

平成 30 年 4 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10459

研究課題名(和文) マクロファージの自然免疫応答能から探る人工関節インプラント感染症

研究課題名(英文) Innate immunity reaction in macrophage for periprosthetic joint infection

研究代表者

高木 理彰 (Takagi, Michiaki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：40241707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント感染症に対する生体反応機構には未だ不明な点が多い。生体反応機構の解明により感染症の発生や病態の進行を抑制することで、人工関節の長期成績が向上すると期待されている。本研究では種々の炎症病態に深く関与する自然免疫系受容体、特にマクロファージに発現するToll様受容体(Toll-like receptor: TLR)とNod様受容体(Nod-like receptor: NLR)に着目し、感染性人工関節周囲組織におけるマクロファージサブタイプ分類とそれらにおける自然免疫系受容体、その関連分子の組織局在と機能解析を行い、人工関節インプラント感染症における生体反応機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：One of big problems is periprosthetic joint infection (PJI) in total joint arthroplasty. PJI cause a severe loosening of implant. Innate immunity and its effector mechanism with immune sensors, Toll-like receptor (TLR) and Nod-like receptor (NLR) at the forefront of host defense. We've reported the presenting of several TLRs and NLRs in macrophages of septic granuloma. We summarized TLRs and NLRs in septic THA. When TLRs recognized abnormal antigens, they stimulate production of proinflammatory cytokines and inflammasome. Innate sensors including TLRs or NLRs were well-equipped in each subset of macrophage in septic loosening tissues around artificial hip joint in different manner depending on the pathologic conditions.

研究分野：整形外科学

キーワード：人工関節 インプラント感染症

1. 研究開始当初の背景

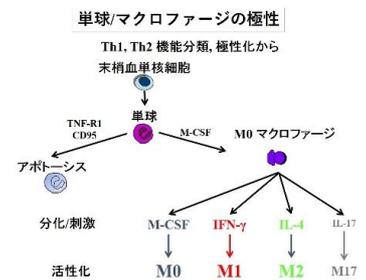
人工関節は、現在、膝関節、股関節を中心に、少なくとも年間 200 万件以上の手術が世界中で行われていると推定されている。現在も、変形性関節症、関節リウマチをはじめ、末期の関節障害の治療に人工関節はなくてはならない治療法の一つで、日常生活の質の向上に大きく貢献している。しかし、インプラント感染症は未だ長期成績に大きく影響している (Darouiche RO, N Engl J Med 2004)。米国からの報告では人工関節インプラントに関連した感染症発生率は 2.0% (12,000/600,000 件) で、灌流、抜去、再置換術を必要とすることが多く、時に重度の関節機能障害を残すため、患者の精神、肉体的負担、医療費の高額化、社会生産性の喪失など、看過できない社会問題となり、今も増加傾向を示している。

これまで、人工関節摩耗粉に対する骨溶解や周囲結合組織の脆弱化における生体反応機構に関する研究においてマクロファージを中心とした細胞性反応と破骨細胞性骨吸収機構を解析し、弛緩人工股関節周囲骨組織の病態解析から周囲骨組織の再生能を生かした機能再建術やインプラントの選択に応用してきた (Takagi, JBMR, 2007)。この一連の研究の過程で人工関節周囲の生体反応に自然免疫機構が関与することを示し、インプラント感染症における TLR を介した自然免疫系細胞の生体応答を解析する機会に恵まれ、その成果を報告してきた (Tamaki Y, J Rheumatol 2008)。

現在、免疫学の分野では、感染症の成立、病態形成に自然免疫が大きな役割を果たしていることが明らかとなりつつある。初期の生体防御反応に深く関わる自然免疫を担う受容体の TLR, NLR に大きな注目が集まっている。TLR は膜貫通型タンパク質で、細胞表面やエンドソームに発現し、ヒトでは 10 種類の TLR の存在が報告されている。細菌、真

