

学 位 論 文 題 名

Long-term effects of prostaglandin E₂ on the mineralization
of a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1)

（骨芽細胞様細胞株（MC3T3-E1）の石灰化に対する
プロスタグランジン E₂ 長期投与の効果）

学位論文内容の要旨

【緒言】

矯正力を歯牙に負荷すると、牽引側で骨添加が起こり圧迫側で骨吸収が起こる。この骨の改造様式をin vitroの実験系にシミュレートするために、骨芽細胞にメカニカルストレスをかける実験が以前より行われている。骨形成におけるメカニカルストレスの影響には、プロスタグランジン（PG）E₂が関与していると考えられているが、詳細に関してはいまだ不明である。この解明の一環として、PGE₂、及びPG合成酵素を阻害するインドメタシンを骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞に持続的に石灰化期までそれぞれ投与し、経時的、定量的に評価した。さらにMC3T3-E1細胞におけるプロスタノイドの産生量とPGE₂受容体量の経時的变化についても調べ、この変化とPGE₂による骨芽細胞の石灰化への影響との関連について考察した。

【材料と方法】

MC3T3-E1細胞を適法に従い α -MEM+10%FBSで培養した。これを対照群とし、低濃度PGE₂（1ng/ml）、高濃度PGE₂（1 μ g/ml）、及びインドメタシン（1 μ g/ml）を培養液に持続的に投与して培養したものを、それぞれ低濃度PGE₂群、高濃度PGE₂群、インドメタシン群とした。

4群を経時的に回収したのちアルカリ性ホスファターゼ（ALP）活性測定、蛋白、コラーゲン、カルシウム、無機リンの定量を行った。ALP活性はパラニトロフェニルリン酸を基質とし、細胞回収を行わずに24ウェルのプレート上で直接測定した。培養液中のALP活性も測定した。蛋白質総量はLowry変法にて測定した。コラーゲンはヒドロキシプロリンをWoessnerの方法で定量した。カルシウム量と無機リン量は、コラーゲン定量時のサンプルを750℃で処理後、それぞれ、原子吸光度分析法、Chiffletの方法で測定した。

対照群、インドメタシン群でのプロスタノイド産生量と対照群における受容体へのPGE₂結合量も経時的に調べた。プロスタノイド産生量は酵素免疫測定法にて求めた。受容体へのPGE₂結合量は [³H]PGE₂を用いて遠心法により求めた。

【結果】

対照群の培養液を経時的に回収してPGE₂、PGF_{2 α} 、6-ketoPGF_{1 α} （PGI₂の代謝産物）、トロンボキサンB₂の産生量を測定したところ、PGE₂は培養期間を通じて最も多く産生されたプロスタノイドであり、その産生はコンフルエンス時に最大であった。インドメタシン群ではその産生は培養期間を通じてほぼ完全に抑制された。

蛋白質総量は4群とも培養期間を通じて増加した。インドメタシン群及び高濃度PGE₂群では対照群に比べさらに増加した。

細胞と細胞外基質のALP活性は4群ともコンフルエンス後14日後より急激に上昇した。活性の上昇は対照群に比べ、インドメタシン群で亢進され、低濃度PGE₂群及び高濃度PGE₂群で抑制された。培養液中のALP活性は、細胞と細胞外基質のALP活性よりも10日ほど遅れて上昇した。各物質投与の影響に関しては同様であった。

ハイドロキシプロリン、カルシウム及び無機リンの蓄積は、コンフルエンス21日後から35日後までインドメタシン群で有意に増加した。低濃度PGE₂群及び高濃度PGE₂群では、カルシウム及び無機リンの蓄積が対照群に比べやや減少した。

受容体へのPGE₂結合量はコンフルエンス時に最大となり、その後減少し石灰化期に再び上昇した。

【考察】

PGE₂の骨芽細胞への影響について統一した見解は現在のところ得られていない。我々は、この異なった見解は投与期間の違いと骨芽細胞様細胞の種類の違いによると考えた。過去の報告では、PGE₂投与及びその効果の観察はコンフルエンス前後の何日間のみで行われたものが大多数である。今回我々は、PGE₂を骨芽細胞に石灰化期まで持続的に投与したときの経時的効果を調べた。マウス頭蓋冠由来であるMC3T3-E1細胞は、コンフルエンス後に高いALP活性を持ち、コラーゲンを分泌し、石灰化結節を形成する。よって、MC3T3-E1細胞はPGE₂の石灰化期までの経時的効果を調べるのに適した細胞である。今回の研究でもこれらの性質が示された。

