

アジスロマイシンが MC3T3-E1 細胞の骨形成機能と
破骨細胞分化促進因子の発現に及ぼす影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

加 藤 健 悟

(指導：外木 守雄 教授，川戸 貴行 教授，尾崎 愛美 助教)

目 次

| | |
|---------|----|
| 概 要 | 1 |
| 緒 言 | 4 |
| 材料および方法 | 6 |
| 結 果 | 9 |
| 考 察 | 11 |
| 結 論 | 13 |
| 文 献 | 14 |
| 図 | 17 |

本論文は、*Current Issue in Molecular Biology* (43: 1451-1459, 2021) に掲載された論文 (Kato et al. Effect of azithromycin on mineralized nodule formation in MC3T3-E1 cells) を基幹論文とし、これに DMSO が Runx2 発現に及ぼす影響とアジスロマイシンが RANKL の発現に及ぼす影響を調べた結果 (Figure 3 と Figure 7) を加えて総括したものである。

概 要

アジスロマイシンは、細菌のリボソームに結合してタンパク質合成を阻害するマクロライド系の抗菌薬であり、広域スペクトルを示す抗菌作用に加え、免疫調節作用や抗炎症作用を有する。また、アジスロマイシンは広く組織に浸透し、その濃度は血中で低下した後も組織内で維持される。骨芽細胞と破骨細胞は、骨量と骨質を保つ上で重要な骨リモデリングに関与する。骨芽細胞はアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性が高く、骨基質タンパクを産生するなどの骨形成機能を有するとともに、破骨細胞分化促進因子である receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) を発現して破骨細胞の分化にも関与する。一方、破骨細胞は H^+ とプロテアーゼを分泌し、骨組織の無機ならびに有機成分を分解する。これまでに、アジスロマイシンが破骨細胞の分化と骨吸収能を抑制することや、歯肉線維芽細胞における骨代謝に関連する炎症性サイトカイン産生を阻害することが明らかにされている。しかし、アジスロマイシンの骨芽細胞への作用を調べた研究は報告されておらず、詳細は不明である。そこで、本研究では、アジスロマイシンが骨芽細胞の機能に及ぼす影響を検討することを目的とし、骨芽細胞様細胞としてマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) をアジスロマイシンで継続的に刺激し、*in vitro* での石灰化物形成、ALPase 活性、骨基質タンパク発現、および RANKL 発現に及ぼす影響を調べた。

MC3T3-E1 細胞を培養プレートに播種して一昼夜、培養後、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したアジスロマイシンを 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度になるように培地に添加して細胞を刺激した。コントロールである無刺激の細胞も 0.1 % DMSO を添加した培地で培養した。細胞数は、Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。ALPase 活性は、8 mM *p*-nitrophenyl phosphate を含む反応液を加え、酵素反応の結果、生じる *p*-nitrophenol 量を測定して求めた。石灰化物形成は、50 mM

β -グリセロリン酸と 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アスコルビン酸を含む培地にアジスロマイシンを加え 14 日間培養後、アリザリンレッド S で染色して調べた。コラーゲン性および非コラーゲン性の骨基質タンパクと RANKL の遺伝子発現は、real-time PCR 法で調べた。培養上清中のオステオポンチンのタンパク量は、ELISA 法で測定した。

培養 5 日と 7 日目の細胞数は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で減少したが、0.1 と 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシンでは、顕著な変化は認められなかった。また、培養 10 日目では、いずれの濃度のアジスロマイシン刺激も細胞数に影響しなかった。培養 10 日目の ALPase 活性は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で低下した。さらに、アリザリンレッドの染色性は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で低下した。培養 7 日と 10 日目のオステオポンチンと骨シアロタンパクの遺伝子発現は、0.1, 1 または 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。また、培養 10 日目のオステオカルシンの遺伝子発現も、これらの濃度のアジスロマイシン刺激で増加した。一方、I 型コラーゲンの遺伝子発現は、培養 7 日目では 0.1 と 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で減少し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。また、培養 10 日目では、1 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で I 型コラーゲンの遺伝子発現が低下した。ALPase はヒドロキシアパタイトの結晶成長を阻害するピロリン酸を加水分解することが知られている。また、I 型コラーゲンは石灰化の足場となり、骨シアロタンパクとオステオカルシンは石灰化の開始に関与する。本研究結果から、高濃度のアジスロマイシン刺激で骨芽細胞の ALPase 活性が低下すると、これらの骨基質タンパクの発現変化にもかかわらず石灰化物形成が低下すると考えられた。

さらに、本研究では、MC3T3-E1 細胞の培養上清中のオステオポンチンのタンパク量は、培養 7 日と 10 日目に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。

また、培養上清からリン酸化タンパクを抽出した試料中のオステオポンチンも、培養 10 日目において 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。リン酸化したオステオポンチンは、ヒドロキシアパタイト形成を阻害し、ALPase はこの阻害作用を弱めることが知られている。すなわち、高濃度 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のアジスロマイシンは、ALPase の活性低下とリン酸化オステオポンチンの産生増加を介して、石灰化物形成を抑制すると考えられた。