菌、ウイルスなどの病原性微生物由来分子、さらに自己構成成分に対して NLR は細胞質やインフゾーム内に存在する自然免疫センサーで、NOD1, 2, NLRP3, AIM2 の各受容体が同定されている。病原性細菌の菌体成分や自己構成成分を認識し NF- $\kappa$ B, AP-1, caspase-1 の経路を通して TNF- $\alpha$  や IL-1 の産生を誘導する。菌体成分を用いたリガンド刺激では TLR を介したシグナル伝達間に促進的ないしは抑制的な相互作用が存在すること、また TLR と NLR 経路の協調作用が炎症反応を増強することも明らかとなっている (Martinon F, Nature 2006, Jonston LAB, Arthritis Rheum 2010)。インプラント感染症はバイオフィーム形成性の病態を呈して遷延化することも少なくない。この過程に TLR と NLR を介した免疫応答が深く関与する可能性が示唆され (Tamaki Y, J Rheumatol 2008)、同時に免疫応答調節分子の使用やインテリジェントマテリアルの併用によって、自然免疫応答を制御してインプラント感染症の発生、炎症の遷延化を抑制できる可能性が示されつつある。さらにこれまでの研究で、自然免疫応答の最前線を担うマクロファージは少なくとも 3 つの大きなサブタイプ (M0, M1, M2) に分類され、それぞれ異なった免疫応答を担当することが明らかになりつつある (Gleisner CA, Frontphysiol 2012、下図)。

このマクロファージのサブタイプの割合、機能の差が、細菌の侵



入、感染成立の際の異物の感知、さらにそれに続く、好中球の感染局所への動員、感染巣での菌体成分や壊死組織への応答の制御に大きく影響することが指摘され始め、細菌感染に対する生体反応の個体差、さらに、それ

に基づいた治療の可能性も指摘されている。

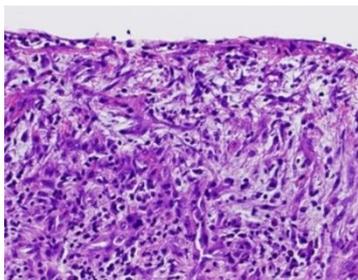
## 2. 研究の目的

本研究では種々の炎症病態に深く関与する自然免疫系受容体、特にマクロファージに発現する Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) と Nod 様受容体 (Nod-like receptor: NLR) に着目し、これらの関連分子の組織局在と機能解析を行い人工関節インプラント感染症における生体反応機構を解明した。

## 3. 研究の方法

1. 病理組織学的検索として、股関節ないしは膝関節手術から得られた感染性人工関節周囲組織 (30 例)、非感染性弛緩人工関節周囲組織 (30 例)、変形性関節症 (30 例)、関節リウマチ由来の滑膜組織 (30 例) を用いた。

パラフィン包埋組織切片・HE 染色 (右図) による細胞形態評価と



凍結組織切片・免疫組織染色によりマクロファージ (CD68)、好中球 (CD15) を同定し、対象組織の細胞分布を明らかにした。免疫組織学的検討は、マクロファージ (CD68)、好中球 (CD15) における自然免疫系受容体 TLRs, NLRs 及びそれらの関連分子の、TLRs (TLR1-9)、MyD88、TRAF 3/6、IRF、IFN-、NLRs (NOD 1, 2, NLRP3, AIM2)、caspase-1、TNF-、IL-1 の局在の有無を蛍光二重染色法で判定した。マクロファージのサブタイプは M0 (CD68+, MMP8+, CD206-), M1 (CD68+, iNOS+, CD206-), M2 (CD68+, CD163+, CD206+, HO-1+) で判定した。以上の検討から感染性人工関節周囲組

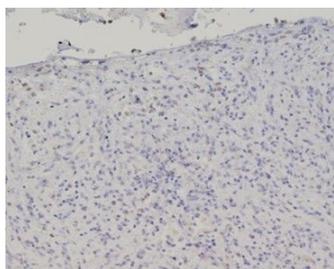
織におけるマクロファージサブタイプ分類と、合わせてマクロファージにおける自然免疫系受容体 TLRs, NLRs 及び関連分子の発現動態を病理学的手法にて明らかにした。

