

氏 名	みやもと まさとも 宮 本 雅 友
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2699 号
学位授与の日付	平 成 16 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 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E ₂ in chondrocyte differentiation. (Prostaglandin E ₂ の成長軟骨細胞における分化促進作用はEP2とEP4の2種類のレセプターを同時に介している)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 井 出 千 束 教 授 中 村 孝 志

論 文 内 容 の 要 旨

Prostaglandin E₂ (PGE₂) は全身のあらゆる組織で様々な生理的・病理的条件下で生成され、多種多様な生体調節作用を有しており、軟骨細胞においてはその分化を促進する効果があることは知られていた。しかし、その作用が4種類報告されているEP1～EP4のどのレセプターを介し、どのような細胞内シグナルにて伝達されているかは明らかにされてない。そこでこの研究ではPGE₂の軟骨分化促進効果を確認し、それがEP1～EP4のどのレセプターが関与しているかを、各レセプターにそれぞれ特異的なagonistを用いて調査した。生後5週齢 Wistar rat の肋軟骨・骨移行部から成長骨細胞を分離してplateに播種し、DMEM/F12培養液に10% FBS, アスコルビン酸 (50ug/ml) を添加して培養した。細胞がconfluentに達してから、PGE₂, cAMP およびEP1～EP4の各agonistを加え、6日の培養後に Alcian Blue 染色を行い、proteoglycanの蓄積量を定量した。また、同様に試薬を加えて2日の培養後RNAを調整し、northern blot にて Type II collagen のmRNAの発現を調査した。また、RT-PCR法にて、この細胞においての各レセプターの発現の有無を調査した。

成長軟骨細胞において、Proteoglycanの蓄積量および Type II collagen mRNA の発現を用量依存性に促進することより、PGE₂には分化促進効果があることを確認した。またEP2とEP4の細胞内伝達物質であるcAMPにも、高濃度において同様に分化促進効果のあることを確認した。ここでRT-PCR法にて、この成長軟骨細胞での各レセプターの発現の有無を調査したところ、EP2とEP4とともにEP1のレセプターの発現は確認できたが、EP3レセプターの発現は確認できなかった。EP1～EP4の各agonist単独では、PGE₂やcAMPでみられたような分化促進効果は確認出来なかったが、EP2とEP4の2つのagonistを同時に加えることにより、Type II collagen mRNA の発現とproteoglycanの産生は促進された。他の2つのagonistのそれ以外のすべての組み合わせを調査したが、同様の効果は確認出来なかった。また細胞内cAMPの濃度を測定したところ、EP2, EP4の2つのagonistを同時に加えることにより、相加的な濃度上昇がみられた。さらに、EP4 antagonist はPGE₂の Type II collagen mRNA の発現促進作用を抑制することを確認した。

以上のことより、PGE₂の軟骨分化促進作用はcAMPをその細胞内伝達物質としており、EP2かEP4もしくはその両方のレセプターを介していると推測した。さらにEP2とEP4の同時の刺激でみられた軟骨分化促進効果がEP2及びEP4単独の刺激では確認できなかったことにより、軟骨分化促進にはEP2とEP4の2種類のレセプターの同時刺激とそれによる充分なcAMP濃度上昇が必要であると結論づけた。

PGE₂は炎症などの病的な状態で機能すると考えた場合、変形性関節症に伴う骨棘形成や異所性骨化など、PGE₂が関与している endochondral bone formation が病的に亢進した状態において、選択的 antagonist を用いて抑制出来る可能性があると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

軟骨骨性骨化において、軟骨分化過程は次第に明らかになりつつあるが、詳しい制御機構は未だ不明である。また、

Prostaglandin E₂ (PGE₂) は、軟骨の分化促進効果があることは知られていたが、成長軟骨においての、その作用を介するレセプター (EP1～EP4) および細胞内シグナル伝達経路は不明である。今回 rat から成長軟骨細胞を採取、培養して調べると、PGE₂と同様に EP2 と EP4 の細胞内伝達物質である cAMP にて、軟骨分化が促進された。EP1～EP4 の各 agonist 単独では確認出来なかった分化促進効果が、EP2, EP4 の 2 つの agonist を同時に加えることによってのみ得られた。この細胞でのこれらのレセプターの存在を RT-PCR にて確認した。またこの 2 つの agonist の同時添加により、相加的な細胞内 cAMP 濃度上昇がみられた。さらに、EP4 antagonist は PGE₂ の軟骨分化促進作用を抑制した。以上より、PGE₂ の軟骨分化促進作用は cAMP を介しており、それには EP2 と EP4 の 2 種のレセプターの同時刺激とそれによる十分な細胞内 cAMP 濃度上昇が必要であると結論づけた。以上の研究結果は PGE₂ の軟骨分化促進効果の細胞内シグナル伝達機構を明らかにしただけでなく、今後 PGE₂ 受容体選択的 agonist や antagonist を用いた臨床応用を発展させる上で重要であると考えられる。

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16年2月2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。