

原

著

ヒト胃癌培養細胞の耐熱性アルカリホスファターゼ活性

新潟大学医学部第一外科学教室（指導：武藤輝一教授）

新潟大学医学部第一病理学教室（指導：渡辺英伸教授）

藍 沢 喜久雄

Heat-stable alkaline phosphatase in cultured human gastric cancer cells

Kikuo AIZAWA

*First Department of Surgery, Niigata University School of Medicine**(Director: Prof. Terukazu MUTO)**First Department of Pathology, Niigata University School of Medicine**(Director: Prof. Hidenobu WATANABE)*

Characteristics of heat-stable alkaline phosphatase (HSAP) in human gastric cancers were studied on various aspects by using their cultured cells. HSAP was identified in 3 (MKN 1, MKN 7 and SCH) out of 9 gastric cancer cell lines. Cytochemical, biochemical and electrophoretic examinations on enzyme revealed that MKN 1 and MKN 7 cell lines had Regan isoenzyme, while SCH cell line had Nagao isoenzyme. Although the strongest activity of HSAP was observed on the plasma membrane ultrastructurally, considerable activities were detected in the intracellular organelles such as endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. These findings indicate a biosynthetic route of HSAP. The HSAP activities of 3 cell lines increased progressively during the logarithmic to the early plateau phase. This datum suggests that the production of HSAP is related to cellular differentiation and maturation. The HSAP activities of MKN 1 and MKN 7 cell lines were accelerated by hydrocortisone, while they were markedly suppressed by retinoic acid. The HSAP activity of SCH cell line was accelerated by sodium butyrate and N^6, O^2' -dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, but it was not influenced by either hydrocortisone or retinoic acid. These data suggest that the regulatory mechanism of enzyme biosynthesis is different between Regan and Nagao isoenzymes. These 3 cell lines, which continuously

Reprint requests to: Kikuo AIZAWA,
First Department of Surgery, Niigata
University School of Medicine, Niigata,
951, JAPAN.

別冊請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第一外科学教室

藍沢喜久雄

produce high levels of HSAP, will be helpful for the development of radioimmunoassay and the evaluation of immunotherapy. Furthermore, they are expected to give us valuable informations regarding the mechanism of carcinogenesis.

Key words: alkaline phosphatase, cultured human gastric cancer cells, enzyme cytochemistry, modulation study

アルカリホスファターゼ, ヒト胃癌培養細胞, 酵素細胞化学, 誘導実験

癌化に伴う形質発現の異常として正常成人組織には見られない胎児性あるいは胎盤性の物質が検出されることがある。これらは腫瘍のマーカー物質として、臨床、癌の診断にしばしば利用され、治療にも応用されつつある。

耐熱性を有するアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; AP) は、妊娠後期の胎盤には大量に存在するが、他の臓器にはあっても極めて微量にしか存在しない。耐熱性アルカリホスファターゼ (heat-stable alkaline phosphatase; HSAP) は、簡単な熱処理によって容易に他の型の AP とは区別し得るということで腫瘍マーカーとして意義深く、また、癌胎盤性酵素の一つであることから発癌過程との関連においても興味を持たれている。

胃癌を中心とした消化器癌においても HSAP の出現する例があることが知られている¹⁾²⁾³⁾。しかし、これらの HSAP の生化学的特性ならびに産生調節機構の差などの相互関係について十分に調べた研究はいまだ見ない。そこで著者は、HSAP を産生するヒト胃癌培養細胞を用い、種々の面よりその性格を検討した。その結果、癌性 HSAP は耐熱性という共通性を有するものの、他の諸性格からさらに2群に大別され、それらは産生の調節機構をも異にしていることを見いだしたので報告する。

I. 材料と方法

1) 培養細胞と培養方法

Table 1 に示すヒト胃癌培養細胞9株⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾を対象に、AP 活性の有無を検索し、後述の方法によって HSAP の存在を確認できた MKN 1, MKN 7, SCH の3株について種々の面より詳細に調べた。細胞株は全て10%の割合の牛胎児血清 (M.A. Bioproducts, USA) と 200 μ g/ml の硫酸カナマイシン (明治製菓, 東京) を含んだ RPMI-1640 (日水製菓, 東京) を培養液とし、37 $^{\circ}$ C, 湿度 100%, 5% 炭酸ガス - 95% 空気の条件下で静置培養した。

2) アルカリホスファターゼ活性の光顕的酵素細胞化学および酵素組織化学

AP 活性の光顕的観察は Burstone⁸⁾ のアゾ色素法にて行い、基質はナフトール AS-MX リン酸、アゾ色素はファースト赤 TR 塩を用いた。核染はメチルグリーンによって行った。細胞を 22mm 平方の Lab-Tek chamber slide (Miles, USA) にて培養し、細胞がほぼ密になった時点で 0.9% NaCl 加 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C) にて洗浄後、Baker の 10% formol calcium 液 (pH 7.2, 4 $^{\circ}$ C) にて20分間固定、次いで Holt の hypertonic gum sucrose 溶液 (0.88M, 4 $^{\circ}$ C)

Table 1 Gastric Cancer Cell Lines Used in the Present Study

Cell line	Histological type of origin ^{a)}
MKN 7	Well differentiated tubular adenocarcinoma
MKN 28	Moderately differentiated tubular adenocarcinoma
MKN 74	Moderately differentiated tubular adenocarcinoma
OKAJIMA	Poorly differentiated adenocarcinoma
MKN 45	Poorly differentiated adenocarcinoma, medullary type
KWS-I	Poorly differentiated adenocarcinoma, medullary type
KATO-III	Signet-ring cell carcinoma
MKN1	Adenosquamous carcinoma
SCH	Choriocarcinoma, non-gestational

^{a)} Classification by Japanese Research Society for Gastric Cancer

にて12時間洗浄したものを染色した。浮遊増殖をしめす OKAJIMA, KATO-III 株については塗沫標本を作製し、上記と同様の操作を行った後、染色した。

対照組織として後期胎盤、小腸、肝を用いた。すなわち、胎盤組織は妊娠合併症のない満期正常産婦より分娩直後に得たものを用い、成人小腸組織は胃腸管手術時に空腸より得た。肝組織は異常のない剖検肝を用いた。いずれの組織も上述の緩衝液にて洗浄し、同様の固定液にて9時間固定し、hypertonic gum sucrose 溶液で24時間ないし36時間洗浄した後、cryostat にて6 μ の連続切片を作製し、染色した。

耐熱性試験は Jensen ら⁹⁾の方法に準じ、切片を5 mM MgCl₂ 溶液中にて65°C、30分間の熱処理をした後、同様の染色を行った。

アミノ酸および EDTA による阻害試験は Watanabe and Fishman¹⁰⁾の方法に準じて行った。培養細胞と組織切片を阻害剤を含んだ0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)中で室温にて15分間プレインキュベーションした後、同濃度の阻害剤を含んだ基質液に移し室温で15分間反応させた。各種阻害剤の濃度は L-phenylalanine, L-leucine, L-homoarginine のアミノ酸は30 mM, EDTA は1mM とした。

3) アルカリホスファターゼの電顕的 酵素細胞化学

AP 活性の電顕酵素細胞化学的観察には細胞を60mm径のプラスチックディッシュ(Corning)にて培養し、細胞が密になった時点で0.9% NaCl 加0.2M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4, 4°C)にて洗浄後、8%ショ糖加2%グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液(pH 7.2, 4°C)で60分間固定し、8%ショ糖加0.1M カコジル酸緩衝液(4°C)にて12時間洗浄後、Mayahara ら¹¹⁾のクエン酸鉛法により、クエン酸鉛浸漬液中で37°Cで30分から60分間反応させた。基質液の浸透性を高めるために0.005%の saponin (和光純薬、東京)処理、さらには凍結融解処理を必要に応じて加えた。浸漬液にて反応後、上述の緩衝液で洗浄し、遠心により、cell pellet を作製し、1%オスミウム酸で後固定、アルコール脱水を経てEpon 812に包埋した。超薄切片は無染色のまま透過型電子顕微鏡で観察した。

4) 免疫細胞化学および免疫組織化学

後期胎盤型 AP (placental alkaline phosphatase; PLAP) に対する免疫化学的染色は非標識酵素抗体間接法(PAP法)によった。細胞をLab-Tek chamber slide にて培養後、10% formol calcium 溶液にて固