2. 培養細胞解析として、C57BL/6 マウス大腿骨からフィルター濾過法にて、骨髓細胞を採取し、M-CSF (10ng/ml)、G-CSF (10ng/ml) 存在下に 3 日間培養した。次いで分化誘導した培養細胞から選択カラムを用いてマクロファージ分画 (M0)、好中球分画を作製し、さらに IFN- 刺激で M1 マクロファージ、IL-4 刺激で、M2 マクロファージ分画を誘導した。各分画における CD68, CD11b, CD15, IL-10, IL-12 発現率を蛍光抗体標識フローサイトメトリー (FACS) で解析し、同時に蛍光二重標識法を用いて TLRs, NLRs 及びそれらの関連分子の標識率、標識強度を明らかにした。mRNA、蛋白レベルの解析として、各細胞分画から mRNA、蛋白を抽出し、それぞれ RT-PCR 法/PCR 法、免疫ブロット/ELISA 法を用いて、TLRs, NLRs 及びそれらの関連分子について mRNA、蛋白レベルでの発現動態を明らかにした。

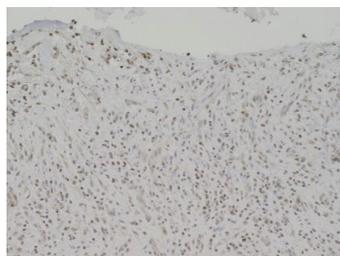
3. 菌体成分刺激試験のため、LPS を水溶性液体として用いた。液体化した各菌体成分をマイクロインプラントに 100  $\mu$ M/ml, 1mM/ml, 100mM/ml の濃度で無菌的に塗布、乾燥させてマウス体内に挿入し、病理組織学的解析を 2、3 の方法で解析した。培養細胞の FACS 並びに mRNA / 蛋白発現解析として、液体化した各菌体成分を 100 nM/ml, 1  $\mu$ M/ml, 100  $\mu$ M/ml の濃度で培養液に添加して、菌体成分刺激による TLRs, NLRs 及びそれらの関連分子の発現動態を解析した。RNA 干渉法による mRNA、蛋白発現の検討として、菌体成分刺激による TLRs, NLRs 及びそれらの関連分子の mRNA の発現動態を解析した。

## 4. 研究成果

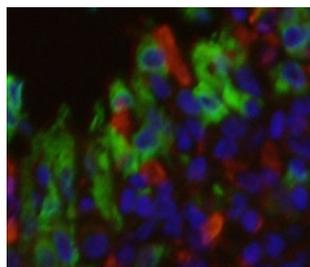
感染性人工関節周囲組織は、非感染性弛緩人工関節周囲組織や変形性関節症由来の滑膜組織と比較し、マクロファージ(CD68、右図)と好中球(CD15)優位の組織像を



示し、関節リウマチ由来の滑膜組織とも異なる細胞分布であった。また、マクロファージ(CD68)、好中球(CD15)における自然免疫系受容体TLRs(TLR1-9、右図; TLR 2)とNLRs(NOD 1, 2, NLRP3, AIM2)、それらの関連



分子であるMyD88、TRAF 3/6、IRFの発現も免疫組織化学法と蛍光二重染色法で明らかにした。さらに、IFN-、caspase-1、TNF-、IL-1の発現も明らかにした。マクロファージのサブタイプはM0(CD68+, MMP8+, CD206-), M1(CD68+, iNOS+, CD206-), M2(CD68+, CD163+, CD206+)で判定し、M2(CD68+, CD163+, CD206+, HO-1+)の存在を明らかにした(右図; M2マクロファージ)。



培養細胞解析では、C57BL/6マウス大腿骨の骨髓細胞から分化誘導し、抽出したマクロファージ分画が、IFN-刺激でM1マクロファージ、IL-4刺激でM2マクロファージ分画に誘導することを明らかにした。

