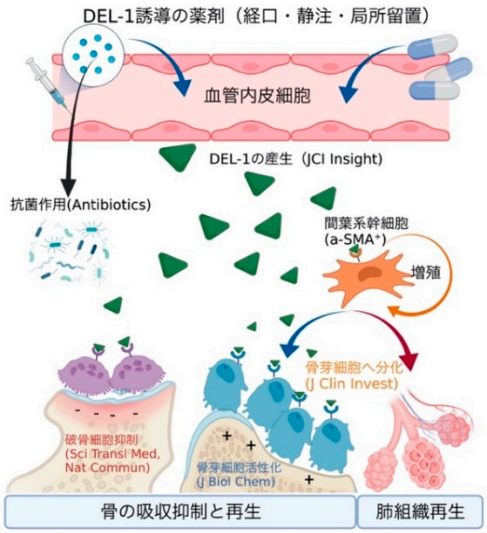
162　DEL-1が繋ぐ口腔の細胞間ネットワーク機構解明	前川　知樹

【目的】Developmental endothelial locus-1（DEL-1）は、主に血管内皮細胞および破骨細胞・骨芽細胞に産生が認められる分子であり、骨代謝や幹細胞に対する作用や制御性 T 細胞の誘導等、多彩な機能をもつ。また DEL-1 は炎症や老化に伴い減少傾向を認めることから、抗加齢効果を発揮している可能性も高い。これら多機能の DEL-1 を生体内に誘導することが可能となれば、加齢性疾患や骨破壊性疾患および再生領域に与える影響は大きい。そこで、加齢とともに増加する歯周炎と肺炎の 2 つの粘膜疾患と加齢性黄斑症を対象として、マクロライド系抗菌薬のエリスロマイシン、クラリスロマイシンおよびアジスロマイシンが与える影響を DEL-1 に着目して解析を行うこととした。さらに、マクロライド系抗菌薬の耐性菌誘導に対する対策として抗菌作用を除去したエリスロマイシン改変体を使用することで、耐性菌を生じない DEL-1 誘導法による骨代謝関連疾患治療法の可能性および加齢に関係する疾患への展開ができないか検討することとした。

【方法】野生型および *Del1* $^{-/-}$マウスの若齢および老化マウス（77 週齢）を用い、歯周炎、肺炎および加齢性黄斑症をモデルとして、マクロライド系抗菌薬の DEL-1 誘導能について検証した。歯牙に絹糸を 9 日間結紮することで炎症と骨吸収を引き起こす歯周炎モデルを使用した。肺炎は LPS の気管内噴霧によるモデルを作製し、肺炎誘導後の組織再生を組織免疫染色によって解析した。加齢性黄斑症は若齢および老化マウスの眼球の遺伝子発現および組織切片から評価を行った。

【結果】エリスロマイシン、クラリスロマイシンおよびアジスロマイシンは血管内皮細胞、マウス歯周組織、肺組織および骨芽細胞において DEL-1 の発現を上昇させることが明らかになった。さらに、歯周炎モデルマウスにおけるマクロライド系抗菌薬投与の結果から、マクロライド系抗菌薬は DEL-1 依存的に好中球の遊走抑制および破骨細胞への分化抑制や骨・組織再生能を発揮していることが明らかとなった。特に老齢マウスの歯周組織において、マクロライド系抗菌薬による老化細胞の減少と破骨細胞の減少が認められた。さらに抗菌作用活性を改変したエリスロマイシン（ERM523）においても破骨細胞と炎症抑制作用がみられた。骨芽細胞においては、マクロライド系抗菌薬による骨のジュールの形成促進と、破骨細胞においては破骨細胞分化抑制と吸収活性の抑制が認められた。加齢性黄斑症においては、マクロライド系抗菌薬の投与により、ドルーゼンの形成の減少とそのマーカーである ApoE および C5 の発現の減少が認められた。さらに、網膜上皮細胞へマクロライド系抗菌薬を添加すると、2 つのマーカーの発現減少と IL-17 によるマーカーの上昇が抑制された。この結果から、炎症および骨吸収抑制作用と、老化細胞の除去に伴う組織再生能力を期待したマクロライド系抗菌薬のドラッグリポジショニングの可能性が示唆された。

