

子宮内膜および培養子宮体癌細胞における

アルカリホスファターゼの性状

北里大学医学部産婦人科学教室

鈴木 光明 蔵本 博行 浜野美恵子

森沢 孝行 新井 正夫

東海大学医学部病理学教室

白根 秀夫 渡辺 慶一

The Nature of Alkaline Phosphatase of the Endometrium and Cultured Endometrial Cancer Cells

Mitsuaki SUZUKI, Hiroyuki KURAMOTO, Mieko HAMANO,

Takayuki MORISAWA and Masao ARAI

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kitasato University, Kanagawa

Hideo SHIRANE and Keiichi WATANABE

Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University, Kanagawa

概要 子宮内膜由来 alkaline phosphatase (ALP) が、他の臓器および組織由来の ALP に比べ、独自の性質を有するか否か、また子宮内膜癌細胞 (HEC-50-B) に存する ALP が、果して子宮内膜由来 ALP と如何なる関係にあるかを、各種阻害剤試験、熱耐性試験に加え、免疫学的検索も行い検討した。その結果、

1) 子宮内膜 ALP は、L-phenylalanine ではほとんど阻害されず、L-homoarginine には強い阻害をうけ、また sodium deoxycholate, imidazol には中等度阻害された。熱試験にては、ほとんどその活性は消失した。これらの結果から、子宮内膜 ALP は、胎盤あるいは小腸性 ALP とは異なる性質をもつことが解り、逆に胆汁由来 ALP とは極めて類似点のあることが判明した。即ち、子宮内膜 ALP はアイソザイムの分類上は肝由来のものに最も近いと結論された。

2) 子宮内膜癌細胞 (HEC-50-B) に存する ALP は、各種阻害剤に対する反応結果から、子宮内膜由来 ALP と類似の性質をもつことが判明した。さらに抗子宮内膜 ALP 抗体を用いた免疫学的検索からも、子宮内膜相当の ALP をもつことが確認され、癌化によつても、なお正常子宮内膜由来 ALP を堅持することが示唆された。

一方、HEC-50-B の ALP は、抗胎盤 ALP 抗体を用いた免疫学的検索では、胎盤由来 ALP の存在は確認されなかつたが、熱耐性試験では、子宮内膜 ALP に比べ、軽度の耐熱性増加を認め、この点では胎盤性 ALP 類似の性質をその一部に含む可能性が示唆された。このことは正常細胞の癌化に伴う一種の酵素偏倚とも解釈された。

Synopsis A study to characterize the biochemical properties of alkaline phosphatase (ALP) derived from human endometrium and cultured endometrial cancer cells (line HEC-50-B) has been undertaken.

1) Endometrial ALP is inhibited by sodium deoxycholate and imidazole, and is markedly inhibited by L-homoarginine. The enzyme also proves to be heat sensitive. The results indicate that endometrial ALP is different in nature from those of placenta and small intestine, whereas the enzyme is closely related to ALP obtained from bile. Consequently, we conclude that endometrial ALP resembles hepatic one.

2) From the results of inhibition test, it is observed that ALP of line HEC-50-B has almost the same character as that of normal endometrium. Similarly, it is also proved by means of immunochemical examinations. Namely, it appears that the cultured carcinoma cells would still preserve the endometrial ALP even after malignant transformation. On the other hand, ALP of HEC-50-B shows slight heat stability.

This phenomenon suggests that it reveals partially the nature of placental origin, although it does not cross-react immunologically, and it may be postulated that "enzyme deviation" has developed in the course of carcinogenesis.

Key words: Alkaline phosphatase • Endometrium • Uterine neoplasms

緒 言

子宮内膜に alkaline phosphatase (ALP) が存在することは、以前より酵素組織化学的検索により認められており⁸⁾、また生化学的検索から、その活性は月経周期に伴って変動を示すことも判明している⁹⁾。一方、我々は子宮内膜癌細胞株 (HEC-50-B) が顕著な ALP 活性を有すること²⁾、またその活性が性ホルモンにより特異的に制御されていること等を報告した³⁾⁴⁾。

しかしながら子宮内膜 ALP が内膜由来として独自の性質を有しているかどうかは、いまだ十分に検討されていない。また、子宮内膜癌細胞のもつ ALP が、果して子宮内膜由来 ALP と同じ性質を有するかどうかについても不明である。

そこで我々は、正常子宮内膜由来 ALP の性質を明らかにし、かつ子宮内膜癌細胞の ALP とは如何なる関連性をもつか否かを、阻害剤試験、熱試験、さらに免疫学的検索も加え検討した。

