの方法¹⁷⁾により転写した。次いで、ニトロセルロース膜を 3% スキムミルクにてブロッキングを行ってから、抗ブタ腎 ALP ポリクローナル抗体¹⁸⁾ (500 倍希釈して使用) と反応させた。その後、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG と反応させ、ペルオキシダーゼの基質を含む溶液にさらし、発色させた。

9. ノーザンブロットング分析法

1) cDNA プロブを用いたノーザンブロットング法

培養細胞を PBS にて洗った後、グアニジウム/セシウムクロライド法¹⁹⁾により全細胞 RNA を抽出した。抽出した RNA それぞれ 20 μ g を 2.2 M ホルムアルデヒド含有 1.2% アガロースゲルにて電気泳動した。このゲルよりエレクトロブロットング法²⁰⁾でナイロン膜 (Zeta-Probe, BIO-RAD 社) に RNA を転写し、³²P で標識した cDNA プロブとハイブリダイズした。プロブは、ヒト臓器非特異型 ALP cDNA²¹⁾ (full length, M.J. Weiss 博士より供与) を用い、Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim 社) により ³²P-dCTP (NEN 社) で標識し、Quick Spin Column (Boehringer Mannheim 社) で精製し、 $5 \sim 10 \times 10^8$

cpm/ μ g の比活性をもつプローブを作製した。プレハイブリダイゼーションは、50% formamide, 4 $\times$ standard saline phosphate-EDTA(SSPE), 1% SDS, 0.5% bovine lacto transfer technique optimizer(BLOTTO), 0.5 mg/ml salmon sperm DNA にて12時間行い、ハイブリダイゼーションは、10% dextran sulfate, 47% formamide, 3 $\times$ SSPE, 1% SDS, 0.5% BLOTTO, 0.5 mg/ml salmon sperm DNA の混合液に 32 P 標識プローブを 1×10^6 cpm/ml の割合で加え、43°C 24時間行った。ナイロン膜は 2 $\times$ standard saline citrate (SSC), 0.1% SDS ; 0.5 $\times$ SSC, 0.1% SDS ; 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS 溶液を用い、室温にてそれぞれ 15 分ずつ洗った。洗浄後、増感紙を用いて通法によりオートラジオグラフィーを行った。

2) オリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロッティング法

培養細胞から 1) と同様にして全細胞 RNA を抽出した後、オリゴ (dT) カラムを用いて、ポリ [A]⁺ RNA を精製し、これを 10 μ g 使い、1) と同様にして電気泳動し、ナイロン膜に転写した。

ヒト臓器非特異型の ALP 遺伝子には骨型のエキソン I と肝型のエキソン I が存在することが知られているので、ヒト臓器非特異型 ALP 遺伝子骨型エキソン I に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ (5'-CTG-CGC-AGA-GCA-CTG-GCG-AGG-GTC-(C)-3')²²⁾、およびヒト臓器非特異型 ALP 遺伝子肝型エキソン I に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ (5'-GCT-GCC-ACA-CCG-GGA-GTT-T-(C)-3')²³⁾ を Cyclone Plus DNA Synthesizer (Milligen/Bioscience 社) により作製した。プローブは、それぞれ DNA 5' Endlabeling Kit (Boehringer Mannheim 社) を用いて γ - 32 P-ATP で標識し、CPB 法²⁴⁾ で精製し、5~10 $\times 10^8$ cpm/ μ g の比活性をもつプローブを作製した。プレハイブリダイゼーションは、6 $\times$ SSC, 0.01 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, 0.5% SDS, 100 μ g/ml salmon sperm DNA, 0.1% BLOTTO にて12時間行い、ハイブリダイゼーションは 3 M tetramethylammonium chloride, 0.01 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, 0.5% SDS, 100 μ g/ml salmon sperm DNA, 0.1% BLOTTO の混合

