

機関番号：32703

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592438

研究課題名（和文） 酸化型ガレクチン-1によるマクロファージを介した歯周病制御の基礎的研究

研究課題名（英文） BASIC RESEARCH FOR EFFECT OF OXIDISED GALECTIN-1 ON PERIODONTAL DISEASE THROUGH MACROPHAGE

研究代表者

堀江 秀典（HORIE HIDENORI）

神奈川歯科大学・歯学部・客員教授

研究者番号：80046135

研究成果の概要（和文）：ガレクチン-1が歯周組織に存在すること、更に歯周組織に口腔内細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) を作用させるとその発現が上昇することを見いだした。また炎症に際して lipopolysaccharide (LPS) がマクロファージを活性化し interleukin-1 (IL-1), interleukin -6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS) などの炎症活性化物質を放出する機能を酸化型ガレクチン-1 (GAL-1/Ox) が抑制することを明らかにした。このことより酸化型ガレクチン-1が歯周病の進行を予防する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We established that galectin-1 mRNA is expressed in rat gingival tissues and also showed that galectin-1 mRNA significantly increased by the challenge with *Porphyromonas gingivalis* indicating galectin-1 may regulate oral inflammation. On the other hand, LPS (100 ng/ml) induced macrophages to upregulate mRNAs associated with a pro-inflammatory response, ie, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin -6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS). We show that oxidized galectin-1 application (10 ng/ml) to LPS-treated macrophages reduced the LPS-induced increase in pro-inflammatory mRNA expression. oxidized galectin-1 restricts the pro-inflammatory actions of LPS, and this protein could limit the negative effects of inflammation in periodontitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経再生、炎症、歯周病、

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：ガレクチン-1、マクロファージ、歯周病、LPS, サイトカイン、炎症、予防

1. 研究開始当初の背景

(1) 酸化型ガレクチン-1が末梢神経再生を促進すること。

(2) 酸化型ガレクチン-1の標的細胞がマクロファージであること。

(3) 酸化型ガレクチン-1がマクロファ

ーシの機能を制御していること。

- (4) マクロファージは炎症で重要な役割を果たしていることから、酸化型ガレクチン-1が炎症を抑制する可能性のあること
- (5) 酸化型ガレクチン-1が歯周病を予防する可能性があること。

2. 研究の目的

- (1) ガレクチン-1が歯周組織に存在し、口腔内細菌の感作により発現が上昇することを明らかにする。
- (2) 炎症の in vitro モデルとして培養マクロファージに LPS を作用させた系を用い、LPS による炎症活性物質の産生が上昇することを確認する。
- (3) この炎症モデルにガレクチン-1の細胞外でのフォームである酸化型ガレクチン-1を作用させると炎症活性物質の産生が抑制されることを証明する。

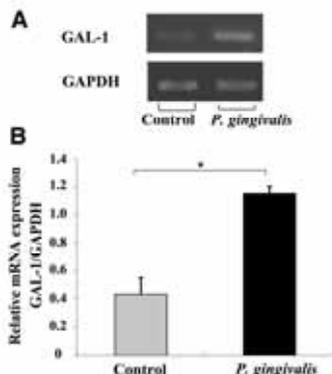
3. 研究の方法

- (1) 10 週齢のラットを用いた。
- (2) ラットの歯周組織を取り出し、ガレクチン-1の mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。
- (3) 口腔内細菌 *P.gingivalis* をラットの歯周組織に 48 時間間隔で 4 回感作させた後歯周組織内のガレクチン-1の発現変化を RT-PCR で解析した。
- (4) ラット腹腔よりマクロファージを取り出して 10% 血清存在下、並びに無血清の両培養液中での培養を行った。この培養マクロファージに LPS を作用させ炎症活性物質 IL-1 β , IL-6, iNOS の mRNA 発現変化を RT-PCR と real time PCR (定量解析) で解析した。
- (5) リコンビナントヒューマンガレクチン-1を酸化させて作製した酸化型ガレクチン-1 (GAL-1/Ox) を用いた。この GAL-1/Ox を LPS 存在下の培養液に加え、LPS で活性化されたマクロファージ内での炎症活性物質の mRNA 発現を抑制する効果を RT-PCR と real time PCR (定量解析) で解析した。