マクロライド系抗菌薬による DEL-1 の誘導と組織再生への展開



162. DEL-1 が繋ぐ口腔の細胞間ネットワーク機構解明

前川　知樹

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 高度口腔機能教育研究センター

Key words：口腔組織再生，歯周炎，抗老化，DEL-1，骨代謝

緒　言

消化管の最前線である口腔は、歯や骨といった硬組織、さらに粘膜組織、口腔腺によって構成されるユニークな湿潤環境であり、多様な研究対象器官である。また口腔粘膜は、皮膚や腸管粘膜など他バリア部位と比較し、損傷後の組織修復が早いことが知られている。消化管の最前線に位置し、食物粉砕を担うため、様々な外的刺激に対し高い適応能力を有すると考えられるが、その分子基盤は不明である。我々はこれまでに、Developmental endothelial locus-1（DEL-1）分子が口腔粘膜修復と再生に必須の役割を担うことを明らかにしてきた。DEL-1 は、インテグリン受容体を介し、好中球の遊走を制御する役割をもつ生体内分子である［1]。我々は DEL-1 が歯周組織で高発現していることを見出し、① 過度な好中球遊走阻止、② 破骨細胞分化阻害による骨吸収抑制［2]、③ エフェロサイトーシス促進による炎症寛解と組織修復を促す機能を持つことを示した。野生型および *DEL-1* 欠損マウスに歯周炎を惹起すると、*DEL-1* 欠損マウスでは正常な歯周組織修復が認められず、線維化による歯の脱落を生じる。また、DEL-1 をマウスおよび霊長類の歯周炎に接種すると、粘膜上皮や歯根膜および骨組織を含む歯周組織修復と再生が起こる。つまり、DEL-1 を生体内で制御することが可能であれば、炎症性疾患に対する新しい治療戦略になると考えた。そこで、これら DEL-1 が生体内でどのように発現制御されているのかを解析したところ、炎症抑制効果をもつオメガ 3 脂肪酸である Resolvin D1（レゾルビン D1）および男性ホルモンの Dehydroepiandrosterone（DHEA）が DEL-1 を制御していることを見出した。IL-17 を DEL-1 の主要な産生細胞である血管内皮細胞に添加すると、DEL-1 発現が遺伝子・タンパクレベルで抑制される。減少した DEL-1 発現は、抗炎症作用をもつオメガ 3 脂肪酸であるリゾルビンを作用させることで、定常状態まで回復させることができた。同様な効果は、*DEL-1* 欠損マウスにて認められなかったところから、レゾルビン D1 による DEL-1 の発現制御機構が明らかになった。また、DHEA は欧米にて若返り効果を持つとして購入可能なサプリメントである。LPS 誘導性の肺微小血管における炎症に伴う好中球遊走や集積に対し、DHEA を投与することで、炎症の抑制効果が認められた。しかしながら、その効果は限定的で、DEL-1 の誘導による歯周病や関連疾患への臨床展開へは困難であった。そこで我々はマクロライド系抗菌薬に着目した。歯科臨床において、歯周炎治療にマクロライド系抗菌薬の 1 つであるジスロマックが効果的であることが報告されている。さらに、肺炎においても世界的にマクロライド系抗菌薬の抗炎症作用に期待した投与が行われている。感染性の肺炎のみではなく，肺疾患である慢性閉塞性肺疾患や嚢胞性線維症においても投与されていることから、マクロライドは DEL-1 を誘導し、これら 2 つの代表的な粘膜疾患である歯周炎や肺炎に対して作用していることが考えられる。そこで、本研究では、マクロライド系抗菌薬の中で頻用されるエリスロマイシン、クラリスロマイシンとアジスロマイシンの DEL-1 に対する作用をマウスモデルおよび細胞使用実験において解析することとした。対象疾患として、加齢とともに増加する歯周炎と肺炎の 2 つの粘膜疾患と加齢性黄斑症を用いた。さらに本研究では、マクロライド系抗菌薬の耐性菌誘導に対する対策として抗菌作用を除去したエリスロマイシン改変体を使用することで、耐性菌を生じない DEL-1 誘導法による骨代謝関連疾患治療法の可能性および加齢に関係する疾患への展開ができないかを同時に検討することとした。血管内皮細胞および破骨細胞に直接作用させたところ、それぞれの細胞において DEL-1 の発現上昇が認められた。