本研究では、MC3T3-E1 細胞の RANKL の遺伝子発現は、培養 7 日目において 0.1, 1 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。本結果から、アジスロマイシンは、骨芽細胞を介した破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

結論として、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のアジスロマイシンは、MC3T3-E1 細胞の骨形成機能に影響を及ぼさないものの、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では、ALPase の活性低下とリン酸化オステオポンチンの産生増加を介して、MC3T3-E1 細胞の骨形成機能を抑制することが明らかとなった。また、アジスロマイシンは、MC3T3-E1 細胞の RANKL 発現を低下させ、破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

緒 言

アジスロマイシンは、細菌のリボソームに結合してタンパク質合成を阻害するマクロライド系の抗菌薬である¹⁾。抗菌スペクトルが広く、免疫調節作用や抗炎症作用を有することから、アジスロマイシンは喘息や慢性閉塞性肺疾患²⁾、ならびに呼吸器、泌尿器、皮膚、歯科などの細菌感染症の治療に使用される^{3,4)}。また、アジスロマイシンは広く組織に浸透し、その濃度は、血中で低下した後も組織内で維持される⁵⁾。扁桃でのアジスロマイシンの濃度は、複数回投与で、呼吸器感染症の原因菌の最小阻害濃度を上回る⁶⁾。抗菌薬の投与量と期間は疾患の種類や患者の病状で異なるが、扁桃と同様に歯周組織においてもアジスロマイシンは高い濃度を保つと考えられる⁷⁾。

骨芽細胞と破骨細胞は、骨量と骨質の維持に重要である骨リモデリングに深く関与する⁸⁾。骨芽細胞は、アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性が高く、骨基質タンパクを産生するなどの骨形成機能を有する⁹⁾。また、骨芽細胞は、破骨細胞分化促進因子である receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) を発現し、破骨細胞の分化にも関係する⁹⁾。破骨細胞は、 H^+ とプロテアーゼを分泌し、骨組織の無機ならびに有機成分を分解する⁹⁾。両細胞のこれらの機能の不均衡は、骨塩密度を低下させて骨粗鬆症を引き起こし、ビスホスフォネート製剤は破骨細胞性骨吸収を阻害することで、この不均衡を改善する^{10,11)}。他方、ステロイドによる治療は骨芽細胞のアポトーシスを誘導し、骨粗鬆症の危険因子となる¹²⁾。

歯周病患者へのアジスロマイシン投与では、歯周病原菌の減少に加え歯槽骨レベルの改善が認められたとの報告が散見される^{13,14)}。また、アジスロマイシンが破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制すること¹⁵⁾、骨代謝に関連する炎症性サイトカインの歯肉線維芽細胞による産生を阻害することが、*in vitro* 研究によっ

で示唆されている¹⁶⁾。さらに、ラット辺縁性歯周炎モデルでは、歯槽骨破壊がアジスロマイシンによって軽減されることが示されている¹⁷⁾。そして、マウス根尖性歯周炎モデルにおける根尖周囲の骨吸収がアジスロマイシン投与で減少したとの報告¹⁸⁾も認められる。これら先行研究の知見は、アジスロマイシンの作用が骨リモデリングに及ぶ可能性を示唆している。

そこで、本研究では、アジスロマイシンが骨芽細胞の機能に及ぼす影響を検討することを目的とし、骨芽細胞様細胞としてマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞（MC3T3-E1 細胞）をアジスロマイシンで継続的に刺激し、*in vitro* での石灰化物形成、ALPase 活性、骨基質タンパクおよび RANKL 発現に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

1. 細胞培養とアジスロマイシンによる細胞の刺激

MC3T3-E1 細胞 (ECACC 99072810; Public Health England) を直径 100 mm の培養ディッシュに 6.0×10^3 cell/cm² の密度で播種し, 10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; HyClone Laboratories) と 1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Sigma-Aldrich) を添加した minimal essential medium α で, 37°C, 5% CO₂ 存在下にて培養した。細胞がコンフルエントに達した段階で, 6-, 24-または 96-well 培養プレートに前述の密度で細胞を播種して一昼夜, 培養後, dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) で溶解したアジスロマイシンを 0.1, 1 および 10 μ g/mL の濃度になるように培地に添加して細胞を刺激した。なお, 無刺激の細胞 (vehicle control) も 0.1 % DMSO を添加した培地で培養した。培地は 2 日ごとに交換した。