4. 研究成果

- (1) ガレクチン-1は歯周組織に発現し、歯周菌を感作させるとその発現は上昇する

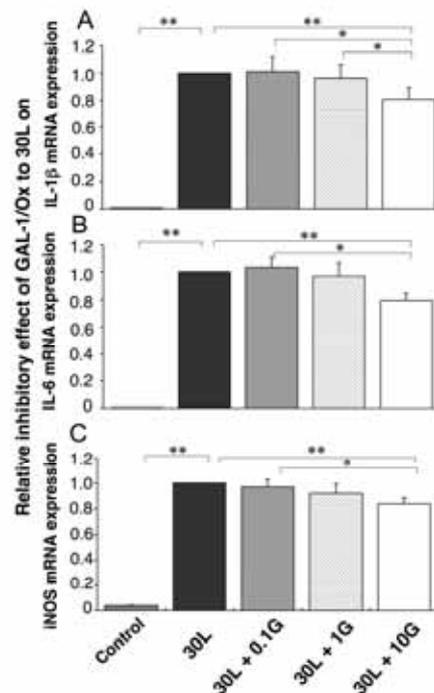
ラットの歯周組織を取り出し RT-PCR で解析した結果、図 1A に見られるようにガレクチン-1の mRNA 発現が周組織に認められた。



更にラットの口腔内に口腔内細菌 (*P.gingivalis*) を感作させた結果、ガレクチン-1の発現が有意に上昇することが判明した (図 1A,B)。

< 図 1 > ガレクチン-1 mRNA の歯周組織内での発現と口腔内細菌の感作効果を RT-PCR により解析. *: Analysis of variance. p<0.005.

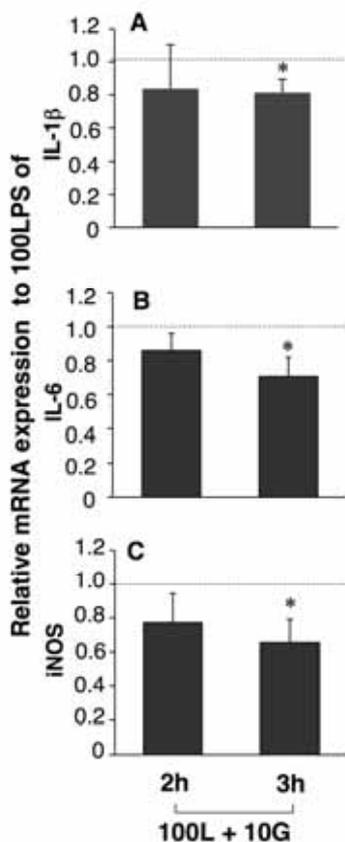
- (2) 酸化型ガレクチン-1は濃度依存的に LPS によるマクロファージ内の炎症活性物質の mRNA 発現上昇を抑制する



< 図 2 > GAL-1/Ox による LPS 活性の濃度依存的抑制効果を Real time PCR により解析. 30L:30ng/ml LPS, 0.1G: 0.1ng/ml GAL-1/Ox, 1G: 1ng/ml GAL-1/Ox, 10G: 10ng/ml GAL-1/Ox. **: t-test, n=7, p<0.01.