材 料

1) 正常子宮内膜組織は、子宮筋腫の診断のもとに全摘術をうけた患者の子宮から得た。摘出後、直ちに内膜ソーハを行い、使用時まで -80°C 下に凍結保存し、材料に供した。尚検体総数は42個を数え、年齢分布は31歳~51歳である。

2) ヒト子宮体癌培養株は HEC-50-B¹⁾ を用いた。60mm 直径のシャーレにて重複培養を行い、培養開始後8日目にラバーポリスマンにて細胞を採取し、0.1M Tris-HCL buffer, pH 7.4にて洗い、2,000rpm, 5分間遠心後、上清をすて材料とした。

3) 妊婦血清は、妊娠35週、28歳妊婦より採血し、2,000rpm, 10分間遠心後血清を得た。

4) 胆汁は、肝疾患の既往のない剖検例の胆嚢より得た。

5) 免疫化学的検索に用いた抗胎盤 ALP 抗体は、P. Nakane より恵与されたものを用い、また

抗子宮内膜 ALP 抗体としては、東海大病理にてつくられたものを使った。

方 法

1) ALP 活性測定

ALP 活性の測定には25mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer, pH 10.0 (含 1mM MgCl_2) に、2.7mM p-nitrophenyl-phosphate (pNPP) を溶解した基質溶液2.5ml に試料溶液100 μl を加え、 37°C 、30分間反応後、250 μl , 1N NaOH にて反応を止め、 A_{405} を測定した。尚1unit は1 μmole liberated p-nitrophenol/min とした。

2) アクリルアミドディスクゲル電気泳動、およびセルロースアセテート電気泳動

アクリルアミドディスクゲル電気泳動用のゲル作製、および電気泳動は Fishman⁹⁾の方法により行つた。ALP 活性の染色には、50mM Propanediol-HCL buffer, pH9.8 (含 1mM MgCl_2) を用い、基質に Naphthol AS-BI phosphate, 発色剤に Fast Red Violet LB-Salt を用いた。

セルロースアセテート電気泳動は、セルロースプレートに Titan III iso (Helena Laboratories) を用い、電気泳動用 buffer に Electra HR (Helena Laboratories) を用い、250V, 40分間泳動を行つた。ALP 活性の染色には、50mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer, pH 10.0 (含2mM MgCl_2) を用い、基質に Naphthol AS-MIX phosphate, 発色剤に Fast Red Violet LB-Salt を用いた。

3) ALP の抽出、精製

胆汁の ALP の抽出、精製は Price et al.¹⁰⁾の方法に従い行つた。また体癌培養細胞の ALP は Ghosh et al.⁷⁾の方法に従い n-butanol 抽出を行つた。尚子宮内膜の ALP は、体癌培養細胞と同様に n-butanol 抽出を行つた後、DEAE-Sephadex A-25イオン交換クロマトグラフィー、Sephadex G-200にてゲル濾過を行い、活性部分を分画した。得られた ALP 標品は比活性で homogenate の

表 Effect of inhibitors on ALP activity

Percentage activity remaining after indicated treatment

	Heat		L-Phenylalanine 5 mM	L-Homoarginine 5 mM	Sodium deoxycholate 5 mM	Imidazol 5 mM
	65°C, 5 min	65°C, 15 min				
Endometrium	3.4	3.5	82.6	25.0	52.1	68.1
HEC-50-B	17.3	16.6	77.2	33.1	56.2	75.0
Pregnant serum	55.1	53.5	51.2	73.5	93.1	82.7
Bile	4.4	0.5	83.4	28.5	58.9	74.8

2,200倍まで精製され、アクリルアミドディスクゲル電気泳動にて単一活性を示した。

4) 阻害剤および熱耐性試験

ALP 活性阻害剤として、L-phenylalanine, L-homoarginine, sodium deoxycholate, imidazol を用いた。これら阻害剤 5mM を基質溶液 (5mM pNPP+25mM Na₂CO₃-NaHCO₃ buffer, pH 10.0 +1mM MgCl₂) に加え、37°C, 30分間反応後、阻害剤無添加をコントロールとして、残存活性率を求めた。

熱耐性試験は、各試料を65°Cの恒温槽中に5分、および15分間 incubate 後、直ちに活性測定を行い、同様にコントロールに対する残存活性率を算出した。

5) 二抗体法による沈降反応

試料溶液と抗胎盤 ALP 抗体、および抗子宮内膜 ALP 抗体を4°C, 一昼夜 incubate 後、抗家兎 γG 抗体 (羊) を加え、さらに一昼夜 incubate し、遠心分離後、上清の ALP 活性を測定した。

