

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592164  
 研究課題名（和文）白血球によるLPS誘発性サイトカイン産生におけるアデノシン受容体の発現変動  
 研究課題名（英文）Differentiation of the expression of adenosine receptor affect LPS-induced cytokine production by leukocytes  
 研究代表者  
 大浦 清（OHURA KIYOSHI）  
 大阪歯科大学・歯学部・教授  
 研究者番号：20131378

## 研究成果の概要：

アデノシン受容体ファミリーを介したシグナル伝達機構は、炎症の惹起と収束のバランスの維持に関与していると考えられているが、詳細な時空間的発現動態は未だ不明である。そこで本研究では、(1) *in vivo* 及び *in vitro* における、アデノシン受容体ファミリーの詳細な発現動態及び発現細胞の同定、(2) アデノシン受容体の時空間的制御機構の解明を試みた。その結果、マウス皮膚創傷治癒モデル (*in vivo* 解析) では、炎症期において、アデノシン受容体 A1、A2A、A2B、A3 の発現が認められた。次に、マクロファージによるアデノシン受容体の発現変動を調べるため、マウス腹腔内よりマクロファージを採取し、培養条件下において LPS 刺激を行い、各種アデノシン受容体の発現変動を RT-PCR 法を用いて調べた (*in vitro* 解析)。その結果、アデノシン受容体 A2A の遺伝子発現は 6 時間後に高発現が認められ、その後 24 時間後には減弱した。また、アデノシン受容体 A2B の遺伝子発現に関しては、1 時間後から高発現が認められた。高発現は 12 時間持続した後、24 時間後には減弱した。一方、アデノシン受容体 A1 及び A3 の発現は認められなかった。以上の結果より、炎症期におけるマクロファージは、アデノシン受容体 A2A 及び A2B を介して、炎症の惹起と収束のバランスを維持していると示唆された。さらに、マクロファージにおけるアデノシン受容体 A2A の時空間的発現動態を調べるため、アデノシン受容体 A2A に GFP (緑色蛍光物質) を結合させたプラスミドを構築し、ライブイメージング解析を試みた。本研究結果により、炎症期においては、アデノシン A2A 及び A2B 受容体が中心となって役割を担っていることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：歯科薬理学

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

エンドトキシンショックは生体内に進入したグラム陰性菌外膜の主要構成成分の一つであるリポポリサッカライド (LPS) により引き起こされるが、この時、病原性細菌の毒性とマクロファージ及び好中球による防御反応により種々の炎症反応が惹起される。

本来、炎症反応は組織再生や修復を伴った生体防御反応の一つであるので、生体にとっては有利な反応とされる。特に病原体侵入に伴った生体防御反応は、その大部分が病原体から生体を守るためのものであるため、炎症を完全に抑制することはむしろ好ましくない。

一方、アデノシンあるいは ATP は細胞内においてエネルギー代謝関連物質として重要な機能的役割を演じる。さらに、両分子は出血成分中にも多量に存在することから、歯科領域のように出血を伴った炎症部位等では、アデノシンあるいは ATP が炎症反応を担うマクロファージあるいは好中球に対して、なんらかの機能的役割を演じている可能性は、高いものと思われる。

最近では、炎症時における LPS が出血部位から末梢血流へと入り、心臓及び肺においてショック死を引き起こす可能性が示されているが、その分子メカニズムは明らかではない。

これまで私達は、LPS 刺激におけるマクロファージ細胞株 Raw264 でのアデノシン受容体及び LPS 受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) の発現相互作用の解明を行い、LPS 刺激によってアデノシン受容体 A2A と TLR4 が共に高発現し、サイトカイン産生に関与する可能性を見出した。

そこで本研究では、更なる分子メカニズムの解明を行い、より詳細な炎症期におけるアデノシン受容体ファミリーの発現変動及びアデノシン受容体ファミリーを介したサイトカイン産生機構の解明を試みた。

## 2. 研究の目的

(1) in vivo 及び in vitro 解析による、炎症期アデノシン受容体ファミリーの発現動態の解明

(2) アデノシン受容体の時空間的制御機構の解明

## 3. 研究の方法

(1) in vivo 及び in vitro 解析による、炎症期アデノシン受容体ファミリーの発現動態の解明

(In vivo 解析)

個体レベルでの、炎症期におけるアデノシン

受容体ファミリーの発現動態を調べるため、マウス皮膚創傷治癒モデルを用いて、アデノシン A1, A2A, A2B, A3 受容体の発現動態を RT-PCR 法を用いて解析した。

