原 著

ヒト骨肉腫樹立細胞株 HOS および Kirsten 株マウス肉腫 ウイルスでトランスホームされた HOS (KHOS) での分化マーカーの発現

片 山 奈知子

東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学教室 (指導: 土田信夫教授)

(1988年 9 月30日 受付)

The Suppression of Osteogenic Differentiation Markers in Human Osteosarcoma Cells Transformed by Kirsten Murine Sarcoma Virus

Nachiko Katayama

Department of Oral Microbiology, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Chief : Prof. Nobuo Tsuchida)

Osteogenic potential of the HOS cells, a cell line derived from the human osteosarcoma, and KHOS cells, HOS cells transformed by the Kirsten murine sarcoma virus, was studied biochemically and histochemically by analyzing the expression of two osteogenic differentiation markers of the bone cells. Both the expression of the liver/bone/kidney-type ALPase and deposition of calcium were observed in the HOS cells, while the expression of both differentiation markers were suppressed in the KHOS cells.

Southern and Northern blot analyses suggested that in the KHOS cells a single copy of the intact K-MSV proviral DNA was integrated and the 6.5 kb K-MSV RNA was transcribed from the integrated DNA. The expression of the K-MSV genome in the KHOS cells is discussed in relation to the suppression of the expression of osteogenic differentiation markers.

I. 緒 言

近年, 分子生物学の進歩に伴い, 分子レベルでの発癌機構の解明が進められている。特に, レトロウイルスのもつ発癌遺伝子 (viral oncogene,

v-*onc*) には, 異なる機能・構造をもつ20種以上のものが知られており, またそれらに関する数多くの新しい知見が報告されている¹⁾。

注目すべきこれらの知見のひとつとして, 正常細胞の染色体には, 発癌遺伝子の塩基配列ときわ

略称 ALPase : Alkaline phosphatase
kbp : kilo base pair
SDS : sodium dodecyl sulfate

めて相同性の高い遺伝子；癌原遺伝子（cellular oncogene, *c-onc*）が存在し、発癌遺伝子が、この細胞側に存在する癌原遺伝子に由来することが解明されている¹⁾。

さらに癌原遺伝子は、異常発現や構造遺伝子の変化により、活性化を受け、発癌能をもつようになる、つまり発癌遺伝子となることが知られている。また、おのおのの癌原遺伝子産物の機能が、明らかにされつつあり、発癌遺伝子は、それに対応する癌原遺伝子産物の機能から、5つのグループ、すなわち(1)細胞増殖因子、(2)トランスメンブレン・タンパク質である細胞増殖因子の受容体、(3)細胞膜内側に存在し、細胞増殖のシグナル伝達に関与するもの、(4)細胞質に存在し、核へのシグナル伝達に関与する可能性が考えられているもの、(5)核に存在し、遺伝子発現の制御に関与するもの、に大別される。このように癌原遺伝子は、正常細胞の増殖に深い関わりをもつことが知られているが、細胞の維持・分化にも深く関係しており、癌原遺伝子由来の発癌遺伝子も同様であると考えられている^{1,2)}。

レトロウイルスのひとつである、Kirsten 株マウス肉腫ウイルス（Kirsten murine sarcoma virus, K-MSV³⁾）は、ゲノム中に第3グループに属する K-*ras* 発癌遺伝子（v-K-*ras*）をもち⁴⁾、細胞の分化に対し誘導や抑制をかけることが知られている。褐色細胞腫樹立細胞株 PC12 を交感神経様細胞へ分化させる⁵⁾ 一方、甲状腺上皮細胞樹立細胞株 FRT-L もしくはケラチン細胞の分化マーカーの発現を抑制するという報告がある^{6~8)}。このように、v-K-*ras* をもつ K-MSV の細胞分化に対する機能については、いまだ不明な点が多い。

そこで、本研究では、v-K-*ras* の分化マーカーの発現に対する作用を明らかにすることを目的として、骨原性細胞の分化マーカーを発現するヒト骨肉腫樹立細胞株 HOS⁹⁾ に K-MSV を感染させて得られた、形質転換細胞である KHOS 細胞¹⁰⁾ を用いて、その分化マーカーの発現を HOS 細胞と比較検討した。

II. 方 法

1. 使用細胞ならびに培養法

以下の3種類の細胞株を用いた。

- 1) ヒト骨肉腫樹立細胞株：HOS 細胞⁹⁾
- 2) HOS 細胞に K-MSV³⁾ を感染させて得られた、形質転換・ウイルス非産生細胞：KHOS 細胞¹⁰⁾
- 3) Balb/c マウス胎仔由来の樹立線維芽細胞株：BALB3T3 クローン A31¹¹⁾

1), 2) はともに J. S. Rhim 博士から分与を受け、また 3) は S. A. Aaronson 博士から分与を受けた。

培養液は、ダルベッコ変法イーグル培地（日水製薬）に10% ウシ胎仔血清（Boehringer-Mannheim 社）、2 mM L-グルタミン、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン、0.01 mg/ml ペニシリン G、0.1 mg/ml ストレプトマイシンおよび 0.25 mg/ml アンホテリシン B を添加したものを使用した。ただし、カルシウム沈着を観察する実験では、上記の培養液に 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-アスコルビン酸ナトリウム（半井化学薬品）を加え、さらに 5 mM β -グリセロリン酸 2 ナトリウム（半井化学薬品）添加あるいは無添加のものを用いた。なお、細胞の培養は、37℃、5% CO₂ 下で行った。

2. ALPase 活性測定法

直径 35 mm 細胞培養用プレートに 5×10^4 の細胞を播き、一定期間培養を行った。その後、細胞を生理食塩水（0.9% 塩化ナトリウム）で2回洗浄し、同溶液中でラバーポリスマンを用いて細胞を剝離した。ついで、4℃、1,000 rpm で10分間遠心して細胞を集め、集めた細胞は測定時まで-80℃で保存した。

