

# プロスタグランディン E<sub>1</sub> および F<sub>2α</sub> の 鶏胚骨の骨形成におよぼす影響

—アルカリホスファターゼ活性に対する作用—

岡山大学歯学部口腔外科学第1講座 (指導: 西嶋克巳教授)

上 田 茂 樹

(平成元年4月24日受稿)

Key words: 組織培養, プロスタグランディン, 骨形成

## 緒 言

プロスタグランディン (以下 PG と略す) は、広く生体内に分布しており多彩な生理作用を有していることが知られている。

骨代謝においても、軟骨および骨に対して多くの作用をおよぼすことが主として *in vitro* の実験において明らかにされつつある。

骨吸収に対する作用としては、Kleinら<sup>1)</sup>のラット胎仔頭蓋骨の組織培養実験において、PGE<sub>1</sub>、PGE<sub>2</sub>が10<sup>-8</sup>M—10<sup>-6</sup>MでCaの遊離を起し、その効果は10<sup>-6</sup>M—10<sup>-5</sup>Mで最も強いという報告がある。

そのほか骨吸収作用については、いくつかの報告<sup>2-6)</sup>もなされておりPGの骨吸収作用についてはかなり解明されている。

一方骨形成に対する作用に関しては未だはっきりしていないのが現状である。

PGE<sub>1</sub>を30日以上にわたって0.02—0.08μg/kg投与するとcortical hyperostosisが生じたという臨床報告<sup>7)</sup>やosteoporosisがPGE<sub>1</sub>によって抑制されたという報告<sup>8)</sup>などPGが骨形成過程において何らかの役割を果たしている可能性が示唆されるが、不明の点も多い。

著者は、鶏胚骨の組織培養において、骨形成に重要な役割を果たしていると考えられているアルカリホスファターゼ (以下ALPaseと略す) 活性におよぼす効果を指標として、PGE<sub>1</sub>およびPGF<sub>2α</sub>の骨形成に対する作用についていくつか

の知見を得たので報告する。

## 実験材料と方法

### 1. 鶏胚の大腿骨および脛骨の組織培養

10日鶏卵より、無菌的に胎仔を取り出し左右の大腿骨および脛骨を実体顕微鏡下で分離し液層と気層の界面に培養骨を保持するために直径8mm、厚さ1mmの円形濾紙上に置き、直径30mmのFalcon社製のプラスチックシャーレ中で6日間培養した。

基本培養液はF12 (日水製薬) 1mlを使用し、CaとPの濃度は100mM CaCl<sub>2</sub>およびNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で2.5mMに調整した。

培養液は、48時間ごとに交換した。

この基本培養液で同一個体より摘出した左右側の大腿骨および脛骨をそれぞれ別々に同一条件のもとで培養した。

次にこの基本培養液にPGE<sub>1</sub> (0.1, 1, 10, 100nM) およびPGF<sub>2α</sub> (1, 10, 100nM) の各濃度のものを加え培養を実施した。

またserum添加の影響を見るため20% calf serumを含む基本培養液にPGE<sub>1</sub> (1, 10, 100nM) を加え培養を実施した。

なおPGは、ethyl alcoholに溶解しmediumを加えて所定の濃度に調整した。

対照群のmediumにはethyl alcoholのみを等量添加した。

また本研究で用いたPGE<sub>1</sub>、PGF<sub>2α</sub>の構造式を図1に示した。

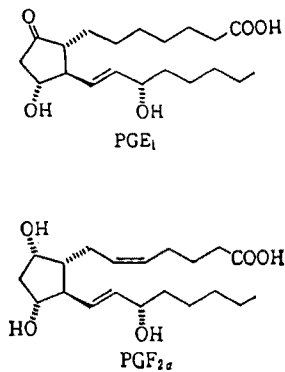


図1 PGE<sub>1</sub>, PGF<sub>2a</sub>の化学構造式

すべて同一個体から得た一方の骨を実験群、他方を対照群とした。

## 2. ALPase 活性の測定

培養後の大腿骨を蒸留水で洗浄後、2 ml 蒸留水中で3分間 homogenize し homogenate 0.8 ml を使用し、20mM p-nitrophenyl phosphate を基質とし 5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液 (pH10.2) を基本的な基質反応液としてベックマン DU-8B 型分光光度計で生成物 p-nitrophenol の420nm の吸光度を測定し、酵素活性を求めた。