定したもの、あるいは cell pellet を作製し、同様の固定を行いパラフィン切片としたものを染色に用いた。胎盤組織は前述の酵素組織化学的染色に用いたものを使用した。抗ヒト PLAP ウサギ抗体とペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ複合体は DAKO (Denmark) より、抗ウサギ免疫グロブリンブタ血清は日本抗体研究所(高崎)より各々求めた。核染にはメチルグリーンを用いた。

5) アルカリホスファターゼの抽出

培養細胞は60mm径のプラスチックディッシュにて培養したもの5 \times 10⁷~10⁸個を集め、0.9% NaCl 加0.2M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4, 4°C)にて洗浄し、抽出に用いるまで-70°Cで凍結保存した。胎盤組織、小腸粘膜組織および肝組織はいずれも前述の酵素組織化学の項で用いたものを使用した。いずれの組織も上述の緩衝液にて洗浄し、培養細胞同様、抽出に用いるまで-70°Cで凍結保存した。抽出には培養細胞あるいは組織0.5gに4mlの0.9% NaCl および0.1mM MgCl₂ 加10mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0, 4°C)、および40% (v/v)になるようn-ブタノールを加え、ホモジナイズした後、さらに超音波破碎処理を行った。次いでこれを冷却遠心(10,000rpm, 20分間)し、下層の透明層をVisking-tubeにより、0.9% NaCl および0.1mM MgCl₂ 加10mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)に対し、4°Cで12時間透析した。抽出物はAP活性測定、および蛋白定量に用いるまで-70°Cで凍結保存した。

6) アルカリホスファターゼ活性の測定 および蛋白定量

AP 活性の測定は King-Armstrong 法の Kind-King 変法にて行った。同試料の蛋白量は Lowry ら¹²⁾の方法により測定した。AP 活性は IU/mg protein にて表わした。

培養細胞および組織抽出物の AP の耐熱性試験は Posen ら¹³⁾の方法に準じ、試料に50mM MgCl₂ 0.2 ml を加えたものを65°Cで10分間熱処理をした後に AP 活性を測定した。

種々の阻害剤に対する感受性試験は標準測定系に種々の濃度の阻害剤を加えて反応させた後に、AP 活性を測定した。耐熱性試験および感受性試験の結果はそれぞれ同時に未処理群を設け、AP の比活性(% activity)として表わした。

7) 電気泳動

ポリアクリルアミドグラディエントゲル法を用いた。ポリアクリルアミドグラディエントゲル PAA 4/30

(Pharmacia)を用い、ペロナール緩衝液 (pH 8.6) 中で 4°C, 15時間泳動した。染色はインドールリン酸エステル系基質の 5-ブロム-3-インドリルリン酸 P-トルイジン塩 (和光純薬)を用い、37°C で反応させ、7%酢酸を加えることにより反応を停止させ、泳動パターンを観察した。

8) 細胞増殖曲線と AP 活性曲線

細胞増殖と AP 活性との関係を見るため、細胞を 2×10^5 個、60mm ディッシュに播き、培養 1, 3, 5, 7, 9, 11日目の細胞数と細胞抽出物の AP 活性を各々求めた。

9) AP 活性の誘導

種々の化学物質を用い、AP 活性の誘導を試みた。細胞を 2×10^5 個、60mm ディッシュに播き、24時間後は通常の培養液にて培地交換し、72時間以後より、後述の化学物質を含んだ培養液で培養した。培養液はその後48時間毎に交換し、6日間薬剤処理をした後、AP の抽出を行った。

高張培養液は通常の培養液 (約 268m Osm/kg) の NaCl 濃度を 40mM 上げることによって 330m Osm/kg としたものをを用いた。Hydrocortisone, dbc AMP, RA (以上 Sigma) および NaBT (半井化学, 京都) は各々 $1 \mu\text{g/ml}$, 1mM, $33 \mu\text{M}$, 5mM の濃度で用いた。Hydrocortisone および RA の溶媒としてエタ

ノールを用いたが、培養液中の最終濃度は 0.1% 以下となるようにした。各々の実験系に対し、全て通常の培養液で培養した未処理群を設け、処理群の活性を比活性 (% activity) で表わした。また、同時に HSAP 活性も求め、同様に誘導性を検討した。

細胞増殖に対する影響は処理群、未処理群の細胞飽和密度 (saturation density; 細胞数/ディッシュの底面積) を各々求め、未処理群に対する比細胞飽和密度 (% saturation density) で表わした。

II. 結 果

1) AP 活性の光顕的酵素細胞化学によるスクリーニング

アゾ色素法により AP 活性の有無を調べたが、9株中、強い活性を有するもの、中等度の活性を有するものが各々3株、弱い活性しか持たないものが1株、全く活性を示さなかったものが2株であった (Table 2)。

強い AP 活性を有した MKN 1, MKN 7, SCH の3株は、65°C 30分の熱処理に対しても後期胎盤同様の耐熱性を示し (Fig. 1 a-c), また、これらは L-phenylalanine に対して、高感受性である点からも後期胎盤との類似性がうかがわれた (Fig. 2, 3)。

他の4株の AP は全て易熱性であり、アミノ酸阻害

Table 2 Enzyme Cytochemistry on AP in Gastric Cancer Cell Lines

Cell line and tissues	Control ^{a)}	Heat at 65°C, 30min	Inhibitors			
			L-phenylalanine (30mM)	L-leucine (30mM)	L-homoarginine (30mM)	EDTA (1 mM)
MKN 1	+++	+++	-	+++	+++	+++
MKN 7	+++	+++	-	+++	+++	+++
SCH	+++	+++	-	-	+++	-
MKN28	++	-~+	-	+	++	nt ^{b)}
MKN74	++	-~+	-	-	+	nt
MKN45	++	-~+	-	-	++	nt
KWS- I	+	-	+	-	-	nt
OKAJIMA	-					
KATO-III	-					
Term placenta	+++	+++	-	+++	+++	nt
Liver	+++	-	++	+++	-	nt
Small intestine	+++	-~+	-	+++	+++	nt

^{a)} -, negative; +, weakly positive; ++, moderately positive; +++, strongly positive. ^{b)} nt: not tested.