酵素活性測定に際しては、-80℃で保存した細胞を溶解し、再び生理食塩水に懸濁し、さらにガラスホモジナイザーで細胞を破碎した後、4℃、1,000 rpm で5分間遠心した。遠心後の上清を、ALPase 活性測定およびタンパク質定量に使用した。

ALPase 活性測定の基質緩衝液には、10 mM

p-ニトロフェニルリン酸 (和光純薬)・5 mM 塩化マグネシウム・0.2 M 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンダイオール塩酸 (pH 10: Sigma 社) の溶液を使用した。反応液総量が 3 ml の時に、上記濃度となるように調整した基質緩衝液 2.9 ml に細胞ホモジネート上清 0.1 ml を加え、37℃ で 1 時間反応させた後、0.2 N 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を添加して反応を停止した。反応停止後 1,000 rpm で 10 分間遠心して浮遊物を除去し、加水分解で生じた *p*-ニトロフェノール量を、波長 405 nm の吸光度から定量した。

また、総タンパク質量は Lowry らの方法¹²⁾に従って行い、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを使用して、波長 750 nm の吸光度から定量した。なお、ALPase 酵素活性は、1 時間に生じた *p*-ニトロフェノール量で示し、また比活性は、タンパク質 1 mg 当たりの ALPase 活性として示した。

一方、細胞密度に対する ALPase 活性を検索した実験では、直径 100 mm 細胞培養用プレートに 3.3×10^5 の対数増殖期の細胞を播き、培養を開始した。細胞採取時には、同じくラバーポリスマンで細胞を剝離した後、血球算定板を使用して細胞数を算定した。

ALPase 活性阻害実験は、阻害剤として L-フェニルアラニンとレバミゾールを用いて行った¹³⁾。反応液総量が 3 ml の時に、5 mM *p*-ニトロフェニルリン酸・5 mM 塩化マグネシウム・0.5 M 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンダイオール塩酸 (pH 10) 溶液となるように調整した基質反応液 1.9 ml に対し、それぞれ異なった濃度の阻害剤を 1 ml 加え、培養 36 日目の細胞ホモジネート上清 0.1 ml を添加し反応させた。ついで、0.2 N 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を添加して反応を停止した後、同様に波長 405 nm で吸光度を測定し、阻害剤無添加試料の ALPase 比活性を 100% として阻害効果を示した。

ALPase 活性熱失活実験は、培養 36 日目の細胞ホモジネート上清 0.1 ml と 50 mM トリス塩酸 (pH 7.7) 溶液 0.1 ml の混合液を、56℃ で各時

間処理し、反応液総量が 3 ml の時に阻害実験と同濃度となるように調整した基質緩衝液 2.8 ml を加え、37℃ で 1 時間反応させた。その後、0.2 N 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を添加して反応を停止し、波長 405 nm で吸光度を測定し、56℃、0 分処理試料の ALPase 比活性を 100% として熱失活効果を示した。

3. 組織化学的染色法

ALPase の活性染色は、プレートで培養した細胞を生理食塩水で 2 回洗浄後、基質緩衝液とアゾ色素を加え、室温、遮光下で 30 分間作用させ、染色を行った。基質緩衝液としては、5 mg/ml β -ナフチルリン酸 1 ナトリウム・100 mM トリス塩酸 (pH 8.8)・5 mM 塩化マグネシウムを、また、アゾ色素としては、0.5 mg/ml 濃度のファストブルー RR 塩を使用した。

カルシウム染色は、アスコルビン酸入り培養液に β -グリセロリン酸添加あるいは無添加で培養した細胞を生理食塩水で洗浄後、20% エタノール・80% ホルムアルデヒド (v/v) で固定し、50% エタノール、蒸留水の順で洗浄した後、Dahl の方法¹⁴⁾に従って 1% アリザリンレッド S 液 (半井化学薬品) を用いて染色を行った。

4. カルシウム定量法

オルトクレゾールフタレインコンプレキソン (OCPC) 発色法¹⁵⁾に基づいて行った。

本定量には、Calcium C-Test Wako (和光純薬工業) キットを使用した。基質緩衝液には 14.8 M エタノールアミンホウ酸水溶液 (pH 11.0) を、発色試薬液には 8-オキシキノリンを含む OCPC 溶液を、またカルシウム標準液には 20 μ g/ml のものを使用した。基質緩衝液 3 ml に、ALPase 活性測定時と同じ細胞ホモジネート上清 0.3 ml を加え、0.3 ml の発色試薬液を添加して反応させた。試料をよく混和し、5 分間室温で静置した後、1,000 rpm で 10 分間遠心して浮遊物を除去し、波長 570 nm で吸光度を測定した。なお、カルシウム量は、直径 35 mm プレート当たりの総カルシウム量 (μ g) で示した。

5. サザン・ブロッティング法¹⁶⁾

HOS および KHOS 細胞から、小池らの方法¹⁷⁾に基づき DNA を抽出し、得られた DNA を *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *KpnI* (すべて宝酒造) の各制限酵素で消化した。酵素反応は、60 μg の DNA を蒸留水に溶かした試料に、600 単位に相当する制限酵素量を加え、反応液最終総量を 900 μl にして、37°C で 1 時間作用させて行った。なお、37°C, pH 7.5 において、 λ -DNA を 1 時間で完全に分解する酵素活性を 1 単位とした。また、各制限酵素反応には、*EcoRI* では 50 mM トリス塩酸 (pH 7.5)・7 mM 塩化マグネシウム・100 mM 塩化ナトリウム・7 mM 2-メルカプトエタノール・0.01% ウシ血清アルブミン反応溶液を、*BamHI* では 10 mM トリス塩酸 (pH 8.0)・7 mM 塩化マグネシウム・100 mM 塩化ナトリウム・2 mM 2-メルカプトエタノール・0.01% ウシ血清アルブミン反応溶液を、*HindIII* では 10 mM トリス塩酸 (pH 7.5)・7 mM 塩化マグネシウム・60 mM 塩化ナトリウム反応溶液を、そして *KpnI* では 6 mM トリス塩酸 (pH 7.5)・6 mM 塩化マグネシウム・6 mM 2-メルカプトエタノール・0.02% ウシ血清アルブミン反応溶液を、それぞれ用いて行った。

