

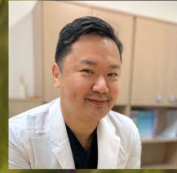
2023.2024年度北海道大学拠点/橋渡し研究プログラム/シーズA

北海道大学  
臨床研究開発センター

## 骨再生を目的としたDEL-1誘導薬剤開発

前川 知樹 (Tomoki Maekawa)

新潟大学大学院歯学総合研究科高度口腔機能教育研究センター  
新潟大学研究統括機構



自らの強さを学ぶ  
新潟大学  
NIGATA UNIVERSITY

### Introduction

- 老化にともなう組織柔軟性および臓器の再生能力低下によるフレイルは、長寿社会における健康寿命の延伸において解決すべき課題である。生体の優れた治癒および環境への適応能力は老化とともに低下し、容易に外傷や感染症による疾患発症を伴う。加えて老化生体において、疾患治療による十分な組織修復や再生能力が認められない。これら老化に伴う再生と修復機構の破綻メカニズムは未だ不明であり、適切な老化マーカーも存在しない。
- 内因性の抗炎症因子であるDevelopment endothelial locus-1 (DEL-1)は、生体内で恒常的に発現が認められる。
- このDEL-1が、炎症の寛解と組織修復と再生、老化した幹細胞の若返りを促す機能を持つことや、生体作用機構(下左図)を明らかにし、老化性疾患である歯周炎とリウマチ性関節炎および肺炎の病態解明と疾患治療法への展開を目指してきた(Sci Transl Med 2015, Nat Commun 2015, J Clin Invest 2017, JCI Insight 2020, J Biol Chem 2020, 2023, iScience, 2024)。
- DEL-1は若齢において高発現であるが顕著な表現系はなく、ストレスや外傷に対して抵抗性を示す。しかしその発現は老化とともに減少し、老化細胞の蓄積と組織修復再生に対する柔軟性が失われる。
- そこで本研究開発では、老化とともに減少するDEL-1の生体内での機能解明を行うとともに、生体内で安全にDEL-1を誘導できる薬剤を開発し、老化除去薬および骨再生剤としての展開を試みる。
- これまでに、DEL-1はマクロライド系抗菌薬が誘導することを明らかにしてきた。そこで、抗菌作用を除去したマクロライド系抗菌薬を使用した新しい骨再生剤を開発する。
- 老化に伴う組織の変化とその再生に与えるDEL-1の効果を、老齢マウス、サルを使用し解明する。本項目はAMED事業Interstellar Initiativeで行われた老化関連の予備研究成果(AMED/NYAS共催のHealthy Longevity award(健康長寿部門)および全米医学アカデミーのCatalyst Award(選出)が深く関わっている。本項目によりDEL-1を起点とする疾患メカニズム解明および組織修復・再生戦略につながる可能性が高い。



### Methodology

- 14または15員環マクロライド系抗菌薬
  - 1) エリスロマイシン(ERM)
  - 2) クラリスロマイシン(CLR)
  - 3) アジスロマイシン(AZM)
- マウス: C57BL/6J male mic, Prx1<sup>Cre</sup>/Dhhlox/Box<sup>VE-Cadherin</sup> male mic, EC-De1-1-Tg, CD73KO, CD73-EC-De1-1-Tg

Experimental timeline: Aged mice (77-80 weeks) receive daily IP injection of macrolides for 9 days. Samples are collected for histology and analysis.

Analysis steps:
 

- (1) Bone analysis: Measure distance from cementumal junction (CEJ) to alveolar bone crest (ABC).
- (2) RT-PCR: Measure DEL-1 gene expression in osteogenic gene expression.
- (3) Immunofluorescence: Cryosection for tissue sections.
- (4) Staining: Staining for histology.
- (5) Osteogenic differentiation: Primary mouse PDL cells (PDLcs).
- (6) Osteoclastogenesis assay: Primary mouse osteoclast precursors.

