

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06272

研究課題名(和文)内因性Del-1分子に着目した炎症制御のメカニズム解析と応用研究

研究課題名(英文) Expression and Function of the Homeostatic Molecule Del-1 in the inflammation and the Periodontal Tissue

研究代表者

前川 知樹 (Maekawa, Tomoki)

新潟大学・医歯学系・研究准教授

研究者番号：50625168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：Del-1は、主に血管内皮細胞から産生され、炎症局所において、過度な好中球遊走阻止、破骨細胞への分化抑制により骨吸収を抑制する、生体の免疫調節等の機能を持つ。個体機能低下が原因で起きる炎症性疾患を対象として、抗炎症因子であるDel-1の作用機序解明と生体でのDel-1誘導機構を解明した。すなわち、Del-1による炎症性骨破壊の制御機構を解析し、Del-1による骨免疫調節学の学問領域を展開した。IL-17とDel-1のバランス制御によるリウマチ関節炎の病態解明と破骨細胞を対象としたDel-1の新規骨破壊制御メカニズムを解明した。Del-1を生体にて誘導する化合物を選出し、臨床応用へ展開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Del-1に関連する炎症性の疾患として、歯周炎とリウマチ性関節炎、肺炎が挙げられる。歯周炎は、歯の喪失の主な原因であり、心疾患や糖尿病など全身疾患の発症および増悪に寄与する。また超高齢社会におけるQOLの向上および健康寿命の延伸を実現する上で対策が重要な課題である。リウマチは、男女間の性差があり、炎症による破骨細胞活性化により骨破壊が引き起こされる。肺炎は、本邦において3番目の死因となっている。特に抗菌剤による治療では薬剤耐性が大きな問題となっており、抗菌に頼らない炎症制御による治療法の開発が喫緊の課題である。3つの問題を解決するために本研究でDel-1の応用法が確立された。

研究成果の概要(英文)：Del-1 has currently emerged as an important factor for homeostatic immunity by regulating neutrophil infiltration and resolution of inflammation. Del-1 is a versatile, multidomain protein that can interact with phospholipids and distinct integrins, thereby regulating the host inflammatory response at different stages. Intriguingly, Del-1 expression progressively declined with aging. Specifically, we have done that Analysis of the control mechanism of inflammatory bone destruction by Del-1 and to expand the field of osteoimmunology by Del-1. Elucidation of pathological condition of rheumatoid arthritis by balance control of IL-17 and Del-1 and novel bone destruction control mechanism of Del-1 for osteoclasts. Select compounds that induce Del-1 in vivo.