2. 細胞増殖と ALPase 活性の測定

細胞を 96-well 培養プレートに播種し, 10 日間培養した。培養 3 日, 5 日, 7 日および 10 日目に Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて細胞数を調べた。また, ALPase 活性は, 8 mM の *p*-nitrophenyl phosphate を含む 200 μ L の反応液¹⁹⁾を加え, 酵素反応の結果, 生じる *p*-nitrophenol 量を測定して求めた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) にて 450 nm (細胞増殖) または 405 nm (*p*-nitrophenol) で吸光度を測定した。ALPase 活性は, 1 分あたり 1.0 μ M の *p*-nitrophenol の形成に必要な酵素量を 1 単位とした。

3. アリザリンレッド染色

細胞を 24-well 培養プレートに播種し、50 mM β -グリセロリン酸と 50 μ g/mL アスコルビン酸を含む培地で 14 日間培養した。細胞と石灰化物形成の状態は、顕微鏡で適宜、観察した。培養、3 日、5 日、7 日、10 日および 14 日目にアリザリンレッド S (PG Research) で石灰化物を染色した¹⁹⁾。染色後の画像を記録した後、各 well に 5%ギ酸を 500 μ L 加えて 30 分間反応後、溶出した色素を含む溶液を 96-well プレートに移し、マイクロプレートリーダーで 415 nm での吸光度を測定した。

4. Real-time PCR

細胞を 6-well 培養プレートに播種し、10 日間、培養した。培養 7 日と 10 日目に、NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel) を用いて全 RNA を抽出した。500 ng の RNA から PrimeScript[™] RT reagent (タカラバイオ) を用いて cDNA を合成し、2 μ L の cDNA 溶液を real-time PCR に用いた。TBgreen[®] Premix ExTaq II (タカラバイオ) と各プライマーを含む溶液を調整し、Thermal Cycler Dice real time system (タカラバイオ) を用いて、先行研究¹¹⁾で示される条件で PCR 反応を行い、付属のソフトウェアで分析した。なお、使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。I 型コラーゲン (forward: 5'-TCAGTGCAATTGTGTTGCTGAAAG-3'; reverse: 5'-GATACCAAACCTGGGCGTGCTG-3'), 骨シアロタンパク (forward: 5'-AATTC TGACCCTCGTAGCCTTCATA-3'; reverse: 5'-GAGCCTCGTGCGGACACTTA-3'), オステオポンチン (forward: 5'-TACGACCATGAGATTGGCAGTGA-3'; reverse: 5'-TATAGGATCTGGGTGCAGGCTGTAA-3'), オステオカルシン (forward: 5'-CAGACACCATGAGGACCATCTT-3'; reverse: 5'-AAGGCTTTGTCAGACTCAGGG-3'), RANKL (forward: 5'-CATGTGCCACTGAGAACCTTGAA-3'; reverse: 5'-CA GGTCCCAGCGCAATGTAAC-3'), グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素

(GAPDH; forward: 5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'; reverse: 5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3')。

5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

培養 7 日と 10 日目の培養上清を ELISA の試料として回収した。リン酸化タンパクの抽出には phosphoprotein enrichment kit (Clontech Laboratories) を用いた。未精製の試料とリン酸化タンパクを抽出した試料中のオステオポンチン量は市販の ELISA キット (R&D Systems) で測定した。

6. 統計分析

結果は平均値と標準偏差で表した。統計処理は GraphPad Prism 6.0 software を使用し、一元配置分散分析後、Tukey の多重比較を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. アジスロマイシンが細胞増殖と ALPase 活性に及ぼす影響

培養 5 日と 7 日目の細胞数は、未刺激 (vehicle control) に比べ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で有意に減少したが、0.1 と 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激では、いずれの培養日数においても未刺激との間に有意差は認められなかった (Figure 1)。また、培養 10 日目では、いずれの濃度のアジスロマイシン刺激も細胞数に影響しなかった。一方、ALPase 活性は、培養期間中、未刺激 (vehicle control) とアジスロマイシン刺激の両方で徐々に上昇した (Figure 2)。また、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で ALPase 活性が低下し、培養 10 日目では未刺激 (vehicle control) に比べ有意差を認めた (Figure 2)。

2. アジスロマイシンが石灰化物形成に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞による石灰化物の形成は、0.5%以上の DMSO で促進することが先行研究²⁰⁾で明らかにされている。本研究では、まず、骨芽細胞分化関連転写因子である Runx2 の遺伝子発現に及ぼす DMSO の影響を調べた。その結果、培養 3 日目と 10 日目には、0.1%DMSO 非存在下に比べ存在下で Runx2 の有意な増加が、培養 5 日目には有意な減少が認められた (Figure 3)。そこで、osteogenic supplements (OS) として 50 mM β -グリセロリン酸と 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アスコルビン酸の存在下 (control)、OS の非存在下 (negative control) および OS と 0.1%DMSO の存在下 (vehicle control) で培養した細胞、ならびに OS の存在下でアジスロマイシン刺激した細胞のアリザリンレッドによる染色性を調べた。培養 10 日と 14 日目のアリザリンレッドの染色性は、negative control に比べ control で増加した。また、培養 7 日、10 日および 14 日目のアリザリンレッドの染色性は、vehicle control に比べ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で低下した (Figure 4)。

