

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：11501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591929
 研究課題名（和文）
 人工関節インプラント感染症における自然免疫機構 Toll 様受容体の機能解析
 研究課題名（英文）
 Analysis on mechanisms of Toll-like receptors in infected totally hip joint replacements
 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

研究成果の概要（和文）：感染性人工関節周囲組織における Toll 様受容体ファミリー（Toll-like receptor, TLR）の TLR2, 4, 5, 9 の発現を明らかにし、その主たる細胞は好中球、マクロファージであることを示した（研究業績欄 文献 7, 9）。さらにグラム陰性桿菌由来の菌体成分 LPS を用いた刺激実験で、マクロファージにおいて TLR4 発現が抑制される一方で、TLR2 の発現が亢進する現象を明らかにした（研究業績欄 文献 9, 11）。

研究成果の概要（英文）： We have demonstrated that TLR2, 4, 5 and 9 expressions on neutrophils and macrophages in the tissue from infected totally replaced hip joints. Expression of mRNA and protein level of TLR4 on phagocytes stimulating by LPS-coating titanium particles were downregulated, but that of TLR2 were upregulated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：Toll 様受容体、シグナル伝達、人工関節、感染症、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

人工関節インプラント感染症の予防、治療は、従来、外科的手技とあわせて抗菌薬を主体とした薬物による殺菌、静菌作用によるものが主体であった。しかし、抗菌薬によって死滅した菌体成分や生体防御に際してアポトーシスを起こした局所の細胞の構成成分に対しても、Toll 様受容体（TLR）を介した自然免疫機構が過剰な宿主反応を引き起こすことが明らかになり、感染症の病態に対する概念が大きくかわりつつある（Liu-Bryan R, Arthritis Rheum 52, 2005）。これに伴って、自然免疫防御機構を考慮した治療戦略が模索されている。

2. 研究の目的

インプラント感染症の成立、波及に関与する TLR と関連分子の感染組織中の発現様式、また、マウスを用いた動物モデルと細胞培養系において、菌体成分刺激によりマクロファージや、好中球を主体とする顆粒球がどのような細胞、分子動態を示すかを明らかにする。

3. 研究の方法

感染性人工関節周囲組織における TLR 並びにアダプター分子の蛋白レベルでの組織局在を検索し、非感染性弛緩人工関節周囲組

織、変形性関節症並びに関節リウマチ滑膜組織と比較しながら、各病態間の差異を明らかにする。また、マウスを用いた細胞培養系において、菌体成分刺激により、マクロファージを主体とする免疫担当細胞がどのような細胞、分子動態を示すかを検索する。これらにより、感染によるインプラント周囲組織のTLRとアダプター分子の動態とその特性を明らかにする。

【病理組織学的検討】

感染性人工関節にて再置換術を行った際、人工関節周囲組織を採取した。また比較検討するため、非感染性弛緩人工関節周囲組織、変形性関節症(OA)の滑膜組織を採取した。採取した組織はOCTコンパウンドに包埋後、厚さ6 μ mの新鮮凍結切片を作製した。各一次抗体として、マクロファージマーカーCD68、好中球マーカーCD15、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9を用い、ABC法にて免疫組織学的検討を行った。

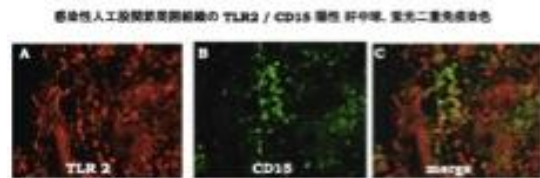
【菌体成分刺激試験】

ラット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)存在下に3日間培養する。さらに骨髓浮遊細胞選択特異カラムを用いて、マクロファージ分画を作製する。Titanium(Ti)、LPS附着Ti(Ti+LPS)を添加後、CD68、CD15、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR9、MyD88、TIRAP、TRAM、TRIF、SARM、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、CD40、CD80、CD86、IRF、IFN- γ の各分子の共局在、mRNAの発現量について、添加前、添加後15分、30分、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間での経時的な検索を行い、両群の結果を比較する。

4. 研究成果

【病理組織学的検討】

感染性人工関節周囲組織において、多形核細胞の浸潤が認められ、ほとんどがCD15陽性細胞であった。非感染性人工関節周囲組織では細胞質に富む単核細胞浸潤が認められ、ほとんどがCD68陽性細胞であった。OAの滑膜組織では炎症性細胞浸潤やリンパ球集簇はほとんど認められず、いくつかの単核細胞浸潤が認められた。また、感染性人工関節周囲組織において、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9陽性の多形核細胞浸潤とわずかな単核細胞浸潤が認められ、非感染性人工関節周囲組織ではTLR2、TLR4、TLR5、TLR9陽性の単核細胞浸潤が認められた。OAの滑膜組織でTLR2、TLR4、TLR5、TLR9陽性細胞は内皮細胞にわずかに認められるのみであった。



