

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890110

研究課題名（和文） 炎症性骨破壊過程におけるアデノシンの骨免疫制御機構

研究課題名（英文） The role of adenosine to regulate osteoimmunology in inflammatory bone destruction

研究代表者

竹立 匡秀 (TAKEDACHI MASAHIDE)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60452447

研究成果の概要（和文）：アデノシン産生酵素 CD73 分子のノックアウトマウスにマウス歯周病モデルを惹起することにより、同分子の歯周炎における役割を明らかにした。一方で、同マウスより単離した骨芽細胞は野生型マウスに比して、その分化能が低下していることが明らかとなった。また、IL-1beta 刺激により骨芽細胞の A2A アデノシン受容体の発現が低下する一方で、A2B 受容体は発現が上昇した。さらに CD73 強発現骨芽細胞では RANKL の発現上昇を認め、同発現は IL-1beta 刺激により増強された。以上の結果よりアデノシンが炎症性骨破壊に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis*-infected CD73 deficient mice revealed the role of CD73 in periodontitis. Osteoblasts isolated from CD73 deficient mice showed impaired differentiation compared to those from wild type mice. On the other hand, IL-1 beta decreased A2A and increased A2B adenosine receptor expression in mouse osteoblasts. Moreover, CD73 overexpression resulted in increase of RANKL expression and the expression was further enhanced when the cells were stimulated with IL-1 beta. These results suggest that endogenous adenosine is involved in inflammatory bone destruction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎、骨免疫、炎症性骨破壊、アデノシン

1. 研究開始当初の背景

歯周病の発症および進行には、デンタルプラークからの慢性的な細菌刺激に対する宿主の生体反応が深く関与している。サイトカインやプロスタグランジン、マトリックスメタロプロテアーゼといった宿主由来の炎症メディエーターが、歯周組織の恒常性維持に

寄与する一方で、それらの過剰発現は歯周組織破壊を誘導する。そのなかで、歯槽骨の破壊は、破骨細胞の活性化による骨吸収過程の促進と、骨芽細胞や歯根膜細胞による硬組織形成の低下に起因すると考えられる。

1970年代に Burnstick らは、アデノシン三リン酸（以下 ATP）が細胞内のみならず細胞

外にも存在し、細胞間伝達物質の一つとしての役割を担うことを報告して以来、ATP を含む nucleotide、さらにその代謝産物であるアデノシン（以下 Ado）が各々特異的受容体を活性化することにより様々な生体反応の制御に関与していることが明らかとなってきた。興味深いことに、骨組織の恒常性維持にもこれらの分子が積極的に関与するという報告が近年になり集積しつつある。骨芽細胞は、メカニカルストレスや低酸素、活性型ビタミン D3 などの刺激を受けることで ATP を細胞外に放出する。放出された ATP は、autocrine、paracrine に骨芽細胞の ATP 受容体である P2 受容体を活性化することにより分化や増殖などの細胞機能を制御する一方、P2 受容体の活性化は、破骨細胞の成熟や細胞死に関与することも報告されている。ATP 代謝産物の Ado も、細胞膜上に発現するアデノシンレセプター (AdoR) を介して、様々な生体反応を制御することが知られており、AdoR には Ado への親和性と共役する G タンパクの違いから A1、A2A、A2B、A3 の 4 つのサブタイプが存在する。申請者らはこれまでに、Ado の細胞外産生酵素である CD73 分子に着目し、同分子の骨代謝における役割について解析を行ってきた。その結果、CD73 ノックアウトマウスは骨量減少の表現型を呈すること、また CD73 の発現は骨芽細胞の分化に伴い上昇すること、CD73 を介して産生された Ado は A2B AdoR の活性化を介して骨芽細胞の分化を促進的に制御していることを見出している。これらの知見は、成育期のみならず成人以降の生理的骨代謝においても Ado が重要な役割を演じている可能性を示唆している。しかしながら、Ado の破骨細胞における機能や、骨芽細胞—破骨細胞間クロストークにおけるカップリングファクターとしての役割、さらには骨代謝の炎症性制御反応における Ado の関与についての情報は未だ皆無であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、骨芽細胞—破骨細胞間クロストークにおける Ado の役割について明らかにし、さらに骨代謝の炎症制御における Ado の関与について骨免疫学的解析により *in vivo*、*in vitro* の両面から検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯周病モデルマウス

