

論文内容の要旨

論文題目 プロスタグランジン E₂ 合成酵素の発現調節と骨吸収への関与

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 三枝正朋

本研究は、骨代謝において重要な役割を果たしていることが以前より知られている prostaglandin E₂ (PGE₂)の産生過程における最終段階で作用する酵素、prostaglandin E₂ synthase (PGES)の骨における発現及び役割について研究を行い、骨代謝疾患治療への可能性について検討した。

もともとプロスタノイドは多岐にわたる生理活性を有しており、発熱や疼痛、炎症、腫瘍形成、胃腸保護、脈管循環、そして骨代謝において重要な役割を演じている。このプロスタノイドの中で、PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂が、骨芽細胞系細胞から産生され、骨に蓄積していることが知られている。そして、これらのプロスタノイドは骨形成と骨吸収においてさまざまな役割を担っている。しかし、プロスタノイドの主な役割は、PGE₂が cyclic AMP を増加させ、rat の長管骨の培養において骨吸収を促進することが30年以上前に証明されてから、骨吸収因子として認識されてきた。骨吸収に関与するサイトカインや全身性ホルモンはまた、骨においてこのプロスタノイドの産生を調節している。サイトカインやホルモンによる骨吸収反応がしばしばプロスタノイド産生をブロックする非ステロイド抗炎症薬により抑制されることから、少なくとも部分的にプロスタノイドと関係していると考えられる。動物や人間での *in vivo* の研究から、閉経後の骨粗鬆症や、悪性腫瘍の高カルシウム血症、歯周病での炎症性骨減少、人工関節のゆるみ、関節リウマチでの関節破壊の骨吸収性病態はプロスタノイドに関連することが示されている。

PGE₂ はプロスタノイドのなかで骨に最も豊富に含まれ、そして最も強い骨吸収因子と信じられてきた。PGE₂ は autocrine/paracrine メカニズムを介して receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) を誘導することで骨吸収を亢進させ、また血球系幹細胞から破骨細胞の分化を引き起こす。PGI₂ は次に多く骨に含まれるが、骨吸収反応には重要な因子とは考えられていない。骨細胞から少量の PGF_{2α}が産生されており、外因性 PGF_{2α}が骨吸収を促進するが、この反応は内因性 PGE₂ 産生増加によるものと考えられている。この研究から、2つのマウスのアッセイシステムを使って包括的比較実験を行い、骨に蓄積するプロスタノイドの中で PGE₂ のみが破骨細胞形成と骨吸収を促進することを確かめた。

このプロスタノイドはアラキドン酸カスケードにより産生される。まず、phospholipase A₂

により、膜リン脂質からアラキドン酸が産生される。このアラキドン酸から PGE₂ が産生されるが、この際、さらに2つの酵素反応により調節されている。最初の反応は cyclooxygenase (COX) によって引き起こされるが、これはアラキドン酸を中間産物である PGH₂ に変える。今までに2つの COX の isoform が同定されている。それらは恒常的に発現している COX-1 と、サイトカインやホルモン、lipopolysaccharide などのさまざまな刺激により誘導される COX-2 である。次の反応は最終段階となる PGH₂ を PGE₂ に変える PGE₂ synthase (PGES) により引き起こされる。近年、2つの PGES、cytosolic PGES と membrane-associated PGES が同定された。heat shock protein 90-associated protein p23 と同一の cytosolic PGES (cPGES) は普遍的に発現しており、さまざまな種類の細胞や組織で炎症性刺激による発現の変化は見られず、COX-1 を介した PGE₂ の急性産生に関与している。この COX-1 と cPGES のカップリングは組織の恒常性を保つための PGE₂ 産生に関与しているものと思われる。一方、本来 microsomal glutathione S-transferase 1-like 1 (MGST1-L1) と呼ばれていた membrane-associated PGES (mPGES) は誘導される酵素で、核膜周辺に COX-2 とともに誘導され、mPGES は COX-1 よりも COX-2 と強く機能連関している。mPGES は様々な組織や細胞で前炎症性刺激により COX-2 やそれに続く PGE₂ 産生に伴って発現誘導され、デキサメタゾンで抑制された。ゆえに COX-2 と mPGES は炎症や発熱、ガンなどの病的状態における PGE₂ 産生と関連していると考えられる。