方　法

1. 歯牙結紮による歯周炎モデルの作製と解析

10〜12 週齢の C57BL/6Ncrl マウスを用いて、第 2 臼歯に 5-0 滅菌絹糸を結紮することで実験的な歯周炎を引き起こした。*Del1* $^{-/-}$マウスはセツロテック社において GEEP 法を用いて作製した。エリスロマイシン（100 mg/kg）およびペニシリン（10,000 unit/kg）とジョサマイシン（100 mg/kg）は結紮の当日から結紮最終日の 9 日目まで 1 日 1 回、腹腔内に投与した。抗生物質による結紮糸への影響解析のため、サンプル回収時に結紮糸を同時に回収し、好気性菌および嫌気性菌数を測定した。骨吸収はライカ社の実体顕微鏡にてセメントエナメル境から歯槽骨の頂上までを測定した。顎骨は O.C.T コンパウンドを使用し凍結組織切片を作製し、Wako 社の TRAP 染色キットにて染色をおこない、TRAP 陽性かつ多核の細胞を破骨細胞として算定した。

2. 破骨細胞および骨芽細胞に対する評価解析

破骨細胞は、野生型マウスおよび *DEL-1* $^{-/-}$マウス大腿骨骨髄より採取した破骨細胞前駆細胞を用いた。MCSF および RANKL と共培養し、エリスロマイシン、クラリスロマシンおよびアジスロマイシン（1、10、20 μg/mL）を添加した。7 日後に TRAP 染色キット（シグマ社）を用いて破骨細胞を染色し算定した。またカルシウムプレート（岩井化学産業）を用いて破骨前駆細胞を播種し、エリスロマイシン等を添加したのち 7 日後に蛍光強度を測定した。骨芽細胞は、マウス胎児頭蓋骨から採取した骨芽細胞を用いた。骨形成誘導培地（アスコルビン酸 50 μg/mL、10 mM β グリセロリン酸）にエリスロマイシン、クラリスロマシンおよびアジスロマイシン（20 μg/mL）を添加した。15 日後に骨のジュール形成量をアリザリンレッド染色によって評価した。

3. 老化細胞および再生能に対する評価解析

セノリティック（抗老化）薬剤として BPTES を使用し、エリスロマイシンおよび抗菌作用を改変したエリスロマイシンと比較検討した。老化細胞は β ガラクトシタラーゼ陽性細胞とし、若齢および老齢マウスの歯周組織においてその数を解析した。眼球においては、網膜上皮細胞とドルーゼンの形成マーカーである ApoE および C5 を qPCR により遺伝子発現と免疫組織学的解析を行った。

結果および考察

1.　マクロライド系抗菌薬は歯槽骨吸収を抑制する

通常、マウスに歯周炎を誘導すると歯槽骨吸収が認められる（図 1a、c の Ligated Control）が、マクロライド系抗菌薬を投与することで歯槽骨吸収が抑制された（図 1a、b）。さらに、歯周炎を誘導した若齢マウスの腹腔にセノリティック薬剤 BPTES を投与したところ、エリスロマイシンや抗菌活性のないエリスロマイシン改変体に比較して歯槽骨吸収量に変化はなかった。若齢マウスにおいても歯牙結紮による老化細胞の増加が認められるが（図 1e）、老化細胞は BPTES およびマクロライド系抗菌薬投与により抑制されていたことから、若齢マウスにおいてはマクロライド系抗菌薬の歯槽骨吸収抑制効果は、老化細胞抑制によるものではないことが示唆された。マクロライド系抗菌薬と BPTES においては、歯槽骨付近の破骨細胞数を減少させることも明らかとなった（図 1g）。