研究分野：歯周病治療学

キーワード：歯周病治療学 骨免疫学 トランスレーショナルリサーチ 骨代謝 抗炎症作用 加齢性炎症 炎症制御 Del-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、慢性炎症に伴う歯周結合組織と周囲骨組織の破壊を特徴とする疾患であり、人類史上最も感染者の多い疾患とされている。また、全身への増悪的な波及も示唆される炎症疾患であるが、病因細菌群や病態形成の複雑さから、有効な治療法は確立されていない。申請者は、「研究活動スタート支援」科研費を得て、内因性の抗炎症分子 Del-1 (Developmental endothelial locus-1) の生体作用機構を明らかにし、歯周炎の病態増悪への影響も解析した。その結果、当初想定以上の進捗と成果を上げることができた (Maekawa T. *et al.*, *Science Transl Med.* 2015, Maekawa T. *et al.*, *Nature Commun.* 2015)。そこで、「スタート支援」科研費の知見を継承発展させ、新たに生体分子 Del-1 による炎症制御のメカニズム解析とその応用研究を開拓する。歯周病はこれまでに、培養可能な歯周病原細菌群「Red complex」と称される3種に限定された細菌群によって引き起こされると考えられてきた。しかし近年では、「異常フローラ感染症」としての概念が歯周病のモデルとして浸透してきている。異常フローラ感染とは、特定の細菌種ではなく、バランスを崩したフローラ総体が病因となり歯周病等を引き起こすという学説である。*Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) は、歯周病の主たる原因細菌として研究されてきた。*P. g* は健常者の歯肉組織からは検出されにくく、また活動性歯周炎部位からも総細菌数の1%未満しか分離されない。しかしながら、疫学的解析からは、進行性の歯周炎と *P. g* の分離頻度が高い相関が示されている。したがって、*P. g* は絶対量が少なくとも、異常フローラへの転換においては、重要な役割を果たしていると推測される。同仮説は、申請者らが留学中に「Keystone 細菌」と提唱し、多面的な研究アイデアを考える起点となっている (Maekawa T. *et al.*, *Cell Host Microbe.* 2014)。Keystone 細菌 *P. g* は自然免疫回避性の細菌である。その主な機序は、*P. g* の分泌型プロテアーゼであるジンジパインを用いた貪食細胞からのエスケープであると報告されている。*P. g* は炎症組織下においても生存し、さらに他細菌に対する貪食も包括的に阻害することで、バランスを保っていたフローラを異常型へと転化させ、病原性をフローラ全体で急激に発揮する可能性を考えている。申請者は、Keystone 細菌 *P. g* によって惹起された炎症と、歯槽骨の吸収には強い関連があり、両者の相乗効果により更に重症な歯周炎を引き起こす可能性を示している。そのため、Del-1 を局所接種することで、歯周組織への好中球の遊走を抑制し炎症を制御することが可能であると推察している。Del-1 と炎症制御に関する研究は、申請者らが開拓した新領域であり、したがって得られた学術的知見の概ねをリードしている。Del-1 の好中球遊走抑制は、好中球表面の LFA-1 と血管内皮細胞の接着因子 ICAM-1 の相互結合を阻害することで引き起こされると示されているが、申請者はさらに Del-1 の骨吸収抑制にも着目し、新規の歯周炎治療法の可能性を解析している。

2. 研究の目的

Del-1 は、主に血管内皮細胞から産生され、炎症局所において、①常在細菌フローラの構成変化を引き起こす、②破骨細胞への分化抑制により骨吸収を抑制する、③好中球の遊走を抑制する等の機能を持つ。本研究の目的は、これら3つの作用を詳細に分子解析し、その知見に基づき歯周炎の治療に Del-1 を応用しようとするものである。

3. 研究の方法

歯周病原細菌によって引き起こされた歯肉局所の炎症は、破骨細胞を活性化させる増悪因子となることが示されている。Del-1 は、好中球遊走停止による炎症抑制とともに、破骨細胞をも抑制する。Del-1 は、破骨細胞表面とその前駆細胞表面の Mac-1 受容体に作用し、破骨細胞の骨吸収活性を減弱することと、前駆細胞からの分化を抑制することを、申請者はこれまでに明らかにしてきた。しかし、Mac-1 からの下流の詳細なメカニズム経路は未だ明らかとなっておらず、なぜ活性と分化抑制の2つの作用があるのか等、不明な点が多い。そこで本申請では、まず骨芽細胞と破骨細胞に対する Del-1 の抑制メカニズム経路を検索する。次いで、Del-1 接種による①異常フローラの細菌バランス回復、②好中球の遊走抑制による炎症制御、③骨吸収抑制能を3つの柱として、Del-1 接種による歯周炎等の炎症コントロール治療の応用研究を試みることにした。

4. 研究成果

本申請研究では、歯と歯の周りを構成する組織の破壊と骨の吸収を特徴とする歯周炎に対し、内因性の抗炎症分子 Del-1

(Developmental endothelial locus-1) を応用するために、Del-1 の生体作用機構を明らかにし、歯周炎の病態増悪への影響を検索した。

3カ年の最終年度研究計画推進により、Del-1 はドメイン依存的に抗炎症作用と骨吸収抑制作用をもつことを明らかにした。すなわち、血管内皮細胞から産生された Del-1 は骨を溶かす機能を持つ細胞である破骨細胞の表面に存在するイ