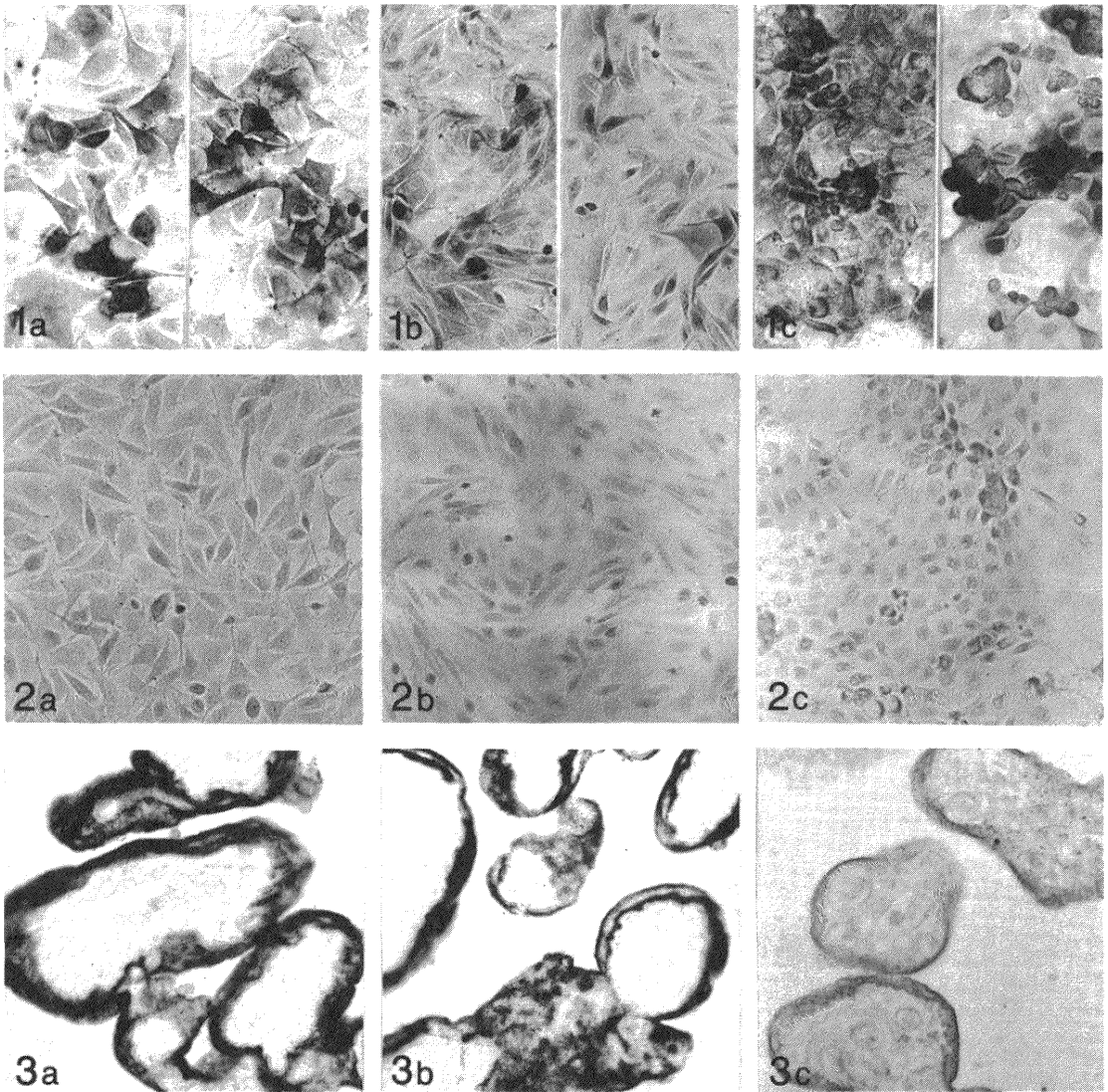


Fig. 1 Enzyme cytochemical stainings for AP in MKN 1 (a), MKN 7 (b) and SCH (c) cell lines. The left side photographs are control and the right side photographs show remaining activities after heating at 65°C for 30min (azo dye method, $\times 50$).

Fig. 2 Enzyme cytochemical stainings for AP in the presence of 30mM L-phenylalanine in MKN 1 (a), MKN 7 (b) and SCH (c) cell lines. The APs of 3 cells were completely inhibited (azo dye method, $\times 50$).

Fig. 3 Enzyme cytochemical stainings for AP in term placenta. a, Control. b, Staining after heating at 65°C for 30min. Strong activity was retained as control. c, Staining in the presence of 30mM L-phenylalanine. The activity was completely inhibited (azo dye method, $\times 100$).

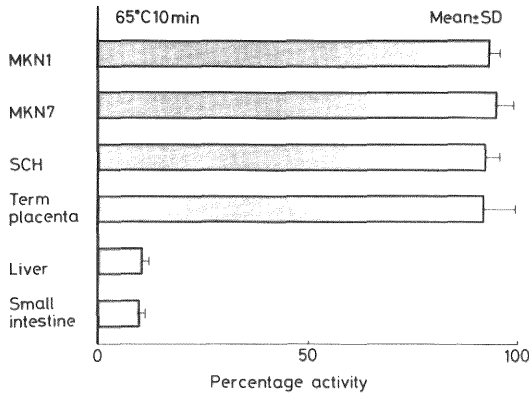


Fig. 4 Heat stabilities of AP extracts from gastric cancer cell lines and control tissues.

試験の面からも後期胎盤との共通性はうかがわれなかった。

以下、本稿では HSAP を有する MKN 1, MKN 7, SCH の 3 株について詳述する。

2) 細胞抽出物の AP 活性

HSAP を有することが示唆された 3 株と対照臓器とした後期胎盤、肝および小腸からの抽出物の AP 活性について、耐熱性および各種阻害剤に対する感受性の程度を調べた結果が Fig. 4 と 5 である。

MKN 1, MKN 7, SCH と後期胎盤とは、65°C 10 分の熱処理によっても AP 活性は90%以上保たれたのに対し、肝と小腸では10%前後に減弱した (Fig. 4)。

さらに、3 株は、L-phenylalanine に対して後期胎盤同様の高感受性を示し、L-homoarginine に対して

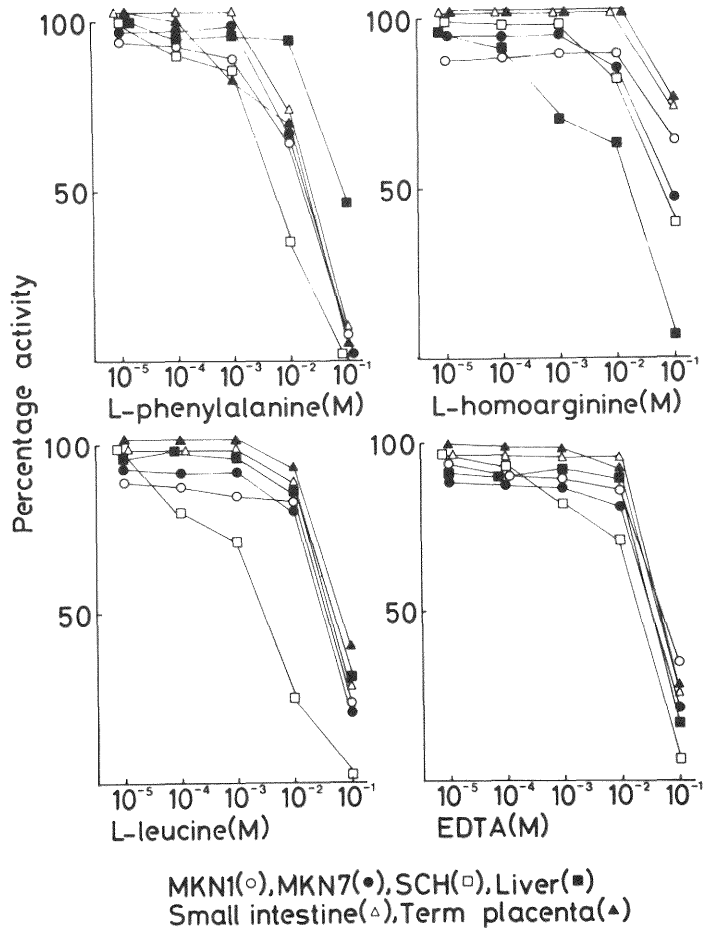


Fig. 5 Biochemical effects of various concentrations of inhibitors on AP extracts from gastric cancer cell lines and control tissues.

は逆に同様の低感受性を示した。しかしながら、L-leucine と EDTA に対しては、SCH は、後期胎盤のみならず MKN 1, MKN 7 と比べても明らかに高感受性であった (Fig. 5)。

以上の結果は、アゾ色素法による酵素細胞化学の結果と完全に一致し、アゾ色素法によるスクリーニングの正当性が裏付けられた。

3) 免疫細胞化学

PLAP に対する免疫染色によっても、MKN 1, MKN 7, SCH の3株はいずれも多数の陽性細胞が検出され、これらの AP が同一の抗原性を有することが示唆された。しかし、後期胎盤においては、合胞性栄養芽細胞に

最も多く、かつ最も強い陽性所見が認められたのに対し、培養3株においてはむしろ単核細胞に多数認められた (Fig. 6)。なお、肝のみならず小腸においても陽性所見は全く認められなかった。

4) 抽出 AP の電気泳動

抽出 AP の電気泳動パターンでは、後期胎盤 AP は肝、小腸に比し、最も陽極よりに速い band として見られたが、その部位に一致して MKN 1 と MKN 7 とは単一の band を形成した。しかしながら、SCH は、後期胎盤よりさらに陽極よりにやや幅の広い band を形成した (Fig. 7)。

5) AP 活性の細胞内局在

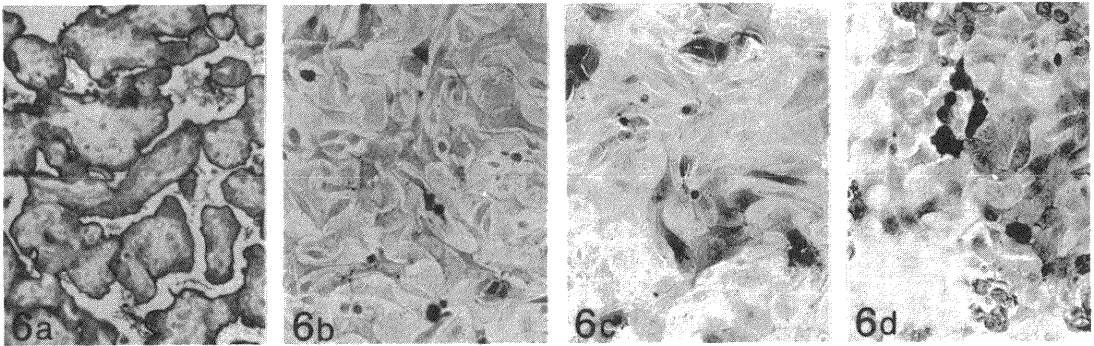


Fig. 6 Immunohistochemistry of PLAP. Reaction products were mainly observed in syncytio-trophoblastic cells in term placenta (a). MKN 1 (b), MKN 7 (c) and SCH (d) cells were positive for PLAP in the plasma membrane and cytoplasm ($\times 50$).