ついで、酵素消化後の DNA のうち 10 μg を、おのおの 0.8% アガロースゲルに電気泳動した。泳動後、0.5 N 水酸化ナトリウム・1.5 M 塩化ナトリウム溶液で、DNA を変性し、1 M トリス塩酸 (pH 7.0)・1.5 M 塩化ナトリウム溶液で中性化した後、ナイロンメンブレンフィルター (Zeta-probe, Bio-Rad 社) へ DNA を転写させ、続いてフィルターを ^{32}P 標識 DNA プロープとハイブリダイズした。 ^{32}P 標識 DNA プロープには、K-MSV の全ゲノムを含む、クローン 4(E) DNA⁴⁾ から得られる 2 種類の DNA 断片を使用した。すなわち、v-K-ras タンパク質をコードする領域を含む 1.7 kbp の *PvuII* 断片 (v-K-ras プロープ) および、2 個の LTR (long terminal repeat) 領域を含むクローン 4(E) のサブクローン DNA から *SmaI* 消化によって得られた 0.55 kbp の DNA

断片 (LTR プロープ) を調製した。その後、両 DNA 断片を Multiprime DNA labelling systems (Amersham 社) ならびに ^{32}P -dCTP を用いて標識し、 $4.6\sim 6.4\times 10^8$ cpm/ μg の比活性をもつプロープを得た。フィルターと ^{32}P 標識化プロープとのハイブリダイゼーションは、 $2\times$ Denhardt's 溶液 ($1\times$ Denhardt's 溶液; 0.02% ウシ血清アルブミン, 0.02% ポリビニールピロリドン および 0.02% フィコール), $5\times$ SSC (standard saline citrate, $1\times$ SSC; 0.15 M 塩化ナトリウム および 0.015 M クエン酸ナトリウム), 20 mM リン酸ナトリウム (pH 6.5), 50% ホルムアミド, 10% デキストラン硫酸および、熱変性により一本鎖とした 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子 DNA の混合液に、混合液 1 ml に対して 1×10^6 cpm となるように、 ^{32}P 標識化プロープを加えた反応液で行った。42°C で 15 時間反応させた後、フィルターをまず $2\times$ SSC・0.1% SDS 溶液中で振とうしながら、室温で 15 分間の洗浄を 2 回行い、その後、 $0.1\times$ SSC・0.1% SDS 溶液中で振とうしながら、室温で 30 分間洗浄し、ついで同溶液中で 60°C で 30 分間の洗浄を 2 回行った。フィルター洗浄後、通法に従い、増感紙を用いてオートラジオグラフィーを行った。

6. ノーザン・ブロッティング法¹⁸⁾

HOS および KHOS 細胞からの全細胞 RNA の抽出は、グアニジン・塩化セシウム法¹⁹⁾に従い行った。抽出した RNA 各 11.25 μg を 1% ホルムアルデヒドゲルに電気泳動し、50 mM 水酸化ナトリウム・10 mM 塩化ナトリウム溶液中でゲルを処理した後、0.1 M トリス塩酸 (pH 7.5) 溶液中で中性化した。ついで、ナイロンメンブレンフィルターへ RNA を転写させ、 3.6×10^7 cpm/ μg の比活性をもつ ^{32}P 標識化 DNA プロープとハイブリダイゼーションを行った。プロープには、クローン 4(E) の v-K-ras タンパク質をコードする領域を含む 1.0 kbp の *HincII* 断片を調製して使用した。プロープとのハイブリダイゼーション、フィルターの洗浄、およびオートラジオグラフィーはサザン・ブロッティング法に従った。

図1 HOS ならびに KHOS 培養細胞の ALPase 活性の経時的染色像
上段数値は培養日数を示す

Ⅲ. 結 果

1. HOS 細胞における骨原性分化マーカーの発現

1) ALPase 活性の発現

組織化学的染色法による観察：HOS 細胞ならびに KHOS 細胞をプレートに播き、培養後経時的に ALPase 活性の染色を行った（図1）。HOS 細胞では、培養開始1日後に ALPase 活性の染色が認められ、培養日数の経過に従い、より強く染め出された。これに対し KHOS 細胞では、培養1日後ならびに24日間培養したものにおいても、HOS 細胞でみられたような ALPase 活性およびその上昇は認められなかった。

生化学的定量：HOS 細胞の培養日数の経過に伴う ALPase 活性の上昇を、生化学的手法を用いてさらに検討した。対数増殖期の細胞をうすま

図2 HOS ならびに KHOS 細胞における細胞密度に対する ALPase 活性の変化
●：HOS 細胞，○：KHOS 細胞
グラフ上の数値は培養日数を示す

きにし、培養後経時的に細胞のホモジネートを作製し、遠心後の上清について ALPase の比活性を測定した（図2）。その結果、細胞密度の上昇に従い、比活性は直線的に増加し、細胞がほぼコンフルエント状態になった段階で最高値に達し、その後は、単位面積当たりの細胞数の増加がみられたにもかかわらず、ALPase 比活性の上昇変化はみられなかった。一方 KHOS 細胞では、細胞数が増加しても、ALPase 比活性の上昇は認められなかった。

アイソザイムタイプの検討：培養36日目の HOS 細胞のホモジネート上清を用いて、阻害剤による ALPase のアイソザイムタイプを検討した。比活性を 50% 阻害する濃度は、阻害剤として L-フェニルアラニンを用いた場合（図3 A）では、約 19 mM であったのに対し、レバミゾールを用いた場合（図3 B）では、約 0.18 mM であった。つ