結果

1) 阻害剤および熱耐性試験 (表)

子宮内膜 ALP は L-phenylalanine 非感受性、L-homoarginine 感受性、易熱性であり、胎盤由来 ALP を多量に含むと考えられる妊婦血清中の ALP とは、耐熱性、L-phenylalanine 阻害等の点で大きく異つた性質をもつことが判明した。一方胆汁由来 ALP とは、ともに易熱性であること、また各種阻害剤により、ほぼ同様の影響をうけること等から、子宮内膜 ALP は胆汁由来 ALP に極めて類似していることが解つた。

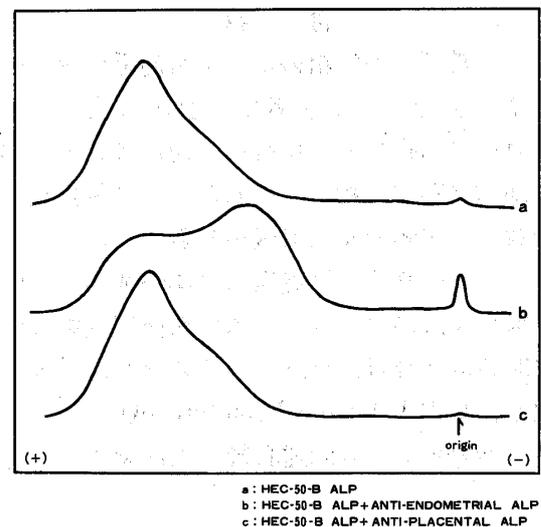
これに対し、子宮内膜癌細胞 HEC-50-B ALP

は、概ね子宮内膜 ALP と類似の性質をもつことが判明したが、L-phenylalanine 阻害の軽度増加、L-homoarginine 阻害の軽度減少、また耐熱性の増加が認められ、一部胎盤性 ALP への偏倚が示唆された。

2) 子宮内膜癌細胞 HEC-50-B ALP の電気泳動パターンおよび免疫学的検討

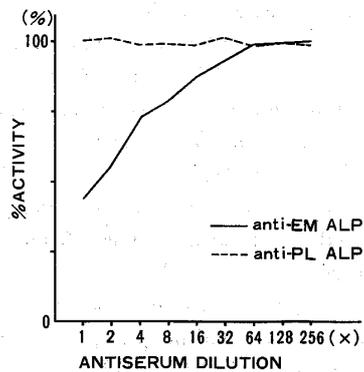
HEC-50-B ALP のセルロースアセテート電気泳動結果を図1 (a 曲線) に示した。陰極よりなだらかなかたをもつたパターンが得られ、2成分の isoenzyme の存在が示唆された。

図1 Densitometric scans of electrophoretic pattern



次いで HEC-50-B ALP と抗子宮内膜 ALP 抗体とを incubate 後、同様にセルロースアセテート電気泳動を行つたところ、移動度の低下が認められた (図1, b 曲線)。また抗胎盤 ALP 抗体と incubate 後の電気泳動では、泳動パターンの

図2 Precipitation of HEC-50-B ALP by anti-endometrial ALP and anti-placental ALP serum



変化は認められなかつた (図1, c 曲線).

さらに, 二抗体法による沈降反応によつては, HEC-50-B ALP と抗子宮内膜 ALP 抗体とは著明な沈降反応を呈したが, 抗胎盤 ALP 抗体との反応は検出されなかつた (図2).

考 案

1) 子宮内膜由来アルカリホスファターゼ

子宮内膜由来 ALP の性質については, Wilson¹²⁾ によりその一部が明らかになつている. 即ち, L-phenylalanine, sodium deoxycholate, urea の各阻害剤による反応結果から, 子宮内膜のもつ ALP は, 胎盤および小腸由来の ALP とは異なつた性質をもつことが示された. 我々の阻害剤による検索では, L-phenylalanine, sodium deoxycholate による反応は Wilson とほぼ同様の結果であるが, さらに L-homoarginine によつて強い阻害をうけること, imidazol によつても中等度の阻害をうけることが判明した. また熱耐性試験によつて, 子宮内膜 ALP は易熱性であることも明らかになつた. Wilson の検索結果と, 我々のこれらの結果を総合すると, 子宮内膜 ALP は胆汁由来 ALP と極めて類似の性質をもつことが解つた.

一方, Sugiura et al.¹¹⁾ はヒト肝由来 ALP を抽出, 精製し, その性質を検討したところ, 至適 pH, Michaelis 定数, 分子量, および熱耐性試験並びに阻害剤による反応態度等から, 肝由来 ALP と胆汁由来 ALP の間に極めて類似点のあることを示し, 胆汁由来 ALP は肝が origin であろう

と結論している. この点を考慮に入れると, 子宮内膜 ALP はアイソザイムの分類上は肝由来のものに最も近いと結論されよう.

