

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 膜結合型プロスタグランジン E<sub>2</sub>合成酵素-1(mPGES-1)の  
生体内における骨代謝調節機構

指導教員 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 山川 聖史

アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)を介して産生される生理活性物質プロスタノイド(プロスタグランジン(PG)D<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, トロンボキサン(TX)A<sub>2</sub>)は、生体の恒常性の維持や様々な病態形成に関与している。なかでもPGE<sub>2</sub>は骨組織において最も多量に存在し、骨代謝に重要な働きをしている。PGE<sub>2</sub>は以下の経路により合成される。細胞の膜リン脂質から酵素であるホスホリパーゼA<sub>2</sub>がアラキドン酸を切り出し、そのアラキドン酸を基に酵素であるCOXによってPGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>が産生される。そのPGH<sub>2</sub>を共通の中間体として、各プロスタノイド特異的な合成酵素により合成される。PGE<sub>2</sub>産生の最終段階を触媒するPGE<sub>2</sub>合成酵素(prostaglandin E synthase:PGES)が同定されたのは比較的最近で、現在3種類が同定されている。1) 広範な臓器に恒常的に発現している細胞質型(cytosolic)のcPGES、2) 炎症刺激等により誘導されてくる膜結合型(membrane-bound)のmPGES-1、3) もうひとつの膜結合型のmPGES-2である。各PGESは上流のCOXと機能的に関連しており、cPGESはCOX-1とともに構成的に発現し、迅速な反応を要する生体の恒常性の維持に働く。一方、mPGES-1はCOX-2とともに炎症性の刺激などにより誘導されてくる酵素で、主に病態形成に関与している。mPGES-2はCOX-1、COX-2の両方と関連するが、恒常的に発現している。現在、解熱・消炎鎮痛剤として最も汎用されている薬剤に非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAIDs)があるが、その作用機序はCOXの活性阻害によるプロスタノイド産生阻害である。従来のNSAIDsに胃腸障害などの副作用が多い理由として、COX-1とCOX-2

を非選択的に阻害してしまうため、構成的に発現し生体の恒常性維持に必要なプロスタノイドをも抑制するからであると考えられている。実際、COX-2 選択的阻害剤が開発され、欧米ではその有効性と胃腸障害などが少ないことが示されている。しかし、COX-2 阻害剤にも問題はあり、COX-2 の阻害による潰瘍治癒の遅延、COX-2 ノックアウト(KO)マウスでの腎障害、雌の不妊症などが示されている。また、COX-2 阻害剤による脳卒中や心筋梗塞などの心血管イベントの増加が最近問題になっている。これらの問題は、PGE<sub>2</sub>のみならず、他のプロスタノイド産生をも広範に抑制するためと考えられる。従って、COX-2 の下流に位置し、誘導性に産生されてくる PGE<sub>2</sub> のみを抑える mPGES-1 の阻害剤が非常に有望視されている。

骨代謝における PGE<sub>2</sub> の役割に関しては、骨形成と骨吸収の両方がある。PGE<sub>2</sub> は 4 種類ある PGE<sub>2</sub> レセプター (EP) の中の EP2 と EP4 を介して破骨細胞形成を促進する。逆に、PGE<sub>2</sub> 投与により動物での骨形成は増加し、EP2 や EP4 の agonist が骨形成促進剤として開発されつつある。また、NSAIDs や COX-2 阻害剤投与による動物の骨折治癒阻害や、COX-2 KO マウスの骨折治癒阻害の報告がある。

mPGES-1 の *in vitro* での骨吸収への関与に関しては Saegusa らの報告があり、プロスタノイドの中で PGE<sub>2</sub> のみが強い骨吸収活性を持つこと、マウス骨芽細胞培養系に骨吸収性サイトカインの IL-1 $\alpha$ などを加えると、PGES の中で mPGES-1 の発現のみが COX-2 とともに誘導されたこと、IL-1 $\alpha$ による破骨細胞形成亢進が mPGES-1 antisense oligonucleotide により抑制されたことを示している。このことから、mPGES-1 は骨吸収性病態において重要な働きをしていることが示唆される。

2002 年に Uematsu らは mPGES-1KO マウスを作製し、免疫反応における解析の報告を行っているが、骨組織に関しての解析は全く行っていない。本研究の目的は、mPGES-1 KO マウスの骨組織を解析することで、生体内の骨組織における mPGES-1 の役割を明らかにすることである。まずは、mPGES-1 KO マウスの生理的条件下での骨組織を野生型(WT)と比較し、続いて、様々な病的条件下での比較を関節リウマチモデル、閉経後骨粗鬆症モデル、不動性骨粗鬆症モデル、骨折モデルを作成して行った。

大阪大学より供与された mPGES-1 KO マウスを飼育・繁殖させたところ成長障害はなく、8 週齢雄の骨格・大腿骨・脛骨・腰椎の X 線、骨密度 (BMD) においても WT と有意な差はなかった。脛骨近位での骨組織形態計測も行ったが、骨形成、骨吸収の指標とも WT と KO の間に有意な差はなく、その他の臓器にも大きな異常は見られなかった。