2.　老齢マウスにおいてマクロライド系抗菌薬による歯槽骨再生および老化細胞の減少が認められる

老齢マウスでは、歯牙の咬耗（長期間の噛み合わせによって歯の頭が削れている）とともに加齢に伴う歯槽骨吸収が認められる。これら自然と骨が減少している老齢マウスにマクロライド系抗菌薬を腹腔内投与すると、約 10 日程度で歯槽骨の再生および骨レベルの増加が認められる（図 2a、b）。さらに、破骨細胞数を測定すると、マクロライド系抗菌薬の投与によって破骨細胞数が減少する（図 2c、d）。さらに老化細胞数を測定すると、歯根膜における老化細胞が減少している。つまり、マクロライド系抗菌薬は、セノリティック薬剤である BPTES と同様な老化細胞除去の作用があることが明らかとなった。

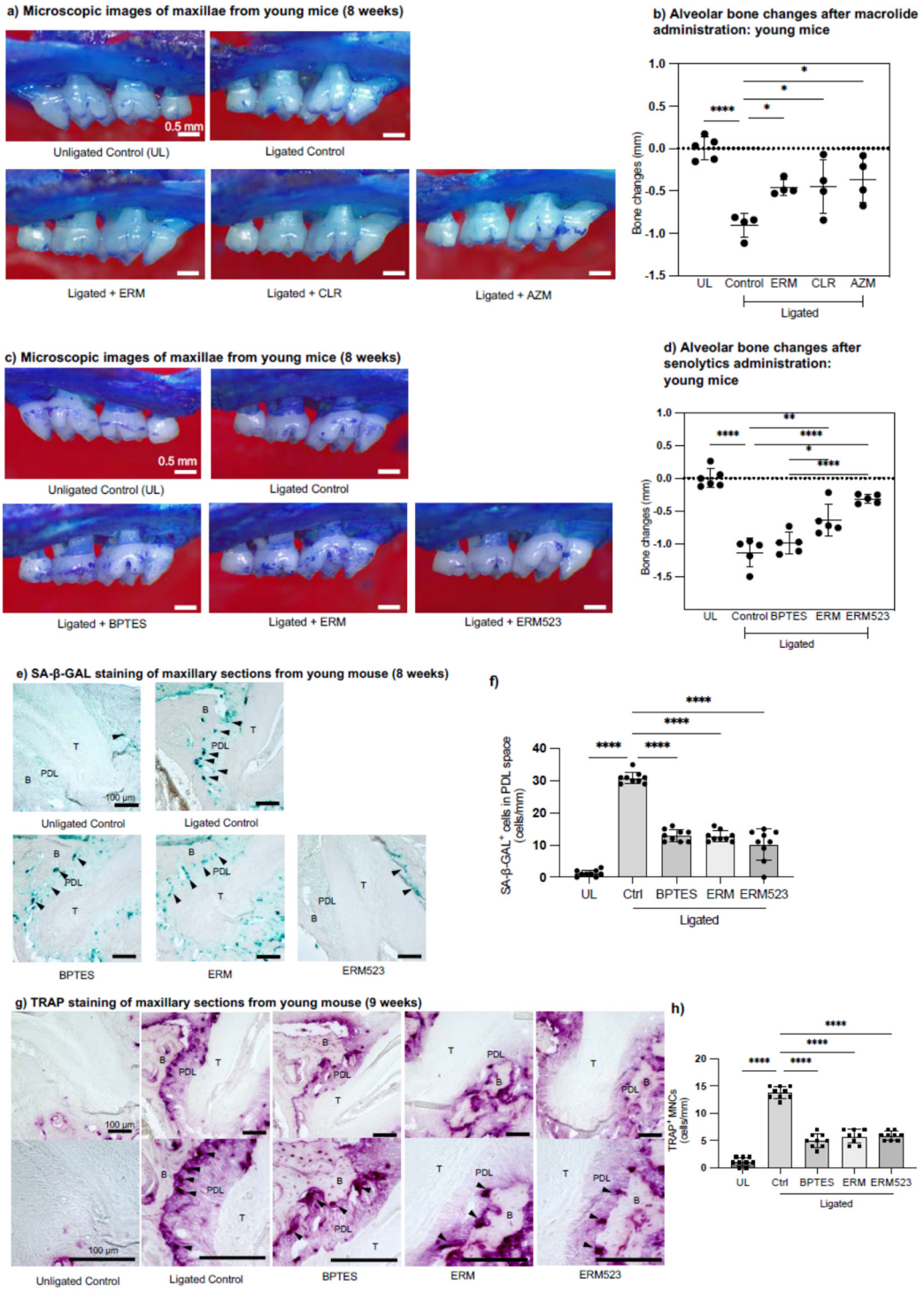


図 1. マクロライド系抗菌薬と BPTES は老化細胞を減少させるとともに歯槽骨吸収を抑制する

a、b） 若齢マウスの歯槽骨吸収に対するマクロライド系抗菌薬の効果。

