



Prostaglandin E2 inhibits platelet-derived growth factor stimulated cell proliferation through a prostaglandin E receptor EP2 subtype in cultured rat hepatic stellate cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小出, 茂樹 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1191">http://hdl.handle.net/10271/1191</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 338号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	小 出 茂 樹		
論文題目	<p>Prostaglandin E2 inhibits platelet-derived growth factor-stimulated cells proliferation through a prostaglandin E receptor EP2 subtype in cultured rat hepatic stellate cells  (血小板由来増殖因子刺激による培養ラット伊東細胞の増殖に対するプロスタグランジン E 受容体サブタイプ EP2 を介したプロスタグランジン E2 の抑制作用)</p>		

博士(医学) 小 出 茂 樹

## 論文題目

Prostaglandin E2 inhibits platelet-derived growth factor-stimulated cell proliferation through a prostaglandin E receptor EP2 subtype in cultured rat hepatic stellate cells.

(血小板由来増殖因子刺激による培養ラット伊東細胞の増殖に対するプロスタグランジンE受容体サブタイプEP2を介したプロスタグランジンE2の抑制作用)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

肝線維化は、アルコール性肝障害、ウイルス性肝炎、鉄過剰症などにより引き起こされ、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの沈着する病態である。この細胞外マトリックスの産生に最も重要な役割を果たしている細胞が伊東細胞である。線維肝においては伊東細胞の増加が認められていることから、伊東細胞の増殖を抑制することにより肝線維化を抑制できるものと考えられる。

プロスタグランジン(PG)は、強い生理活性作用をもつアラキドン酸の酸素添加代謝産物であり、全身のあらゆる臓器で産生され、産生局所において多種多様な生体調節作用を示す。肝臓では、類洞壁細胞であるKupffer細胞、内皮細胞、伊東細胞から産生・分泌され、パラクライン、オートクラインで作用している。PGE2は、主としてKupffer細胞から産生、分泌され、伊東細胞に対しては増殖抑制作用を示すことが知られている。しかし、その抑制機序は未だ明らかにされていない。最近、PGE2の受容体が同定され、4つのサブタイプEP1, EP2, EP3, EP4があることが明らかとなった。そこで、伊東細胞におけるPGE受容体サブタイプを同定し、PGE2による増殖抑制作用がどの受容体サブタイプを介しているのか明らかにすることを目的とした。

### [材料ならびに方法]

SD雄性ラット正常肝をプロナーゼ・コラゲナーゼ灌流消化し、ナイコデンツ比重遠心法にて伊東細胞を分離した。細胞は20%血清を含むM-199培地にて培養し、72時間後より0.4%血清存在下に添加培養実験を行った。PGE2やPGE受容体サブタイプ特異的アゴニストあるいは対照群として0.1%dimethyl sulfoxide (DMSO)を添加し1時間後に10ng/mlの血小板由来増殖因子(PDGF)を添加して24時間培養した。細胞増殖能は、 $[^3\text{H}]$ thymidineを16時間標識しTCA不溶画分の放射活性を測定し評価した。PGE受容体サブタイプの同定には、Acid Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC)法にてtotal RNAを抽出後、PGE受容体サブタイプEP1, EP2, EP3, EP4のspecific primersを用いたRT-PCR法でサブタイプのmRNAの発現を検討した。

また、0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)存在下にPGE2やEP2, EP4受容体サブタイプ特異的アゴニストを添加し、細胞内サイクリックAMP(cAMP)の生成を測定した。

### [結果]

PGE2はPDGF刺激によるDNA合成を0.01  $\mu\text{M}$ から1  $\mu\text{M}$ の範囲で濃度依存性に抑制し、1  $\mu\text{M}$ 濃度では51%の抑制を示した。RT-PCR法を用いてPGE受容体サブタイプの発現を検討したところ、EP1, EP2, EP3, EP4のmRNAが全て認められた。EP2特異的アゴニスト(ONO-AE1-259-01)は、PDGF刺激によるDNA合成を濃度依存性に抑制し、100nM濃度で51%の抑制を示した。一方、他の受容体サブタイプに対する特

異的アゴニストでは明らかな抑制作用は観察されなかった。また細胞内cAMPのレベルはIBMX存在下において対照群( $170 \pm 4 \text{ pg/well}$ )に比してEP2特異的アゴニスト(ONO-AE1-259-01,  $100 \text{ nM}$ )で $316 \pm 70 \text{ pg/well}$ 、EP4特異的アゴニスト(ONO-AE1-329,  $100 \text{ nM}$ )で $232 \pm 60 \text{ pg/well}$ 、PGE2( $1 \mu \text{ M}$ )で $286 \pm 39 \text{ pg/well}$ と上昇が認められた。

