

岸本 隆明 論文内容の要旨

主論文

Peptidoglycan and lipopolysaccharide synergistically enhance bone resorption and osteoclastogenesis

(ペプチドグリカンとリポ多糖は骨吸収と破骨細胞形成を協調的に増強する)

(岸本 隆明、金子 高士、鵜飼 孝、横山 美穂、Ayon Haro Esperanza Raquel、
吉永 泰周、吉村 篤利、原 宜興)

(Journal of Periodontal Research ・ 掲載時期は未定)

[ページ数未定]

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

グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS)は Toll-like receptor (TLR) 4 を介して NF- κ B を活性化する。一方、すべての細菌に存在するペプチドグリカン (PGN) は TLR2 を刺激することにより、そしてその分解産物の γ -D-Glu-DAP (iE-DAP)、ムラミルジペプチド (MDP) はそれぞれ Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 1、NOD2 を介して、NF- κ B を活性化することが示されている。また、PGN の構造はグラム陰性菌とグラム陽性菌で異なっていること、そして TLR、NOD の活性化能も異なることが知られている。さらに、TLR 間のシグナリングと TLR と NOD 間のシグナリングにはクロストークが存在し、互いのシグナル伝達を増強することが示されている。

グラム陽性菌 PGN は骨吸収や破骨細胞形成を促進することが報告されているものの、グラム陰性菌 PGN と骨吸収の関連については明らかではない。そこで、今回我々は、グラム陰性菌 PGN の骨吸収や破骨細胞活性化能を明らかにし、グラム陽性菌 PGN の活性と比較すること、そして両 PGN と LPS が共存した際の相互作用について検討した。

対象と方法

in vivo において、マウスの歯肉にグラム陰性菌の *Escherichia coli* PGN、グラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* PGN、*E. coli* LPS をそれぞれ 0.5 μ g/3 μ l、5 μ g/3 μ l、50 μ g/3 μ l の濃度で単独投与もしくは両 PGN と LPS が同濃度になるように混合して 13 回隔日投与した。屠殺後、組織切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色、酒石酸耐性酸

フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、病理組織学的に炎症状態や歯槽骨吸収について解析した。また、対照群には PBS を投与した。次に、*in vitro* においてマウス骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と低濃度の Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 刺激により誘導した破骨細胞前駆細胞 (R-BMMs) に PGN、LPS 単独刺激もしくは両 PGN と LPS 共刺激を行い、誘導された破骨細胞の数を計測した。さらに、合成リガンド (A-iE-DAP, NOD1 リガンド; MDP, NOD2 リガンド; Pam₃CSK₄, TLR2 リガンド) 刺激後の破骨細胞形成についても解析した。

結 果

in vivo において、PBS 投与群では弱い炎症性細胞浸潤はみられたものの骨吸収は認めなかった。また、5 μ g/3 μ l の濃度以下では *E. coli* PGN、*S. aureus* PGN、LPS 投与群ともに結合組織内に中程度の炎症性細胞浸潤がみられたが、骨吸収窩に接する TRAP 陽性多核細胞はほとんど認めなかった。50 μ g/3 μ l の濃度の *S. aureus* PGN、LPS 投与群では強い炎症性細胞浸潤と骨吸収が観察されたが、*E. coli* PGN 投与群では観察されなかった。さらに、単独投与で骨吸収の観察されなかった 5 μ g/3 μ l の濃度の PGN と LPS を混合して投与した結果、両 PGN とともに LPS 共刺激によって歯槽骨周囲の結合組織に強い炎症性細胞浸潤と骨吸収を認めた。次に、*in vitro* における PGN の破骨細胞誘導能を検討した結果、両 PGN とともに破骨細胞形成を誘導し、LPS との共刺激は破骨細胞形成を相乗的に誘導した。また、この時 *S. aureus* PGN は、*E. coli* PGN と比較して有意に低い濃度で破骨細胞形成を誘導した。さらに、A-iE-DAP、MDP、Pam₃CSK₄ は単独で破骨細胞形成を誘導し、すべてのリガンドは TLR4 リガンドとの共刺激においても破骨細胞形成を相乗的に促進した。

考 察

本実験の結果は *in vivo*、*in vitro* においても PGN と LPS が協調的に作用することによってマウス歯槽骨吸収や破骨細胞形成の増強がおきることを示している。PGN は TLR2、NOD1、NOD2 によって認識されるが、合成リガンドと LPS で共刺激した実験より、TLR2、NOD1、NOD2 刺激と TLR4 刺激がそれぞれ協調的に作用することにより誘導されることが示唆された。また、*S. aureus* PGN と *E. coli* PGN で、その誘導能に相違が認められたことは、グラム陽性菌 PGN とグラム陰性菌 PGN の構造や菌種の違いによる TLR2 刺激能や NOD 刺激能の差やマウス歯周組織における NOD1 と NOD2 発現の違いが関係しているかもしれない。歯周病原細菌由来 PGN と骨吸収の関連については明らかではないが、奥川らは *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum* 由来 PGN は *E. coli* PGN と同等に NOD1、NOD2 を活性化したことを報告していることから *A. actinomycetemcomitans*、*F. nucleatum* 由来 PGN も *E. coli* PGN と同様に LPS との協調作用によって骨吸収を誘導するかもしれない。また、*Porphyromonas gingivalis* や *A. actinomycetemcomitans* 由来 LPS は TLR4 活性化能があること、そして骨吸収や破骨細胞形成を増強することが知られている。歯周ポケット内には PGN や LPS が混在しており、PGN と LPS の協調作用が歯周ポケット内においても作用しているかもしれない。しかし、*in vitro* においてこれらの相乗的な破骨細胞形成の促進メカニズムを解明するために R-BMMs のレセプター発現レベルやシグナル経路についてもさらなる検討が必要であると思われる。