6週齢 C57BL/6 マウスおよび CD73 欠損マウスに 10 日間、自由飲水にて 2 種類の抗生剤を含む滅菌水を与えた。その後、3 日間抗生剤投与を休止した後、W83 株 *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) を 1×10^9 CFU/100 μ L カルボキシメチルセルローズに調整し 3 日毎に計 10 回経口投与した。10 回目の感染から 2 日後、

過剰麻酔により屠殺し、下顎骨の採取を行った。一方で、8 週齢 C57BL/6 マウスの上顎第二臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、3 日後に過剰麻酔により屠殺し、上顎骨の採取を行った。採取した顎骨は、4%PFA にて固定し、マイクロフォーカス 2D/3DXCT 装置を用いて断層撮影を行い、その後、三次元構築を行った。その後、EDTA にて脱灰し、OCT コンパウンドに包埋後、凍結薄切切片を作成した。

(2) 細胞培養

3 日齢の C57BL/6 あるいは CD73 ノックアウトマウスから頭蓋骨を採取し、縫合部を除去した後、0.1% コラゲナーゼ・0.2% ディスペラーゼにて 37°C 20 分間、計 3 回処理し、最初の 1 回の処理を除いた 2 回の処理で回収された細胞を初代骨芽細胞として培養した。また、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 は理化学研究所バイオリソースセンターより入手し、10% 牛血清含有 α -MEM にて培養した。CD73 強発現プラスミドベクターを Lipofectamine 2000 を用いて導入した後、ジェネティシン含有培地で選択培養を行い、樹立した。骨芽細胞の分化誘導は 10mM β -グリセロリンサン、50 μ g/ml アスコルビン酸含有の培養培地（以下、石灰化誘導培地）を 3 日毎に培地交換することにより行った。

(3) マウス顎骨における CD73 分子の発現解析

7mm の凍結薄切標本を 2.5% ヒアルロニダーゼ処理後、0.3% 過酸化水素にて処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに 3% BSA にて 4°C 8 時間のブロッッキング処理後、一次抗体として抗マウス CD73 抗体 (TY/23)、二次抗体としてビオチン標識抗ラット IgG2a 抗体および ABC kit、3,3'-Diaminobenzidine を用いて発色した。

4. 研究成果

(1) CD73 ノックアウトマウスを用いた歯周病モデルの解析

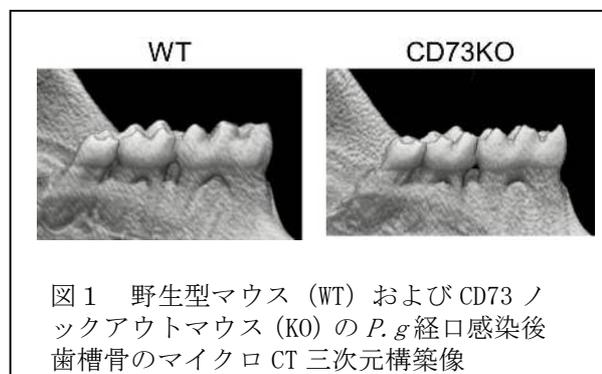


図1 野生型マウス (WT) および CD73 ノックアウトマウス (KO) の *P. g* 経口感染後歯槽骨のマイクロ CT 三次元構築像

マイクロ CT を用いた解析から、野生型マウスに *P. g.* を経口感染させることにより、有意な歯槽骨の吸収を認めた。CD73 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べ骨吸収量が増大している傾向があった (図 1)

(2) CD73 ノックアウトマウス由来骨芽細胞の分化能に関する解析

CD73 分子の発現は、骨芽細胞の分化に伴い上昇することから、同分子の骨芽細胞分化に及ぼす影響について解析を行った。CD73 ノックアウトマウスおよび野生型マウスから骨芽細胞を単離し、石灰化誘導培地で培養した際のアルカリフォスファターゼ活性および石灰化ノジュールの形成について検討を行った。その結果、CD73 ノックアウトマウス由来骨芽細胞では、野生型マウス由来骨芽細胞と比較して、分化に伴うアルカリフォスファターゼ活性の上昇が抑制され、さらに石灰化ノジュール形成も低下していることが明らかとなった。(図 2) このことから、CD73 分子が骨芽細胞の分化を促進的に制御していることが明らかとなった。