各分画におけるTLRs、NLRs及びそれらの関連分子を蛍光二重標識法を用いて明らかにした。また、各細胞分画からmRNA、蛋白を抽出し、それぞれRT-PCR法/PCR法、免疫ブロット/ELISA法を用いて、TLRs、NLRs及び

それらの関連分子についてmRNA、蛋白レベルでの発現動態を明らかにした。

菌体成分刺激試験として、LPSを水溶性液体として用いた感染性人工関節周囲組織において、マクロファージ(CD68)と好中球(CD15)の局在を明らかにした。LPS刺激により、TLR5、TLR8のmRNA発現の上昇がみられた。また、NLR、NOD-1、NLRP-3、CASP1も、その発現が上昇した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 24 件)

- 1) Takagi M, Takakubo Y(1/7), Oki H, Goodman SB: Danger of frustrated sensors: Role of Toll-like receptors and NOD-like receptors in aseptic and septic inflammations around total hip replacements. J Orthop Translat 2017; 10: 1-8 (査読有り: 以下「査有」と略記)
- 2) Takakubo Y, Naganuma Y, Sasaki K, Takagi M(8/8): The Incidence of atypical femoral fractures in Patients with rheumatic disease. Yamagata prefectural committee of atypical femoral fractures (YamaCAFe) study. Tohoku J Exp Med 2017; 242: 327-334 (査有)
- 3) Yamakawa J, Takagi M(4/4): The bone regeneration using bone marrow stromal cells with moderate concentration platelet-rich plasma in femoral segmental defect of rats. Open Orthop J 2017; 11: 1-12 (査有)
- 4) Maruyama M, Takakubo Y, Takagi M(7/7): Comparison of the effects osteochondral autograft transplantation with platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin on osteochondral defects in a rabbit model. Am J Sports Med 2017; e-pub (査有)
- 5) Honma R, Takagi M(8/9), Kato Y: Establishment of novel monoclonal antibody PMab-32 against rabbit podoplanin. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 2016; 35: 41-7 (査有)
- 6) Honma R, Takagi M(7/9), Kaneko MK, Kato Y: Critical epitope of anti-rabbit podoplanin monoclonal antibodies for immunohistochemical analysis. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 2016; 35: 65-72 (査有)
- 7) Honma R, Takagi M(7/9), Kato Y: PMab-44 detects bovine podoplanin in immunohistochemistry. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 2016; e-pub (査有)
- 8) Honma R, Takagi M(6/7), Kato Y: Specific detection of dog podoplanin expressed in renal glomerulus by a novel monoclonal antibody PMab-38 in immunohistochemistry. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 2016; 35: 212-216

