

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593051

研究課題名(和文) ヒト唾液中ガレクチン-1の口腔内機能解析とその創薬展開

研究課題名(英文) Functional analysis in oral cavity of human saliva Galectin-1 and drug deploy of the protein

研究代表者

笹栗 健一 (SASAGURI, KENICHI)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10235286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチン-1(Gal-1)は、全身の広範囲に分布する多機能蛋白質であり、近年マクロファージの炎症性サイトカインの分泌に対し抑制的に働くことが明らかとなってきた。さらに、ヒト唾液中にGal-1が分泌されることが明らかになったことから、P.gingivalisを用いた実験的歯周病発症ラットを作製しGal-1の口腔内機能の解析した。その結果、ラット口腔内Gal-1濃度の100倍のGal-1に実験的歯周炎による骨吸収に対し抑制的作用がある可能性が示唆された。今後、Gal-1の歯周炎に対する抑制効果の機構を解明し、将来的には創薬へ展開する可能性を検討する。

研究成果の概要(英文)：Galectin-1(Gal-1) is a multifunctional protein that is widely distributed throughout the body, and recently has been found to inhibit the secretion of inflammatory cytokines by macrophages. In addition, since Gal-1 has been found to be secreted in human saliva, the functions of Gal-1 in the oral cavity were analyzed by using P.gingivalis to prepare rats with periodontal disease. The results suggested that Gal-1 may have an inhibitory effect on bone resorption caused by experimental periodontitis at concentrations 100 times higher than those found in the rat's oral cavities. In the future, we will elucidate the mechanism behind the inhibitory effect of Gal-1 on periodontitis, and will examine the possibility of the future expansion of its use in the development of new drugs.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正(小児系)歯学・歯科矯正学

キーワード：Galectin-1 saliva

1. 研究開始当初の背景

ガレクチン-1 (Gal-1) は、全身の広範囲に分布し正常細胞及び腫瘍細胞から産生され、腫瘍の形質転換・アポトーシス・細胞接着・神経再生や免疫・炎症系に関連した多機能レクチンとして知られている。さらに本申請の連携研究者の堀江らは、抹消神経の障害後神経再生・機能再建を促進する物質の一つとして酸化型 Gal-1 が関与していることを発見し (Horie, et al J. Neurosci, 1999)。さらに、酸化型 Gal-1 の作用機序解析を進めていった結果、その標的細胞がマクロファージであることを報告した (Horie, et al J. Neurosci, 2004)。また、本申請者はヒト・ラット唾液中に Gal-1 が分泌されていることをウエスタンブロットを用いて明らかにしている (未発表データ)。

一方、歯周病は多形核白血球ついでマクロファージによる応答さらに T-cell・B-cell 細胞病変が惹起され、歯周炎が成立するまでの機構が徐々に明らかになってきており、多くの増殖因子やサイトカインネットワークの解明に向け精力的なアプローチが行われている。しかし、歯周病の初期成立過程やその進行のメカニズムは依然として不明であり、その予防や治療も今後の研究がまたれているのが現状である。

そこで、本申請では唾液中に存在する Gal-1 と歯周病によって誘導されるマクロファージとの関連性を検討することを目的に、ラット口腔内に *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) を接種し実験的歯周病を作製し、human recombinant Gal-1(hr-Gal-1) を作用させその骨吸収に及ぼす影響を検討することとした。

2. 研究の目的

本申請者は、これまでにウエスタンブロット法を用いてヒトおよびラット唾液中に Gal-1 が分泌され、特にヒトではその分泌量に個人差があることを確認済みである(未発表データ)。そこで本研

究では、培養 *P. gingivalis* を用いて実験的ラット歯周病モデルを作製し、hr-Gal-1 および遺伝子操作により構築した酸化型 Gal-1 (CS-Gal-1) さらに Gal-1 抗体を用いて、誘導された炎症症状に対する影響を Gal-1 とマクロファージの関連性を歯槽骨の吸収を指標に検討しその機構を解明することで、将来的に新規創薬の開発に展開する可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒトリンパ腫由来単球細胞 U937 を用いたヒトマクロファージ細胞への分化・誘導系の確立

