

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592747

研究課題名(和文)TLRアゴニストによる免疫および慢性炎症の制御機構解明—イメージング手法を用いて

研究課題名(英文)Regulation of inflammation and innate immunity by TLR agonists

研究代表者

鈴木 恵子 (SUZUKI, Keiko)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：50119187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病や骨髄炎などにおいては、本来であれば生体を防御するための炎症反応が過剰な骨組織破壊につながり、ひいては修復不可能な病態を引き起こすことになる。骨破壊を起こす破骨細胞はToll-like receptor 4 (TLR4) およびTLR2を有することが知られているので、各々のアゴニストであるLPSおよびPam3CSK4投与により炎症性骨破壊を誘導し、イメージングおよび遺伝子解析手法を用いて実験を行った。その結果、TLR2刺激ではTLR4に比べて、炎症から免疫への移行が遅延するため、より大きな組織障害を惹起すること、すなわち、これらの受容体を介して炎症と免疫が制御されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Bacteria are a common cause of periodontitis, in which accelerated alveolar bone resorption may ultimately lead to tooth loss. It is well established that bacteria interact with host cells through components of their cell wall by binding to corresponding Toll-like receptors (TLRs). Among these, LPS, a ligand for TLR4, is the most clearly defined molecule as a potent inducer of osteoclastogenesis and bone resorption. On the other hand, the fact that TLR2, in addition to TLR4, was prominently expressed in both precursors and differentiated osteoclasts, raised the possibility that TLR2 is involved in periodontitis-associated osteolysis. In the present study, we studied whether Pam3CSK4, a ligand for TLR2, caused bone resorption in vivo. The results showed that Pam3CSK4 caused even severer alveolar bone resorption as compared to LPS, indicating that transition time from inflammation to innate immunity was prolonged in Pam3CSK4-induced osteolysis compared to that of LPS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：炎症性骨破壊 Toll-like receptor in vivo imaging 自然免疫 骨代謝治療薬

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ、歯周病、骨転移性腫瘍では重篤な骨破壊により歩行困難、歯の喪失、骨痛などが生じ、患者の QOL は著しく損なわれる。超高齢社会である我が国においては、骨強度の低下による運動制限は寝たきりに、ひいては認知症にも直結する大問題である。さらに、長年の努力により癌の治療効果があり生存期間が延長したため、乳癌・肺癌などの転移性骨破壊により起こる苦痛を緩和する必要性が高まっている。

動物が成長を停止したのちも、骨は形成と吸収のバランスがとれた代謝回転により、常に健全な状態に保たれている。ところが、炎症などの病的状態では破骨細胞が異常に活性化されるため骨破壊がおこる。

歯周病や骨髄炎などにおいては、本来であれば細菌感染に対して生体を防御するために起きた炎症反応が過剰な骨組織破壊につながり、ひいては修復不可能な深刻な病態を引き起こすことになる。この反応過程には Toll-like receptor (TLR; グラム陽性菌は TLR2, グラム陰性菌は TLR4 を介する) が関与することが知られている。

2. 研究の目的

- (1) 破骨細胞は造血幹細胞に由来し、分化誘導因子や受容体を免疫・炎症細胞と共有するため、炎症性骨破壊の病態は極めて複雑である。このように複数の細胞種が相互に関連する病的骨破壊の病態を解明し、新規治療薬を開発することを目的として、主に *in vivo* imaging 手法による研究を行った。
- (2) 本来は感染に対する宿主の防衛反応である炎症によって、過剰な組織破壊が引き起こされるメカニズムを解明するために、歯周疾患の原因となる細菌成分が宿主の TLR2 または TLR4 を介して起こす作用を詳細に検討した。

3. 研究の方法

- (1) 培養 calvaria を用いた骨吸収活性の測定
生後 5 日齢のマウスから採取した calvaria を LPS 存在下で 48 時間培養し、骨吸収活性を測定する。
固定した calvaria について免疫染色を行い、炎症反応および骨吸収のマーカー発現変化と、それに対する新規治療薬の