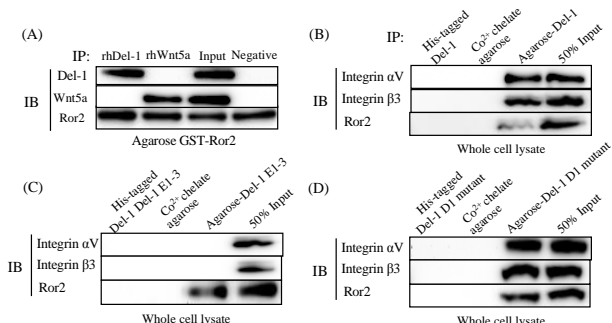


図1 Ror2とDel-1は競合的に働く

ンテグリン受容体 Mac-1 と avb3 以外にもチロシンキナーゼ受容体である Ror2 に拮抗的に作用することが解明された。

Ror2 は Wnt5a 刺激により非古典的経路から破骨細胞上の RANK に結合し、骨吸収を促す。Del-1 は Wnt5a が Ror2 に結合することを競合的に抑制し、結果として破骨細胞分化を抑制する (右図)。

次に、Del-1 を全身で誘導した際にリウマチ関節炎に与える影響を検索した。すると Del-1 を誘導した際にはリウマチ関節炎による骨破壊が抑制されていることが明らかとなった。さらに同効果は、Del-1 ノックアウトマウスでは確認されなかった。すなわち、リウマチ関節炎での Del-1 による骨破壊抑制効果が期待できる可能性が高い。

Del-1 を生体内で調節が可能かどうかを検索した。Del-1 は加齢とともに減少する。さらに性差が存在し、男性に多く、女性に少ない傾向が認められる。これは、女性に多く認められるリウマチ性関節炎や骨粗鬆症に Del-1 が関連している可能性が考えられる。Del-1 を自律的に生体に誘導することができれば、自然におきる炎症 (自然炎症) や骨疾患、ロコモへの対策の

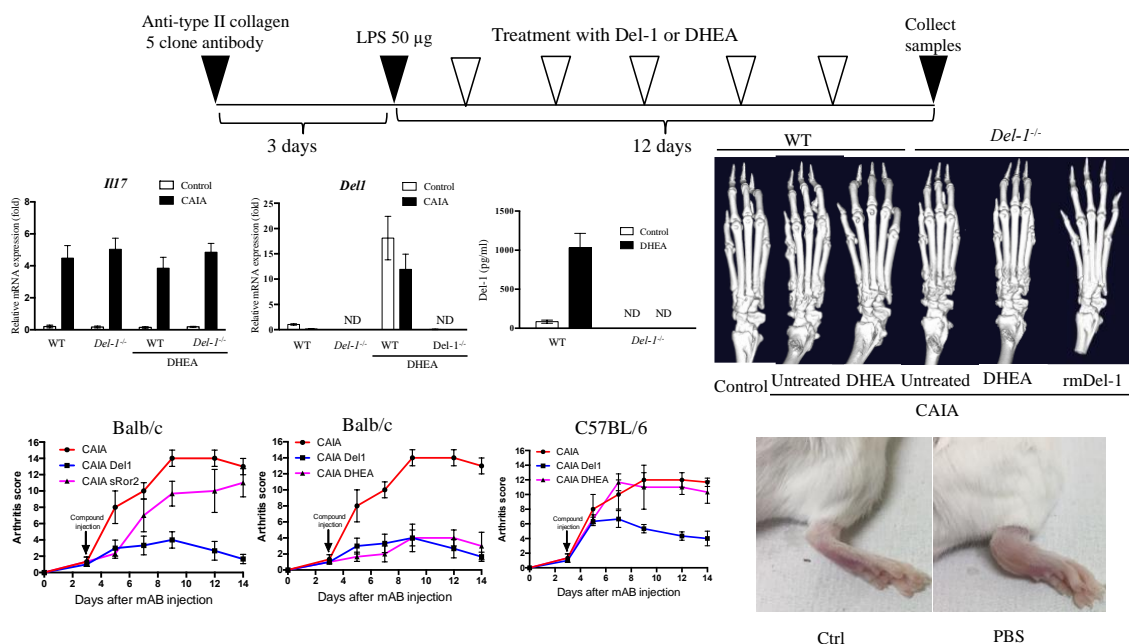
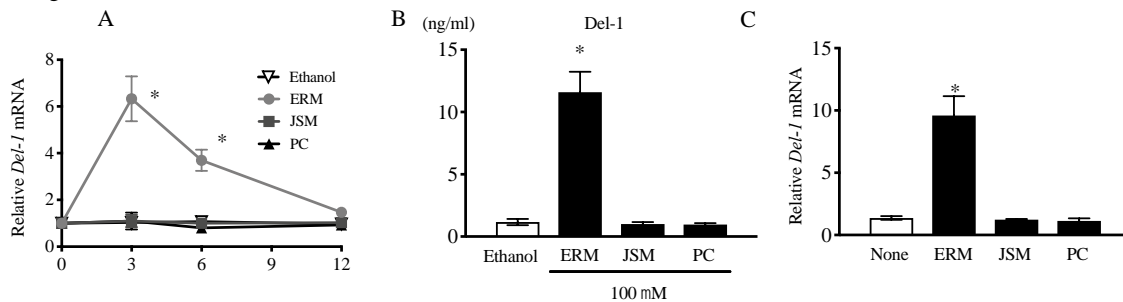