図3 HOS 細胞で認められた ALPase のアイソザイムタイプの解析
阻害剤として L-フェニルアラニン (A) と レバミゾール (B) を用いた時の活性阻害実験 (C)：56°Cでの熱失活実験

図4 HOS ならびに KHOS 培養細胞のカルシウムの経時的染色像

H, K, A はおのおの HOS, KHOS, BALB3T3 細胞を, - はアスコルビン酸のみの添加培養時, + はアスコルビン酸・ β -グリセロリン酸添加培養時を示し, A~D はおのおの培養後 14, 21, 28, 42 日目を示す

図5 カルシウム染色した HOS 細胞 (H) と KHOS 細胞 (K) の位相差顕微鏡所見

アスコルビン酸・ β -グリセロリン酸添加培養30日目の培養細胞を用いた

まり、レバミゾールは、L-フェニルアラニンに比べ低濃度で、HOS 細胞で発現されている ALPase 活性を阻害するということが示された。さらに、同様のホモジネート上清を用いて、56℃における ALPase 活性熱失活実験を行った(図3C)。56℃処理時間が6分の時、残存活性は50%を、また30分時には約10%を示した。

2) カルシウム沈着の観察

組織化学的染色法による観察：HOS 細胞ならびに KHOS 細胞を、さらに対照としてマウス BALB3T3 細胞をおのおのプレートに播き、培養後経時的に Dahl の方法を用いてカルシウム染色を行った。培養液中に、アスコルビン酸および β -グリセロリン酸を添加した HOS 細胞(HOS β +) では、培養日数経過に従い、アリザリンレッド S によって染め出される、カルシウム沈着物の増加が認められた(図4)。その増加は、培養後14日目から21日目の間で染色程度に大きな変化を見い出せないのに対し、培養後21日目と28日目の間で著しい染色の差が認められた。培養後42日目では、その染色の程度がいっそう明らかに認められた。さらに、培養後30日目の HOS β + の位相差顕微鏡所見では、染色液に濃染する多数のカルシウム沈着物の存在が認められた(図5)。これに対し、同条件で培養した KHOS 細胞(KHOS β +) では、HOS 細胞で観察されたような染色の変化は培養後45日目を経ても認められなかった。同様の結果は、培養後30日目の位相差顕微鏡所見においても観察された(図5)。なお KHOS β + において、HOS β + でみられたような著しい染色の程度やカルシウム沈着物が認められなかったにもかかわらず、対照である BALB3T3 β + と比較すると、培養日数に従って、その染色の程度はわずかながら上昇を示した。一方、培養液中にアスコルビン酸のみを添加した場合には、HOS細胞(HOS β -) ならびに KHOS 細胞(KHOS β -) ともに、カルシウム沈着物は観察されなかった。しかしこれらの染色の程度を BALB3T3 β - と比較すると、KHOS β -, HOS β - の順に染色の差が大きく KHOS β + でみられたように、培

図6 HOS ならびに KHOS 細胞における培養日数に対するカルシウム量の変化

○ならびに△は、おのおのアスコルビン酸添加培養時の HOS, KHOS 細胞, ●ならびに▲は、おのおのアスコルビン酸・ β -グリセロリン酸添加培養時の HOS, KHOS 細胞を示す

養日数に従ってそれらはわずかな上昇を示した。加えて BALB3T3 細胞では、 β + と β - との間に染色の程度の差が認められないのに対し、KHOS 細胞では、 β - に比べ β + の方がより高い染色の程度を認め、その差は、培養日数に従って拡大した。

生化学的定量：HOS ならびに KHOS 細胞を、 β -グリセロリン酸添加または無添加のアスコルビン酸入りの培養液で培養し、経時的に得られた細胞のホモジネート上清を用いて、そのカルシウム量を OCPC 発色法にて測定した。HOS β + では、培養15日以後よりカルシウム量の増加を認め、22日以後では、その著しい増加が認められた(図6)。これに対し、HOS β -, KHOS β + および KHOS β - においては、HOS β + で示されたような、顕著なカルシウム量の増加は認められなかった。

2. KHOS 細胞における K-MSV ゲノム DNA の解析

KHOS 細胞における、骨原性分化マーカーの発現抑制をさらに検討するため、K-MSV ゲノムの存在様式とその発現について、解析を行った。

1) K-MSV ゲノム DNA の解析

KHOS と HOS 細胞から DNA を抽出し、制限酵素で切断後、サザン・ブロッティング法を用いて KHOS 細胞における K-MSV DNA の構造解

図7 サザン・ブロッティング法による K-MSV ゲノム DNA の解析
各制限酵素 (E : *EcoRI*, B : *BamHI*, H : *HindIII*, K : *KpnI*) で消化した HOS
ならびに KHOS 細胞 DNA の (A) v-K-ras プローブあるいは (B) LTR プローブ
によるハイブリダイゼーションの結果を示し、左右両端の棒線は λ HindIII マー
カーのサイズ (kbp) を示す。(C) K-MSV ゲノム DNA, クローン 4 (E) なら
びに使用したプローブ DNA の制限酵素地図 (E : *EcoRI*, S : *SmaI*, B : *BamHI*,
P : *PvuII*)。□ : LTR 領域, ■ : v-K-ras タンパク質をコードする領域, 矢印 A
: v-K-ras プローブ, 矢印 B : LTR プローブ

析を行った (図7)。

用いた4種の制限酵素は、いずれも v-K-ras 内を切断することなく、K-MSV ゲノム DNA をそれぞれ、*EcoRI* で1箇所、*BamHI* で1箇所、*HindIII* で2箇所、*KpnI* で2つの LTR 内それぞれ1箇所ならびに v-K-ras と LTR 間1箇所の計3箇所を切断する⁴⁾。v-K-ras プローブと各細胞 DNA をハイブリダイズした場合 (図7A), KHOS 細胞DNA において、*EcoRI* で 7.0 kbp, *BamHI* で 9.5 kbp, *HindIII* で 5.8 kbp, *KpnI* で 5.8 kbp の各1本の DNA 断片が、特異的な