3. アジスロマイシンが骨基質タンパクの遺伝子発現に及ぼす影響

培養7日と10日目のオステオポンチンと骨シアロタンパクの遺伝子発現は、未刺激 (vehicle control) に比べ0.1, 1または10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で有意に増加した (Figure 5a, c)。また、培養10日目のオステオカルシンの遺伝子発現も、未刺激 (vehicle control) に比べこれらの濃度のアジスロマイシン刺激で有意に増加した (Figure 5b)。一方、培養7日目のI型コラーゲンの遺伝子発現は、未刺激に比べ0.1と1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で減少し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。また、培養10日目のI型コラーゲンの発現は、未刺激 (vehicle control) に比べ1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で有意に低下した。

4. アジスロマイシンがオステオポンチンのタンパク産生に及ぼす影響

未精製の培養上清中のオステオポンチンは、培養7日と10日目において未刺激 (vehicle control) に比べ10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で有意に増加した (Figure 6a)。また、培養上清からリン酸化タンパクを抽出した試料中のオステオポンチンも、培養10日目において未刺激 (vehicle control) に比べ10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で有意に増加した (Figure 6b)。

5. アジスロマイシンが RANKL の遺伝子発現に及ぼす影響

培養7日目の RANKL の遺伝子発現は、未刺激 (vehicle control) に比べ、0.1, 1および10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で有意に低下した (Figure 7)。一方、培養10日目の RANKL 発現にアジスロマイシン刺激の影響は認められなかった。

考 察

アジスロマイシンを歯周病患者に投与すると、その濃度は歯周組織で維持され^{7, 21-23)}る。そのため、歯肉、歯根膜および歯槽骨の破壊を認める歯性感染症では、アジスロマイシンの臨床的な有効性が報告^{4,13,14)}されている。Malizia ら²¹⁾は、500 mg/日の経口投与 12 時間後のアジスロマイシンの濃度は、血漿で 0.33 ± 0.04 mg/L であり、歯周組織中では血漿よりも数倍高いものの歯肉に比べて歯槽骨で低く、いずれも数日を経て徐々に減少したと報告している。本研究では、1 μ g/mL 以下の濃度のアジスロマイシンで刺激された MC3T3-E1 細胞と未刺激の細胞の間では、石灰化物形成に違いが認められなかった。また、アジスロマイシンの処方、歯周炎²¹⁾ と呼吸器感染症⁶⁾ とで大きな違いはない。これら先行研究の知見と本研究結果から、骨芽細胞の骨形成機能に及ぼす影響は、呼吸器感染症や歯性感染症で処方されるアジスロマイシンでは小さいと考えられた。一方、臨床研究では、歯周膿瘍に起因する歯槽骨吸収の症例でアジスロマイシンによる骨再生が示唆されている^{13,14)}。さらに、*in vitro* 研究では、10 μ g/mL 未満の濃度のアジスロマイシンが破骨細胞による骨吸収を著しく抑制することや、0.1~10 μ g/mL のアジスロマイシンが、lipopolysaccharide で誘導される interleukin-6 など、破骨細胞形成を促進する炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告^{15,16)}されている。本研究においても、アジスロマイシンで刺激した細胞では RANKL の発現低下が認められた。これらの知見と本研究結果から、アジスロマイシンによる骨再生は、骨芽細胞の骨形成機能の促進ではなく、破骨細胞性骨吸収の抑制による可能性が考えられた。

さらに本研究では、10 μ g/mL のアジスロマイシン刺激で MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性と石灰化物形成が顕著に抑制された一方で、I 型コラーゲン、骨シアラタンパク、オステオカルシン、オステオポンチンの発現は増加した。I 型コ

ラーゲンは骨組織の石灰化の足場となり、また、骨シアロタンパクとオステオカルシンは石灰化の開始に不可欠である²⁴⁻²⁶⁾。従って、10 µg/mL のアジスロマイシン刺激で骨芽細胞の ALPase 活性が低下すると、これら骨基質タンパクの発現の変化にもかかわらず石灰化物形成が低下すると考えられた。さらに、10 µg/mL のアジスロマイシン刺激による石灰化物形成の抑制は、ALPase、ピロリン酸、オステオポンチンの相互作用とも一致するものであった。すなわち、ALPase はヒドロキシアパタイトの結晶成長を阻害するピロリン酸を加水分解し^{8,27)}、ピロリン酸はオステオポンチン産生を促進する²⁸⁾。さらに、リン酸化したオステオポンチンは、ヒドロキシアパタイト形成を阻害し^{28,29)}、ALPase はこの阻害作用を減弱化する²⁹⁻³¹⁾。本研究では、10 µg/mL のアジスロマイシン刺激でリン酸化オステオポンチンの産生が顕著に増加し、ALPase 活性は減少した。このことから、高濃度 (10 µg/mL) のアジスロマイシンは、ALPase 活性の減少とリン酸化オステオポンチンの産生増加を介して、石灰化物形成を抑制すると考えられた。