影響を検討する。

- (2) *in vivo* imaging による破骨細胞の体内動態の観察

SCID マウス頭蓋骨膜下に LPS または Pam3CSK4 を投与して炎症性骨破壊を起こす。

Luciferase transgenic (LucTg) ラットあるいは GFPtransgenic (GFPTg) ラット由来の骨髄細胞を MCSF (15ng/mL) 存在下で 3 日間培養し、破骨細胞前駆細胞 (Pre-osteoclast, POC) とその他の血球系細胞 (Lymphocyte) に分画する。

炎症性骨破壊を起こした SCID マウスに LucTg または GFPTg の POC または Lymphocyte を尾静注後、発光および蛍光分子の体内分布について *in vivo* 顕微鏡 (Luc: IVIS, Xenogen; GFP: OV110, Olympus) で経時的に観察する。これらのマウスから得られた頭蓋骨の凍結切片を作製し、immunohistochemistry を行うことにより、*in vivo* imaging で観察された細胞の生物学的性質について確認し同定を行う。

マウスの頭蓋骨、頭部炎症皮膚、脾臓、骨髄細胞から total RNA を調製し、real-time RT-PCR 法により、遺伝子解析を行う。

- (3) *in vivo* imaging による頭蓋骨の形態計測

生きたままのマウスを経時的に X 線 CT 撮影後 (eXplore, GE Healthcare)、3 次元画像構築し、吸収窩の容積を測定する。新規治療薬を前投与したマウス、あるいは骨破壊を確認したのちに治療薬投与を開始したマウスについても同様に X 線 CT 画像を解析することにより、治療薬の骨吸収抑制および骨形成促進効果について評価する。

4. 研究成果

- (1) 歯周疾患の原因となる細菌成分が宿主と相互作用する際に結合する受容体として Toll-like receptor (TLR) 4 または TLR2 が知られている。それぞれのリガンドである LPS または Pam3CSK4 をマウス頭蓋骨膜下に投与することにより、炎症性骨破壊が誘導された。すなわち、

TLR4のみならずTLR2アゴニストも歯槽骨破壊に關与する可能性が示された。TLR2を介して作用することが知られているグラム陽性菌成分をマウス頭蓋骨膜下またはラット口蓋骨膜下に投与すると骨破壊が誘導されたことから、TLR2の作用が確認された。

- (2) 遺伝子解析の結果から、炎症性骨破壊モデルマウスでは骨吸収マーカー (TRAP, cathepsinK, MMP9)の他に炎症性サイトカイン (TNF α , IL-1 β , IL-6) およびケモカイン (MCP-1, MIP1 α) などが増加することが示された。
- (3) In vivo実験でのLPSとPam3CSK4の比較から、TLR4よりもTLR2の方が炎症反応の経過が長引き、組織侵襲度が高いことが示された。
- (4) LPSまたはPam3CSK4を投与したマウスから継時的に採取した血液・頭蓋冠・脾臓・骨髄の蛋白および遺伝子解析の結果、LPS群ではPam3CSK4群よりも早期に樹状細胞のマーカーであるCD209e発現がみられること、血液中のIFN γ の発現量が多いこと、さらにRantes産生が増加していることが示され、炎症から免疫反応への移行がPam3CSK4に比して速やかであることが示された。
- (5) 本研究で用いたin vivo imaging手法は開発されてから数年しかたっていないため、骨代謝研究領域での応用例はまだ少ないが、異種細胞間の複雑な相互作用を損なうことなく観察できること、さらに、生きたままの動物で治療薬などの有効性を経時的に検討できることなど、従来までの手法では解明できなかった事柄について研究するうえで、極めて有用な手段となることを実証することができた。この新しい手法と従来の組織学的手法とを併用することは、炎症性骨破壊の病態解明や新規的作用メカニズムをもつ治療薬開発の一助となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Moriwaki S, Suzuki K, Muramatsu M, Nomura A, Inoue F, Into T, Yoshiko Y, Niida S: Delphinidin, One of the Major Anthocyanidins, Prevents Bone Loss

