

論文内容要旨

論文題目

Modifications of Toll-like receptors and their adaptor molecules in macrophages after phagocytosis of lipopolysaccharide-coated titanium particles.

(リポポリサッカライド付着チタン粒子の貪食によるマクロファージ Toll 様受容体とアダプター分子の発現動態変化)

責任講座： 整形外科学講座

氏 名： 平 山 朋 幸

【内容要旨】(1,200 字以内)

〔目的〕人工股関節の長期耐久性に影響する因子に金属粒子由来の骨溶解現象（オステオライシス）がある。人工股関節周囲組織で発生した金属摩耗由来の粒子状物質は、マクロファージに貪食されると骨吸収性サイトカインの産生を伴った人工関節周囲オステオライシスを惹起する。その貪食過程で Lipopolysaccharide (LPS) が金属粒子に付着すると、マクロファージに備わった自然免疫応答センサーの Toll 様受容体 (TLR) 4 が働き、炎症性生体反応亢進の可能性が指摘されている。しかしその詳細な分子機構は未だ不明のままである。本研究では LPS が付着したチタン粒子をマクロファージが貪食する過程で、TLR とそのアダプター分子の発現動態がいかに変化するかを明らかにすることを目的とした。

〔方法〕ラットの大腿骨より採取した骨髓細胞にマクロファージコロニー刺激因子を加えて培養しマクロファージを分画した。免疫細胞染色にて骨吸収性サイトカイン、TLR、アダプター分子の局在を確認し、また RT-PCR 法を用いて LPS 単刺激に対する各分子の反応を検討した。この後、LPS を除去したチタン粒子 (Ti/LPS-) と LPS の付着したチタン粒子 (Ti/LPS+) 添加による各分子の発現動態変化について mRNA と蛋白レベルで検討した。

〔結果〕(1)免疫細胞染色ではチタン粒子添加前の CD68 陽性マクロファージには、骨吸収性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 および TLR2, 4, 5, 9, アダプター分子 MyD88, IRAK1, 2, 4, TRAF6 の局在が確認された。mRNA レベルで LPS の添加により TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の亢進が確認された。(2)チタン粒子添加では Ti/LPS-群、Ti/LPS+群とも添加後 1, 3 時間で TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の mRNA が亢進し Ti/LPS+群でより強い発現がみられた。両群では TLR4, 5, 9 の発現は抑制的で Ti/LPS+群の 3, 6, 12 時間で有意に発現が抑制された。MyD88, IRAK1, 4 の発現も抑制傾向があった。蛋白レベルでは Ti/LPS+群で IL-1 β の発現は亢進したが、TLR4, IRAK4 の発現は抑制された。一方、mRNA レベルで TLR2, IRAK2 は亢進し、TRAF6 は一時的に発現が亢進した後に抑制される傾向がみられた。

〔考察〕貪食時に金属粒子表面に LPS が付着するとマクロファージにおける骨吸収性サイトカインの産生亢進が生じる一方で、LPS のリガンドである TLR4 に加え、TLR5, 9 やアダプター分子 MyD88, IRAK1, 4 の発現も抑制され、貪食に伴う過剰な生体反応に対する抑制機構が存在する可能性が示唆された。一方、TLR2, IRAK2 の発現亢進と、TRAF6 の一過性の発現亢進も観察され、これらの分子を介した反応経路が貪食に伴う生体反応を修飾している可能性も明らかになった。

平成 23 年 1 月 25 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学 位 論 文 審 査 結 果 報 告 書

申請者氏名： 平山 朋幸

論文題目： Modifications of Toll-like receptors and their adaptor molecules
in macrophages after phagocytosis of lipopolysaccharide-
coated titanium particles.

審査委員：主審査委員 浅尾 裕信

副審査委員 山川 光徳

副審査委員 川前 金幸



審査終了日：平成 23 年 1 月 11 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

人工股関節の長期使用に伴い、周囲の骨溶解現象（オステオライシス）が問題となる。その発生原因として、金属摩耗により産生される金属粒子とその金属粒子に付着するリポポリサッカライド（LPS）がマクロファージを活性化し、各種サイトカインを産生させることが考えられている。

本研究では、チタン粒子とLPSを付着させたチタン粒子によりマクロファージを刺激し、Toll様受容体（TLR）とその下流の情報伝達分子の発現動態を解明することを目的に研究を進め、以下の結果を得た。

- 1) ラット骨髓細胞からM-CSFでCD68陽性マクロファージを誘導し、以下の実験に使用した。このマクロファージでは、刺激前からTNF- α 、IL-1 β 、IL-6の発現を認めた。
- 2) TNF- α 、IL-1 β 、IL-6発現はチタン粒子添加で僅かに上昇するが、LPS付着チタン粒子では大きく上昇した。
- 3) TLR4、5、9、MyD88、IRAK1、4はチタン粒子添加でmRNA発現が抑制されるが、LPS付着チタン粒子ではより強く抑制された。TLR4、IRAK4では蛋白レベルでも発現の抑制が認められた。一方TLR2とIRAK2はLPS付着チタン粒子添加によりmRNA発現が亢進した。

以上の研究結果から、LPSが付着したチタン粒子により刺激されたマクロファージはより多くの炎症性サイトカインを産生し、オステオライシスを進行させることが予想される。一方LPS付着チタン粒子はTLR4のみならず、TLR5、9、MyD88、IRAK1、4を抑制し、過剰な炎症反応を抑える可能性が示唆された。この情報伝達分子の抑制はオステオライシスが極めて慢性的に進行する機序を説明する可能性もある。

実験に使用したLPSの濃度やデータの提示方法など検討が望ましい部分も見られたが、関連する事項についての質疑応答も的確であり、学位審査委員会は本研究が博士（医学）の授与に値するものであると判定した。

（1，200字以内）