

Title	A群レンサ球菌感染による化膿性関節炎の誘発と関節破壊メカニズムの分子解析
Author(s)	桜井, 敦朗
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45148">https://hdl.handle.net/11094/45148</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	桜井 敦 朗
博士の専攻分野の名称	博士 (歯 学)
学位記番号	第 18603 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	A 群レンサ球菌感染による化膿性関節炎の誘発と関節破壊メカニズムの分子解析
論文審査委員	(主査) 教授 浜田 茂幸  (副査) 教授 大嶋 隆 助教授 岡橋 暢夫 講師 中澤 光博

### 論文内容の要旨

#### 【研究目的】

A 群レンサ球菌 (GAS) は、ヒトに咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、あるいは続発症として糸球体腎炎、リウマチ熱などを惹起する。また、化膿性関節炎の原因菌としても黄色ブドウ球菌に次ぐ臨床例が報告されているが、本菌がどのような機序を経て関節部に定着し、関節破壊を生じるのかについては不明の点が多い。

本研究では、GAS の感染による化膿性関節炎の発症モデルを確立し、その病態や宿主の免疫応答について検討を加えた。関節炎の進行による組織破壊に関わる可能性のある宿主因子として、破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などがあげられるが、本研究ではこれらの因子が関節炎の発症に関与している可能性について、上記の関節炎モデルマウス、初代培養骨芽細胞および軟骨細胞株培養系の三者を用いて解析を行った。

#### 【方法】

##### 1. GAS 感染による化膿性関節炎の発症モデルの構築とその病態の解析

GAS 菌株として JRS4 株 (M6 タンパク<sup>+</sup>、F1 タンパク<sup>+</sup>) および F1 タンパクを欠失した組み換え体 SAM1 株 (M6<sup>+</sup>、F<sup>-</sup>) を用い、CD-1 マウスに静注して関節炎発症の有無と症状を肉眼的、あるいは病理組織学的に観察した。関節炎発症マウスの血清と関節部の IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  および RANKL の濃度を測定した。また関節部や他の臓器に定着した GAS 菌数を算定した。さらに、RANKL のおとり型受容体である osteoprotegerin (OPG) を腹腔内投与し、関節部の骨破壊に与える影響を検討した。

##### 2. GAS 感染による培養骨芽細胞の RANKL 発現

骨芽細胞は二日齢マウス頭蓋冠より調製し、GAS 感染後の骨芽細胞への付着、侵入を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、RANKL 発現はリアルタイム PCR、ウェスタンブロットで解析した。MAP キナーゼのリン酸化についてもウェスタンブロットで検出した。

##### 3. 軟骨細胞による MMP 発現応答

軟骨細胞 ATDC5、N1511 の両株に GAS を感染させ、細胞への付着・侵入の程度を検討した。同細胞における MMP-2、

-9、-13 の発現動態は、リアルタイム PCR およびザイモグラム、ウエスタンブロットにより評価した。細胞外基質 (ECM) 分解の程度はアルシアンブルー染色により比較した。さらに GAS 感染による MMP-13 遺伝子発現については、各種変異プロモーターの活性を測定し、解析した。

#### 【結果と考察】

マウスに GAS JRS4 株  $2 \times 10^8$  CFU を感染させると、90%以上の個体に膝関節の腫脹・発赤がみられた。感染マウスの血清からは IL-1 および IL-6 の、膝関節部ではそれらに加えて RANKL の濃度の上昇を認めた。関節部の病理組織学的観察により、骨体に著しい骨破壊像が認められた。抗 GAS 抗体を用いた免疫染色により関節部の骨、骨稜に沿って多数の GAS が観察された。OPG を腹腔投与すると、GAS 感染による関節部の骨破壊は軽減された。以上の結果は、関節部に感染定着した GAS は、局所において RANKL 産生を誘導し、骨破壊を促進することを示唆している。

培養骨芽細胞に GAS を感染させたところ、JRS4 株は同部位に付着・侵入したのに対し、SAM1 株は細胞表面へ付着はするものの、細胞内への侵入はほとんど認められなかった。しかしながら、これら2株の感染による RANKL mRNA の発現増強は同程度であった。感染による骨芽細胞の RANKL の発現はタンパク質レベルでも確認され、さらに GAS の感染が骨芽細胞の p38 MAPK のリン酸化を促進することが認められた。以上の結果から、GAS の感染が骨芽細胞の RANKL 産生を促進すること、またこの過程に p38 MAPK が関与していることが示された。

GAS の軟骨細胞株への付着・侵入は、骨芽細胞とほぼ同様であったが、ECM の分解は RANKL の発現と異なり、SAM1 株感染細胞では JRS4 株感染細胞に比して軽度であった。JRS4 株を感染させると、MMP-13 の発現増強が著しく、mRNA レベルで約 10 倍に達し、ウエスタンブロットでも発現量の増大が確認され、さらに MMP-13 の発現は AP-1 シグナルの活性化を伴った。これらの結果は、軟骨細胞に感染した GAS が MMP 産生を増大させ、組織破壊を促進することを示唆している。

以上の結果から、GAS の感染によって骨・軟骨の組織・細胞から、RANKL、MMP のほか、各種の炎症性サイトカインが産生されること、また、GAS が関節部に定着すると、骨や軟骨の炎症応答を持続的に誘発し、化膿性関節炎を発症させることが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は A 群レンサ球菌による化膿性関節炎の関節破壊メカニズムについて検討したものである。その結果、A 群レンサ球菌は関節部に定着し、骨、軟骨の組織および細胞に炎症応答を誘発することにより、化膿性関節炎を発症することが明らかにされた。

以上より、本研究はレンサ球菌の病原性に関して重要な示唆を与えるものであり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。