液に 32 P 標識プローブを 5×10^6 cpm/ml の割合で加え、54°C 48時間行った。ナイロン膜は 6 $\times$ SSC 溶液を用い、室温にて30分洗った後、これをもう一度くり返した。洗浄後、増感紙を用いて通法によりオートラジオグラフィーを行った。

10. サザンブロッティング分析法

Koike らの方法²⁵⁾により、正常ヒト胎盤組織および HSC-5 細胞よりゲノム DNA を抽出し、各ゲノム DNA 10 μ g を各種制限酵素 (EcoR I, Hind III, BamH I) にて消化後、この DNA 断片を 0.8% アガロースゲル電気泳動にて分離し、Southern²⁶⁾の方法によりナイロン膜(Hybond-N⁺, Amersham 社)に転写した。ハイブリダイゼーションにはヒト臓器非特異型 ALP cDNA プローブ(full length)を 32 P で標識したものをを用いた。プローブの標識、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄およびオートラジオグラフィーは、既述の cDNA プローブを用いたノーザンブロッティング分析と同様に行った。

結 果

1. 正常ヒト口腔粘膜上皮組織 および 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞の ALP 活性

Table 1 に示すように正常ヒト口腔粘膜上皮組織とヒト口腔扁平上皮癌細胞のホモジネートにおける ALP 活性を比較したところ、15種類のヒト口腔扁平上皮癌株細胞のうち、Ca922, HOC313, HOC719, HOC815, HSC-5, NA, NU, TSU, ZA の9種類は正常ヒト口腔粘膜上皮組織よりも高い ALP 活性を示した。また、細胞株により、それらの値は異なっており、0.017 U/mg protein から 0.221 U/mg protein までと広い範囲の活性が認められた。そこで特に高い ALP 活性を示した HSC-5 細胞の産生する ALP について詳しく調べることにした。

2. HSC-5 細胞の産生する ALP の生化学的性質

1) 単層培養状態の HSC-5 細胞の活性染色

Fig. 1 に示すように単層培養状態の HSC-5 を活性染色したところ、細胞の重層しているところが特に染色されており ALP 活性が高いことがわ

Table 1 Specific activities of alkaline phosphatases

Samples (homogenate)	Specific activities (U*/mg protein)†
Normal epithelium of oral mucosa	0.005 (± 0.00057)
Ca922 cells	0.025 (± 0.0023)
HOC313 cells	0.052 (± 0.0046)
HOC719 cells	0.017 (± 0.0008)
HOC815 cells	0.021 (± 0.00078)
HOC927 cells	0.003 (± 0.00009)
HSC-2 cells	0.0005 (± 0.0002)
HSC-3 cells	0.0006 (± 0.0001)
HSC-4 cells	0.005 (± 0.0013)
HSC-5 cells	0.221 (± 0.0087)
HSC-6 cells	0.003 (± 0.0004)
HSC-7 cells	0.0003 (± 0.00007)
NA cells	0.024 (± 0.0038)
NU cells	0.029 (± 0.0077)
TSU cells	0.035 (± 0.0026)
ZA cells	0.019 (± 0.0011)

* U = μ mol p-nitrophenol formed/min.

† Values are the mean $\pm$ S.D. of triplicate measurements.

かった。HSC-5 細胞は重層傾向が強く, confluent に達する前から積極的に重層し始め, その部分が ALP 活性を示した。

2) HSC-5 細胞播種後の ALP 活性の経時的変化

Fig. 2 に示すごとく, HSC-5 細胞の ALP 活性は, 播種後 3 日では 0.021 U/mg protein と低い値を示しているが, その後経時的に活性が高くなり, 播種後約 3 週間 (confluent 後 10 日) では, 0.221 U/mg protein と約 10 倍高い値を示した。その後は播種後 4 週間で 0.098 U/mg protein と再びやや低い値に戻った。

3) HSC-5 細胞における ALP 誘導実験

HSC-5 細胞に対し, sodium butyrate を 2 mM の濃度で 1 週間作用させたが, ALP の誘導はみられなかった。また, retinoic acid を 10^{-5} M の濃度で 48 時間作用させても, ALP 活性の誘導はみられなかった。他の HSC 細胞にも同様な実験を行ったところ, ほとんどすべての HSC 細胞において ALP の誘導はみられなかったが, 例外的

Fig. 1 Enzyme-histochemical staining of cultured HSC-5 cells.