メジャーバンドとして検出された。また、HOS ならびに KHOS 細胞 DNA において、*EcoRI* で 5.9 kbp, 2.9 kbp の2本、*BamHI* で 22 kbp, 18 kbp, 9.4 kbp の3本、*HindIII* で 14 kbp, 9.5 kbp, 3.4 kbp の3本がおのの共通なマイナーバンドとして検出された。

一方、同様に HOS ならびに KHOS 細胞 DNA を4つの制限酵素で切断し、LTR プローブとハイブリダイズした場合 (図7B), KHOS 細胞 DNA において、*EcoRI* で 7.0 kbp, 3.1 kbp の2本、*BamHI* で 9.5 kbp, 3.4 kbp の2本、*HindIII* で

図8 ノーザン・ブロッティング法による K-MSV RNA の解析

(A) KHOS ならびに HOS 全細胞 RNA の v-K-ras を含むプローブによるハイブリダイゼーションの結果を示す。矢印：検出された RNA のサイズ、棒線：リボソーム RNA の 28S, 18S の位置。(B) K-MSV ゲノム DNA, クローン 4 (E) の *HincII* 部位 (Hc) を示す。□：LTR 領域, ■：v-K-ras タンパク質をコードする領域、矢印：使用したプローブ

5.8 kbp, 3.1 kbp の 2 本, *Kpn* I で 5.8 kbp, 3.1 kbp, 0.9 kbp, 0.5 kbp の 4 本がそれぞれメジャーバンドとして検出された。これに対し, HOS 細胞 DNA において, LTR プローブとハイブリダイズするバンドは検出されなかった。

2) K-MSV RNA の解析

KHOS 細胞から抽出した RNA を用いて, K-MSV RNA の発現をノーザン・ブロッティング法にて検索した (図 8)。

K-MSV ゲノム DNA の v-K-ras タンパク質をコードする領域ならびにその上流の約 0.4 kbp を含む, 1.0 kbp, *HincII* DNA 断片をプローブに用いたところ, KHOS 細胞では, 6.5 kb (kilo base) の大きさの RNA がメジャーバンドとして検出された。一方, この条件下で HOS 細胞では, プローブとハイブリダイズする RNA は認められなかった。

IV. 考 察

1. HOS 細胞における骨原性細胞の分化マーカーの発現

本研究において, HOS 細胞が骨原性細胞の分化マーカーの発現, すなわち ALPase 活性の発現およびカルシウム沈着能をもつことが明らかになった。ALPase 活性の発現に関しては, 細胞密度に依存して, ALPase 比活性が上昇することが認められた。つまり, 組織化学的染色で認められた ALPase 活性の増加が, 単に細胞数の増加によるものではないということが判明した。さらに, 細胞がコンフルエント状態になった後, 比活性の上昇が抑制されたことから, 細胞の接触あるいは増殖速度の低下が, ALPase 遺伝子の発現誘導に関与する可能性が考えられる。この活性発現の誘導機構については, 現在 ALPase 遺伝子の研究が進められており²⁰⁾, 今後 ALPase 遺伝子の RNA 転写に関与するプロモーター領域が解析されることによって, 誘導機構がさらに明らかにされるものと思われる。

一方, ヒト ALPase のアイソザイムには, 骨型を含む臓器非特異型 (tissue-unspecific, bone/liver/kidney-type), 小腸型ならびに胎盤型の 3 種が知られている¹³⁾。小腸型ならびに胎盤型アイソザイムの阻害剤である L-フェニルアラニンを用いた場合, 臓器非特異型のものは 31.0 mM 濃度で活性の 50% の阻害を受け, 小腸型のものは 0.8 mM で, 胎盤型のものは 1.1 mM で 50% の阻害を受けることが報告されている²¹⁾。本研究では, 約 19 mM L-フェニルアラニンで 50% の活性阻害を認めたことから, HOS 細胞の ALPase は, 小腸型ならびに胎盤型以外のアイソザイムであると考えられる。それに対し, 小腸型, 胎盤型以外のアイソザイムを阻害するレバミゾールを用いた場合, 臓器非特異型は 0.03 mM で 50% の阻害を受けるが, 小腸型は 6.8 mM, 胎盤型は 1.7 mM でそれぞれ 50% の阻害を受けることが報告されている²¹⁾。本研究では, 約 0.18 mM レバミゾールで 50% の活性阻害を認めたことから, HOS 細

胞の ALPase は、小腸型、胎盤型以外のアイソザイムであると考えられる。また 56℃ の熱失活実験で、骨型は、その比活性の 50% を失活するのに 1.9 分を要すると報告されている²²⁾ のに対し、小腸型ならびに胎盤型は、熱安定性があり 56℃ では失活を受けない^{23,24)} と報告されている。HOS 細胞の ALPase 活性では、6 分で 50% が失活したことから、HOS 細胞の ALPase は、小腸型ならびに胎盤型以外のアイソザイムであると考えられる。以上の既知の報告と、本研究の HOS 細胞で観察された ALPase 活性のアイソザイムタイプ解析の結果とを比較検討すると、HOS 細胞で発現された ALPase 活性は、大部分が臓器非特異型アイソザイムであると結論づけられる。なおこの結果は、他の腫瘍組織や腫瘍細胞から、胎盤型類似の ALPase が検出される²⁵⁾ のに対し、ヒト骨肉腫^{26,27)} あるいはラット骨肉腫細胞^{28~30)} では、臓器非特異型 ALPase が検出されるという報告と一致する。