【菌体成分刺激試験】

骨髓細胞由来培養細胞において、CD68陽性細胞にサイトカイン、TLR4及び各アダプター分子の共局在が蛍光二重免疫染色で認められた。

mRNA発現量はTi+LPS群でサイトカインおよびTLR2の著名な亢進を認めた。TLR4はTi+LPS群でのmRNAの発現は抑制された。

Western blotでは、Ti+LPS群でサイトカインの発現が認められたが、TLR4の発現はわずかに認められたのみであった。

LPS附着Ti顆粒が骨髓細胞由来マクロファージに認識されると、TLR4の発現は抑制され、その一方でTLR2の発現は亢進する。TLR反応系を介した炎症反応が生じるとともに、それに対応して過剰な生体反応防御機構が存在することが示唆された。

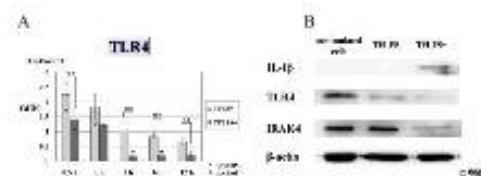


Figure A: Quantitative analysis, mRNA expression levels of TLR4 were shown. Graphs showed ratio to LPS-free particles (Ti/LPS-) and LPS-coated particles (Ti/LPS+) versus control.

Figure B: Immunoblot analysis, protein expression levels of IL-1 β , TLR4 and IRAK4 were shown.

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20件)

2011年

1) Takagi M: Toll-like receptor. A potent driving force behind rheumatoid arthritis. J Clin Exp Hematopathol 51: 77-92 (1人中1番目) 査読有。

2) Takakubo Y, Kontinen YT, Takagi M, et al.: Osteogenesis of human mesenchymal stem cells on micro-patterned surfaces. J Biomater Appl (in press) (8人中8番目) 査読有。

3) Hirayama T, Tamaki Y, Takakubo Y, Iwazaki K, Sasaki K, Goodman S, Kontinen YT, Takagi M: Toll-like receptors and their adaptors are regulated in

macrophages after phagocytosis of lipopolysaccharide-coated titanium particles. *J Orthop Res* 29: 984-992 (9人中9番目) 査読有.

4) Konttinen YT, Goodman S, Takakubo Y, Takagi M, et al.: Aseptic loosening of arthroplasty as a result of local failure of tissue homeostasis. In-Tech, Open Access Publisher, Slavka Krautzeka, Croatia (DOI: 10.5772/25817) (5人中1番目) 査読有.

5) Tamaki Y, Sasaki K, Takagi M, et al.: Postoperative prophylactic effect of fondaparinux for prevention of deep venous thrombosis after cemented total hip arthroplasty. A comparative study. *Modern Rheum* (in press) (8人中8番目) 査読有.

6) Takagi M, Konttinen YT, et al.: Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation. *J Cell Mol Med* (in press) (Epub ahead of print, doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01442.x. (6人中5番目) 査読有.

7) Tamaki Y, Takakubo Y, Hirayama T, Konttinen YT, Goodman S, Yamakawa M, Takagi M: Expression of Toll-like receptors and their signaling pathway in rheumatoid synovitis. *J Rheumatol* (Epub ahead of print, doi:10.3899/jrheum.100732) (7人中7番目) 査読有.

8) Takagi M, Takakubo Y, Konttinen YT: Laminin isoform profiles in salivary glands in Sjögren's syndrome. *Adv Clin Chem* 55: 35-59 (9人中7番目) 査読有.

9) Virkki LM, Valleala H, Takakubo Y, et al.: Outcomes of switching anti-TNF drugs in rheumatoid arthritis – a study based on observational data from the Finnish Register of Biological Treatment (ROB-FIN). *Clin Rheumatol*. 30: 1447-1454 (15人中3番目) 査読有.

10) Takakubo Y, Konttinen YT: Immune-regulatory mechanisms in systemic autoimmune and rheumatic diseases. *Clin Devop Immunol* 2012: 941346 (2人中1番目) 査読有.

11) Takakubo Y, Tamaki Y, Takagi M, et al.: Mid-term clinico-radiologic findings of an open label observation study of add on tacrolimus with biologics or non-biologic DMARDs. *Rheumatology International* (Epub ahead of print) (9人中1番目) 査読有.

2010年

12) Tamaki Y, Takagi M, Konttinen YT, et al.: Profile of Toll-like positive cells in septic and aseptic loosening of total hip arthroplasty implants. *J Biomed Mater Res A* 94: 84-92 (8人中8番目) 査読有.

13) Takagi M, Goodman SB, Konttinen YT, et al.: Titanium particles modulate expression of Toll-like

receptor proteins. *J Biomed Mater Res* 92A: 1528-1537 (8人中4番目) 査読有.