生理的状态では骨組織に異常はみられなかったため、まずは、炎症および炎症性骨吸収モデルとして II 型コラーゲン抗体投与による関節リウマチモデルを作成した。WT に II 型コ

ラーゲン抗体を腹腔内投与 (day0) 後、day2 に booster として Lipopolysaccharide (LPS) を投与したところ day4 頃から四肢が腫れ始め、day7 頃にピークに達し、その後、3 日毎に LPS を追加投与することで day28 まで炎症は持続し、四肢関節に骨破壊が観察された。炎症の臨床評価として手足の腫れ具合を関節炎スコア (合計 12 点) にて評価したところ、WT が 8 点近くまで達したのに対し、KO ではその半分程度に抑制された。膝関節部の組織像では、WT でみられた関節軟骨の変性・破壊が KO では抑制され、膝関節周囲の BMD は WT に比べて KO では約 40% の抑制がみられた。また、中手骨部の X 線では WT で明らかだった骨破壊・骨膜反応が KO ではみられず、TRAP 染色像および骨組織形態計測での骨吸収の指標が、WT の半分程度に減少していた。Day6 での両手足組織中の PGE<sub>2</sub> 産生量は、著明な産生亢進がみられた WT 発症群に対し、KO では半分程度に抑制されていた。また、mPGES-1 蛋白の発現は、関節炎の発症に伴い COX-2 の発現亢進とともに誘導されていたが、mPGES-2 や cPGES の発現は不変であった。破骨細胞形成・活性化に重要な RANKL の mRNA 発現は、発症に伴い WT で亢進していたが、KO では対照群と同程度に抑制されていた。

次に、閉経後骨粗鬆症モデルとして卵巣摘出モデルを作成した。術後 4 週で脛骨の BMD を術前と比較したところ、卵巣摘出に伴って BMD の減少がみられたが、その減少率に WT と KO で有意な差はなかった。

続いて、不動性骨粗鬆症モデルとして尾部懸垂モデルを作成した。懸垂後 4 週で脛骨の BMD を地上対照群と懸垂群の間で比較し、その BMD の減少率を WT と KO で比較したが、有意な差はみられなかった。脛骨の骨組織形態計測でも WT と KO の間には有意な差はなかった。

最後に、骨折モデルとして脛骨骨折モデルを作成した。WT では、X 線上、術後 1 週でわずかに仮骨を認め、2 週間には旺盛な仮骨の形成がみられ、3 週間には全例骨癒合した。術後 1 週の組織切片での mPGES-1 蛋白の発現は骨折部の軟骨組織および骨膜近傍の線維性骨にみられた。経時的に骨折部での 3 種類の PGES の mRNA 発現を調べたところ、mPGES-1 のみに術後 1 週をピークに 2 倍以上の発現亢進がみられた。KO では X 線上 WT でみられたような仮骨形成に乏しく、10 匹中の半分が術後 3 週でも骨癒合していなかった。骨密度測定器を用いて仮骨面積と仮骨骨量を定量化したところ、WT に比べて KO では半分程度に低下していた。組織学的にも骨折後初期から軟骨組織が WT より著明に小さかったが、KO で軟骨組織が後期まで残存しているわけではなかった。仮骨部軟骨組織細胞の性質を評価するために細胞増殖を示す BrdU、肥大化軟骨細胞を示す X 型コラーゲンとアポトーシスを示す TUNEL に対する免疫染色を行ったところ、KO では WT に比較し BrdU 陽性細胞の数が少なかった。X 型コラーゲン、TUNEL に対しては KO ではその範囲が小さかったものの、

WT、KO の染色の割合に差はみられなかった。さらに、マウスの肋軟骨より採取した初代軟骨細胞の培養系で細胞増殖アッセイを行ったところ、KO では細胞の増殖が WT に比較し抑制されていた。従って、KO での骨折治癒の阻害は、骨折後早期の軟骨細胞の増殖が阻害されたためと考えられた。さらに、mPGES-1 の骨折治癒への関与を確認するため、術後 2 日目に KO の骨折部に mPGES-1 アデノウイルスを局所注射したところ、KO で抑制されていた仮骨の形成が回復した。

以上より、mPGES-1 KO マウスでは、骨組織を含めて生理的状态に異常はないが、関節リウマチモデルでは炎症と炎症に伴う関節破壊が抑制され、脛骨骨折モデルでは仮骨形成の抑制による骨折治癒阻害が見られた。従って、mPGES-1 は、生理的状态には大きな影響を与えずに、病的負荷のかかった状態である炎症性骨吸収および骨折治癒に関与することが示された。

すでに、mPGES-1 KO マウスの解析から、mPGES-1 が炎症・疼痛・発熱に関与することは明らかにされており、COX-2 阻害剤と同等の効果を持ちながら、より副作用が少ない理想的な解熱・消炎鎮痛剤になる可能性が高いことが示されている。本研究から、mPGES-1 阻害剤は炎症性骨吸収阻害剤としても有望であることが明らかとなり、その開発が待たれるところである。しかし、骨折患者への投与は慎重に行った方がよいことが示唆された。