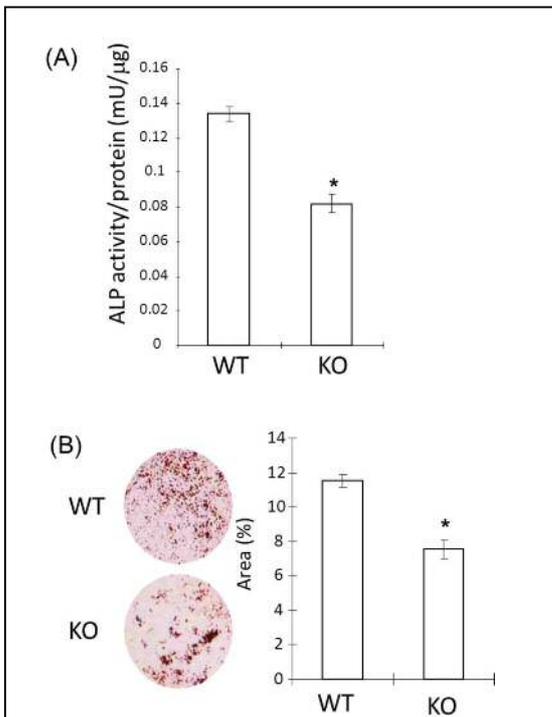


図 2
CD73 ノックアウトマウス由来骨芽細胞の分化能

- (A) 石灰化誘導培地にて培養した際の 6 日目におけるアルカリフォスファターゼ活性
(B) 石灰化誘導培地にて培養した際の 12 日目におけるアリザリン染色像
(A) (B) とともに * $P < 0.05$

(3) 絹糸結紮マウス歯周炎モデルにおける CD73 分子の発現解析

C57BL/6 マウスの上顎第二臼歯に絹糸を縫合し 3 日後には、歯槽骨の吸収がマイクロ CT にて確認された。同組織を用いて薄切切片を作製し、CD73 分子の発現を免疫染色にて解析した。その結果、同骨吸収部における CD73 分子の発現は非吸収部の歯槽骨表面における発現と著明な差を認めなかった。

(4) 炎症性サイトカイン IL-1beta が骨芽細胞の AdoR 発現に及ぼす影響に関する解析

我々はこれまでにマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞が A2A および A2BAdoR を発現していることを報告してきた。そこで、両 AdoR の発現が IL-1beta 刺激によりいかなる制御を受けるかについて検討した。遺伝子発現解析の結果、IL-1beta 刺激は MC3T3-E1 細胞における A2AAdoR の発現を抑制し、A2BAdoR の発現を上昇させた (図 3)。この発現変化は MC/CD73 においても同様であった。このことは CD73 分子を介して産生された Ado が A2bAdoR のシグナルを介して、骨芽細胞の炎症反応制御に関与している可能性を示唆している。

