

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592252

研究課題名(和文)人工関節感染症における自然免疫系受容体TLRとNLRの機能解析

研究課題名(英文)Analyses of innate immune sensors, TLR and NLR, in periprosthetic 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：感染性人工関節周囲組織と非感染性弛緩人工股関節周囲組織におけるToll様受容体(TLR)、Nod様受容体(NLR)の発現様式について、TLR1、TLR2、TLR6並びにNLRP3の組織学的局在を明らかにし、マクロファージ、線維芽細胞、好中球に発現していることを明らかにした。またグラム陽性球菌菌体成分であるリポタイコ酸(Lipoteichoic acid: LTA)を用いてマクロファージの刺激試験を行い、TLR2、NLRP3、TNF- α およびIL-1 β のmRNA発現が亢進する一方で、骨溶解を誘導する催炎性サイトカインTNF- α およびIL-1 β の分泌には乖離が生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that TLR1, TLR2, TLR6 and NLRP3 expressions on macrophages, fibroblasts and neutrophils in the periprosthetic tissue from infected and aseptic loose hip joints. mRNA expression of TLR2, NLRP3, TNF- α and IL-1 β on phagocytes stimulating by LTA-coating titanium particles were enhanced, whereas, reinforced secretion of IL-1 β was not detected in spite of marked release of TNF- α .

研究分野：整形外科学

キーワード：人工股関節の弛み 自然免疫 TLR NLR

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変わりつつある (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、波及に關与する TLR、NLR 反応系關連分子の非感染性弛緩人工関節周囲組織および感染組織中の発現様式、また、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

非感染性弛緩人工関節周囲組織、感染性人工関節周囲組織および変形性股関節症滑膜組織における TLR、NLR 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、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、インプラント周囲組織の TLR、NLR 反応系の分子動態とその特性を明らかにする。

【病理組織学的検討】

非感染性弛緩人工関節、感染性人工関節で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、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 μm 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、D68, TLR1, TLR2, TLR6, NLRP3, TNF- α , IL-1 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】

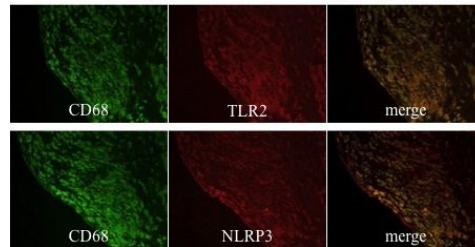
マクロファージ培養系細胞の RAW264.7 を用いて Titanium (Ti), LTA 附着 Ti (Ti + LTA) を添加後、TLR1, TLR2, TLR6, NLRP3, ASC, caspase1, TNF- α , IL-1 mRNA の発現量と培養上清への TNF- α , IL-1 の分泌量について、経時的な検索を行い、両群の結果を比較する。

4. 研究成果

【病理組織学的検討】

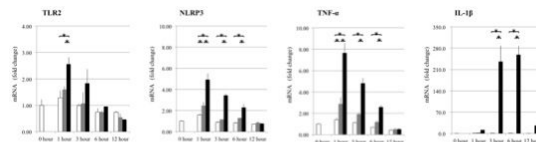
無菌性弛緩人工股関節周囲組織では、マク陽性マクロファージを主体とした異物肉芽腫が形成され、間質および表層再生滑膜に CD68 陽性細胞が認められた。CD15 陽性細胞は間質の新生血管周囲にわずかに認められた。TLR1, TLR2, TLR6, NLRP3, TNF- α , IL-1 は炎症細胞中の単核球および多核球細胞と表層滑膜細胞に強く発現していた。感染症性人工関節周囲組織では血管新生が豊富で、種々の炎症性細胞が確認されたが、CD68 陽性細胞はわずかで CD15 陽性細胞が新生血管周囲に認められた。TLR1, TLR2, TLR6, NLRP3 は好中球または単球に強く発現し、TNF- α と IL-1 は新生血管周囲組織で中等度の染色性を示した。