through the Inhibition of Excessive Osteoclastogenesis in Osteoporosis Model Mice. PLOS ONE, Published: May 13, 2014. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0097177
Sakai N, Morohashi T, Yamada S: Fructooligosaccharide Consumption Improves the Decreased Cortical Bone Following Gastrectomy in Rats. Dent Med Res, 33, in press, 2013. 査読有
Yano A, Suzuki K, Yamamoto M, Yamada S: Pam3CSK4, a TLR2 Agonist, Induces Osteoclastogenesis in RAW 264.7 Cells. Dent Med Res, 32:181-188, 2012. 査読有
Oka Y, Iwai S, Amano H, Irie Y, Yatomi K, Ryu K, Yamada S, Inagaki K, Oguchi K: Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. J Pharmacol Sci, 118:55-64, 2012. 査読有
Sakai N, Suzuki K, Morohashi T, Yamada S: Effects of mechanical stimulation on the expression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger mRNA and orientation of F-actin filaments in cultured osteoblastic cells. Dent Med Res, 30:117-123, 2011. 査読有
鳴沢佑香, 千葉美麗, 鈴木恵子, 村上忍, 竹山禎章, 山田庄司, 五十嵐薫, 篠田壽: 新規ビスホスホネート[4-(methylthio)phenylthio] methanebisphosphonateのanabolicな作用. Clinical Calcium, 21:756-757, 2011. 査読無

〔学会発表〕(計 9 件)

滝澤愛子, 千葉美麗, 太田岳, 安田真弓, 鈴木恵子, 篠田 壽, 五十嵐 薫: 新規ビスホスホネートが卵巣摘出ラットの骨形成に及ぼす作用 (第 73 回 日本矯正歯科学会, 千葉, 2014 年 10 月)
滝澤愛子, 千葉美麗, 太田岳, 安田真弓, 鈴木恵子, 篠田 壽, 五十嵐 薫: 新規ビスホスホネート MPMBP が骨粗鬆症モデルラットの骨形成に及ぼす影響 (第 35 回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014 年 7 月)
Suzuki K, Arimoto T, Morohashi T,

Sakai N, Karakawa A, Shinoda H, Yamada S: Pam3CSK4, a TLR2 agonist, induces *in vitro* osteoclastogenesis RANKL-independently and resorbs calvarial and alveolar bone *in vivo*. (15th International Congress of Immunology, Milan, August 2013)
鈴木恵子: 炎症性骨破壊における Toll-like receptor の役割 (薬力学研究会受賞講演、東京、2013年2月)
森脇佐和子, 鈴木恵子, 井上文秀, 村松昌, 野村篤志, 新飯田俊平: 植物アントシアニジンの骨破壊抑制効果 (第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012年7月)
Yano A, Suzuki K, Morohashi T, Arimoto T, Karakawa A, Igarashi T, Shinoda H, Yamamoto M, Yamada S: Pam3CSK4, a TLR2 agonist, induces *in vitro* osteoclastogenesis RANKL-independently and resorbs alveolar bone in rats. (ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, September 2011)
矢野亜希子, 鈴木恵子, 諸橋富夫, 有本隆文, 唐川亜希子, 五十嵐武, 山本松男, 山田庄司: TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 による破骨細胞形成とラット上顎口蓋骨吸収作用について. (第31回昭和歯学会総会, 東京, 2011年7月)
矢野亜希子, 鈴木恵子, 諸橋富夫, 唐川亜希子, 山本松男, 山田庄司: TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 による破骨細胞形成とラット上顎口蓋骨吸収作用について. (第29回日本骨代謝学会, 東京, 2011年7月)
矢野亜希子, 鈴木恵子, 山本松男, 山田庄司: TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 による破骨細胞形成とマウス頭蓋骨吸収作用について. (第54回春季日本歯周病学会学術大会, 福岡, 2011年5月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 恵子 (SUZUKI, Keiko)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号: 50119187

(2) 研究分担者

山田 庄司 (YAMADA, Shoji)
昭和大学・歯学部・名誉教授
研究者番号: 00111617

(3) 連携研究者

石井 優 (ISHII, Masaru)
大阪大学大学院医学系研究科・医学部・教授
研究者番号: 10324758

谷村 明彦 (TANIMURA, Akihiko)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号: 70217149