

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592389

研究課題名（和文） 感作された免疫系細胞による骨吸収促進作用の解析

研究課題名（英文） A study on acceleration of bone resorption by immunized cells

研究代表者

原 宜興 (HARA YOSHITAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 60159100

研究成果の概要：

細菌と免疫系が歯周炎の発症に重要な関わりをもつことは、既に知られている。しかし実際の関与の様式は明らかでなかった。本研究では免疫系細胞のうち T 細胞に焦点を合わせ、細菌由来のリポ多糖（LPS）誘導型骨吸収におけるその関与を検討した。その結果、T 細胞は単独（B 細胞不在下）でも LPS 誘導型骨吸収に促進的に働くこと、さらに感作された個体の T 細胞は骨吸収局所において、その促進作用を発揮していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
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：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：骨吸収、免疫系細胞、感作、リポ多糖

1. 研究開始当初の背景

歯周炎の発症に、口腔内細菌と生体側の免疫機構とが深く関連していることはすでに明らかにされている。我々もこれまで LPS 誘導型骨吸収における T 細胞の重要性を示してきた。しかしながら、宿主が細菌あるいはその菌体成分によって免疫（感作）されれば、当然宿主側の免疫系に変化が起きるが、この免疫系の変化、いいかえれば変化した免疫系細胞が組織破壊にどのように関与するのかについての報告はない。歯周炎が発症する際の

条件を知るためには、この点についての研究が不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

細菌由来物質（本研究では LPS）により免疫系が感作されることで、免疫系細胞（本研究ではとくにその調節に関わる T 細胞）が非感作個体のそれとどのように変化するのかを、とくに組織破壊（骨吸収）への影響を観察することで明らかにする。

3. 研究の方法

使用した動物

実験には7週令雄性の SCID マウスおよびその野生型である CB17 マウスを用いた。

実験 1

LPS によって誘導される骨吸収への T 細胞の関与を検討するため、正常マウスの脾臓から T 細胞を精製し、これを T 細胞と B 細胞の両者が存在しない SCID マウスに、あらかじめ移入した。T 細胞移入マウス、SCID マウス、正常マウスの歯肉に $5 \mu\text{g}/3 \mu\text{L}$ の *E. coli* 由来 LPS を 48 時間おきに 13 回投与した。これらを屠殺後、顎骨を摘出して、後述するごとく病理組織学的ならびに免疫組織学的に比較観察した。

実験 2

T 細胞および B 細胞の存在しない SCID 群、無処置の野生型マウスの脾臓から T 細胞を採取して歯肉に注入する群 (以下 N-SCID 群)、および野生型マウス歯肉に *E. coli* の LPS を 13 回注入して感作したマウスの脾臓から分離した T 細胞を IL-2 と PHA で刺激し注入する群 (以下 L-SCID 群) の 3 群を作製した。SCID 群にはマウスの左側第一臼歯近心歯肉に $5 \mu\text{g}/3 \mu\text{L}$ の LPS を 48 時間ごとに 4 回投与し、24 時間後に屠殺して左側顎骨を採取した。N-SCID 群と L-SCID 群には、それぞれ無処置マウスの T 細胞、または LPS で感作されたマウスの T 細胞を 4 回目の LPS と同時に注入し、24 時間後に左側顎骨を採取した。

実験 1 および 2 の観察方法

採取した顎骨は固定、脱灰、パラフィン包埋して連続切片を作製し、10 枚ごとに HE 染色、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (以下 TRAP) 染色、CD3、interferon- γ 、RANKL 免疫染色を行った。骨吸収度の測定は、TRAP 陽性多核細胞が接触している骨表面を活性吸収面 (ARS) と定義し、マイクロメーターのラインと骨の交差点の数を計測し、総交差点に対する ARS の比率を算出した (Fig. 1)。

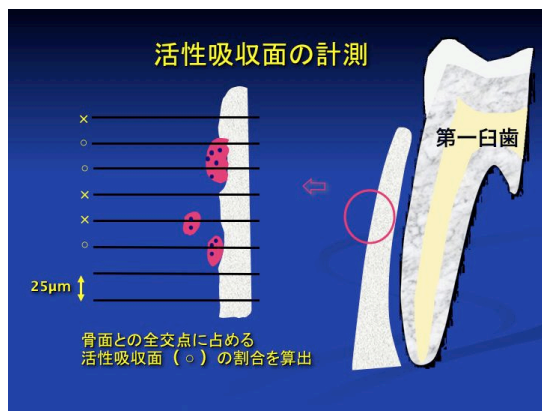


Fig. 1 活性吸収面の計測法

実験 3

実験 3 では、in vitro で破骨細胞フォーメーションアッセイを行った。LPS を 4 回投与する直前の骨面近くには組織学的に破骨細胞分化誘導因子である RANKL 陽性細胞が観察されたので、この in vivo の条件に近づけるため、骨髄マクロファージを M-CSF 存在下で RANKL にて 48 時間前処理した後に、LPS で感作もしくは非感作のマウスから得られた T 細胞と 24 時間共培養した。このとき、種々の濃度の LPS も同時に添加した。また、T 細胞との共培養時に抗 TNF- α ポリクローナル抗体、対照としてヤギの IgG あるいは RANKL の抑制因子である OPG を加えた。培養後、TRAP 染色を行い、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として計測した。