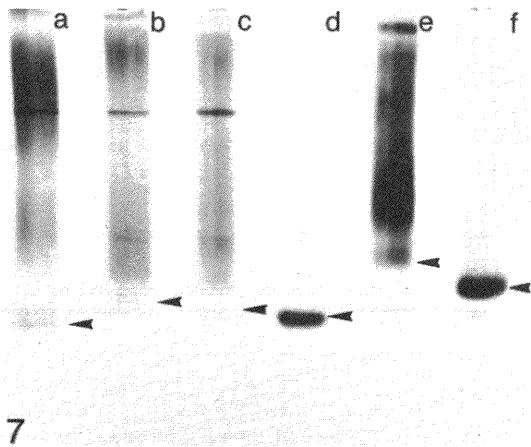


Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis, PAA 4/30. Lane a, SCH; Lane b, MKN 7; Lane c, MKN 1; Lane d, term placenta; Lane e, small intestine; Lane f, liver.

3株とも最も強い AP 活性は細胞膜にみられたが、細胞内小器官の粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアおよび核膜周囲腔にもやや弱いながら活性が認められた (Fig. 8)。

MKN 1 と MKN 7 とでは saponin 処理のみで細胞内小器官に活性の存在を認めることができたが、SCH ではさらに凍結融解処理を加えることによって初めて細胞内小器官の活性を確認した (Fig. 8-d)。

6) AP 活性と細胞の増殖

AP 活性と細胞の増殖との関係では、3株とも AP 活性は細胞の増殖の時相とともに高まり、特に対数増殖期後期から早期定常期にかけては著しい上昇を見た。培養11日目の AP 活性は、培養3日目のそれと比較すると、MKN 1 で3.8倍、MKN 7 で7.6倍、SCH で4倍であった (Fig. 9)。

7) 各種化学物質による影響

(1) AP 活性の変化

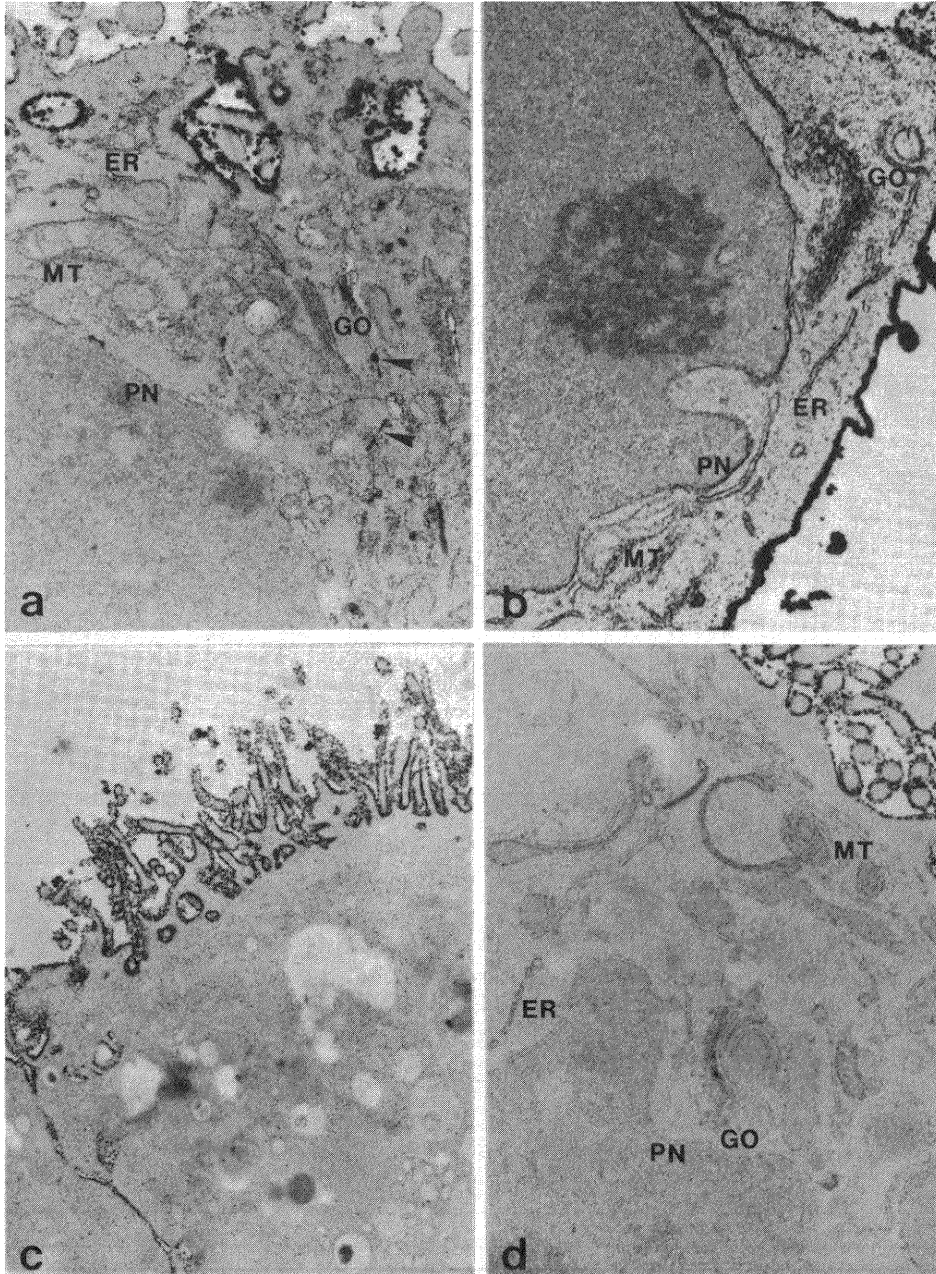


Fig. 8 Electron microscopic enzyme cytochemistry with saponin treatment for APs in MKN 1 cells (a, $\times 10,000$), MKN 7 cells (b, $\times 10,000$), SCH cells (c, $\times 7,000$) and SCH cells with freezing and thawing steps in addition to saponin treatment (d, $\times 10,000$). Reaction products were observed not only on the plasma membranes, but also in intracellular organelles such as the endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus (GO), mitochondria (MT), perinuclear space (PN) and some of vesicles and rod-like structures (head of arrows) in MKN 1 and MKN 7 cells. But, it is not until that intracellular activities were observed by the addition of freezing and thawing steps in the case of SCH cells (c, d).