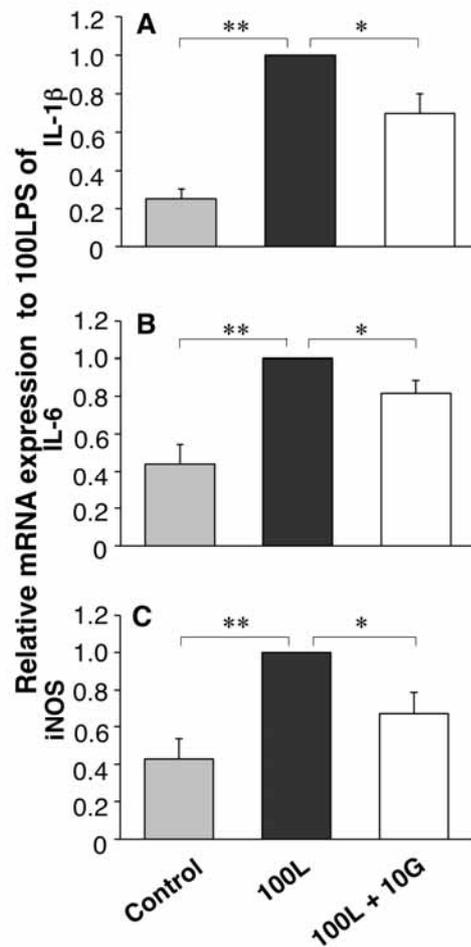
ラットの腹部より摘出されたマクロファージを 10%血清入りの培養液中で培養し、30ng/ml の LPS を加えた時の 3 種類の炎症活性物質 IL-1 β , IL-6, iNOS の mRNA 発現を real time PCR で解析した。その結果発現量が大幅に上昇することが判明した (図 2A,B,C の 30L)。更に上記 LPS を含む培養液に 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml の 3 種類の異なる濃度の酸化型ガレクチン-1 (GAL-1/Ox) を加え、LPS による炎症活性物質の mRNA 発現増強作用に対する効果を検討した。図 2 の A に見られるように 0.1ng/ml の GAL-1/Ox を加えた時では全く LPS による IL-1 β の mRNA の発現増加の抑制が見られなかったが、1ng/ml、10ng/ml の GAL-1/Ox を加えると濃度依存的に抑制効果が増し、10ng/ml では有意に発現上昇を抑制した。同様な GAL-1/Ox による濃度依存的な LPS による発現上昇抑制効果は IL-6, iNOS でも見られ、10ng/ml でその効果が有意であることが明らかとなった (図 2 B,C)。

(3) 無血清下での LPS による炎症活性物質の mRNA 発現増加を酸化型ガレクチン-1 は抑制する



< 図 3 > 無血清下での GAL-1/Ox による LPS 活性の抑制効果を RT-PCR により解析。100L: 100ng/ml LPS, 10G: 10ng/ml GAL-1/Ox. *: t-test, n=6, p<0.05.

血清には多くの活性物質が含まれているので、その効果を除去するためマクロファージを無血清培養液中で培養した。無血清培養液中のマクロファージに 100ng/ml LPS を作用させると、血清存在下より活性は低くなるものの 3 種類の炎症活性物質の mRNA 発現が上昇した (図 4A,B,C)。その培養系に 10ng/ml の GAL-1/Ox を加え LPS による炎症活性物質 mRNA の発現増加の抑制効果を培養後 1 時間、2 時間、3 時間と経時的に RT-PCR で解析した。各時間における LPS と GAL-1/Ox を含んだ培養液中で培養した時の mRNA の発現量 (100L+10G) を LPS だけを含んだ培養液中で培養した時の発現量 (100L) で割った値を図 3 に示した。この値が 1 より小さい時は LPS の活性が GAL-1/Ox により抑制されたことを示す。図 3 の A が示すように培養後 3 時間では有意に LPS による IL-1 β の mRNA 発現増



<図4> 無血清下での GAL-1/Ox による LPS 活性の抑制効果を Real time PCR により解析 .100L: 100ng/ml LPS, 10G: 10ng/ml GAL-1/Ox. *: t-test, n=6, p<0.05. **: t-test, n=6, P<0.01.

加が GAL-1/Ox により抑制された。同様に LPS による IL-6, iNOS の mRNA の発現増加は GAL-1/Ox により抑制された (図 3 B,C)。

この培養 3 時間後の LPS だけの培養液中での 3 種類の炎症活性化物質の mRNA 量 (100L) 並びに LPS に GAL-1/Ox を加えた培養液中で培養した時の 3 種類の炎症活性化物質の mRNA 量 (100L+10G) を real time PCR で解析した。図 4A が示すように 10ng/ml GAL-1/Ox を加えることにより LPS による IL-1 β の mRNA の発現増加が抑えられた。同様に GAL-1/Ox は LPS による IL-6 並びに iNOS の mRNA の発現増加を抑制した (図 4B,C)。この real time PCR による解析結果は図 3 で示された RT-PCR による解析結果と一致した。