ヒトリンパ腫由来単球細胞 U937 を 24well に 1×10^6 cell/well の細胞数で播種し、フォルボールエステル (PMA) を作用させマクロファージに分化誘導を行う。分化誘導終了後、浮遊細胞を培養液の交換にて除去し、接着細胞を本実験に使用する。

RT-PCR・ELISA による LPS 刺激 U937 ヒトマクロファージ細胞活性化の検討

ヒトマクロファージ細胞に LPS の濃度・作用時間を変化させて添加し、IL-1 や IL-6 等の炎症性ケミカルメディエーターの誘導・発現を検討する。これまでの基礎的検討からマクロファージからは、Trizol 溶出後エタノール中で沈殿し抽出する一般的な方法での mRNA を得ることは困難である。そこで、RNA 吸着カラムを用いた RNA 抽出法である Qiagen 社の RNeasy Mini を用いる。この方法により mRNA を安定して取り出すことができるようになり、そのサンプルを用いて RT-PCR 法にて遺伝子発現量を検討中とする。同時に、各種条件による培養上清を収集し ELISA 方にて細胞が分泌した蛋白量に関しても検討する

Gal-1 の LPS 刺激による U937 マクロファージ活性化の抑制機構の検討

で得られた LPS 至適濃度により刺激された U937 マクロファージに対し Gal-1 の至適濃度・作用時間を変化させ炎症性ケミカルメディエー

ターの IL-1、IL-6 等の発現を指標として RT-PCR、ELISA を用いてコントロール群と比較し解析する。

U937 マクロファージにおける Gal-1 受容体の同定及びシグナル伝達系の解析

連携研究者の堀江らの研究結果から、ガレクチン-1 が末梢神経の障害後の神経再生・機能再建を促進し、その反応の標的細胞がマクロファージであることが明らかになっている(Horie et al, J Neurosci, 2004)。すなわち、マクロファージが何らかの受容体を有していることは明らかであるが、未だにその受容体は明らかになっておらず、またその細胞内シグナル伝達系についての報告も認められない。そこで、ガレクチン-1 の LPS による U937 マクロファージ活性化抑制効果の至適濃度・作用時間が明らかとなった条件で、レセプターアッセイ・DNA chip・プロテオーム解析を用いて、網羅的にガレクチン-1 の細胞に及ぼす影響を検討する。

ラット唾液中 Gal-1 濃度の計測

申請者らは、P.gingivalis をラットに感染させ実験的歯周病モデルを用い、Gal-1 の抑制効果を検討するため、ラット唾液中の Gal-1 の有無・濃度を知る必要がある。そこで、ピロカルピンを腹腔内投与し副交感神経を刺激することで得られた唾液をウエスタンブロット法を用いて検討する。

P.gingivalis に対する Gal-1,CS-Gal-1 および Gal-1 抗体の直接的影響の検討

実験的歯周病ラットに対する各タンパク質の影響を検討するにあたり、P.gingivalis に対して直接的な抑制効果が認められるか否かを検討する必要がある。そこで、通法に則り培地に P.gingivalis を播種し、各タンパク質を 0.01 ~ 1000 倍容量濾紙に添付し阻止円の形成を評価する。