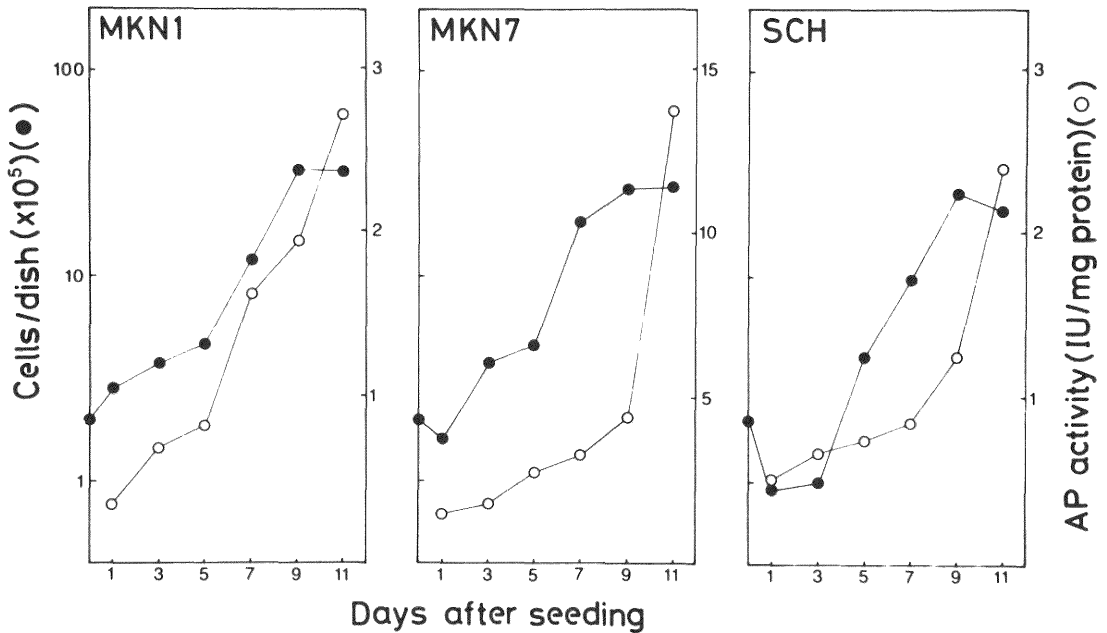


Fig. 9 Relationships between growth and the AP activities in MKN 1, MKN 7 and SCH cells. The AP activities increased progressively in the late logarithmic to the early plateau phase in all 3 cell lines.

Table 3 Effects of Various Agents on AP Activities and Saturation Densities in Gastric Cancer Cell Lines

	Total AP activity ^{a)} (HSAP activity)			Saturation density ^{b)}		
	MKN 1	MKN 7	SCH	MKN 1	MKN 7	SCH
NaCl (40mM)	391.4±86.4 (395.9±74.9)	278.7±15.4 (299.5±55.6)	219.8±21.8 (211.6±25.0)	85.0±12.8	45.2±18.5	66.1±11.4
Hydrocortisone (1 μg/ml)	240.1±14.3 (249.0±4.5)	178.5±20.2 (189.2±14.4)	93.4±21.8 (83.5±8.2)	94.5±11.5	95.4±16.2	111.1±20.1
NaBT (5 mM)	103.8±27.1 (101.4±24.2)	98.4±13.2 (103.4±8.6)	164.7±20.5 (159.0±45.7)	72.7±14.4	92.9±16.4	80.3±10.9
dbcAMP (1 mM)	166.8±22.3 (159.0±5.6)	101.9±14.9 (106.7±18.5)	216.7±23.3 (191.5±13.6)	37.5±11.4	40.5±5.4	94.3±9.4
RA (33 μM)	28.7±2.3 (33.1±9.3)	9.5±4.8 (9.6±4.7)	106.1±9.2 (107.3±5.0)	90.1±14.3	93.6±28.6	79.4±20.8

^{a)} AP activity was expressed as a percentage of the untreated control ; Mean±SD.

^{b)} Saturation density was expressed as a percentage of the untreated control ; Mean±SD.

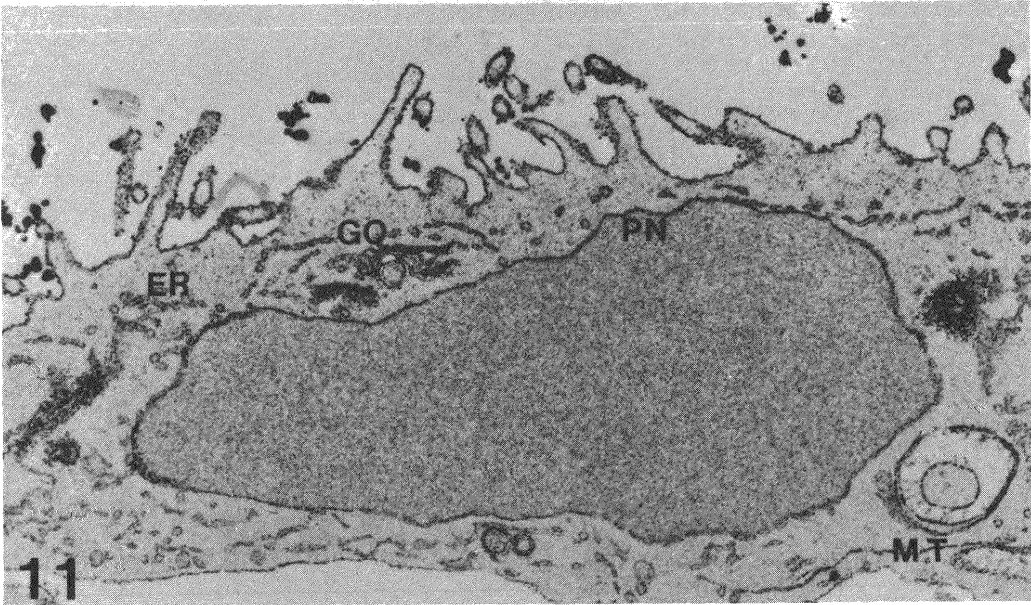
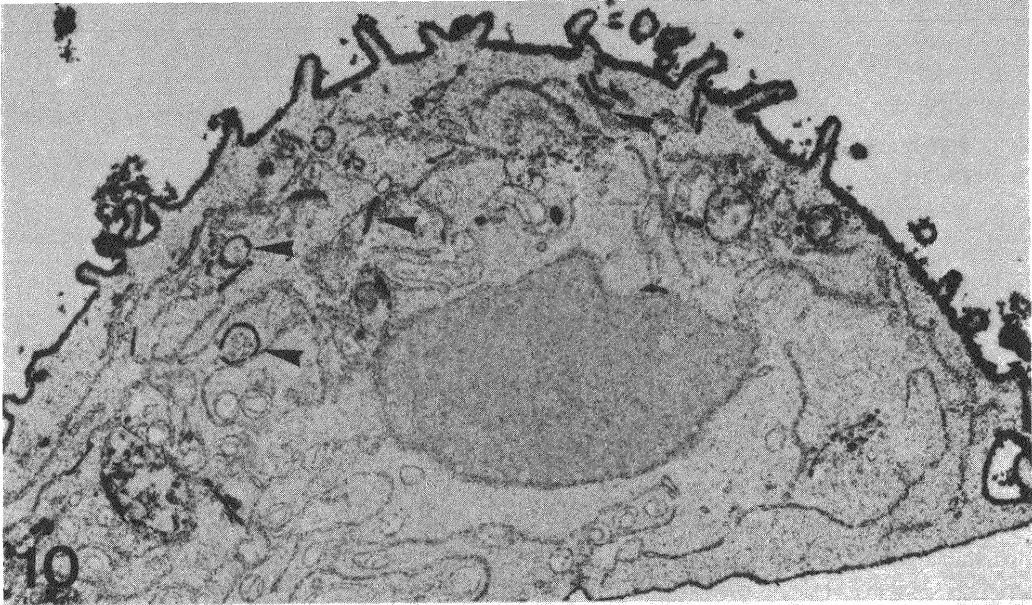


Fig. 10 Electron microscopic enzyme cytochemistry for AP in MKN7 cells treated by hydrocortisone (1 μ g/ml). The density and width of reaction products on the plasma membrane were increased. And small vesicles, rod-like and horseshoe-shaped structures (head of arrows) in the cytoplasm were also increased ($\times 7,000$).

Fig. 11 Electron microscopic enzyme cytochemistry for AP in SCH cells treated by hyperosmolality (NaCl 40mM). Intracellular reaction products such as the endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus (GO), mitochondria (MT) and perinuclear space (PN) were clearly observed without freezing and thawing steps ($\times 7,000$).

