

# 横山美穂 論文内容の要旨

主 論 文

Membrane-bound CD40 Ligand on T cells from mice injected with lipopolysaccharide (LPS) accelerates LPS-induced osteoclastogenesis.

(LPS 連続投与マウスから採取した T 細胞の膜型 CD40 Ligand は LPS 存在下での破骨細胞形成を促進する)

(横山美穂、鵜飼孝、アヨンラケル、岸本隆明、吉永泰周、原宜興)

(Journal of Periodontal Research in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：原 宜興 教授)

## 緒 言

歯周炎は破骨細胞による骨破壊を伴う炎症性疾患である。歯周炎の発症にはグラム陰性細菌の感染が関与しており、病因の一つとして lipopolysaccharide (LPS) が挙げられる。LPS はグラム陰性菌の構成成分であり様々な生物学的活性をもつ。これまでに多くの研究で、LPS が破骨細胞形成を促進することが報告されている。一方、T 細胞が破骨細胞形成に関与することが明らかになっている。過去には活性化 T 細胞が receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) を産生して破骨細胞形成を促進すると報告された。そこで我々は、LPS 連続投与によって活性化されたマウスの T 細胞 (LPS-T 細胞) が破骨細胞形成へ及ぼす影響を検討した。その結果、LPS-T 細胞が *in vivo* および *in vitro* において LPS 存在下で破骨細胞形成を促進し、*in vitro* での LPS-T 細胞による破骨細胞形成促進が抗 TNF- $\alpha$  抗体添加によって完全に抑制されることを明らかにした。一方で、RANKL のデコイレセプターである OPG は LPS-T 細胞による破骨細胞形成促進に影響を与えなかった。以上より、LPS-T 細胞は LPS および TNF- $\alpha$  存在下で破骨細胞形成促進に関与すると考えられた。しかし、詳細なメカニズムは不明なままであり、LPS-T 細胞による破骨細胞形成促進メカニズムを解明することを本研究の目的とした。

## 対象と方法

我々は C.B17 マウスの下顎左側臼歯近心歯肉に *Escherichia coli* の LPS を 48 時間おきに 13 回注入し、最終投与の 24 時間後に屠殺した。そして、脾臓より T 細胞を分離し、IL-2 および PHA で 24 時間刺激した (LPS-T 細胞)。コントロールとして LPS 非投与マウスの T 細胞を同様に分離、刺激した (control-T 細胞)。そして、T 細胞とあらかじめ 1ng/ml の RANKL で 48 刺激した骨髄マクロファージ(R-BMMs) とを LPS 存在下で 24 時間共培養して破骨細胞を形成させる実験系を用いて、LPS-T 細胞による破骨細胞形成促進メカニズムを解明するために以下の *in vitro* の実験を行った。1)共培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度を ELISA にて測定し、破骨細胞および T 細胞の TNF- $\alpha$  mRNA および TNFR mRNA を RT-PCR にて測定した。2)共培養時に trans well を用いて T 細胞と R-BMMs との細胞間接触を遮断した。3)共培養時に抗 CD40L 抗体を添加して CD40L の影響を調べた。4)T 細胞における膜型 CD40L (mCD40L) 発現を FACS にて解析した。5)R-BMMs に LPS を添加すると同時に CD40L を添加した。さらに *in vivo* における CD40L の破骨細胞形成促進への影響を検討するため、6)あらかじめ LPS を 3 回注入した SCID マウスに、LPS 4 回目注入と同時に CD40L を注入した(CD40L マウス)。対照群では LPS と同時に PBS を注入した(PBS マウス)。

## 結 果

LPS 存在下において LPS-T 細胞共培養群は control-T 細胞共培養群および T 細胞を添加しなかった非共培養群と比較して有意に破骨細胞形成が促進した。各実験の詳細な結果を次に示す。1)TNF- $\alpha$  の関与を検討した結果、培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度は、非共培養群、control-T 細胞共培養群、LPS-T 細胞共培養群間で差はなかった。また、T 細胞および破骨細胞における TNF- $\alpha$  mRNA および TNFR mRNA 発現も各群で差は認められなかった。2) trans well による LPS-T 細胞と R-BMMs との細胞間接触遮断によって、LPS-T 細胞による破骨細胞形成の促進は完全に抑制された。一方、control-T 細胞共培養群では細胞間接触遮断による影響は認められなかった。3)抗 CD40L 抗体は LPS-T 細胞による破骨細胞形成を完全に抑制した。一方、非共培養群および control-T 細胞共培養群での破骨細胞形成には影響を与えなかった。4)LPS-T 細胞における mCD40L 発現は control-T 細胞と比較して大きかった。5) *in vitro* における CD40L の関与を検討した結果、CD40L は LPS 存在下では有意に破骨細胞形成を促進した。6)*in vivo* における CD40L の関与を検討した結果、CD40L マウスの歯槽骨表面は粗造で破骨細胞が数多く認められた。一方、PBS マウスの歯槽骨表面はスムーズで破骨細胞はわずかに観察される程度であった。

## 考 察

我々は本研究で、CD40L が LPS、TNF- $\alpha$  および RANKL 存在下での破骨細胞形成促進に関与することを示唆した。さらに、LPS-T 細胞の mCD40L が破骨細胞形成を促進することも示唆された。我々は LPS-T 細胞による破骨細胞形成促進において TNF- $\alpha$  の存在が重要であることを明らかにした。この TNF- $\alpha$  産生は主に LPS 刺激を受けた R-BMMs によるものと思われる。我々は本研究において、mCD40L、LPS および TNF- $\alpha$  からのシグナルにより R-BMMs での NF- $\kappa$ B、MAPK が活性化され破骨細胞形成が促進したと考えている。また、実際に歯周炎炎症局所には T 細胞の浸潤が観察されることから、LPS、TNF- $\alpha$ 、RANKL が存在する炎症局所に mCD40L 陽性 T 細胞が浸潤した場合、破骨細胞形成促進、骨吸収・骨破壊の増悪が生じ、歯周炎の進行に深く関与すると考えられる。