本研究では、PGE₂は培養期間を通じて最も多く産生されたプロスタノイドであった。PG合成酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害するインドメタシン投与により、その産生はほぼ完全に抑制された。これらのことより、今回用いた4群の培養液に含まれるPGE₂量は、高濃度PGE₂群で最も多く、以下低濃度PGE₂群、対照群、インドメタシン群の順と考えられた。

インドメタシンを石灰化期まで持続的にMC3T3-E1細胞に投与すると、ALP活性、及びコラーゲン、カルシウム、無機リンの蓄積は促進された。またPGE₂投与により、ALP活性及びカルシウム、無機リンの蓄積はやや抑制される傾向を示した。以上より、長期間の投与により、外因性、内因性を問わずPGE₂は濃度依存的に石灰化を抑制することが示唆された。

培養液中のALP活性に対するPGE₂の影響は、細胞のALP活性とほぼ同様であったが、活性の上昇する時期が異なることより、培養液中のALPと細胞のALPとはそれぞれ異なる役割をもつことが示唆された。

蛋白質総量はインドメタシン群及び高濃度PGE₂群で対照群に比べ増加した。これは、インドメタシン群ではコラーゲンの蓄積が増加したことに起因すると考えられた。高濃度PGE₂群では、過去に報告されているように細胞の増殖能が上昇するためと考えられた。

MC3T3-E1細胞が石灰化にいたるまでの受容体へのPGE₂結合量は、コンフルエンス時に最大となった。これはPGE₂受容体量がコンフルエンス時に最大となることを示唆している。骨芽細胞において、コラーゲンの蓄積はコンフルエンス後約10日より上昇するのに対し、プロコラーゲンのmRNAや架橋結合の前駆体の発現はコンフルエンス前後に最大となるという報告がある。今回の結果とこれらの報告より、PGE₂の石灰化抑制作用はコンフルエンス時にすでに伝達されていることが示唆された。

PGE受容体には4つのサブタイプ (EP1、EP2、EP3、EP4) があることが薬理学的にすでに知られている。MC3T3-E1細胞にはこのサブタイプのうちEP1、EP4のmRNAがコンフルエンス時に存在し、コンフルエンス時にサブタイプのアゴニストを投与することにより、EP1はDNA合成を促進しALP活性を抑制し、EP4では逆の結果が得られたという報告がある。よって、PGE₂の石灰化抑制作用はEP1を経由して伝達される可能性がある。

以上より、PGE₂の長期投与はE1細胞の石灰化を抑制することが示され、この効果はコンフルエンス時にすでに伝達されていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 中 村 進 治

副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

Long-term effects of prostaglandin E₂ on the mineralization of a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1)

(骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) の石灰化に対する
プロスタグランジン E₂ 長期投与の効果)

主査、副査全員が一堂に会し、口頭にて論文審査を行った。まず、論文提出者に研究内容の概要の説明を求めた。提出者は以下の内容を明快に説明した。

骨形成におけるメカニカルストレスの影響には、プロスタグランジン (PG) E₂ が関与していると考えられているが、詳細に関してはいまだ不明である。本研究では、この解明の一環として、PGE₂、及び PG 合成酵素を阻害するインドメタシンを骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞に持続的に石灰化期までそれぞれ投与し、経時的、定量的に評価した。さらに MC3T3-E1 細胞におけるプロスタノイドの産生量と PGE₂ 受容体量の経時的变化についても調べ、石灰化との関連について考察した。

MC3T3-E1 細胞を通法に従い培養した。これを対照群とし、低濃度 PGE₂ (1 ng/ml)、高濃度 PGE₂ (1 µg/ml)、及びインドメタシン (1 µg/ml) を培養液に持続的に投与して培養したものを、それぞれ低濃度 PGE₂ 群、高濃度 PGE₂ 群、インドメタシン群とした。