c、d） 若齢マウスの歯槽骨吸収に対するマクロライド改変体および BPTES の効果。

e、f） 歯周炎モデルマウスの歯槽骨組織のおける老化細胞の変化。

g、h） 歯周炎モデルマウスの歯槽骨組織における破骨細胞数変化。

The data were compared using the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001、ns：not significant.

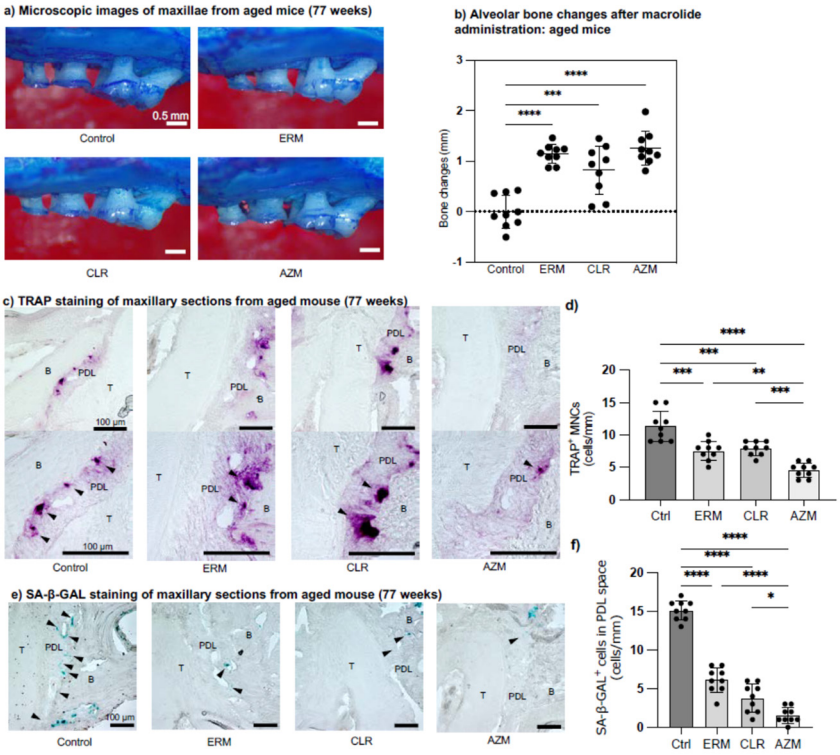


図 2. マクロライド系抗菌薬は老齢マウスにおいて骨再生を誘導する

a、b）マクロライド系抗菌薬は歯槽骨再生を促した。

c、d）マクロライド系抗菌薬は老齢マウスの破骨細胞数を減少させた。

e、f）マクロライド系抗菌薬は老化細胞を減少させた。

The data were compared using the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001、ns：not significant.