一方、カルシウム沈着に関して本研究では、培養液中にアスコルビン酸のみを添加した場合、カルシウム沈着を認めなかったのに対し、 β -グリセロリン酸ならびにアスコルビン酸を添加した場合に、カルシウム沈着を認めた。これら 2 種の添加物は、通常 *in vitro* 培養で、骨原性細胞を石灰化させる際に用いられ、 β -グリセロリン酸は、培養液中へのリンイオンを供給し³¹⁾、アスコルビン酸は、コラーゲン合成を促進する^{32,33)} と考えられている。現在、*in vitro* で石灰化能を有する細胞は多数報告されている³⁴⁾ が、2 種の添加物を入れずに、株化細胞で石灰化を認めるものには、マウス頭蓋冠由来の株化骨芽細胞、MC3T3-E1 が知られている³⁵⁾。しかし一方で、ラット^{36,37)} もしくはマウス頭蓋冠由来細胞³⁸⁾ や骨膜由来細胞^{39,40)}、および骨組織^{41,42)} では、アスコルビン酸を添加しても、 β -グリセロリン酸がないと石灰化は生じないと報告されている。したがって、これら 2 種の添加物存在下でのみみられた、HOS 細胞のカルシウム沈着は、*in vitro* 培養の骨原性細胞で認められるカルシウム沈着と同様の現象であると

考えられる。

さらに池田は、 β -グリセロリン酸・アスコルビン酸添加培養の HOS 細胞の電子顕微鏡組織所見で、基質小胞様構造物およびハイドロキシアパタイト結晶の形成を報告した⁴³⁾。ニワトリ骨芽細胞を用いた Gerstenfeld ら⁴⁴⁾ の研究では、 β -グリセロリン酸・アスコルビン酸添加培養でのみハイドロキシアパタイト結晶の形成を認め、そのカルシウム量はコントロールの 20 倍を示した。それに対し、アスコルビン酸のみの培養では、結晶の形成が認められないにもかかわらず、コントロールの 3 倍のカルシウム量を示し、カルシウム染色では多数の小塊が観察され、またその部分は β -グリセロリン酸添加時とはほぼ同様の Ca/P 比を示した。この報告と、本研究のカルシウム染色で、HOS β - が BALB3T3 β - に比べ、わずかに染色を呈したという結果とを比較検討すると、アスコルビン酸のみを添加した際、HOS 細胞でも同様に、ハイドロキシアパタイト結晶の形成を伴わないカルシウム量の増加を生じている可能性が考えられる。

以上のことから、HOS 細胞の石灰化過程は、培養初期に ALPase 活性の発現上昇がみられ、ついで細胞がコンフルエント状態になった時期に、ALPase 活性が一定レベルに達し、培養開始後 3 ないし 4 週でカルシウム沈着が始まり、その後ハイドロキシアパタイト結晶の形成が生じると結論づけられる。

2. KHOS 細胞における K-MSV 遺伝子

1) K-MSV DNA の構造とその発現

v-K-ras プローブを用いた、4 種の制限酵素で消化した KHOS 細胞 DNA とのサザン・ブロッティング法による解析の結果、メジャーバンドとして、おのおの 1 本の K-MSV DNA 断片が検出された。このメジャーバンドの各 DNA 断片のサイズと、K-MSV 感染直後に合成される直鎖状 DNA および環状 DNA を、各制限酵素で切断した場合のサイズ⁴⁵⁾ とを比較検討した結果、KHOS 細胞は、HOS 細胞 DNA 中に K-MSV ゲノム DNA が 1 コピー組み込まれたものであることが

図9 KHOS細胞におけるK-MSVプロウイルスDNAの構造とRNAへの転写
HOS細胞DNAへ組み込まれたK-MSVプロウイルスDNAの構造を示す。各制限酵素部位 (E: *Eco*RI, B: *Bam*HI, H: *Hind*III, K: *Kpn*I) はサザン・ブロッティングの結果に基づいて決定した。■: HOS細胞DNA, □: K-MSV LTR領域, ■: v-K-rasタンパク質をコードする領域, —: LTR, v-K-ras以外のK-MSV DNA, 波線: K-MSV DNAから転写されるRNAとその転写方向(矢印)

明らかになった。また、HOSならびにKHOS細胞で検出されたマイナーバンドは、すでに報告されたc-K-ras-2のバンドのサイズ^{46,47)}と一致することから、これらのバンドは、すべてのヒト細胞中に共通に存在する細胞性K-ras遺伝子、c-K-ras-2に相当することが判明した。

さらに、LTRプローブを用いたサザン・ブロッティングの結果と、直鎖状DNAの制限酵素地図とを比較検討した結果、図9に示すように、KHOS細胞ではK-MSVゲノムDNAが、5'末端から3'末端にかけて完全な形で、つまりプロウイルスの形でHOS細胞中に組み込まれていることが明らかになった。また、v-K-rasを含むプローブを用いたノーザン・ブロッティングの結果、6.5 kbの大きさをもつRNAがKHOS細胞に特異的に見い出された。このRNAはKHOS細胞に組み込まれたプロウイルスDNAからの転写産物と考えられ、このRNAからv-K-ras遺伝子産物であるp21タンパク質⁴⁸⁾がつくられるものと考えられる。

2) 分化マーカー発現の抑制

本研究において、KHOS細胞では、HOS細胞で認められたALPase活性の発現およびカルシウム沈着が、明らかに抑制されているという結果を得た。このKHOS細胞での分化マーカーの発現抑制の機構について、現在少なくとも2つの可能性のあるものと考えられる。つまり、第1に、HOS細胞DNAにK-MSVゲノムが組み込まれた結果生じた可能性と、第2に、v-K-ras遺伝子