A : before staining, B : after staining

Fig. 2 Time course of alkaline phosphatase activity of HSC-5 cells in culture.

The culture medium was exchanged every three days. Values are the means $\pm$ S.D. of triplicate measurements.

に HSC-6 細胞においては, 2 mM sodium butyrate を 1 週間作用させると, ALP 活性が 0.020 U/mg protein と平常時と比べて約 7 倍の値を示

Fig. 3 Inhibition assay of alkaline phosphatase activity.

Values are the means $\pm$ S.D. of triplicate measurements except the value of the bone type (The result of the bone enzyme was quoted from reference 27).

し、ALP の誘導が認められた。

4) HSC-5 細胞が産生する ALP に対する阻害実験

Fig. 3 のごとく HSC-5 細胞の ALP 活性は L-フェニルアラニンに耐性を示したが、レバミゾールと L-ホモアルギニン、56°C 10 分間処理で有意に抑制された。これらの結果から、HSC-5 細胞の ALP は臓器非特異型であると推定された。

HSC-5 細胞以外のヒト口腔扁平上皮癌株細胞では、HOC313 の産生する ALP は、Fig. 3 の阻害

実験でみられるようにレバミゾール、L-ホモアルギニンに耐性を示すが L-フェニルアラニンで有意に活性が抑制された。この結果から、HSC-5 細胞とは異なり、臓器非特異型以外の ALP を産生していると推定された。

5) オリゴヌクレオチドプローブによるノーザンブロッティング分析

Fig. 4 に示したように、臓器非特異型の ALP 遺伝子には骨型のエキソン I と肝型のエキソン I が存在しており、各組織では二者択一的にどち

Fig. 4 Gene structure of tissue-nonspecific ALP.

Two different mRNAs of bone and liver types are produced from a single gene by alternative splicing process²³⁾.

Fig. 5 Northern blot analysis of alkaline phosphatase mRNA in HSC-5 cells.

Poly[A]⁺ RNA in HSC-5 cells was subjected to electrophoresis (10 µg/lane). Hybridization analysis with an oligonucleotide probe specific to the bone type alkaline phosphatase mRNA (lane 1) and with the other probe specific to the liver type alkaline phosphatase mRNA (lane 2).

らかのエクソン I を使って ALP が発現されている²³⁾。それぞれのエクソン I に特異的な配列をもつオリゴヌクレオチドプローブを用いてノーザンブロットング分析を行い、HSC-5 ではどちらのエクソン I を使って発現しているかを検索した。Fig. 5 の lane 1 に示されるように、HSC-5 細胞が発現する ALP mRNA は骨型エクソン I に特異的なオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズして 2.7 kb のところにバンドが認められるのに対し、lane 2 の肝型エクソン I に特異的なオリゴヌクレオチドプローブとはハイブリダイズしなかった。この結果から HSC-5 細胞は臓器非

特異型 ALP の骨型 mRNA を発現していることが判明した。

6) HSC-5 細胞が産生する ALP の分子量および免疫学的性質

Fig. 6 の lane 3, 4 に示すように、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の位置から HSC-5 の ALP の分子量は約 160 KD であることが示され、これまで報告された臓器非特異型 ALP の分子量とはほぼ一致した。また、ヒト骨、腎および肝組織 ALP と交差反応することが確かめられている抗ブタ腎 ALP ポリクローナル抗体²⁸⁾を用いてウェスタンブロットング分析を行った。lane 1 に示すように、ヒト腎組織 ALP はこの抗体と反応し、約 160 KD のところにバンドが認められるのに対し、HSC-5 の ALP はこの抗体とは反応せず、バンドは認められなかった。上記のように mRNA から HSC-5 が産生する臓器非特異型 ALP はヒト骨中に存在するタイプであると推定されたが、Fig. 6 の結果から、抗原性においては、ヒト骨、腎あるいは肝組織 ALP と違いがある可能性が示唆された。