非感染性弛緩人工股関節周囲組織の CD68/TLR2、CD68/NLRP3 蛍光二重染色法



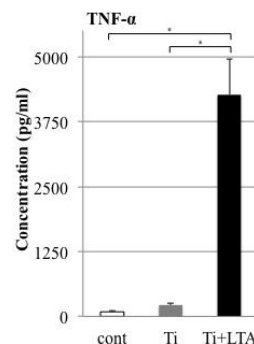
【異物貪食実験】

qRT-PCR 法では Ti 刺激により TLR2 と TNF- α の mRNA 発現が亢進し、Ti+LTA 刺激により NLRP3 と IL-1 β の mRNA 発現が増強した。



Relative quantitative analysis of mRNA of TLR2, NLRP3, TNF- α and IL-1 β in RAW264.7 cells stimulated for 0, 1, 3, 6 and 12 hours by Ti or Ti+LTA. White, grey and black bars indicated control, Ti and Ti+LTA, respectively. *p value < 0.05

ELISA 法では Ti+LTA 刺激により TNF- α の分泌量は増加したが、IL-1 β の分泌は検出されなかった。



Enzyme-linked immunosorbent assay analysis of TNF- α levels in the supernatant of cultures. RAW264.7 were stimulated for 24 hours by Ti or Ti+LTA. * p value < 0.05

LTA 付着 Ti の刺激により TLR2 および NLRP3 反応系の mRNA 発現が亢進する一方で、TNF- α と IL-1 の分泌量には乖離が生じた。この現象は IL-1 誘導性の急性炎症をともなわない非感染性弛緩人工関節の病態に合致したものと考えられた。

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 9 件)

1. Goodman SB, Konttinen YT, Takagi M. Joint replacement surgery and the innate immune system. J Long Term Eff Med Implants 査読有, 24 巻, 2014, 253-257, DOI: 10.1615/JLongTermEffMedImplants.2014010627
2. Goodman SB, Takagi M. Preface: Innate immune sensors in joint diseases. J Long Term Eff Med Implants 査読有, 24 巻, 2014, 241-242, DOI: 10.1615/JLongTermEffMedImplants.2014011853
3. Konttinen YT, Takakubo Y, Takagi M, et al. Macrophage polarization and activation in response to implant debris: influence by "Particle Disease" and "Ion Disease". J Long Term Eff Med Implants 査読有, 24 巻, 2014, 267-281, DOI: 10.1615/JLongTermEffMedImplants.2014011355
4. Huttu MRJ, Takakubo Y, Konttinen YT, et al. Cell-tissue interactions in osteoarthritic human hip joint articular cartilage. Connect Tissue Res 査読有, 55 巻, 2014, 282-291, DOI: 10.3109/03008207.2014.912645
5. Nich C, Takakubo Y, Takagi M, et al. Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements. J Biomed Mater Res A 査読有, 101 巻, 2013, 3033-3045, DOI: なし
6. 玉木康信、高窪祐弥、平山朋幸、高木理彰. 自然免疫センサー(2). Toll-like receptor (TLR)をはじめとする分子群. 整形外科. 査読無, 63 巻, 2012, 660, DOI: なし
7. 玉木康信、高窪祐弥、平山朋幸、高木理彰. 自然免疫センサー(1). Toll-like receptor (TLR)をはじめとする分子群. 整形外科. 査読無, 63 巻, 2012, 570, DOI: なし
8. 高木理彰、佐々木幹. THA の合併症対策. 骨溶解・弛み. 病態と対策. 基礎的視点から. 関節外科. 査読無, 31 巻, 2012 年, 56-63, DOI: なし
9. Waris V, Takagi M, Konttinen YT, et al. Role and regulation of VEGF and its receptors 1 and 2 in the aseptic loosening of total hip implants. J Orthop Res. 査読有, 30 巻, 2012, 1830-1836, DOI: 10.1002/jor.22138