結 論

本研究の結果、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のアジスロマイシンは、MC3T3-E1 細胞の骨形成機能に影響しないが、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では ALPase 活性の低下と、リン酸化オステオポンチンの産生増加を介して骨形成機能を抑制すると考えられた。また、アジスロマイシンは、MC3T3-E1 細胞の RANKL 発現を低下させ、破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

文献

1. Bakheit A.H, Al-Hadiya BM, Abd-Elgalil AA. Azithromycin. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol 2014, 39, 1–40.
2. Uzun S, Djamin RS, Kluytmans JA, Mulder PG, van't Veer NE, Ermens AA, Pelle AJ, Hoogsteden HC, Aerts JG, van der Eerden MM. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Respir Med 2014, 2, 361–368.
3. Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. Pharmacol Ther 2014, 143, 225–245.
4. Kestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. J Periodontal Res 2015, 50, 294–314.
5. Foulds G, Shepard RM, Johnson RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. J Antimicrob Chemother 1990, 25(Suppl A), 73–82.
6. Foulds G, Johnson RB. Selection of dose regimens of azithromycin. J Antimicrob Chemother 1993, 31(Suppl E), 39–50.
7. Gomi K, Yashima A, Iino F, Kanazashi M, Nagano T, Shibukawa N, Ohshima T, Maeda N, Arai T. Drug concentration in inflamed periodontal tissues after systemically administered azithromycin. J Periodontol 2007, 78, 918–923.
8. Katsimbri P. The biology of normal bone remodeling. Eur J Cancer Care (Engl) 2017, 26, e12740.
9. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. Connect Tissue Res 2018, 59, 99–107.
10. Reszka AA, Rodan GA. Bisphosphonate mechanism of action. Curr Rheumatol Rep. 2003, 5, 65–74.
11. Nagasaki M, Nakai K, Tanaka H, Ozaki M, Kato K, Koshi R, Maeno M, Nishikubo S, Kawato T, Tonogi M. Lipopolysaccharide and high concentrations of glucose enhances zoledronate-induced increase in RANKL/OPG ratio by upregulating PGE₂ production in osteoblasts. J Hard Tissue Biol 2021, 30, 37–44.
12. Kirchgatterer A, Aschl G, Knoflach P. Steroid-induced osteoporosis: pathogenesis and therapeutic consequences. Acta Med Austriaca 2000, 27, 23–26.
13. Hirsch R. Periodontal healing and bone regeneration in response to azithromycin. Aust Dent J 2010, 55, 193–199.
14. Hirsch R, Deng H, Laohachai MN. Azithromycin in periodontal treatment: more than an antibiotic. J Periodontal Res 2012, 47, 137–148.

15. Gannon SC, Cantley MD, Haynes DR, Hirsch R, Bartold PM. Azithromycin suppresses human osteoclast formation and activity in vitro. *J Cell Physiol* 2013, 228, 1098–1107.
16. Doyle CJ, Fitzsimmons TR, Marchant C, Dharmapatni AA, Hirsch R, Bartold PM. Azithromycin suppresses *P. gingivalis* LPS-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production by human gingival fibroblasts in vitro. *Clin Oral Investig* 2015, 19, 221–227.
17. Park SH, Lee YS, Choi EY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Subantibiotic dose of azithromycin attenuates alveolar bone destruction and improves trabecular microarchitectures in a rat model of experimental periodontitis: A study using micro-computed tomography. *Int Immunopharmacol* 2017, 47, 212–217.
18. Andrada AC, Azuma MM, Furusho H, Hirai K, Xu S, White RR, Sasaki H. Immunomodulation mediated by azithromycin in experimental periapical inflammation. *J Endod* 2020, 46, 1648–1654.
19. Nakai K, Kawato T, Morita T, Inuma T, Kamio N, Zhao N, Maeno M. Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. *Biochimie* 2013, 95, 922–933.
20. Cheung WM, Ng WW, Kung AW. Dimethyl sulfoxide as an inducer of differentiation in preosteoblast MC3T3-E1 cells. *FEBS Lett.* 2006, 580, 121–126.
21. Malizia T, Tejada MR, Ghelardi E, Senesi S, Gabriele M, Giuca MR, Blandizzi C, Danesi R, Campa M, Del Tacca M. Periodontal tissue disposition of azithromycin. *J Periodontol* 1997, 68, 1206–1209.
22. Blandizzi C, Malizia T, Lupetti A, Pesce D, Gabriele M, Giuca MR, Campa M, Del Tacca M, Senesi S. Periodontal tissue disposition of azithromycin in patients affected by chronic inflammatory periodontal diseases. *J Periodontol* 1999, 70, 960–966.
23. Malizia T, Batoni G, Ghelardi E, Baschiera F, Graziani F, Blandizzi C, Gabriele M, Campa M, Del Tacca M, Senesi S. Interaction between piroxicam and azithromycin during distribution to human periodontal tissues. *J Periodontol* 2001, 72, 1151–1156.
24. Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 2007, 41, 462–473.
25. Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol* 2008, 27, 600–608.
26. Rammelt S, Neumann M, Hanisch U, Reinstorf A, Pompe W, Zwipp H, Biewener A. Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. *J Biomed Mater Res A* 2005, 73, 284–294.
27. Anderson HC. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989, 60, 320–330.
28. Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating

- osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem* 2007, 282, 15872–15883.
29. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000, 275, 20197–20203.
 30. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* 1993, 22, 147–159.
 31. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994, 300, 723–728.



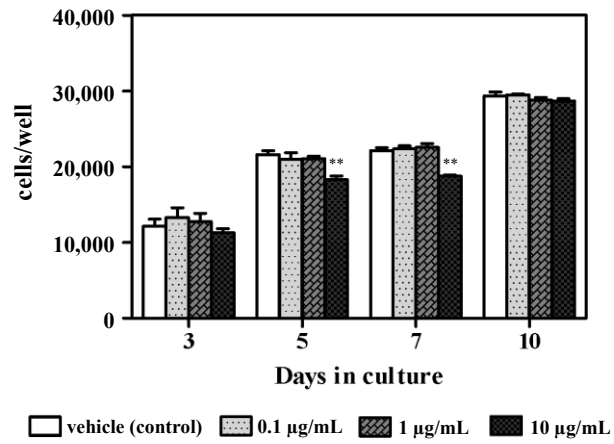


Figure 1. Effect of azithromycin on osteoblast proliferation.

MC3T3-E1 cells were untreated (vehicle control) or grown in the presence of variable azithromycin concentrations (0.1, 1, or 10 µg/mL) for 10 days. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$ compared with the control.

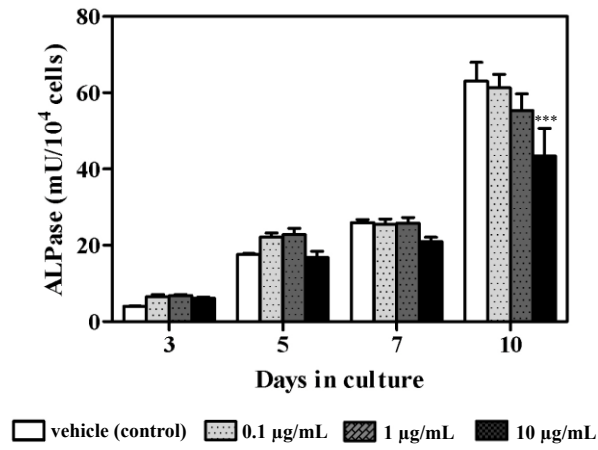


Figure 2. Effect of azithromycin treatment on ALPase activity.

MC3T3-E1 cells were untreated (vehicle control) or grown in the presence of variable azithromycin concentrations (0.1, 1, or 10 µg/mL) for 10 days. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$ compared with the control.

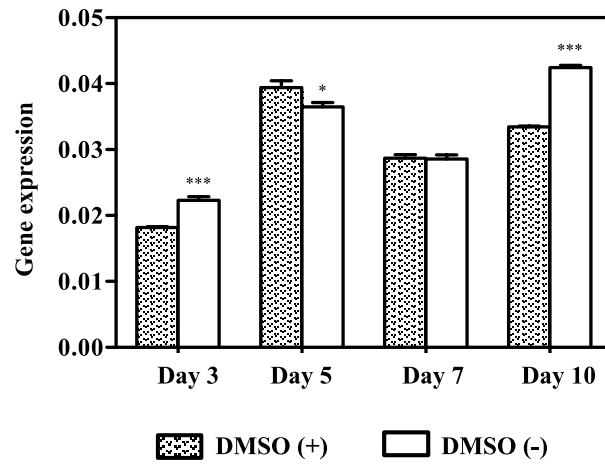


Figure 3. Effect of DMSO on Runx2 mRNA expression.

MC3T3-E1 cells were cultured in the presence or absence of 0.1% DMSO for 10 days. The expression level of Runx2 mRNA expression were determined by real-time PCR following 3-, 5-, 7- and 10-day culture. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$ compared with the presence of 0.1% DMSO on each day of culture.