7) HSC-5 細胞が産生する臓器非特異型 ALP の発現機構について

ヒト臓器非特異型 ALP cDNA プローブを用いたノーザンブロットング分析により、Fig. 7 の lane 1 に示すように正常ヒト口腔粘膜上皮角化細胞では ALP の mRNA の発現が認められなかったのに対し、HSC-5 細胞では lane 2 にみられるように、mRNA レベルでの発現がはっきりと認められ、2.7 kb の位置にバンドが認められた。

◀ 200 KD

◀ 116 KD

◀ 97 KD

◀ 66 KD

◀ 45 KD

Fig. 6 Western blot immunoassay by polyclonal antibody against swine-kidney alkaline phosphatase.

Lanes 1, 3 : human kidney alkaline phosphatase

Lanes 2, 4 : alkaline phosphatases from HSC-5 cells

Immunostaining with the polyclonal antibody against swine-kidney alkaline phosphatase (lanes 1 and 2). Enzymatic activity stained by the β -naphthyl phosphate method (lanes 3 and 4).

Fig. 7 Northern blot analysis of the bone type alkaline phosphatase mRNA.

Hybridization analysis with a human tissue-nonspecific alkaline phosphatase cDNA probe. RNA extracted from human normal keratinocytes of oral mucosa (lane 1) and from HSC-5 cells (lane 2). (20 μ g/lane)

Right panel indicates RNA staining by etidium bromide of lane 1 (lane A) and lane 2 (lane B) on nylon membrane.

また、ヒト臓器非特異型 cDNA プローブを用いたサザンブロッティング分析により HSC-5 の

臓器非特異型 ALP 遺伝子について検索したところ、Fig. 8 に示されるように、正常ヒト胎盤組織

Fig. 8 Southern blot analysis of genomic DNA of tissue-nonspecific alkaline phosphatase.

Hybridization analysis with human tissue-nonspecific alkaline phosphatase cDNA probe. Genomic DNA (10 μ g) extracted from HSC-5 cells (lane 1, 3, 5) and from human placenta (lane 2, 4, 6), digested with restriction enzymes as indicated above.

の臓器非特異型 ALP 遺伝子と比較してもバンドのパターンに違いは認められなかった。

これらの結果より、HSC-5 細胞は正常ヒト口腔粘膜上皮角化細胞ではほとんど発現の認められない臓器非特異型 ALP の骨型 mRNA を過剰発現しているが、ゲノムの増幅や著明な再配列は認められないため、臓器非特異型 ALP 遺伝子自体には異常はないものと推定された。

考 察

癌細胞株が産生する ALP については特に大腸癌や子宮頸癌由来の癌細胞に関してよく研究され

ている²⁹⁻³²⁾。一方、ヒト口腔扁平上皮癌が産生する ALP については、Kawakatsu らが組織化学的検索によりその腫瘍本体には ALP 活性は認められないが、腫瘍に隣接している結合組織には高い ALP 活性が認められると報告している⁷⁾。

しかし、今回の著者の検索により、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株15種のうち9種が正常ヒト口腔粘膜上皮組織よりも高い ALP 活性を示した。これら9種の ALP 活性は、0.017 U/mg protein から 0.221 U/mg protein まで様々な値を示したが、ヒト口腔扁平上皮癌本体においても大腸癌や子宮頸癌と同様に ALP を発現している例があることが確かめられた。

