

LPS 誘導型骨吸収における RANKL および OPG に関する免疫組織学的研究

長崎大学大学院歯学研究科 吉本 真弓

【緒言】

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) は、受容体である (Receptor activator of NF- κ B) RANK と結合し、破骨細胞の分化、活性化、生存に促進的に関与する。また osteoprotegerin (OPG) は RANKL と RANK の結合を拮抗阻害し破骨細胞形成に抑制的に作用する。

Lipopolysaccharide (LPS) は破骨細胞性の炎症性骨吸収を強力に誘導する。これまでに、*Escherichia coli* (*E. coli*) 由来 LPS をマウス歯肉へ頻回投与することにより誘導される炎症性骨吸収の増加に伴い、骨面付近の結合組織中に多形核白血球 (PMN) や T 細胞の浸潤が多数認められるという報告がある。しかし RANKL および OPG 陽性細胞の発現がどのように変化するのか、またどの細胞が破骨細胞形成の調節に関与しているのかについては明らかではない。そこで LPS 誘導型骨吸収が増加または減少する際の骨吸収部位における RANKL および OPG 発現の変化を免疫組織学的に検討した。

【材料と方法】

E. coli 由来 LPS を PBS に $5 \mu\text{g}/3 \mu\text{l}$ の濃度で溶解し、マイクロシリンジにてマウスの左側下顎臼歯部歯肉に投与した。まず LPS を一日おきに 8 回投与後、48 時間後に屠殺した群を Base line 群とし、9 回目に LPS または PBS を投与し 24 時間後に屠殺した群をそれぞれ LPS 群と PBS 群とした。さらにコントロールとして PBS を 9 回投与して 24 時間後に屠殺した群を Injection Control 群とした。各群のパラフィン包埋したブロックから第一臼歯近心歯槽骨が観察できるような連続切片を作製し、10 枚ごとに H.E.、TRAP 染色、さらに RANKL と OPG の免疫染色を行った。また T 細胞における RANKL の発現と PMN における OPG の発現を調べるために、同一切片上で再染色法による免疫染色を行った。そして骨吸収の程度を比較するために、破骨細胞の接した骨面を活性吸収面と定め、その割合を求めた。RANKL と OPG 陽性細胞は非炎症性細胞と炎症性細胞に分類し、歯肉結合組織中の陽性細胞数を算出した。また多形核の細胞を PMN とし、全 PMN に対する OPG 陽性 PMN 数の割合を算出した。統計学的解析には Base line 群と LPS 群または PBS 群は Wilcoxon signed-ranks test、LPS 群と PBS 群を Man-whitney's U test を用いた。

【結果】

Base line 群は結合組織中に PMN を主体とした炎症性細胞の浸潤が認められ、一部の吸収窩に破骨細胞が存在した。LPS 群では PMN やリンパ球を主体とした多数の炎症性細胞の浸潤を認め、深い吸収窩に大型の破骨細胞が多数観察された。PBS 群は炎症性細胞の浸潤は少なく、吸収窩に破骨細胞をほとんど認めなかった。Injection Control 群は軽度の炎症性細胞浸潤があるものの、吸収窩や破骨細胞は存在しなかった。

活性吸収面の割合は Base line 群と比べて LPS 群は有意に増加し、PBS 群は Base line 群に較べて有意に減少した。また PBS 群は LPS 群と較べて有意に低い値を示した。

RANKL 陽性細胞数は、炎症性細胞において LPS 群が Base line 群に比べて有意に増加し、PBS 群は LPS 群に比べて有意に低い値を示した。OPG 陽性細胞数は、炎症性細胞において PBS 群が Base line 群に比べて有意に増加した。また PBS 群は LPS 群に比べて有意に高い値を示した。非炎症性細胞では LPS 群は Base line 群と比べて有意に減少し、PBS 群は LPS 群に比べて有意に高い値を示した。また LPS 群では RANKL を発現している T 細胞を、PBS 群では OPG を発現している PMN を血管周囲に多く認めた。

全 PMN 数は LPS 群が Base line 群および PBS 群に較べ有意に高い値を示した。また OPG 陽性 PMN 数は PBS 群が Base line 群および LPS 群に比べて有意に高い値を示した。これらをもとに算出した全 PMN に対する OPG 陽性 PMN の割合は PBS 群が Base line 群、LPS 群に比べ有意に高い割合を示した。

【考察】

今回の実験より、LPS 投与により炎症性骨吸収が増加する際には、RANKL を発現する炎症性細胞の増加と OPG を発現する非炎症性細胞の減少が、また破骨細胞の消失により骨吸収が減少する際には OPG を発現する炎症性細胞の増加が重要であると考えられた。また LPS 誘導性の炎症性骨吸収の促進には、T 細胞の発現する RANKL が重要な働きをしていることが示唆された。

また、PMN は OPG を発現することで破骨細胞形成に抑制的に作用していることが考えられた。