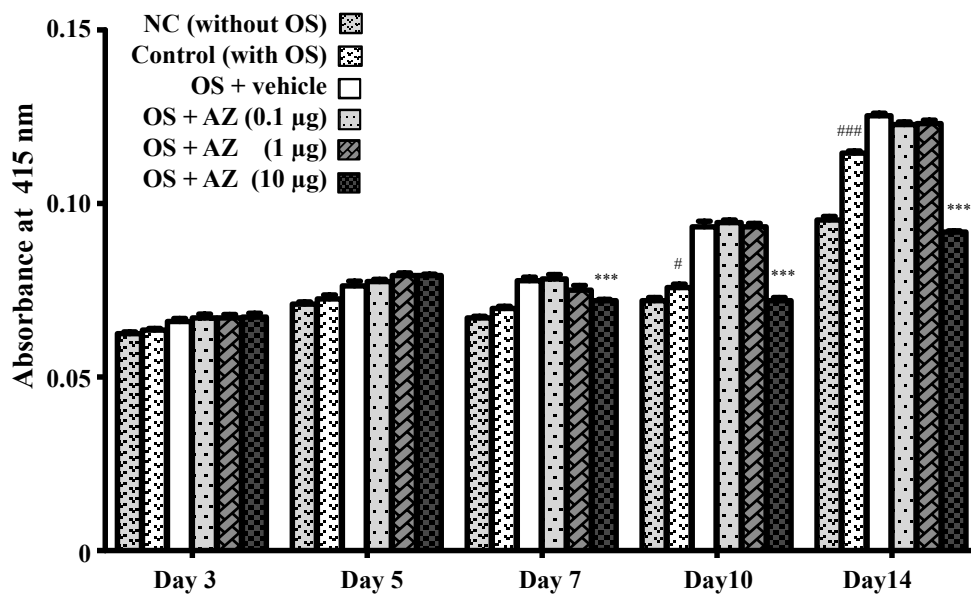
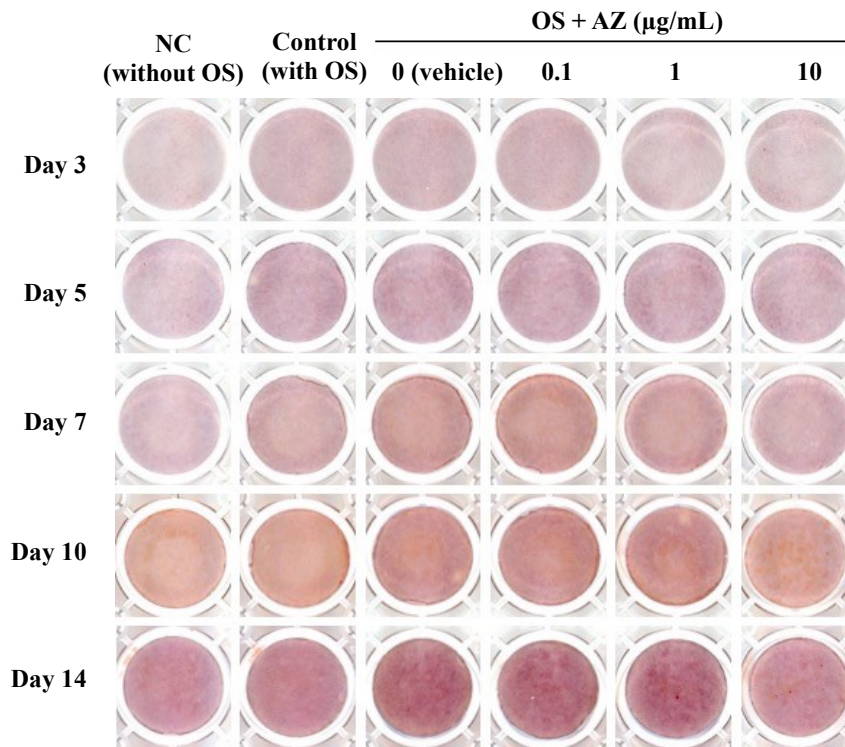


Figure 4. Effect of azithromycin on mineralized nodule formation.

MC3T3-E1 cells were treated with 0.1, 1, or 10 µg/mL azithromycin in the presence of osteogenic supplements (OS; 50 mM β-glycerophosphate and 50 µg/mL ascorbic acid) and 0.1% DMSO as a vehicle. Mineralized nodule formation was examined by alizarin red staining. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. NC, negative control. #### $p < 0.001$, # $p < 0.05$ compared with negative control (NC); *** $p < 0.001$ compared with the vehicle control.