- ( 査有 )
- 9) Iwazaki K, Takagi M (9/10), Goto K: DGK downregulation enhances osteoclast differentiation and bone resorption activity under inflammatory conditions. *J Cellular Physiol* 2017; 232: 617-624 ( 査有 )
  - 10) Kaneko MK, Takagi M (6/11), Kato Y : Development and characterization of anti-glycopeptide monoclonal antibodies against human podoplanin, using glycan-deficient cell lines generated by CRISPR/Cas and TALEN. *Cancer Med* 2017; 6: 382-396 ( 査有 )
  - 11) Kato Y, Takagi M (5/16): Novel Monoclonal antibody LpMab-17 developed by CasMab technology distinguishes human podoplanin from monkey podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2016; 35: 109-16 ( 査有 )
  - 12) Maruyama M, Takagi M (6/7): Bone-peg grafting for osteochondritis dissecans of the humeral capitellum. *J Orthop Surg* 2016; 24: 51-56 ( 査有 )
  - 13) Naganuma Y, Takakubo Y (2/8), Sasaki K (6/8), Takagi M (8/8): Lipoteichoic acid modulates inflammatory response in macrophages after phagocytosis of titanium particles through Toll-like receptor 2 cascade and inflammasomes. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104: 435-444 ( 査有 )
  - 14) Ogasawara S, Takagi M (6/8), Kato Y : Establishment of mouse monoclonal antibody LpMab-13 against human podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2016; 35: 155-162 ( 査有 )
  - 15) Takakubo Y (1/9), Sasaki K (4/9), Takagi M (9/9): Distribution of podoplanin in synovial tissues in rheumatoid arthritis patients using biologic or conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Curr Rheumatol Rev* 2017; 13: 72-78 ( 査有 )
  - 16) Kaneko MK, Takagi M, Kato Y: Monoclonal antibody LpMab-9 recognizes o-glycosylated n-terminus of human podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2015; 34:310-317 ( 査有 )
  - 17) Kaneko MK, Takagi M (4/5): Anti-podoplanin monoclonal antibody LpMab-7 detects metastatic lesions of osteosarcoma. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2015 ; 34: 154-61 ( 査有 )
  - 18) Liu X, Takagi M (7/8), Kato Y: A novel monoclonal antibody SMab-2 recognizes endogenous IDH2-R172S of chondrosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 ; 459: 636-42 ( 査有 )
  - 19) Ogasawara S, Takagi M (10/11), Kato Y : Development of monoclonal antibody LpMab-10 recognizing non-glycosylated PLAG1/2 domain including Thr34 of human podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2015; 34: 318-326 ( 査有 )
  - 20) Oki H, Takagi M (4/6), Kato Y : Characterization of monoclonal antibody LpMab-3 recognizing sialylated glycopeptide of podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2015; 34: 44-50 ( 査有 )
  - 21) Oki H, Takakubo Y (7/9), Takagi M (8/9),

Kato Y: Characterization of monoclonal antibody LpMab-7 recognizing non-PLAG domain of podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2015; 34:174-180 ( 査有 )

- 22) Oki H, Takagi M (6/8), Kato Y : Development of sensitive monoclonal antibody PMab-2 against rat podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2015; 34: 396-403 ( 査有 )
- 23) Pajarinen J, Takagi M (7/9): Modulation of mouse macrophage polarization in vitro using IL-4 delivery by osmotic pumps. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103: 1339-45 ( 査有 )
- 24) Kato Kaneko M, Takagi M (14/15), Kato Y: Isocitrate dehydrogenase mutation is frequently observed in giant cell tumor of bone. *Cancer Sci.* 2014 ; 105: 744-748 ( 査有 )

[学会発表](計 21 件)

- 1) Takagi M, (1/8): International medical support in the disaster experience from Nepal big earthquake 2015. The 90th Annual Meeting of the Japanese Orthopaedic Association, Sendai; May 2017(Symposium) B
- 2) Takakubo Y, Takagi M (9/9): Is increasing the trend of primary total hip arthroplasties for the patients with osteoarthritis, but decreasing the rate of female in super-aging area of Japan in last twelve years? EULAR, Madrid; June 2017 B
- 3) Takakubo Y, Takagi M (9/9): Trend of total hip arthroplasties in the super-aging area in Northern Japan. ISTA in Seoul, Seoul; September 2017 B
- 4) Takakubo Y, Takagi M (10/10): Postoperative rehabilitation of atypical femoral fractures in patients with rheumatic diseases. The 54th Annual meeting of the Japanese association of rehabilitation medicine, Okayama; June 2017(Session) B
- 5) 高木理彰: 人工関節によるリウマチ性股関節障害の機能障害. 第 46 回日本リウマチの外科学会, 仙台; 2017 年 8 月(イブニングセミナー)
- 6) Takakubo Y, Takagi M (10/10): Expression of podoplanin in synovial tissue of rheumatoid arthritis. The 61th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, Fukuoka; April 2017 B
- 7) Takakubo Y, Takagi M (10/10): Trend of atypical femoral fractures in rheumatic patients in the highly super aging area of North Japan. The 61th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, Fukuoka; April 2017 B
- 8) Takagi M: Innate immune system in total joint replacement. The