さらに、著者はヒト口腔扁平上皮癌細胞株のうち特に高い活性を示す HSC-5 細胞の産生する臓器非特異型 ALP について詳細な分析を行った。

HSC-5 細胞が発現する ALP はその活性が 0.221 U/mg protein と高く、これはヒト骨芽細胞様細胞の 0.117 U/mg protein やマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の 0.143 U/mg protein³³⁾よりも高い活性値を示している。

この HSC-5 細胞は現在 200 継代を越えているが、継代初期(5代目)の HSC-5 細胞でも 0.143 (± 0.0172) U/mg protein と高い ALP 活性を示しており、HSC-5 細胞の ALP 産生能は幾度もの継代や長い期間の単層培養により獲得されたものではないと考えられる。HSC-5 細胞の ALP 活性は、播種時にはあまり高くないのに対し、その後経時的に高まり、confluent に達してからも上昇し続け、0.221 U/mg protein と最高値を示した。この ALP 活性の経時的な上昇は大腸癌細胞株 Caco-2 が産生する ALP についても報告されている³⁴⁾。Caco-2 における confluent 後の ALP 活性の経時的な上昇については、細胞分化に伴った現象として捉えているが³⁴⁾、HSC-5 については今後の精査が必要である。また、20日後からの ALP 活性の低下については、異常に高い細胞密度の条件では細胞増殖の抑制に伴い ALP タンパクの産生が低下するためではないかと思われた。

阻害実験およびオリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロッティング分析により、HSC-5 細胞が産生する ALP はヒト骨中に含まれる臓

器非特異型 ALP と同じタイプであることが判明した。しかし、ウェスタンブロッティング分析において、HSC-5 細胞の ALP はヒト臓器非特異型 ALP と交差反応するはずの抗ブタ腎ポリクローナル抗体とは反応しなかった。この結果から、HSC-5 細胞の ALP は正常ヒト臓器非特異型 ALP と抗原性において多少の違いがあると推察された。一般に、抗体は糖鎖を認識している場合が多いため、この抗原性の違いは糖鎖の違いによるものではないかと思われるが、この点については今後の精査が必要である。

しかし、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の産生する ALP がすべて臓器非特異型の骨型の ALP であるわけではない。Fig. 3 の阻害実験でみられるように HOC313 の産生する ALP は、レバミゾール、L-ホモアルギニンに耐性を示し、L-フェニルアラニンで有意に活性が抑制されているため、臓器非特異型以外の ALP であると考えられる。このように、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株では臓器非特異型以外の ALP も合成している可能性が示唆された。

ノーザンブロッティング分析により、HSC-5 細胞で発現の認められた臓器非特異型 ALP の mRNA は正常ヒト口腔粘膜上皮角化細胞ではほとんど認められなかったことから、HSC-5 の臓器非特異型 ALP の異常発現は mRNA レベルで確認された。また、HSC-5 細胞の臓器非特異型 ALP 遺伝子について検索したところ、遺伝子増幅や著明な遺伝子再配列は認められなかったため、その異常発現の原因はゲノムそのものにあるのではなく、臓器非特異型 ALP のプロモーター領域を活性化するような特別な因子が癌化に伴って発現しているためではないかと推察された。

sodium butyrate や retinoic acid を HSC-5 細胞に作用させても、ALP の誘導効果はみられなかった。また、まだ予備的な実験段階であるが、HSC-5 に対し、TGF- β 、EGF、aFGF それぞれ 10 ng/ml を 2 日間作用させたが、ALP 活性にはほとんど影響を及ぼさなかった。

癌細胞が産生する ALP の意義については、Latham ら^{35,36)}の報告が非常に興味深い。彼らは、ヌードマウスに移植すると腫瘍を形成することの

できる D98/AH.2 (HeLa) 細胞と、正常ヒト線維芽細胞を融合することにより、ヌードマウスで腫瘍を形成する細胞クローン CGL4 と腫瘍を形成しない細胞クローン CGL1 を得た。CGL4 と CGL1 の性質を比較検討したところ、CGL4 の細胞膜には小腸型 ALP が認められたのに対し、CGL1 には認められなかった。そこで、CGL1 に小腸型 ALP cDNA を形質導入して小腸型 ALP を発現させたが、腫瘍形成能は獲得されなかった。したがって、小腸型 ALP の発現が、直接の腫瘍形成の原因となっているとは考えられないが、腫瘍形成に深く関係している可能性があるかと推定している。

