Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-05-14

Cyclooxygenase inhibitors enhance cell growth in an osteoblastic cell line, MC3T3-E1

藤森, 明

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1991-03-20
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙1532
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001532

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔 170 〕

氏名・（本籍）	藤森　明（ふじもり　あきら）　（長野県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1233号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成3年3月20日
学位論文題目	Cyclooxygenase Inhibitors Enhance Cell Growth in an Osteoblastic Cell Line, MC3T3-E1 （cyclooxygenase阻害剤の骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1における増殖刺激効果）
審査委員	主査　教授　藤田拓男 教授　岡田安弘　教授　高井義美

論文内容の要旨

I　序文

骨芽細胞が，prostaglandin を産生することは良く知られている。また，prostaglandin，特にprostaglandinE_2（PGE_2）が骨芽細胞の増殖や分化に影響を与えていることも知られている。マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1は，アラキドン酸の代謝物としてPGE_2を産生し，epidermal growth factorや，interleukin-1によってこのPGE_2産生が刺激されるという報告が近年なされた。一方，PGE_2がMC3T3-E1細胞のDNA合成，蛋白合成，アルカリフォスファターゼ活性（ALP活性）に影響を与えることも示されている。これらの事実は内因性に作られたPGE_2が骨芽細胞の増殖や分化を制御している可能性を示唆するものの，内因性PGE_2の役割を詳細に検討した報告は今までなされていない。そこで本研究では，内因性PGE_2産成を阻害することによりMC3T3-E1細胞の増殖や分化がどの様に影響をうけるか検討した。即ち，indomethacin，acetyl salicylic acid（ASA），flurbiprofen，piroxicamといった4種の cyclooxygenase 阻害剤の細胞増殖，ALP活性に対する影響をMC3T3-E1細胞を用いて調べた。同時に対照としてラット骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株UMR106も用い，cyclooxygenase 阻害剤の作用を調べた。

II　実験方法

MC3T3-E1細胞の培養は10％牛胎児血清を含むα-minimal essential mediumで，UMR106細胞の培養は10％牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's minimal essential mediumを用いておこなった。radioimmunoassay で培養液中のPGE_2濃度を測定することにより細胞のPGE_2産生を証

明した。内因性PGE_2産生を阻害するため cyclooxygenase 阻害剤(indomethacin, ASA, flurbiprofen, piroxicam)を細胞に投与し，増殖の指標としてDNA量の測定及び［^{3}H］thymidine の取込を測定した。また骨芽細胞の分化の指標として Lowry 法によりALP活性を測定した。

Ⅲ 結果

MC3T3-E1細胞培養液中のPGE_2濃度は indomethacin 非存在下では18-20ng／mlであるのに対し，10^{-5}M indometacin 存在下では1ng／ml以下であった。さらに indomethacin 存在下で4日間MC3T3-E1細胞を培養したところ，対照群に比べて最高（10^{-5}M, indomethacin）29%DNAの増加が見られた。同様に indomethacin は［^{3}H］thymidine の取込も刺激した。indomethacinと同様の増殖刺激作用はASA, flurbiprofen, piroxicam にも認められた。一方ALP活性は indomethacin, ASA が上昇させたのに対し flurbiprofen, piroxicam はALP活性を低下させた。次に，外因性にPGE_2をMC3T3-E1細胞に投与したところ低濃度（$6X10^{-8}$, $6X10^{-7}$M）では増殖を抑制し，高濃度（$6X10^{-6}$M）では増殖を刺激した。ALP活性は外因性PGE_2により濃度依存性に低下した。対照として用いたUMR106細胞もPGE_2を産生したが，培養液中のPGE_2濃度はMC3T3-E1細胞培養液中の濃度よりも低かった。細胞増殖，分化に対するcyclooxygenase 阻害剤の効果もUMR106細胞ではMC3T3-E1細胞に比べて軽微であった。