COX-2 は骨芽細胞に豊富に発現しており、さまざまな骨吸収刺激に反応して産生される PGE₂ に重要な役割を担っていると報告されている。マウスの co-culture において、破骨細胞形成は COX-2 ノックアウトマウスでは wild type と比較して抑制されており、外因性 PGE₂ によりこの抑制は解除された。interleukin-1 α (IL-1 α)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) などのサイトカインや、閉経後骨粗鬆症、関節リウマチなどにより COX-2 が誘導され、それに続き PGE₂ が産生されることも示されている。この研究で、これらの骨吸収性サイトカインによる mPGES の発現調節を *in vivo*、*in vitro* で調べた。他の組織のホメオスタシスへの悪影響が少ない、骨吸収性病態への高度選択的薬剤としての可能性を調べるため、mPGES に対する antisense oligonucleotide を使い内因性 mPGES と骨吸収との関係を調べた。

まず初めに、どのプロスタノイドが破骨細胞形成と骨吸収を起こすかを、マウス骨芽細胞と骨髄細胞による共存培養下での TRAP 陽性多核破骨細胞数を計数することと、dentine slice 上での骨吸収窩の面積を計測することで検討した。PGE₂ は用量依存的に破骨細胞形成を起こし、1,25(OH)₂D₃ と同程度の作用となった。一方、骨に存在する他のプロスタノイド PGF_{2 α} 、PGI₂ はほとんど影響を及ぼさなかった。共存培養により形成された破骨細胞を dentine slice 上に移しこれらのプロスタノイドとさらに培養したところ、PGE₂ のみが吸収窩形成能を示した。PGF_{2 α} もわずかな破骨細胞形成能と吸収窩形成能を示したが、有意なものではな

かった。これらの結果から、骨に存在するプロスタノイドの中で、PGE₂のみが破骨細胞性骨吸収を促すことが示された。

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 への IL-1 α 、TNF- α 、FGF-2 などの骨吸収性サイトカイン刺激による mPGES の RNA 発現を調べたところ、IL-1 α 、TNF- α により mPGES が刺激3時間後から発現誘導され、FGF-2 により刺激6時間後から発現誘導された。COX-2 に関しても同様な発現パターンを示した。

マウス初代骨芽細胞への IL-1 α 、TNF- α 、FGF-2 による mPGES と cPGES の発現誘導を調べたところ、IL-1 α 、TNF- α による mPGES の mRNA 発現誘導は1-2時間後に見られ、3時間後にピークに達し、その後減少した。FGF-2 による mPGES の mRNA 発現誘導は3-6時間後に見られ、48時間まで増加した。この mPGES のタイムコースは COX-2 の発現誘導と同様であった。mPGES のタンパクは骨吸収性サイトカインにより、6-12時間後に発現誘導が見られ、48時間まで増加した。mPGES とは対照的に、cPGES の mRNA とタンパクはこれらの刺激により影響を受けず、恒常的に発現していた。一方、COX-2 のタンパクレベルは3時間後に増加し、12時間後から減少した。

マウスに LPS を腹腔内注射し、3時間後と6時間後に脛骨と大腿骨を採取して骨髄と残りの骨に分離した。RT-PCR/サザンブロッティングにより観察を行ったところ、mPGES の mRNA は用量依存的に骨髄でも残りの骨でも発現誘導が見られた。一方、RT-PCR による cPGES の mRNA レベルは、骨髄でも残りの骨でも LPS 腹腔内注射により影響を受けなかった。

骨吸収に対する mPGES の関与を調べるために、mPGES に対するチオリン酸化したアンチセンスオリゴヌクレオチド（以下アンチセンス）を合成した。この mPGES アンチセンスとコントロールオリゴヌクレオチドの IL-1 α 刺激による PGE₂ レベルと RANKL の mRNA レベルへの影響を調べたところ、mPGES アンチセンスにより両者とも抑制された。

次に、破骨細胞性骨吸収におけるアンチセンスの効果を調べるために、培養初代骨芽細胞にオリゴヌクレオチドを加え、その後骨髄細胞との共存培養を行い、IL-1 α 、PGE₂ で刺激した。アンチセンスは IL-1 α による破骨細胞形成と骨吸収窩形成を抑制したが、コントロールオリゴヌクレオチドは影響を及ぼさなかった。mPGES アンチセンスは外因性 PGE₂ による破骨細胞形成、骨吸収窩形成を抑制しなかった。このことより、mPGES は PGE₂ 産生を伴うサイトカインによる骨吸収の重要なメディエーターであることが示された。

本研究で得られた知見から、mPGES は骨吸収性病態において重要な役割を持っており、現在開発中である mPGES の抑制剤は骨代謝改善薬としての可能性が期待される。