産物であるp21タンパク質が、HOS細胞の分化マーカー遺伝子の発現に対して作用したという可能性である。第1の可能性については、レトロウイルスDNAが組み込まれた部位の遺伝子を不活化したり^{49,50)}、あるいは組み込まれた近傍の遺伝子を活性化する^{51,52)}ことが知られており、K-MSVゲノムがHOS細胞に組み込まれたために、骨原性分化マーカーの発現を抑制したという可能性である。しかし、(1) MC3T3-E1にK-MSVをm. o. i. (multiplicity of infection, 感染多重度) 1以上で感染した時、分化マーカーの発現が抑制された⁵³⁾、(2)他の分化マーカーをもつ細胞にK-MSVを感染させることによって分化マーカーが同様に抑制された⁶⁾、(3) K-MSVゲノムにはv-K-ras以外の遺伝子がこれまでみつけれられていない、ということから、KHOS細胞においてはv-K-rasにコードされるp21タンパク質が分化マーカー発現を抑制したものと推察できる。

src発癌遺伝子(v-src)をもつRous肉腫ウイルス(RSV)⁴⁸⁾はK-MSVと同様に、褐色細胞腫樹立細胞株PC12を交感神経様細胞へ分化させることが知られている⁵⁴⁾。一方、トリ筋原細胞⁵⁵⁾や軟骨芽細胞⁵⁶⁾、またマウスメラニン細胞⁷⁾や線維芽細胞⁵⁷⁾に対しては、それらの分化を抑制することが報告されている。

以上のことから、発癌遺伝子は、標的細胞の種類によって、分化の誘導あるいは抑制の両方向に作用するものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なご指導とご校閲を賜った主任土田信夫教授に深甚なる謝意を表します。また、数々のご教示、ご助言をいただいた本学歯学部生化学教室佐々木哲教授ならびに助手大井田新一郎博士に心より感謝いたします。さらに、本研究に協力を惜しまれなかった口腔細菌学教室ならびに歯学部生化学教室の方々、特に卓越した技術のご協力をいただいた現昭和大学歯学部口腔病理学教室助手池田通博士に厚くお礼申し上げます。

なお、この研究は昭和62年度文部省科学研究費補助金、一般研究 (B) (課題番号62480374) により行われた。

また、論文の一部は昭和61年9月第28回歯科基礎医学学会総会 (東京)、昭和61年12月第9回日本分子生物学会 (名古屋)、昭和62年8月第29回歯科基礎医学学会総会 (札幌)、昭和63年3月 The 66th International Association for Dental Research (Montréal) において発表した。

文 献

- Burck, K. B., Liu, E. T. and Larrick, J. W. : Oncogenes. New York, 1988, Springer-Verlag.
- Bradshaw, R. A. and Prentis, S. : Oncogenes and growth factors. Amsterdam, 1987, Elsevier Science Publishers.
- Kirsten, W. H. and Mayer, L. A. : Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. J. Natl. Cancer Inst. 39 : 311-335, 1967.
- Tsuchida, N., Ryder, T. and Ohtsubo, E. : Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. Science 217 : 937-939, 1982.
- Noda, M., Ko, M., Ogura, A., Liu, D., Amano, T., Takano, T. and Ikawa, Y. : Sarcoma viruses carrying *ras* oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. Nature 318 : 73-75, 1985.
- Fusco, A., Pinto, A., Ambesi-Impimbato, F. S., Vecchio, G. and Tsuchida, N. : Transformation of rat thyroid epithelial cells by Kirsten murine sarcoma virus. Int. J. Cancer 28 : 655-662, 1981.
- Weissman, B. and Aaronson, S. A. : Members of the *src* and *ras* oncogene families supplant the epidermal growth factor requirement of BALB/MK-2 keratinocytes and induce distinct alterations in their terminal differentiation program. Mol. Cell Biol. 5 : 3386-3396, 1985.
- Yuspa, S. H., Kilkenny, A. E., Stanley, J. and Lichti, U. : Keratinocytes blocked in phorbol ester-responsive early stage of terminal differentiation by sarcoma viruses. Nature 314 : 459-462, 1985.
- McAllister, R. M., Gardner, M. B., Greene, A. E., Bradt, C., Nichols, W. W. and Landing, B. H. : Cultivation *in vitro* of cells derived from a human osteosarcoma. Cancer 27 : 387-402, 1971.
- Rhim, J. S., Cho, H. Y. and Huebner, R. J. : Non-producer human cells induced by murine sarcoma virus. Int. J. Cancer 15 : 23-29, 1975.
- Aaronson, S. A. and Todaro, G. J. : Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. J. Cell Physiol. 72 : 141-148, 1968.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275, 1951.
- Mulivor, R. A., Plotkin, L. I. and Harris, H. : Differential inhibition of the products of the human alkaline phosphatase loci. Ann. Hum. Genet. 42 : 1-13, 1978.
- Dahl, L. K. : A simple and sensitive histochemical method for calcium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 80 : 474-479, 1952.
- Connerty, H. V. and Briggs, A. R. : Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. Am. J. Path. 45 : 290-296, 1966.
- Southern, E. M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517, 1975.
- 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.
- Thomas, P. S. : Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 5201-5205, 1980.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning. New York, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, 196.
- Weiss, M. J., Henthorn, P. S., Lafferty, M. A., Slaughter, 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.
- 21) Goldstein, D. J., Rogers, C. and Harris, H. : Evolution of alkaline phosphatases in primates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 879-883, 1982.
- 22) Whitby, L. G. and Moss, D. W. : Analysis of heat inactivation curves of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin. Chem. Acta 59 : 361-367, 1975.
- 23) Goldstein, D. J. and Harris, H. : Human placental alkaline phosphatase differs from that of other species. Nature 280 : 602-605, 1979.
- 24) McComb, R. B., Bowers, Jr. G. N. and Posen, S. : Alkaline phosphatase. New York, 1979, Plenum Press, 373-524.
- 25) Lange, P. H., Millan, J. L., Stigbrand, T., Vessella, R. L., Ruoslahti, E. and Fishman, W. H. : Placental alkaline phosphatase as a tumor marker for seminoma. Cancer Res. 42 : 3244-3247, 1982.
- 26) Singh, I. and Tsang, K. Y. : An *in vitro* production of bone specific alkaline phosphatase. Exp. Cell Res. 95 : 347-358, 1975.
- 27) Murray, E., Provvedini, D., Curran, D., Catherwood, B., Sussman, H. and Manolagas, S. : Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. J. Bone Miner. Res. 2 : 231-238, 1987.
- 28) Majeska, R. J., Rodan, S. B. and Rodan, G. A. : Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. Endocrinol. 107 : 1494-1503, 1980.
- 29) Partridge, N. C., Frampton, R. J., Eisman, J. A., Michelangeli, V. P., Elms, E., Bradley, T. R. and Martin, T. J. : Receptors for 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ enriched in cloned osteoblast-like rat osteogenic sarcoma cells. FEBS Lett. 115 : 139-142, 1980.
- 30) Manolagas, S. C., Burton, D. W. and Deftos, L. J. : 1,25(OH)₂ D₃ stimulates the alkaline phosphatase activity in osteoblast-like cell. J. Biol. Chem. 256 : 7115-7117, 1981.
- 31) Tenenbaum, H. C. and Heersche, J. N. M. : Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone *in vitro*. Calcif. Tissue Int. 34 : 76-79, 1982.
- 32) Robertson, W. B., Hewitt, J. and Herman, C. : The relation of ascorbic acid to the conversion of proline to hydroxy-proline in the synthesis of collagen in carrageenan granuloma. J. Biol. Chem. 234 : 105-108, 1959.
- 33) Peterkofsky, B. : The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. Arch. Biochem. Biophys. 152 : 318-328, 1972.
- 34) Majeska, R. J. and Rodan, G. A. : Culture and activity of osteoblasts and osteoblast-like cells. In Butler, W. T. (Ed.) : The chemistry and biology of mineralized tissues. Alabama, 1985, Ebsco Media, Inc., 279-285.
- 35) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. Jpn. J. Oral Biol. 23 : 899-901, 1981.
- 36) Nefussi, J. R., Boy-Lefevre, M. L., Boulekbache, H. and Forest, N. : Mineralization *in vitro* of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. Differentiation 29 : 160-168, 1985.
- 37) Bellows, C. G., Aubin, J. E., Heershe, N. M. and Antosz, M. E. : Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif. Tissue Int. 38 : 143-154, 1986.
- 38) Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F. H., der Rest, M. and Preira, G. : Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. J. Cell Biol. 96 : 639-643, 1983.
- 39) Tenenbaum, H. C. : Role of organic phosphate in mineralization of bone *in vitro*. J. Dent. Res. 60 : 1586-1589, 1981.
- 40) Tenenbaum, H. C. and Heersche, J. N. M. : Differentiation for osteoblasts and formation of mineralized bone *in vitro*. Calcif. Tissue Int. 34 : 76-79, 1982.
- 41) Anderson, H. C. and Reynolds, J. J. : Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. Dev. Biol. 34 : 211-227, 1973.
- 42) Raisz, L. G., Dietrich, J. W. and Canalis, E. M. : Factors influencing bone formation in organ culture. Isr. J. Med. Sci. 12 : 108-114, 1976.
- 43) 池田 通 : ヒト骨肉腫細胞株 HOS の *in vitro* 培養系における分化および石灰化. 口病誌 55 : 106-118, 1988.
- 44) Gerstenfeld, L. C., Chipman, S. D., Glowacki, J. and Lian, J. B. : Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. Dev. Biol. 122 : 49-60, 1987.
- 45) Tsuchida, N. and Uesugi, S. : Structure and functions of the Kirsten murine sarcoma virus