Cell study:
 

- Primary mouse periodontal ligament cells (primary mouse PDLcs)
- Human iPSC-derived mesenchymal stem cells (human MSCs)

Macrolide Treatment: Includes Osteogenic differentiation, Histological examination, Cell assay, and RT-PCR.

### Results

(1) マクロライドの投与により、野生型の老化マウスでは歯槽骨再生が認められるが、DEL-1欠損マウスではその効果が消失した

**A. Aged WT**  
 Alveolar bone gain (mm): 0.5 to 1.5. Significant increase with ERM, CLR, AZM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. Mean ± S.D. n = 4 mice/gr. One-way ANOVA & Dunnett test.

**B. Aged Del1<sup>-/-</sup>**  
 Alveolar bone gain (mm): 0.5 to 1.5. No significant increase with ERM, CLR, AZM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. Mean ± S.D. n = 2 mice/gr. One-way ANOVA & Dunnett test.

(2) エリスロマイシンの8週間わたる連続投与(週2回)にて、老化による骨粗鬆症を改善させた

骨密度(BMD)の改善: Significant increase in BMD for Aged WT + ERM compared to Aged WT - ERM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. Mean ± S.D. n = 2 mice/gr. One-way ANOVA & Dunnett test.

(3) マクロライド系抗菌薬は、間葉系幹細胞ニッチへDEL-1を誘導する

**A. Aged WT**  
 Staining for DAPI, DEL-1, CD31. Shows increased DEL-1 expression in the niche with ERM, CLR, AZM. Scale bar 100 μm.

**B. Aged Del1<sup>-/-</sup>**  
 Staining for DAPI, DEL-1, CD31. Shows reduced DEL-1 expression in the niche with ERM, CLR, AZM. Scale bar 100 μm.

(4) マクロライド系抗菌薬の抗菌作用を除去し、さらにDEL-1誘導効果を向上させた薬剤の開発(北里大学との共同研究-AMED BINDS)

DEL-1強発現誘導体の開発: Development of EM-523, a DEL-1-inducing agent without antibiogram activity.

Body treatment: Significant increase in alveolar bone gain with EM-523. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. Mean ± S.D. n = 4 mice/gr. One-way ANOVA & Dunnett test.

Week treatment: Significant increase in alveolar bone gain with EM-523. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. Mean ± S.D. n = 4 mice/gr. One-way ANOVA & Dunnett test.

DEL-1の強い発現により、老化間葉系幹細胞が除去され、増加した間葉系幹細胞が骨組織を作り出すことを示した。→ではDEL-1はどのように老化細胞を除去しているのか?

### (5) マクロライド系抗菌薬は間葉系幹細胞の骨分化を促進する

**A. Alizarin Red staining of cultures on Day 26 of the osteogenic differentiation assay**

Human MSCs: Control, EtOH, DMSO, ERM, CLR, AZM. Shows increased mineralization with ERM, CLR, AZM.

**B. RT-PCR of cultures on Day 9 of the osteogenic differentiation assay**

Human MSCs: DEL-1, RUNX2, SPT, BGLAP. Shows increased expression of osteogenic markers with ERM, CLR, AZM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. Mean ± S.D. n = 4 sets of cultures/gr. One-way ANOVA & Bonferroni test.

**C. Tartrate-resistant acid phosphatase staining on Day 7 of the assay**

WT vs Del1<sup>-/-</sup> (Undifferentiated, Control, DMSO, ERM, CLR, AZM). Shows increased TRAP staining in WT with ERM, CLR, AZM.

(6) EM-523により間葉系幹細胞の増加と老化間葉系幹細胞の減少(CD73<sup>+</sup>細胞)、血管内皮細胞の増加が認められる

若齢マウス(骨髄細胞) vs 老齢マウス(骨髄細胞): Flow cytometry plots showing increased CD73<sup>+</sup> cells and decreased CD31<sup>+</sup> cells in aged mice. \*P < 0.05.