また、最近 Sarrouilhe らはラットの肝臓の原形質膜中に、肝臓型 ALP の基質となりうる 18 KD のタンパク質を発見した³⁷⁾。この膜タンパク質が細胞の成長を調節するような情報伝達に関わっており、リン酸化によりその機能が変化するとすれば、ALP は細胞の成長を調節しようと考えられ、細胞の癌化にも関与する可能性があると思われる。

現在のところ ALP の生理的役割について最もよく知られているのは、石灰化における作用である。古くから、硬組織形成において有機リン酸エステルを加水分解し、局所の無機リン酸の濃度を上昇させて石灰化を促進するという Robison の学説³⁸⁾や、結晶形成を阻害するピロリン酸を分解して石灰化を促進するという Fleisch の学説³⁹⁾があるが、その至適 pH が 8~10 と高いこと、石灰化とは無関係の軟組織でも高い ALP 活性が認められることなど疑問点が多く、いまだ定説はない。上皮系細胞の癌化に伴う ALP の発現機構について明らかにすることは、癌細胞における ALP 発現の意義の解明、さらには、ALP の生理的機能の解明につながると考えられるが、HSC-5 細胞はこの目的のために有用であると考えられた。

結 論

1. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 15 種について検索したところ、このうち 9 種が正常ヒト口腔粘膜上皮組織と比較して強い ALP 活性を示したため、

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株でも、大腸癌や子宮頸癌由来の癌細胞株と同様に ALP の発現が確認できた。

2. 特に HSC-5 細胞は 0.221 U/mg protein と、高い ALP 活性を示したため、この細胞の ALP について詳細な検索を行ったところ、これはヒト骨中に含まれる臓器非特異型 ALP であることが判明した。ノーザンブロッティング分析により、HSC-5 細胞の臓器非特異型 ALP の異常発現は、mRNA レベルで確認されたが、この異常発現の原因を探るため、サザンブロッティング分析により臓器非特異型 ALP のゲノム DNA を検索したところ、遺伝子増幅や著明な遺伝子再配列は認められなかった。このため、HSC-5 細胞の臓器非特異型 ALP の異常発現の原因は、臓器非特異型 ALP ゲノムそのものの異常のためではなく、臓器非特異型 ALP のプロモーターを活性化させる

ような特別な因子が働いているためではないかと考えられた。今後、この発現の原因について明らかにし、癌細胞における ALP 発現の意義について究明する必要があると思われる。

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました本学歯学部生化学講座佐々木哲教授、本学歯学部口腔外科学第一講座塩田重利名誉教授ならびに本学歯学部口腔外科学第一講座天竺光雄教授に深甚なる感謝の意を表します。

さらに、卓越した知識と技術により、終始懇切丁寧なご教示をいただきました本学歯学部生化学講座大井田新一郎博士、ならびに五関正江博士に心より感謝いたします。また、終始暖かいご支援をいただきました本学歯学部口腔外科学第一講座百瀬文雄博士、貴重なヒト口腔扁平上皮癌細胞株を戴きました徳島大学歯学部口腔外科学第一講座力丸浩一講師に厚くお礼申し上げます。

抄録：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株15種について ALP 活性を測定したところ、9種の細胞株において正常ヒト口腔粘膜上皮組織よりも高い ALP 活性を認めた。この事実より、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の数種は、大腸癌や子宮頸癌由来癌細胞株と同様に ALP を産生すると結論できた。