各種薬剤による全 AP 活性および HSAP 活性の変化を Table 3 に示した。高張液処理により3株の AP 活性は著明に上昇し、hydrocortisone は MNK 1 と MKN 7 の AP 活性を上昇させたが、SCH の AP 活性には全く影響を与えなかった。逆に、NaBT は SCH の AP 活性を中等度上昇させたが、MKN 1 と MKN 7 の AP 活性には影響を与えなかった。dbcAMP は SCH では 217% の上昇、MNK 1 では 167% の上昇をもたらしたが、MKN 7 では 102% とほとんど変化がなく、MKN 1 および MKN 7 群と SCH との間に一定の傾向を認めなかった。一方、RA は MKN 1 と MKN 7 の AP 活性を著明に低下させたが、SCH には変化を与えなかった。尚、HSAP 活性の変化も全て、全 AP 活性の変化とはほぼ同様であり、全 AP 活性の変化は、全て HSAP 活性の変化によるものと考えられた。

高張液処理は細胞の増殖を抑制する傾向を示したが、hydrocortisone, NaBT, dbcAMP は各々が AP 活性を上昇させた各細胞に対して、有意の増殖抑制効果を示さなかった。また、MKN 1 と MKN 7 の AP 活性を低下させた RA も、増殖には影響を与えなかった (Table 3)。

(2) 細胞内 AP 活性局在の変化

AP 活性を上昇させる処理により、いずれの細胞にも細胞膜、細胞内小器官に反応沈着部位の拡大と密度の増強がみられた。特に、MKN 1 と MKN 7 とでは細胞内に大小の桿状あるいは馬蹄形の反応産物の増加が顕著であった (Fig. 10)。

SCH では高張液あるいは dbcAMP 処理によって、凍結融解処理を加えずに細胞内小器官に AP 活性を容易に認めることができた (Fig. 11)。

一方、MKN 1 と MKN 7 の AP 活性を低下させた RA 処理では AP 陽性細胞の減少がみられ、また活性がみられても細胞膜のみで、細胞内小器官に陽性像を欠くものが多かった (Fig. 12)。

III. 考 察

アルカリホスファターゼ (AP) は、熱湯に近い温泉中に生息する細菌類からヒトの諸臓器に至るまで、ほぼ同程度の分子量と亜鉛含有蛋白であるなどの共通性をもって、広く存在しており¹⁴⁾、生命の維持に基本的な役割を果していることは想像に難くない。しかし、その生理学的意義についてはいまだほとんど解明されていない。PLAP についても、膜蛋白として物質の輸送、グリコゲンの合成あるいはヒストンの加水分解による遺伝子転

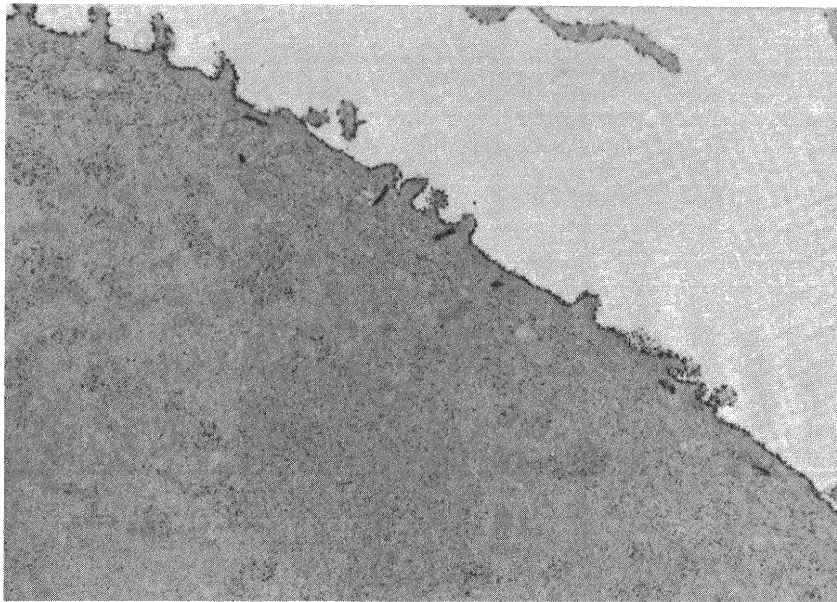


Fig. 12 Electron microscopic enzyme cytochemistry for AP in MKN 7 cells treated by RA (33 μ M). The reaction products were only on the plasma membrane. Intracellular reaction products were markedly decreased ($\times 10,000$).

写の調節などの機能を有することが推定されているにすぎない¹⁵⁾。ところが、完成された癌のみならず、発癌の過程において徐々に PLAP 類似の酵素が発現されてくることが Karasaki¹⁶⁾によって実験的に示されるにおよんで、この酵素と発癌機構との関係はより重要視されるようになった。

PLAP に類似した HSAP の代表的なものとして Regan isoenzyme と Nagao isoenzyme とがある。Regan isoenzyme は Fishman ら¹⁷⁾により肺扁平上皮癌患者の血清中に見いだされたもので、生化学的にも免疫学的にも PLAP と類似するものとして注目された。Nagao isoenzyme は、中山ら¹⁸⁾によって癌性胸膜炎患者の血清中に見いだされたもので、Regan isoenzyme によく似ているが、L-leucine および EDTA に対し、より高い感受性を示すということで区別された。これらはいずれも患者名から命名されたものである。

古典的な、耐熱性、L-phenylalanine, L-leucine および EDTA に対する感受性によって分けると、MKN 1 と MKN 7 の AP は Regan isoenzyme に相当し、SCH の AP は Nagao isoenzyme に相当する。

正常の PLAP も電気泳動により多くの型に細分類できることが知られている^{19) 20)}。デンプンゲル電気泳動では、基本的に S (slow), F (fast), および I (intermediate) の 3 型に分類でき、これらは全ての胎盤に共通してみられる²¹⁾。Regan isoenzyme は S 型のことが多いが、F あるいは FS のこともある²²⁾。正常胎盤においては、1,000 例に 1 例という非常に低い出現頻度ではあるが²³⁾、遅延型変種とも言うべき“D-variant”が存在し、Nagao isoenzyme はこれに相当するものといわれている²²⁾。さらに悪性腫瘍においては Regan isoenzyme と Nagao isoenzyme の比が 1 対 1 であると報告されているので²⁴⁾、腫瘍化によって“D-variant”の出現頻度が著しく高くなるものと推測される。

益沢²⁵⁾は、ポリアクリルアミドグラディエントゲルを用いることによって PLAP を 8 つの subband にまで分離することに成功している。それによれば、Regan isoenzyme は PLAP の slow band に一致し、Nagao isoenzyme はさらに陽極よりで幅の広い band として検出される。著者のポリアクリルアミドグラディエントゲルを用いた電気泳動でも、MKN 1 と MKN 7 とは PLAP の比較的 slow の位置に単一の band として泳動され、SCH は PLAP の main band よりさらに陽極よりに幅の広い band として泳動された。このことは、電気泳動的にも MKN 1 と MKN 7 と

は Regan isoenzyme に一致し、SCH は Nagao isoenzyme に一致することを示している。

AP が膜蛋白として強調されることがあったのは、細胞内の AP の局在部位を超微形態的に十分に観察できる方法が確立されていなかったためと考えられる。今日では、核内にも認められるという報告もあり²⁶⁾、著者の方法でも、細胞内小器官の多くに観察された。Tokumitsu ら²⁷⁾が HeLa TCRC-1 で示したように、今回の実験結果も Regan 型、Nagao 型を問わず、AP は他の分泌蛋白と同様に、粗面小胞体で合成され、Golgi 装置で修飾を受けた後、細胞膜へ移送されることを裏付けている。但し、ミトコンドリアにおける存在意義については今のところ不明である。種々の化学物質による AP 活性の誘導あるいは抑制実験も、活性をもった酵素蛋白が細胞内で既に合成されていることを示している。

高張液処理を除いて、種々の薬剤による AP 活性の上昇あるいは低下は、細胞の増殖には影響を与えなかった。このことは、今回用いた MKN 1, MKN 7 そして SCH と HSAP の間には少なくとも autocrine 的な意味合いはないと思われる。HSAP が広い意味での成長因子として働くか否かは、今後それなりの実験系によって確認する必要がある。

各種癌細胞の細胞膜における高 AP 活性の局在は、細胞の増殖および分化の調節、とくに未分化性の維持に関与していると推論されてきた^{16) 28)}。しかし、今回の実験では 3 株ともその AP 活性は、増殖初期から存在はするものの、増殖の時相に依存して高まり、特に対数増殖期後期から早期定常期にかけて著しい上昇を示した。このことは AP の産生が細胞の分化および成熟と関連している可能性が大であることを意味している。AP は、一方では未分化性の維持に働きながら、他方では分化抗原としての意味を持つという二律背反性を有するのかもしれない。このような性質は、癌胎児性抗原 (CEA) においても指摘されている²⁹⁾。