2) 子宮内膜癌細胞 HEC-50-B のアルカリホスファターゼ

子宮内膜癌細胞 HEC-50-B の ALP については, 各種阻害剤に対する反応結果から, 子宮内膜由来 ALP と類似の性質をもつことが判明した. さらに, 抗子宮内膜 ALP 抗体を用いた免疫学的検索により, HEC-50-B は子宮内膜相当の ALP をもつことが確認された. 即ち, このことは内膜癌の発生源組織が子宮内膜であることを考慮すると, 癌化によつてもなお正常子宮内膜由来 ALP を堅持するというを示唆している.

一方, HEC-50-B の ALP は熱耐性試験によつては, 子宮内膜 ALP に比べ軽度の耐熱性増加を認めており, この点では胎盤性 ALP 類似の性質をその一部に含む可能性が示唆された. しかしながら, 抗胎盤 ALP 抗体を用いた二抗体法による沈降反応およびセルロースアセテート電気泳動にては反応を生ぜず, 免疫学的検索からは胎盤性 ALP の存在は証明されなかつた. ここで認められた耐熱性の増加については, Nose et al.⁹⁾ の培養細胞中に見出された細胞可溶性分画に存在する ALP-II に相当するものとも考えられる. 即ち, 彼らは各種培養株中に2種類の ALP を見出し, これらのうち細胞膜分画に存在すると考えられるものを ALP-I, 細胞可溶性分画に存在すると考えられるものを ALP-II とし, この ALP-II は熱安定性で, 各種培養株に広く存在するという. しかしながら, 我々が認めた内膜癌細胞 HEC-50-B の耐熱性の増加という現象は, また正常細胞の癌化に伴う一種の酵素偏倚とも解釈される.

文 献

1. 蔵本博行, 浜野美恵子, 西田正人, 田口 明, 上坊敏子, 鈴木光明, 長内国臣: 腹水由来ヒト子宮体癌細胞株の樹立. 日産婦誌, 28: 1405, 1976.
2. 蔵本博行, 鈴木光明, 浜野美恵子, 新井正夫, 白根秀夫, 渡辺慶一: 培養子宮体癌細胞にお

- けるアルカリホスファターゼ活性の有無ならびに増殖動態による消長。日産婦誌, 30: 601, 1978.
3. 鈴木光明, 蔵本博行, 浜野美恵子, 新井正夫, 白根秀夫, 渡辺慶一: 子宮体癌培養株のアルカリホスファターゼ活性におよぼす性ホルモンの影響。日産婦誌, 30: 509, 1978.
 4. 鈴木光明, 蔵本博行, 浜野美恵子, 森沢孝行, 新井正夫, 白根秀夫, 渡辺慶一: 体癌培養細胞のアルカリホスファターゼ活性におよぼすステロイドホルモンの影響。日産婦誌, 31: 577, 1979.
 5. Fishman, L.: Acrylamide disc gel electrophoresis of alkaline phosphatase of human tissues, serum and ascites fluid using triton x-100 in the sample and the gel matrix. *Biochem. Med.*, 9: 309, 1974.
 6. Gautray, J.P., Couderc, P., Colomb, M.C., Sibut, H. and Maurel, C.: Biochemical determination of alkaline phosphatase activity in the human endometrium during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 104: 818, 1969.
 7. Ghosh, N.K. and Fishman, W.H.: Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase. *Biochem. J.*, 108: 779, 1968.
 8. McKay, D.G., Hertig, A.T., Bardawil, W.A. and Velardo, J.T.: Histochemical observations on the endometrium I. normal endometrium. *Obstet. Gynecol.*, 8: 22, 1956.
 9. Nose, K., Takaoka, T. and Katsuta, H.: Two different activities of alkaline phosphatase in cultured mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 155: 1, 1973.
 10. Price, C.P., Hill, P.G. and Sammons, H.G.: The nature of the alkaline phosphatase of bile. *J. Clin. Pathol.*, 25: 149, 1972.
 11. Sugiura, M., Hirano, K., Iino, S., Suzuki, H. and Oda, T.: Purification and properties of human liver alkaline phosphatase. *Chem. Pharm. Bull.*, 23: 2369, 1975.
 12. Wilson, E.W.: Some properties of human endometrial alkaline phosphatase. *Fertil. Steril.*, 27: 299, 1976.

(No. 4522 昭54・4・13受付)