4. 研究成果

実験 1

PBS のみを注入した群 (PBS) には骨吸収は起こっていなかったが、正常マウス群 (WT) には強い骨吸収が起こっていた。一方 SCID マウス群 (SCID) には骨吸収はみられず、T 細胞移入マウス群 (SCID+T cell) にはみられた (Fig. 2)。活性吸収面を見ると、正常マウス群が最も高く、次いで T 細胞移入マウス群 (SCID+T cell)、そして SCID マウス群 (SCID) の順であった。T 細胞移入マウス群、T 細胞移入マウス群と SCID マウス群との間にはそれぞれ統計学的有意差が認められた (Fig. 3)。RANKL 陽性細胞数は SCID マウス群が最も少なく、T 細胞移入マウス群、正常マウス群の順であった。一方 interferon- γ 陽性細胞数は、T 細胞移入マウスが最も高かった。さらに interleukin-4 陽性細胞をみると、正常マウスにはその存在が観察されたものの、T 細胞移入マウスと SCID マウスには全く観察されなかった。

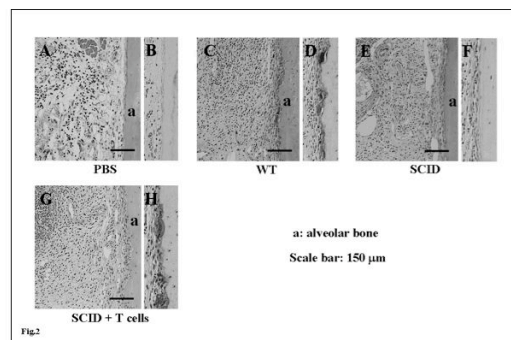


Fig. 2 各群の骨面の状態

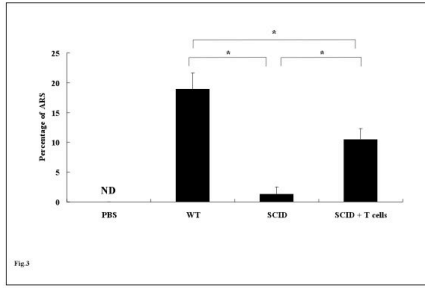


Fig. 3 活性吸収面の相違

実験 2

SCID 群では炎症性細胞の浸潤は弱く、骨面はなだらかでほとんど吸収面を認めなかった。N-SCID 群ではやや強い炎症性細胞の浸潤とわずかな骨の粗造感を認めた。L-SCID 群ではやや強い炎症性細胞の浸潤と、吸収窩が見られた (Fig. 4)。また CD3 陽性細胞は SCID 群では観察されなかった。

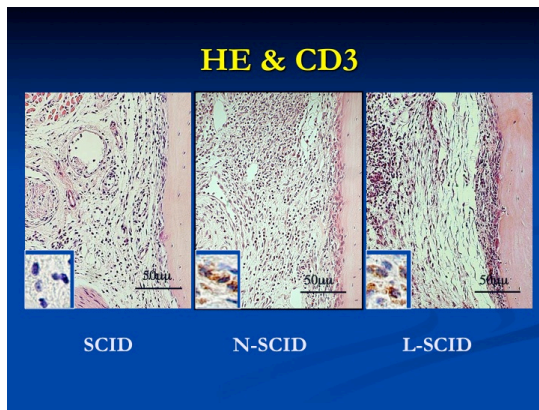


Fig. 4 骨面の状態と CD3 陽性細胞

TRAP 染色像を見ると、SCID 群および N-SCID 群では少数の陽性多核細胞しか見られなかったが、L-SCID 群では多くの陽性像を認めた (Fig. 5)。

