HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A study on effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on differentiation capacity of canine osteogenic cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	呉, 南佶
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11274号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56302
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Namgil_Oh_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：呉　南　佶

審査委員

主査　教授　奥村正裕
副査　特任教授　伊藤茂男
副査　教授　昆泰寛
副査　准教授　細谷謙次

学位論文題名

A study on effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on differentiation capacity of canine osteogenic cells

（イヌ骨芽細胞の分化に対する非ステロイド性抗炎症薬の影響に関する研究）

非ステロイド性抗炎症剤(NSAIDs)は、主にシクロオキシゲナーゼ(COX)の活性を阻害することでエイコサノイドの発現を抑制して鎮痛効果などを発現させる。COXはさまざまな組織・細胞で発現・誘導され、NSAIDsによって生理的にCOXを必要とする器官や組織で副作用が引き起こされる。しかし、炎症刺激によってCOX-2が過剰発現することによりプロスタグランジン(PG)E_2が大量に産生されることは、痛みを誘発する主原因であるが、この過剰に生成されたPGE_2は骨芽細胞の増殖と分化を促進させる重要な因子でもある。そのため、鎮痛を目的としたNSAIDsの使用は骨折部位のPGE_2濃度を減少させ、骨折治癒を遅延させる可能性がある。一方で、生体の過剰な恒常性維持機構の活性化を誘導する疼痛は、骨折治癒の際に、生体にとって大きな負担となる。本研究では、イヌ骨形成細胞の分化能力に対するNSAIDsの影響を検討し、NSAIDsの存在下での骨折治癒機転初期の細胞反応を解析することを目的とした。

第1章では、骨芽細胞の骨分化におけるNSAIDs短期間作用による影響を検討した。骨芽細胞の骨分化モデルとして、*in vitro*で自律的に骨芽細胞様細胞へ分化するイヌ骨肉腫由来細胞株POS細胞が用いられた。この細胞株は基質を石灰化させるまで、前骨芽細胞期、移行期および成熟骨芽細胞期の段階的分化を示す。本細胞の各骨分化段階にカルプロフェンまたはメロキシカムを72時間作用させ、定量的real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)を用いて骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)およびオステオカルシンの遺伝子発現を評価するとともにALP酵素活性と染色性、さらにvon Kossa染色を用いて細胞集塊の石灰化を観察した。その結果、骨分化移行期においてオステオカルシンの遺伝子発現が抑制され、非石灰化細胞集塊の形成が遅延することが示された。しかし、各薬剤について作用期間に関係なく、薬剤の作用が中止された後に骨分化が進行し、石灰

化細胞集塊の形成時期に差はみられなかった。この結果から、これらの薬剤が骨芽細胞に可逆的に作用すること、および薬剤により骨分化が抑制されていた細胞は、薬剤の中止後に分化がより促進され、石灰化する際にはそれらの影響はほとんどなくなることが示唆された。

第2章では、NSAIDsによるPGE_2生成抑制に対する骨芽細胞の反応について検討した。正常なPGE_2生成能を示す骨分化細胞として、イヌ骨髄由来間葉系幹細胞を骨分化させて用いた。それらを炎症刺激(1 ng/mlのヒトリコンビナント(rh)IL-1β)し、同時にカルプロフェン、メロキシカム、インドメタシンおよびロベナコキシブを20日間作用させた。第1章と同様にALP、オステオカルシンおよびCOX-1、COX-2、cPGES、mPGES-1、さらにPGE_2受容体であるEP2およびEP4遺伝子発現量の変動をqRT-PCRを用いて評価した。また、ALP、オステオカルシンおよびPGE_2の培養液中濃度、ALP染色によるALP陽性細胞のコロニー形成状況およびアリザリンレッド染色による石灰化の観察を実施した。これら細胞におけるALP遺伝子発現および培養液中ALP活性は培養開始から4日目に最大に達したが、薬剤の作用によってその発現が有意に抑制された。ALP陽性細胞のコロニー形成能も同様に抑制されたが、PGE_2の添加により、対照細胞と同様のレベルに回復することが確認された。培養開始20日目には、NSAIDsによってオステオカルシン蛋白の産生量が抑制されていなかったにも関わらず、石灰化の程度は対照細胞より有意に低下し、長期間のNSAIDs投与によるPGE_2産生の絶対量の減少がALPの発現を抑制していることが示された。なお、培養開始4日目にPGE_2産生関連酵素およびその受容体の遺伝子発現が増加しており、骨芽細胞では細胞周囲のPGE_2濃度低下に対応する代償的な反応が存在することが示唆された。これらの結果から、NSAIDsの作用に対する骨分化細胞の反応としてPGE_2低下を補完する代償機構が存在し、薬剤（カルプロフェンおよびロベナコキシブ）によっては、骨分化に与える影響が限定的であることが示唆され、骨分化過程におけるNSAIDs使用による影響は最小限である可能性が示唆された。

以上のように、本研究結果から、骨折発症動物に対するNSAIDsによる骨分化遅延はその臨床的な使用様式ではかなり軽微である可能性が示された。これらの知見は、同薬剤の臨床使用における主反応・副反応の発現に関する理解に有益な情報となると考えられた。よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者呉南佶氏の学位論文は，北海道大学大学院獣医学研究科規程第６条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。