## 3. protein 量の測定

ALPase 活性測定時に homogenize した大腿骨の homogenate 0.4ml について bovine serum albumin を標準として Lowry ら<sup>9)</sup>の方法によって、protein 量を測定した。

## 4. calcium 沈着量の測定

培養終了後の脛骨を蒸留水で数回洗浄後 2N HCl 2 ml にて calcium を溶出し、48時間後原子吸光法 (日立 Z-8000 型偏光ゼーマン原子吸光分光光度計) により測定した。

## 結 果

1. 6日間培養した後の同一個体より摘出した左右の鶏胚骨における ALPase 活性および、protein 量、calcium 沈着量は、表1および図2に示すごとく、ほぼ一致しており、左右の一方を対照側、他方を実験標本にすることにより個体差を除去し得ることが確認された。

2. serum free および20% calf serum 添加の各条件下における PGE<sub>1</sub> の ALPase 活性および protein 合成、calcium 沈着量に対する効果

### 1) ALPase 活性

PGE<sub>1</sub> は、serum free の条件下では、10nM で培養骨中の ALPase 活性をコントロールに比べて、約2倍に促進させた。

その結果を表2に示した。

またその効果は図3に示すように0.1nM よりほぼ直線的に増加し10nM を最大としてそれ以上の濃度では減少するパターンが示された。

一方、20% calf serum を medium に添加した条件下では、表3のように10nM における効果は消失し、1 nM の濃度で促進する傾向がみられる

表1 同一条件で6日間培養した鶏胚骨左右側の ALPase 活性、protein 量、および calcium 沈着量の比較

value : means ± S.E for 4-8 bones

	protein ( $\mu\text{g}/\text{femur}$ )	calcium ( $\mu\text{g}/\text{tibia}$ )	ALP activities ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{femur}$ )
left	74.85 ± 9.75	4.13 ± 0.25	1.62 ± 0.28
right	74.75 ± 9.22	4.57 ± 0.14	1.52 ± 0.17

ratio

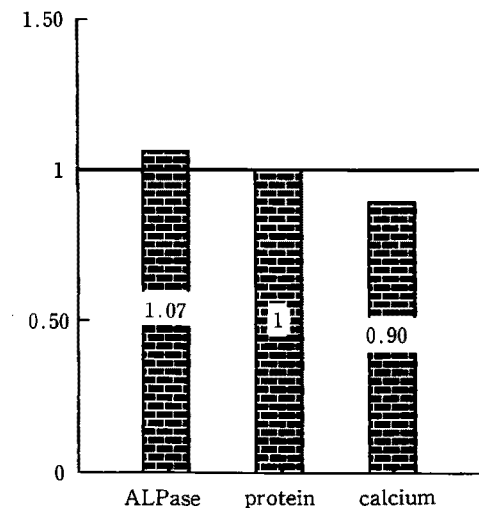


図2 同一条件で6日間培養した鶏胚骨左右側の比較

ratio = left/right

表2 serum free における PGE<sub>1</sub>の ALPase 活性, protein 量, および calcium 沈着量におよぼす影響  
value : means±S.E for 3-4 bones \*\* : p<0.01

Condition	protein (μg/femur)	calcium (μg/tibia)	ALP activities (μmol/min/femur)
PGE <sub>1</sub> (10 <sup>-11</sup> nM)	90.60±11.40	1.13±0.18	1.91±0.50
Control	86.80±10.00	1.14±0.19	2.24±0.48
PGE <sub>1</sub> (1nM)	80.50±4.16	8.96±0.34	2.99±0.40
Control	75.60±5.10	9.01±0.54	2.35±0.16
PGE <sub>1</sub> (10nM)	95.50±14.40	7.79±0.45	3.71±0.67**
Control	67.90±14.20	8.27±0.28	1.86±0.66
PGE <sub>1</sub> (10 <sup>2</sup> nM)	80.30±8.43	1.16±0.22	2.13±0.56
Control	87.20±4.24	1.17±0.25	2.39±0.84