DEL-1は、ある経路を活性化することで、老化間葉系幹細胞を生体内から除去し、加えて間葉系幹細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進する。

(7) サルの顎骨に欠損を作成し、骨の再生を評価。予定されていた頭数を超過して17頭のサルを使用し、効果とメカニズムを検証

骨再生量(%vol): Significant increase in bone regeneration with EM-523 in rhesus monkeys. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. Mean ± S.D. n = 10 monkeys. One-way ANOVA & Dunnett test.

### Conclusion

マクロライド系抗菌薬は、DEL-1が減少した老化生体においてDEL-1を大きく誘導することが可能であった。

DEL-1誘導により、老齢マウスで新生骨を形成し、骨の吸収および再生の両輪を可能とする新規薬剤の開発につながる。

老齢サルモデルでは難しい骨再生も、DEL-1誘導薬により大きな骨再生作用が認められた。

CD73を介するDEL-1の老化細胞除去作用が明らかになったことにより、新しい老化除去薬としての可能性が示唆された。

抗菌作用を除去し、さらにDEL-1誘導能を強化させた薬剤開発により、安全かつ再生効果の高い薬剤への展開が期待される。

Flowchart: Macrolide Antibiotics → DEL-1 Induction → Osteogenic Differentiation → Bone Formation/Repair.

2023年度 革新的医療技術創出拠点 令和5年度成果報告会

橋渡し研究戦略的推進プログラムシース A 北海道大学拠点  
 任意のエクソンのスキッピングを誘導する人工RNAの開発

研究代表者：中川 真一（北海道大学）  
 研究参加者：芳本 玲（摂南大学）

1

### 4.5SHの標的結合部位は改変可能である

5

### 4.5SHキメラRNAを用いたスプライシング制御

基礎研究で得られた知見 → 本研究で開発を目指す新規エクソンスキップ療法

Yoshimoto et al. *Mol Cell* (2023)

2

### 4.5SHのモジュール構造を利用して「プログラマブル」なキメラRNAを作れるか？

デュシェンヌ型筋ジストロフィー

疾患型DMD遺伝子 (ex51, ex52, ex53, ex54)

核酸医薬 (ビルトラルゼン) 治療

新たな遺伝子治療薬 (人工キメラRNA)

体重20 kgの場合：約60万円/週

6

### 4.5SHとは？

- 1970代に同定された古典的RNA (Jelinek and Leinward (1978), Harada et al. (1979))
- 極めて大量に存在 ( $10^4 < /math>/cells)</math>するがマウス垂目 (マウス・ラット・ハムスター) に特異的$
- ユビキタスに発現し核スベックルに局在
- レトロトランスポゾンSINE B1に高い相同性

```

s1  GCGGGATGTTGGGAGCCCTTAAATCCAGACTGGAGGACAGAGGAGGAGGATTTCTGATTCAGAGCC
4.5SH GCGGTTTGTGGGAGCCGCGGCTGAGGTTTC -GAGAGGAGGAGGAGGAGGATAC -GATTCAGAGCC
s2  AGCTCTGCTACACAGTAGTTCAGGACAGCGGCTATACAGAGAAACCTCTTCAAAAAACAAA
4.5SH AGCCTGGGCTACACATTTTTT
    
```

3

### 既存のエクソンスキッピング技術との比較

s	アンチセンス核酸	U7キメラRNA	4.5SHキメラRNA
発現ベクターへの搭載	X	✓	✓
細胞毒性	✓	X	✓
スキッピング効率	✓	△	✓

7

### 4.5SHは天然の遺伝子治療薬のように毒性エクソンをスキップさせて無毒化する

4.5SH KOマウスは胎生致死

	WT	+/-	KO
Embryo (E3.5)	17	4	0
Embryo (E9.5)	3	6	0
Adult (3w)	25	34	0

4.5SHは相補的な配列を持つasB1由来の毒性エクソンをスキップさせる

4


### 4.5SHキメラRNAの効率は核酸医薬と同等

DMD exon 53 (ex51, ex52, ex53, ex54)