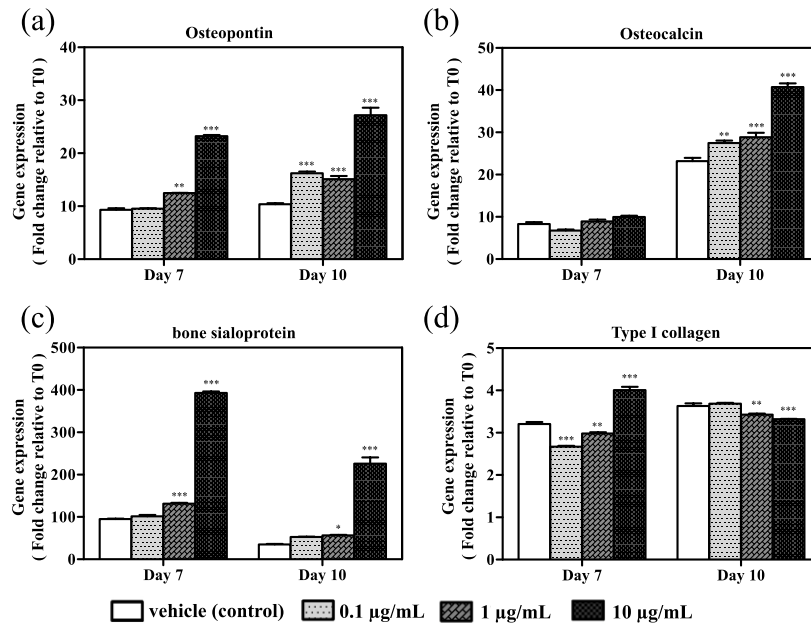


Figure 5. Effect of azithromycin on bone matrix protein mRNA expression.

MC3T3-E1 cells were untreated (vehicle control) or grown in the presence of variable azithromycin concentrations (0.1, 1, or 10 µg/mL). The expression level of (a) osteopontin, (b) osteocalcin, (c) bone sialoprotein, and (d) type I collagen mRNA expression were determined by real-time PCR following 7- and 10-day culture. Each gene was calculated and expressed as a ratio to the expression level in cells without azithromycin and DMSO treatment on the day when cells were seeded (T0). Data represent the mean ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with the vehicle control on each day of culture.

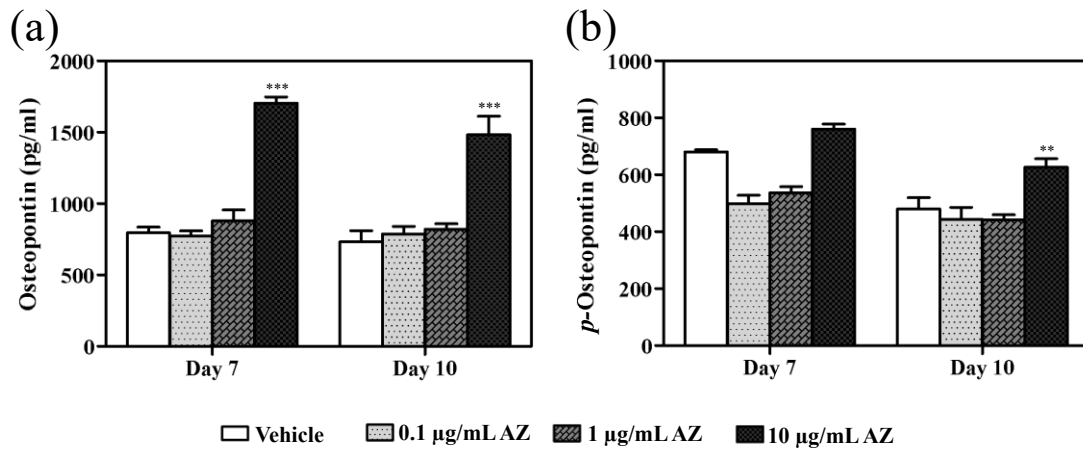


Figure 6. Effect of azithromycin on osteopontin levels. MC3T3-E1 cells were untreated (vehicle control) or grown in the presence of variable azithromycin concentrations as stated in the legend. The levels of (a) osteopontin in the supernatant and (b) phosphorylated osteopontin in the phosphoprotein-purified supernatant were determined using enzyme-linked immunosorbent assays 7 and 10 days after treatment. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the vehicle control.

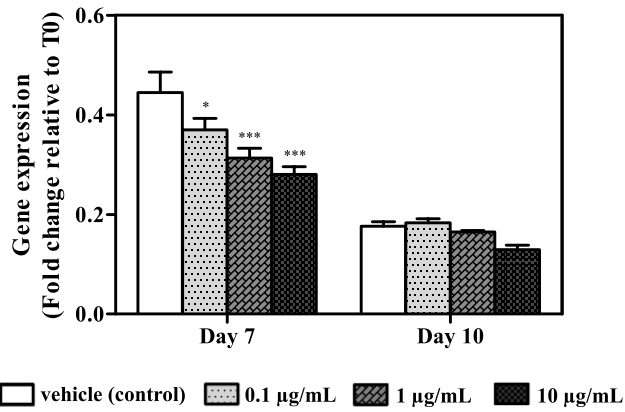


Figure 7. Effect of azithromycin on RANKL mRNA expression.

MC3T3-E1 cells were untreated (vehicle control) or grown in the presence of variable azithromycin concentrations (0.1, 1, or 10 µg/mL). The expression level of RANKL mRNA expression were determined by real-time PCR following 7- and 10-day culture. Each gene was calculated and expressed as a ratio to the expression level in cells without azithromycin and DMSO treatment on the day when cells were seeded (T0). Data represent the mean ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared with the vehicle control on each day of culture.