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 玉木康信、高窪祐弥、佐々木幹、高木理彰ほか. 異物肉芽腫反応とリウマチ性関節炎におけるマクロファージの役割. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014 年 10 月 09 日~2014 年 10 月 10 日, 城山観光ホテル, 鹿児島
2. 長沼靖、高窪祐弥、佐々木幹、高木理彰ほか. リポテイコ酸付着チタン摩耗粉貪食マクロファージの免疫応答修飾における TLR2 及び NLRP3 反応系の関与. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014 年 10 月 09 日~2014 年 10 月 10 日, 城山観光ホテル, 鹿児島
3. Sasaki K, Takakubo Y, Takagi M, et al. The outcome of treatment for infected total hip. ISTA 2014 Kyoto

- Scientific, 2014年09月24日~2014年09月27日, Hotel Okura Kyoto, Kyoto, Japan
4. Naganuma Y, Takakubo Y, Sasaki K, Takagi M, et al. Analyses on immunohistochemical localization of TLR2 and NLRP3 in aseptic periprosthetic tissues around loose hip joints and their response to foreign body particles. ISTA 2014 Kyoto Scientific, 2014年09月24日~2014年09月27日, Hotel Okura Kyoto, Kyoto, Japan
 5. 玉木康信, 佐々木幹, 高窪祐弥, 高木理彰ほか. 人工股関節インプラント感染症における Toll-like receptor(TLR)を介した宿主生体反応. 第37回日本骨・関節感染症学会. 2014年06月21日~2014年06月21日, 京王プラザホテル, 東京
 6. 長沼靖, 高窪祐弥, 佐々木幹, 高木理彰ほか. 弛緩人工股関節異物肉芽腫組織における TLR2、NLRP-3 シグナル伝達機構に関する免疫組織化学的検討. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2014年04月24日~2014年04月26日, グランドプリンスホテル新高輪, 東京
 7. 長沼靖, 高窪祐弥, 佐々木幹, 高木理彰ほか. リポテイコ酸刺激マクロファージにおける TLR2 および TLR6 の発現様式. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2014年04月24日~2014年04月26日, グランドプリンスホテル新高輪, 東京
 8. 高木理彰. 人工股関節の現状と課題. 第122回中部日本整形外科災害外科学会学術集会, 2014年04月11日~2014年04月12日, 岡山コンベンションセンター, 岡山
 9. Takagi M, Sasaki K, Takakubo Y, et al. Periprosthetic osteolysis around total hip implants past, present and future. The 57th Annual Fall Congress, Korean Orthopaedic Association. 2013年10月17日~2013年10月19日, Grand Hilton Hotel, Seoul, Korea
 10. Takagi M, Goodman S. Innate immune sensors in joint diseases. 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies. 2013年10月13日~2013年10月16日, San Servolo, Venice, Italy
 11. Tamaki Y, Takakubo Y, Sasaki K, Takagi M, et al. High Mobility Group Box-1 (HMGB-1) in Aseptic and Septic Loose Total Hip Arthroplasty. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2013年01月26日~2013年01月29日, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, USA.
 12. Tamaki Y, Takakubo Y, Sasaki K, Takagi M, et al. Expression of toll-like receptors (TLRs) and cathepsin K in periprosthetic aseptic osteolysis of total hip arthroplasty. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2013年01月26日~2013年01月29日, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, USA.
 13. Naganuma Y, Takakubo Y, Sasaki K, Takagi M, et al. Irak2 maintained increased cellular reactivity of macrophages after phagocytosis lipoteichoic acid-coated titanium particles. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2013年01月26日~2013年01月29日,

- Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, USA.
14. 長沼靖、高窪祐弥、佐々木幹、高木理彰ほか。リポテイコ酸付着チタン摩耗粉貪食によるマクロファージ反応性の亢進。第27回日本整形外科学会基礎学術集会。2012年10月26日～2012年10月27日。名古屋国際会議場，名古屋
 15. 玉木康信、高窪祐弥、佐々木幹、高木理彰ほか。非感染性弛緩人工股関節周囲組織における high mobility group box-1 (HMGB-1) 発現に関する検討。第27回日本整形外科学会基礎学術集会。2012年10月26日～2012年10月27日。名古屋国際会議場，名古屋
 16. 平山朋幸、高木理彰、高窪祐弥、佐々木幹。Lipopolysaccharide (LPS) 付着チタン粒子刺激骨髄マクロファージにおける toll-like receptors (TLRs) とアダプター分子の発現。第27回日本整形外科学会基礎学術集会。2012年10月26日～2012年10月27日。名古屋国際会議場，名古屋
 17. Takagi M, Takakubo Y, Sasaki K, Konttinen YT, et al. Suppression of TLR4 and IRAK-1, 4 in macrophages after phagocytosis of lipopolysaccharide-coated titanium particles. 20th European Orthopaedic Research Society. 2012年09月26日～2012年09月28日, ACTA Building, VU University, Amsterdam, Nederland.
 18. Naganuma Y, Takakubo Y, Sasaki K, Takagi M, et al. Innate immune sensors enhanced macrophagic reaction after phagocytosis of wear debris in so called “aseptic” condition. 20th European Orthopaedic Research Society. 2012年09月26日～2012年09月28日, ACTA Building, VU University, Amsterdam, Nederland.
 19. Tamaki Y, Takakubo Y, Sasaki K, Takagi M, et al. Analysis of Toll-like receptor mediating signal pathway in periprosthetic infection. 20th European Orthopaedic Research Society. 2012年09月26日～2012年09月28日, ACTA Building, VU University, Amsterdam, Nederland.
 20. 玉木康信、高窪祐弥、佐々木幹、高木理彰ほか。感染性、非感染性弛緩人工股関節周囲組織における Toll-like receptor (TLR) シグナル伝達系の解析。第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2012年04月26日～2012年04月28日, グランドプリンスホテル新高輪, 東京
 21. 長沼靖、高窪祐弥、佐々木幹、高木理彰ほか。グラム陽性球菌由来病原体関連分子パターンによる免疫応答修飾。第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2012年04月26日～2012年04月28日, グランドプリンスホテル新高輪, 東京
- 〔図書〕(計8件)
1. 高木理彰. 股関節学: 摩耗粉による生体反応. 金芳堂. 2014, 1251
 2. 高木理彰. 人工股関節全置換術: オステオライシスのメカニズムとインプラントの弛み. 金芳堂. 2014, 238
 3. Takakubo Y, Konttinen YT, et al. Book of Bio-tribocorrosion in biomaterials and medical implants, Wear-corrosion mechanisms. In: 9. LOOSENING OF TOTAL JOINT REPLACEMENT, Woodhead Publisher, 2013, 74-110
 4. Takakubo Y, Konttinen YT, Takagi

- M, et al. Wear of orthopaedic implants and artificial joints: Materials used for hip and knee implants. Saverio A (Ed.), In: Wear of orthopaedic implants and artificial joints. Woodhead Publishing 2012, 179-218.
5. Takakubo Y, Takagi M, Konttinen Y, et al. Recent Advances in Arthroplasty: Cytokines and orchestrating of local adverse reaction to prosthetic particles. Aseptic loosening of total hip arthroplasty as a result of local failure of tissue homeostasis. InTech 2012, 332-336.
6. Takakubo Y, Konttinen YT, Takagi M, et al. Recent Advances in Arthroplasty: Does it exist something like long-term tolerance to an implant? Aseptic loosening of total hip arthroplasty as a result of local failure of tissue homeostasis. InTech 2012, 324-327.
7. Konttinen YT, Takagi M, Takakubo Y, et al. Recent Advances in Arthroplasty: What we know about the physiological reactions of the local tissue on the prosthesis and its wear products. InTech 2012, 614.
8. Takakubo Y, Takagi M, Konttinen YT, et al. Infected Total Joint Arthroplasty: Biomaterial-host interactions in aseptic and septic conditions, In: Infected total joint arthroplasty. The algorithmic approach. Springer 2012, 119-131.

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔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・准教授
研究者番号：00444034

高窪祐弥 (Takakubo Yuya)
山形大学・医学部・講師
研究者番号：80431461