高張液処理による HSAP の誘導は、Fishman ら³⁰⁾によれば、DNA 合成が阻害されることにより、HSAP の合成が開始される S 期および G 1/S 期の細胞が蓄積されることによるとされているが、この説は細胞の増殖が抑制されることからもうなずける。しかし、hydrocortisone, Na BT, dbc AMP などは、各々の細胞に対して増殖を全く抑制することなく、AP 活性を高めている。通常、増殖期にある細胞と機能相にある細胞とは分けて考えられ、機能的表現を強制すると増殖は停止する。ところが AP に関しては、その活性を高めるという機

能の亢進があっても旺盛な増殖力は依然として維持されるという極めて特殊な性格があることが明らかとなった。

さて、MKN 1 と MKN 7 の AP, つまり Regan isoenzyme は hydrocortisone によってその活性が高められたが, SCH の Nagao isoenzyme では活性は高められなかった。この事実を従来との報告と対比して見ると, 次のような興味ある傾向がうかがわれた。すなわち, Regan isoenzyme を持つものは, 主として HeLa³⁰⁾, C4I³¹⁾, KB³²⁾, T24³³⁾ として MKN 1, MKN 7 といった non-trophoblastic cell であり, これらは hydrocortisone 等の glucocorticoid により AP 活性が誘導される。一方, Nagao isoenzyme を持つものは, 主として BeWo, Jar³⁴⁾, JEG-3³⁵⁾ として SCH といった trophoblastic cell であり, これらは glucocorticoid により AP 活性は誘導されない。

MKN 1 と MKN 7 の Regan isoenzyme は, RA によって著しく抑制されるが, SCH の Nagao isoenzyme は不変であった。既に直腸腺癌由来の HRT-18

では RA 処理によって AP が著明な低下をきたし³⁶⁾, また, 子宮頸部腺癌由来の HeLa 65 では glucocorticoid による AP の誘導が RA によって阻害されることが示されている³⁷⁾。すなわち, RA は non-trophoblastic cell の Regan isoenzyme の活性を抑制するが, trophoblastic cell の Nagao isoenzyme には影響を与えず, glucocorticoid と RA とは Regan isoenzyme に対しては全く逆の効果を持っている。また, RA は細胞膜表面の受容体と結合し, 複合体を形成し, これが核内に輸送されて遺伝子の発現を招来するという作用機序を考えると³⁸⁾, 細胞膜上にはこれら二つの物質と結合する共通の部分が存在することが示唆される。

NaBT は, AP の型を問わず活性を高めるようであるが^{39) 40) 41) 42)}, PLAP 類似のものにおいても, NaBT が HeLa, HRT-18, および BeWo の AP 活性を促進しえたこと報告されている^{36) 39) 43)}。しかしながら, 著者の実験では, SCH の Nagao isoenzyme は活性が

Table 4 Comparison of Inducibilities of Regan-like and Nagao-like Isoenzyme in Human Cancer Cell Lines

	Cell line	Origin	Modulators					References
			NaCl	Glucocorticoid	NaBT	dbcAMP	RA	
Regan-like isoenzyme	HeLa	Adenocarcinoma, uterine cervix	↑ ^{a)}	↑	↑	↑	(↓) ^{b)}	30)37)39)
	C 4 I	Squamous cell carcinoma, uterine cervix	↑	↑	→			31)41)
	KB	Epidermoid carcinoma, floor of the mouth	↑	↑				32)
	T24	Transitional cell carcinoma, urinary bladder	↑	↑				33)
	HRT-18	Adenocarcinoma, rectum			↑		↓	36)
Nagao-like isoenzyme	BeWo	Choriocarcinoma, uterus		→	↑	↑		34)43)44)
	JEG-3	Choriocarcinoma, uterus		→	↑	↑		35)40)44)
	Jar	Choriocarcinoma, uterus		→				34)
	A431	Epidermoid carcinoma	↑		↑			45)

^{a)} ↑, increased; ↓, decreased; →, unchanged.

^{b)} Inhibition of glucocorticoid mediated induction.

軽度促進されたが、MKN 1 と MKN 7 の Regan isoenzyme では活性の変化は認められなかった。また、他の trophoblastic cell において観察されたように SCH の Nagao isoenzyme は dbcAMP によって誘導されるが、MKN 1 と MKN 7 の Regan isoenzyme は、MKN 1 では軽度誘導、MKN 7 では不変というように一定の傾向を示さなかった。

以上、ヒト癌培養細胞によって産生される HSAP の諸性格を対比すると Table 4 のようになる。単に glucocorticoid あるいは RA に対する HSAP 活性の促進あるいは抑制の有無という面で見るときには、これらに対する受容体の多寡ということでも説明もできる³⁵⁾。しかし、生化学的な面でもかなりの違いがあること、かつ由来細胞の発生源地にも違いがあることなどから、Regan isoenzyme と Nagao isoenzyme との間には当初は想像もつかなかったほどの本質的な差異があるように思われる。幸いなことに、今回用いた 3 株の培養細胞は常に高活性の AP を産生している。これらを免疫原として Regan isoenzyme および Nagao isoenzyme に対する単クローン抗体を作製し、それにより mRNA を得、cDNA を作製していくことにより、遺伝子発現機序におけるこれらの差異を解明していかなければならないと考えている。

腫瘍化に伴う HSAP の再発現は種々の悪性腫瘍においてみられるが、これが発癌過程のマーカーとなりうるにもかかわらず、現在の測定系では癌の早期診断には有用とは思えず、今後、さらに鋭敏な radioimmunoassay 法の開発が望まれる。また、HSAP は細胞膜面に移送された後も膜と強い結合性を有し、このため血中に放出される量に比し、細胞自体が常に大量の AP を持っている。従って、癌細胞自体が持つ量よりも分泌される量がはるかに多い α -フェトプロテイン (AFP) などに比べてターゲット療法における標的抗原としての意義も極めて大きいと考えられる⁴⁶⁾。今後は MKN 1, MKN 7, SCH の 3 株を用い、ターゲット療法等治療面についての応用の可能性を追求することもさらなる課題である。

IV. 結 語

1. ヒト胃癌培養細胞 9 株のうち MKN 1, MKN 7, SCH の 3 株は HSAP を有し、各種アミノ酸および EDTA による阻害試験、電気泳動パターンから MKN 1 と MKN 7 の AP は Regan isoenzyme, SCH のそれは Nagao isoenzyme と考えられた。

2. 電顕的酵素細胞化学からみたこれら 3 株の AP 活

性の局在部位は主として細胞膜であったが、細胞内小器官の粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアおよび核膜周囲腔にもみられた。これら細胞内の AP 陽性像はこの酵素蛋白の生合成経路を示すものと考えられた。

3. これら 3 株の HSAP 活性は全て細胞の増殖の時に依存して高まり、AP の産生が細胞の分化および成熟と関連している可能性があることが示唆された。

4. 種々の化学物質を用いた HSAP の誘導実験の結果から、MKN 1 と MKN 7 の Regan isoenzyme、および SCH の Nagao isoenzyme の両者間の誘導性で共通点と相違点が明らかとなり、両者の isoenzyme の産生調節機構における差異が示唆された。

5. 本研究で対象とした 3 株は HSAP の高産生株であることから、鋭敏な radioimmunoassay 法の開発、ターゲット療法の基礎的検討などの免疫原として有用であるのみならず、発癌過程と異常形質の発現機構の解明にも貴重な資料を与えてくれることが期待される。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました新潟大学医学部第一外科武藤輝一教授ならびに第一病理渡辺英伸教授に深謝いたします。また、本研究において、直接御指導、御教示をいただいた新潟大学医学部第一病理本山梯一講師、附属病院中央検査部・杉田収講師、桑名友美先生に心より謝意を表します。最後に、種々御協力いただいた新潟大学医学部第一外科学教室と第一病理学教室の技術員の方に厚く御礼申し上げます。

(本論文の要旨の一部は第74回日本病理学会総会、第44回日本癌学会総会、第19回日本臨床電子顕微鏡学会総会にて発表した。)

略 語 表

AP:	alkaline phosphatase
HSAP:	heat-stable alkaline phosphatase
PLAP:	placental alkaline phosphatase
EDTA:	ethylenediamine tetraacetic acid, disodium
NaBT:	sodium butyrate
dbcAMP:	N ⁶ , O ^{2'} -dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate
RA:	retinoic acid