図2 Del-1はリウマチ関節炎による骨破壊を制御する

一つをなり得る。そこで、様々な薬剤を試したところ、ホルモン剤 (DHEA : デヒドロエピアンドステロン) の他にマクロライド系抗菌薬において Del-1 が誘導されることを新規に明らかにした。さらに同抗菌薬は、炎症によって発現が減少した Del-1 を補完する働きがあることも明らかになった。つまり、マクロライド系抗菌薬が持つとされていた免疫調節作用の一つの作用機序として Del-1 の存在が考えられる。本研究成果を生かし、マクロライド系抗菌薬、特にエリスロマイシンによる Del-1 誘導を利用したところ、エリスロマイシンによる Del-1 誘導が肺炎への治療に効果的であることが明らかになった (下図)。

Fig. 1



さらに、本申請研究により Del-1 誘導に対して血管内皮細胞の表面作用受容体が同定された (Trka 受容体)。以上のことから、抗炎症と骨吸収抑制機能をもつ Del-1 を、減少した生体内で安全な薬剤によって誘導することで治療へ行かせる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

- (1) Hajishengallis G, Kajikawa T, Hajishengallis E, **Maekawa T**, Reis ES, Lambris JD: Complement-Dependent Mechanisms and Interventions in Periodontal Disease. *Front Immunol.*, Mar 12;10:406, 2019.
- (2) Tamura H, **Maekawa T**, Domon H, Hiyoshi T, Yonezawa D, Nagai K, Ochiai A, Taniguchi M, Tabeta K, Maeda T, Terao Y: Peptides from rice endosperm protein restrain periodontal bone loss in mouse model of periodontitis. *Arch Oral Biol.*, Feb;98:132-139, 2019.
- (3) Nagai K, Domon H, **Maekawa T**, Hiyoshi T, Tamura H, Yonezawa D, Habuka R, Saitoh A, Terao Y: Immunization with pneumococcal elongation factor Tu enhances serotype-independent protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Vaccine.*, Jan 3;37(1):160-168, 2019.
- (4) Nagai K, Kimura O, Domon H, **Maekawa T**, Yonezawa D, Terao Y: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* clinical isolates from children with acute otitis media in Japan from 2014 to 2017. *J Infect Chemother.* Mar;25(3):229-232, 2019.
- (5) Domon H, **Maekawa T**, Yonezawa D, Nagai K, Oda M, Yanagihara K, Terao Y: Mechanism of Macrolide-Induced Inhibition of Pneumolysin Release Involves Impairment of Autolysin Release in Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Oct 24;62(11), 2019.
- (6) Bostanci N, Bao K, Li X, **Maekawa T**, Grossmann J, Panse C, Briones RA, Resuello RRG, Tuplano JV, Garcia CAG, Reis ES, Lambris JD, Hajishengallis G: Gingival Exudate Dynamics Implicate Inhibition of the Alternative Complement Pathway in the Protective Action of the C3 Inhibitor Cp40 in Nonhuman Primate Periodontitis. *J Proteome Res.* Sep 7;17(9):3153-3175, 2018.
- (7) Domon H, Nagai K, **Maekawa T**, Oda M, Yonezawa D, Takeda W, Hiyoshi T, Tamura H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia. ***Front Immunol.*** Apr 25;9:732, 2018.