(4) 考察

以上の結果ガレクチン-1 が歯周組織に発現し、口腔内細菌によりその発現が上昇することが明らかとなった。更に酸化型ガレクチン-1 が LPS による炎症活性化物質の mRNA 発現増加を抑制することを見いだした。

ガレクチン-1 が歯周組織に発現していること

ガレクチン-1 が神経組織、肺、肝臓、などさまざまな組織に発現していることは既に報告されているが、歯周組織に発現していることは本研究により初めて明らかにされた。そのガレクチン-1 の mRNA の発現が口腔内細菌 (*P.gingivalis*) を感作させることにより増加することが判明した。この細菌感染により炎症が進行しそれに伴いガレクチン-1 のレベルが上がることからガレクチン-1 が炎症の調節に関与している可能性が示唆された。

酸化型ガレクチン-1 の抗炎症作用

我々は酸化型ガレクチン-1 のターゲットセルがマクロファージであること、そして損傷後の末梢神経再生を促進することを証明してきた。このことから歯周組織内のガレクチン-1 が細胞外へ放出され酸化型ガレクチン-1 となりマクロファージの機能を制御し歯周組織での炎症を改善する可能性が考えられた。我々は *in vitro* モデルとして培養マクロファージに細菌から分泌される炎症促進物質である LPS を加えた系を用い、この可能性を検証した。LPS を培養液に加えるとマクロファージ内の 3 種類の炎症活性化物質 IL-1 β , IL-6, iNOS の mRNA の発現が上昇し、酸化型レクチン-1 を投与することによりそ

の発現上昇が抑制された。このことから酸化型ガレクチン-1 が炎症抑制物質の有力な候補であることが示唆された。この酸化型ガレクチン-1 による炎症活性化抑制作用は血清中の LPS 結合タンパクなどを含まない無血清培養液中でも見られた。

酸化型ガレクチン-1 による炎症活性化抑制作用の機構はまだ明らかにされていない。酸化型ガレクチン-1 は糖質と結合するレクチン活性を持っていないので、LPS と直接結合してその機能を抑制する可能性はないと考えられる。また無血清培養液中でも LPS 活性抑制作用を示すことから血清中の LPS 結合タンパク質もターゲットとは考えられない。有力な候補としてマクロファージで産生される LPS 受容体 CD-14 (膜結合型と可溶型がある) があげられる。この受容体に酸化型ガレクチン-1 が作用しその機能を抑制することにより LPS 機能を阻害することは有力な作用機序の 1 つと考えられる。他の有力な機序としては LPS の複合型受容体からのシグナル伝達をブロックすることである。この受容体からのシグナルにより NF- κ B が活性化され炎症活性化物質の発現が上昇するので、この伝達ブロックにより炎症活性化物質の発現が抑制される。詳しい作用機序の解明はこれからの研究に期待される。

結語

本研究によりガレクチン-1 の mRNA が歯周組織に発現している、口腔内細菌の感作によりその発現が顕著に上昇する。このガレクチン-1 の発現上昇が炎症を抑制する可能性について培養マクロファージに LPS を作用させた炎症モデルを導入して検証した。LPS により活性化されたマクロファージ内では炎症活性化物質 (IL-1 β , IL-6, iNOS) の mRNA 発現が増加するが、酸化型ガレクチン-1 を作用させることによりその増加は抑制された。以上の結果酸化型ガレクチン-1 は抗炎症物質として機能することができ、歯周病下でのマクロファージの活性化を抑制し歯周病の進行を抑える可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Kogawa Y, Nakajima K, Sasaguri K, Hamada N, Kawasaki H, Sato S, Kasoya T, Horie H. Oxidized galectin-1 reduces lipopolysaccharide-induced increase of proinflammatory cytokine mRNA in cultured macrophages. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry 3:1-8, 2011. 査読有

Iwamoto M, Taguchi C, Sasaguri K, Kubo K, Horie H, Yamamoto T, Onozuka M, Sato S, Kadoya T. The galectin-1 level in serum as a novel marker for stress. *Glycoconj J* 27: 419-425, 2010. 査読有

