

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ディン E 受容体 EP 4 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

プロスタグランディン (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、EP 1 はカルシウム動員、EP 2 と EP 4 はアデニル酸シクラーゼ刺激、EP 3 には 3 つのアイソフォーム α , β , γ 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、PGE₂ 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 α (IL-1 α)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、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 (一部の実験では脾細胞) の共存培養系及び受容体欠損マウス (EP 4-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、EP 4/EP 2 アゴニストである 11-deoxy PGE 1 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。EP 2 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, EP 3 α , EP 3 β , EP 4 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 EP 4 遺伝子の発現を認めた。以上より、PGE₂ による破骨細胞形成において EP 4 が最も重要であり、EP 2 はわずかに関与することが示唆された。EP 4-k/o の解析を行ったところ、EP 4-k/o は形態学的異常は認めず、EP 4 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 PGE₂ の産生が増加する病態における EP 4 受容体の作用を検討した。PGE₂ 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、EP 4-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、PGE₂ は EP 4 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 PGE₂ 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 PGE₂ を添加した。PGE₂ は EP 4-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、EP 4-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 PGE₂ 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及ぼすことを示した。更に IL-1 α , TNF α , 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、EP 4-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ディン 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 α , TNF α , 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 PGE₂ 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、 PGE_2 及び $\text{IL-1}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$, 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_2 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_2 の作用を検討した。 PGE_2 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_2 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- 1α ($\text{IL-1}\alpha$), 腫瘍壊死因子- α ($\text{TNF}\alpha$), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic FGF) は、骨芽細胞に PGHS-2 遺伝子を誘導し、産生された PGE_2 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_2 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。