研究方法は、まず最初に、マウス背部に直径 4mm の皮膚打ち抜き損傷を作成し、各受傷後 (各 1、3、7、10、14 日) に、創部を中心として直径 6mm のバイオプシーで創傷部を採取した。その後、Trizol (invitorgen) を用いて total RNA を抽出、ゲノム DNA の分解、カラムによる total RNA の精製 (Qiagen) を行った。精製後の total RNA を用いて、逆転写反応を cDNA 合成試薬 (アプライドバイオシステムズ) を用いて行い、合成した cDNA を鋳型として、PCR を行った (アニーリング温度 : 58 度、伸張 : 1 分、35 cycles)。

(In vitro 解析)

炎症期においてマクロファージが発現するアデノシン受容体の発現動態を調べるため、培養条件下における LPS 刺激による解析を行った。

研究方法は、まず最初に、チオグリコレート 2.5 ml を 6-8 週齢 ICR マウス (雄) の腹腔内に投与して、4 日後にマクロファージを採取した (無菌性炎症モデル)。その後、Lysis buffer を用いて溶血処理を行い、L-グルタミン、抗生物質、10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (Invitogen) を用いて、5% CO2 条件下で 24 時間培養した。なお、マクロファージの確認は、F4/80 抗体を用いた蛍光免疫染色法により確認を行った。そして LPS (100 ng/ml) を用いて刺激を行い、各経過時間後に (各 1、3、7、10、14 日)、マクロファージを回収して、Trizol (invitorgen) を用いて total RNA を抽出、ゲノム DNA の分解、カラムによる total RNA の精製 (Qiagen) を行った。精製後の total RNA を用いて、逆転写反応を cDNA 合成試薬 (アプライドバイオシステムズ) を用いて行い、合成した cDNA を鋳型として、PCR を行った (アニーリング温度 : 58 度、伸張 : 1 分、30 cycles)。

(2) アデノシン受容体の時空間的制御機構の解明

アデノシン受容体の時空間的発現動態を明らかにするため、生細胞ライブイメージング法を試みた。

まず最初に in vivo 解析によって得た cDNA を鋳型として、全長アデノシン受容体 A1、A2A、A3 (ストップコドンを除くエキソンのみ) を PCR によって取得した。その後、TOPO GFP (Green Fluorescence Protein) vector (invitogen) を用いて TA クローニングを

行い GFP 結合各種アデノシン受容体を含むプラスミドを構築した。その後、シーケンスによって塩基配列及びアミノ酸配列の確認を行った。

次に、in vitro 解析において得たマクロファージに、上記手法で作成したプラスミドを Lipofectamine2100 (invitrogen) を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション 4 時間後に培地を交換して 48 時間培養した。培養後、BIOREVO (KEYENCE) を用いて顕微鏡観察を行い、マクロファージにおける GFP 結合アデノシン受容体の発現確認を行い、確認後、アデノシン (1 $\mu$ M/L) (Sigma) を投与して、生細胞ライブイメージング法を用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 皮膚創傷治癒過程におけるアデノシン受容体ファミリーの発現動態

アデノシン A1, A2A, A2B, A3 受容体の発現動態を RT-PCR 法を用いて調べた (図 1)。その結果、炎症期において各アデノシン受容体の発現が認められた。

また、増殖期、成熟期においても発現が認められることから、皮膚創傷治癒過程においては、炎症細胞以外の細胞にも発現している可能性があることが示唆された。

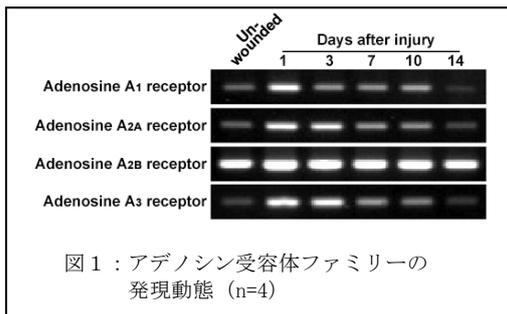
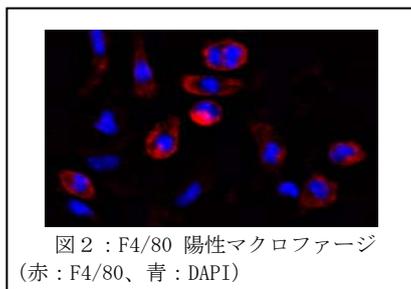