参 考 文 献

- 1) Miki, K., Oda, T., Suzuki, H., Iino, S. and Niwa, H.: Alkaline phosphatase isoenzymes in intestinal metaplasia and carcinoma of the stomach. *Cancer Res.*, **36**: 4266~4268, 1976.
- 2) Takagi, K., Maeno, M., Misumi, A. and Akagi, M.: Studies on alkaline phosphatase isoenzyme in gastric carcinoma tissues. *Gastroenterol. Jap.*, **16**: 110~121, 1981.
- 3) 宮山東彦, 宮山幸彦: 胎児消化管の発生と対比したヒト胃癌・腸癌の形質発現 (α -FP, CEA, hCG plac. A1-P) の免疫組織化学的検討, 病理と臨床, **3**: 905~915, 1985.
- 4) 北條晴人: ヒト胃癌細胞培養株の樹立とその形態学的特性, 新潟医学会誌, **91**: 737~763, 1977.
- 5) Sekiguchi, M., Sakakibara, K. and Fujii, G.: Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn. J. Exp. Med.*, **48**: 61~68, 1978.
- 6) 大星章一, 吉田紘一, 清藤 勉, 下里幸雄, 小出勉, 佐野量造, 北岡久三: 胃悪性絨毛上皮腫細胞培養株の樹立とその *in vitro* ゴナドトロピン産生, 第31回日本癌学会総会記事, p. 59, 1972.
- 7) Motoyama, T., Hojo, H. and Watanabe, H.: Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol. Jpn.*, **36**: 65~83, 1986.
- 8) Burstone, M.S.: Histochemical comparison of Naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J. Natl. Cancer Inst.*, **20**: 601~615, 1958.
- 9) Jensen, H., Lyngbye, J. and Davidsen, S.: Histochemical investigation of the thermostable alkaline phosphatase in the normal full-term placenta. *Acta obst. et gynec. Scandinav.*, **47**: 436~442, 1968.
- 10) Watanabe, K. and Fishman, W.H.: Application of the stereospecific inhibitor L-phenylalanine to the enzymorphology of intestinal alkaline phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 252~260, 1964.
- 11) Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Ogawa, K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). *Histochemie*, **11**: 88~96, 1967.
- 12) 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.
- 13) Posen, S., Neale, F.C. and Clubb, J.S.: Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases. *Ann. Int. Med.*, **62**: 1234~1243, 1965.
- 14) 馬屋原宏: 7.2 Phosphatase, 新酵素組織化学, pp. 267~290, 朝倉書店 (東京), 1980.
- 15) Huang, K.P., Robinson, J.C. and Chou, J.Y.: Phosphoprotein-phosphatase activity associated with human placental alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**: 186~192, 1976.
- 16) Karasaki, S.: Cell proliferation and subcellular localization of alkaline phosphatase activity in rat liver parenchyma during azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.*, **35**: 482~491, 1975.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Boyer, S.H.: Alkaline phosphatase in human sera and placentae. *Science*, **134**: 1002~1004, 1961.
- 20) Harris, H., Hopkinson, D.A. and Robson, E.B.: The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man. *Ann. Hum. Genet.*, **37**: 237~253, 1974.
- 21) Robson, E.B. and Harris, H.: Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of

- the human placenta. *Nature*, **207**: 1257~1259, 1965.
- 22) **Inglis, N.R., Kirley, S., Stolbach, L.L. and Fishman, W.H.**: Phenotypes of the Regan isoenzyme and identity between the placental D-variant and the Nagao isoenzyme. *Cancer Res.*, **33**: 1657~1661, 1973.
- 23) **Beckman, L. and Beckman, G.**: A genetic variant of placental alkaline phosphatase with unusual electrophoretic properties. *Acta Genet., Basel*, **18**: 543~552, 1968.
- 24) **Nakayama, T. and Kitamura, M.**: L-Leucine sensitive alkaline phosphatase isozyme from cancer tissue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **259**: 325~336, 1975.
- 25) **益沢 学**: 癌性アルカリフォスファターゼアイソザイムの電気泳動法的研究, *生物物理化学*, **21**: 5~10, 1977.
- 26) **吉田 豊, 服部淳夫, 金子愛子, 森 道夫**: アルカリフォスファターゼに対する単クローン抗体により検出される核内抗原の免疫組織化学的検討とその意義, *日本病理学会会誌*, **74**: 138~139, 1985.
- 27) **Tokumitsu, S. and Fishman, W.H.**: Alkaline phosphatase biosynthesis in the endoplasmic reticulum and its transport through the Golgi apparatus to the plasma membrane: cytochemical evidence. *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 647~655, 1983.
- 28) **Bernstine, E.G., Hooper, M.L., Grandchamp, S. and Ephrussi, B.**: Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 3899~3903, 1973.
- 29) **Motoyama, T. and Watanabe, H.**: Carcinoembryonic antigen production in human gastric cancer cell lines in vitro and in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **74**: 679~686, 1983.
- 30) **Fishman, W.H. and Singer, R.M.**: Placental alkaline phosphatase: regulation of expression in cancer cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **259**: 261~272, 1975.
- 31) **Herz, F., Miller, O.J., Miller, D.A., Auer-sperg, N. and Koss, L.G.**: Chromosome analysis and alkaline phosphatase of C41, a cell line of human cervical origin distinct from HeLa. *Cancer Res.*, **37**: 3209~3213, 1977.
- 32) **Singer, R.M. and Herz, F.**: Multiple effects of glucocorticoids and hyperosmolality on isoenzyme expression in cultured KB cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**: 573~577, 1978.
- 33) **Herz, F. and Koss, L.G.**: Alkaline phosphatase activity in cultured urinary bladder cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**: 30~36, 1979.
- 34) **Speeg, Jr., K.V., Azizkhan, J.C. and Stromberg, K.**: Characteristics of alkaline phosphatase from two continuous lines of human choriocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, **105**: 199~205, 1977.
- 35) **Speeg, Jr., K.V. and Harrison, R.W.**: The ontogeny of the human placental glucocorticoid receptor and inducibility of heat-stable alkaline phosphatase. *Endocrinol.*, **104**: 1364~1368, 1979.
- 36) **Tsao, D., Morita, A., Bella, Jr., A., Luu, P. and Kim, Y.S.**: Differential effects of sodium butyrate, dimethyl sulfoxide, and retinoic acid on membrane-associated antigen, enzymes, and glycoproteins of human rectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, **42**: 1052~1058, 1982.
- 37) **Griffin, M.J. and Cama, H.R.**: Vitamin A inhibition of cortisol induction of HeLa alkaline phosphatase. *Nature*, **228**: 762~763, 1970.
- 37) **Lotan, R.**: Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **605**: 33~91, 1980.
- 39) **Griffin, M.J., Price, G.H., Bazzell, K.L., Cox, R.P. and Ghosh, N.K.**: A study of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate, sodium butyrate and cortisol as inducers of HeLa alkaline phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**: 619~623, 1974.
- 40) **Chou, J.Y.**: Regulation of the induction of alkaline phosphatase in choriocarcinoma cells by sodium butyrate. *In Vitro*, **15**: 789~795,

- 1979.
- 41) Herz, F., Schermer, A., Halwer, M. and Bogart, L.H.: Alkaline phosphatase in HT-29, a human colon cancer cell line: influence of sodium butyrate and hyperosmolality. *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**: 581~591, 1981.
- 42) Takahara, N., Herz, F., Singer, R.M., Hirano, A. and Koss, L.G.: Induction of alkaline phosphatase activity in cultured human intracranial tumor cells. *Cancer Res.*, **42**: 563~568, 1982.
- 43) Speeg, Jr., K.V., Azizkhan, J.C. and Stromberg, K.: Modulation studies of alkaline phosphatase in human choriocarcinoma cells. *Scand. J. Immunol.*, **8**: 527~532, 1978.
- 44) Hamilton, T.A., Tin, A.W. and Sussman, H.H.: Regulation of alkaline phosphatase expression in human choriocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 323~327, 1979.
- 45) Jemmerson, R., Shah, N., Takeya, M. and Fishman, W.H.: Characterization of the placental alkaline phosphatase-like (Nagao) isozyme on the surface of A431 human epidermoid carcinoma cells. *Cancer Res.*, **45**: 282~287, 1985.
- 46) Tsukazaki, K., Hayman, E.G. and Ruoslahti, E.: Effects of ricin A chain conjugates of monoclonal antibodies to human α -fetoprotein and placental alkaline phosphatase on antigen-producing tumor cells in culture. *Cancer Res.*, **45**: 1834~1838, 1985.

(昭和62年9月29日受付)