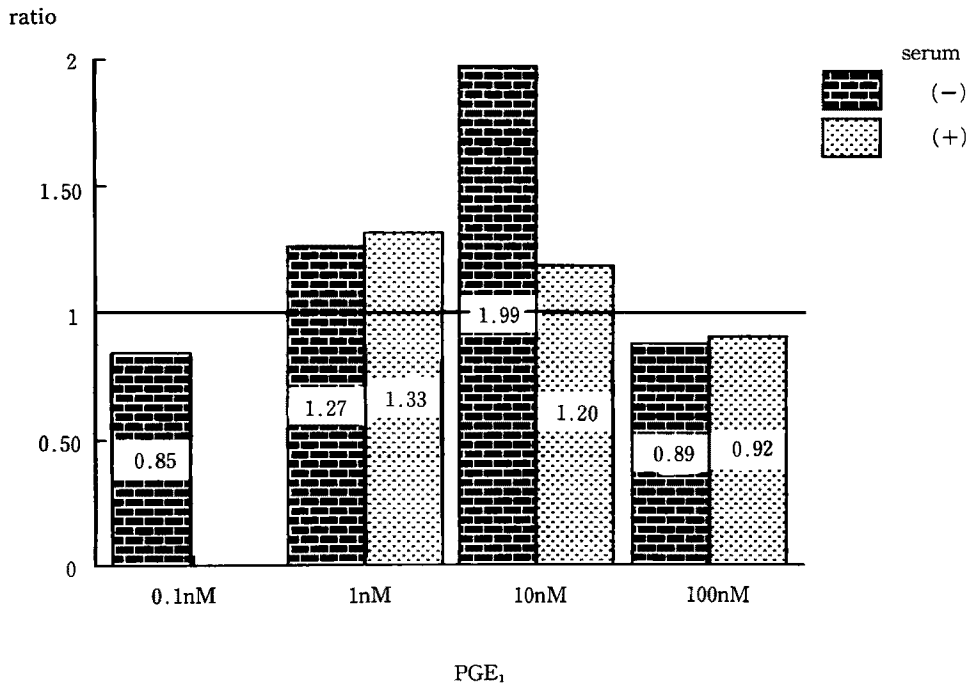


図3 serum free および20% calf serum 添加の条件下における PGE<sub>1</sub>の ALPase 活性におよぼす影響  
ratio=treated bone/control bone

たがコントロールと比較して有意の差は認められなかった。

2) protein 合成

serum free medium において, 10nM の PGE<sub>1</sub> は, 表2のごとく protein 合成を促進させる傾向がみられたが, コントロールと比較して有意の差は認められなかった。

また20% calf serum を medium に添加した条件下では表3に示すように PGE<sub>1</sub>は各濃度とも protein 合成に対してほとんど影響を与えなかった。

3) calcium 沈着量

左右の脛骨を用い calcium 沈着量を測定し, その結果を表2および表3に示した。

表3 20% calf serum 添加条件下における PGE<sub>1</sub> の ALPase 活性, protein 量, および calcium 沈着量におよぼす影響

value : means±S.E for 3-4 bones

Condition	protein ( $\mu\text{g}/\text{femur}$ )	calcium ( $\mu\text{g}/\text{tibia}$ )	ALP activities ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{femur}$ )
PGE <sub>1</sub> (1nM)	256.60±21.80	2.01±0.19	11.67±2.13
Control	277.60±21.40	1.89±0.11	8.80±1.83
PGE <sub>1</sub> (10nM)	280.00±37.70	1.96±0.17	11.63±1.15
Control	265.40±22.20	2.01±0.17	9.69±4.27
PGE <sub>1</sub> (10 <sup>2</sup> nM)	246.30±38.40	2.14±0.44	13.15±0.99
Control	264.00±36.00	2.14±0.41	14.30±0.65

表4 serum free における PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  の ALPase 活性におよぼす影響

value : means±S.E for 3-4 bones

\* : p&lt;0.05

Condition	ALP activities ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{femur}$ )
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> (1nM)	12.40±3.50
Control	12.59±4.10
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> (10nM)	12.73±2.40
Control	16.41±3.40
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> (10 <sup>2</sup> nM)	9.80±1.07*
Control	14.84±1.48

PGE<sub>1</sub> は serum free および, 20% calf serum を添加した条件下で 0.1nM - 100nM の範囲において効果を示さなかった。

### 3. serum free の条件下における PGF<sub>2 $\alpha$</sub> の ALPase 活性におよぼす効果

PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  は 1 nM - 100nM の濃度範囲で培養骨中の ALPase 活性を抑制する傾向が認められた。