4 群の細胞を経時的に回収したのちアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性測定、蛋白、コラーゲン、カルシウム、無機リンの定量を行った。培養液中の ALP 活性も測定した。更に、対照群、インドメタシン群でのプロスタノイド産生量と対照群における受容体への PGE₂ 結合量も経時的に調べた。

その結果、PGE₂ は培養期間を通じて最も多く産生されたプロスタノイドであった。PG 合成酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害するインドメタシン投与により、その産生はほぼ完全に抑制された。これらのことより、今回用いた 4 群の培養液に含まれる PGE₂ 量は、高濃度 PGE₂ 群で最も多く、以下低濃度 PGE₂ 群、対照群、インドメタシン群の順と考えられた。インドメタシンを石灰化期まで持続的に MC3T3-E1 細胞に投与すると、ALP 活性、及びコラーゲン、カルシウム、無機リンの蓄積は促進された。また PGE₂ 投与により、ALP 活性及びカルシウム、無機リンの蓄積はやや抑制される傾向を示した。

以上より、長期間の投与により、外因性、内因性を問わず PGE₂ は濃度依存的に石灰化を抑制することが示唆された。

培養液中の ALP 活性に対する PGE₂ の影響は、細胞の ALP 活性とほぼ同様であったが、活性の上昇する時期が異なることより、培養液中の ALP と細胞の ALP とはそれぞれ異なる役割をもつことが示唆された。

蛋白質総量はインドメタシン群及び高濃度 PGE₂ 群で対照群に比べ増加した。これは、インドメタシン群ではコラーゲンの蓄積が増加したことに起因すると考えられた。高濃度 PGE₂ 群では、過去に報告され

ているように細胞の増殖能が上昇するためと考えられた。

MC3T3-E1細胞が石灰化にいたるまでの受容体へのPGE₂結合量は、コンフルエンス時に最大となった。これはPGE₂受容体量がコンフルエンス時に最大となることを示唆している。骨芽細胞において、コラーゲンの蓄積はコンフルエンス後約10日より上昇するのに対し、プロコラーゲンのmRNAや架橋結合の前駆体の発現はコンフルエンス前後に最大となるという報告がある。今回の結果とこれらの報告より、PGE₂の石灰化抑制作用はコンフルエンス時にすでに伝達されていることが示唆された。

PGE受容体には4つのサブタイプ（EP1、EP2、EP3、EP4）があることが薬理学的にすでに知られている。MC3T3-E1細胞にはこのサブタイプのうちEP1、EP4のmRNAがコンフルエンス時に存在し、コンフルエンス時にサブタイプのアゴニストを投与することにより、EP1はDNA合成を促進しALP活性を抑制し、EP4では逆の結果が得られたという報告がある。よって、PGE₂の石灰化抑制作用はEP1を経由して伝達される可能性がある。

以上より、PGE₂の長期投与はE1細胞の石灰化を抑制することが示され、この効果はコンフルエンス時にすでに伝達されていることが示唆された。

このような趣旨の論文に対し、次のような質問がなされた。1) PGE₂濃度が ng-μg/ml で用量に幅があるが途中の用量ではどうか 2) 細胞の増殖、分化に対してPGE₂はその用量の差異により促進させたり、抑制させたりすることはあるのか 3) メカニカルストレスのかけ方には持続的なものと間歇的なものがあるその意味合いは何か 4) 骨芽細胞にPGE₂がどうして作用するのか 5) ペレットをはがして得たCell lysateをかき混ぜてALPなどを測定したか 6) MC3T3-E1細胞を播いたあとコンフルエンスになるまでの期間におけるプロスタノイドの合成はどうか 7) インドメタシンの用量をあげるとどうなるのか 8) 受容体へのPGE₂結合量はコントロールでも測定したのか 9) PGE₂の骨吸収作用について 10) PGE₁には骨吸収作用があるのか 等、これら質問に対し、申請者は明快な回答を行い、関連分野についても広く詳細な理解があることを認めれた。その後、久保木副査によって口腔生物学全般にわたる見識を問う論述試験が課せられたが、申請者は概ね的確な解答をすることが出来た。以上の結果を総合し、合格とした。