

# 実験的破骨細胞形成に及ぼす LPS と PGE<sub>2</sub> の影響

新井 通次

## 1. はじめに

歯周病は、歯周病原細菌によって引き起こされる感染性炎症疾患であり、歯肉、セメント質、歯根膜および歯槽骨よりなる歯周組織に起こる疾患である<sup>1</sup>。骨代謝に着目すれば、歯周病は破骨細胞による過度の歯槽骨の吸収が進行している病態といえる。正常な骨組織では、常に破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成からなる代謝（リモデリング）が活発に営まれ、その動的平衡のもとに骨塩量を一定に維持しつつ古い骨組織を新しい骨組織に置き換えている<sup>2</sup>。この骨形成と骨吸収の動的平衡が崩れ、骨吸収が骨形成に比べ優位な状態が続くと、骨量が減少し骨組織としての十分な機能を維持することが出来なくなる<sup>3</sup>。すなわち、歯周病の歯槽骨では、破骨細胞による骨吸収が異常に亢進し骨減少が進行している<sup>4</sup>。ここでは、歯周病原性細菌の外毒素であるリポ多糖（LPS）と炎症性サイトカインのプロスタグランジン E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）の破骨細胞形成への関与について、破骨細胞誘導実験系を用いて考察する。

## 2. 破骨細胞の特徴と破骨細胞誘導実験系

破骨細胞は生体内で骨吸収を担う唯一の細胞で、破骨細胞前駆細胞となる単球・マクロファージ系の造血細胞が分化・融合して形成される多核の巨大細胞である<sup>2</sup>。破骨細胞は、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ

（TRAP）染色陽性で、アクチンリングを発現し、骨吸収能を有するなどの特徴を示す。図1には、子ウサギの長管骨を破壊し培養液で激しく振動させることで分離させた破骨細胞にそれらの特徴が認められることを示した。分離破骨細胞の TRAP 染色像（図1A）には多数の核が、ローダミン・ファロイジン染色像（図1B）には細胞周囲にアクチンリングがそれぞれ認められる。さらに破骨細胞を乗せて培養した象牙切片（図1C）の表面には破骨細胞によって形成された吸収窩が認められる。

破骨細胞の分化については、図2に示すように、マウス骨髄細胞やマクロファージ系の RAW 264.7 細胞（以後 RAW 細胞と略す）と骨芽細胞/ストローマ細胞の共存培養による実験的な破骨細胞分化誘導系が確立している<sup>5-10</sup>。即ち、破骨細胞分化誘導系に活性型ビタミン D<sub>3</sub> や副甲状腺ホルモンなどの骨吸収因子を添加して培養すると、骨芽細胞/ストローマ細胞が破骨細胞分化誘導因子（receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B（RANK）ligand, RANKL）を産生し細胞膜に発現する。この RANKL と骨髄細胞や RAW 細胞（破骨細胞の前駆細胞）に存在する受容体の RANK との結合（RANKL-RANK 結合）により、前駆細胞は融合し破骨細胞へと分化する。この実験的に誘導された破骨細胞においても本来の破骨細胞と同様の特徴が備わっていることは確認されている。

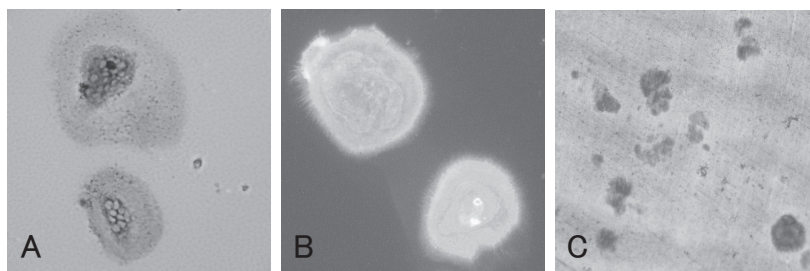


図1 分離破骨細胞の特徴  
TRAP 陽性多核細胞 (A) アクチンリング (B) 吸収窩 (C)

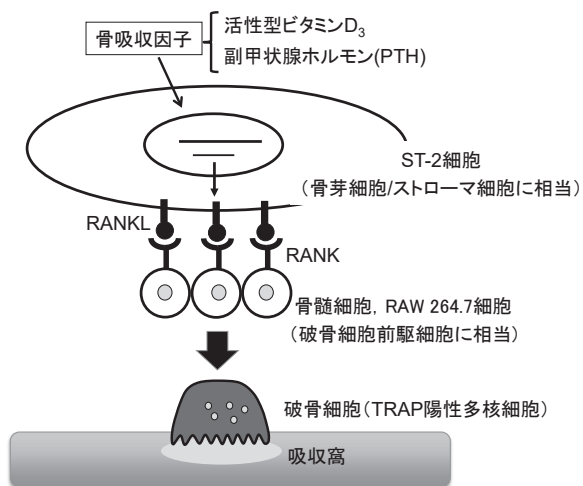


図2 RAW細胞とST-2細胞の共存培養系による破骨細胞形成

### 3. RAW細胞とST-2細胞の共存培養系における破骨細胞形成に及ぼすLPSとPGE<sub>2</sub>単独または併用効果

図3には、RAW細胞とST-2細胞の共存培養系における無添加群 (Control), LPS (10 μg/mL) 単独群, PGE<sub>2</sub> (1 μM) 単独群, LPS (10 μg/mL) と PGE<sub>2</sub> (1 μM) の併用群 (LPS+PGE<sub>2</sub>) の7日間培養後のTRAP染色像を示した。Control群にはTRAP染色陽性の細胞も細胞同士が融合した多核細胞も全く認められなかった。LPS単独群とPGE<sub>2</sub>単独群にはTRAP染色陽性細胞がまばらに認められるが、多核のTRAP染色陽性細胞は認められなかった。これに対し、LPS+PGE<sub>2</sub>併用群では、破骨細胞の特徴である多核のTRAP陽性細胞が認められた。なお、RAW細胞単独