#### 〔考察〕

ラット培養伊東細胞において細胞内cAMPの増加が細胞増殖を抑制することはよく知られている。cAMPのデータはEP2やEP4特異的アゴニストが受容体を介して作用している事を示している。PDGF刺激による細胞増殖をPGE2が抑制する機序は、PGE受容体サブタイプEP2を介して誘導されるcAMPの上昇にもとづく可能性が考えられた。ラット培養伊東細胞にはcAMPをセカンドメッセンジャーとするPGE受容体サブタイプEP4も発現したが、EP4特異的アゴニストにおいて細胞増殖抑制作用が認められなかった。これはEP4のdesensitizationを受け易い性質による不十分な細胞内cAMPの増加にもとづく可能性が考えられた。

#### 〔結論〕

ラット培養伊東細胞には、PGEレセプターサブタイプであるEP1, EP2, EP3, EP4が表出しているが、PGE2による増殖抑制作用は、EP2を介した細胞内cAMPの上昇による可能性が考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

#### 〔はじめに〕

肝炎から肝硬変に進行していく過程で、肝線維化はコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの沈着する病態である。細胞外マトリックスは主として伊東細胞が産生している。肝組織内の線維増生では伊東細胞が増加しており、この伊東細胞の増殖を抑制することが肝の線維化、肝硬変の進行の防止につながるものと考えられる。

プロスタグランジン(PG)は強い生理活性作用を持ち、全身のあらゆる臓器で産生され、産生局所において多様な生体調節作用を示す。肝臓ではKupffer細胞、内皮細胞、伊東細胞から産生・分泌され、パラクライン、オートクラインで作用している。PGE2は主としてKupffer細胞から産生され、伊東細胞の増殖抑制作用を示すが、その機序は不明である。また最近、PGE2の受容体が同定され、4つのサブタイプがあることが明らかにされたが、伊東細胞のPGサブタイプについての研究はない。

本研究の目的は伊東細胞におけるPGE受容体サブタイプを同定し、PGE2による増殖抑制作用はどのサブタイプを介して作用しているかを明らかにすることである。

#### 〔対象と方法〕

(1)SD系雄性ラットから伊東細胞を分離・培養し、72時間後から薬物の添加培養実験を行った。(2)PGE2およびPGE受容体特異的アゴニストを添加し、血小板由来増殖因子(PDGF)を添加して、24時間培養した。(3) $^3\text{H}$ -thymidineの取り込みにより増殖能を観察した。(4)RT-PCR法でPGE受容体サブタイプEP1, EP2, EP3, EP4のmRNAの発現を検討した。(5) $0.5 \text{ mM}$  3-isobutyl-1-methylxanthineの存在下でEP2, EP4の受容体サブタイプ特異的アゴニストを添加し、細胞内cAMPの生成を測定した。

## 〔結果〕

- (1) PGE<sub>2</sub>は0.01  $\mu$  Mから1  $\mu$  Mの範囲で濃度依存性にPDGF刺激によるDNA合成を抑制した。
- (2) 伊東細胞にはEP1, EP2, EP3, EP4のすべてのmRNAが認められた。
- (3) EP2特異的アゴニスト(ONO-AE1-259-01)はPDGF刺激によるDNA合成を濃度依存性に抑制した。他の受容体サブタイプのアゴニストでは抑制作用は認められなかった。
- (4) 伊東細胞内のcAMPはEP2, EP4受容体アゴニストおよびPGE<sub>2</sub>の投与で対照に比して有意に上昇した。

## 〔結論〕

ラット培養伊東細胞には、PGE受容体サブタイプであるEP1, EP2, EP3, EP4のすべてが発現するが、PGE<sub>2</sub>による増殖抑制作用はEP2を介した細胞内cAMPの上昇によると考えられる。

本論文は伊東細胞にPGEの4つの受容体サブタイプを発現すること、PGE<sub>2</sub>はEP2サブタイプを介して伊東細胞の増殖を抑制することを明らかにした。このような報告はなく、審査委員はこれに対し、十分originalityのある結論であると高く評価した。この発表の際、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 伊東細胞の機能について
- 2) 血小板の伊東細胞活性化への関与について
- 3) 伊東細胞の増殖を抑制する物質について
- 4) 伊東細胞の分離培養について
- 5) EP4 agonistで増殖抑制反応がなかった理由
- 6) EP1, EP3とEP2, EP4の機能が相反するのになぜEP2しか反応しないのか
- 7) PDGFが細胞の増殖促進に働く機序
- 8) cAMPの上昇が細胞増殖を抑制する機序

これらの質問に対し申請者の解答はおおむね適切であり、本研究での問題点を十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	中 村	達
	副査	梅 村 和 夫	副査 花 井 洋 行