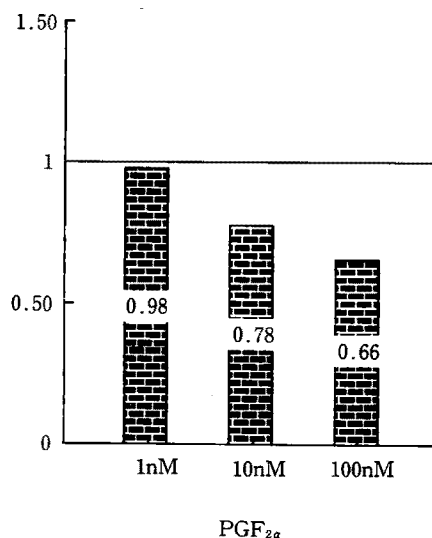
特に, 100nM において最も強い効果を示した(表4, 図4)。

## 考 察

9日から10日鶏胚大腿骨は, 骨膜性化骨や骨髓形成は始まっておらず殆ど軟骨細胞だけで形成されている。

組織培養においては細胞は三次元的な接触を保っており, 軟骨細胞の反応を総合的に in vitro で再現が可能である点で細胞培養より in vivo で

ratio

図4 serum free における PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  の ALPase 活性におよぼす影響

ratio=treated bone/control bone

の組織形成の実状をより反映する情報をもたらされると考えられる<sup>10)</sup>。

著者は, 10日鶏胚大腿骨の組織培養において PGE<sub>1</sub> が骨中の ALPase 活性を促進させることを見いだした。

骨中の ALPase は, 1923年 Robinson<sup>11)</sup> によって発見され, 骨や歯などの硬組織形成に伴って活性が上昇することが判明した。

ALPase が石灰化に対して重要な役割を果していると考えられるようになり化骨部の無機リン

酸濃度を高めることによりリン酸カルシウムの沈着を促進するとか、化骨を阻害するピロリン酸を分解する説<sup>12)</sup>などが唱えられているが、最近ではALPaseがCa, Pの輸送に関与している可能性が示唆されている<sup>13)</sup>。

またPGと骨形成に関していくつかの報告がなされている。

Hakedaら<sup>14)</sup>はserum freeにおけるマウス頭蓋骨由来の樹立骨芽細胞株MC3T3-E1 cellの培養においてPGE<sub>2</sub>が100ng/mlの濃度でALPase活性およびprotein合成をコントロールに比べて約2倍促進させたと報告している。

さらに、これらの効果は、細胞内のcyclic AMP (以下cAMPと略す)の増加と平行しており、ALPaseが骨芽細胞分化のmarker enzymeであると指摘している。

cAMPはホルモン作用のsecond messengerとして働くことが知られている。

ホルモンが細胞膜上のレセプターに結合すると、その信号によりadenyl cyclaseが活性化され、その結果産生されたcAMPがホルモン作用を惹起すると言われている。

またPGの骨吸収作用時には、parathyroid hormone (以下PTHと略す)と同様、骨組織中のcAMPの増加が認められる<sup>1)</sup>。

その作用は骨細胞におけるadenyl cyclaseが活性化されることにより引き起こされることが明らかにされている<sup>15)</sup>。

一方、PGおよびdibutyryl cyclic AMPが破骨細胞を抑制したと言う報告<sup>16)</sup>もあり、PGのcAMPレベルの増加作用が破骨細胞による骨吸収あるいは骨芽細胞による骨形成のいずれにどの様に関与しているのかははっきり解明されていないのが現状である。

またcAMPによりラット肝由来の上皮細胞の培養系においてALPaseの誘導が見られたが、この作用は酵素蛋白質量の増加ではなく不活性化ALPaseが活性化されたためであると報告<sup>17)</sup>されている。

今回著者が用いた系においてもserum freeの条件下でPGE<sub>1</sub>が有意にALPase活性を促進させた。

またその用量曲線は10nMまではほぼ直線的に

増加しそれ以上の濃度では、減少する山形のパターンを呈した。

一方PGF<sub>2α</sub>についてHakedaら<sup>14)</sup>は、100ng/mlの濃度でALPase活性に対してPGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>は促進的に作用するが、PGF<sub>2α</sub>は抑制する傾向を示したと述べている。

また東島ら<sup>18)</sup>はPGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>といったアラキドン酸系のIIシリーズのPGは骨吸収を促進し、PGE<sub>1</sub>などのγ-リノレン酸系のIシリーズのPGは骨吸収を抑制する可能性があると述べている。