図 1 : アデノシン受容体ファミリーの発現動態 (n=4)

##### (2) LPS 刺激によるマクロファージにおけるアデノシン受容体の発現動態

腹腔内より採取したマクロファージを免疫染色で確認した結果、採取されたほぼすべての細胞はマクロファージであることが確認された (図 2)。



次に、採取したマクロファージを LPS 刺激を行い、アデノシン A1, A2A, A2B, A3 受容体の発現動態を RT-PCR 法を用いて調べ

た (図 3)。その結果、アデノシン A2A 及び A2B 受容体の発現が認められた。一方、アデノシン A1 及び A3 受容体の発現は認められなかったことから、炎症期におけるマクロファージにおいては、主にアデノシン A2A 及び A2B 受容体を介したシグナル伝達系が、サイトカイン産生を促していると考えられる。

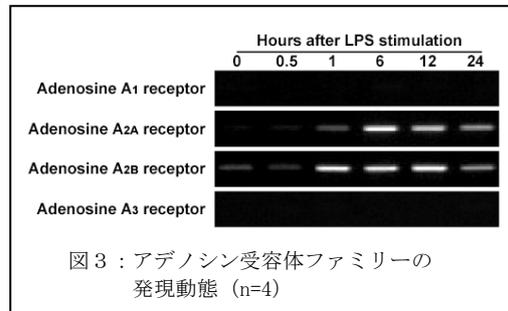


図 3 : アデノシン受容体ファミリーの発現動態 (n=4)

##### (3) アデノシン A2A 受容体ライブイメージング解析

アデノシン受容体ファミリーの時空簡的発現制御機構を調べるために、GFP を結合した各アデノシン受容体を構築し、トランスフェクションを行った (図 4)。

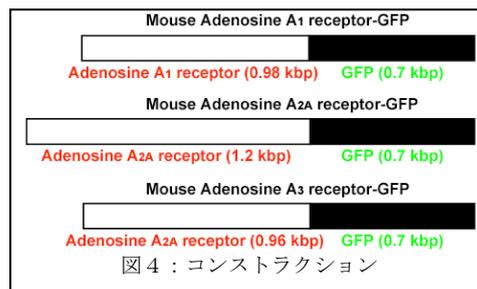


図 4 : コンストラクション

その結果、アデノシン A2A 受容体はマクロファージ細胞膜に発現することが確認された (図 5)。

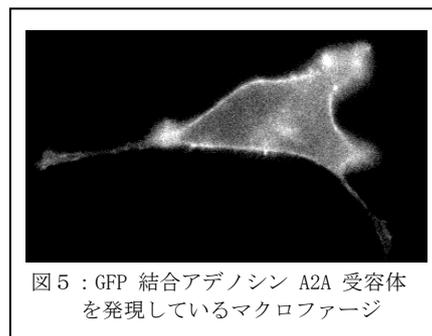


図 5 : GFP 結合アデノシン A2A 受容体を発現しているマクロファージ

これまで、ライブイメージング解析用 GFP 結合アデノシン受容体ファミリーベクター構築については報告されていない。よって本研究により構築されたベクターは、今後のライブイメージング解析において有用な研究ツールとなると考えている。

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3件)

- ① 渡邊京子, 白数慎也, 大東希好, 大浦 清, 大東道治. LPS 刺激乳歯歯髓由来線維芽細胞における MMP-2 産生増強. J Oral Bioscience, Vol.49, Suppl., 179, 2007.
- ② Ryusuke Nakatsuka, Tadashige Nozaki, Kiyoshi Ohura. J Dilazep decrease LPS-induced nitric oxide and TNF  $\alpha$  synthesis in RAW264. J Pharmacological Science, Vol.106, Suppl. I, 198P, 2008.
- ③ 渡邊京子, 白数慎也, 大東希好, 大浦 清, 大東道治. 乳歯歯髓由来線維芽細胞の MMP-2 産生における P I 3-K の関与について. 歯薬療法, Vol.27, NO.3, 188, 2008.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大浦 清 (OHURA KIYOSHI)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：20131378

(2) 研究分担者

篠原 光子 (SHINOHARA MITSUKO)  
大阪歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：40067187

(3) 連携研究者

森 亮一 (MORI RYOICHI)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：30509310