- (8) Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sulijaya B, **Maekawa T**, Ushiki T, Mikami Y, Hayatsu M, Mizutani Y, Kishino S, Ogawa J, Arita M, Tabeta K, Maeda T, Yamazaki K: A bacterial metabolite ameliorates periodontal pathogen-induced gingival epithelial barrier disruption via GPR40 signaling. *Sci Rep.* Jun 13;8(1):9008, 2018.
- (9) Nagai K, Domon H, **Maekawa T**, Oda M, Hiyoshi T, Tamura H, Yonezawa D, Arai Y, Yokoji M, Tabeta K, Habuka R, Saitoh A, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. ***Cell Immunol.*** Mar;325:14-22, 2018.
- (10) Oda M, Kimura T, Isono T, **Maekawa T**, Hayashi N, Yamada N, Furue Y, Kai D, Terao Y: Sulfated vizantin induces the formation of macrophage extracellular traps. *Microbiol Immunol.* May;62(5):310-316, 2018.
- (11) Mitroulis I, Chen LS, Singh RP, Kourtzelis I, Economopoulou M, Kajikawa T,

Troullinaki M, Ziogas A, Ruppova K, Hosur K, **Maekawa T**, Wang B, Subramanian P, Tonn T, Verginis P, von Bonin M, Wobus M, Bornhäuser M, Grinenko T, Di Scala M, Hidalgo A, Wielockx B, Hajishengallis G, Chavakis T: Secreted protein Del-1 regulates myelopoiesis in the hematopoietic stem cell niche. *J. Clin. Invest.*, Oct 2;127(10):3624-3639, 2017.

(12) Tabeta K, Du X, Arimatsu K, Yokoji M, Takahashi N, Amizuka N, Crozat K, **Maekawa T**, Kaku M, Hoebe K, Ohno K, Yoshie H, Yamazaki K, Moresco EMY, Beutler B: An ENU-induced splice site mutation of mouse Colla1 causing recessive osteogenesis imperfecta and revealing a novel splicing rescue. *Sci Rep.*, Sep 15;7(1):11717 2017.

(13) ***Maekawa T**, Kulwattanaporn P, Hosur K, Oda M, Terao Y, Maeda T, * Hajishengallis G: Differential expression and roles of secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and the wingless homolog Wnt5a in periodontitis. *J. Dent. Res.*, May;96(5):571-577. 2017. *corresponding author

〔学会発表〕（計 24 件）

(1) **Maekawa T**, Genetic and Intervention Studies Implicating Keystone Pathogens and Del-1 as Major Targets for the Treatment of Periodontitis, International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Phuket, Thailand, 2019.

(2) **Maekawa T**, Del-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in periodontitis, rheumatoid arthritis and pneumonia of non-human primates, 6th Symposium of the Smart-Aging Research Center, Tohoku University, 2019.

(3) 前川知樹, 内因性抗炎症 Del-1 分子による炎症性骨破壊—歯周病とリウマチ—の治療戦略, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡, 2018.

(4) **Maekawa T**, Del-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in periodontitis, Niigata U-CU Seminar in Periodontal Research. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 2018.