そこで著者は、今回用いた実験系において、PGF<sub>2α</sub>のALPase活性に対する作用を検討したが、PGF<sub>2α</sub>は1 nM—100nMの濃度範囲で培養骨中のALPase活性を抑制する傾向を示し、特に100nMで最も強い効果を示すことが判明した。

Kumagawaら<sup>19)</sup>はMC3T3-E1細胞の培養においてserum freeでPTHはALPase活性を有意に促進させたと報告しているが、Nakataniら<sup>20)</sup>は、10% serumを添加した条件下では、PTHのその効果が認められなかったと報告している。

そこで著者は、20% calf serumを基本培養液に加えserum存在下におけるPGE<sub>1</sub>の効果を調べたが、serumを加えるとserum freeの条件下でみられた10nMにおけるALPase活性促進効果が消失し、1 nMにおいて若干の促進効果が認められたが有意ではなかった。

mediumにserumを添加することにより培養骨の成長、分化が促進されるが、serum中には未知の生物学的因子が含まれており、PGに関しても10% serum添加によって、コントロールに比較して約10倍PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>の合成が促進されるという報告<sup>21)</sup>もありserumの存在により実験結果の解析がこのように複雑になることが判明した。

骨のremodelingは骨吸収と骨形成のバランスにより調節されているが、両者は密接に関連して起こると考えられており同一のfactorが関与している可能性は十分考えられる。

calf rib cartilageの培養においてPGが高濃度(0.1mM—1 mM)でchondroitin-4-, -6-sulfate peptideの合成を抑制するが、低濃度(0.1 μM—10 μM)では、その効果が消失または、僅かに促進する傾向がみられ、PGに対して少なくと

も2つの異なった site が存在する可能性が考えられるという報告<sup>22)</sup>があるが、今回著者の行った実験結果より、PGE<sub>1</sub>は10<sup>-5</sup>M—10<sup>-6</sup>Mの濃度では骨吸収を促進し、10<sup>-8</sup>M—10<sup>-9</sup>Mの低濃度では逆に骨形成に関与している可能性が推測された。

### 結 論

10日鶏胚の大腿骨および脛骨の組織培養における、PGE<sub>1</sub>、PGF<sub>2α</sub>の作用について検討し次の結論を得た。

1. serum free の条件下で PGE<sub>1</sub>は用量依存性の促進効果を ALPase 活性に対して示し、10nM ではコントロールに比較して約2倍 ALPase 活性を促進させ、かつ protein 合成も促進する傾向がみられた。

2. serum free の条件下で PGF<sub>2α</sub> (100nM) はコントロールに比較して約30% ALPase 活性を

抑制した。

3. 20% calf serum を加えると、PGE<sub>1</sub> (10nM) の ALPase 活性促進効果が消失し、代わって 1 nM で若干活性を促進する傾向がみられた。

4. calcium 沈着量については、今回用いた系においては、PGE<sub>1</sub>は殆ど影響を与えなかった。

なお、この論文の要旨は、昭和63年12月2日第36回国際歯科研究学会日本部会において発表した。

稿を終えるにあたりご指導ご校閲を賜った西嶋克巳教授並びに岡山大学歯学部口腔生化学講座の谷口茂彦教授に深く感謝いたします。

また本研究を遂行するにあたり、ご協力頂きました岡山大学歯学部口腔生化学講座の高橋浩二郎先生並びに快く PG 提供に応じて下さいました小野薬品株式会社に厚くお礼を申し上げます。