- genome : molecular cloning of biologically active Kirsten murine sarcoma virus DNA. J. Virol. 38 : 720-727, 1981.
- 46) Shimizu, K., Birnbaum, D., Ruley, M. A., Fasano, O., Suard, Y., Edlund, L., Taparowsky, E., Goldfarb, M. and Wigler, M. : Structure of the Ki-*ras* gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. Nature 304 : 497-500, 1983.
- 47) McGrath, J. P., Capon, D. J., Smith, D. H., Chen, E. Y., Seeburg, P. H., Goeddel, D. V. and Levinson, A. D. : Structure and organization of the human Ki-*ras* proto-oncogene and a related processed pseudogene. Nature 304 : 501-506, 1983.
- 48) Coffin, J. : Structure of the retroviral genome. In Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. and Coffin, J. (Eds.) : Molecular biology of tumor viruses second edition, RNA tumor viruses. New York, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, 261-368.
- 49) Harbers, K., Kuehn, M., Delius, H. and Jaenisch, R. : Insertion of retrovirus into the first intron of α 1(I) collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1504-1508, 1984.
- 50) Stoye, J. P., Fenner, S., Greenoak, G. E., Moran, C. and Coffin, J. M. : Role of endogenous retroviruses as mutagens : the hairless mutation of mice. Cell 54 : 383-391, 1988.
- 51) Payne, G. S., Bishop, J. M. and Varmus, H. E. : Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. Nature 295 : 209-214, 1982.
- 52) Dickson, C., Smith, R., Brookes, S. and Peters, G. : Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus : Proviral activation of a cellular gene in the common integration region *int*-2. Cell 37 : 529-536, 1984.
- 53) 大井田新一郎, 佐々木哲, 土田信夫 : 発癌遺伝子による, 株化骨芽細胞 [MC3T3] の分化マーカー発現の阻害. 歯基礎誌 27 : 112, 1985. (抄)
- 54) Alema, S., Casalbone, P., Agostini, E. and Tato, F. : Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-*src* oncogene. Nature 316 : 557-559, 1985.
- 55) Kobayashi, N. and Kaji, A. : Induction of DNA synthesis in terminally differentiated myotubes by the activation of the *src* gene of Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 5501-5505, 1978.
- 56) Alema, S., Tato, F. and Boettiger, D. : *myc* and *src* oncogenes have complementary effects on cell proliferation and expression of specific extracellular matrix components in definitive chondroblasts. Mol. Cell Biol. 5 : 538-544, 1985.
- 57) Liao, G., Yamada, Y. and Crombrughe, B. : Coordinate regulation of the levels of type III and type I collagen mRNA in most but not all mouse fibroblasts. J. Biol. Chem. 260 : 531-536, 1985.