また、特に高い ALP 活性を示す癌細胞株 HSC-5 の産生する ALP の性質や、オリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロッティング分析により、この ALP は臓器非特異型のうちの骨で産生される型であることが判明した。HSC-5 細胞の ALP のゲノムについてサザンブロッティング分析を行ったところ、その遺伝子自体には異常が認められなかったため、この異常発現の原因は、ある種の発現活性化因子が癌化に伴って発現するためではないかと推察された。この活性化機構の解明は、癌化における ALP 発現の意義の究明につながるものと考えられる。

文 献

- 1) Milan, J.L. : Oncodevelopmental expression and structure of alkaline phosphatase genes. *Anticancer Res.* 8 : 995-1004, 1988.
- 2) Fishman, W.H., Inglis, N.I., Stolbach, L.L. and Krant, M.J. : A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. *Cancer Res.* 28 : 150-154, 1968.
- 3) Nakayama, T., Yoshida, M. and Kitamura, M. : L-Leucine sensitive, heat-stable alkaline-phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosa. *Clin. Chim. Acta.* 30 : 546-548, 1970.
- 4) Rosen, S.W., Wientraub, B.D., Vaitukaitis, J.L., Sussman, H.H., Hershman, J.M. and Muggia, F.M. : Placental proteins and their subunits as tumour markers. *Ann. Intern. Med.*, 82 : 71-83, 1975.
- 5) Stolbach, L.L., Krant, M.J. and Fishman, W.H. : Ectopic production of an alkaline phosphatase isoenzyme in patients with cancer. *N. Engl. J. Med.*, 281 : 757-762, 1969.
- 6) Herz, F. : Alkaline phosphatase isoenzymes in cultured human cancer cells. *Experientia.* 41 : 1357-1490, 1985.
- 7) Kawakatsu, K. and Mori, M. : Histochemical evaluation of enzymatic activities in human squamous-cell cancer. *Cancer Res.* 23 : 539-545, 1963.
- 8) Takahashi, K., Kanazawa, H., Chan, C., Hosono, T., Takahara, M. and Sato, K. : A case of esophageal carcinoma metastatic to the mandible and characterization of two cell lines (T. T and T. Tn) established from the oral tumor. *Jpn. J. Oral Maxillofac. Surg.* 36 : 307-316, 1990.