Viltolarsen vs 4.5SH asDMD53

8





北海道大学

生体吸収性素材とハイドロゲルによる新規シートを用いた内視鏡的絆創膏の開発

橋渡し研究プログラム preF

北海道大学大学院医学研究院内科学分野  
消化器内科学教室

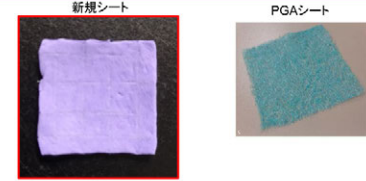
研究代表者: 大野 正芳

1

### 新規生体吸収性素材

・素材  
カプロラクトンと乳酸の共重合体(50:50)

ゲンゼ株式会社と共同研究



① 運びやすく  
② 貼りやすく  
③ 効果的  
④ 安価

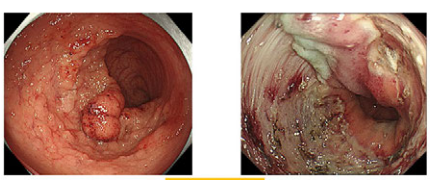
誰でも簡単に使用できる内視鏡的絆創膏を目指す

北海道大学

5

### 内視鏡治療の侵襲

・内視鏡治療の進歩は目覚ましいが、それに伴い侵襲が大きくなるため、合併症対策が重要である。



大腸ESD

北海道大学

2

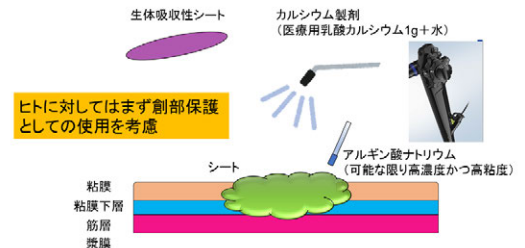
### シートの付着法(案)

生体吸収性シート

カルシウム製剤 (医療用乳酸カルシウム1g+水)

ヒトに対してはまず創部保護としての使用を考慮

アルギン酸ナトリウム (可能な限り高濃度かつ高粘度)



粘膜  
粘膜下層  
筋層  
漿膜


北海道大学

6

### ESDの合併症

術中合併症	治療法	術後合併症	予防法
・出血 ・穿孔	クリップ、止血鉗子、OTSC、ヒュースタット等	・後出血 ・遅発性穿孔 ・狭窄	縫縮法等 ステロイド局注、バルーン拡張等

Suturing method



術後にも合併症予防のため創部の保護を行う必要性

北海道大学

3

### これまでに得られた結果

ESD処置したブタの創部に使用した結果、以下の効果が確認されている。

- 新規生体吸収性シートにアルギン酸ナトリウムと塩化カルシウムを用いると、5-6 mm程度の穿孔部は閉鎖可能であった。
- 新規生体吸収性シートにアルギン酸ナトリウムと塩化カルシウムを用いると、内視鏡治療後創部の均一な創傷治療効果、治癒促進を促していた。

北海道大学

7

### 開発の目的

・新しい生体吸収性素材を用いてESD後の創部を簡便に被覆でき、消化管を保護、再生させ、さらには穿孔部を閉鎖することも可能な新規治療法を開発すること

北海道大学

4

### 本開発品目の特徴

- 内視鏡専用の生体吸収性素材は今回が初めて
- 使用する素材は、今まで人への使用実績があるもの
- 今までの製品と比較し、原価は安価でできる可能性がある
- 内視鏡医のニーズは必ずある  
～創部被覆、穿孔保護、瘻孔閉鎖 他、...～

まずは胃ESD後創部への使用のため、開発進行中

北海道大学

8