3. 破骨前駆細胞および骨芽細胞におけるマクロライド系抗菌薬の効果

マウス骨髄由来破骨前駆細胞にマクロライド系抗菌薬を添加すると、破骨細胞への分化が抑制された（図 3a、b）。マウス頭蓋骨より採取した骨芽細胞においては、マクロライド系抗菌薬によって、15 日後の骨ノジュール形成が促進されていた（図 3c、d）。すなわち、マクロライド系抗菌薬は破骨細胞への分化および骨再生を促すことで歯周炎に対して防御的に機能する可能性が示唆された。

4. マクロライド系抗菌薬は加齢性黄斑症マーカーを減少させる

若齢および老齢マウスの眼球の組織切片を作製し、黄斑症の進行マーカーである ApoE および C5 の発現とその局在を解析した（図 4a、b）。RPE-65 で示される網膜上皮細胞に近い ApoE および C5 がマクロライド系抗菌薬投与により減少していた。さらに、不死化ヒト網膜上皮細胞を培養し、マクロライド系抗菌薬を添加すると *APOE* および *C5* の遺伝子発現が減少し、炎症性サイトカインの IL-17 刺激による *APOE* および *C5* の上昇も抑制された。また老化マウスの *Apoe* および *C5* 遺伝子も、マクロライド系抗菌薬によって抑制された。ドルーゼンの減少効果のために長期的なマクロライド系抗菌薬投与は難しいことから、抗菌活性のないマクロライド改変体の効果に期待した新薬の開発を目指している。

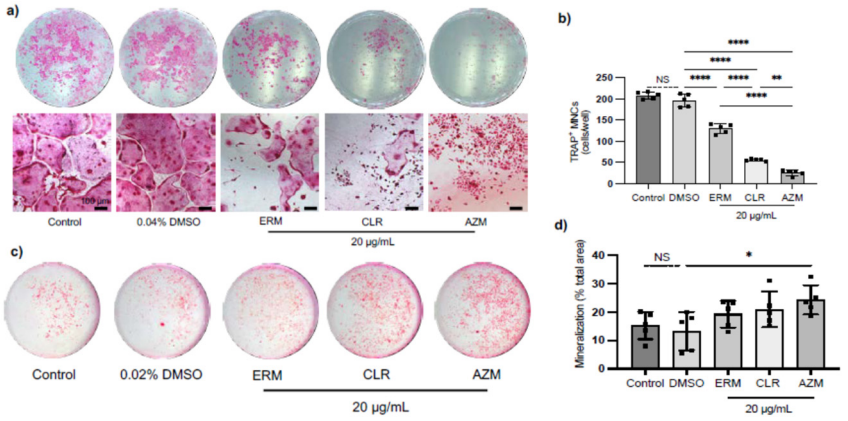


図 3. マクロライド系抗菌薬は骨代謝を制御する

a、b） マクロライド系抗菌薬により破骨細胞分化が抑制された。

c、d） マクロライド系抗菌薬により骨ノジュール形成が促進された。

The data were compared using the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001、ns：not significant.