### 文 献

- 1) Klein DC and Raisz LG : Prostaglandins : Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* (1970) **86**, 1436—1440.
- 2) Raisz LG and Koolemans-Beynen AR : Inhibition of bone collagen synthesis by prostaglandin E<sub>2</sub> in organ culture. *Prostaglandins* (1974) **8**, 377—385.
- 3) Dietrich JW, Goodson JM and Raisz LG : Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins* (1975) **10**, 231—340.
- 4) Dietrich JW and Raisz LW : Prostaglandin in calcium and bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res* (1975) **111**, 228—237.
- 5) Dowsett M, Easty GC, Powles TJ, Easty DM and Neville AM : Human breast tumor-induced osteolysis and prostaglandins. *Prostaglandins* (1975) **11**, 447—460.
- 6) Raisz LG, Vanderhoek JY, Simmons HA, Kream BE and Nicolau KC : Prostaglandin synthesis by fetal rat bone in vitro : Evidence for a role of prostacyclin. *Prostaglandins* (1979) **17**, 905—914.
- 7) Ueda K, Saito A, Nakano H, Aoshima M, Yokota M, Muraoka M and Iwata T : Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E<sub>1</sub> in infants with cyanotic congenital heart disease. *J Pediatr* (1980) **97**, 834—836.
- 8) Yonaga T, Morimoto S : A calcitonin—like action of prostaglandin E<sub>1</sub>. *Prostaglandins* (1979) **17**, 801—819.
- 9) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) **193**, 265—275.
- 10) 遠藤浩良 : 軟骨細胞の基質代謝とホルモン—特に組織培養による研究を中心として. *結合組織* (1974) **6**, 139—148.
- 11) Robinson R : The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem J* (1923) **17**, 286—293.

- 12) Fleisch H and Neuman WF : Mechanisms of calcification : Role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Am J Physiol* (1961) **200**, 1296—1300.
- 13) 大井田新一郎, 鈴木ミチ子, 佐々木哲 : アルカリフォスファターゼの生化学. *骨代謝* (1979) **12**, 25—33.
- 14) Hakeda Y, Nakatani Y, Hiramatsu M, Kurihara N, Tsunoi M, Ikeda E and Kumegawa M : Inductive effects of prostaglandins on alkaline phosphatase in osteoblastic cells, clone MC 3T3-E1. *J Biochem* (1985) **97**, 97—104.
- 15) Yu J, Wells H, Royan WJ and Lloyd WS : Effect of prostaglandins and other drugs on the cyclic AMP content of cultured bone cells. *Prostaglandins* (1976) **12**, 501—513.
- 16) Chambers TJ, Fuller K and Athanasou NA : The effect of prostaglandins I<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and dibutyryl cyclic AMP on the cytoplasmic spreading of rat osteoclasts. *Br J Exp Pathol* (1984) **65**, 557—566.
- 17) 野瀬 満 : 培養哺乳動物のアルカリホスファターゼ活性調節機構. *蛋・核・酵* (1975) **20**, 764—771.
- 18) 東島利夫, 塩川優一 : 骨粗鬆症とプロスタグランジン. *最新医学* (1983) **38**, 2217—2225.
- 19) Kumegawa M, Ikeda I, Tanaka S, Haneji T, Yora T, Sakagishi Y, Minami N and Hiramatsu M : The effects of prostaglandin E<sub>2</sub>, Parathyroid hormone, 1, 25 dihydroxycholecalciferol, and cyclic nucleotide analogs on alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* (1984) **36**, 72—76.
- 20) Nakatani Y, Tsunoi M, Hakeda Y, Kirihara N, Fusita K and Kumegawa M : Effect of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1984) **123**, 894—898.
- 21) Su-Chen LH, Rosemary PC and Lawrence L : Stimulation of prostaglandin biosynthesis by vasoactive substances in methylcholanthrene-transformed mouse BALB/3T3. *J Biochem* (1976) **251**, 776—780.
- 22) Kleine TC, Jungmann U : Inhibitory and stimulating effects of prostaglandins A, E, F on the in vitro biosynthesis of glycosaminoglycans and protein from calf rib cartilage. *Pharmacol Res Commun* (1977) **9**, 827—831.

**Effect of prostaglandin E<sub>1</sub> and prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>   
on bone formation of cultured chick embryonic bone  
with special reference to the alkaline phosphatase activity**

**Shigeki UEDA**

**First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,**

**Okayama University Dental School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. K. Nishijima)**

The effects of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) and prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) on bone formation were investigated with femur and tibia from 10-day chick embryo. When the bones were cultured in serum free medium, PGE<sub>1</sub> (10nM) caused a significant increase of bone alkaline phosphatase activity and a slight increase in bone protein content, whereas PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (100nM) significantly decreased the enzyme activity. On the other hand, in a medium containing 20% serum, PGE<sub>1</sub> did not affect the enzyme activity at 10nM, but slightly increased the activity at 1nM. No effect of PGE<sub>1</sub> on bone calcium content was observed in a concentration ranging from 0.1nM to 100nM. Thus, PGE<sub>1</sub> was likely to stimulate bone formation at 10nM, whereas PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  suppressed formation at 100nM.