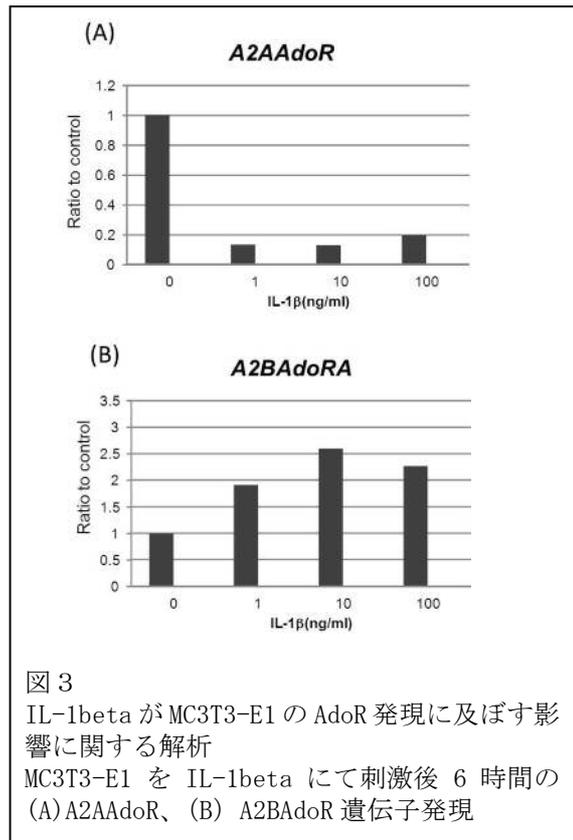


図 3
IL-1beta が MC3T3-E1 の AdoR 発現に及ぼす影響に関する解析

MC3T3-E1 を IL-1beta にて刺激後 6 時間の (A) A2AAdoR、(B) A2BAdoR 遺伝子発現

(5) CD73 強発現が骨芽細胞の破骨細胞分化制御因子の発現に及ぼす影響に関する解析

MC/CD73 における破骨細胞分化制御因子 (RANKL および OPG) の遺伝子発現について

検討した。その結果、同細胞における OPG の発現はコントロール細胞と比較してほぼ同等であったが、RANKL 発現については上昇していることが明らかとなった。さらに IL-1beta 刺激により、同 RANKL 発現は増強されることが示唆された (図 4)。このことは CD73 分子を介して産生された Ado が骨芽細胞における RANKL 発現を制御することにより破骨細胞分化制御に関与していることを示唆している。

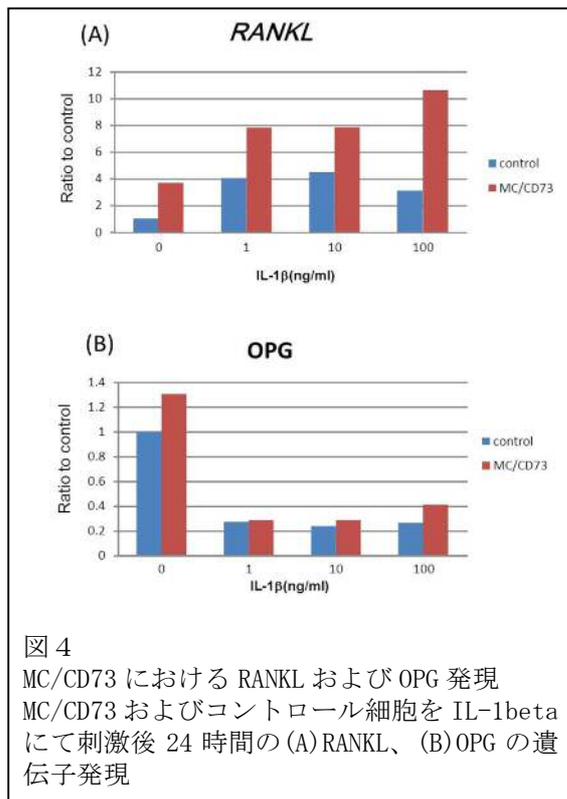


図 4

MC/CD73 における RANKL および OPG 発現
MC/CD73 およびコントロール細胞を IL-1beta にて刺激後 24 時間の (A)RANKL、(B)OPG の遺伝子発現

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 1 件)

①竹立匡秀、アデノシンによる骨芽細胞分化制御機構、大阪大学歯学雑誌、査読無、57 巻、2012、1-6 ページ

[学会発表] (計 3 件)

①Masahide Takedachi, Hiroyuki Oohara, Mitsuyoshi Iyama, Linda F. Thompson, Shinya Murakami: CD73 and its role in osteoblast differentiation、Purine 2012、2012 年 5 月 31 日、福岡県福岡市

②竹立匡秀：アデノシンによる骨芽細胞分化制御機構、大阪大学歯学会 第 113 回例会、2012 年 1 月 12 日、大阪府吹田市

③大原廣之、竹立匡秀、伊山舜吉、村上伸也：

CD73(ecto-5'-nucleotidase)によるアデノシン受容体活性化制御が骨芽細胞分化に及ぼす影響、第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011 年 7 月 29 日、大阪府大阪市

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹立 匡秀 (TAKEDACHI MASAHIDE)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60452447