- 9th Clare Valley Bone Meeting, Clare Valley ; April 2016(教育講演)
- 9) Takagi M : Introduction - current knowledge of implant-related pathology. 2016 International Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies, Xi'an ; September 2016
- 10) Naganuma Y, Takakubo Y, Takagi M (10/10): Immunohistochemical localization and cellular reaction of NLRP3 inflammasomes related to TLR2 in aseptic loosening of totally replaced hip joints. 2016 ORS Annual Meeting, Orlando, March 2016
- 11) Maruyama M, Takagi M (5/5): Early postoperative magnetic resonance imaging findings after autologous osteochondral plug graft for osteochondritis dissecans of the humeral capitellum. AOSSM Annual Meeting, Colorado, July 2016
- 12) Maruyama M, Takagi M (6/6): The outcomes of Surgical treatment for ulnar neuritis in athletes: Comparison between with and without ulnar collateral ligament injury of the elbow. 13th ICSES Congress, Jeju, May 2016
- 13) Sasaki K, Takagi M (8/8): Outcome of rotational acetabular osteotomy for dysplastic follow up for minimum 15 years. Asia Pacific Orthopaedic Association 2016, Melbourne ; April 2016
- 14) Suzuki A, Takakubo Y, Takagi M (4/4): Ankle arthrodesis using a retrograde intramedullary nail with bone graft for failed total ankle arthroplasty. 6th Asian Federation of Foot and Ankle Surgeons, Nara ; November 2016
- 15) Takakubo Y Mari A, Takagi M (3/3): Microparticles in rheumatic disease. Biomedic meeting 2016, Helsinki: January 2016
- 16) Takakubo Y, Takagi M (6/6): Biologic agents improve the abnormality apoptosis of synovial tissues in rheumatoid arthritis? ORS Annual Meeting 2016, Orlando: March 2016
- 17) Takakubo Y, Takagi M (7/7): Trend of atypical femoral fractures in rheumatic patients in the highly super aging area of North Japan. European League Against Rheumatism 2016, London; June 2016
- 18) Takakubo Y, Takagi M (6/6): Expression of Toll-like receptors and distribution of immune-cells in rheumatoid synovial tissues of the patients treated by Abatacept. European League Against Rheumatism 2016, London; June 2016
- 19) Takakubo Y, Takagi M (8/8): The effect of anti-TNF inhibitors on innate immune system in synovial tissues in rheumatoid arthritis patients. 2016 International Combined Meeting of

Orthopaedic Research Societies, Xi'an ; September 2016

- 20) Takagi M : Local immune host response in periprosthetic joint infection: In the danger clear?. The 89th Annual Meeting of The Japanese Orthopaedic Association, Yokohama ; May 2016
- 21) 高木理彰 : オステオライシスの病理学的特徴. 第89回日本整形外科学会学術集会, 横浜 ; 2016年5月(教育研修講演)

【図書】(計 4件)

- 1) 高木理彰 : 4 摩耗と潤滑の基礎知識. 大谷卓也, 飯田寛和監修, 整形外科 SURGICAL TECHNIQUE BOOKS 3 人工股関節置換術 [THA・BHA]. 大阪, メディカ出版, 2016; 18-22
- 2) 高木理彰 : 23 股関節の疾患 一過性大腿骨頭萎縮症. 土屋弘之, ほか編, 今日の整形外科治療方針 第7版. 東京, 医学書院, 2016 ; 719-720
- 3) 高木理彰 : 23 股関節の疾患 急速破壊型股関節症. 土屋弘之, ほか編, 今日の整形外科治療方針 第7版. 東京, 医学書院, 2016 ; 720-721
- 4) 高木理彰 : 第5章 関節の構造, 生理, 生化学. 井樋栄二, 吉川秀樹, 津村弘編, 中村利孝, 松野丈夫監修, 標準整形外科学 第13版. 東京, 医学書院, 2016 ; 48-60

【産業財産権】

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

【その他】ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木理彰 (Takagi Michiaki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 40241707

(2)研究分担者

佐々木 幹 (Sasaki Kan)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 00444034

高窪 祐弥 (Takakubo Yuya)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号: 80431641

(3)連携研究者( )

(4)研究協力者( )