実験的歯周炎発症モデルラットに対する Gal-1 接種による骨吸収抑制効果の検討

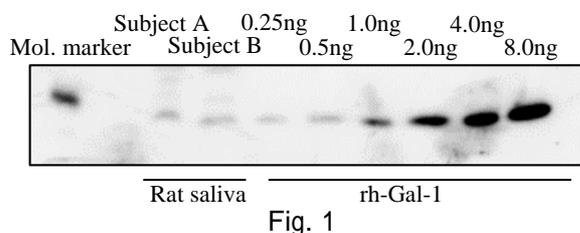
本申請者は、共同研究者の浜田が株化した歯周病原菌細菌の P.gingivalis 株を暴露することで作成する歯周炎モデルマウスを使用し、夜間拘束ストレスや ブロッカーの投与により歯槽骨の吸収に影響を及ぼすことを報告してきた(Nakajima K.,Sasaguri K.et al. J. Periodontal Res. 2006.,Okada Y., Sasaguri K. et al., Arch Oral Biol. 2010)。そこで、本申請では、同様にラットに対して P.gingivalis 株を暴露し、実験的歯周病ラットを作製し、ラット唾液中の Gal-1 蛋白濃度を指標として Gal-1、還元型 Gal-1(CS-Gal-1)ならびに Gal-1 抗体それぞれの濃度を变化させて 21 日間毎日口腔内に接種する。その後、顎態標本作製し、セメント - エナメル境と歯槽骨の距離を計測することで歯槽骨吸収に及ぼす影響を検討する。さらに、組織切片を作製し TRAP 染色を行い誘導された破骨細胞数を各群で比較検討する。

4 . 研究成果

これまでに我々は、ラット腹腔内由来マクロファージを採取し E-LPS を用いて刺激し rh-Gal-1 を添加したところ誘導される炎症メディエーターである IL-1、IL-6 の遺伝子発現が抑制されることを報告した (Clinical, Cosmetic and Investgational Dentistry. Vol.3, P1-8;2011)。本申請では、Gal-1 のマクロファージ受容体を検討する目的で、まずヒトリンパ腫由来単球細胞 U937 に対して PMA を用いて刺激しマクロファージに分化させる系を確立することとした。その結果、誘導されたマクロファージは形態的・遺伝子発現的に効率よく分化し、さらに E-LPS 刺激により炎症性サイトカイン遺伝子の発現が増加したことから実験系を確立したと考えられた。そこで、本実験系に rh-Gal-1,CS-Gal-1 を添加し IL-1、IL-6,COX-2,TNF- の遺伝子発現を検討したが、ラット腹腔内由来 Primary マクロファージの反応とは異なり Gal-1 による各種炎症メディエーターの抑制作用は認められなかった。すな

わち、ヒトリンパ腫由来単球細胞 U937 から PMA 刺激で誘導されたマクロファージは Gal-1 受容体が存在しない可能性があることが明らかとなった。

本申請では、P.gingivalis を用いて実験的歯周病発症ラットを作製し、Gal-1,CS-Gal-1 ならびに Gal-1 抗体をラット口腔内に添加しその抑制作用の検討を行うにあたり、ラット唾液中の Gal-1 濃度を知る必要があるためウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、ラット唾液中 Gal-1 濃度は平均 0.05ng/ul であることが明らかとなった (Fig.1)。



次に、P.gingivalis に対して各蛋白質が直接的な作用があるか否かを検討するため、通法に従い培地に細菌を播種し、口腔内 Gal-1 濃度 0.05ng/ul を指標として 0.01 ~ 100 倍濃度の各蛋白質を作用させた結果、すべての濃度で P.gingivalis 発育の阻害作用は認められなかった。そこで次に歯周病モデルラットを作製し検討した。用いた各蛋白質の濃度は、 $\times 10$ 、 $\times 100$ 倍でコントロールも含め各群 6 ~ 7 匹として計 8 群で検討を加えた。その結果、P.gingivalis 単独で作用したものに比べ、有意差は認められなかったが Gal-1 $\times 100$ のみに骨吸収の抑制作用の傾向が認められた (Fig.2)。



現在、本実験系を用いて詳細に検討中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

門屋 利彦、岩本 真由子、小泉 創、堀江 秀典、越野 江利子、宮原 初美、山本 利春、笹栗 健一
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

笹栗 健一 (Sasaguri Kenichi)
神奈川歯科大学・歯学研究科 (研究院)・
講師
研究者番号：10235286

(2) 研究分担者

門屋 利彦 (Kadoya Toshihiko)
前橋工科大学・工学部・生物工学科・教授
研究者番号：40551875

(3) 連携研究者

()

研究者番号：