

## 論文の要約

氏名：長尾麻由

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Low-intensity pulsed ultrasound reduced lipopolysaccharide-induced IL-6 and RANKL production in osteoblasts

（低出力超音波は骨芽細胞のLPS誘導性IL-6およびRANKL発現を抑制する）

歯周病はプラーク中に棲息するグラム陰性菌由来のリポ多糖（LPS）によって歯肉に炎症が惹起されることに始まり、深い歯周ポケットが形成されると歯周炎と呼ばれ骨破壊すなわち歯槽骨の吸収が起る疾患である。LPSはグラム陰性菌細胞壁の構成成分であり、骨芽細胞膜上の受容体 Toll like receptor (TLR) 4, 2 に結合するとインターロイキン（IL）-1, IL-6, 腫瘍壊死因子（TNF）- $\alpha$  などの炎症性サイトカインと receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) の産生を増加させ、免疫応答を引き起こすことが知られている。歯周病による骨破壊では、IL-1, TNF- $\alpha$  および RANKL などが破骨細胞の分化や活性化を促進して歯槽骨吸収を引き起す。また、IL-1, IL-6 および TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインは、多くの炎症性疾患の発症や進行に深く関与しており、とくに IL-6 は関節リウマチ発症の主要な炎症性サイトカインとして、骨芽細胞が産生する膜結合型リガンドである RANKL の発現を誘導し、破骨細胞の分化を促進する。つまり、IL-6 と RANKL は骨の慢性炎症性疾患の進行に関与する重要な因子と考えられている。

低出力超音波（LIPUS）は出力の低い超音波を発生させる医療用機器であり、整形外科分野において臨床応用されている。超音波による音響放射力、音響直進流および表面波伝播などのメカニカルストレスを患部に与えることで、骨折の治癒や骨増生を促進することが知られている。LIPUS は低出力のため生体為害性は無く、低周波によるキャビテーション効果や、連続刺激で起こる温熱効果も認められない。LIPUS による骨増生促進効果については、*in vitro*において LIPUS が骨芽細胞の ATP 産生を誘導し、産生された ATP が P2X7 受容体を介してオートクリンに骨芽細胞に作用してその分化や石灰化を促進することが報告されている。近年、炎症性ケモカインである CXCL4 および CXCL10 産生が LIPUS によって抑制されることが報告された。しかしながら、炎症性サイトカインや継続的な LIPUS の影響、また、その詳細なメカニズムについては報告されていない。そこで、本研究では骨芽細胞における継続的な LIPUS による炎症抑制効果について細胞生物学的に検討した。

マウス頭蓋冠由来の株化骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1 細胞）を 6 穴プレートに播種（ $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>）して生着を確認後、*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) 由来の LPS（10  $\mu$ g/ml）存在または非存在下で、最長 14 日間培養した。LIPUS（発振周波数 1.5 MHz, 超音波出力 30 mW/cm<sup>2</sup>）は、培養液にプローブを直接接触させて 30 分/日、14 日間毎日行った。培養 3, 7 および 14 日目にそれぞれのサンプルを回収し、IL-6, RANKL, 細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>（cPLA<sub>2</sub>）およびシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて mRNA レベルで調べた。また、IL-6 および RANKL のタンパク発現、プロスタグランジン E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）産生は ELISA 法を用いて調べた。

IL-6 および RANKL の遺伝子発現は培養 14 日目に LPS 刺激によってコントロールと比較して有意に増加した。一方、LPS 刺激と同時に LIPUS を作用させた細胞（LPS + LIPUS）では LPS 刺激のみと比較して有意に減少した。IL-6 および RANKL のタンパク発現も遺伝子発現と同様の傾向を示した。これらの結果から、LIPUS は LPS 誘導性の IL-6 および RANKL の発現を抑制することが示唆された。

骨芽細胞の IL-6 および RANKL の発現は、PGE<sub>2</sub> によって誘導されることが報告されている。PGE<sub>2</sub> は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の両方に関与する生理活性物質である。その起源は、細胞膜リン脂質（主にホスファチジルコリン）から PLA<sub>2</sub> の作用で遊離するアラキドン酸に由来し、炎症性骨疾患の主要なメディエーターとして知られている。また、cPLA<sub>2</sub> は PLA<sub>2</sub> のサブタイプであり細胞質に存在し、アラキドン酸カスケードの始動において中心的な役割を果たしている。一方、COX は、アラキドン酸を PGE<sub>2</sub> に変換させるために必要な酵素の一つで、炎症時のさまざまな刺激によってその発現が誘導される。また、COX には COX-1 と COX-2 の 2 つのサブタイプがあり、NS398 は COX-2 阻害剤

として IL-6 および RANKL の発現を抑制することが知られている。

そこで、LIPUS による IL-6 および RANKL の産生抑制効果の詳細を明らかにするために、まず仮説をたてて実験を遂行した。具体的には、LIPUS が LPS によって誘導された cPLA<sub>2</sub> と COX-2 発現を抑制して PGE<sub>2</sub> 産生を抑制することで、結果的に IL-6 および RANKL の発現を抑制するのではないかと考え、LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> の産生に関与する酵素である COX-2 および cPLA<sub>2</sub> の遺伝子発現および PGE<sub>2</sub> 産生に及ぼす LIPUS の影響を検討した。

その結果、COX-2 の遺伝子発現は、培養 3 および 7 日目に LPS 刺激によってコントロールと比較して有意に増加した。一方、LPS + LIPUS では LPS 刺激のみと比較して有意に減少した。PGE<sub>2</sub> のタンパク発現は LPS 刺激によってコントロールと比較して有意に増加したが、LPS + LIPUS では有意に減少した。さらに、LIPUS 単独でもコントロールと比較して有意に増加した。cPLA<sub>2</sub> の遺伝子発現は、培養 7 日目において LPS 刺激によってコントロールと比較して有意に増加した。一方、LPS + LIPUS では LPS 単独刺激と比較して有意に減少した。これらの結果から、LIPUS が COX-2、PGE<sub>2</sub> および cPLA<sub>2</sub> の発現を抑制することが示唆された。

以上のことから、LIPUS は、骨芽細胞において LPS により発現が誘導される cPLA<sub>2</sub> および COX-2 の発現を抑制することで PGE<sub>2</sub> 産生が抑制され、最終的に IL-6 および RANKL 産生が抑制されることが示唆された。つまり LIPUS は、LPS が誘因となる炎症性疾患の進行を抑制することが明らかとなり、歯周治療に有用である可能性が示唆された。