培養系にLPSやPGE<sub>2</sub>を添加してもTRAP陽性細胞の出現は認められなかった (データ示さず)。

### 4. 考察

本研究では、RAW細胞とST-2細胞の共存培養系を用いて、LPSとPGE<sub>2</sub>の破骨細胞形成に及ぼす影響を検討した。共存培養系においてはLPSとPGE<sub>2</sub>いずれも、TRAP陽性細胞を誘導したが、細胞融合による巨大な多核細胞の誘導は認められなかった。これに対し、LPSとPGE<sub>2</sub>との併用では、TRAP陽性の多核細胞の誘導が認められた。この結果は、共存培養系における破骨細胞形成において、LPSとPGE<sub>2</sub>との併用による協力関係が成り立っていることを示唆した。一方、RAW細胞単独培養系では、LPSとPGE<sub>2</sub>いずれにもTRAP陽性細胞の誘導を認められなかった。TRAP陽性細胞の誘導にはST-2細胞が関わっていることを示した。ST-2細胞は骨髄由来ストローマ細胞株で、骨吸収因子の刺激によりRANKLを産生することが知られている。すなわち、この研究では、LPSとPGE<sub>2</sub>の併用によりそれぞれの単独よりも高いRANKL産生が生じたことでTRAP陽性で多核の破骨細胞が誘導されたと考えられる。すなわち、本研究では破骨細胞誘導においてLPSとPGE<sub>2</sub>の協力関係を認めた。LPSは歯周病原性細菌などグラム陰性菌に存在する内毒素であり、PGE<sub>2</sub>は代表的な炎症のケミディエーターである事を考えると、この破骨細胞誘導におけるLPSとPGE<sub>2</sub>の協力関係は歯周病における歯槽骨の病的な骨吸収・破壊の一端を示しているのかもしれない。

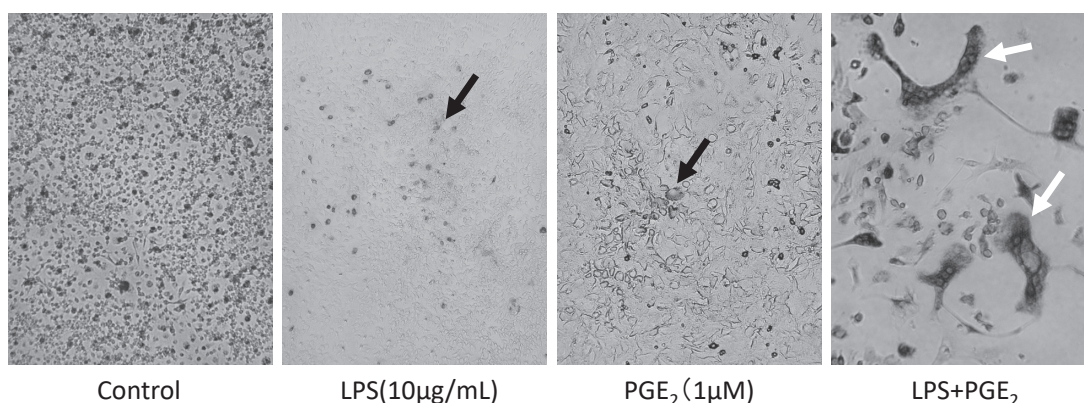


図3 RAW細胞とST-2細胞の共存培養系におけるLPSおよびPGE<sub>2</sub>による破骨細胞形成  
TRAP陽性細胞 (黒矢印), TRAP陽性多核細胞 (白矢印)

## 参考文献

1. 日本歯周病学会編：歯周治療の指針 2015, 第1版第1刷, 医歯薬出版, 東京, 2016, 8-9.
2. 須田立雄：骨はどのようにして形成され, 破壊されるか. 臨床病理, 50:267-272, 2002
3. 山本義三：骨粗鬆症の概念と定義. 医学のあゆみ, 165(9):499-501, 1993
4. 宮田 隆, 辰巳順一：歯周病と骨の科学. 医歯薬出版, 東京, 2002, 2-41.
5. 高柳 宏:ITAM を介した共刺激シグナルと RANKL による骨代謝の維持機構. 実験医学, 22(12):1726-1729, 2004
6. 篠原正浩, 高柳 宏：骨免疫学. 炎症と免疫, 20(2):105-108, 2012
7. 新井通次, 戸荻彰史：マウス骨髄細胞による破骨細胞形成系の薬理学への応用：ミノサイクリンおよびクロルプロマジンによる破骨細胞形成抑制. 愛知学院大学短期大学部紀要, 20:1-10, 2012
8. 高橋直之, 宇田川信之, 須田立雄:破骨細胞の分化と機能を調節する新規の TNF 様因子 (破骨細胞分化因子) の役割. 生化学, 71(4):241-253, 1999
9. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology, 122(4):1373-1382, 1988
10. 小関健由, 岡橋暢夫, 村瀬貴之, 佐藤 毅, 愛甲勝哉, 辻澤利行, 西原達次：RAW 細胞における破骨細胞への分化シグナルについて. 歯科基礎誌 42(5):443-443, 2000