

氏名 佐久間 陽 子  
 学位(専攻分野) 博士 (医学)  
 学位記番号 医博第2237号  
 学位授与の日付 平成12年3月23日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
 研究科・専攻 医学研究科内科系専攻  
 学位論文題目 Crucial involvement of the EP 4 subtype of prostaglandin E (PGE) receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide  
 (炎症性サイトカインおよびリポポリサッカライドによる破骨細胞形成過程におけるプロスタグランジンE受容体EP4サブタイプの意義)

論文調査委員 (主査) 教授 中村孝志 教授 開 祐司 教授 中尾一和

### 論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) は骨における重要な局所因子であり、骨吸収・骨形成作用が報告されてきた。最近、マウス PGE 受容体に4つのサブタイプがクローニングされ、EP1はカルシウム動員、EP2とEP4はアデニル酸シクラーゼ刺激、EP3には3つのアイソフォーム  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  があり主にアデニル酸シクラーゼ抑制、という各々異なったセカンドメッセンジャーを介することが証明されている。

本研究では、PGE<sub>2</sub> および炎症性骨吸収に関与が示唆されるインターロイキン-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic FGF)、リポポリサッカライド (LPS) による破骨細胞形成作用の分子機構の解明を目的とした。破骨細胞形成を *in vitro* で再現できるマウス骨芽細胞/骨髄細胞(一部の試験では脾細胞)の共存培養系及び受容体欠損マウス (EP4-k/o) を用いて、これらの物質がどの PGE 受容体サブタイプを介して破骨細胞形成作用を促進するかを検討した。

共存培養系において、EP4/EP2 アゴニストである 11-deoxy PGE1 は他のアゴニストと比べてはるかに強力に破骨細胞形成を促進した。EP2 アゴニストである butaprost は少量の破骨細胞を形成した。骨芽細胞は EP1, EP2, EP3 $\alpha$ , EP3 $\beta$ , EP4 遺伝子を発現しており、胎生16日齢のマウスの椎骨と尾に EP4 遺伝子の発現を認めた。以上より、PGE<sub>2</sub> による破骨細胞形成において EP4 が最も重要であり、EP2 はわずかに関与することが示唆された。EP4-k/o の解析を行ったところ、EP4-k/o は形態学的異常は認めず、EP4 受容体は正常な状態では骨の機能において必須ではないことを示した。次に PGE<sub>2</sub> の産生が増加する病態における EP4 受容体の作用を検討した。PGE<sub>2</sub> を wild type マウス (w/t) の共存培養系に添加すると破骨細胞形成を強く促進したが、EP4-k/o の共存培養系においてはほとんど破骨細胞を形成しなかった。この結果、PGE<sub>2</sub> は EP4 受容体を介して破骨細胞形成を促進することが明らかになった。次に PGE<sub>2</sub> は骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞(骨髄細胞に含まれる)のどちらを介して作用するのかを検討するために、破骨細胞前駆細胞のみを含み骨芽細胞系の細胞を含まない脾細胞と、骨芽細胞との共存培養系に PGE<sub>2</sub> を添加した。PGE<sub>2</sub> は EP4-k/o 由来の脾細胞を用いた共存培養系では破骨細胞形成を促進したが、EP4-k/o 由来の骨芽細胞を用いた共存培養系では破骨細胞をほとんど形成せず、このことは PGE<sub>2</sub> が骨芽細胞上の EP4 受容体を介して破骨細胞形成作用を及ぼすことを示した。更に IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , basic FGF, LPS も、w/t の共存培養系では破骨細胞形成を強く促進したが、EP4-k/o の共存培養系においてはほとんど破骨細胞を形成しなかった。これらの物質はその破骨細胞形成作用をプロスタグランジン G/H 合成酵素 (PGHS) 阻害剤であるインドメタシンによってほぼ完全に抑制された。IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , basic FGF, LPS は骨芽細胞に PGHS-2 の遺伝子を誘導することにより PG 産生を増加させ、産生された PGE<sub>2</sub> が骨芽細胞上の EP4 受容体を介して破骨細胞形成作用を促進するという機

構が示唆された。

本研究は、PGE<sub>2</sub> 及び IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , basic FGF, LPS の破骨細胞形成作用を解明し、これらの物質による骨吸収作用における EP 4 受容体の重要性を初めて明らかにしたものである。

#### 論文審査の結果の要旨

従来、PGE<sub>2</sub> の骨吸収作用は報告されていたが、どの PGE 受容体サブタイプを介するかは不明であった。また、炎症性サイトカイン、リポポリサッカライド (LPS) による骨吸収作用に PG の関与が示唆されていたが、従来の報告は阻害剤を用いた間接的な実験によるもので、関与の程度について一定した見解がなかった。

本研究において、受容体の面から PGE<sub>2</sub> の作用を検討した。PGE<sub>2</sub> の破骨細胞形成過程を介する PGE 受容体サブタイプの決定と、炎症性サイトカイン、LPS による破骨細胞形成過程における EP 4 受容体の意義の解明を目的に、破骨細胞形成を *in vitro* で再現できるマウス共存培養系及び受容体欠損マウス (EP 4-k/o) を用いて検討した。

EP 4-k/o 由来細胞を用いた共存培養系により、PGE<sub>2</sub> は骨芽細胞上の EP 4 受容体を介して破骨細胞形成作用を及ぼすことが明らかになった。LPS, インターロイキン-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), 腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basicFGF) は、骨芽細胞に PGHS-2 遺伝子を誘導し、産生された PGE<sub>2</sub> が骨芽細胞上の EP 4 受容体を介して破骨細胞形成作用を促進するという機構が示唆された。

本研究は、炎症性サイトカイン、LPS による破骨細胞形成はほぼ 100% PGE<sub>2</sub> 依存性であり、その過程は主に EP 4 受容体を介することを初めて明らかにしたものである。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。