Ⅳ 考察

本研究では4種の構造の異なる cyclooxygenase 阻害剤がすべてMC3T3-E1細胞の増殖を刺激することが示された。MC3T3-E1細胞のPGE_2産生が indomethacin で阻害されることも同時に示された。これらの事実から内因性PGE_2はMC3T3-E1細胞の増殖を抑制している可能性が推察された。すなわち，cyclooxygenase 阻害剤は内因性PGE_2による増殖抑制を解除することによりMC3T3-E1細胞の増殖を刺激したものと思われる。外因性にPGE_2を投与した場合，低濃度($6X10^{-8}$M, $6X10^{-7}$M)ではMC3T3-E1細胞の増殖を抑制したという結果も，MC3T3-E1細胞の培養液中のPGE_2濃度がおよそ$6X10^{-6}$M(20ng／ml)であったことから，この仮説を裏付けている。一方，cyclooxygenase 阻害剤のALP活性に対する効果は一定でなかった。しかし，外因性に投与したPGE_2がMC3T3-E1細胞のALP活性を低下させたことから内因性PGE_2はMC3T3-E1細胞の分化も抑制している可能性が考えられた。flurbiprofen, piroxicam は何等かの直接作用によりALP活性を低下させたのかもしれない。UMR106細胞ではMC3T3-E1細胞に比べて cyclooxygenase 阻害剤の作用は軽微であった。また，内因性PGE_2産生も少量であった。このことからUMR106細胞においても内因性PGE_2は増殖抑制効果を持っていると考えられるものの，その役割はMC3T3-E1細胞に比べ小さいと思われた。この違いは両細胞株の分化の程度の差，或いは由来の違いからくるものと考えられた。

結論

骨芽細胞が内因性に産生するPGE_2はその増殖，分化を抑制している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジンは全身各組織に分布し，局所の代謝調節ことに平滑筋の収縮弛緩や細胞の増殖に細胞内情報伝達機構を介して深く関与しているが，骨にも大量に存在し，骨芽細胞によって産生されることが知られている。骨におけるプロスタグランジンの役割は多様であるが，ことにプロスタグランジンE_2は骨吸収を促進するとともに骨芽細胞の増殖や分化をおこすといわれる。マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞株MC3-T3-E1はプロスタグランジンを産生し，Epidermal Growth Factor や Interleukin-1がその産生を刺激する。そのPGE$_2$は又オートクリン的にM3CT3E1のDNA産生，蛋白合成，アルカリフォスファターゼ等に影響を与える。本研究者は逆に cyclooxygenase 阻害剤により，PGE$_2$の合成を抑制して骨芽細胞MC3T3E1及びラット骨肉腫由来のUMR106に対する影響をしらべ，プロスタグランジンの骨芽細胞に対する作用機序を明らかにしようとこころみた。

10%牛胎児血清を含む α minimum essential medium でMC3T3-E1細胞を，同じく10%牛胎児血清を含む Dulbecco の modified Eagle's minimum essential medium を用いてUMR106細胞を培養し，cyclooxygenase 阻害剤としてはインドメサシン，アセチルサリチル酸(ASA)，プロピプロフェン及びピロキシカムを用い，増殖の指標として，DNA量の［^{3}H］サイミジンの取込を測定した。又アルカリフォスファターゼ活性を骨芽細胞の分化の指標とした。MC3T3-E1細胞培養液中のPGE$_2$濃度は18-20ng／mlであったが10^{-5}Mのインドメサシン存在化では1ng／ml以下に著減した。インドメサシン存在下で4日間MC3T-E1を培養した所，最高29%のDNAの増加がみとめられ，ASA，フルルビプロフェン，ピロキシカムにも同様の効果がみとめられた。アルカリフォスファターゼ活性はインドメサシン，ASAが上昇させたがフルルビプロフェン，ピロキシカムは低下させた。外因性にPGE$_2$を加えると低濃度ではMC3T1-E1の増殖を抑制し，高濃度では刺激した。アルカリフォスファターゼ活性は濃度依存性に低下した。UMR106細胞はPGE$_2$産生がMC3T3-E1細胞より少なく，cyclooxygenase阻害剤の効果もより軽微であった。以上の結果から，内因性プロスタグランジンは骨芽細胞の増殖と分化を抑制しており，cyclooxygenase によってその抑制が解除されるものと解された。

以上本研究者は，従来殆ど研究されなかった骨芽細胞に対するプロスタグランジンの効果をcyclooxygenase 抑制剤を用いて検討したものであり，価値ある集積と考えられる。

よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると考えられる。