Gaudet AD, Leung M, Poirier F, Kadoya T, Horie H, Matt S, Ramer MS. A role for galectin-1 in the immune response to peripheral nerve injury. *Experimental Neurology* 220: 320-327, 2009. 査読有
Kajitani K, Nomaru H, Ifuku M, Yutsudo N, Dan Y, Miura T, Tsuchimoto D, Sakumi K, Kadoya T, Horie H, Poirier F, Noda M and Nakabeppu Y. Galectin-1 promotes basal and kainate-induced proliferation of neural progenitors in the dentate gyrus of adult mouse hippocampus. *Cell Death and Differentiation*, 16, 417-427, 2009. 査読有

【学会発表】(計16件)

岩本 真由子ほか. 新規ストレスマーカーとしての血清中 Galectin-1 の検討. 第33回日本神経科学学会, 2010年9月4日, 神戸.

吉村和法 ほか. アルブミン、酸化型ガレクチン-1、あるいは還元型ガレクチン-1で刺激したマクロファージの経時的プロテオーム解析. 第33回日本神経科学学会, 2010年9月3日, 神戸.

堀江秀典 ほか. 酸化型ガレクチン-1による神経損傷後の修復機構. 第33回日本神経科学学会, 2010年9月3日, 神戸.

Taguchi C. et al. Generation and characterization of human Galectin-1 monoclonal antibody. *International Association for Dental Research 2010*, 2010年7月17日, Barcelona, Spain.

Kogawa Y, et al. Oxidized galectin-1 inhibits LPS activity to increase cytokines in macrophages. *International Association for Dental Research 2010*, 2010年7月15日, Barcelona, Spain.

Horie H. Oxidized galectin-1 regulates macrophage functions to promote peripheral nerve regeneration. *The First International Conference on Neural Tissue Culture*, 2010年6月25日, Seoul, Korea.

古川幸枝 ほか. 酸化型ガレクチン-1によるマクロファージの活性化抑制機構. 第44回神奈川歯科大学学会, 2009年12月5日, 神奈川.

古川幸枝 ほか. 歯周病におけるガレクチン-1の局在と機能. 第68回日本矯正歯科学会, 2009年11月18日, 福岡.

古川幸枝 ほか. 酸化型ガレクチン-1によるLPSを介したマクロファージの活性化抑制. 第32回日本神経科学学会, 2009年9月18日, 名古屋.

越後佑 ほか. RAW 264.7における酸化型ガレクチン-1による遺伝子発現の変化の解析. 第32回日本神経科学学会, 2009年9月17日, 名古屋.

三五一憲 ほか. GDNFによるDRGニューロンの神経突起伸長促進ならびにGalectin-1・Galectin-3の発現誘導. 第32回日本神経科学学会, 2009年9月16日, 名古屋.

三五一憲 ほか. 後根神経節ニューロンにおけるガレクチン-1ならびにガレクチン-3の発現局在と機能. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第24回学術集会, 2009年6月21日, 群馬.

古川幸枝 ほか. 歯肉組織におけるガレクチン-1の局在と機能. 第31回日本神経科学学会, 2008年7月11日, 東京.

能丸寛子ほか. アストロサイトが産生するガレクチン-1は興奮毒性による脳損傷後のマウス海馬胃おける神経再生を促進. 第31回日本神経科学学会, 2008年7月9日, 東京.

杉木隼人ほか. ゼブラフィッシュ視神経軸索の再生. 第31回日本神経科学学会, 2008年7月9日, 東京.

Kogawa Y, et al. Galectin-1 localizing in gingival tissues regulates macrophage cytokine mRNA expression. *86th IADA*, 2008年7月4日, Toronto, Canada.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 秀典 (HORIE HIDENORI)
神奈川歯科大・歯学部・客員教授
研究者番号: 80046135

(2) 連携研究者

笹栗 健一 (SASAGURI KENICHI)
神奈川歯科大・歯学部・講師
研究者番号: 10235286
浜田 信城 (HAMADA NOBUSHIRO)
神奈川歯科大・歯学部・教授
研究者番号: 20247315
野崎 直仁 (NOZAKI NAOHITO)
神奈川歯科大・歯学部・講師
研究者番号: 70222198