- 9) Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Hori-koshi, M., Enomoto, S. and Kuroki, T. : Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res.* **46** : 1648-1653, 1986.
- 10) Tadokoro, K., Ueda, M., Oshima, T., Fujita, K., Rikimaru, K., Takahashi, N., Enomoto, S. and Tsuchida, N. : Activation of oncogenes in human oral cancer cells : a novel codon 13 mutation of c-H-ras-1 and concurrent amplifications of c-erbB-1 and c-myc. *Oncogene* **4** : 499-505, 1989.
- 11) Sakai, E. and Tsuchida, N. : Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumour-suppressor genes. *Oncogene* **7** : 927-933, 1992.
- 12) Rikimaru, K., Tadokoro, K., Yamamoto, T., Enomoto, S. and Tsuchida, N. : Gene amplification and over expression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck* **14** : 8-13, 1992.
- 13) 上田晶義：口腔腫瘍における癌遺伝子の解析。日口外誌 **36** : 2211-2225, 1990.
- 14) Momose, F., Araida, T., Negishi, A., Ichijo, H., Shioda, S. and Sasaki, S. : Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* **18** : 391-395, 1989.
- 15) Kurahashi, Y. and Yoshiki, S. : Electron microscopic localization of alkaline phosphatase in the enamel organ of the young rat. *Archs. Oral. Biol.* **17** : 155-163, 1972.
- 16) Weber, K. and Osborn, M. : The Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** : 4406-4412, 1969.
- 17) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gells to nitrocellulose seets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 4350-4354, 1979.
- 18) Oida, S., Sone, M. and Sasaki, S. : Purification of swine kidney alkaline phosphatase by immunoaffinity cromatography. *Anal. Biochem.* **140** : 117-120, 1984.
- 19) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Macdonaldo, R.J. and Rutter, W.J. : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18** : 5294-5299, 1979.
- 20) Tomas, P. : Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** : 5201-5205, 1980.
- 21) Weiss, M.J., Henthorn, P.S., Lafferty, M.A., Sraughter, C., Raducha, M. and Harris, H. : Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 7182-7186, 1986.
- 22) Weiss, M.J., Ray, K., Henthorn, P.S., Lamb, B., Kadesch, T. and Harris, H. : Strucure of the human liver/bone/kidney alkaline phophatase gene. *J. Biol. Chem.* **263** : 12002-12010, 1988.
- 23) Matsuoka, S., Kishi, F. and Kaiji, T. : Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene : two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **168** : 993-1000, 1990.
- 24) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. : *Molecular Cloning* 2nd edn., pp. 11.35-11.36, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- 25) Koike, K., Kobayashi, M., Mizusawa, H., Yoshida, E., Yaginuma, K. and Taira, M. : Rearrangement of the surface antigen gene of hepatitis B virus integrated in the human hepatoma cell lines. *Nucleic Acids Res.* **11** : 5391-5402, 1983.
- 26) Southern, E.M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** : 503-517, 1975.
- 27) 大井田新一郎, 佐々木哲：硬組織と軟組織のアルカリフォスファターゼの性質に関する酵素化学的比較研究。歯基礎誌 **23** : 272-280, 1981.
- 28) Goseki, M., Oida, S. and Sasaki, S. : Detection of minor immunological differences among human "Unversal-Type" alkaline phosphatases. *J.C.B.* **38** : 155-163, 1988.
- 29) Chou, J.Y. and Takahashi S. : Control of placental alkaline phosphatase gene expression in HeLa cells : induction of synthesis by prednisolone and sodium butyrate. *Biochem.* **26** : 3596-3602, 1987.
- 30) Harris, H. H. and Benham, F.J. : Human cell lines expressing intestinal alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 4016-4019, 1979.
- 31) Gum, J.R., Kam W.K., Byrd, J.C., Hicks, J.W., Slesinger, M.H. and Kim, Y.S. : Effects of sodium butyrate on human colonic adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **262** : 1092-1097, 1987.
- 32) Ito, F. and Chou, J.Y. : Induction of placental alkaline phosphatase biosynthesis by

- sodium butyrate. *J. Biol. Chem.* **259** : 2526-2530, 1984.
- 33) Goseki, M., Oida S., Nifuji, A. and Sasaki, S. : Properties of alkaline phosphatases of the human dental pulp. *J. Deht. Res.* **69** : 909-912, 1990.
- 34) Matsumoto, H., Erickson, R.H., Gum J.R., Yoshioka, M., Gum, E. and Kim, Y.S. : Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology* **98** : 1199-1207, 1990.
- 35) Latham, K.M. and Stanbridge E.J. : Identification of the HeLa tumor-associated antigen, p75/150, as intestinal alkaline phosphatase and evidence for its transcriptional regulation. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA* **87** : 1263-1267, 1990.
- 36) Latham, K.M. and Standbridge E.J. : Examination of the oncogenic potential of a tumor-associated antigen, intestinal alkaline phosphatase, in HeLa x fibroblast cell hybrids. *Cancer Res.* **52** : 616-622, 1992.
- 37) Sarrouilhe, D., Lalegerie, P. and Baudry, M. : Endogenous phosphorylation and dephosphorylation of rat liver plasma membrane proteins, suggesting a 18 kDa phosphoprotein as a potential substrate for alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.* **1118** : 116-122, 1992.
- 38) Robison, R. and Soames, K.M. : The possible significance of hexosephosphoric ester in ossification. *Biochem. J.* **20** : 388-391, 1926.
- 39) Fleisch, H. and Newman, W.F. : Mechanism of calcification : role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Am. J. Physiol.* **200** : 1296-1300, 1961.