| | |
|---|---|
| 氏名（本籍） | 石田匡彦（いしだまさひこ） |
| 学位の種類 | 博士（歯学） |
| 学位記番号 | 歯博第698号 |
| 学位授与年月日 | 平成27年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科・専攻 | 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻 |
| 学位論文題目 | LPSによる破骨細胞形成および骨吸収に対するMDPの影響の検討 |
| 論文審査委員 | （主査）教授 福本 敏<br>教授 高田春比古　教授 山本照子 |

# 論文内容要旨

歯周病等による病的骨吸収の誘導は，細菌の菌体成分のLipopolysaccharide（LPS）が原因の1つであることが知られている。また，細菌のペプチドグリカンの免疫生物活性を担う最小構成成分であるmuramyl dipeptide（MDP）がLPSによる免疫賦活化作用を増加させることが報告されている。このことから本報告では，LPSによって引き起こされる破骨細胞形成および骨吸収に対するMDPの作用を検討した。

マウスの頭蓋部にLPSおよびMDPをそれぞれの濃度を変えて注入し，組織切片を作製後，TRAP染色を行い破骨細胞形成を評価した。その結果，高濃度LPSを投与したマウスでは破骨細胞の形成が多く認められたが，低濃度LPSでは破骨細胞形成が少なかった。しかし，低濃度LPSにMDPを同時に投与したものでは多くの破骨細胞形成が認められた。また，破骨細胞マーカーであるTRAPおよびcathepsin K，また，RANKLの発現のリアルタイムPCRでの評価でも同様の結果が得られた。さらに骨吸収マーカーである血中のTRACP 5b濃度およびマイクロCTを用いた骨吸収の評価でも同様にLPSにMDPを加えたものでは骨吸収の増強が認められた。

次に，マウス骨髄細胞からストローマ細胞を作製し，LPSによるRANKLの発現に対するMDPの作用を検討した。ストローマ細胞において，低濃度LPSではRANKLの発現が認められなかったが，高濃度LPSおよび低濃度LPSに同時にMDPを加えたものではRANKLの発現が多く認められた。このことからMDPはストローマ細胞に対して*in vivo*と同様にLPSの作用を増強させることが分かった。しかしながら，MDPの増強作用は，副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone：PTH）による破骨細胞形成に対しては認められなかった。

次に*in vivo*においてLPSの受容体であるTLR4の発現について検討したところ，MDPはLPSが誘導するTLR4の発現を増加させることが認められた。同様に，ストローマ細胞に対するLPSのTLR4

発現誘導に対してもMDPによる増加作用が認められた。

ストローマ細胞においてLPSを作用させるとMAPkinase（MAPK）であるERK，p38およびJNKのリン酸化が誘導された。さらに，MDPはLPSによって誘導されるこれらのリン酸化の全てを増加させた。しかしながら，MDP単独では，ERK，p38およびJNKのリン酸化は増加しなかった。これらの結果からMDPは，MAPKのリン酸化は誘導しないが,LPSによるMAPKのリン酸化を増強させることがわかった。

これらの結果より生体内では，感染によって起こる病的な骨吸収は，MDPがLPSで誘導される破骨細胞形成およびそれによる骨吸収を増加させている可能性が示唆された。

## 審査結果要旨

本論文は，細菌のペプチドグリカンの免疫生物活性を担う最小構成成分であるmuramyl dipeptide（MDP）のLipopolysaccharide（LPS）誘導性の破骨細胞形成および骨吸収に対する影響を明らかにした論文である。

歯周病等による病的骨吸収の誘導には，細菌の菌体成分であるLPSが深く関わると考えられている。またMDPは，細菌のペプチドグリカンの一部で，免疫生物活性を有する最小構成成分であり，単球においてLPSで誘発される炎症性サイトカインの産生を増強させる。またMDP単独では骨芽細胞と造血細胞の共培養で破骨細胞の形成は認められないが，LPS，IL－1$\beta$，TNF－$\alpha$によって誘導される破骨細胞形成を増強させる。このような背景から，申請者はLPS誘導性の*in vitro*での破骨細胞形成および*in vivo*における骨吸収について，MDPの有無による影響を詳細に解析し，その分子メカニズムを明らかにしようとした。

まず，マウスの頭蓋部にLPSおよびMDPを各種濃度で注入し，注入後６日目の組織切片を作製およびTRAP染色を行なうことで，*in vivo*における破骨細胞誘導を検討した。その結果，LPSの濃度依存的にTRAP陽性の破骨細胞誘導が確認され，さらにLPSおよびMDP添加群では，LPS単独よりもより多くの破骨細胞形成が認められた。さらに破骨細胞のマーカーであるcathepsin KまたはTRAPの発現をリアルタイムPCRで検討した結果，TRAP染色と同様の結果が得られた。

次に，*in vitro*における破骨細胞形成について，マウス骨髄細胞からストローマ細胞を調製し検討を行っている。低濃度のLPS添加においては，RANKL遺伝子の発現が認められないが，高濃度のLPS添加においてストローマ細胞におけるRANKLの発現誘導が認められた。さらに，低濃度あるいは高濃度のLPSと同時にMDPを添加した群においては，いずれもストローマ細胞におけるRANKL遺伝子の発現が，LPS単独群と比較して増強された。一方，副甲状腺ホルモンであるPTHも破骨細胞を誘導するが，MDPはPTH誘導性の破骨細胞誘導においては増強作用を示さず，この結果からMDPによる破骨細胞誘導の増強効果は，LPSに特異的な作用である可能性があると判断された。

なぜMDPがLPS誘導性の破骨細胞形成を促進するのかを明らかにする為に，LPSの受容体の１つであるTLR4の発現について*in vivo*および*in vitro*の実験系を用いて解析している。その結果，MDPによりTLR4の発現が増強している，この増加した受容体によりLPSによる破骨細胞誘導が増強したものと考えている。そこで，この受容体発現の増強が，細胞シグナルの増強に繋がっているかどうかを検討する為に，LPSによってリン酸化されるERK1/2，p38のリン酸化をウエスタンブロット法にて解析している。LPSによりERK1/2およびp38がリン酸化されるが，MDPを添加することでそのリン酸化の程度はさらに増加した。いっぽうで，MDP単独ではこれらの分子のリン酸化は生じていな

い。このことは，MDP が TLR4の発現を促進し，その結果受容体からのシグナルが増強され，実際 ERK1/2および p38のリン酸化が亢進したと考えられる。これらの結果から，生体内での細菌感染に伴う病的な骨吸収は，MDP と LPS との共存により，破骨細胞形成が促進され，骨の吸収も促進する可能性が示唆された。

本論文は，破骨細胞分化機構の解明のみならず，歯科領域における病的な骨吸収を抑制するために必要な知見を提供する事が期待され，博士（歯学）に相応しい内容と判断する。