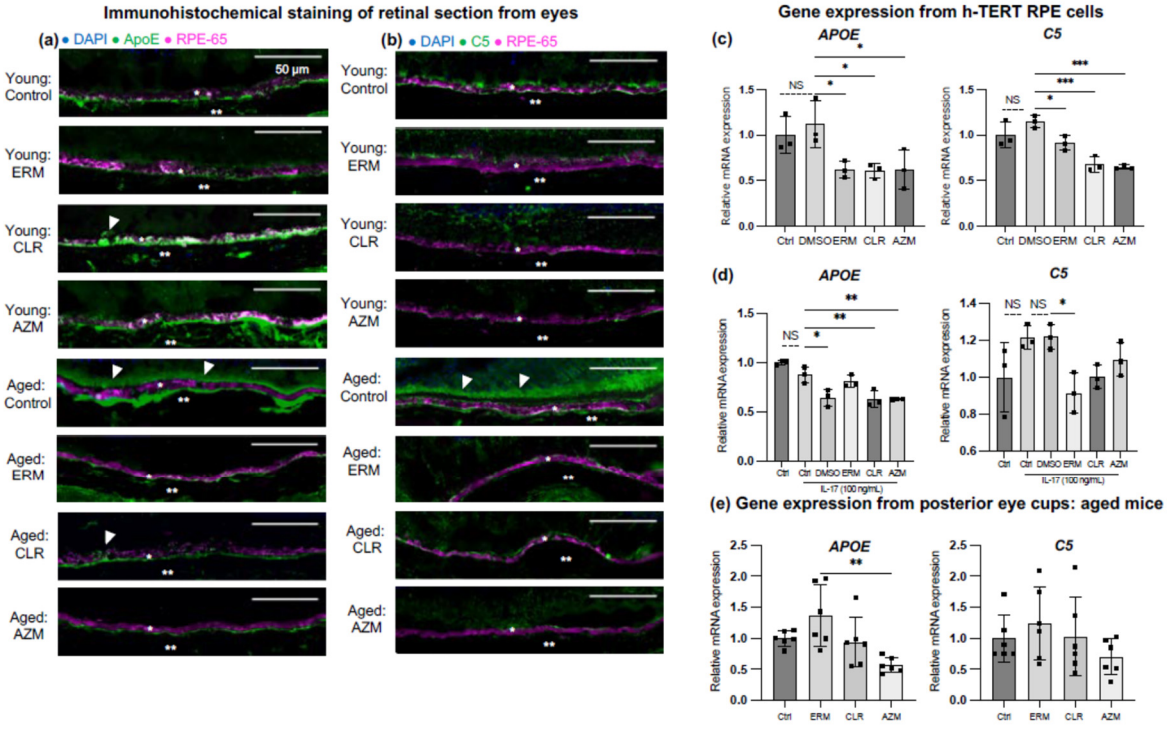


図 4. マウス眼球およびヒト網膜色素細胞におけるマクロライド系抗菌薬の効果

a、b） マウス眼球の ApoE および C5 の局在。

c） ヒト不死化網膜上皮細胞へのマクロライド系抗菌薬の効果。

d） IL-17 存在下におけるマクロライド系抗菌薬の効果検証。

e） 老化マウスの眼球での *APOE* および *C5* の遺伝子発現変化。

The data were compared using the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001、ns：not significant.

謝　辞

コロナ禍において研究資金や活動が困難な中、多大なご支援をうけることができましてスムーズな研究を遂行することができました。公益財団法人上原記念生命科学財団ならびに関係者の皆様に、心より御礼申し上げます。

文　献

1）　Choi EY, Chavakis E, Czabanka MA, Langer HF, Fraemohs L, Economopoulou M, Kundu RK, Orlandi A, Zheng YY, Prieto DA, Ballantyne CM, Constant SL, Aird WC, Papayannopoulou T, Gahmberg CG, Udey MC, Vajkoczy P, Quertermous T, Dimmeler S, Weber C, Chavakis T. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. Science, 322: 1101-1104, 2008. PMID: 19008446 DOI: 10.1126/science.1165218.

2）　Shin J, Maekawa T, Abe T, Hajishengallis E, Hosur K, Pyaram K, Mitroulis I, Chavakis T, Hajishengallis G. DEL-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in nonhuman primates. Sci Transl Med, 7: 307ra155, 2015. PMID: 26424570 DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5380.