(5) **Maekawa T**, Domon H, Kobayashi Y, Nagai K, Yonezawa D, Terao Y, Maeda T, Hajishengallis G. Local regulator Del1 inhibits bone-resorption via suppression of Wnt5a-Ror2 signaling. 96th General Session & Exhibition of the IADR, London, England, 2018.

(6) **Maekawa T**, Kobayashi Y, Domon H, Tamura H, Hiyoshi T, Maeda T, Terao Y, Hajishengallis G. Local regulator Del1 inhibits bone-resorption via suppression of Wnt5a-Ror2 signaling. ASBMR 2018 Annual Meeting, Montreal, Canada, 2018.

(7) 前川知樹, 小林泰浩, 土門久哲, 田村 光, 日吉 巧, 永井康介, 寺尾 豊, 前田健康. 内因性抗炎症分子 Del-1 分子誘導による炎症性骨破壊の新規治療戦略. 第 4 回日本骨免疫学会, 沖縄, 2018.

(8) 前川知樹, 内因性抗炎症 Del-1 分子誘導による炎症性骨破壊の新規治療戦略. 秋季日本歯周病学会学術大会, 大阪, 2018.

(9) 前川知樹, 内因性抗炎症分子 Del-1 を介したマクロライド系抗菌薬の新作用機序, 第 25 回マクロライド新作用研究会, 東京, 2018.

(10) **Maekawa T**, Inhibition of pre-existing natural periodontal inflammation in non-human primates by a locally administered peptide inhibitor of complement C3. 7th TIMNAS and 4th JSMiD, 2017.

(11) **Maekawa T**, Genetic and intervention studies implicating keystone pathogens as a major target for the treatment of periodontitis. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017.

(12) 前川知樹, 内因性 Del-1 分子による炎症性骨吸収の制御メカニズム解析とサルの応用研究, 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会, 2017.

(13) 前川知樹, 内因性 Del-1 分子と歯周病. クローズアップセッション「骨免疫と歯周病」, 第 3 回日本骨免疫学会ウインターセミナー, 2018.

(14) 前川知樹, Del-1 分子による歯周炎制御メカニズム解析とサルの応用研究, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017.

(15) **Maekawa T**, Del-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in periodontitis, International collaborative symposium on development of human resources in practical oral health and treatment, 2018.

(16) 前川知樹, 小林泰浩, 土門久哲, 寺尾 豊, 前田健康, Hajishengallis George. 抗炎症性分子 Del-1 は Wnt5a-Ror2 伝達経路を阻害し骨吸収を抑制する, 第 3 回日本骨免疫学会, 2017.

- (17) **前川知樹**, 小林泰浩, 土門久哲, 永井康介, 寺尾 豊, 前田健康. 抗炎症性分子 Del-1 は Wnt5a-Ror2 伝達経路を阻害し骨吸収を抑制する, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017.
- (18) **前川知樹**, Del-1 分子による歯周炎の制御メカニズム解析とサル応用研究, 第 3 回口腔医科学フロンティア研究会, 2018.
- (19) **前川知樹**, 前田健康, 寺尾豊. Porphyromonas gingivalis は補体 C5a と TLR を利用して免疫系から回避する, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2016.
- (20) **前川知樹**, 内因性 Del-1 分子による炎症性骨吸収の制御メカニズム解析とサル応用研究, 第 19 回骨代謝研究会, 2017.
- (21) **前川知樹**, Keystone 細菌と生体の相互作用, 第 69 回日本細菌学会関西支部総会, 2016.
- (22) **Maekawa T**, Kulwattanaporn P, Hosur K, Domon H, Terao Y, Maeda T, Hajishengallis G. Differential expression and roles of sfrp5 and Wnt5a in periodontitis. 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017.
- (23) **Maekawa T**, Maeda T, Hajishengallis G. Inhibition of periodontitis in non-human primates by a locally administered complement C3 inhibitor, 94th General Session & Exhibition of the IADR, 2016.
- (24) **前川知樹**, 前田健康, サル自然発症歯周炎に対する補体 C3 インヒビターの治療効果について, 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.caos-niigata-univ.net/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。