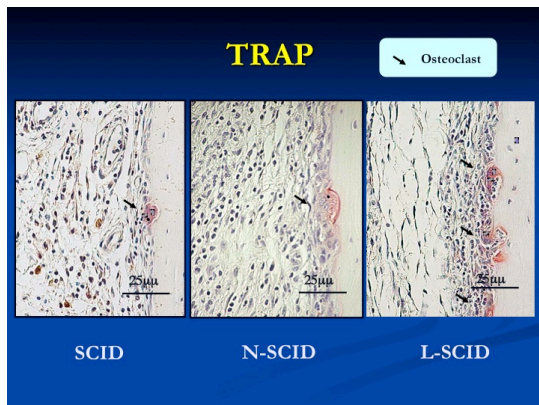


Fig. 5 TRAP 陽性細胞

活性吸収面の割合は L-SCID が SCID や N-SCID に比べて有意に高かった。一方、SCID 群と N-SCID 群に有意差はなかった。

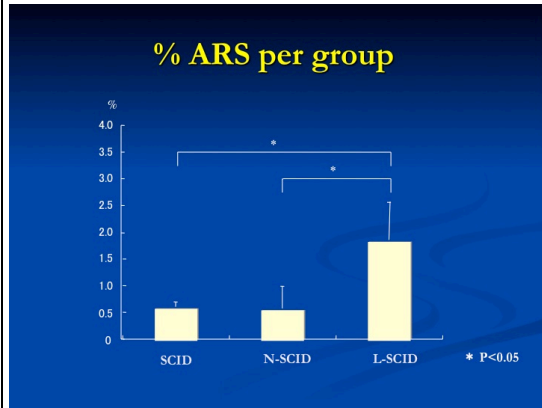


Fig. 6 活性吸収面の相違

実験 3

1ng/mL 以上の LPS を添加した場合、LPS 感作マウスからの T 細胞との共培養系では、多くの破骨細胞形成が認められた。その破骨細胞の有意な増加は LPS の濃度依存的に高くなっていった。他の 2 群では増加は認められなかった (Fig. 7)。

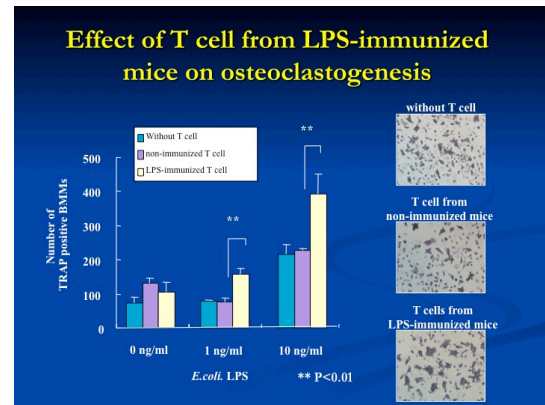


Fig. 7 In vitro における破骨細胞誘導

LPS 感作マウスからの T 細胞と骨髄マクロファージとの共培養系において、ヤギ IgG, OPG 添加は影響を及ぼさなかったものの、抗 TNF- α 抗体を添加すると T 細胞との共培養による破骨細胞形成の促進は完全に阻害された (Fig. 8)。

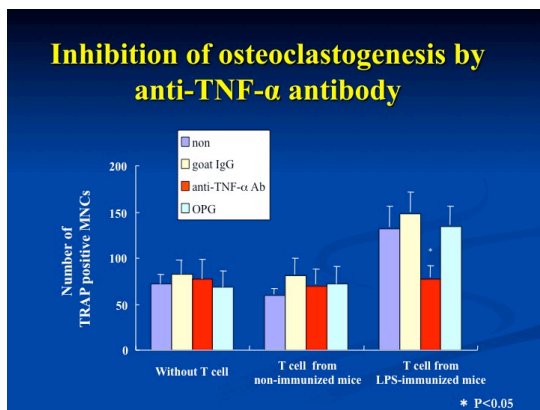


Fig. 8 抗TNF- α 抗体による破骨細胞形成阻害

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2件)

1. Yamaguchi M, Ukai T, Kaneko T, Yoshinaga M, Yokoyama M, Ozaki Y, Hara Y: T cells are able to promote lipopolysaccharide-induced bone resorption in mice in the absence of B cells. J Periodontal Res, 43 (5): 549-555, 2008. 査読有り
2. Ozaki Y, Ukai T, Yamaguchi M, Yokoyama M, Ayón Haro ER, Kaneko T, Yoshinaga M, Nakamura H, Shiraishi C, Hara Y: Locally administered T cells from mice immunized with lipopolysaccharide (LPS) accelerate LPS-induced bone resorption. Bone, in press, 2009. 査読有り

[学会発表] (計2件)

1. Hara Y, Yamaguchi M, Ukai T, Onoyama M, Yokoyama M, Ozaki Y, Kaneko T: T cells are closely related to LPS-induced bone resorption. The 11thth International Biennial Congress of International Academy of Periodontology, Bern, Switzerland, 2007.
2. Hara Y, Ozaki Y, Yokoyama M, Shiraishi C, Yoshinaga Y, Ukai T: Locally administered T cells from LPS-immunized mice accelerate LPS-induced bone resorption, The 10th International Endotoxin and Innate Immunity Society meeting, Edinburgh, UK, 2008.

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 宜興

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 60159100

(2)研究分担者

吉村 篤利

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

授

研究者番号: 70253680

金子 高士

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 10284697

(3)連携研究者

なし