14) Konttinen YT, Takagi M, Takakubo Y, et al.: Sex steroids in Sjögren's syndrome. *J Autoimmune* (Epub ahead of print) (10人中10番目) 査読有.
2009年

15) Takagi M, Tamaki Y, Sasaki K, Takakubo Y, et al.: Cement removal and bone bed preparation of the femoral medullary canal assisted by flexible endoscope in total hip revision arthroplasty. *J Orthop Sci* 14: 719-726 (6人中1番目) 査読有.

16) Sasaki K, Takagi M, et al.: Antibiotics impregnated cement spacers in the first step of two-stage revision for infected totally replaced hip joints. *J Orthop Sci* 14: 704-710 (6人中6番目) 査読有.

17) Goodman SB, Takagi M, Konttinen YT, et al.: Biocompatibility of total hip replacement. (総説) *J Biomed Mater Res*, A91: 894-902, 2009 (4人中1番目) 査読有.

18) Okada M, Goto K, et al: Interaction of nucleosome assembly proteins abolishes nuclear localization of DGK-zeta by attenuating its association with importins. *Exp Cell Res* (12人中12番目) 査読有.

19) 高木理彰, 玉木康信, 高窪祐弥, 平山朋幸, 佐々木幹: 人工関節感染症と生体反応. *Monthly Book Orthopedics* 24:7-16 (総説) (5人中1番目) 査読無.

20) Takakubo Y, Tamaki Y, Takagi M, et al.: Mid-term results of joint preserving procedures by a modified Mann method for big toe deformities in rheumatoid patients with undergoing forefoot surgeries. *Modern Rheumatol* 20:147-153 (7人中1番目) 査読有.

[学会発表] (計 11 件)

2011年

1) Takagi M: Activated signal pathway of Toll-like receptor in the synovial-like membrane around a septic and septic loose artificial hip joints. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011年1月13日: Long Beach, U.S.A

2) Tamaki Y: Expression of Toll-like receptors (TLRs) and their signaling pathway in rheumatoid synovitis. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011年1月13日: Long Beach, U.S.A

3) Hirayama T: Modification of messenger ribonucleic acid level of Toll-like receptors and the adaptor molecules in macrophages after phagocytosis of lipopolysaccharide-coated titanium particles. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011年1月13日: Long Beach, U.S.A

4) Takagi M: Differentiation patterns in response

of Toll-like receptors and the adaptor molecules in macrophages after stimulation of lipopolysaccharides (abstract presentation). European League Against Rheumatism, 2011年5月25日: London, England

5) 玉木康信: 弛緩人工股関節周囲骨溶解現象におけるDGKとTLR4, 9の検討 (次世代ワークショップ). 第55回日本リウマチ学会総会学術集会, 2011年7月17日: 神戸, 神戸ポートピアホテル他

6) 平山朋幸: LPS付着チタン顆粒刺激によるマクロファージにおけるTLR4発現の抑制 (次世代ワークショップ). 第55回日本リウマチ学会総会学術集会, 2011年7月17日: 神戸, 神戸ポートピアホテル他

7) 玉木康信: 変形性股関節症滑膜組織におけるToll-like receptor (TLR) シグナル伝達機構の解析. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011年10月20日, 前橋, ベイシア文化ホール

8) 平山朋幸: 骨髄マクロファージにおける Toll-like receptor (TLR) とアダプター分子の発現動態の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011年10月20日, 前橋, ベイシア文化ホール 2010年

9) 高木理彰: 関節リウマチ滑膜組織におけるToll様受容体発現に関する検討(ワークショップ). 第54回日本リウマチ学会総会. 2010年4月22日. 神戸.

10) Takagi M: Expression of Toll-like receptors and their adaptor molecules in synoviocytes and sublining cells in actively inflamed rheumatoid synovial membranes. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, October 17, 2010, Kyoto, Japan.

11) Takagi M: Increased expression of Toll-like receptors and the adaptor molecules in rheumatoid synovium with active auto-immune inflammation. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2010), June 16, 2010, Rome, Italy.

〔図書〕 (計3件)

2011年

- 1) 高木理彰ほか: 人工関節全置換術: オステオライシスのメカニズムとインプラントの緩み. 2011年, 金芳堂, (pp. 39-49)
- 2) 高木理彰ほか: 人工股関節の摩耗. オステオライシスのメカニズムとインプラントの弛み. 人工股関節全置換術, 金芳堂 (印刷中) (著書: 分担執筆).
- 3) 高木理彰ほか: 摩耗とトライボロジー. 摩耗粉による生体反応. 股関節学, 金芳堂 (印刷中) (著書: 分担執筆).

〔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・講師
研究者番号: 00444034

浅野 多聞 (ASANO TAMON)

山形大学・医学部・助教
研究者番号: 10344805

(3) 連携研究者

後藤 薫 (GOTO KAORU)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 30234975

山川 光徳 (YAMAKAWA MITSUNORI)

山形大学・医学部・教授
研究者番号: 20183676