

|             |                                                                                                                                                    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | よし だ けい じ<br>吉 田 圭 二                                                                                                                               |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                          |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2519 号                                                                                                                                       |
| 学位授与の日付     | 平 成 14 年 5 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 | Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation<br>(プロスタグランジン E 受容体 EP4 の活性化による骨形成の促進と骨減少の予防) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 開 祐 司 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 中 村 孝 志                                                                                                         |

### 論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) はアラキドン酸から作られる一群の脂質メディエーターで、様々な組織で様々な生理的・病理的条件下で生成され、局所のホメオスタシスを維持している。PG のなかでも E のタイプは骨吸収・骨形成の両方を促進する。PGE<sub>2</sub> は骨の組織培養で骨吸収を促進するが、ヒトを含む動物の生体内に反復してあるいは持続的に投与すると骨形成を促進することが分かった。しかし、PGE<sub>2</sub> を骨減少に対する治療薬として全身投与することは種々の副作用のために困難であった。また、PGE<sub>2</sub> の持つ骨形成促進作用の機序はこれまで殆ど明らかにされていなかった。

PGE<sub>2</sub> は細胞膜表面にある特異的な受容体 (EP) を介してその効果を発揮する。EP には 4 つのサブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) が同定されている。これらはすべて個別の遺伝子にコードされ、独自に発現する。そこで各 EP サブタイプを欠くマウスを作成した。また、各 EP サブタイプに選択的なアゴニストを合成した。これらを用いて PGE<sub>2</sub> の骨形成促進作用がどの EP サブタイプを介しているかについて調べた。

野生型マウスに小型の浸透圧ポンプを埋め込み大腿骨表面に PGE<sub>2</sub> を持続的に投与した。骨表面には新生骨の旺盛な増生が見られ、その体積は PGE<sub>2</sub> による容量依存性を認めた。各 EP サブタイプ欠損マウスに PGE<sub>2</sub> を同様に投与すると、EP1, EP2, EP3 の各欠損マウスは野生型と同様に容量依存性に新生骨の増加を認めたが、EP4 欠損マウスのみは PGE<sub>2</sub> に反応しなかった。一方、野生型マウスに各 EP サブタイプに選択的なアゴニストを同様に投与すると、EP4 アゴニストのみが容量依存性に新生骨の増生を示した。以上から PGE<sub>2</sub> の持つ骨形成促進作用は EP4 サブタイプを介する事が示された。

野生型マウス・EP4 欠損マウスの骨髓細胞を培養し、カルシウム沈着した骨基質量を測定した。野生型マウスでは PGE<sub>2</sub> により濃度依存性に増加したが、EP4 欠損マウスでは殆ど骨基質は産生されず PGE<sub>2</sub> による増加も見られなかった。各 EP アゴニストを野生型マウスの骨髓細胞に加えると、EP4 アゴニストのみが骨基質の増加を示した。

骨芽細胞の分化に必須の転写因子とされる Runx2/Cbfa1 (runt-related gene 2/core-binding factor α1) の発現をこの培養系で調べると、野生型マウスの細胞では PGE<sub>2</sub> による発現の増加を認めたが、EP4 欠損マウスの細胞にはその効果は無かった。また、Runx2/Cbfa1 陽性細胞の数は PGE<sub>2</sub> により有意に増加しており、このことは PGE<sub>2</sub> が骨芽細胞の分化を促進することを示唆している。

また、卵巣摘出ラットや神経切除により不動化したラットに EP4 アゴニストを投与すると、骨減少や骨の脆弱化を予防することができた。骨を形態計測すると、海面骨体積・類骨形成・骨芽細胞数の増加が見られ、EP4 アゴニストが骨形成を促進していることが示された。一方、破骨細胞の密度は対照と同じ程度であった。

以上の結果から、EP4 を刺激すると生体内で骨形成を促進することが示唆され、その選択的なアゴニストは骨粗鬆症の治療などに有用である可能性があると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン (PG) の中でも  $\text{PGE}_2$  は骨吸収・骨形成の両方を促進することが知られている。しかし、その機序はこれまで殆ど明らかにされていなかった。

$\text{PGE}_2$  は特異的な受容体 (EP) を介してその効果を発揮し、EP には4つのサブタイプ (EP1, 2, 3, 4) が同定されている。そこで各 EP サブタイプを欠くマウスと、各 EP サブタイプに選択的なアゴニストを用いて、 $\text{PGE}_2$  の骨形成促進作用がどの EP サブタイプを介しているかについて調べた。

in vivo でも in vitro でも、野生型マウスと EP4 以外の各サブタイプ欠損マウスは  $\text{PGE}_2$  により骨の増生を認めたが、EP4 欠損マウスのみは  $\text{PGE}_2$  に反応しなかった。一方、各 EP アゴニストの中で EP4 アゴニストのみが野生型に対して骨の増生を示した。これは  $\text{PGE}_2$  の骨形成促進作用が EP4 を介することを示す。

野生型の細胞では  $\text{PGE}_2$  による Runx2/Cbfa1 の発現の増加を認めたが、EP4 欠損マウスの細胞にはその効果は無かった。また、Runx2/Cbfa1 陽性細胞の数は  $\text{PGE}_2$  により有意に増加しており、このことは  $\text{PGE}_2$  が骨芽細胞の分化を促進することを示唆している。

また、卵巣摘出ラットや不動化モデルラットに EP4 アゴニストを投与すると、骨減少や骨の脆弱化を予防した。骨形態計測では、骨新生の増加が見られた。

以上の研究は、 $\text{PGE}_2$  の EP4 を介する骨形成促進作用の機序の一端を解明し、EP4 アゴニストの生体内での効果を明らかにした点で意義深く、骨粗鬆症などの治療薬の開発に寄与するところ大である。

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14年4月26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。